

**Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

**Wirkung von verschiedenen hydraulischen Silikatzementen auf
orale Zellen *in vitro*: Biokompatibilität, Entzündungsregulation und
regeneratives Potential**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Katharina Broos
aus München

2017

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. dent. Karin C. Huth

Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. dent. Jan-Frederik Güth
Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. Harald Mückter

Mitbetreuung durch
den promovierten Mitarbeiter: Dr. med. dent. Maximilian Kollmuß

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Ansätze zur Gewebsregeneration in der Zahnmedizin.....	6
1.2	Klinische Indikationen und deren zugrundeliegende Ätiologie.....	6
1.2.1	Indirekte und direkte Überkappung und Pulpotomie	7
1.2.2	Apexifikation	8
1.2.3	Perforationsdeckung.....	9
1.2.4	Retrograde Wurzelkanalfüllung nach Wurzelspitzenresektion	10
1.3	Materialien aus der Gruppe der hydraulischen Silikatzemente	10
1.3.1	ProRootMTA.....	11
1.3.2	Medcem MTA	12
1.3.3	Biodentine.....	13
1.4	Wirkung der Zementeluat auf orale Zellen <i>in-vitro</i>	14
1.4.1	Biokompatibilität.....	14
1.4.1.1	Zytotoxizität.....	15
1.4.1.2	Genotoxizität.....	16
1.4.3	Wirkung auf Wege der inflammatorischen Signatransduktion	17
1.4.3.1	NF-κB-System	17
1.4.3.2	Cyclooxygenase-System	19
1.4.4	Wirkung auf Differenzierung von Stammzellen	20
1.4.4.1	Differenzierung von hMSC und hPDSC_hTERT.....	23
2	Fragestellung und Studienziele	26
3	Material und Methoden	28
3.1	Herstellung der Zementextrakte.....	28
3.2	Zellkultur.....	28
3.2.1	Kulturbedingungen.....	29
3.2.2	Passagieren und Konservierung	30
3.3	Toxizitätsassays	31
3.3.1	WST-8-Test	31
3.3.2	Mikrokerntest	33
3.4	Einfluss auf die inflammatorische Signaltransduktion	35
3.4.1	NF-κB-System	35

3.4.1.1	Stimulationsparameter für den Nachweis von p65 und IκBα	35
3.4.1.2	Extraktion der Proteine	36
3.4.1.3	Messung der Proteinkonzentration	37
3.4.1.4	Elektrophorese/Western Blot zum Nachweis von NF-κB p65 und IκBα ...	37
3.4.1.5	Probenherstellung für IL-6 ELISA	40
3.4.1.6	ELISA zum Nachweis der IL-6 Konzentration	40
3.4.2	COX-System.....	43
3.4.2.1	Stimulationsparameter für den Nachweis von COX-2.....	43
3.4.2.2	Elektrophorese und Western Blot Verfahren zum Nachweis von COX-2.	43
3.4.2.3	Probenherstellung für PGE ₂ EIA.....	44
3.4.2.4	EIA zum Nachweis der PGE ₂ Konzentration.....	44
3.5	Regeneratives Potential der Zemente	45
3.5.1	Nachweis von RUNX2 mittels Western Blot.....	45
3.5.2	Nachweis von Osteocalcin mittels ELISA	46
4	Ergebnisse	47
4.1	Toxizitätsassays	47
4.1.1	WST-8-Test	47
4.1.2	Mikrokerntest	48
4.2	NF-κB-System	48
4.2.1	IκBα und NF-κB p65 Nachweis mittels Western Blot	49
4.2.2	IL-6 Nachweis mittels ELISA.....	50
4.3	Cyclooxygenase System.....	51
4.3.1	COX-2 Nachweis mittels Western Blot	51
4.3.2	PGE ₂ Nachweis mittels EIA.....	52
4.4	Regeneratives Potential	54
4.4.1	RUNX2 Nachweis mittels Western Blot	54
4.4.2	Osteocalcin-ELISA.....	55
5	Diskussion	57
6	Zusammenfassung	64
7	Literaturverzeichnis.....	66
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	82

9	Abkürzungsverzeichnis.....	84
10	Reagenzien und Chemikalien	87
10.1	Chemikalien.....	87
10.2	Rezepte	88
10.3	Verwendete Kits.....	88
11	Danksagung	89
12	Lebenslauf..... Fehler! Textmarke nicht definiert.	

1 Einleitung

1.1 Ansätze zur Gewebsregeneration in der Zahnmedizin

In den letzten Jahren ist in der Zahnmedizin ein Trend zu regenerativen Therapieverfahren zu beobachten. Insbesondere im Bereich der Endodontie sind viele Techniken und Materialien eingeführt worden, die zu einer deutlichen Verbesserung der klinischen Behandlungserfolge im Sinne einer Gewebsregeneration geführt haben (Bansal *et al.*, 2014; Murray *et al.*, 2007). Dazu zählen beispielsweise die Regeneration von Hydroxylapatit, die Induktion einer Hartsubstanzbarrierebildung im Bereich von Pulpa und Parodont durch Calciumhydroxidpräparate oder sogar die vollständige Regeneration der pulpalen Gewebe bei Zähnen von Heranwachsenden durch den Einsatz einer Tri-Antibiotika-Paste (Steffen *et al.*, 2011). Durch einen immer höheren Anspruch des Patienten an einen langfristigen Zahnerhalt sind diese neuen Methoden auch für schwierige Ausgangssituationen im Bereich der Endodontie von immer größerer Wichtigkeit. Eine herausragende Rolle auf diesem Gebiet spielen neue, besonders biokompatible Materialien, die an der empfindlichen Schnittstelle zwischen Wurzelkanalsystem und Parodontium zum Einsatz kommen (Torabinejad *et al.*, 2010). Diese Materialien sollten nicht nur biokompatibel sein, sondern darüber hinaus auch den Heilungsprozess fördern und unterstützen. In den vergangenen Jahren kamen einige solcher meist auf Tricalciumsilikat-Zementen basierender Materialien auf den Markt, welche zur großen Gruppe der hydraulischen Silikatzemente zählen (Darvell *et al.*, 2011). Um die Wirkung dieser Materialien auf zellulärer Ebene besser zu verstehen, gilt es diese auf deren Eigenschaften im Bezug auf Biokompatibilität, Beeinflussung der Entzündungsantwort und regeneratives Potential zunächst *in vitro* zu untersuchen.

1.2 Klinische Indikationen und deren zugrundeliegende Ätiologie

Die klinischen Indikationen für den Einsatz dieser Materialien sind im Bereich der Kronenpulpa die indirekte Überkappung („Caries profunda Behandlung“) (Petrou *et al.*, 2014;) und die direkte Überkappung (Bidar *et al.*, 2014). Auch die Vitalamputation an Milchzähnen (Menezes *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2013) und die partielle Pulpotomie an Zähnen der zweiten Dentition gehören zu den Indikationsgebieten (Chailertvanitkul *et al.*, 2014). Im apikalen Bereich des Zahnes sind die Apexifikation

bei noch nicht abgeschlossenem Wurzelwachstum (Torabinejad *et al.*, 1999; Bonte *et al.*, 2014), die Deckung von iatrogenen Perforationen (De-Deus *et al.*, 2006) und die retrograde Wurzelkanalfüllung nach Wurzelspitzenresektion zu nennen (Bernabè *et al.*, 2005).

Grundlage für die genannten Indikationen ist zumeist eine Karieserkrankung und ein daraus resultierender Zahnhartsubstanzverlust. Karies ist ein multifaktorieller Prozess der Demineralisation von Zahnhartsubstanzen, der progredient fortschreitend zu irreversiblen Zahnhartsubstanzverlust führt (Arends, 1969; König, 1971). Die Zerstörung und Demineralisation der Zahnhartsubstanz kommt durch länger anhaltende Säureangriffe zustande (König, 1987). Keyes stellte fest, dass Karies auf drei grundlegenden Faktoren beruht, nämlich dem Zusammenspiel aus Zahnhartsubstanz, Mikroorganismen und dem Substrat für Mikroorganismen (Keyes, 1960; Keyes, 1968). König ergänzte diese Theorie 1987 um den Faktor Zeit (König, 1987).

Ein strukturierter Biofilm bestehend aus säureproduzierenden Mikroorganismen, der in diesem Fall als Plaque bezeichnet wird, ist die Grundlage der Kariesentstehung (Axelsson und Lindhe, 2004). Die genaue Zusammensetzung der Plaque spielt dabei eine entscheidende Rolle: Zu den Karies-auslösenden Spezies gehören vor allem Laktobazillen, Aktinomyzeten und Streptokokken (v.a. *Streptococcus mutans* und *Streptococcus sobrinus*) (Bowden, 1990; Loesche, 1986).

Diese zahlreichen pathogenen Faktoren tragen im Gesamten dazu bei, dass Zahnhartsubstanz irreversibel demineralisiert und somit verloren geht.

Jedoch nicht nur Karies, sondern auch ein Trauma kann einigen der oben genannten Indikationen vorausgehen. Im Verlauf eines Traumas kann es zur bakteriellen Invasion der ungeschützten Pulpa oder des Wurzelkanalsystems kommen (Zaleckiene *et al.*, 2014). Nun soll im Folgenden auf die genannten Indikationen genauer eingegangen werden.

1.2.1 Indirekte und direkte Überkappung und Pulpotomie

Eine indirekte Überkappung im Bereich des Dentins wird notwendig wenn die Restdentinstärke zur Pulpa nur noch sehr gering ist, beispielsweise nach Entfernung einer tiefen Karies („Caries profunda“) (Opal *et al.*, 2014). Die direkte Überkappung hingegen wird notwendig, wenn ein Teil der Pulpa eröffnet ist (Attin *et al.*, 1993).

Ziele der indirekten und direkten Überkappung sind der Schutz der vitalen Pulpa vor exogenen Noxen, das Abtöten von verbliebenen Mikroorganismen, Härtung und Austrocknung von erweichtem Dentin und die Regeneration und Bildung von Tertiärdentin (Eskandarizadeh *et al.*, 2011). Durch Applikation eines geeigneten Materials als Wundverband soll die Pulpa demnach vital erhalten werden. Ein Material, welches bisher als Mittel der Wahl galt ist Calciumhydroxid [Ca(OH)₂] (Auschill *et al.*, 2003). Jedoch weist dieses deutliche Nachteile auf, bezogen auf die Dauer der Induktion der Hartgewebsbildung und die Qualität dieser (Bakland *et al.*, 2012).

Im Zuge der genannten Indikationen indirekte und direkte Überkappung ist noch eine weitere zu nennen: die Vitalamputation. Diese ist bei Pulpafreilegung an symptomlosen, kariösen Zähnen der ersten Dentition indiziert (Fuks *et al.*, 2002, Parisay *et al.*, 2015). Aufgrund der morphologischen Eigenschaften des Milchzahnes gestaltet sich eine konventionelle Wurzelkanalbehandlung hier schwierig. Aber auch nach traumatischer Freilegung der Pulpa an jugendlichen Zähnen der zweiten Dentition mit nicht abgeschlossenem Wurzelwachstum ist die sogenannte partielle Pulpotomie möglich, allerdings nur wenn seit dem Trauma nicht mehr als 12 h vergangen sind. Die partielle Pulpotomie wird durchgeführt um die Vitalität des Zahnes zu gewährleisten und somit auch das weitere Wurzelwachstum zu sichern (Ghoddusi *et al.*, 2014). Das bisher für die partielle Pulpotomie hauptsächlich verwendete Material ist Calciumhydroxid (Chailertvanitkul *et al.*, 2014; Huth *et al.*, 2005). Calciumhydroxid zieht allerdings in einigen Fällen interne Wurzelresorptionen nach sich, was ein Risiko bei der Anwendung birgt (Liu *et al.*, 2011).

1.2.2 Apexifikation

Die Apexifikation ist indiziert bei devitalen jugendlichen Zähnen, welche kein abgeschlossenes Wurzelwachstum aufweisen (Bishop *et al.*, 2002). Der Apex dieser Zähne ist weit offen und es findet sich keine apikale Konstriktion. Ziel der Apexifikation war es bisher, eine apikale Hartgewebsbildung zu induzieren, um einen apikalen Stopp zu generieren. Dieser Stopp ist notwendig, um die spätere Wurzelkanalfüllung des devitalen Zahns zu ermöglichen (Ghaziani *et al.*, 2007; Steiner *et al.*, 1968). Auch soll das Wurzelkanalsystem vor dem Eindringen von Mikroorganismen geschützt werden. Das bisher für die Apexifikation verwendete Material ist ebenfalls Calciumhydroxid, welches durch eine oberflächliche

Kolliquationsnekrose die Bildung einer körpereigenen Hartschubstanzbarriere induziert (Mohammadi *et al.*, 2011; Corbella *et al.*, 2014). Nachteile von Calciumhydroxid sind allerdings der lange Behandlungszeitraum von mehreren Monaten, die erhöhte Frakturgefahr der behandelten Zähne während dieser Zeit und auch die teils undichte gebildete Hartschubstanzbarriere (Kumar *et al.*, 2014; Flanagan 2014). Nun wurden als Alternativen neue Materialien gesucht, mit denen es möglich ist direkt eine künstliche apikale Barriere zu formen. Gegen diese Barriere an der Wurzelspitze kann der Behandler dann die Wurzelfüllung kondensieren (Silva *et al.*, 2015). Hierfür haben sich bereits Materialien aus der Gruppe der hydraulischen Silikatzeemente etabliert (Hong *et al.*, 2008).

1.2.3 Perforationsdeckung

Eine Perforation des Wurzelkanalsystems zum Parodont im Rahmen einer Wurzelkanalbehandlung ist eine Behandlungskomplikation, welche sowohl iatrogen als auch pathologisch verursacht werden kann. Die Gründe der iatrogenen Perforation sind beispielsweise stark gekrümmte Kanäle, falsche Aufbereitungstechniken oder die inkorrekte Handhabung von Instrumenten. Pathologische Prozesse wie Karies können ebenfalls eine Perforation verursachen (Alhadainy *et al.*, 1994). Eine Perforation kann entweder die Wurzeln betreffen oder aber auch bereits den Boden des Pulpenkavums im Bereich der Furkation. Durch eine Abdeckung der Perforationsstelle mit einem geeigneten Material wird ein bakteriendichter Verschluss gewährleistet (Martin *et al.*, 1982). Perforationen wurden bislang mit Amalgam, Glasionomerzement, Guttapercha, Intermediate Restorative Material IRM oder Calciumhydroxid gedeckt (Tasatsas *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2006; Bellam *et al.*, 2009). Calciumhydroxid bewirkt, wie bei der Apexifikation schon beschrieben, die Induktion einer Barrierebildung der beteiligten Hart- und Weichgewebe. So wird die Stabilität der Wurzeln oder des Pulpakammerbodens wieder hergestellt (Büttel *et al.*, 2013). Calciumhydroxid erweist sich jedoch nicht als vollständig zufriedenstellend (Bryan *et al.*, 1999). Sowohl Amalgam als auch IRM weisen eine gewisse Toxizität und mangelhafte Biokompatibilität auf (Wang *et al.*, 2009; Al-Sabek *et al.*, 2005). Glasionomerzeemente sind hinsichtlich der Biokompatibilität ebenfalls verbesserungswürdig (Tai *et al.*, 2000). Auch im Bereich dieser Indikation werden also Materialien gesucht, welche diese genannten Mängel nicht aufweisen. Bis dato haben sich für diese Indikation ebenfalls die hydraulischen

Silikatzemente im klinischen Einsatz bewährt (Mente *et al.*, 2014). Nun sollen neu auf den Markt gekommene Materialien für diese Indikationsgebiete genauer untersucht werden.

1.2.4 Retrograde Wurzelkanalfüllung nach Wurzelspitzenresektion

Als invasivste Methode bei der der Einsatz von regenerativen Materialien gerechtfertigt erscheint, kann die Wurzelspitzenresektion gelten, welche eine Technik aus dem Bereich der endodontischen Chirurgie ist. Grundsätzlich notwendig wird eine Wurzelspitzenresektion bei Versagen oder Unmöglichkeit einer orthograden endodontischen Behandlung und dem Misserfolg einer Wurzelkanalrevision (gemäß der Leitlinie zur Wurzelspitzenresektion der DGZMK 2009). Auch das Vorliegen einer Fraktur im unteren Wurzeldrittel oder Abbruch einer Instrumentenspitze im apikalen Wurzelbereich sind mögliche Indikationen für einen solchen Eingriff (Kunkel *et al.*, 2007). Im Anschluss an eine Wurzelspitzenresektion muss eine retrograde Wurzelkanalfüllung erfolgen, um das Wurzelkanalsystem nach apikal dicht zu verschließen (Friedman, 1991). Dieser Verschluss gelingt durch ein geeignetes Füllungsmaterial.

Verschiedene Studien haben sich in der Vergangenheit mit den Materialien und deren Erfolgsrate bei retrograd gefüllten Zähnen nach Wurzelspitzenresektion beschäftigt. Zu nennen sind unter anderem Amalgam, IRM (Zinkoxid-Eugenol-Zement; Dentsply, Ballaigues, Schweiz), Glasionomerezemente (GIZ), Guttapercha und Komposite (Finne *et al.* 1977; Dorn *et al.* 1990; Rud *et al.*, 1991; Jesslén *et al.*, 1995; Trope *et al.*, 1996). Dabei hat sich keines dieser Materialien durchsetzen können, da entweder eine hohe Zytotoxizität, wie bei Amalgam und IRM (Zhu *et al.*, 1999), oder eine schwierige Verarbeitung und daraus resultierende unsichere werkstoffkundliche Eigenschaften (bei GIZ und Komposit) (De Bruyne *et al.*, 2004) vorliegen.

1.3 Materialien aus der Gruppe der hydraulischen Silikatzemente

Die bereits genannten klinischen Indikationen im Bereich der Endodontie wurden in der Vergangenheit mit den beschriebenen unterschiedlichen Materialien versorgt. Aufgrund der bereits genannten Nachteile der Materialien wurde jedoch nach neueren, universell einsetzbaren gesucht. Hier ist besonders die Gruppe der hydraulischen Silikatzemente von Interesse.

In den 1990er Jahren wurde Mineral Trioxide Aggregate (MTA; z.B. ProRootMTA[®]; Dentsply, York, PA, USA) entwickelt (Torabinejad *et al.*, 1994; Torabinejad *et al.*, 1995). MTA vereint einige chemische und physikalische Anforderungen an einen in der Endodontie einsetzbaren Zement, beispielsweise Biokompatibilität und geringe Zytotoxizität (Ceci *et al.*, 2015). Die schwierige Handhabung und die lange Abbindezeit von MTA waren jedoch Gründe für die Suche nach weiteren verbesserten Materialien (Torabinejad *et al.*, 1995; Elnaghy *et al.*, 2013; Parirokh *et al.*, 2010). Aus diesem Grund gelangten in den vergangenen Jahren weitere Untergruppen der hydraulischen Silikatzemente auf den Markt. Ein Beispiel für so eine Untergruppe ist reiner Portland-Zement. Das Produkt Medcem MTA gehört zu dieser Gruppe und stellt eine interessante Neuentwicklung auf diesem Gebiet dar: es besteht aus der Mischung eines Portland-Zements und dem Röntgenkontrastmittel Zirconiumdioxid (Medcem MTA[®]; Medcem GmbH, Weinfelden, Schweiz; Attik *et al.*, 2014). Eine andere Untergruppe der hydraulischen Silikatzemente sind die MTA-Derivate. Dazu gehört Biodentine. Es wird auch zu den bioaktiven Gläsern auf Calciumsilikatbasis gezählt (Biodentine[®]; Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, Frankreich). Durch Zusatz des Abbindebeschleunigers Calciumchlorid wird die Abbindezeit von bioaktiven Gläsern deutlich verkürzt, vor allem im Vergleich zu den Portland-Zement-Derivaten. Daher ist es nun von besonderem Interesse, auch die Eigenschaften der neueren Materialien Medcem MTA und Biodentine genauer zu untersuchen, um deren Einsetzbarkeit unter anderem im Bereich der Endodontie zu bestätigen.

1.3.1 ProRootMTA

ProRootMTA ist ein Derivat des Portland-Zements (Mitchell *et al.*, 1999; Torabinejad *et al.*, 1995). Er besteht aus verschiedenen Oxidverbindungen wie Tricalciumsilikat, Dicalciumsilikat, Tricalciumaluminat, Tetracalciuminulferrit, Calciumsulfatdihydrat und zusätzlich Bismutoxid zur Verbesserung der Röntgenopazität. ProRootMTA wird nach Hellwig und Mitarbeitern in einem Verhältnis von 3:1 (1g MTA:0,35 g H₂O; Hellwig *et al.*, 2013) mit destilliertem Wasser angemischt. Der Hersteller Dentsply gibt keine genauen Angaben zum Mischungsverhältnis an. Je nach gewünschter Viskosität soll der Behandler selbst die Wassermenge bestimmen. Beim Abbinden bildet ProRootMTA ein kolloidales Gel. Die Abbindezeit beträgt durchschnittlich 165

min (Torabinejad *et al.* 1995). Nach dem Anmischen weist MTA einen pH-Wert von 10 auf, welcher innerhalb von 3 h auf 12,5 steigt.

Verschiedene Studien beschäftigten sich in den vergangenen Jahren mit den Eigenschaften von ProRootMTA im Hinblick auf die oben genannten Indikationsbereiche, wie die indirekte und direkte Überkappung oder die retrograde Füllung von Zähnen nach Wurzelspitzenresektion und Apexifikationen. In einer Studie lag die Heilungsrate der 64 untersuchten Zähne mit iatrogener Wurzelperforation, die alle mit ProRootMTA behandelt worden waren, bei 86% (Mente *et al.*, 2014). In einer weiteren Studie wurde die Adaptation von verschiedenen Materialien an den Wänden von Wurzelkanälen untersucht. ProRootMTA wurde mit AH Plus Sealer (Dentsply) und Portlandzement mit 20% Zirconiumdioxid Beimischung verglichen. Die Adaptation von ProRootMTA in 1 mm Entfernung vom Apex der retrograd gefüllten Zähne unterschied sich statistisch nicht von der Adaptation der anderen Materialien (Amoroso-Silva *et al.*, 2014). Auf Basis der Ergebnisse ist MTA in werkstoffkundlicher Hinsicht ein guter Ersatz für die bis dato existierenden Materialien in der Endodontie, es bedarf jedoch weitere Studien in dieser Richtung.

1.3.2 Medcem MTA

Medcem MTA gehört, ebenso wie ProRootMTA, zu den hydraulischen Silikatzementen und unterscheidet sich von ProRootMTA nach Angaben des Herstellers durch die Beimischung von Zirconiumdioxid anstelle von Bismutoxid als Röntgenkontrastmittel. Das Pulver wird, wie ProRootMTA, mit Wasser angemischt. Das genaue Verhältnis Wasser zu Pulver wird vom Hersteller nicht angegeben. Der Behandler entscheidet je nach gewünschter Viskosität die Menge an Wasser die hinzugegeben wird. Zu der großen Gruppe der hydraulischen Silikatzemente gibt es zu diesem Zeitpunkt einige Studien, die sich jedoch nicht speziell auf das Produkt Medcem MTA beziehen sondern auf die Portlandzemente im Allgemeinen. Dies stellt ein Problem der Forschung dar, da der Begriff „Portlandzement“ eine Vielzahl an unterschiedlich zusammengesetzten Materialien bezeichnet. Die genauen Bestandteile der Portlandzemente werden nicht einheitlich kontrolliert oder garantiert.

Die Indikationen für die Anwendung von Medcem MTA decken sich naturgemäß mit den Indikationen für ProRootMTA. Eine Studie verglich *in vitro* das Abdichtungsvermögen von Portlandzement und ProRootMTA an insgesamt 24

retrograd gefüllten Zähnen. Zwischen beiden Materialien wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt (Islam *et al.*, 2005). Eine weitere Studie stellte in Bezug auf Apexifikationen fest, dass das Abdichtungsvermögen der beiden Materialien Portlandzement und ProRootMTA ebenfalls vergleichbar war. Dazu war ein *in vitro* Apexifikationsmodell verwendet worden (Hong *et al.*, 2008).

Bis jetzt scheinen die reinen Portlandzemente, also auch Medcem MTA, im Vergleich zu den derzeit auf dem Markt erhältlichen Produkten wie ProRootMTA einen entscheidenden Vorteil zu haben, nämlich den geringen Kostenfaktor. Die hohe Verfügbarkeit und die niedrigen Kosten machen die Portlandzemente deshalb zu einer interessanten Alternative (Tenório de Franca *et al.*, 2010). Auf die weiteren Eigenschaften des Materials wird im Folgenden näher eingegangen. Jedoch lässt die Studienlage bezüglich der biologischen Eigenschaften speziell für das Medcem MTA Produkt trotz einiger vorliegender Untersuchungen zu wünschen übrig. Es bedarf somit umfassender Versuche um Medcem MTA als gleichwertigen Ersatz von ProRootMTA anzuerkennen.

1.3.3 Biodentine

Biodentine gehört ebenfalls zu den hydraulischen Silikatzementen, genauer zu der Gruppe der MTA Derivate. Es ist ein Material auf Calciumsilikatbasis welches seit 2009 auf dem Markt erhältlich ist (Malkondu *et al.*, 2014). Es beinhaltet vor allem Tricalciumsilikat (Camilleri *et al.*, 2013). Zusätzlich ist Calciumkarbonat beigefügt (Grech *et al.*, 2013) und als Röntgenkontrastmittel Zirconiumdioxid (Setbon *et al.*, 2014). Das Material liegt als Pulver in Kapselform vor und wird mit einer wässrigen Lösung aus Calciumchlorid in einem Triturator angemischt. Das Calciumchlorid trägt zu einer relativ schnellen Abbindezeit von 12 min bei (Septodont, Produktinformation Herstellerangaben). Grech und Mitarbeiter bestätigten eine schnelle Abbindezeit im Verhältnis zu anderen untersuchten Materialien wie beispielsweise IRM (Grech *et al.*, 2013).

Biodentine kann genauso wie ProRootMTA und Medcem MTA in verschiedensten Bereichen der Endodontie eingesetzt werden. Eine Studie untersuchte beispielsweise *in vitro* die Eigenschaften von Biodentine als Material für die Apexifikation. Es bestand ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Härte der Materialien Biodentine und ProRootMTA im Vergleich (Caronna *et al.*, 2014). Weiters wurde die Adaptation von Biodentine und MTA *in vitro* an 30 retrograd gefüllten

Zähnen überprüft und kein statistischer Unterschied zwischen den Materialien festgestellt (Soundappan *et al.*, 2014).

1.4 Wirkung der Zementeluate auf orale Zellen *in-vitro*

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Wirkung von Medcem MTA, ProRootMTA und Biodentine auf orale Zellen *in vitro*. Neben den bereits beschriebenen physikalisch-chemischen Eigenschaften müssen bei den neuen Materialien zunächst vor allem deren Eigenschaften hinsichtlich der Biokompatibilität untersucht werden. Erstens soll eine möglichen Zytotoxizität oder Genotoxizität ausgeschlossen und die Biokompatibilität überprüft werden. Diese Eigenschaften sind relevant, da die Materialien mit Zahn oder Parodont und damit vitalem Geweben dauerhaft in Kontakt treten.

Zweitens soll der Einfluss auf die inflammatorische Signaltransduktions-Kaskade überprüft werden. Als klassische Signaltransduktionswege zur Testung der Wirkung auf das Entzündungsgeschehen können das „nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“ (NF- κ B)-System und das Cyclooxygenase-System (COX) gelten. Die Wirkung von neuen Materialien auf diese Systeme *in vitro* ist somit ein wichtiger Ansatzpunkt zum Verständnis ihrer entzündungsmodulierenden Wirkung.

Weiters wird das regenerative und das osteoinduktive Potential der Zemente untersucht. Die osteogene Differenzierung von parodontalen und mesenchymalen Stammzellen unter Einfluss dieser Materialien wird über die Expression des Transkriptionsfaktors RUNX2 und den Nachweis eines osteogenen Markers (Osteocalcin) untersucht.

Im Folgenden wird der bisherige Stand der Forschung zu diesen Themengebieten dargestellt. Dabei ist zu bemerken, dass in Bezug auf Medcem MTA bis jetzt nur wenige bis gar keine Forschungsergebnisse vorliegen. Dabei wären diese Forschungsergebnisse von Interesse, da Medcem MTA als Röntgenkontrastmittel Zirconiumdioxid anstelle von Bismutoxid zugesetzt ist, welches die Eigenschaften des Materials im Vergleich zu ProRoot MTA verändern könnte.

1.4.1 Biokompatibilität

Eine genaue Definition der Biokompatibilität wurde 2003 von Williams gegeben. Biokompatibilität ist die Fähigkeit eines Medizinproduktes dessen vorgesehene

Funktion zu erfüllen, sich aber gleichzeitig ohne unerwünschte lokale oder systemische Effekte in den Organismus zu integrieren (Williams, 2003). Ein biokompatibles Material sollte also weder zytotoxisch noch genotoxisch sein. Diese möglichen negativen Effekte der drei endodontischen Materialien auf humane Zellen müssen also für eine bedenkenlose Anwendung ausgeschlossen werden.

1.4.1.1 Zytotoxizität

Als Zytotoxizität wird die schädigende Wirkung einer Substanz auf vitale Zellen und Gewebe beschrieben. Zur Beurteilung der Zytotoxizität von Materialien und Substanzen und zum Nachweis des möglichen Zelltods können verschiedene *in-vitro*-Testverfahren eingesetzt werden. Dadurch wird die Wirkung der zu testenden Substanz auf die Zellviabilität überprüft, zumeist im Vergleich mit einer Negativkontrolle und einer Positivkontrolle. Die Zellviabilität bezeichnet den Anteil an vitalen Zellen innerhalb einer Zellpopulation. Eines dieser Testverfahren ist der WST-8-Proliferationstest (Water soluble Tetrazolium salts; PromoKine GmbH, Heidelberg, Deutschland). Mit diesem Verfahren werden die vitalen, metabolisch aktiven Zellen innerhalb einer Zellpopulation bestimmt. Der Test überprüft dies durch Nachweis der zeitgleichen Anwesenheit zellulärer Dehydrogenasen und geeigneter Reduktionsäquivalente beispielsweise NAD(P)H. Weitere mögliche Verfahren sind der Trypanblau-Ausschlusstest und beispielsweise der MTT-Test (Mosmann's tetrazolium toxicity; 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)).

Im Folgenden werden einige Studien beschrieben, welche die Biokompatibilität der Materialien größtenteils bestätigen. In einer *in-vitro*-Studie wurde an humanen dentalen Pulpa-Stammzellen die mögliche Zytotoxizität von ProRootMTA mittels eines MTT-Tests überprüft. Die Zellen zeigten keinerlei Anzeichen einer Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit und eine Steigerung der Proliferation konnte nachgewiesen werden (Jaberiansari *et al.*, 2014). Durch einen MTT-Test mit humanen Monozyten wurde kein signifikanter Unterschied zwischen Biodentine und ProRootMTA bezogen auf die Biokompatibilität festgestellt (Khedmat *et al.*, 2014). Biodentine wies in einem Zytotoxizitäts-Versuch mit humanen Fibroblasten des parodontalen Ligaments (hPDLF) nach Färbung mittels Trypanblau und Bestimmung der Zellzahl ein etwas höheres zytotoxisches Potential auf als MTA (Samyukhta *et al.* 2014). Die Portlandzemente schnitten in einem *in vitro* MTT-Test mit humanen

Fibroblasten des parodontalen Ligaments etwas besser ab als MTA (MTA Angelus; Londrina, PR, Brasilien) (Yoshino *et al.*, 2013).

Der MTT-Test bestimmt das Reduktionsvermögen mitochondrialer Dehydrogenasen von lebenden Zellen. Ein Vorteil des WST-8-Tests im Hinblick auf den MTT-Test ist die Verwendung von wasserlöslichem statt wasserunlöslichem Formazan (Tantular *et al.*, 2003). So entfällt der Lösungsschritt mit zytotoxischem DMSO (Dimethylsulfoxid), welcher beim MTT-Test notwendig ist (Sexton, 1979).

Trotz dieser Ergebnisse fehlt es an Studien, welche die Eigenschaften aller drei Materialien im Hinblick auf ihre Biokompatibilität vergleichen. Dies wäre ein wichtiger Faktor für den Einsatz von Medcem MTA, ProRootMTA und Biodentine in der Endodontie.

1.4.1.2 Genotoxizität

Für die Überprüfung der Genotoxizität und das Aufdecken von DNA- und Chromosomenschäden kann der Mikrokerntest herangezogen werden (Heddle *et al.*, 1991; Countryman *et al.*, 1976; Ostling *et al.*, 1984). Mikrokerne bestehen aus Chromatin und befinden sich getrennt vom Zellkern im Zytoplasma, sie enthalten also geschädigte DNA. Sie erscheinen jedoch viel kleiner als dieser (Schiffman *et al.*, 1991). Die Größe sollte nicht mehr als ein Drittel des Hauptkerndurchmessers betragen, sie sollten in dessen Nähe und in derselben Fokussierungsebene liegen. Weiters sollten sie keine Verbindung zum Hauptkern haben und einen glatten Umriss (Countryman *et al.*, 1976). Sie können durch exogen einwirkende Substanzen oder Noxen entstehen. Mikrokerne sind somit ein Maß für die chromosomale Schädigung (Evans *et al.*, 1959). Sie enthalten Chromosomen oder deren Bruchstücke und werden wie der Zellkern von einer Kernmembran mit Poren umgeben (Schiffmann *et al.*, 1991). Mikrokerne bestehen also aus DNA, die bei der Zellteilung nicht in einen der Tochterkerne integriert wurde (Schultz und Onfelt, 1994). Zur Detektion von Mikrokernen wird eine Methode nach Fenech und Mitarbeitern eingesetzt. Die Zellen werden mit der potentiellen Noxe in Kontakt gebracht. Die Teilung der Zellen wird abgewartet und die Zellen werden entsprechend angefärbt. Cytochalasin B wird noch vor der Noxe hinzugegeben. Dies ist sinnvoll, um unterscheiden zu können ob die Zellen bereits die Mitose durchlaufen haben oder nicht. Cytochalasin B hemmt nämlich die Zellteilung, nicht aber die Kernteilung. Wenn die Zellen nun eine Mitose durchlaufen, entstehen doppelkernige Zellen. Eine diploide Zelle mit einem Mikrokern

kann somit als genotoxisch geschädigte Zelle klassifiziert werden (Fenech *et al.*, 1985).

In Bezug auf das Mikrokern-Verfahren existieren für ProRootMTA, Medcem MTA und Biodentine bis dato wenige Studien. Eine *in vitro* Studie konnte nach Inkubation von V79 Zellen mit MTA Extrakten keine erhöhte Anzahl von Mikrokernen nachweisen (Camargo *et al.*, 2009). Eine weitere Studie überprüfte die Auswirkungen von hydraulischen Silikatzementen an humanen Lymphozyten mittels Mikrokern-Test. Das Auftreten von Mikrokernen war im Verhältnis ähnlich zu dem der Kontrollgruppe, also lag hier eine geringe Genotoxizität vor (Laurent *et al.*, 2008). Auch in Bezug auf die Genotoxizität sind weitere Studien im Hinblick auf die vorliegende Studienlage nötig.

1.4.3 Wirkung auf Wege der inflammatorischen Signaltransduktion

Die mögliche Wirkung der drei Materialien ProRootMTA, Medcem MTA und Biodentine auf die zelluläre inflammatorische Signaltransduktion wurde bereits in einigen Studien untersucht. Dabei kamen *in vitro* Zellkulturmodelle sowohl mit unstimulierten Zellen als auch mit artifiziell entzündlich stimulierten Zellen zum Einsatz. Zum einen erfolgte die Untersuchung in Bezug auf das NF- κ B-System, zum anderen auf das COX-System. Dabei ist bei Ersterem die Expression des Zytokins Interleukin 6 (IL-6) besonders von Interesse und bei Zweiterem die Expression des Arachidonsäurederivats Prostaglandin E₂ (PGE₂), da dieses die eigentliche Gewebsschädigung bedingt.

1.4.3.1 NF- κ B-System

NF- κ B ist ein essentieller Transkriptionsfaktor (Sen *et al.*, 1986). Dieser besteht aus einem Komplex aus mehreren Proteinen (p50, p105, p52, p100, p65, RelB, c-Rel) und befindet sich im Zytoplasma der Zellen des menschlichen Organismus. Dort wird NF- κ B durch Bindung an I κ B α Proteine (Inhibitors of κ B) im inaktiven Zustand gehalten (Baeuerle, 1988). Eine vereinfachte Übersicht über den NF- κ B-Signalweg zeigt Abbildung 1.

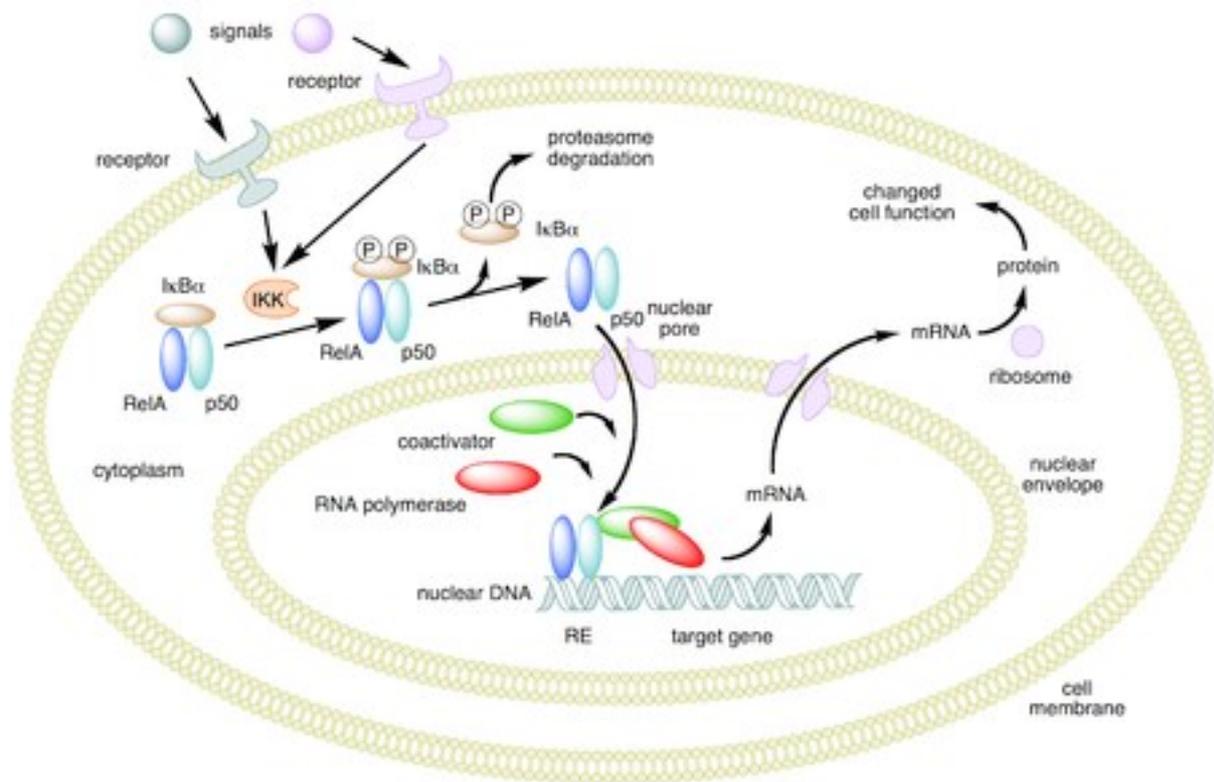


Abbildung 1: Wege der NF- κ B Signalkaskade auf Zellebene (Gilmore, 2006; Brasier, 2006; Perkins, 2006)

NF- κ B spielt unter anderem eine große Rolle bei der Regulation der inflammatorischen Entzündungskaskade. Die Aktivierung der NF- κ B Signalkaskade wird beispielsweise durch die Zytokine Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) und IL-1 β und durch bakterielle Produkte wie Lipopolysaccharide ausgelöst (Baeuerle *et al.*, 1997). TNF- α gehört zu den wichtigsten Entzündungsmediatoren des menschlichen Immunsystems. Es wird hauptsächlich von Makrophagen gebildet. Diese Bildung wird über „Toll-like Rezeptoren“ (TLR) und NF- κ B angeregt. Das lösliche sTNF wirkt auf die zellulären Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2. Über verschiedene Zwischenschritte wird so der nukleäre Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert: NF- κ B ist normalerweise an die I κ B α Proteine gebunden. Die Stimulation mit TNF- α bewirkt den Abbau der I κ B α Proteine durch Phosphorylierung (Miyamoto *et al.*, 1994). Das freie ungebundene NF- κ B transloziert in den Zellkern. Dort kann es durch Bindung an regulatorische DNA Abschnitte als Transkriptionsfaktor wirken. Auf diesem Weg stimulierte Zellen produzieren vermehrt Zytokine beispielsweise IL-6 oder IL-8 (Bonizzi *et al.*, 2004). Zudem bewirken sie eine Expressionssteigerung von Schlüsselenzymen der peripheren Entzündungsreaktion, wie der Leukotrienoxidase (LOX, Produktion von Leukotrienen) (Vervordeldonk *et al.*, 1996) und der COX-2, die die Bildung von Prostaglandinen katalysiert (Yamamoto *et al.*, 1995). Die gebildeten

Mediatoren verstärken somit die Entzündungsreaktion, wie die Entwicklung von Fieber oder lokale Entzündungserscheinungen wie Schwellung, Schmerz und Rötung.

Viele Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Einfluss von endodontischen Materialien auf diese Systeme. Mittels Western Blot und ELISA wurden die Effekte von MTA auf dentale pulpale Zellen geklonter Ratten (RPC-C2A) untersucht. ProRootMTA bewirkte eine erhöhte Phosphorylierung von I κ B α Proteinen und die Translokation von NF- κ B Untereinheiten in den Zellkern. Die Schlussfolgerung ergab, dass MTA via NF- κ B Signalweg einen Entzündungsvorgang induzierte (Minamikawa *et al.*, 2009). Eine weitere Studie überprüfte die mögliche Aktivierung des NF- κ B Signalweges durch MTA in Stammzellen der apikale Papille (SCAPs). Auch hier kam es zu einem erhöhten Nachweis von zytoplasmatischem phosphorylierten I κ B α . Auch ein erhöhtes Vorkommen von p65, sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern, sowie die gesteigerte nukleäre Translokation von p65 wurden festgestellt. MTA aktivierte also auch hier den NF- κ B Signalweg (Yan *et al.*, 2014). Eine weitere Studie beschäftigte sich ebenfalls mittels Western Blot-Analyse mit der Wirkung von MTA auf inflammatorisch stimulierte dentale pulpale Stammzellen (iDPSCs). MTA bewirkte eine Aktivierung des NF- κ B Signalweges (Wang *et al.*, 2014). ProRootMTA bewirkte ebenfalls die Expression von IL-6 in Osteoblasten (MG-63) (Ciasca *et al.*, 2012). Auch in humanen Osteosarkomzellen (MG63) nach Inkubation mit MTA wurde die Expression von IL-6 festgestellt (Mitchell *et al.*, 1999). Mittels ELISAs mit Osteoblasten (MG63) wurde ebenfalls eine Erhöhung der Expression von IL-6 bei Zellen, die mit MTA in Kontakt gebracht worden waren, gefunden (Koh *et al.*, 1998).

Die Studienlage im Hinblick auf die Expression von Zytokinen und auf den Einfluss auf die inflammatorische Signaltransduktion lässt im Hinblick auf Medcem MTA, ProRootMTA und Biodentine zu wünschen übrig. Um genauere Aussagen über die Eigenschaften dieser Materialien treffen zu können sind somit umfangreiche Untersuchungen nötig, die einen möglichen Einfluss auf den NF- κ B-Signalweg als auch die IL-6 Expression klären.

1.4.3.2 Cyclooxygenase-System

Die Cyclooxygenasen bewirken im menschlichen Organismus die Synthese von Prostaglandinen aus Arachidonsäure (Smith *et al.*, 1992). Man unterscheidet dabei zwei Unterformen, nämlich die COX-1 und die COX-2. In dieser Arbeit beziehen wir

uns auf das Enzym COX-2, da dieses vor allem eine Rolle bei inflammatorischen Prozessen spielt. Es kommt durch Zytokin-vermittelte Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren zu einer vermehrten Aktivität der COX-2 (induzierbare COX). Zu nennen sind hier vor allem die Zytokine IL-1 β und „tumor necrosis factor“ α (TNF- α ; Yucel *et al.*, 1999; Jobin *et al.*, 1998). Durch die vermehrte Expression von COX-2 kommt es zu einer erhöhten Produktion von inflammatorischen Prostaglandinen, insbesondere PGE₂. PGE₂ ist ein wichtiges, lokal wirkendes Molekül bei inflammatorischen Prozessen (Coon *et al.*, 2007). Es wird direkt nach seiner Synthese aus der Zelle freigesetzt (Schuster *et al.*, 2002). Wirkungen von PGE₂ sind im Rahmen der Entzündungsreaktion die Erhöhung der Gefäßpermeabilität, die Verstärkung von Schmerz und die Induktion von Fieber.

In Bezug auf die hydraulischen Silikatzemente und das Cyclooxygenase-System beschäftigte sich eine Studie beispielsweise mit dem Effekt von Biodentine auf humane dentale Pulpazellen. Biodentine bewirkte eine mäßige Hochregulation von COX-2 und PGE₂, verglichen mit dem Kontrollmaterial IRM (Chang *et al.*, 2014). Eine weitere *in vitro* Studie kam zu dem Schluss, dass MTA und Calciumsilikate eine entzündliche Reaktion und gesteigerte COX-2 Expression in primären humanen dentalen Pulpa-Stammzellen herbeiführten (Chen *et al.*, 2010). Die Hochregulation von COX-2 und von PGE₂ in dentalen Pulpazellen geklonter Ratten, welche mit MTA stimuliert worden waren, wurde ebenfalls in der Vergangenheit beforscht (Minamikawa *et al.*, 2009).

Nun ist auch hier die Studienlage zum Thema hydraulische Silikatzemente und ihrem Einfluss auf das Cyclooxygenase-System nicht aussagekräftig genug. Es bedarf also weiterer Studien welche sich genauer damit befassen.

1.4.4 Wirkung auf Differenzierung von Stammzellen

Das mögliche regenerative Potential von endodontischen Materialien wie ProRootMTA, Medcem MTA und Biodentine wurde in der letzten Zeit bereits in einigen Studien untersucht. Ein wichtiger Hinweis auf die regenerative Wirkung ist die osteogene Differenzierung von Stammzellen. Das Differenzierungsverhalten von zum einen mesenchymalen humanen Stammzellen (hMSC) und zum anderen von einer immortalisierten, humanen parodontalen Progenitorzelllinie (hPDSC_hTERT) unter Einfluss der regenerativen Materialien Medcem MTA, ProRootMTA und Biodentine kann als Modell zur Untersuchung dienen.

Das parodontale Ligament des Zahnes besteht aus verschiedenen heterogenen Zellpopulationen wie den Osteoblasten, Fibroblasten und Zementoblasten (Bartold *et al.*, 2000). Sowohl die mesenchymalen Stammzellen als auch die parodontalen Progenitorzellen sind in der Lage, unter entsprechenden Bedingungen zu den genannten Zellen zu differenzieren. Wichtig für die osteogene Differenzierung sind dabei unter anderem die richtigen Kulturbedingungen (Jaiswal *et al.*, 1997). Eine Folge der Differenzierung zu Osteoblasten ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors RUNX2 und die vermehrte Expression verschiedener Proteine (osteogene Marker) wie beispielsweise Osteocalcin (OCN), Osteopontin, Bone Sialoprotein (BSP) und Alkalische Phosphatase (ALP).

Parodontale Progenitorzellen sind Abkömmlinge von adulten multipotenten mesenchymalen Stammzellen. Sie sind ebenfalls multipotent und besitzen die Fähigkeit, sich sowohl in die Osteoblasten-Linie als auch in die Zementoblasten- oder Fibroblasten-Linie zu differenzieren (Seo *et al.*, 2004; Gay *et al.*, 2007, Bartold *et al.* 2006). Mögliche Differenzierungswege einer parodontalen Progenitorzelle sind in Abbildung 2 dargestellt.

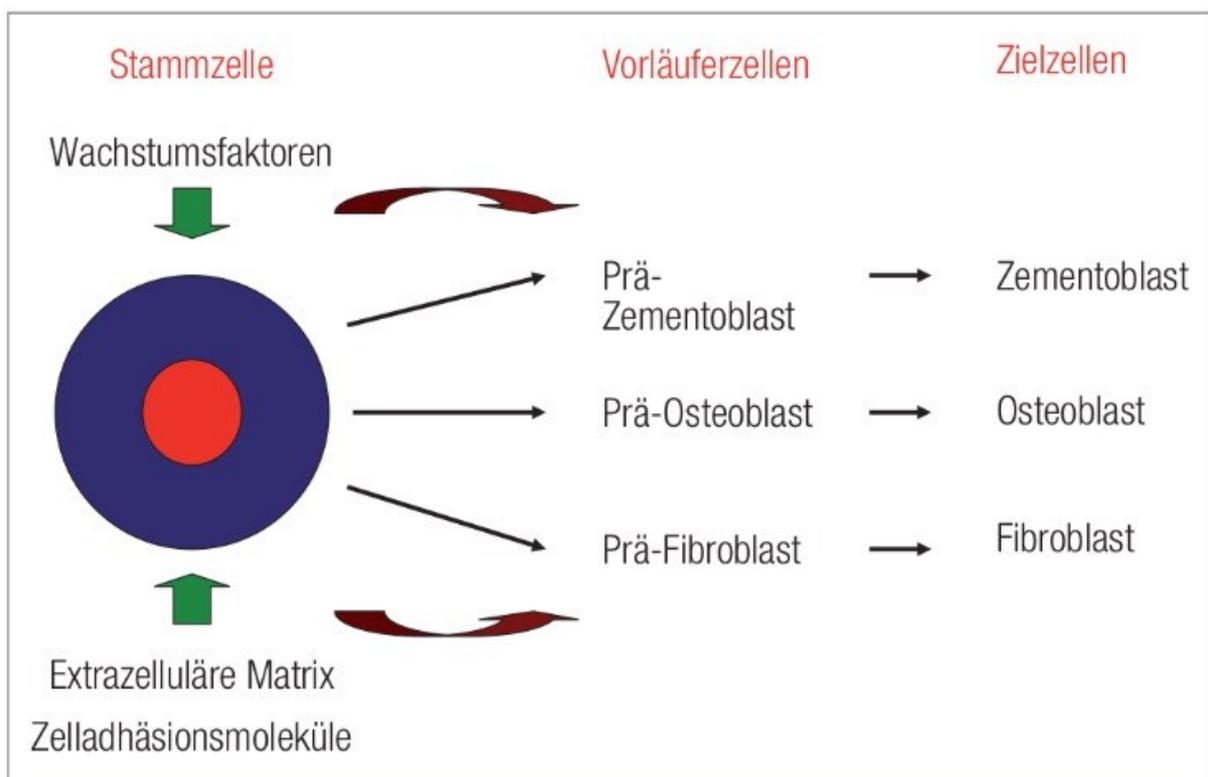


Abbildung 2: Wege der Differenzierung der parodontalen Prognitorzelle unter Einfluss von verschiedenen Wachstumsfaktoren (Ivanovski *et al.*, 2006)

Von besonderem Interesse ist der Transkriptionsfaktor RUNX2. Dieser wurde 1997 von Komori und Mitarbeitern im Zusammenhang mit osteoblastärer Differenzierung beschrieben (Komori *et al.*, 1997). RUNX2 gilt als regulatorisches Protein der Knochenneubildung (Bruderer *et al.*, 2014). Er gehört zu den "Runt box" (RUNX) Transkriptionsfaktoren (Coffman und Mitarbeiter, 2003), welche auch "core binding factor- α " (CbF α) genannt werden. Beim Mensch sind drei RUNX Faktoren bekannt (RUNX-1, RUNX-2, RUNX-3). Die RUNX-Gene regulieren die Expression von Zielgenen durch Bindung an deren Promotorregion. Zielgene von RUNX2 sind vor allem osteoblastentypische Gene wie Kollagen-I, Osteopontin, Osteonectin, BSP und OCN (Komori *et al.*, 2002; Aubin *et al.*, 1995). RUNX2 legt die Differenzierung von Osteoblasten aus pluripotenten mesenchymalen Stammzellen fest, induziert diese Differenzierung im frühen Stadium und terminiert diese im späten Stadium (Komori und Mitarbeiter 1997; Komori 2002, Liu 2001). Abbildung 3 gibt einen Überblick über die möglichen Differenzierungswege einer mesenchymalen Stammzelle.

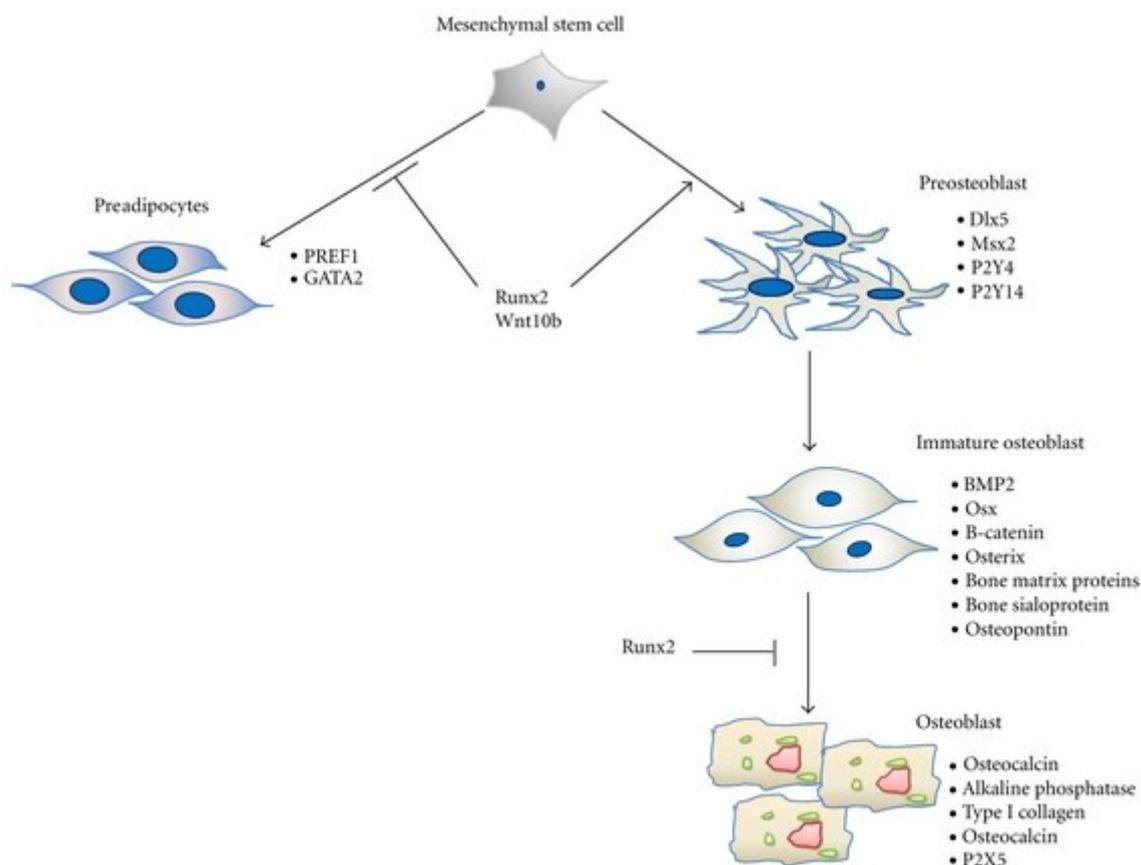


Abbildung 3: Differenzierung einer pluripotenten mesenchymalen Stammzelle zum Osteozyten unter Einfluss von RUNX2 (Zhang *et al.*, 2012)

Ein weiterer Hinweis für die osteogene Differenzierung ist also die Expression dieser genannten Zielgene des RUNX2 Transkriptionsfaktors. Im Rahmen der

Knochenneubildung können dabei verschiedene Phasen der Expression unterschieden werden (Abe *et al.*, 1993). Je nach Phase werden einzelne osteogene Marker besonders ausgeprägt exprimiert. Abbildung 4 zeigt den zeitlichen Verlauf und den Grad der Expression der unterschiedlichen osteogenen Marker in Reihenfolge (Owen *et al.*, 1990). Daraus geht hervor, dass zunächst Kollagen Typ I, ALP, dann Osteopontin und schließlich OCN exprimiert werden. Insbesondere OCN ist ein wichtiger osteogener Marker, da er das Stadium der reifen Osteoblasten repräsentiert (Owen *et al.*, 1990).

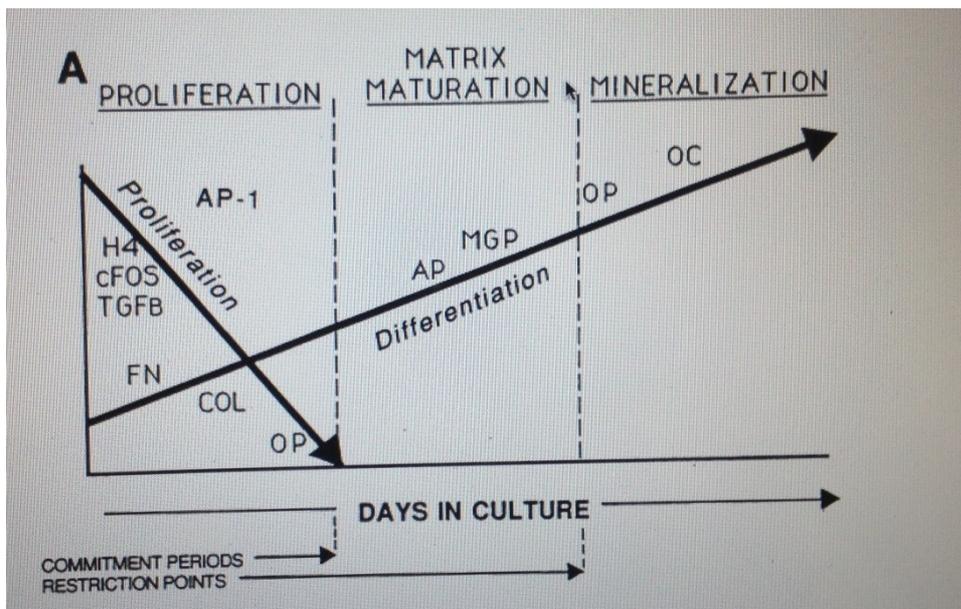


Abbildung 4: Phasen der Expression unterschiedlicher osteogener Marker während der osteogenen Differenzierung (Owen *et al.*, 1990)

Im Rahmen dieser Studie wird die Wirkung von verschiedenen hydraulischen Silikatzementen wie ProRootMTA, Medcem MTA und Biodentine auf die Differenzierung von Stammzellen an zwei unterschiedlichen Stellen getestet: Zunächst einmal am Anfang der Differenzierung in Form der RUNX2 Expression der Zellen und schließlich zum Ende des Differenzierungsweges in Form der OCN Expression der Zellen.

1.4.4.1 Differenzierung von hMSC und hPDSC_hTERT

Das regenerative Potential von ProRootMTA, Medcem MTA und Biodentine wurde in Bezug auf mesenchymale Stammzellen und parodontale Progenitorzellen überprüft. Dafür wurden unterschiedliche Parameter betrachtet. Zu diesen zählen vor allem das ALP-Level, der Kalknachweis mittels Alizarin-Rot-Färbung, die RUNX2 Expression oder die OCN Expression.

Einige Studien beschäftigten sich in der Vergangenheit mit der Wirkung von unterschiedlichen hydraulischen Silikatzementen auf die Differenzierung von Stammzellen. Beispielsweise lag der ALP-Level von mesenchymalen Stammzellen nach Stimulation mit ProRootMTA und Biodentine im Vergleich zum Level der Kontrollgruppe bei beiden Zementen höher. Ebenfalls wurde ein signifikanter Anstieg des mRNA Levels von OCN festgestellt. (Lee *et al.*, 2014). Eine weitere Studie mit humanen orofazialen mesenchymalen Stammzellen stellte eine potentielle Förderung der Gewebsregeneration in periapikalen Knochendefekten unterstützt von Calciumsilikatzementen fest (Gandolfi *et al.*, 2014). Die verstärkte Mineralisation und die osteogen-ähnliche Differenzierung von humanen dentalen Pulpastammzellen nach Inkubation mit MTA wurde ebenso nachgewiesen (Asgary *et al.*, 2014). Auch im Hinblick auf parodontale Progenitorzellen bewirkte MTA eine Induktion der Aktivität der ALP und damit der osteoblastären Differenzierung (Bonson *et al.*, 2004). MTA bewirkte auch eine Steigerung der Expression des Transkriptionsfaktors RUNX2 in hPDLs (Hakki *et al.*, 2012) und genauso auch in humanen alveolären Knochenzellen (Perinpanayagam *et al.*, 2009). Eine Studie bestätigte ebenfalls, dass MTA den Differenzierungsweg pluripotenter mesenchymaler Stammzellen (C2C12) in die Osteoblasten-Linie zu lenken vermochte. Dies gelang durch Nachweis der signifikanten Hochregulation des zellulären Phänotyp-spezifischen Markers RUNX2 (Matsumoto *et al.*, 2013).

Im Hinblick auf die Wirkung von hydraulischen Silikatzementen auf OCN untersuchte eine Studie die Effekte von ProRootMTA auf humane dentale Pulpazellen. ProRootMTA steigerte das mRNA Expressionslevel von OCN der Zellen deutlich im Vergleich mit IRM (Chang *et al.*, 2014). Genauso induzierte ProRootMTA die Hochregulation der Genexpressionslevel von OCN in humanen dentalen Pulpazellen (Paranjpe *et al.*, 2011). Eine weitere Studie bestätigte dies: In Stammzellen der apikalen Papille (SCAPs) wurde nach Kontakt mit MTA vermehrt OCN nachgewiesen (Yan *et al.*, 2014). Auch in humanen dentalen Pulpastammzellen steigerte MTA die OCN Expression (Zhao *et al.*, 2012). Eine weitere Studie untersuchte die Effekte von MTA und Calciumsilikat-basierten Zementen auf Knochenzellen (MG63). Die Resultate zeigten, dass beide Zemente gesteigerte OCN-Level bewirkten (Chen *et al.*, 2009). Die Inkubation mit MTA zog auch in Osteoblasten (MC3T3-E1) nach 24 h eine Hochregulation von OCN nach sich (Tan-Ishii *et al.*, 2007). In Bezug auf Biodentine fand eine Studie heraus, dass das Material ebenfalls zu einer Steigerung

der OCN Expression in humanen dentalen Pulpastammzellen (hDPSCs) führte (Luo *et al.*, 2014). Die Analyse der Wirkung von Tricalciumsilikat-Zementen auf humane dentale Pulpazellen (hDPCs) *in-vitro* zeigte, dass diese eine Expression des osteogenen Markers OCN förderten (Peng *et al.*, 2011).

2 Fragestellung und Studienziele

Aufgrund gewisser Nachteile und aufgrund des bereits erwähnten Optimierungsbedarfs der aktuell in der Endodontie verwendeten Materialien wurden neue Materialien gesucht, die eine ähnliche Wirkung und Effektivität wie ProRootMTA besitzen sollten, jedoch preisgünstiger und in ihren Eigenschaften und in der Handhabung verbessert waren. Natürlich sollten diese Materialien ähnliche Eigenschaften hinsichtlich ihrer Biokompatibilität und der regenerativen Wirkung in Bezug auf den menschlichen Organismus aufweisen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Dafür wurden drei Materialien, welche zu den hydraulischen Silikatzementen gezählt werden, Medcem MTA, ProRootMTA und Biodentine, bezüglich ihrer Eigenschaften und Wirkungen miteinander verglichen. Die Zemente wurden für die Versuchsreihen in den Zellkulturmedien der unterschiedlichen verwendeten Zellarten eluiert. Verwendete Zellarten waren hierbei hPDLF, hOB, hGF-1, hMSC und hPDSC_hTERT.

Zunächst wurden Versuche zur Biokompatibilität der Materialien durchgeführt. Dabei wurde zum Ausschluss einer möglichen Zytotoxizität ein WST-8 Test durchgeführt. Eine mögliche erbgutschädigende Wirkung wurde in einem Mikrokerntest untersucht.

Zudem wurden die Materialien auf ihr mögliches inflammatorisches Potential untersucht. Dafür wurden Western Blots und ELISA Tests sowohl auf entsprechende Zielproteine des NF- κ B-System (IL-6, I κ B α , NF- κ B) als auch des Cyclooxygenase-System (PGE₂, COX-2) durchgeführt.

Schließlich wurden Versuche durchgeführt, welche ein mögliches regeneratives Potential der Materialien untersuchen sollten. Unter anderem wurden die RUNX2 Expression von unterschiedlichen Zellarten und ebenso die veränderte Expression von Osteocalcin überprüft.

Ausgehend von der derzeitigen Studienlage in Bezug auf das neue Material Medcem MTA ist die zentrale Fragestellung dieser Studie, ob es mit dem etablierten ProRootMTA vergleichbar ist und dieses ersetzen kann und darüber hinaus, ob es tatsächlich sogar in mancherlei Hinsicht ProRootMTA überlegen ist. Ebenso sollen die Eigenschaften von Biodentine im Vergleich zu den beiden anderen Materialien eingeordnet werden. Es wäre möglich, dass Medcem MTA sich sowohl als

biokompatibles Material erweist, als auch eine positive Wirkung auf die inflammatorischen Prozesse innerhalb von oralen Zellen und auf die Differenzierung von Stammzellen hat. Dies gilt es nun im Rahmen dieser Studie zu untersuchen.

3 Material und Methoden

3.1 Herstellung der Zementextrakte

Für die Experimente in der Zellkultur wurden flüssige Eluate der drei endodontischen Zemente ProRootMTA (Dentsply), Biodentine (Septodont) und Medcem MTA (Medcem) in Zellkulturmedium hergestellt. ProRootMTA und Medcem MTA wurden mit destilliertem Wasser (B. Braun, Melsungen, Deutschland) und einem Spatel gemäß Herstellerangaben auf einer Glasplatte angemischt, bis die gewünschte stopfbare Konsistenz erzielt wurde. Biodentine wurde ebenfalls gemäß Herstellerangaben in einer Kapsel mit 5 Tropfen Calciumchloridlösung für 30 s in einem Kapselanmischgerät (Ivoclar Vivadent, Ellwangen, Deutschland) angemischt. Die Zemente wurden in Edelstahlringe (16x10x2 mm; Lederer, Ennepetal, Deutschland) hineingegeben, die Oberfläche geglättet und für 4 h in einem Inkubator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bei 37° C und 100% relativer Luftfeuchtigkeit ausgehärtet (Camargo *et al.*, 2009). Es folgte eine Überführung der ausgehärteten Proben in eine 6-Well-Platte (greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich). Auf die Zementproben wurden je 3 ml Minimal Essential Medium- α (α -MEM; Medium gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA; mit 10% Fetalem Kälberserum (FBS), gibco/Life Technologies; 100 U/ml Penicillin G, 100 μ g/ml Streptomycin, beide Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) gegeben. Nun folgte eine weitere Inkubationszeit bei 37° C für 24 h, um den Elutionsprozess abzuwarten. Das Eluat wurde mit einer 2-ml-Einwegspritze (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) durch doppelte Filtration (Filter: Porengröße 0,45 μ m; Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) in ein 1,5-ml-Eppendorfreaktionsgefäß (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt. Die Eluate wurden bei -20° C eingefroren, um eine spätere Verwendung zu ermöglichen.

3.2 Zellkultur

Für die *in vitro* Versuche in der Zellkultur wurden unter anderem humane gingivale Fibroblasten (hGF-1; LGC Standards, Wesel, Deutschland) verwendet. Diese Zelllinie stammte ursprünglich aus einer Gingivabiopsie eines gesunden, männlichen, 28-jährigen Kaukasiers. Die Zellen befanden sich laut Lieferant in einem unbekanntem Passage-Level, allerdings war eine Passagierung bis zu 22 Mal erfolgreich beschrieben worden (McAllister *et al.*, 1993). Weiterhin wurden humane

Osteoblasten verwendet (primäre Kultur, hOB; PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland). Diese stammten aus dem Sternum eines 51-jährigen, männlichen, Kaukasiers und wurden in Passage 2 geliefert. Die humanen Fibroblasten des parodontalen Ligament (primäre Kultur, hPDLF; Lonza, Basel, Schweiz) stammten ursprünglich aus dem mittleren Wurzeldrittel der Oberfläche eines aus kieferorthopädischen Gründen extrahierten Prämolaren eines gesunden, männlichen, 20-jährigen Individuums unbekannter Herkunft und befanden sich laut Lieferant in Passage-Level 2. Zudem wurden humane mesenchymale Stammzellen (hMSC; Lonza) ebenfalls in Passage-Level 2 verwendet. Die Zellen wurden aus dem Knochenmark des hinteren Beckenkamms eines erwachsenen, gesunden kaukasischen Spenders isoliert. Alle primären Zellen waren negativ auf Mykoplasmen und negativ auf das Humane Immundefizienz-Virus-1, das Hepatitis-B-Virus und das Hepatitis-C-Virus getestet worden. Der Lieferant garantierte zudem das Einverständnis des jeweiligen Spenders.

Zusätzlich wurden immortalisierte humane adulte Stammzellen des parodontalen Ligaments (hPDSC_hTERT; humane Telomerase reverse Transkriptase) nach einem Protokoll von Docheva und Mitarbeitern verwendet (Docheva *et al.*, 2010). Diese wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Frau Priv.-Doz. Dr. D. Docheva vom ExperiMed-Institut für experimentelle Chirurgie und regenerative Medizin der Ludwigs-Maximilians-Universität zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden aus dem Gewebe eines gesunden Individuums unter 25 Jahren entnommen, im Zuge der orthodontischen Extraktion der oberen Prämolaren. Die PDLs wurden in Passage 1 mit dem zuvor nach einer Methode nach Böcker und Mitarbeitern produzierten Lentivirus infiziert (Böcker *et al.*, 2008). Das Virus bewirkte eine Expression von hTERT innerhalb der PDLs, wodurch diese immortalisiert wurden. So wiesen die PDL_hTERT eine längere Lebensdauer und ähnliche phänotypische Eigenschaften zu den PDL Progenitorzellen auf.

3.2.1 Kulturbedingungen

Alle Arbeiten mit Zellen wurden in einer biologischen Sicherheitswerkbank durchgeführt (Holten Laminair, Thermo Fisher Scientific). Die Zellen wurden stets bei 37° C, 5% CO₂-Atmosphäre und 100% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in unterschiedlichen Medien in Zellkulturflaschen (T75; Sarstedt). Die hGF-1-Zellen und die hPDLF-Zellen wurden in α -MEM Medium

(mit Glutamax, mit 10% FBS; gibco/Life Technologies) und die hOB in Osteoblast growth Medium (PromoCell GmbH) kultiviert. Die hMSC wurden wiederum in α -MEM Medium und die hPDSC_hTERT in DMEM Medium (4,5 g Glucose/L) kultiviert. Allen Zellkulturmedien wurde eine Mischung von Penicillin G und Streptomycin zugegeben (100 U/ml Penicillin G, 100 μ g/ml Streptomycin).

3.2.2 Passagieren und Konservierung

Die verschiedenen Zelltypen wurden tiefgefroren auf Trockeneis geliefert und für die Versuche zunächst auf Raumtemperatur erwärmt, zentrifugiert, der Überstand des Konservierungs-Mediums verworfen und das Zellpellet in dem entsprechendem Medium resuspendiert. Danach folgte die Aussaat in Zellkulturflaschen mit 20 ml entsprechendem Medium. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt. Das Passagieren bzw. Aussäen der Zellen für die Experimente erfolgte nach Erreichen von 80%iger Konfluenz der Zellen. Dies wurde durch tägliche Kontrollen der Zellen unter einem Durchlichtmikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) überprüft. Dazu wurden zunächst die Zellen nach Absaugen des Mediums mit 5 ml Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS; ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , Sigma-Aldrich) gewaschen um Reste des Zellkulturmediums zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen enzymatisch mittels Trypsin-EDTA-Lösung (0,05% Trypsin, 0,02% Ethylendiamintetraessigsäure in PBS; Sigma-Aldrich) vom Boden der Flasche gelöst. Nach 3 bis 5 min Einwirkzeit erfolgte eine optische Kontrolle unterhalb des Mikroskops. Das Trypsin wurde dann mittels serumhaltigen Zellkulturmedium inaktiviert und die Lösung zentrifugiert (300 g; 5 min bei Raumtemperatur; Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA). Das entstandene Zellpellet wurde in einer entsprechenden Menge Medium resuspendiert, je nach Art der weiteren Verwendung. Das Splitten erfolgte stets in einem Verhältnis von 1:4. Die konfluenten Zellen einer Flasche wurden entsprechend der weiteren Verwendung für Versuche verteilt.

Das Einfrieren diente der Stammhaltung und der Konservierung der Zellen. Dies erfolgt naturgemäß in einem möglichst niedrigen Passagelevel der Zellen um ein ausreichendes Wachstum nach erneutem Auftauen zu gewährleisten. Zunächst wurden die konfluenten Zellen wie oben beschrieben trypsinisiert. Nach Zentrifugieren wurde das Zellpellet in 1 ml entsprechendem Medium gelöst. Daraufhin wurde die Zellzahl darin mithilfe eines softwarebasierten Zellanalysesystem (Cedex XS; Roche

Diagnostics, Mannheim, Deutschland) bestimmt. Dafür wurden 10 µl der Zellen auf die Messvorrichtung pipettiert, mit 10 µl Trypanblau (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) gefärbt und in das Messgerät eingespeist. Trypanblau wurde von lebenden Zellen nicht aufgenommen. Abgestorbene Zellen dagegen nahmen den Farbstoff auf, so ergab sich durch Verwendung der Trypanblau-Exklusions-Methode eine Messung der Anzahl der lebenden Zellen anhand der ungefärbten und gefärbten Zellen. Die Zellen wurden nun auf Kryoröhrchen (greiner bio-one) verteilt, sodass jedes Röhrchen eine Anzahl von $3,0 \times 10^5$ - $5,0 \times 10^5$ Zellen enthielt. Dem Medium wurde 10% Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich) zugesetzt, was eine intrazelluläre Eiskristallbildung verhindern sollte. Zum schrittweisen Einfrieren wurden die Kryoröhrchen für 24 h in einer mit 2-Propanol gefüllten Einfrierhilfe auf -80°C abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen in der Gasphase von Stickstoff bei -196°C (Thermo Fisher Scientific) eingefroren.

3.3 Toxizitätsassays

3.3.1 WST-8-Test

Grundlage des Tests war die Reduktion von farblosen Tetrazoliumsalzen (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H Tetrazolium) zu farbigen, wasserlöslichen Formazanprodukten (3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium-Bromid). Die Umwandlung von WST-8 erfolgte durch zelluläre Reduktionsäquivalente wie Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid-Hydrid (NADH) oder Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH). NADH bzw. NADPH wurden nur in stoffwechselaktiven Zellen von zellulären Dehydrogenasen innerhalb der Atmungskette generiert. Die Absorption des Formazan Farbstoffes wurde photometrisch gemessen. Sie war proportional zur Anzahl der metabolisch aktiven Zellen (Tsukatani *et al.*, 2009). Eine schematische Darstellung der Farbreaktion ist in Abbildung 5 gezeigt.

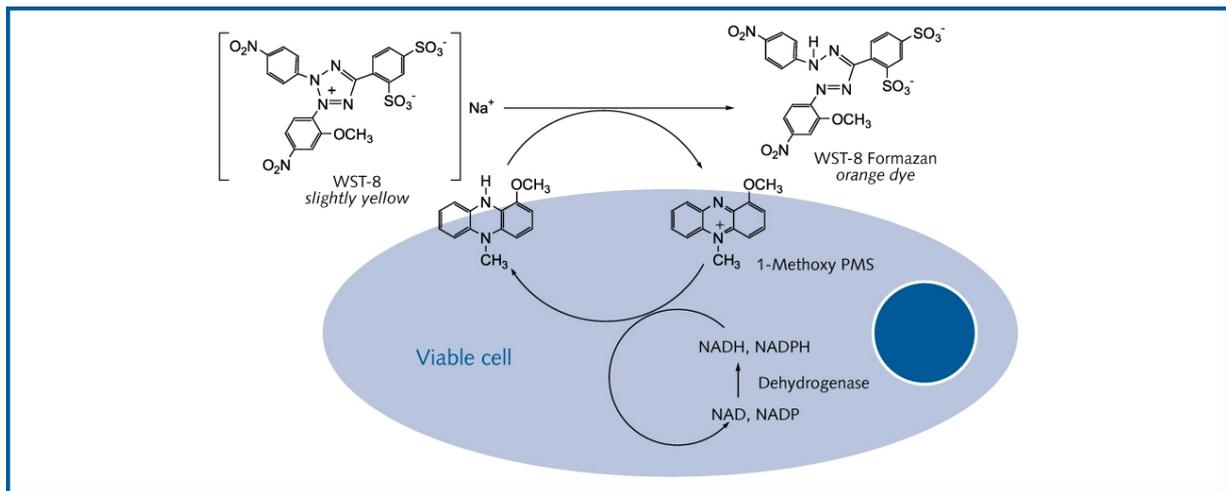


Abbildung 5: Reduktion von farblosem Tetrazoliumsalz zu farbigem Formazanprodukt als Grundlage des WST-8-Test (Abbildung Hersteller Promokine)

Für den Versuch wurden folgende Zellarten verwendet: hGF-1, hPDLF und hOB. Diese wurden trypsiniert und in 1 ml entsprechendem Medium resuspendiert. Mit dem softwarebasierten Zellzahl-Analysesystem wurde die Zellzahl in 1 ml Medium bestimmt. Durch hinzufügen einer entsprechenden Menge Medium wurde eine Zellsuspension von 50000 Zellen/ml hergestellt und eine 96-Well-Platte (greiner bio-one) mit 5000 Zellen in 100 μ l pro Well befüllt. Nach 24 h Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und die Platte mit Verdünnungen der Eluate der drei endodontischen Materialien (unverdünnt, 1:2, 1:5, 1:10) und Negativ- und Positivkontrolle befüllt. Als Negativkontrolle wurde entsprechendes Medium, als Positivkontrolle 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) verwendet. Die Wells wurden nach 24 h Inkubationszeit und Abnahme der Testsubstanzen mit 100 μ l neuem Medium befüllt, welchem 1% Colorimetric Cell Viability Kit-1-Reagens (CCVK-1; PromoCell GmbH) zugesetzt worden war. Um eine eventuelle Interaktion des WST-8-Reagens mit dem Zellkulturmedium festzustellen wurde als Kontrolle zusätzlich auch die Medium-Reagens Lösung ohne metabolisch aktive Zellen getestet. Die photometrische Auswertung erfolgte nach 2 h Inkubationszeit bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450$ nm in einem softwarebasierten Mikroplattenphotometer (Thermo Fisher Scientific). Abbildung 6 zeigt eine 96-Well-Platte mit der abgelaufenen Farbreaktion.

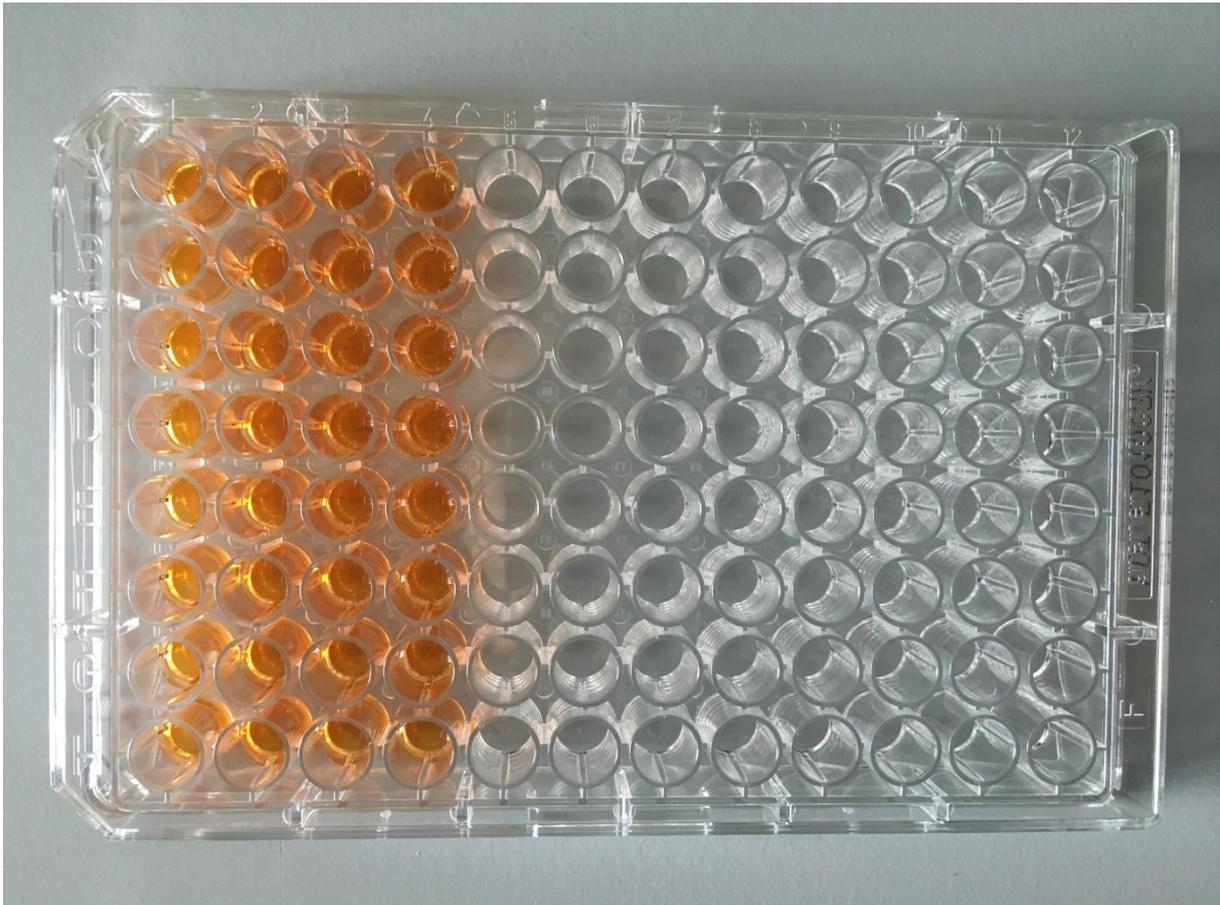


Abbildung 6: Abgelaufene Farbreaktion in einer 96-Well-Platte

Von den gemessenen Werten der Proben wurde der Leerwert (Medium ohne Zellen mit WST-8 Reagens) subtrahiert, um Einflüsse der Interaktion des Mediums mit CCVK-1 Reagens auszuschließen. Dann wurden die Extinktionen der Wells mit der Negativkontrolle als 100% angesetzt und alle anderen Werte der mit den Zementen inkubierten Zellen im Verhältnis dazu prozentual angegeben.

3.3.2 Mikrokerntest

Der Mikrokerntest zur Detektion von Chromosomenschäden erfasste sowohl defekte DNA-Fragmente als auch Chromosomen welche im Zytosol Mikronuklei bilden. Durch Anfärben von DNA-haltigen Strukturen wurden etwaige Defekte visualisiert. Der Test beruhte auf der Feulgenreaktion (Kit von Merck Millipore): Einer Reaktion von Schiffs-Reagens (Fuchsin-schwefelige Säure) mit der 2-Desoxyribose in Nukleinsäuren. Die DNA wurde durch Salzsäure hydrolysiert, unter Abspaltung von Purin- und Pyrimidinbasen. Es entstanden freie Aldehydgruppen die mit der Schiffs-Reagenz eine rotviolette Färbung ergaben. Für den Versuch wurden hPDLFs verwendet.

Zunächst wurde eine Zellsuspension mit $3,0 \times 10^5$ Zellen pro 4 ml Medium hergestellt, auf einen Glasobjektträger (Menzel, Braunschweig, Deutschland) pipettiert und für 24 h bei 37° C, 5% CO₂ und 100% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Pro Glasobjektträger wurden 2 ml Medium oder ProRootMTA, Biodentine oder Medcem MTA Eluat hinzugegeben und zusätzlich Cytochalasin B (3 µg/ml) pro Glasobjektträger hinzugefügt. Als Positivkontrolle mit einer bekannt hohen Induktion von Micronuclei wurde Ethylmethansulfonat (300 µg/ml) verwendet (Stopper und Lutz, 2002). Es folgte eine Inkubationszeit von 24 h. Alle weiteren Schritte wurden in Färbeküvetten aus Glas (Assistent, Sondheim von der Rhön, Deutschland) durchgeführt. Die Zellen wurden 1 h luftgetrocknet, dann auf den Glasobjektträgern für 1 h durch Zugabe von 4%-iger Formaldehydlösung (gepuffert pH 6,9) fixiert und für 10 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Die Glasobjektträger wurden dann für 50 min bei 22° C in 5 mol/l Salzsäure (HCl) eingetaucht. Nach zweimaligem Waschen für 2 min mit A. dest. wurden die Objektträger für 60 min bei Raumtemperatur ohne Lichteinfluss mit Schiffs-Reagens behandelt. Die Glasobjektträger wurden dann zweimal für 3 min mit Natriumdisulfit-Spüllösung (540 ml H₂O dest., 30 ml 1 M HCl, 30 ml 10% Kaliumdisulfit-Lösung) behandelt.

Die Zellpräparate mussten nun dehydriert werden, um sie für eine bessere Haltbarkeit einbetten zu können. Dies erfolgte mittels einer aufsteigenden 2-Propanolreihe (50-99%) je Probe unter dem Abzug. Im nächsten Schritt erfolgte eine fünfminütige Behandlung mit Xylol, die wiederholt wurde. Die xylolfeuchten Präparate auf den Glasobjektträgern wurden mit Entellan (Merck Millipore) eingedeckt und mindestens 24 h im Dunkeln gelagert. Identifiziert wurden die Mikronuklei als eine DNA beinhaltende Struktur im Zytoplasma, getrennt vom Hauptzellkern und von der Größe kleiner als 1/3 des Hauptzellkerns (Countryman *et al.*, 1976). Abbildung 7 zeigt einen exemplarischen Mikrokern in einer Zelle. Das Auswerten erfolgte durch Zählen von 1000 Zellen pro Objektträger, pro Versuchsgruppe wurden je 3 Objektträger verwendet (Schweikl *et al.*, 2001).

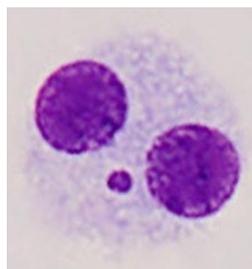


Abbildung 7: Mikrokern in einer Zelle

3.4 Einfluss auf die inflammatorische Signaltransduktion

Die Wirkung der flüssigen Eluate der endodontischen Materialien ProRootMTA, Medcem MTA und Biodentine auf die inflammatorische Signaltransduktion wurde anhand von zwei exemplarischen Systemen untersucht, dem NF- κ B-System und dem Cyclooxygenase-System. Für jedes System wurde eine Analyse der Produktionssteigerung der beteiligten Proteine und Enzyme durchgeführt. Für den Nachweis von spezifischen Produkten des Signalwegs des jeweiligen Systems wurden Endpunktassays durchgeführt.

3.4.1 NF- κ B-System

NF- κ B bewirkt als Transkriptionsfaktor innerhalb von hPDLF die gesteigerte Produktion von Entzündungsmediatoren wie IL-6 und verstärkt so die Entzündungsreaktion. Die entzündliche Stimulation des NF- κ B-System erfolgte mittels TNF- α . Die Expression von NF- κ B und die Ausschüttung von IL-6 wurden im Rahmen der Versuche überprüft. Dabei wurden sowohl Western Blot-Verfahren als auch ELISAs durchgeführt. Als unspezifischer Hemmstoff des NF- κ B-Systems wurde Dexamethason verwendet.

3.4.1.1 Stimulationsparameter für den Nachweis von p65 und I κ B α

Für das Western Blot Verfahren wurden die hPDLF in den Zellkulturflaschen trypsiniert. Pro Well einer 6-Well-Platte wurden 2 ml in Medium resuspendierte Zellen ausgesät. Nach 24 h Inkubationszeit im Brutschrank wurde das Medium abgenommen. Nun wurden entweder unstimulierte Zellen oder artifiziell entzündlich stimulierte Zellen für die Versuche benötigt. Sowohl für die unstimulierten als auch für die entzündlich stimulierten Zellen wurde pro Well 1 ml flüssiges Eluat der drei endodontischen Materialien pipettiert oder Medium mit 10 μ l Dexamethason (0,5 μ M; Sigma-Aldrich) hinzugegeben. Um unstimulierte Zellen zu erhalten, wurde nach 1 h Inkubation im Brutschrank das Medium oder Eluat verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen und mittels eines Zellschabers in 700 μ l PBS geerntet. Für die artifiziell entzündlich stimulierten Zellen erfolgte nach 1 h Präinkubation mit den Test-Eluaten die Stimulation mit TNF- α (50 U/ml für hPDLF; Sigma-Aldrich). Die nun folgende Inkubationszeit im Brutschrank betrug 15 min. Die Negativkontrolle war 1 ml reines Medium. Nach Ablauf der Zeit wurde wiederum das Medium oder Eluat verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen und mittels eines Zellschabers in 700 μ l PBS

geerntet. Die resuspendierten Zellen wurden in ein 1,5-ml-Eppendorfreaktionsgefäß überführt und in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert (Beckman Coulter Inc.; 300 g; 5 min, 0°C).

3.4.1.2 Extraktion der Proteine

Um die nukleären und zytosolischen Proteine der Zellen zu extrahieren wurde ein Extraktions Kit für nukleäre und zytoplasmatische Proteine (NE-PER; Thermo Fisher Scientific) eingesetzt. Alle Schritte wurden zur Verhinderung von Denaturierungsvorgängen der Proteine auf Eis durchgeführt. Sowohl der CER-1 Reagens als auch der NER Reagens wurde unmittelbar vor Gebrauch ein Protease-Inhibitor-Cocktail (1:100; Thermo Fisher Scientific) zugesetzt, um die Funktion und Stabilität der zu extrahierenden Proteine zu gewährleisten.

Zu Beginn wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mittels eines Zellschabers in 700 µl PBS geerntet. Die resuspendierten Zellen wurden in ein 1,5-ml-Eppendorfreaktionsgefäß überführt und in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert (Beckman Coulter Inc.; 300 g/ 5 min, 0° C).

Der Überstand wurde abgenommen und verworfen und das entstandene Zellpellet in 100 µl eiskaltem Lysepuffer (CER-1, zytoplasmatisches Extraktionsreagenz) resuspendiert und anschließend 15 s gevortext (IKA, Staufen, Deutschland). CER-1 bewirkte ein Anschwellen der Zellen und ein Anlösen der Zellmembran. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß mit dem Lysepuffer 10 min auf Eis inkubiert und nach Ablauf der Zeit 5,5 µl eiskaltes CER-2-Reagens hinzu pipettiert. CER-2 bewirkte eine Lyse der Zellmembran, ließ aber die Zellkerne intakt. Nach 5 s vortexen und einer erneuten Inkubation von 1 min wurden die Reaktionsgefäße bei 16000 g für 5 min zentrifugiert und der klare Überstand, welcher nun die zytosolischen Proteine enthielt, in ein 1,5-ml-Eppendorfreaktionsgefäß überführt.

Das neu entstandene Pellet enthielt die Zellkerne und wurde in 50 µl eiskaltem NER (nukleäre Extraktionsreagenz) gelöst. NER setzte die im Zellkern enthaltenen Proteine frei. Das Eppendorfreaktionsgefäß wurde daraufhin für insgesamt 40 min auf Eis inkubiert und alle 10 min je 15 s auf dem Vortex-Mixer geschüttelt. Dies unterstützte die Lyse der Zellkerne. Es folgte ein erneuter Zentrifugierschritt bei 16000 g für 10 min. Der Überstand enthielt nun die nukleären Proteine und wurde in ein neues 1,5-ml-Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Sowohl die nukleären als auch die zytosolischen Proteinextrakte wurden für weitere Versuche bei -20°C eingefroren.

3.4.1.3 Messung der Proteinkonzentration

Um eine gleichmäßige Beladung der Geltaschen für die anschließenden Gelelektrophoresen zu ermöglichen, wurde zunächst der Proteingehalt der Extrakte bestimmt. Dazu diente der Bradford Test (Bradford Assay; Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA USA), eine photometrischen Methode zur quantitativen Bestimmung des Proteingehalts (Compton *et al.*, 1985; Bradford *et al.*, 1976).

Der Test basierte auf dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 (CBBG), welcher mit Seitenketten von Proteinen in saurer Lösung Komplexe bildet. Die rote, ungebundene, kationische Form des Farbstoffes wurde nach Bindung an die Proteine in ihrer blauen, gebundenen, anionischen Form stabilisiert. Dabei ist die Blaufärbung proportional zum Proteingehalt in der Lösung. Ebenfalls verschiebt sich durch die Bindung das Absorptionsmaximum von $\lambda = 470$ nm auf $\lambda = 595$ nm.

Um die Konzentration eines Proteingemischs zu bestimmen wurden Standardproteine zur Kalibrierung verwendet. Zunächst wurden je 5 μ l von 7 verschiedenen Konzentrationen Rinderalbumin (BGG; 2; 1,5; 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125 mg/ml; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) in je 245 μ l Färbereagenz (Thermo Fisher Scientific) gelöst.

Aus den Proteinextrakten wurden ebenfalls je 5 μ l entnommen und in 245 μ l Färbereagenz hinzugegeben. Die Standardproteine und die Protein Extrakte wurden jeweils in einer Menge von 100 μ l in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Als Negativkontrolle diente die Färbereagenz. Um die Richtigkeit der Methode zu gewährleisten wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Je zwei Wells wurden mit derselben Substanz befüllt. Es folgte eine Reaktionszeit von 5 min bei Raumtemperatur. Die photometrische Messung der gefärbten Standards und Protein Extrakte erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm in einem Mikroplattenphotometer.

3.4.1.4 Elektrophorese/Western Blot zum Nachweis von NF- κ B p65 und I κ B α

Die Analyse der extrahierten Proteine erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970). Dieses Verfahren ermöglicht es Proteine nach ihren Molekülmassen in einem elektrischen Feld zu trennen. Dabei diente ein kontinuierliches 12%iges Polyacrylamid-Tris-Glycin-Gel (Bio-Rad Laboratories) als Trennmedium. Das Gel

befand sich in Laufpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1% SDS) zwischen zwei Elektroden (Kathode und Anode) welche an eine Gleichspannungsquelle ($U = 160 \text{ V}$) angeschlossen waren. Um eine identische Proteinkonzentration in jeder Probe zu erhalten, wurde die Probe entsprechend mit destilliertem Wasser und unter Zugabe eines 4X Laemmli Puffer (277,8 mM Tris-HCL, pH 6.8, 44,5% Glycerol, 4,4% SDS, 0,02% Bromphenolblau, 10% β -Mercaptoethanol) verdünnt. Die Bestandteile des Laemmli-Puffers dienen der Denaturierung der unterschiedlichen Proteine. SDS war ein anionisches Tensid das die Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine zerstörte und deren nichtkovalente Bindungen aufbrach. Es band effizient an die Proteine und sättigte so deren Peptidketten. Durch seine negative Ladung bewirkte SDS, dass die Eigenladung der Proteine vernachlässigt werden konnte. So wurde das Verhältnis Größe zu Ladung der Proteine in etwa gleich. Ebenfalls im Laemmli-Puffer enthalten war β -Mercaptoethanol um Disulfidbrücken zu spalten. Glycerin bewirkte durch seine hohe Dichte das Absinken der Proteine in die Geltasche. Bromphenolblau diente als Farbstoffmarker. Zur weiteren Denaturierung wurden die Proben in einem Thermomixer (Eppendorf) auf 95° C erhitzt. Die Geltaschen wurden nach diesen Denaturierungsschritten mit je $12 \mu\text{l}$ Probe beladen. Als Kontrolle wurde in eine Tasche pro Gel $5 \mu\text{l}$ Proteinstandard (Kaleidoscope, Bio-Rad Laboratories) aufgetragen. Dieser diente zur Abschätzung des Molekulargewichts der entsprechenden Banden und bestand aus Proteinen bekannter Größe. Das SDS-PAGE-System wurde nun in einem Kühlraum bei 4° C für 40 min bei einer konstanten Spannung von 160 V an ein Netzgerät (Bio-Rad Laboratories) angeschlossen. Die Proteine wanderten entlang des elektrischen Feldes innerhalb des Gels. Je kleiner die Molekülmasse des Proteins desto länger war der zurückgelegte Weg. Im Anschluss erfolgte ein Western Blot.

Der Western Blot diente dem Transfer der Proteine von dem Polyacrylamid-Tris-Glycin-Gel auf eine Trägermembran aus Polyvinylidenfluorid (PVDF, Porengröße der Membran: $0,45 \mu\text{m}$; Millipore) mittels Elektrophorese. Dazu wurde eine Spannung senkrecht zum Polyacrylamidgel angelegt. Das Blotting Verfahren wurde mittels eines Tank-Blot-Systems, bestehend aus Schwämmen, Blotting Papieren, PDVF-Membran und Polyacrylamidgel, durchgeführt. Der Tank war gefüllt mit Transferpuffer (Puffer nach Towbin *et al.* 1979, 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% v/v Methanol, pH $\sim 8,3$). Die PVDF-Membran wurde mit Methanol (Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland) getränkt. Das Polyacrylamidgel wurde 15 min vorher in Transferpuffer

äquiliert um Reste des Elektrophoresepuffers zu entfernen. Der Aufbau bestand aus einer Blotkassette mit zwei Kunststoffgittern. Dazwischen wurden die Schwämme, das Blotting Papier, die PVDF-Membran und das Polyacrylamidgel komprimiert. Die Blotkassette wurde vertikal zwischen zwei Platindrahtelektroden in den Tank platziert. Die Drahtelektroden waren an das Netzgerät (200 mA; Bio-Rad Laboratories) angeschlossen. Dadurch wanderten durch die angelegte elektrische Spannung die negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode auf die zwischen Gel und Anode gelegte PVDF-Membran. Das Blotting erfolgte für 40 min bei 4° C. Dadurch wurde ein zu hoher Anstieg der Leitfähigkeit durch Hitzeentwicklung während des Transfers vermieden.

Schließlich wurden die freien unspezifischen Proteinbindungsstellen der Proteine auf der Membran mit Rinderalbumin (3% in TBS-T: 20 mM Tris pH7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20; Bio-Rad Laboratories) blockiert. Zur Identifizierung der Proteine auf der PVDF-Membran wurden diese für 24 h in einer Färbeküvette bei 4° C im Kühlraum auf einem Plattformschüttler (Heidolph; Schwabach, Deutschland) mit spezifischen, monoklonalen Primär-Antikörpern behandelt. Während der Inkubationszeit sollten die Antikörper spezifisch an das jeweilige Antigen binden welches auf der Membran fixiert war. Tabelle 1 zeigt die verwendeten Antikörper.

<u>Primär-Antikörper</u>	<u>Sekundär-Antikörper</u>
Kaninchen anti-IkBa monoklonaler IgG-Antikörper (Cell Signaling #4812)	Ziege anti-Kaninchen IgG-Antikörper (HRP konjugiert; Cell Signaling #7074)
Kaninchen anti-p65 monoklonaler IgG-Antikörper (Cell Signaling #4764)	

Tabelle 1: Primär- und Sekundärantikörper für Untersuchungen des NF-κB-Systems (Cell Signaling, Danvers, MA, USA)

Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Geltaschen mit Proteinen wurden zusätzlich noch **β-Aktin** Antikörper (Cell Signaling #4967) und **Cyclin-B1** Antikörper (Cell Signaling #4138) verwendet. Die Antikörper-Lösung wurde abgenommen und die PVDF-Membranen in den Glaswannen auf dem Plattformschüttler 3 Mal für je 5 min mit TBS-T gewaschen. Der Waschvorgang diente dazu unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran zu entfernen. Nun folgte eine Inkubation mit einem Sekundär-Antikörper. Dieser war spezifisch gegen die Wirtsspezies des Primär-Antikörpers gerichtet und mit Meerrettichperoxidase (HRP; Santa Cruz) konjugiert.

Der Sekundär-Antikörper (Verdünnung 1:1000 in 5% Milchpulver in TBS-T) wurde für 1 h den gewaschenen Transfermembranen zugegeben. Daraufhin erfolgte ein weiterer wie oben beschriebener Waschschrift. Nun folgte die Zugabe der Enzym-Substrat-Lösung (Luminol Enhancer Lösung und stabiler Peroxid Puffer, Verhältnis 1:1; Thermo Fisher Scientific) für die HRP. Nach 5-minütiger Inkubation katalysierte die HRP die Oxidation von Luminol. Die Oxidation war proportional zur Menge des gebundenen Antikörpers. Die Auswertung erfolgte durch das Chemilumineszenz-Verfahren in einem Gel-Dokumentationsgerät (PqLab Biotechnologie GmbH; Erlangen, Deutschland). Die Membranen wurden dabei durch UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 280 \text{ nm}$ angeregt. Hierbei fand eine Emission von Licht statt.

3.4.1.5 Probenherstellung für IL-6 ELISA

Für das ELISA (Quantikine Human IL-6; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) zum Nachweis der IL-6 Konzentration wurden zunächst in 1 ml Medium resuspendierte hPDLF pro Well einer 12-Well-Platte ausgesät. Es folgte eine Inkubation von 24 h im Brutschrank. Dazu wurde zunächst das Medium in allen Wells abgenommen. Je 1 ml flüssiges Eluat der drei endodontischen Zemente, reines Medium oder Medium mit 10 μl Dexamethason (0,5 μM , Sigma-Aldrich) wurde pro Well hinzugegeben. Nach 1 h Präinkubation im Brutschrank folgte die Stimulation mit TNF- α (50 U/ml für hPDLF; Sigma-Aldrich). Die nun folgende Inkubationszeit betrug 15 min. Danach wurde in allen Wells das Medium oder Eluat abgenommen und 1 ml neues Medium pro Well pipettiert. Nach 24 h Inkubationszeit im Brutschrank wurden die Überstände abgenommen und in 1,5-ml-Eppendorfreaktionsgefäße für die nachfolgenden Versuche überführt.

3.4.1.6 ELISA zum Nachweis der IL-6 Konzentration

Zum Nachweis der möglichen Hemmung der Produktion von IL-6 in hPDLF wurden Sandwich ELISAs durchgeführt. Das ELISA ist ein immunologisches Verfahren und beruht auf dem Nachweis von spezifischen Antigenen. Dabei wurden Mikrotiterplatten verwendet die mit einem Primär-Antikörper beschichtet waren. Der Primär-Antikörper richtete sich gegen das zu bestimmende Antigen. Im weiteren Verlauf wurde ein Sekundär-Antikörper hinzugefügt. Dieser war ebenfalls gegen das Antigen gerichtet und zudem an das Enzym HRP gekoppelt. So entstand ein Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex, ein sogenanntes „Sandwich“. Ein zum Enzym HRP passendes chromogenes Substrat wurde daraufhin zugegeben. Durch

Enzymaktivität entstand ein Reaktionsprodukt. Der Nachweis des Reaktionsproduktes wurde durch Farbumschlag nachgewiesen. Die Enzymaktivität wurde während der Auswertung photometrisch erfasst und zwar proportional zur Menge an gebundenem Antigen. Abbildung 8 zeigt schematisch den Ablauf der Reaktion des Kits.

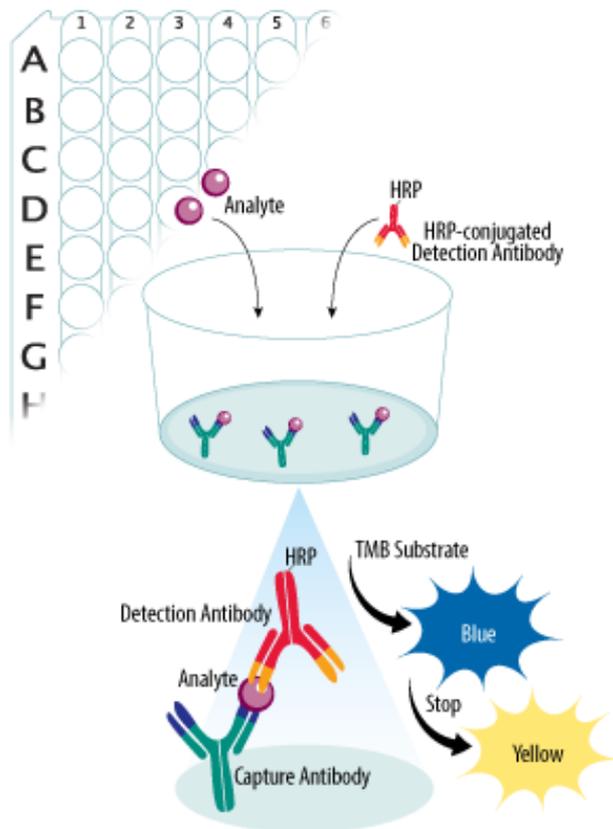


Abbildung 8: Grundlage des ELISA-Verfahrens mit Primär-Antikörper-Antigen-Sekundär-Antikörper Sandwich HRP gekoppelt (Abbildung Hersteller R&D Systems)

Im ersten Schritt des ELISAs wurden zunächst Verdünnungen eines im Kit enthaltenen IL-6 Standards mit ebenfalls beigefügtem Probenverdünnungsmedium hergestellt. Die Zellkulturüberstände wurden ebenfalls in einem Verhältnis von 1:20 mit dem Probenverdünnungsmedium verdünnt. Dies war nötig um Werte innerhalb des möglichen Messbereiches zu erhalten und mit der Standardkurve zu vergleichen. Zunächst wurden alle Wells der Mikrotiterplatte mit 100 µl Probenverdünnungsmedium befüllt. Dann wurden pro Well je 100 µl der Standard Verdünnungsreihe oder der verdünnten Proteinextrakte pipettiert. Um später die Präzision des Versuches zu gewährleisten, wurden je zwei Wells mit derselben Substanz befüllt. Als Kontrolle des Tests diente das Probenverdünnungsmedium. Schließlich erfolgte die Versiegelung der Platte mit einer Klebefolie. Es folgte eine

Inkubationszeit für 2 h bei Raumtemperatur. In diesem Zeitraum wurden die Antigene aus den Proben an die spezifischen Antikörper auf der Platte gebunden, entsprechend der jeweils vorhandenen Menge an Antigen.

Nach Entfernung der Klebefolie wurden die Wells entleert und ein viermaliger Waschvorgang mit Waschpuffer vorgenommen. Der Waschschrift war notwendig um Antikörper die nicht oder nur unspezifisch an die Mikrotiterplatte gebunden hatten zu entfernen. Daraufhin wurden in jedes Well 200 µl Antikörper-Enzym-Lösung pipettiert, die Platte wiederum versiegelt und noch mal für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung enthielt einen weiteren gegen das Antigen gerichteten Antikörper. An diesen Antikörper war das Enzym (HRP, Meerrettichperoxidase) gekoppelt. Dieser Antikörper wurde nun an die nach dem Waschen vorhandene Menge an Antigenen gebunden.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Waschvorgang wie oben beschrieben wiederholt und dann 200 µl Substratlösung pro Well hinzugefügt. Die Substratlösung setzte sich aus gleichen Teilen Farbreagenz A und Farbreagenz B zusammen (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin). Die Mikrotiterplatte wurde nun für 30 min lichtgeschützt aufbewahrt. In dieser Zeit katalysierte HRP die Aktivierung des Chromogens 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin zu 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidindiimin. Dies bewirkte eine Blaufärbung der Lösung entsprechend der Menge an gebundenem Enzym. Die Aktivierung machte es möglich die Enzymaktivität photometrisch zu erfassen. Diese war proportional zur Menge an gebundenem Antigen. Schließlich wurden 50 µl Stopp-Lösung (Schwefelsäure) in jedes Well hinzugefügt. Dabei erfolgte ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung der Extinktion der Proben erfolgte mithilfe eines ELISA- Readers bei $\lambda = 450 \text{ nm}$. Zur Auswertung der Messungen wurden zunächst anhand der Doppelbestimmungen die Mittelwerte berechnet. Die gemessenen Absorptionen des Standards (y-Achse) wurden gegen die bekannten Standardkonzentrationen aufgetragen (x-Achse). Anhand der Punkte wurde eine Gerade erstellt, welche alle Standardmesswerte am besten berücksichtigte. Mittels einer Tabellenkalkulationssoftware (Microsoft Excel, Redmont, VG, USA) wurde die Gleichung der entstandenen Gerade nach dem Schema $y = ax + b$ bestimmt. Schließlich wurden Messwerte der Proben mit denen der Standardkurve verglichen und über oben bestimmte Gleichung der Gehalt an IL-6 berechnet.

3.4.2 COX-System

COX-2 ist ein Enzym welches in entzündlich stimulierten hPDLF und hOB aktiv ist und dort die PGE₂ Produktion katalysiert. Die entzündliche Stimulation der Zellen erfolgte mittels IL-1 β . Im Rahmen der Versuche wurde das intrazelluläre Vorhandensein von COX-2 mittels Western Blot Verfahren und die Konzentration von PGE₂ mittels ELISA untersucht. Ein unspezifischer Hemmstoff für Cyclooxygenasen ist Indomethacin.

3.4.2.1 Stimulationsparameter für den Nachweis von COX-2

Für das Western Blot Verfahren wurden unstimulierte und artifiziell entzündlich stimulierte hPDLF und hOB getestet. Für die unstimulierten Zellen wurde pro Well einer 6-Well-Platte je 1 ml Eluat der drei endodontischen Zemente oder 1 ml reines Medium pipettiert. Indomethacin (300 mM; Sigma-Aldrich) diente als Hemmstoff der COX-2 (Riendeau *et al.*, 1997) und wurde für 24 h im Brutschrank Co-Inkubiert. Analog zum Vorgehen in 3.4.1.5. wurden die Zellen geerntet. Um artifiziell entzündlich stimulierte Zellen zu erhalten, wurde derselbe Vorgang wiederholt, nur wurde IL-1 β (2 μ g/ml; Sigma-Aldrich) zeitgleich mit den Eluaten der endodontischen Materialien für 24 im Brutschrank koinkubiert.

3.4.2.2 Elektrophorese und Western Blot Verfahren zum Nachweis von COX-2

Die Arbeitsschritte für den Nachweis der COX-2 in hPDLF erfolgten in analoger Reihenfolge wie in 2.4.1.2. beschrieben. In Tabelle 2 finden sich die verwendeten Antikörper.

<u>Primär-Antikörper</u>	<u>Sekundär-Antikörper</u>
Kaninchen anti-COX-2 monoklonaler IgG-Antikörper (Cell Signaling #12282)	Ziege anti-Kaninchen IgG-Antikörper (HRP konjugiert; Cell Signaling #4764)

Tabelle 2: Primär- und Sekundärantikörper zum Nachweis von COX-2 (Cell Signaling)

Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Geltaschen mit Proteinen wurden zusätzlich noch **β -Aktin** Antikörper für zytoplasmatische Proteine (Cell Signaling #4967) verwendet.

3.4.2.3 Probenherstellung für PGE₂ EIA

Für die Durchführung des kompetitiven Enzym-Immunoassays (kompetitives EIA, PGE₂ high sensitivity EIA; Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY USA) zum Nachweis der PGE₂-Konzentration in hPDLF und hOB wurden zunächst in 1 ml Medium resuspendierte Zellen pro Well einer 12-Well-Platte ausgesät. Es folgte eine Inkubation von 24 h im Brutschrank. 1 ml Eluat der drei endodontischen Materialien oder 1 ml reines Medium pipettiert. Indomethacin (300 mM; Sigma-Aldrich) diente wiederum als Hemmstoff und wurde für 24 h im Brutschrank Co-Inkubiert. Die artifizielle entzündliche Stimulation erfolgte analog zum Vorgehen in 3.4.1.5. Wie bereits in 3.4.1.2 beschrieben wurden nach Ablauf der Inkubationszeit die Zellkulturüberstände für die Durchführung des EIA gewonnen.

3.4.2.4 EIA zum Nachweis der PGE₂ Konzentration

Das EIA Kit bestand aus einer Mikrotiterplatte, die mit einem monoklonalen Antikörper (Anti-Maus IgG₁-Antikörper) beschichtet war. An den Antikörper banden kompetitiv entweder das in den Zellkulturüberständen enthaltene PGE₂ oder das PGE₂ bekannter Konzentration aus der PGE₂-Konjugat-Lösung des Kits. Das PGE₂ der Lösung war kovalent an das Enzym ALP gebunden. Je nach Konzentration band mehr PGE₂ aus den Zellkulturüberständen oder aus dem Konjugat an den Antikörper der Mikrotiterplatte.

Zunächst wurde wiederum eine Standardreihe hergestellt, die PGE₂ Standard Lösung wurde mit Zellkulturmedium verdünnt und in die Mikrotiterplatte pipettiert. Die Zellkulturüberstände wurden ebenfalls in die Platte pipettiert. Als Blindwert diente das Zellkulturmedium. Schließlich wurden der Standardreihe und den Zellkulturüberständen sowohl PGE₂-Konjugat-Lösung (ALP konjugiert mit PGE₂) als auch Antikörper (monoklonaler Antikörper gegen PGE₂) hinzugefügt. Die Mikrotiterplatte wurde versiegelt und für 24 h bei 4°C auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Wells (TBS-T, 1X) wurde gepufferte p-Nitrophenylphosphat-Lösung (Substrat für ALP) in die Wells pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37°C. Danach wurde eine Stopp-Lösung (verdünnte Phosphorsäure) pipettiert und es erfolgte die Messung der optischen Dichte der Proben bei $\lambda = 405$ nm mittels eines ELISA-Readers. Abbildung 9 zeigt eine exemplarische Well-Platte nach Abschluss der Farbreaktion.

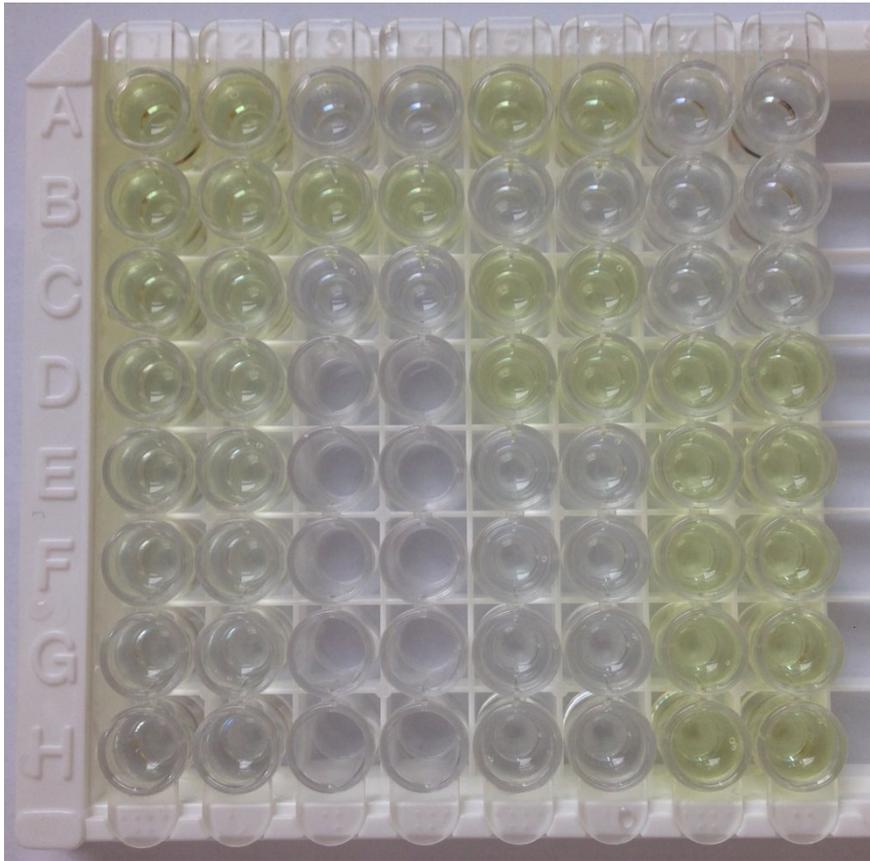


Abbildung 9: EIA-Platte nach Abschluss des Assays mit beendeter Farbreaktion

3.5 Regeneratives Potential der Zemente

Zur Überprüfung des möglichen regenerativen Potentials von ProRootMTA, Medcem MTA und Biodentine wurden analog zum oben beschriebenen Punkt sowohl eine Analyse der Produktionssteigerung der beteiligten Proteine und Enzyme als auch Enzym-Immunoassays durchgeführt. Die verwendeten Zellen waren dabei hMSC und hPDSC_hTERT Zellen. Diese wurden für die Versuchsreihen nicht entzündlich stimuliert, sondern für 72 h mit 1 ml der Eluate der endodontischen Zemente inkubiert. Besonders die Expression des osteogenen Markers RUNX2 als auch der Nachweis von OCN im Überstand des Kulturmediums wurden untersucht.

3.5.1 Nachweis von RUNX2 mittels Western Blot

Der Nachweis des Transkriptionsfaktors RUNX2 erfolgte mittels Western Blot-Verfahren. Die hMSC und hPDS Zellen wurden dafür in entsprechendem Medium resuspendiert und 2 ml pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach 72 h Inkubationszeit im Brutschrank und visueller Kontrolle der Zellen unterhalb des Durchlichtmikroskopes wurde das Medium abgenommen und pro Well 1 ml flüssiges Eluat der drei endodontischen Materialien hinzugegeben. Als Negativkontrolle diente

1 ml des entsprechenden Mediums. Nach 3 Tagen Inkubation wurden die Zellen geerntet. Ein Western Blot-Verfahren zum Nachweis von RUNX2 wurde durchgeführt. Tabelle 3 zeigt die verwendeten Antikörper.

<u>Primär-Antikörper</u>	<u>Sekundär-Antikörper</u>
Kaninchen anti-RUNX2 monoklonaler IgG-Antikörper (#8486)	Ziege anti-Kaninchen IgG-Antikörper (HRP konjugiert; #7074)

Tabelle 3: Primär- und Sekundärantikörper für den Nachweis von RUNX2 (Cell Signaling)

Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Geltaschen mit Proteinen wurden dieselben Antikörper verwendet wie bereits beschrieben.

3.5.2 Nachweis von Osteocalcin mittels ELISA

Für den Nachweis von OCN im Überstand des Kulturmediums der hPDSC_hTERT und der hMSC Zellen wurden diese zunächst in entsprechendem Medium resuspendiert und in 12-Well ausgesetzt. Je 1 ml pro Well wurde pipettiert. Es folgte eine Inkubation für 24 h im Brutschrank. Danach wurde das Medium abgenommen und pro Well 1 ml flüssiges Eluat der drei endodontischen Materialien hinzugegeben. Als Negativkontrolle diente 1 ml des entsprechenden Mediums. Als Positivkontrolle diente modifiziertes Osteocalcin Medium (100 nM Dexamethason, 10 mM β -Glycerophosphat, 0,05 mM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat) nach Jaiswal und Mitarbeitern (Jaiswal *et al.*, 1997). Nach 3 Tagen Inkubation wurde in allen Wells das Medium oder Eluat abgenommen und die Konzentration von OCN bestimmt.

Für das nun folgende ELISA (Quantikine ELISA human OCN; R&D Systems) wurden zunächst Verdünnungen eines im Kit enthaltenen humanen OCN Standards mit ebenfalls beigefügtem Probenverdünnungsmedium hergestellt. Die weitere Durchführung des Versuchs und die Auswertung erfolgten analog zu 2.4.2.2. Schließlich wurden Messwerte der Proben mit denen der Standardkurve verglichen und über oben bestimmte Gleichung der Gehalt an humanem OCN berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Toxizitätsassays

4.1.1 WST-8-Test

Drei verschiedene Zellarten (hGF-1, hPDLF, hOB) wurden im Rahmen des WST-8-Tests mit Zementeluat von ProRootMTA, Medcem MTA und Biodentine inkubiert. Als Negativkontrolle diente reines Zellkulturmedium und als Positivkontrolle 1%-iges Triton X-100. Die Zellviabilität der Negativkontrolle war der Richtwert zur Festlegung der 100% Marke. Die Positivkontrolle wies bei allen drei Zellarten Werte zwischen 0% und 1% Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle auf.

Abbildung 10 zeigt zusammenfassend die Werte der Zellviabilitäten von hGF-1, hPDLF und hOB im Rahmen des durchgeführten WST-8-Tests der jeweils unverdünnten Eluate. Bei ProRootMTA ließen sich im Vergleich zu Medcem MTA etwas höhere Werte der Zellviabilität bei allen drei Zellarten feststellen (hGF-1 = $90,61 \pm 4,43\%$; hPDLF = $97,14 \pm 4,53\%$; hOB = $94,16 \pm 6,00\%$). Medcem MTA wies insgesamt die niedrigsten Werte der Zellviabilität auf. Diese lagen bei hGF-1 bei $76 \pm 8,23\%$, bei hPDLF bei $89,68 \pm 7,79\%$ und bei hOB bei $83,51 \pm 9,29\%$. Auffallend bei hPDLF nach Inkubation mit Biodentine war die Zellviabilität von $109,79 \pm 2,07\%$. Diese lag demnach höher als der 100% Wert der Negativkontrolle.

Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte keine signifikanten Unterschiede der Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle sowohl für die hPDLF als auch für die hOB, die mit Zementeluat von ProRootMTA, Medcem MTA und Biodentine inkubiert worden waren. Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte einen signifikanten Einfluss der Materialien auf die Zellviabilität ($p = 0,03$). Der Tukey-HSD-Post-Hoc-Test zeigte signifikant niedrigere Werte im Vergleich zur Negativkontrolle für die Zellen, die mit Zementeluat von Medcem MTA und Biodentine inkubiert worden waren (Medcem MTA $p = 0,003$, Biodentine $p = 0,007$).

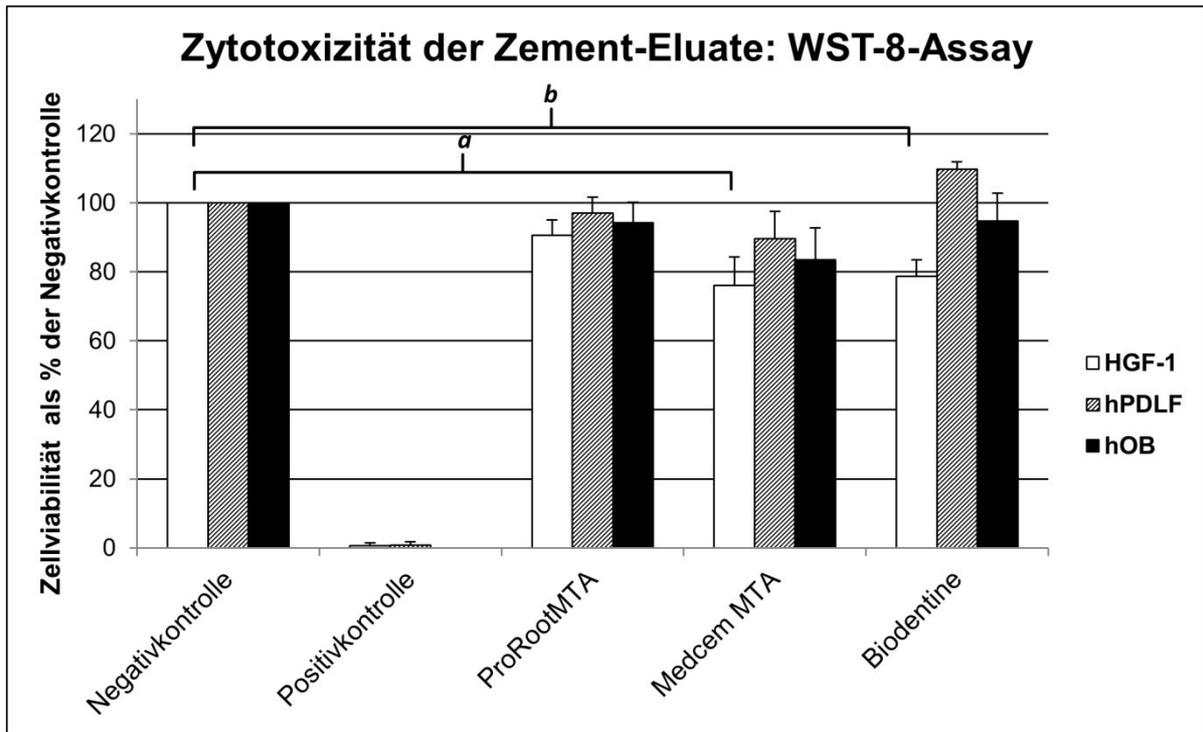


Abbildung 10: Ergebnisse des WST-8-Test – Durchschnittliche Zellviabilität von hGF-1, hPDLF und hOB nach Inkubation mit den Zementeluatens als % der Negativkontrolle; ^ap = 0,003, ^bp = 0,007

4.1.2 Mikrokerntest

Der Mittelwert der Anzahl der Zellen mit Mikronuklei nach Inkubation mit Eluatens von ProRootMTA, Medcem MTA und Biodentine ist in Tabelle 4 dargestellt. Es besteht kein Anhalt auf eine mögliche Genotoxizität der drei Materialien.

Testsubstanz	Anzahl der Mikronuklei Mittelwert ± SD (n = 3)
Negativkontrolle (Medium)	2,7 ± 1,2
Positivkontrolle (EMS, 300 µg/ml)	42,3 ± 9,7
ProRootMTA	3,3 ± 0,5
Medcem MTA	2,7 ± 1,7
Biodentine	4,7 ± 1,2

Tabelle 4: Mittelwert der Anzahl der Mikronuklei mit Standardabweichung

4.2 NF-κB-System

Die Wirkung der Materialien ProRootMTA, Medcem MTA und Biodentine auf die inflammatorische Signaltransduktion in Bezug auf das NF-κB-System wurde mittels Western Blot (IκBα, NF-κB p65) und ELISA (IL-6) untersucht.

4.2.1 I κ B α und NF- κ B p65 Nachweis mittels Western Blot

Abbildung 11 zeigt eine exemplarische Auswertung eines Western Blots auf I κ B α . Dabei fällt deutlich der Abfall der Konzentration von I κ B α in der zweiten Bande des Blots auf, welcher die alleinig mit TNF- α stimulierte Gruppe darstellt. Die Hemmung mit Dexamethason zeigte, dass trotz Stimulation kein Abfall der I κ B α -Konzentration zu beobachten war. Bei den Testgruppen mit den Zementeluatzen zeigt sich keine eindeutige Veränderung der Menge von I κ B α im Vergleich zur Stimulationskontrolle. Der untere Blot (Abbildung 12) zeigt die Expression von Actin als Kontrolle einer gleichmäßigen Proteinladung während der Gelelektrophorese.

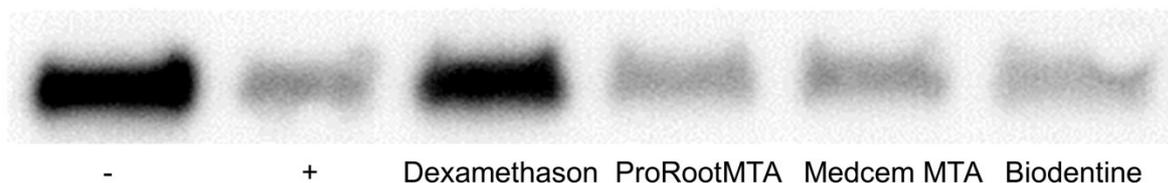


Abbildung 11: exemplarisches Western-Blot-Ergebnis auf I κ B α nach Inkubation mit Zementeluatzen

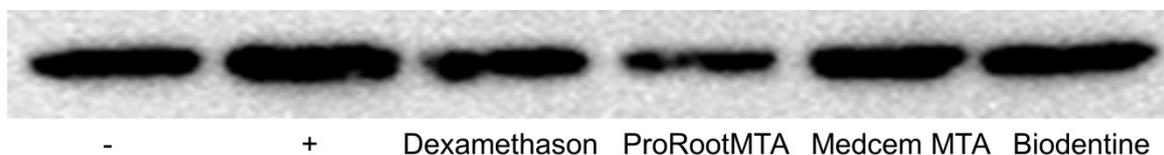


Abbildung 12: exemplarisches Western-Blot-Ergebnis auf Actin zur Ladungskontrolle

Um die Vorgänge im Zellkern darzustellen wurden als Pendant mit den nucleären Extrakten Western Blots durchgeführt. Abbildung 13 zeigt somit naturgemäß ein entgegengesetztes Verhalten von NF- κ B p65 für die Kontrollgruppen. Ebenso zeigt sich lediglich bei ProRoot MTA eine geringfügig niedrigere NF- κ B p65-Konzentration im Vergleich zur Positivkontrolle, was auf eine geringe Aktivierung von NF- κ B durch ProRootMTA hindeutet. Abbildung 14 zeigt die gleichmäßige Proteinladung der Gele bei einem Western Blot mit Cyclin B als Primärantikörper.

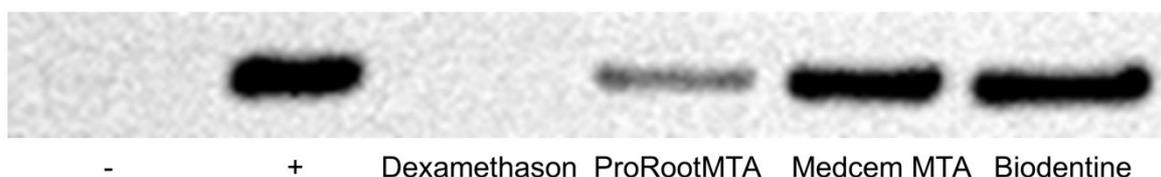


Abbildung 13: exemplarisches Western-Blot-Ergebnis auf NF- κ B p65 nach Inkubation mit Zementeluatzen

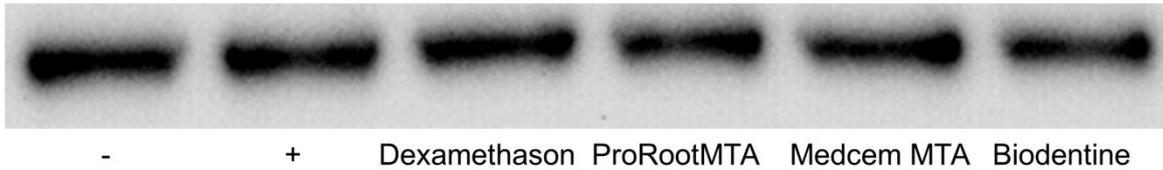


Abbildung 14: exemplarisches Western-Blot-Ergebnis auf Cyclin B zur Ladungskontrolle

4.2.2 IL-6 Nachweis mittels ELISA

Abbildung 15 zeigt die Konzentration von IL-6 im Zellkulturmedium von hPDLF nach Inkubation mit den Zementeluatden der drei getesteten Materialien. Die Proben mit den entzündlich stimulierten Zellen wiesen im Vergleich höhere IL-6 Konzentrationen auf als die Proben mit den unstimulierten Zellen. Ein deutliches Gefälle zeigten die verschiedenen Proben nach Inkubation mit Medcem MTA. Hier unterschied sich die IL-6 Konzentration der stimulierten hPDLF mit $113,75 \pm 58,86$ pg/ml deutlich von der Konzentration der unstimulierten hPDLF mit $30,95 \pm 9,14$ pg/ml. Medcem MTA wies auch im Gesamtvergleich bei den entzündlich stimulierten Zellen die höchste IL-6 Konzentration auf (ProRootMTA = $107,68 \pm 54,71$ pg/ml , Biodentine = $94,75 \pm 84,11$ pg/ml). Bei den unstimulierten hPDLF bewirkte ProRootMTA eine IL-6 Konzentration von $61,58 \pm 17,06$ pg/ml, Medcem MTA und Biodentine bewirkten eine IL-6 Konzentration von $30,95 \pm 9,14$ pg/ml und $54,70 \pm 29,49$ pg/ml. Die höchste IL-6 Konzentration wies die Positivkontrolle mit $195,40 \pm 9,37$ pg/ml auf. Der Wert der Negativkontrolle betrug $23,73 \pm 8,77$ pg/ml IL-6 und der Wert der Hemmkontrolle $8,30 \pm 2,59$ pg/ml. Dies ist in Abbildung 15 dargestellt.

Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ($p = 0,001$). Der LSD-Post-Hoc-Test zeigte signifikant niedrigere Werte im Vergleich zur Positivkontrolle für stimulierte Zellen, die mit Zementeluatden von ProRootMTA und Biodentine inkubiert worden waren (ProRootMTA $p = 0,045$, Biodentine $p = 0,024$). Die einfaktorielle Varianzanalyse für hPDLF ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

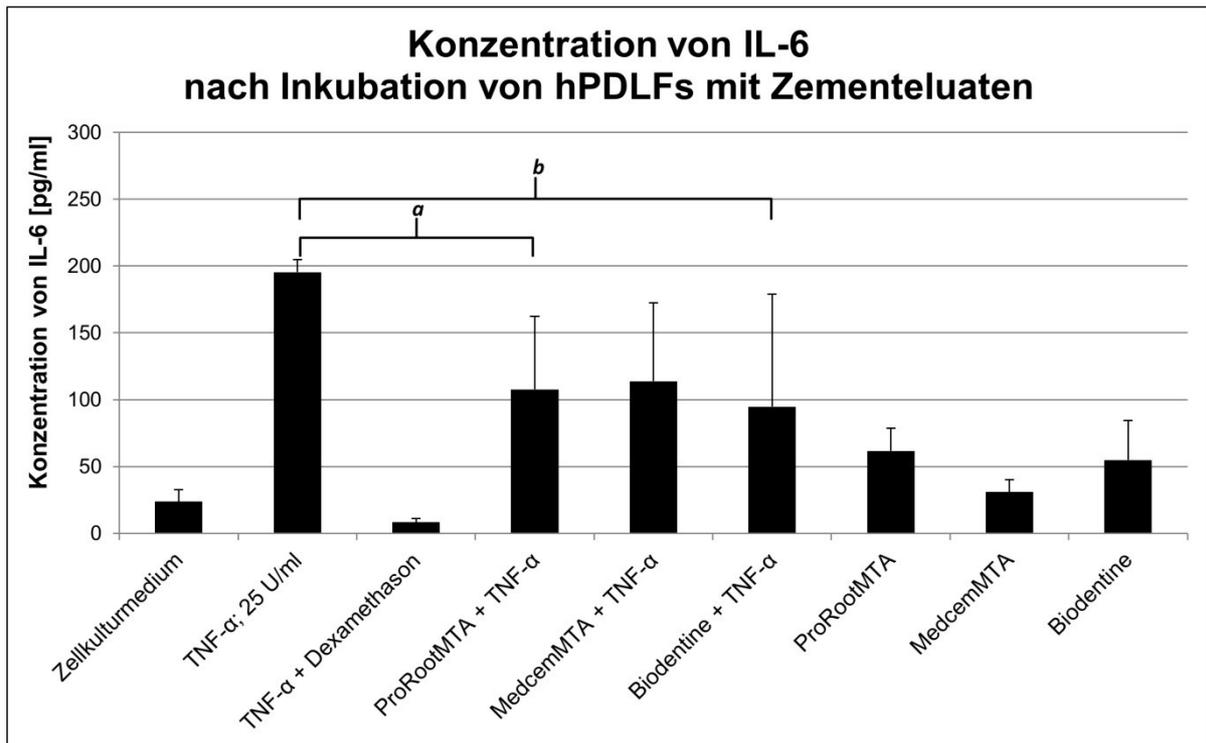


Abbildung 15: IL-6 Konzentrationen nach Inkubation von unstimulierten und entzündlich stimulierten hPDLF mit Zementeluat; ^a $p = 0,045$, ^b $p = 0,024$

4.3 Cyclooxygenase System

Die Auswirkungen der Materialien ProRootMTA, Medcem MTA und Biodentine auf das Cyclooxygenase-System werden nachfolgend in den Ergebnissen der COX-2 Western Blots und PGE₂-EIAs dargestellt.

4.3.1 COX-2 Nachweis mittels Western Blot

In Abbildung 16 ist ein exemplarisches Western-Blot-Ergebnis für die Expression der Cyclooxygenase 2 dargestellt. Dabei stehen die deutliche Expressionssteigerung bei Stimulation mit IL-1 β sowie eine fast vollständige Expressionshemmung bei Inkubation mit Indomethacin ins Auge. ProRootMTA und Medcem MTA bewirkten lediglich eine geringfügig höhere Expression von COX-2 im Vergleich mit der Negativkontrolle, Biodentine hingegen zeigte eine deutliche Expressionssteigerung des Enzyms. Die gleichmäßige Ladung der Gele wird in Abbildung 17 als Western Blot auf Actin dargestellt.



- + Indomethacin ProRootMTA Medcem MTA Biodentine

Abbildung 16: exemplarisches Western-Blot-Ergebnis auf COX-2 nach Inkubation mit Zementeluat



- + Indomethacin ProRootMTA Medcem MTA Biodentine

Abbildung 17: exemplarisches Western-Blot-Ergebnis auf Actin zur Ladungskontrolle

4.3.2 PGE₂ Nachweis mittels EIA

In Abbildung 18 wird die PGE₂ Konzentration im Zellkulturüberstand unterschiedlicher hPDLF Proben dargestellt. Bei der Negativkontrolle mit reinem Zellkulturmedium lagen die Werte der PGE₂ Konzentration bei $498,76 \pm 213,54$ pg/ml und bei der Hemmkontrolle mit beigefügtem Hemmstoff Indomethacin lag die PGE₂ Konzentration bei $306,54 \pm 199,44$ pg/ml. Bei der Positivkontrolle bewirkte die entzündliche Stimulation mit IL-1 β einen Anstieg der PGE₂ Konzentration auf $5077,24 \pm 1182,25$ pg/ml. Die mit den drei unterschiedlichen Materialien inkubierten hPDLF, welche zusätzlich entzündlich stimuliert worden waren, zeigen insgesamt höhere PGE₂ Konzentrationen als die Proben der unstimulierten hPDLF. Biodentine bewirkte bei den stimulierten hPDLF den höchsten Anstieg der PGE₂ Konzentration auf $14255,60 \pm 2464,09$ pg/ml, gefolgt von Medcem MTA mit $6108,11 \pm 3231,17$ pg/ml und ProRootMTA mit $3527,39 \pm 1831,97$ pg/ml. Auch bei den Proben unstimulierter hPDLF wies der Zellkulturüberstand nach Inkubation mit dem Material Biodentine die höchste PGE₂ Konzentration von $7461,94 \pm 5690,87$ pg/ml auf. Sowohl Medcem MTA als auch ProRoot MTA bewirkten beide einen Anstieg der PGE₂ Konzentration auf Werte um circa 1000 pg/ml. Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p < 0,0001$). LSD-Post-Hoc-Tests zeigten im Vergleich zur Positivkontrolle keine signifikanten Unterschiede für die stimulierten Zellen, die mit ProRootMTA und Medcem MTA inkubiert worden waren (ProRootMTA $p = 0,537$, Medcem MTA $p = 0,680$), allerdings signifikant höhere Werte im Vergleich zur Positivkontrolle für die stimulierten Zellen, die mit Biodentine inkubiert worden waren (Biodentine $p = 0,002$).

Die Inkubation der Zellen mit Biodentine führte auch ohne Stimulation zu einer signifikanten Steigerung der PGE₂-Konzentration ($p = 0,011$)

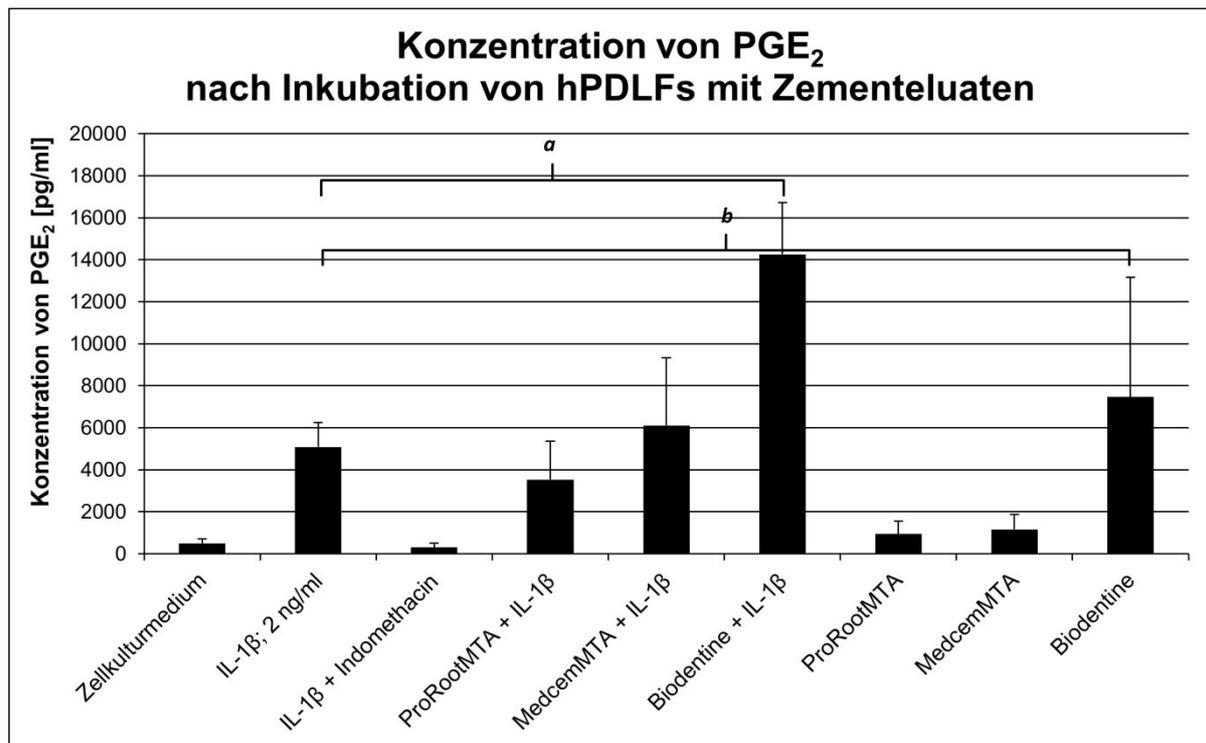


Abbildung 18: Ergebnisse des PGE₂-EIA mit hPDLF nach Inkubation mit Zementeluat; ^a $p = 0,002$, ^b $p = 0,011$

In Abbildung 19 wird die PGE₂ Konzentration im Zellkulturüberstand von hOB dargestellt. Die Negativkontrolle wies einen Wert von $582,08 \pm 267,18$ pg/ml auf und der Wert der Hemmkontrolle mit Indomethacin lag etwas höher bei $1294,558 \pm 632,82$ pg/ml. Die entzündlich stimulierten hOB, welche mit ProRootMTA, Medcem MTA und Biodentine inkubiert worden waren, wiesen in absteigender Reihenfolge folgende PGE₂ Konzentrationen auf, Biodentine $28157,80 \pm 1197,84$ pg/ml, Medcem MTA $7291,78 \pm 6093,90$ pg/ml und ProRootMTA $4935,74 \pm 647,67$ pg/ml. Die Proben von unstimulierten hOB, inkubiert mit ProRootMTA, Medcem MTA und Biodentine, wiesen alle Werte bis zu maximal 1200 pg/ml auf.

Die einfaktorielle Varianzanalyse mit Post-Hoc-Test zeigte einen signifikanten Einfluss der Materialien auf die PGE₂-Konzentration ($p = 0,03$). Der LSD-Post-Hoc-Test zeigte niedrigere Werte im Vergleich mit der Positivkontrolle für die stimulierten hOB, die mit Zementeluat von ProRootMTA und Medcem MTA inkubiert worden waren (ProRootMTA $p = 0,003$, Medcem MTA $p = 0,012$), jedoch signifikant höhere Werte im Vergleich zur Positivkontrolle für die stimulierten hOB, welche mit Biodentine inkubiert worden waren (Biodentine $p = 0,002$).

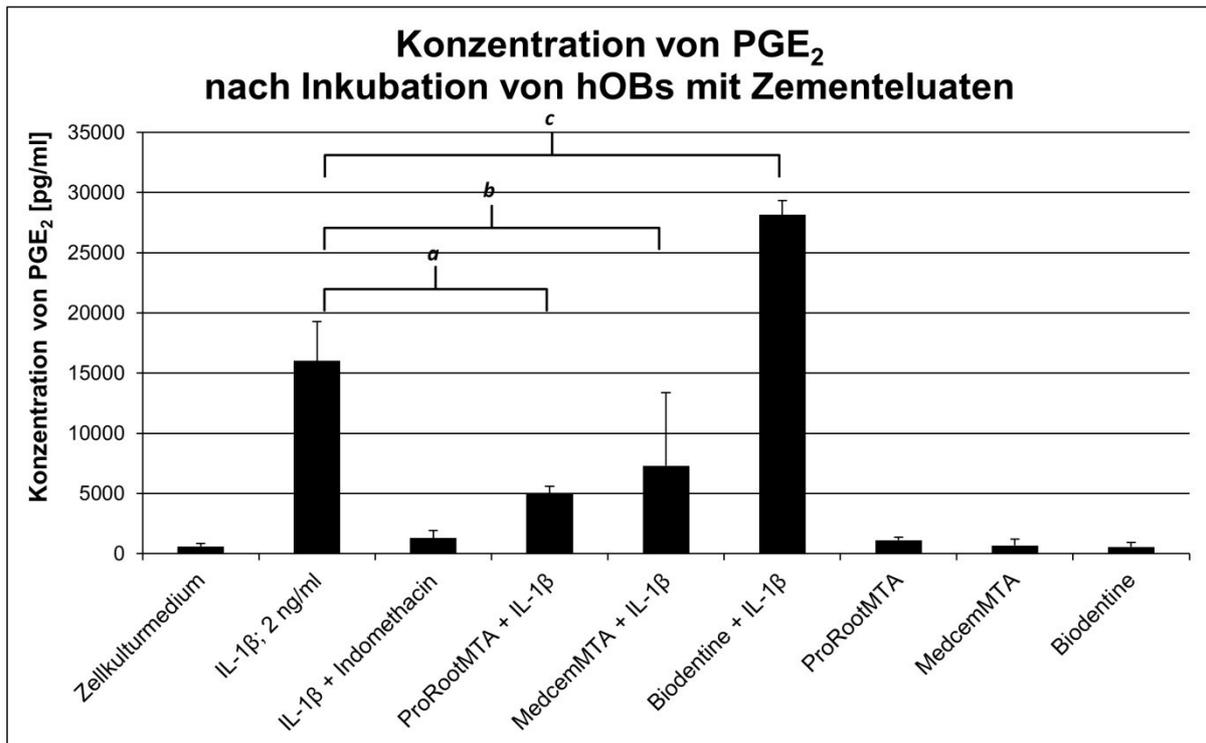


Abbildung 19: Ergebnisse des PGE₂-EIA mit hOB nach Inkubation mit Zementeluat; ^ap = 0,003, ^bp = 0,012, ^cp = 0,002

4.4 Regeneratives Potential

Das regenerative Potential der Materialien ProRootMTA, Medcem MTA und Biodentine wurde auf verschiedenen Ebenen mittels unterschiedlicher Methoden überprüft. Zum Nachweis der osteogenen Differenzierung wurden die Menge eines sekretorischen osteogenen Markerproteins (Osteocalcin, ELISA) und die Expressionsrate eines hierfür typischen Transkriptionsfaktors (RUNX2, Western Blot) untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Versuche dargestellt.

4.4.1 RUNX2 Nachweis mittels Western Blot

Abbildung 20 zeigt die Auswertung der Expressionsrate von RUNX2 nach Inkubation der Zellen mit den Zementeluat. Dazu wurden Western Blots der hPDS_C_hTERT-Proteine mit einem gegen RUNX2 gerichteten Antikörper durchgeführt. Es zeigten sich deutliche Intensitätsunterschiede. Die höchste Intensität der Banden wiesen in diesem Fall Medcem MTA und Biodentine auf, gefolgt von der Positivkontrolle. ProRootMTA wies die geringste Grauintensität beim Vergleich der drei Materialien auf.

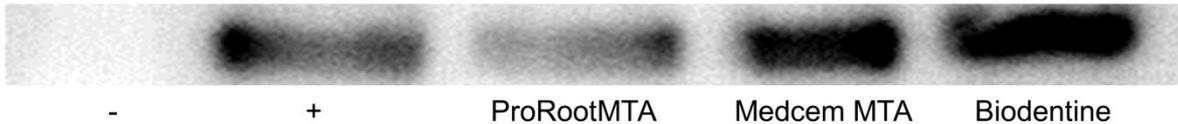


Abbildung 20: exemplarisches Western-Blot-Ergebnis auf RUNX2 nach Inkubation mit Zementeluat

Abbildung 21 zeigt die Kontrolle der Auswertung der Expressionsrate von RUNX2 der hPDSC_hTERT nach Inkubation mit Anti-Cyclin B-Antikörper. Bei der Detektierung mittels Western Blot zeigten sich lediglich sehr geringfügige Intensitätsunterschiede. Somit kann von einer einheitlichen Proteinladung der einzelnen Geltaschen ausgegangen werden.

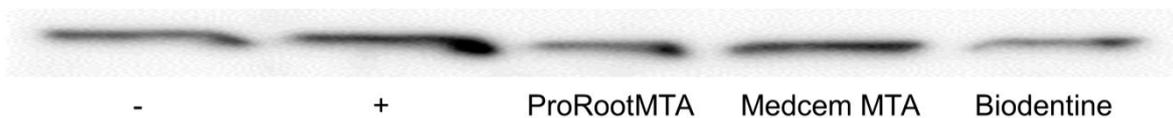


Abbildung 21: exemplarisches Western-Blot-Ergebnis auf Actin zur Ladungskontrolle

4.4.2 Osteocalcin-ELISA

In Abbildung 22 wird die OCN Konzentration durch Nachweis mittels Osteocalcin-ELISA im Zellkulturüberstand sowohl von hPDSC_hTERT als auch von hMSC dargestellt. Dafür wurden die Zementeluate der Materialien ProRootMTA, Medcem MTA und Biodentine mit den Zellarten inkubiert. Als Negativkontrolle diente das jeweilige Zellkulturmedium. Als Positivkontrolle diente optimiertes Osteocalcin Medium (100 nM Dexamethason, 10 mM β -Glycerophosphat, 0,05 mM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat) nach Jaiswal und Mitarbeitern (Jaiswal *et al.*, 1997).

Beim Vergleich der Wirkung der drei Zementeluate auf die hPDSC_hTERT zeigte ProRootMTA die höchsten Werte der OCN Konzentration von $6,84 \pm 3,25$ pg/ml gefolgt von Medcem MTA und Biodentine mit jeweils $5,91 \pm 1,21$ pg/ml und $5,83 \pm 2,53$ pg/ml. Niedrigere Werte wies die Positivkontrolle mit $5,30 \pm 0,65$ pg/ml auf. Die geringste OCN Konzentration hatte die Negativkontrolle mit $3,94 \pm 0,73$ pg/ml. Insgesamt betrachtet zeigten sich bei hPDSC_hTERT höhere OCN Konzentrationen als bei dem hMSC. Hier wies die Positivkontrolle mit $5,38 \pm 0,60$ pg/ml den höchsten Wert der OCN Konzentration auf. ProRootMTA lag mit $4,35 \pm 0,36$ pg/ml etwas darunter. Medcem MTA wies eine OCN Konzentration von $2,81 \pm 0,51$ pg/ml auf, ähnliche Werte hatte auch die Negativkontrolle. Die geringste OCN Konzentration in

Verbindung mit hMSC wiesen die Proben auf, welche mit Biodentine inkubiert worden waren, nämlich $1,18 \pm 0,04$ pg/ml.

Die einfaktorielle Varianzanalyse ($p = 0,038$) mit LSD-Post-Hoc-Test zeigte signifikant höhere Werte im Vergleich zur Negativkontrolle für die hMSC, die mit Zementeluat von ProRootMTA inkubiert worden waren (ProRootMTA $p = 0,002$). Sie zeigte ebenfalls signifikant niedrigere Werte im Vergleich zur Negativkontrolle für die hMSC, die mit Zementeluat von Biodentine inkubiert worden waren (Biodentine $p = 0,005$). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Negativkontrolle für die hPDSC_hTERT, die mit ProRootMTA, Medcem MTA und Biodentine inkubiert worden waren (ProRootMTA $p = 0,172$, Medcem MTA $p = 0,341$, Biodentine $p = 0,360$).

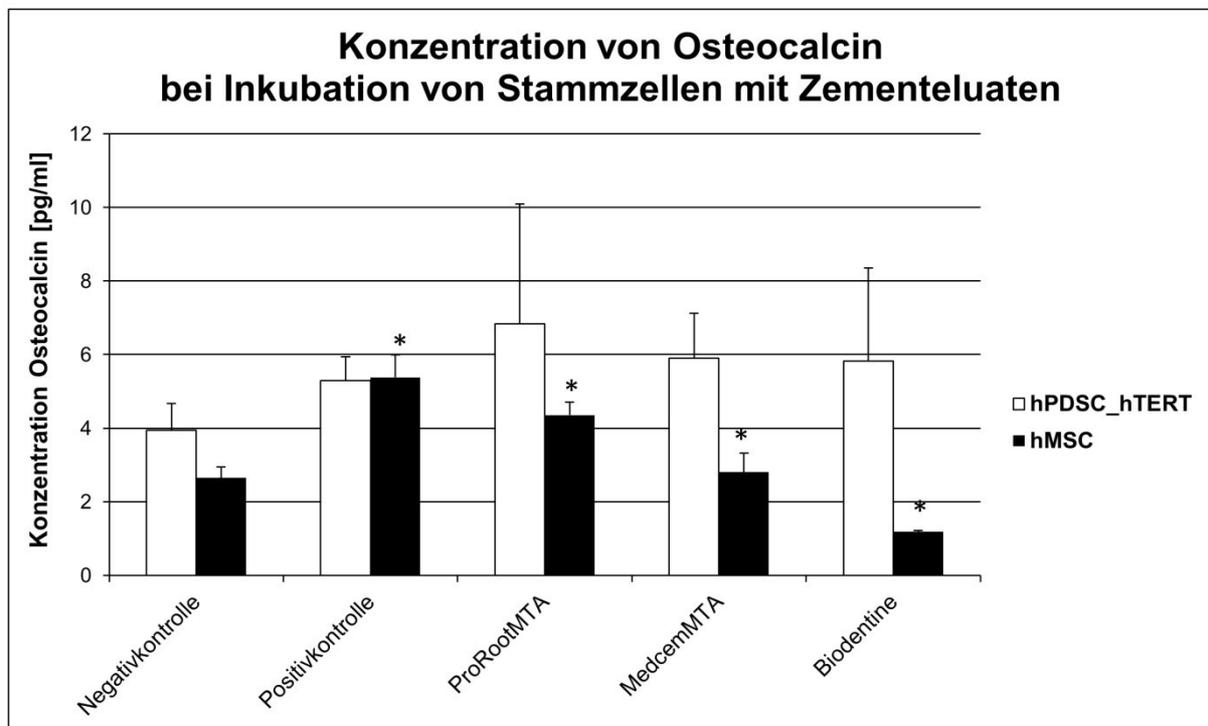


Abbildung 22: Ergebnisse des Osteocalcin-ELISA mit hPDSC_hTERT und hMSC nach Inkubation mit Zementeluat, * signifikant, $p < 0,05$

5 Diskussion

In der vorliegenden Studie werden die drei endodontisch eingesetzten Materialien Medcem MTA, ProRootMTA und Biodentine im Hinblick auf deren biologische Eigenschaften untersucht. Dazu zählen insbesondere die Biokompatibilität, die Wirkung auf Wege der inflammatorischen Signaltransduktion und das regenerative Potential. Zu diesem Zweck wurde Medcem MTA mit zwei weiteren in der Endodontie häufig eingesetzten Materialien, nämlich dem längstjährig etablierten ProRootMTA und dem neueren Biodentine, verglichen. Bei dieser Arbeit handelt es sich demnach um eine experimentelle Studie, die sich den biologischen Eigenschaften in bereits erwähnter Form widmet.

Im Hinblick auf die Biokompatibilität, genauer die Zytotoxizität, wurde gezeigt, dass sowohl ProRootMTA als auch Medcem MTA und Biodentine ein gewisses zytotoxisches Potential aufweisen, jedoch alle drei Zemente auf Basis der vorliegenden Ergebnisse trotzdem biokompatible Materialien sind. Diese Schlussfolgerung ist vor allem in Bezug auf ProRootMTA und Biodentine in der Vergangenheit durch zahlreiche Studien ähnlich bestätigt worden (Khedmat *et al.*, 2014; Samyukhta *et al.* 2014; Yoshino *et al.*, 2013). Zytotoxizität wurde im Rahmen unserer Studie durch den Nachweis von vitalen, metabolisch aktiven Zellen innerhalb einer Zellpopulation bestimmt, also der prozentual angegebenen Zellviabilität. Im Umkehrschluss ergab sich je nach Material eine prozentuale Reduktion der Zellviabilität durch mögliche zytotoxische Wirkung. Dabei stellte sich im WST-8 Test heraus, dass je nach Material und Verdünnung des Materials auch das Gegenteil eintreten konnte. Die wichtigste Erkenntnis bei Betrachtung der Ergebnisse war, dass die einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-HSD-Test keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Negativkontrolle zeigte, sowohl für die hPDLF als auch für die hOB, die mit reinen Zementeluat von ProRootMTA, Medcem MTA und Biodentine inkubiert worden waren (hPDLF: ProRootMTA $p = 0,954$, Medcem MTA $p = 0,170$, Biodentine $p = 0,204$; hOB: ProRootMTA $p = 0,868$, Medcem MTA $p = 0,124$, Biodentine $p = 0,903$). Lediglich für die hGF-1 zeigte die einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-HSD-Test signifikant niedrigere Werte im Vergleich zur Negativkontrolle für die Proben, die mit Zementeluat von Medcem MTA und Biodentine inkubiert worden waren (Medcem MTA $p = 0,003$, Biodentine $p = 0,007$).

Man kann also feststellen, dass das bisher nur wenig untersuchte Material Medcem MTA in Bezug auf die Zytotoxizität definitiv ähnliche Eigenschaften aufweist, wie das auf dem Markt etablierte ProRootMTA und auch Biodentine. Da vor allem ProRootMTA in vielen klinischen Bereichen der Zahnmedizin erfolgreich eingesetzt wird, ist die vernachlässigbare Zytotoxizität von Medcem MTA also ein wichtiger Punkt für die Anwendung in den Bereichen retrograde Wurzelkanalfüllung nach Wurzelspitzenresektion und Apexifikation. Bei beiden Gebieten kommt das eingebrachte Material mit vitalem Gewebe in Kontakt. Bei der Apexifikation ist eine geringe Zytotoxizität besonders von Bedeutung, da diese bei jüngeren Patienten und dementsprechend an devitalen, jugendlichen Zähnen, welche kein abgeschlossenes Wurzelwachstum aufweisen, durchgeführt wird (Bishop *et al.*, 2002). Bei der retrograden Wurzelkanalfüllung ist es Ziel das Wurzelkanalsystem nach apikal dicht zu verschließen, hier wäre ein hoher Grad an Zytotoxizität nachteilig, da das umliegende vitale Gewebe eventuell Schaden nehmen könnte.

Im Rahmen der Biokompatibilität wurde zudem noch ein Mikrokerntest durchgeführt um mögliche DNA- und Chromosomenschäden aufzudecken. Zu diesem speziellen Versuchsaufbau liegen in der Forschung relativ gesehen weniger Studien vor, als beispielsweise für die mögliche Zytotoxizität der drei Materialien. Deshalb bedurfte es hier Versuchen, die sowohl Medcem MTA als auch ProRootMTA und Biodentine in Bezug auf eine mögliche vorliegende Genotoxizität untersuchten. Nach Durchführung des Mikrokerntests mit allen drei Materialien ließ keines davon darauf schließen, dass eine Einschränkung der Biokompatibilität vorliegen könnte. Es wurden keine DNA- oder Chromosomenschäden aufgedeckt. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Gorduysus und Mitarbeiter, sie stellten gute Biokompatibilität von ProRootMTA mittels Annexin V-Assay an PDL-Fibroblasten fest (Gorduysus *et al.*, 2007). Im Mikrokerntest konnten Camargo und Mitarbeiter im Zusammenhang mit MTA ebenso keine erhöhte Anzahl von Mikrokernen nachweisen und dementsprechend auch keine mögliche Genotoxizität (Camargo *et al.*, 2009).

Somit war die Biokompatibilität von Medcem MTA, ProRootMTA und Biodentine auf Basis der vorliegenden Ergebnisse der durchgeführten Versuche als ausreichend einzustufen. Medcem MTA wies in dieser Untersuchung absolut gleichwertige Eigenschaften auf wie das Material ProRootMTA. Damit kann, aus Sicht der Biokompatibilität, Medcem MTA im gleichen Indikationsspektrum eingesetzt werden wie die beiden anderen etablierten Materialien. Da die Biokompatibilität als primärer

und wichtigster Faktor untersucht wurde, folgte nun die Untersuchung weiterer interessanter möglicher Eigenschaften, die das neue Material Medcem MTA für die Endodontie einsetzbar machen könnten.

In Bezug auf den Einfluss von Medcem MTA auf die inflammatorische Signaltransduktion wurden sowohl das NF- κ B-System als auch das Cyclooxygenase-System untersucht. Die Ergebnisse der Versuche nach Inkubation von hPDLF mit den Zementeluaten zeigten einige Unterschiede zwischen den Materialien Medcem MTA, ProRootMTA und Biodentine. Wie Yan und Mitarbeiter als auch Minamikawa und Mitarbeiter in der Vergangenheit feststellten, war MTA in der Lage durch Beeinflussung des NF- κ B Signalwegs einen Entzündungsvorgang zu induzieren (Minamikawa *et al.*, 2009, Yan *et al.*, 2014). Verschiedene Studien bestätigten in der Vergangenheit ebenfalls die Steigerung der IL-6 Konzentration durch MTA (Ciasca *et al.*, 2012). Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigte sich jedoch, dass sowohl ProRootMTA als auch Biodentine anscheinend den NF- κ B Signalweg bei entzündlich stimulierten Zellen eher hemmen. Indirekt wurde dies durch eine signifikant geringere IL-6 Konzentration in den Proben von ProRootMTA und Biodentine im Vergleich mit der Positivkontrolle mittels ELISA-Verfahren und anschließendem LSD-Post-Hoc-Test nachgewiesen. Die direkte Untersuchung der I κ B α -Expression zeigte hingegen keinen deutlichen Unterschied zwischen den mit den Zementen behandelten Zellen und der entzündlich stimulierten Positivkontrolle. Medcem MTA hingegen wies die höchsten Werte der IL-6 Konzentrationen bei hPDLF auf, welche vorher inflammatorisch stimuliert worden waren. Das könnte darauf hindeuten, dass Medcem MTA im Vergleich zu ProRootMTA und Biodentine am wenigsten die IL-6 Produktion reprimiert. Somit würde Medcem MTA die Reaktion des Immunsystems und der Abwehr eher unterstützen als andere Materialien und möglicherweise eine ungestörte und effektivere Heilung ermöglichen. Dies könnte als vorteilhaft betrachtet werden, da ja die klinische Anwendung, vor allem im Bereich der retrograden Wurzelkanalfüllung nach Wurzelspitzenresektion, zumeist mit geschädigtem Gewebe mit Heilungsbedarf einhergeht. Für die entsprechende Heilung muss aber auch eine Entzündung gegeben sein, mit vorhandenen Entzündungsmediatoren wie zum Beispiel IL-6. Interessant an den Versuchsergebnissen war ebenfalls, dass Medcem MTA bei den unstimulierten hPDLF die geringste Konzentration an IL-6 im Vergleich aufwies. Der Werteunterschied der IL-6 Konzentrationen bei Medcem MTA zur Negativkontrolle

war zwar nicht signifikant, konnte aber doch nicht gänzlich außer Acht gelassen werden. Daher unterstützt diese Beobachtung die These, dass Medcem MTA einen geringeren Einfluss auf den natürlichen Metabolismus der Zellen hatte. Bei Medcem MTA existierte dementsprechend das größte Gefälle der IL-6 Konzentrationen zwischen den unstimulierten und den entzündlich stimulierten hPDLF Zellen.

Somit ergibt die erste Versuchsgruppe, dass keines der drei Materialien die unstimulierten und somit gesunden Zellen in signifikantem Maß beeinflusst und die IL-6 Konzentrationen gravierend steigern könnte. Die zweite Gruppe bestätigt umgekehrt dasselbe, nämlich dass keines der drei Materialien in der Lage ist die IL-6 Konzentration auf Werte zu erhöhen, die der Positivkontrolle annäherungsweise ähnlich sind. Folglich bedeuten diese Ergebnisse, dass wahrscheinlich kein Einfluss auf gesundes Gewebe von Seiten der Materialien besteht und man diese guten Gewissens in den unterschiedlichen Bereichen der Endodontie einsetzen kann.

In den letzten Jahren wurden einige Studien veröffentlicht, in denen Zellen nach Kontakt mit MTA eine gesteigerte Expression der Cyclooxygenase und PGE₂ Konzentration aufwiesen (Minamikawa *et al.*, 2009). Bei Betrachtung der in dieser Studie gemessenen PGE₂ Konzentration wiesen die Zellkulturüberstände der hPDLF nach Inkubation mit Medcem MTA tendenziell höhere Werte an PGE₂ auf, als nach Inkubation mit ProRootMTA, vor allem bei den vorher entzündlich stimulierten Zellen. Medcem MTA rief also in dieser Versuchsreihe eine Modulation und gesteigerte Expression von Enzymen und Entzündungsmediatoren hervor, welche bekanntlich teil von Entzündungsreaktionen und somit auch von Heilungsprozessen sind. Dazu zählt in diesem Fall als Enzym die Cyclooxygenase 2 und als Entzündungsmediator PGE₂. Aufgrund der ähnlichen Werte von ProRootMTA und Medcem MTA läge es nun nahe, dass Medcem MTA eventuell genauso effektiv verwendbar wäre, wie das langjährig eingesetzte ProRootMTA. Dies beträfe dann insbesondere den Einsatz in entzündetem Gewebe, wie man es beispielsweise bei entzündeten Apices der Zähne findet. Somit wäre eine Anwendung des Materials bei der retrograden Wurzelkanalfüllung nach Wurzelspitzenresektion eines beherdeten Zahnes gerechtfertigt.

Die einfaktorielle Varianzanalyse mit LSD-Post-Hoc-Test zeigte im Vergleich zur Positivkontrolle keine signifikanten Unterschiede für stimulierte hPDLF, die mit ProRootMTA und Medcem MTA inkubiert worden waren (ProRootMTA $p = 0,537$,

Medcem MTA $p = 0,680$). Also griff hier Medcem MTA eventuell genauso geringfügig in die PGE_2 Produktion von hPDLF ein, wie bei den vorher bereits beschriebenen Vorgängen der IL-6 Produktion von hPDLF. Dies könnte den bereits erwähnten Vorteil bezüglich der Anwendung von Medcem MTA in körpereigenem Gewebe bedeuten, welches beispielsweise nach Apexifikation oder retrograder Wurzelkanalfüllung nach Wurzelspitzenresektion einer Heilung bedarf. Medcem MTA könnte hier durch seine Anwendung in unmittelbarer Umgebung von bereits entzündetem Gewebe die gesteigerte PGE_2 Konzentration belassen und ermöglichen und somit auch die notwendigen entzündlichen Prozesse beschleunigen. Biodentine stach im Rahmen des Versuches heraus, es wies signifikant höhere Werte im LSD-Post-Hoc-Test im Vergleich der Proben der entzündlich stimulierten hPDLF und der Positivkontrolle auf (Biodentine $p = 0,002$), ebenso zeigte sich in der Western-Blot-Analyse eine starke Expressionssteigerung der COX-2 nach Inkubation mit Zementeluat von Biodentine. Man kann also schließen, dass Biodentine eine sehr starke Entzündungsreaktion hervorruft; klinisch müsste nun abgeklärt werden, ob dieses Ausmaß an Entzündung auch gewünscht ist. Der genaue Einfluss des Materials auf die klinische Anwendung ist ebenfalls nicht abschließend geklärt und fortführende Studien zu diesem Thema werden benötigt.

Bezogen auf die hOB wiesen die Ergebnisse der durchgeführten ELISAs einige Ähnlichkeiten zu den Ergebnissen mit den hPDLF auf. Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte im Vergleich zur Positivkontrolle ebenfalls signifikant höhere Werte der PGE_2 Konzentration für stimulierten hOB, die mit Biodentine inkubiert worden waren (Biodentine $p = 0,002$). Andererseits zeigte die einfaktorielle Varianzanalyse mit Post-Hoc-Test im Vergleich zu Positivkontrolle signifikant niedrigere Werte für stimulierte hOB, die mit Zementeluat von ProRootMTA und Medcem MTA inkubiert worden waren (ProRootMTA $p = 0,003$, Medcem MTA $p = 0,012$). Diese Ergebnisse lassen eventuell darauf schließen, dass hOB generell eine stärkere Reaktion auf äußere Einflüsse und entsprechend auf die endodontisch angewandten Materialien zeigen. Hier waren ja die bereits stimulierten Zellen mit den Zementen behandelt worden und zeigten einen starken und signifikanten Rückgang der PGE_2 Konzentration. Das könnte bedeuten, dass im Knochengewebe ProRootMTA und Medcem MTA eine stärkere reprimierende Wirkung auf die PGE_2 Konzentration hätten.

Medcem MTA könnte schlussfolgernd sowohl im Weichgewebe als auch im Knochen eine ähnliche Wirkung auf die Zellen und die Entzündungsreaktion der Zellen haben, wenngleich die PGE₂ Konzentration in entzündetem Weichgewebe auf Basis der Ergebnisse der durchgeführten ELISAs auch etwas höher ausfallen könnte. Klinisch ist diese Beobachtung von Bedeutung, da die Zähne sowohl innerhalb der knöchernen Alveole als auch durch den parodontalen Halteapparat verankert sind. Ein Material, welches bei beiden dieser Formen des Bindegewebes mit seiner Wirkung ansetzt, ist in der Endodontie von Vorteil.

Neben der Wirkung auf das Entzündungsgeschehen war aber ebenso die Wirkung von Medcem MTA, ProRootMTA und Biodentine auf mesenchymale Stammzellen und parodontale Progenitorzellen von Interesse. Die Expressionsrate eines hierfür typischen Transkriptionsfaktors (RUNX2, Western Blot) wurde unter anderem untersucht. Die Ergebnisse zeigen nach Interpretation der Intensitäten der Banden der gegen RUNX2 gerichteten Antikörper mit den hPDSC_hTERT Zellen, dass sowohl Medcem MTA als auch Biodentine eine sehr starke Wirkung auf die RUNX2 Expression in parodontalen Progenitorzellen hervorrufen. ProRootMTA lag unterhalb der Intensität der Positivkontrolle, jedoch über der Intensität der Negativkontrolle, zeigte also auch eine gewisse Wirkung. Klinisch sind diese Ergebnisse von Interesse, da alle drei Materialien ja in parodontalem Gewebe verwendet werden. Wird nun die RUNX2 Expressionsrate durch Einsatz der Zemente gesteigert, so könnte dies die gesteigerte Differenzierung der Progenitorzellen in Knochengewebe, also Osteozyten bedeuten. Das wäre wiederum förderlich für die Anwendung bei der Indikation retrograde Wurzelkanalfüllung nach Wurzelspitzenresektion. Dort besteht apikal ja zumeist eine Entzündung des Knochengewebes und der Wurzelspitze. Wenn nun ProRootMTA, Medcem MTA und Biodentine eher Differenzierung zu Knochen als zu Weichgewebe fördern, könnte man eine bessere Regeneration hin zu Hartsubstanzen und damit einer ossären Regeneration fördern.

Das regenerative Potential der Materialien wurde unter anderem durch ein Endpunkt-Assay, durch welches die OCN Konzentration gemessen wurde, überprüft. OCN als wichtiger osteogener Marker war ein Hinweis für die osteogene Differenzierung und repräsentierte das Stadium der reifen Osteoblasten (Owen *et al.*, 1990). Die bereits vorliegenden Studienergebnisse zeigten, dass beispielsweise sowohl in dentalen Pulpazellen als auch in Stammzellen der apikalen Papille oder in bereits differenzierten Osteoblasten das Material MTA eine Steigerung der OCN Expression

bewirken konnte (Paranjpe *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2014; Tan-Ishii *et al.*, 2007). Die hMSC, also die mesenchymalen Stammzellen, sprachen im Vergleich zur Negativkontrolle sehr gut auf ProRootMTA an. Die einfaktorielle Varianzanalyse mit Post-Hoc-Test zeigte signifikant höhere Werte im Vergleich zur Negativkontrolle für die hMSC, die mit Zementeluat von ProRootMTA inkubiert worden waren (ProRootMTA $p = 0,002$). Biodentine hingegen lag mit den OCN Werten sogar signifikant unter der Negativkontrolle (Biodentine $p = 0,005$). Medcem MTA bewirkte zwar keine signifikant höheren Werte bei hMSC als die Negativkontrolle mit $2,65 \pm 0,30$ pg/ml, die OCN Konzentration befand sich aber dennoch darüber mit Werten bei $2,81 \pm 0,51$ pg/ml. In unserer Studie stellte sich auch heraus, dass hPDSC_hTERT zwar gut auf die drei Materialien ansprachen und dementsprechend mehr OCN Konzentration in der jeweiligen Probe nachgewiesen werden konnte, die Unterschiede aber nicht signifikant waren. Medcem MTA und ProRootMTA wiesen in etwa dieselbe Menge an OCN auf. ProRootMTA hatte einen leicht höheren Wert an OCN Konzentration. Der Fakt, dass alle gemessenen OCN Konzentrationen der drei Zementproben höher lagen als die Negativkontrolle der hPDSC_hTERT, ließ tendenziell auf ein regeneratives Potential der drei Materialien schließen. Schließlich galt hier: je mehr OCN innerhalb der Probe, desto mehr reife Osteoblasten waren vorhanden und desto mehr parodontale Progenitorzellen waren osteogen differenziert.

Somit kann darauf geschlossen werden, dass Medcem MTA und ProRootMTA sich wahrscheinlich positiv auf die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen auswirken, Biodentine aber eher keinen oder nur wenig Effekt in diese Richtung aufweist. Klinisch gesehen ist eine regenerative Komponente natürlich von Vorteil, da diese ja neben der Heilung auch die Neubildung von Gewebe und Knochenmaterial ermöglichen würde. Was die Apexifikation bei avitalen jugendlichen Zähnen mit nicht abgeschlossenem Wurzelwachstum angeht, würde dies das Generieren eines natürlichen apikalen Stopps erleichtern.

Betrachtet man nun noch die wirtschaftliche Komponente von Medcem MTA, also den Kostenfaktor, sind die Vorteile dieses neuen Materials zahlreich. Die hohe Verfügbarkeit und die niedrigen Kosten machen die Portlandzemente im Allgemeinen deshalb zu einer interessanten Alternative zu den bisherigen auf dem Markt verfügbaren Produkten (Tenório de Franca *et al.*, 2010).

6 Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der Biokompatibilität, der inflammatorischen Wirkung und der Wirkung auf Stammzellendifferenzierung der drei hydraulischen Silikatzemente Medcem MTA, ProRootMTA und Biodentine. Alle drei Zementarten sind für ähnliche Indikationen vorgesehen, wie zum Beispiel für die indirekte und direkte Überkappung und Pulpotomie, für die Apexifikation, für die Perforationsdeckung und für die retrograde Wurzelkanalfüllung nach Wurzelspitzenresektion. ProRootMTA wurde bislang von Seiten der Forschung am eingehendsten untersucht, da es von allen drei endodontischen Materialien am längsten auf dem Markt existiert. Biodentine und Medcem MTA sind neuere Materialien und müssen demnach noch in ähnlichem Umfang untersucht werden.

Für die Versuche an Kulturen oraler Zellen (Fibroblasten der Gingiva und des Parodonts, Osteoblasten sowie deren Vorläuferzellen) wurden Eluate der drei endodontischen Zemente in Zellkulturmedium hergestellt.

Zunächst wurde die Biokompatibilität der Materialien untersucht, wobei jeweils eine Versuchsreihe zum Ausschluss einer generellen Zytotoxizität (WST-8-Assay) und einer möglichen genotoxischen Wirkung (Micronucleus-Assay) durchgeführt wurde.

Weiterhin wurde die Wirkung der Zementeluate auf verschiedene zelluläre Entzündungskaskaden (NF- κ B-System, Cyclooxygenase-System) untersucht. Dazu wurden die Zellen mit Zementeluat inkubiert und teilweise zusätzlich artifiziell entzündlich stimuliert. Der Nachweis von für das jeweilige getestete System relevanten Zielproteinen und –substanzen erfolgte mittels Western Blot (I κ B α , NF- κ B p65, COX-2) und ELISA (IL-6, PGE₂).

Als weitere Komponente wurden Versuche durchgeführt, welche den Nachweis eines möglichen regenerativen Potentials der Materialien zum Ziel hatten. Hierfür wurden Progenitorzellen (hPDSC_hTERT, hMSC) mit den Zementeluat inkubiert und sowohl die Menge eines sekretorischen osteogenen Markerproteins (Osteocalcin, ELISA) als auch die Expressionsrate eines hierfür typischen Transkriptionsfaktors (RUNX2, Western Blot) untersucht.

Die Ergebnisse der Versuche ergaben für die Beurteilung der Biokompatibilität der Materialien folgende Erkenntnisse: Im WST-8 Test zeigte sich für alle drei Zemente eine gute Biokompatibilität, lediglich die Ergebnisse der HGF-1 wiesen eine gewisse

Zytotoxizität auf. Der Mikrokerntest ließ nicht auf ein genotoxisches Potential von Medcem MTA, ProRootMTA oder Biodentine schließen.

Die Beeinflussung des NF- κ B-Systems und des Cyclooxygenase-Systems von Seiten der Zemente wurde teilweise bestätigt. Medcem MTA bewirkte im ELISA Versuch die höchsten Werte der IL-6 Konzentration bei hPDLF, welche vorher entzündlich stimuliert worden waren. Das könnte darauf hindeuten, dass Medcem MTA im Vergleich zu ProRootMTA und Biodentine am geringsten die IL-6 Produktion reprimiert und damit am wenigsten in die Funktion des Immunsystems eingreift.

Dasselbe Ergebnis zeigte sich bei der Untersuchung des Einflusses der drei Materialien auf das Cyclooxygenase-System. Was Medcem MTA anging, waren hier besonders in Bezug auf stimulierte hPDLF keine signifikanten Unterschiede der PGE₂ Konzentration zur Positivkontrolle festzustellen. Biodentine wies dagegen signifikant höhere Werte auf, ProRoot MTA schnitt ungefähr genauso ab wie Medcem MTA. In Bezug der Wirkung von Medcem MTA auf das Cyclooxygenase-System zeigt sich also wiederum ein relativ geringfügiger Einfluss dieses Materials auf die intrazelluläre Entzündungskaskade der Zellen.

Was das regenerative Potential der Materialien anging, so zeigten im Western Blot Versuch sowohl Medcem MTA als auch Biodentine eine sehr starke Wirkung auf die RUNX2 Expression in parodontalen Progenitorzellen. Beide Materialien könnten also die gewünschte Wirkung auf die osteogene Differenzierung dieser Zellen aufweisen. ProRootMTA bewirkte im ELISA Versuch bei hMSC signifikant höhere OCN Konzentrationen im Vergleich mit der Negativkontrolle. Auch nach Inkubation mit Medcem MTA lag die OCN Konzentration in den Proben von hMSC höher. Also schufen beide Materialien wahrscheinlich gute Bedingungen für die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen. Biodentine lag mit den OCN Werte hingegen unter der Negativkontrolle. Sowohl ProRootMTA als auch Medcem MTA wiesen also ein gewisses regeneratives Potential auf, was für die klinischen Anwendungen wie retrograde Wurzelkanalfüllung nach Wurzelspitzenresektion und Apexifikation als möglicher Vorteil angesehen werden darf.

7 Literaturverzeichnis

1. Al-Haj Ali SN. *In vitro* toxicity of propolis in comparison with other primary teeth pulpotomy agents on human fibroblasts (2015). *J Investig Clin Dent* doi: 10.1111/jicd.12157.
2. Al-Sabek F, Shostad S, Kirkwood KL. Preferential attachment of human gingival fibroblasts to the resin ionomer Geristore (2005). *J Endod* 31: 205-208.
3. Alhadainy HA. Root perforations. A review of literature (1994). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 78: 368-74.
4. Amoroso-Silva PA, Marciano MA, Guimarães BM, Duarte MA, Sanson AF, Moraes IG. Apical adaptation, sealing ability and push-out bond strength of five root-end filling materials (2014). *Braz Oral Res* 28: pii: S1806-83242014000100252.
5. Arends C. *Zahnkaries und Speichel* (1969). Hanser (München)
6. Asrari M, Lobner D. *In vitro* neurotoxic evaluation of root-end-filling materials (2003). *J Endod* 29: 743-746.
7. Attik GN, Villat C, Hallay F, Pradelle-Plasse N, Bonnet H, Moreau K, Colon P, Grosogeat B. *In vitro* biocompatibility of a dentine substitute cement on human MG63 osteoblasts cells: Biodentine™ versus MTA® (2014). *Int Endod J* 47: 1133-1141.
8. Attin TH, Hellwig E. Erfolgsaussichten der direkten Überkappung bei Zähnen mit Caries profunda (1993). *Quintessenz* 44: 1613-1622.
9. Auschill TM, Arweiler NB, Hellwig E, Zamani-Alaei A, Sculean A. Success rate of direct pulp capping with calcium hydroxide (2003). *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 113: 946-95.
10. Axelsson P, Nyström B, Lindhe J. The long-term effect of a plaque control program on tooth mortality, caries and periodontal disease in adults. Results after 30 years of maintenance (2004). *J Clin Periodontol* 31: 749-757.
11. Baeuerle PA, Baichwal VR. NF-κB as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules (1997). *Adv Immunol* 65:111-137.
12. Baeuerle PA, Baltimore D. Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-κappa B transcription factor (1988). *Cell* 53: 211-207.
13. Bakland LK, Andreasen JO. Will mineral trioxide aggregate replace calcium hydroxide in treating pulpal and periodontal healing complications subsequent to dental trauma? A review (2012). *Dent Traumatol* 28: 25-32.

14. Bansal R, Jain A, Mittal S, Kumar T, Kaur D. Regenerative endodontics: a road less travelled (2014). *J Clin Diagn* **8**: 20-44.
15. Barbosa AV, Sampaio GC, Gomes FA, de Oliveira DP, de Albuquerque DS, Sobral AP. Short-term analysis of human dental pulps after direct capping with portland cement (2009). *Open Dent J* **17**: 31-35.
16. Bartold PM, Shi S, Gronthos S. Stem cells and periodontal regeneration (2006). *Periodontol 2000* **40**: 164-172.
17. Bartold, PM, McCulloch CAG, Narayanan AS, Pitaru S. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology (2000). *Periodontol 2000* **24**: 253-269.
18. Bauch T, Bocker W, Mallek U, Muller WU and Streffer C. Optimization and standardization of the "comet assay" for analyzing the repair of DNA damage in cells (1999). *Strahlenther Onkol* **175**: 333-340.
19. Baumann AM, Beer R. Endodontie (2007). Farbatlant der Zahnmedizin. *Thieme* (Stuttgart) 2 Edition.
20. Bellam KK, Namburi SK, Tripuraneni SC. *In vitro* evaluation of bacterial leakage through different perforation repair materials of teeth (2009). *J Appl Biomater Biomech* **7**: 179-184.
21. Ber BS, Hatton JF, Stewart GP. Chemical modification of ProRootMTA to improve handling characteristics and decrease setting time (2007). *J Endod* **33**:1231-1234.
22. Berger T, Baratz AZ, Gutmann JL. *In vitro* investigations into the etiology of mineral trioxide tooth staining (2014). *J Conserv Dent* **17**: 526-530.
23. Bernabé PF, Holland R, Morandi R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Dezan Junior E, Gomes-Filho JE. Comparative study of MTA and other materials in retrofilling of pulpless dogs' teeth (2005). *Braz Dent J* **16**:149-155.
24. Beslot-Neveu A, Bonte E, Baune B, Serreau R, Aissat F, Quinquis L, Grabar S, Lasfargues JJ. Mineral trioxide aggregate versus calcium hydroxide in apexification of non vital immature teeth: study protocol for a randomized controlled trial (2011). *Trials* **12**: 174.
25. Bidar M, Naghavi N, Mohtasham N, Sheik-Nezami M, Fallahrastegar A, Afkhani F, Attaran Mashhadi N, Nargesi I. MTA and portland cement for direct pulp capping in dog: a histopathological evaluation (2014). *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* **8**: 134-140.
26. Bishop BG, Woollard GW. Modern endodontic therapy for an incompletely developed tooth (2002). *Gen Dent* **50**: 252-256.
27. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation (2003). *Curr Opin Cell Biol* **15**: 725-731.

28. Böcker W, Yin Z, Drosse I, Haasters F, Rossmann O, Wierer M, Popov C, Locher M, Mutschler W, Docheva D, Schieker M. Introducing a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral gene transfer (2008). *J Cell Mol Med* **12**: 1347-59.
29. Bonizzi G, Bebien M, Otero DC, Johnson-Vroom KE, Cao Y, Vu D, Jegga AG, Aronow BJ, Ghosh G, Rickert RC, Karin M. Activation of IKKalpha target genes depends on recognition of specific kappaB binding sites by RelB:p52 dimers (2004). *EMBO J* **23**: 4202-4210.
30. Bonson S, Jeansonne BG, Lallier TE. Root-end filling materials alter fibroblast differentiation (2004). *J Dent Res* **83**: 408-413.
31. Bonte E, Beslot A, Boukpepsi T, Lasfargues JJ. MTA versus Ca(OH)₂ in apexification of non-vital immature permanent teeth: a randomized clinical trial comparison (2014). *Clin oral Invest* [Epub ahead of print].
32. Bowden GH. Microbiology of root surface caries in humans (1990). *J Dent Res* **69**:1205-1210.
33. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding (1976). *Anal Biochem* **72**: 248-254.
34. Brasier AR. The NF-kappaB regulatory network (2006). *Cariiovasc Toxicol* **6**: 111-130.
35. Braz MG, Camargo EA, Salvadori DM, Marques ME, Ribeiro DA. Evaluation of genetic damage in human peripheral lymphocytes exposed to MTA and Portland cements (2006). *J Oral Rehabil* **33**: 234-239.
36. Bruderer M, Richards RG, Alini M, Stoddart MJ. Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis (2014). *Eur Cell Mater* **23**: 269-286.
37. Bryan EB, Woollard G, Mitchell WC. Nonsurgical repair of furcal perforations: a literature review (1999). *Gen Dent* **47**: 274-278.
38. Büttel L, Weiger R, Krastl G: Repair of a root perforation with MTA. a case report (2013). *Schweiz Monatsschr Zahnmed* **123** : 549-563.
39. Butt N, Talwar S, Chaudhry S, Nawal RR, Yadav S, Bali A. Comparison of physical and mechanical properties of mineral trioxide aggregate and Biodentine (2014). *Indian J Dent Res* **25**: 692-697.
40. Camargo SE, Camargo CH, Hiller KA, Rode SM, Schweikl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines (2009). *Int Endod J* **42**: 227-237.

41. Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S, McDonald F, Pitt Ford TR. Biocompatibility of two commercial forms of MTA (2004). *Int Endod J* **37**: 699-704.
42. Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus (2013). *Dent Mater* **29**: 580-593.
43. Caronna V, Himel V, Yu Q, Zhang JF, Sabey K. Comparison of the surface hardness among 3 materials used in an experimental apexification model under moist and dry environments (2014). *J Endod* **40**: 986-989.
44. Ceci M, Beltrami R, Chiesa M, Colombo M, Poggio C. Biological and chemical-physical properties of root-end filling materials: A comparative study (2015). *J Conserv Dent* **18**: 94-99.
45. Chailertvanitkul P, Paphangkorakit J, Sooksantisakoonchai N, Pumas N, Pairojamornyoot W, Leela-Apiradee N, Abbott PV. Randomized control trial comparing calcium hydroxide and MTA for partial pulpotomies in cariously exposed pulps of permanent molars (2014). *Int Endod J* **47**: 835-842.
46. Chang SW, Lee SY, Ann HJ, Kum KY, Kim EC. Effects of calcium silicate endodontic cements on biocompatibility and mineralization-inducing potentials in human dental pulp cells (2014). *J Endod* **40**: 1194-1200.
47. Chang SW, Lee SY, Kum KY, Kim EC. Effects of ProRoot MTA, Bioaggregate, and Micromega MTA on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells (2014). *J Endod* **14**: 113-118.
48. Chen CL, Huang TH, Ding SJ, Shie MY, Kao CT. Comparison of calcium and silicate cement and MTA biologic effects and bone markers expression in MG63 cells (2009). *J Endod* **35**: 682-685.
49. Chen CL, Kao CT, Ding SJ, Shie MY, Huang TH. Expression of the inflammatory marker cyclooxygenase-2 in dental pulp cells cultured with MTA or calcium silicate cements (2010). *J Endod* **36**: 465-468.
50. Coffman JA. Runx transcription factors and the developmental balance between cell proliferation and differentiation (2003). *Cell Biol Int* **27**: 315-324.
51. Compton SJ, Jones CG. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay (1985). *Anal Biochem* **151**: 369-374.
52. Coon D, Gulati A, Cowan C, He J. The role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory bone resorption (2007). *J Endod* **33**: 432-436.
53. Corbella S, Ferrara G, El Kabbaney A, Taschieri S. Apexification, apexogenesis and regenerative endodontic procedures: a review of the literature (2014). *Minerva Stomatol* **63**: 375-389.

54. Countryman PI, Heddle JA. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes (1976). *Mutat Res* **41**: 321-332.
55. Craig RG, Peyton FA. Elastic and mechanical properties of human dentin (1958). *J Dent Res* **37**: 710-718.
56. Darvell B, Wu R. "MTA"-an hydraulic Silicate Cement: review update and setting reaction (2011). *Dent Mater* **27**: 407-422.
57. De Bruyne MA, De Moor RJ. The use of glass ionomer cements in both conventional and surgical endodontics (2004). *Int Endod* **37**: 91-104.
58. De-Deus G, Petrucelli V, Gurgel-Filho E, Coutinho-Filho T. MTA versus Portland cement as repair material for furcal perforations: a laboratory study using a polymicrobial leakage model (2006). *Int Endod J* **39**: 293-298.
59. Docheva D, Padula D, Popov C, Weishaupt P, Prägert M, Miosge N, Hickel R, Böcker W, Clausen-Schaumann H, Schieker M. Establishment of immortalized periodontal ligament progenitor cell line and its behavioural analysis on smooth and rough titanium surface (2010). *Eur Cell Mater* **19**: 228-241.
60. Dorn SO, Gartner AH. Retrograde filling materials: a retrospective success-failure study of amalgam, EBA, and IRM (1990). *J Endod* **16**:391-393.
61. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis (1999). *Annu Rev Biochem* **68**: 383-424.
62. Elnaghy AM. Influence of acidic environment on properties of biodentine and white MTA: a comparative study (2014). *J Endod* **40**: 953-957.
63. Eskandarizadeh A, Shahpasandzadeh MH, Shahpasandzadeh M, Torabi M, Pariookh M. A comparative study on dental pulp response to calcium hydroxide, white and grey MTA aspulp capping agents (2011). *J Conserv Dent* **14**: 351-355.
64. Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pécora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal (2000). *Braz Dent J* **11**: 3-9.
65. Estrela C, Pesce HF. Chemical analysis of the formation of calcium carbonate and its influence on calcium hydroxide pastes in connective tissue of the dog-- Part II (1997). *Braz Dent J* **8**: 49-53.
66. Poggio C, Arciola CR, Beltrami R, Monaco A, Dagna A, Lombardini M, Visai L. Cytocompatibility and antibacterial properties of capping materials (2014). *ScientificWorldJournal* doi: 10.1155/2014/181945.

67. Evans HJ, Neary GJ, Williamson FS. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei (1959). *Int J Radiat Biol* **1**: 216-229.
68. Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts (2001). *J Biol Chem* **12**: 1071 – 1077.
69. Fayazi S, Ostad SN, Razmi H. Effect of ProRootMTA, Portland cement, and amalgam on the expression of fibronectin, collagen I, and TGF β by human periodontal ligament fibroblasts *in vitro* (2011). *Indian J Dent Res* **22**: 190-194.
70. Fenech M, Morley A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay (1985). *Cytobios* **43**: 233-246.
71. Fenech, M. Optimisation of micronucleus assays for biological dosimetry (1991). *Prog Clin Biol Res* **372**: 373-836.
72. Finne K, Nord PG, Persson G, Lennartsson B. Retrograde root filling with amalgam and Cavit (1977). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **43**: 621-626.
73. Fitzgerald M, Heys RJ. A clinical and histological evaluation of conservative pulpal therapy in human teeth (1991). *Oper Dent* **16**: 101-112.
74. Flanagan TA. What can cause the pulps of immature, permanent teeth with open apices to become necrotic and what treatment options are available for these teeth (2014). *Aust Endod J* **40**: 95-100.
75. Friedman S. Retrograde approaches in endodontic therapy (1991). *Endod Dent Traumatol* **7**: 97-107.
76. Fuks AB. Current concepts in vital primary pulp therapy (2002). *Eur J Paediatr Dent* **3**: 115-120.
77. Galhotra V, Sofat A, Pandit IK, Gambhir RS, Srivastava N, Gugnani N. Comparative evaluation of micro leakage of various retrograde filling materials: An invitro study (2013). *J Nat Sci Biol Med* **4**: 403-408.
78. Gandolfi MG, Siboni F, Primus CM, Prati C. Ion release, porosity, solubility, and bioactivity of MTA Plus tricalcium silicate (2014). *J Endod* **40**: 1632-1637.
79. Gay, I.C., S. Chen, and M. MacDougall. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells (2007). *Orthod Craniofac Res* **10**:149-160.
80. Ghaziani P, Aghasizadeh N, Sheikh-Nezami M. Endodontic Treatment with MTA plugs: a case report (2007). *J Oral Sci* **49**: 325-329.

81. Ghodduzi J, Forghani M, Parisay I. New approaches in vital pulp therapy in permanent teeth (2014). *Iran Endod J* **9**: 15-22.
82. Ghosh S, Mazumdar D, Ray PK, Bhattacharya B. Comparative evaluation of different forms of calcium hydroxide in apexification (2014). *Contem Clin Dent* **5**: 6-12.
83. Gilbert L, He X, Farmer P, Rubin J, Drissi H, van Wijnen AJ, Lian JB, Stein GS, Nanes MS. Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha (2002). *J Biol Chem* **277**: 2695-2701.
84. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives (2006). *Oncogene* **25**: 6680-6684.
85. Gorduysus M, Avcu N, Gorduysus O, Pekel A, Baran Y, Avcu F, Ural AU. Cytotoxic effects of four different endodontic materials in human periodontal ligament fibroblasts (2007). *J Endod* **33**: 1450-1454.
86. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Characterization of set Intermediate Restorative Material, Biodentine, Bioaggregate and a prototype calcium silicate cement for use as root-end filling materials (2013). *Int Endod J* **46**: 632-641.
87. Hakki SS, Bozkurt SB, Ozcopur B, Purali N, Belli S. Periodontal ligament fibroblast response to root perforations restored with different materials: a laboratory study (2012). *Int Endod J* doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01968.x.
88. Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD, Vanparys P, MacGregor JT. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future (1991). *Environ Mol Mutagen* **18**: 277-291.
89. Huth KC, Paschos E, Hajek-Al-Khatat N, Hollweck R, Crispin A, Hickel R, Folwaczny M. Effectiveness of 4 pulpotomy techniques-randomized controlled trial (2005). *J Dent Res* **84**: 1144-1148.
90. Islam I, Chng HK, Yap AU. Comparison of the root-end sealing ability of MTA and Portland cement (2005). *Aust J Endod* **31**: 59-62.
91. Ivanovski S, Gronthos S, Shi S, Bartold PM. Stem cells in the periodontal ligament (2006). *Oral Dis* **12**: 358-363.
92. J. F. R. Kerr, A. H. Wyllie, A. R. Currie. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics (1972). *Br J Cancer* **26**: 239-257.
93. Jaberiansari Z, Naderi S, Tabatabaei FS. Cytotoxic effects of various MTA formulations, calcium-enriched mixture and a new cement on human pulp stem cells (2014). *Iran Endod J* **9**: 271-276.

94. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells *in vitro* (1997). *J Cell Biochem* **64**: 295-312.
95. Jesslén P, Zetterqvist L, Heimdahl A. Long-term results of amalgam versus glass ionomer cement as apical sealant after apicectomy (1995). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **79**: 101-103.
96. Jobin C, Morteau O, Han DS, Balfour SR. Specific NF-kappaB blockade selectively inhibits tumour necrosis factor-alpha-induced COX-2 but not constitutive COX-1 gene expression in HT-29 cells (1998). *Immunology* **95**: 537-543.
97. Keyes PH. Research in dental caries (1968). *J Am Dent Assoc* **76**: 1357-1373.
98. Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications (1960). *Arch Oral Biol* **1**: 304-320.
99. Khedmat S, Dehghan S, Hadjati J, Masoumi F, Nekoofar MH, Dummer PM. *In vitro* cytotoxicity of four calcium silicate-based endodontic cements on human monocytes, a colorimetric MTT assay (2014). *Restor Dent Endod* **39**:149-154.
100. Komori T, H Yagi, S Nomura, A Yamaguchi, K Sasaki, K Deguchi, Y Shimizu, RT Bronson, YH Gao, M Inada. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts (1997). *Cell* **89**: 755–764.
101. Komori T. Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development (2002). *J Cell Biochem* **87**:1-8.
102. König KG. Karies und Kariesprophylaxe (1971). 2. *Goldmann* (München) 2. Auflage.
103. König KG. Karies und Parodontopathien (1987). *Thieme* (Stuttgart) 2. Auflage.
104. Koromila T, Baniwal SK, Song YS, Martin A, Xiong J, Frenkel B. Glucocorticoids antagonize RUNX2 during osteoblast differentiation in cultures of ST2 pluripotent mesenchymal cells (2014). *J Cell Biochem* **115**: 27-33.
105. Kratchmann SI. Perforation repair and one Stepp-apexification procedures (2004). *Dent Clin North Am* **48**: 291-307.
106. Kumar A, Yadav A, Shetty N. One-step apexification using platelet rich fibrin matrix and MTA apical barrier (2014). *Indian J Dent Res* **25**: 809-812.
107. Kunkel M, Allroggen S, Appel C, Bargholz C, Biffar R, Boehme P, Engel P, Esser W, Fedderwitz J, Frank M, Georgi M, Heurich T, Kopp I, Kreusser B, Reichert TE, Sanner F, Singer R, Staehle HJ, Terheyden H, Wagner W, Wahl G, Weingart D, Werkmeister R, Hülsmann M. Apical tooth root resection guideline (2007). *Mund Kiefer Gesichtschir* **11**: 251-257.

108. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T (1970). *Nature* **227**: 680-685.
109. Laurent P, Camps J, De Méo M, Déjou J, About I. Induction of specific cell responses to a Ca(3)SiO(5)-based posterior restorative material (2008). *Dent Mater* **24**: 1486-1494.
110. Lee BN, Lee KN, Koh JT, Min KS, Chang HS, Hwang IN, Hwang YC, Oh WM. Effects of 3 endodontic bioactive cements on osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells (2014). *J Endod* **40**: 1217-1222.
111. Lee H, Shin Y, Kim SO, Lee HS, Choi HJ, Song JS. Study of Pulpal Responses to Pulpotomy with ProRoot MTA, RetroMTA, and TheraCal in Dogs' Teeth (2015). *J Endod* doi: 10.1016/j.joen.2015.04.007.
112. Lee SJ, Chung J, Na HS, Park EJ, Jeon HJ, Kim HC. Characteristics of novel root-end filling material using epoxy resin and Portland cement (2013). *Clin Oral Investig* **17**: 1009-1015.
113. Lenherr P, Allgayer N, Weiger R, Filippi A, Attin T, Krastl G. Tooth discoloration induced by endodontic materials: a laboratory study (2012). *Int Endod J* **45**: 942-949.
114. Liu H, Zhou Q, Qin M. Mineral trioxide aggregate versus calcium hydroxide for pulpotomy in primary molars (2011). *Chin J Dent Res* **14**: 121-125.
115. Liu W, S Toyosawa, T Furuichi, N Kanatani, C Yoshida, Y Liu, M Himeno, S Narai, A Yamaguchi, T Komori. Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures (2001). *J Cell Biol* **155**: 157-166.
116. Loesche WJ. Role of Streptococcus mutans in human dental decay (1986). *Microbiol Rev* **50**: 353-380.
117. Lost C, Schmitz HJ, Friedman S. Healing of apical periodontitis in dogs after apicoectomy and retrofilling with various filling materials (1996). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **81**: 221-228.
118. Luo Z, Kohli MR, Yu Q, Kim S, Qu T, He WX. Biodentine induces human dental pulp stem cell differentiation through mitogen-activated protein kinase and calcium-/calmodulin-dependent protein kinase II pathways (2014). *J Endod* **40**: 937-42.
119. Malkondu Ö, Karapinar Kazandağ M, Kazazoğlu E. A review on biodentine, a contemporary dentine replacement and repair material (2014). *Biomed Res Int* doi: 10.1155/2014/160951.
120. Martin LR, Gilbert B, Dickerson AW. Management of endodontic perforations (1982). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **54**: 668-677.

121. Matsumoto S, Hayashi M, Suzuki Y, Suzuki N, Maeno M, Ogiso B. Calcium ions released from MTA convert the differentiation pathway of C2C12 cells into osteoblast lineage (2013). *J Endod* **39**: 68-75.
122. McAllister BS, Leeb-Lundberg LM, Javors MA, Olson MS. Bradykinin receptors and signal transduction pathways in human fibroblasts: integral role for extracellular calcium (1993). *Arch Biochem Biophys* **304**: 294-301.
123. Menezes R, Bramante CM, Garcia RB, Letra A, Carvalho VG, Carneiro E, Brunini S, Oliveira RC, Canova GC, Moraes FG. Microscopic analysis of dog dental pulp after pulpotomy and pulp protection with MTA and white Portland cement (2004). *J Appl Oral Sci* **12**: 104-107.
124. Mente J, Hufnagel S, Leo M, Michel A, Gehrig H, Panagidis D, Saure D, Pfefferle T. Treatment Outcome of MTA or Calcium Hydroxide Direct Pulp Capping: Long-term Results (2014). *J Endod* doi:10.1016/j.joen.2014.07.019.
125. Mente J, Leo M, Panagidis D, Saure D, Pfefferle T. Treatment outcome of MTA: repair of root perforations-long-term results (2014). *J Endodont* **40**: 790-796.
126. Miller WD. The microorganisms of the human mouth (1973). S. S. White and Co (Philadelphia) (Reprinted, Karger Basel).
127. Minamikawa H, Deyama Y, Nakamura K, Yoshimura Y, Kaga M, Suzuki K, Yawaka Y. Effect of MTA on rat clonal dental pulp cells: expression of cyclooxygenase-2 mRNA and inflammation-related protein via nuclear factor kappa B signaling system (2009). *J Endod* **35**: 843-846.
128. Mitchell PJ, Pitt Ford TR, Torabinejad M, McDonald F. Osteoblast biocompatibility of MTA (1999). *Biomaterials* **20**: 167-173.
129. Miyamoto S, Maki M, Schmitt MJ, Hatanaka M, Verma IM. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of I kappa B alpha is a signal for its degradation but not dissociation from NF-kappa B (1994). *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 12740-12744.
130. Moghaddame-Jafari S, Mantellini MG, Botero TM, McDonald NJ, Nör JE. Effect of ProRootMTA on pulp cell apoptosis and proliferation *in vitro* (2005). *J Endod* **31**: 387-391.
131. Mohammadi Z, Dummer PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology (2011). *Int Endod J* **44**: 697-730.
132. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM: Regenerative Endodontics. A Review of Current Status (2007). *J Endod* **33**: 377-390.
133. Oliveira TM, Moretti AB, Sakai VT, Lourenço Neto N, Santos CF, Machado MA, Abdo RC. Clinical, radiographic and histologic analysis of the effects of pulp capping materials used in pulpotomies of human primary teeth (2013). *Eur Arch Paediatr Dent* **14**: 65-71.

134. Opal S, Garg S, Dhindsa A, Taluja T. Minimally invasive clinical approach in indirect pulp therapy and healing of deep carious lesions (2014). *J Clin Pediatr Dent* **38**: 185-192.
135. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells (1984). *Biochem Biophys Res Commun* **123**: 291-298.
136. Owen T, Aranow M, Shalhoub V, Barone L, Wilming L, Tessinari M, Kennedy M, Pockwinse S, Lian J, Stein G. Progressive development of the rat osteoblast phenotype *in vitro*: reciprocal relationship in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix (1990). *J Cell Physiol* **143**: 420-430.
137. Pahl HL. Oncogene. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors (1999). *Oncogene* **18**: 6853-6866.
138. Paranjpe A, Zhang H, Johnson JD. Effects of MTA on human dental pulp cells after pulp-capping procedures (2010). *J Endod* **36**: 1042-1047.
139. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action (2010). *J Endod* **36**: 400-413.
140. Parisay I, Ghoddusi J, Forghani M. A review on vital pulp therapy in primary teeth (2015). *Iran Endod J* **10**: 6-15.
141. Peltola M, Salo T, Oikarinen K. Toxic effects of various retrograde root filling materials on gingival fibroblasts and rat sarcoma cells (1992). *Endod Dent Traumatol* **8**: 120-124.
142. Peng W, Liu W, Zhai W, Jiang L, Li L, Chang J, Zhu Y. Effect of tricalcium silicate on the proliferation and odontogenic differentiation of human dental pulp cells (2011). *J Endod* **37**: 1240-1246.
143. Perinpanayagam H, Al-Rabeah E. Osteoblasts interact with MTA surfaces and express Runx2(2009). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **107**: 590-596.
144. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function (2007). *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 49-62.
145. Petrou MA, Alhamoui FA, Welk A, Altarabulsi MB, Alkilzy M, H Splieth C. A randomized clinical trial on the use of medical Portland cement, MTA and calcium hydroxide in indirect pulp treatment (2014). *Clin Oral Investig* **18**: 1383-1389.
146. Pistorius A, Willershausen B, Briseño Marroquin B. Effect of apical root-end filling materials on gingival fibroblasts (2003). *Int Endod J* **36**: 610-615.

147. Pratap J, Javed A, Languino LR, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. The Runx2 osteogenic transcription factor regulates matrix metalloproteinase 9 in bone metastatic cancer cells and controls cell invasion (2005). *Mol Cell Biol* **25**: 8581-8591.
148. Riendeau D, Percival MD, Boyce S, Brideau C, Charleson S, Cromlish W, Ethier D, Evans J, Falguyret JP, Ford-Hutchinson AW, Gordon R, Greig G, Gresser M, Guay J, Kargman S, Léger S, Mancini JA, O'Neill G, Ouellet M, Rodger IW, Thérien M, Wang Z, Webb JK, Wong E, Chan CC. Biochemical and pharmacological profile of a tetrasubstituted furanone as a highly selective COX-2 inhibitor (1997). *Br J Pharmacol* **121**: 105-117.
149. Rud J, Munksgaard EC, Andreasen JO, Rud V, Asmussen E. Retrograde root filling with composite and a dentin-bonding agent (1991). *Endod Dent Traumatol* **7**: 118-125.
150. Rydberg B, Johanson KJ. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells (1978). In: DNA Repair Mechanisms. (Herausgeber: Hanawalt PC, Friedberg EC, Fox CF) *Academic Press* (New York): 465-468.
151. Samyuktha V, Ravikumar P, Nagesh B, Ranganathan K, Jayaprakash T, Sayesh V. Cytotoxicity evaluation of root repair materials in human-cultured periodontal ligament fibroblasts (2014). *J Conserv Dent* **17**: 467-470.
152. Santos AD, Moraes JC, Araujo EB, Yukimitu K, Valerio Filho WV. Physico-chemical properties of MTA and a novel experimental cement (2005). *Int Endod J* **38**: 443-447.
153. Schiffmann D, De Boni U. Dislocation of chromatin elements in prophase induced by diethylstilbestrol: a novel mechanism by which micronuclei can arise (1991). *Mutat Res* **246**: 113-122.
154. Schuster VL. Prostaglandin transport (2002). *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**: 633-647.
155. Schutz N, Onfelt A. Video time-lapse study of mitosis in binucleate V79 cells: chromosome segregation and cleavage (1994). *Mutagenesis* **9**: 117-123.
156. Schweikl H, Schmalz G, Spruss T. The induction of micronuclei *in vitro* by unpolymerized resin monomers (2001). *J Dent Res* **80**: 1615-1620.
157. Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism (1986). *Cell* **47**: 921-928.
158. Seo, B.M., M. Miura, S. Gronthos, P.M. Bartold, S. Batouli, J. Brahim, M. Young, P.G. Robey, C.Y. Wang, and S. Shi. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament (2004). *Lancet* **364**:149-155.

159. Setbon HM, Devaux J, Iserentant A, Leloup G, Leprince JG. Influence of composition on setting kinetics of new injectable and/or fast setting tricalcium silicate cements (2014). *Dent Mater* **30**: 1291-1303.
160. Sexton TJ. Cytotoxicity of DMSO as related to components of a turkey semen extender (1979). *Poultry Science* **58**: 1024-1030.
161. Shahi S, Yavari HR, Rahimi S, Eskandarinezhad M, Shakouei S, Unchi M. Comparison of the sealing ability of MTA and Portland cement used as root-end filling materials (2011). *J Oral Sci* **53**: 517-522.
162. Silva RV, Silveira FF, Nunes E. Apexification in non-vital teeth with immature roots: report of two cases (2015). *Iran Endod J* **10**: 79-81.
163. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells (1988). *Exp Cell Res* **175**: 184-191.
164. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis (1999). *Cell Death Differ* **6**: 1067-1074.
165. Smith WL. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action (1992). *Am J Physiol* **263**: F181-191.
166. Soundappan S, Sundaramurthy JL, Raghu S, Natanasabapathy V. Biodentine versus Mineral Trioxide Aggregate versus Intermediate Restorative Material for Retrograde Root End Filling: An Invitro Study (2014). *J Dent* **11**: 143-149.
167. Souza NJ, Justo GZ, Oliveira CR, Haun M, Bincoletto C. Cytotoxicity of materials used in perforation repair tested using the V79 fibroblast cell line and the granulocyte-macrophage progenitor cells (2006). *Int Endod* **39**: 40-47.
168. Steffen R, Moret C, van Waes H. Regenerative Zahnmedizin (2011). *ZWP* **6**: 60-66.
169. Stopper H, Lutz WK. Induction of micronuclei in human cell lines and primary cells by combination treatment with gamma-radiation and ethyl methanesulfonate (2002). *Mutagenesis* **17**: 177-181.
170. Steiner JC, Dow PR, Cathey GM. Inducing root end closure of nonvital permanent teeth (1968). *J Dent Child* **35**: 47-54.
171. Tabrizzade M, Asadi Y, Sooratgar A, Moradi S, Sooratgar H, Ayatollahi F. Sealing ability of MTA and calcium-enriched mixture cement as apical barriers with different obturation techniques (2014). *Iran Endodont J* **9**: 261-265.
172. Tai KW, Chang YC. Cytotoxicity evaluation of perforation repair materials on human periodontal ligament cells *in vitro* (2000). *J Endod* **26**: 395-397.

173. Tani-Ishii N, Hamada N, Watanabe K, Tujimoto Y, Teranaka T, Umemoto T. Expression of bone extracellular matrix proteins on osteoblast cells in the presence of mineral trioxide (2007). *J Endod* **33**: 836-839.
174. Tantular IS, Kawamoto F. An improved, simple screening method for detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (2003). *Trop Med Int Health* **8**: 569-574.
175. Tenório de Franca TR, da Silva RJ, Sedycias de Queiroz M, Aguiar CM. Arsenic content in Portland cement: a literature review (2010). *Indian J Dent Res* **21**: 591-595.
176. Torabinejad M, Chivian N. Clinical Applications of MTA (1999). *J Endod* **25**: 197-205.
177. Torabinejad M, Higa RK, McKendry DJ, Pitt Ford TR. Dye leakage of four root end filling materials: effects of blood contamination (1994). *J Endod* **20**: 159-163.
178. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material (1995). *J Endod* **21**: 349-353.
179. Torabinejad M1, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations (2010). *J Endod* **36**: 190-202.
180. Trope M, Lost C, Schmitz HJ, Friedman S. Healing of apical periodontitis in dogs after apicoectomy and retrofilling with various filling materials (1996). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **81**: 221-228.
181. Trubiani O, D'Arcangelo C, Di Iorio D, Di Nardo Di Maio F, Caputi S. Dental pulp stem cells bioadhesivity: evaluation on mineral-trioxide-aggregate (2007). *Int J Immunopathol Pharmacol* **20**: 81-86.
182. Tsatsas DV, Meliou HA, Kerezoudis NP. Sealing effectiveness of materials used in furcation perforation *in vitro* (2005). *Int Dent J* **55**: 133-141.
183. Tsukatani T, Higuchi T, Suenaga H, Akao T, Ishiyama M, Ezo T, Matsumoto K. Colorimetric microbial viability assay based on reduction of water-soluble tetrazolium salts for antimicrobial susceptibility testing and screening of antimicrobial substances (2009). *Anal Biochem* **393**: 117-25.
184. Vallés M, Mercadé M, Duran-Sindreu F, Bourdelande JL, Roig M. Influence of light and oxygen on the color stability of five calcium silicate-based materials (2013): *J Endod* **39**: 525-528.
185. Van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure (1998). *Cytometrie* **31**: 1-9.
186. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on

- early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V (1995). *J Immunol Methods* **184**: 39-51.
187. Vervoordeldonk MJ, Pineda Torra IM, Aarsman AJ, van den Bosch H. Aspirin inhibits expression of the interleukin-1- β -inducible group II phospholipase A2 (1996). *FEBS Lett* **397**: 108-111.
 188. Wang L, Yin SH, Zhong SL, Jie YQ. Cytotoxicity evaluation of three kinds of perforation repair materials on human periodontal ligament fibroblasts *in vitro* (2009). *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* **27**: 479-482.
 189. Wang Y, Yan M, Fan Z, Ma L, Yu Y, Yu J. MTA enhances the odonto/osteogenic capacity of stem cells from inflammatory dental pulps via NF- κ B pathway (2014). *Oral Dis* **20**: 650-658.
 190. Williams D. Revisiting the definition of biocompatibility (2003). *Med Device Technol* **14**: 10-13.
 191. Yamamoto K, Arakawa T, Ueda N, Yamamoto S. Transcriptional roles of nuclear factor κ B and nuclear factor interleukin-6 in the tumor necrosis factor- α -dependent induction of cyclooxygenase 2 in MC3T3-E1 cells (1995). *J Biol Chem* **270**: 31315-31350.
 192. Yan M, Wu J, Yu Y, Wang Y, Xie L, Zhang G, Yu J, Zhang C. MTA promotes the odonto/osteogenic differentiation and dentinogenesis of stem cells from apical papilla via nuclear factor kappa B signaling pathway (2014). *J Endod* **40**: 640-647.
 193. Yildiz E, Tosun G. Evaluation of formocresol, calcium hydroxide, ferric sulfate, and MTA primary molar pulpotomies (2014). *Eur J Dent* **8**: 234-240.
 194. Yoshino P, Nishiyama CK, Modena KC, Santos CF, Sipert CR. *In vitro* cytotoxicity of white MTA, MTA Fillapex® and Portland cement on human periodontal ligament fibroblasts (2013). *Braz Dent J* **24**: 111-116.
 195. Yucel LT, Nilsson S, Modeer T. Signal transduction pathways involved in the synergistic stimulation of prostaglandin production by interleukin-1 β and tumor necrosis factor α in human gingival fibroblasts (1999). *J Dent Res* **78**: 61-68.
 196. Zaleckiene V, Peciuliene V, Brukiene V, Drukteinis S. Traumatic dental injuries: etiology, prevalence and possible outcomes (2014). *Stomatologija* **16**: 7-14.
 197. Zanini M, Sautier JM, Berdal A, Simon S. Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization (2012). *J Endod* **38**: 1220-1226.
 198. Zeferino EG, Bueno CE, Oyama LM, Ribeiro DA. Ex vivo assessment of genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to white MTA or white Portland cement with 15% bismuth oxide (2010). *Int Endod J* **43**: 843-848.

199. Zhao X, He W, Song Z, Tong Z, Li S, Ni L. MTA promotes odontoblastic differentiation via mitogen-activated protein kinase pathway in human dental pulp stem cells (2012). *Mol Biol Rep* **39**: 215-220.
200. Zhu Q, Safavi KE, Spangberg LS. Cytotoxic evaluation of root-end filling materials in cultures of human osteoblast-like cells and periodontal ligament cells (1999). *J Endod* **25**: 410-412.

8 **Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

- Abbildung 1 Wege der NF- κ B Signalkaskade auf Zellebene (Gilmore, 2006; Brasier, 2006; Perkins, 2006)
- Abbildung 2 Wege der Differenzierung der parodontalen Prognitorzelle unter Einfluss von verschiedenen Wachstumsfaktoren (Ivanovski *et al.*, 2006)
- Abbildung 3 Differenzierung einer pluripotenten mesenchymalen Stammzelle zum Osteozyten unter Einfluss von RUNX2 (Zhang *et al.*, 2012)
- Abbildung 4 Phasen der Expression unterschiedlicher osteogener Marker während der osteogenen Differenzierung (Owen *et al.*, 1990)
- Abbildung 5 Reduktion von farblosem Tetrazoliumsalz zu farbigem Formazanprodukt als Grundlage des WST-8-Test (Abbildung Hersteller Promokine)
- Abbildung 6 Abgelaufene Farbreaktion in einer 96-Well-Platte
- Abbildung 7 Mikrokern in einer Zelle
- Abbildung 8 Grundlage des ELISA-Verfahrens mit Primär-Antikörper-Antigen-Sekundär-Antikörper Sandwich HRP gekoppelt (Abbildung Hersteller R&D Systems)
- Abbildung 9 EIA-Platte nach Abschluss des Assays mit beendeter Farbreaktion
- Abbildung 10 Ergebnisse des WST-8-Test – Durchschnittliche Zellviabilität von hGF-1, hPDLF und hOB nach Inkubation mit den Zementeluat als % der Negativkontrolle; ^a $p = 0,003$, ^b $p = 0,007$
- Abbildung 11 exemplarisches Western-Blot-Ergebnis auf I κ B α nach Inkubation mit Zementeluat
- Abbildung 12 exemplarisches Western-Blot-Ergebnis auf Actin zur Ladungskontrolle
- Abbildung 13 exemplarisches Western-Blot-Ergebnis auf NF- κ B p65 nach Inkubation mit Zementeluat
- Abbildung 14 exemplarisches Western-Blot-Ergebnis auf Cyclin B zur Ladungskontrolle

- Abbildung 15 IL-6 Konzentrationen nach Inkubation von unstimulierten und entzündlich stimulierten hPDLF mit Zementeluaten; ^a $p = 0,045$, ^b $p = 0,024$
- Abbildung 16 exemplarisches Western-Blot-Ergebnis auf COX-2 nach Inkubation mit Zementeluaten
- Abbildung 17 exemplarisches Western-Blot-Ergebnis auf Actin zur Ladungskontrolle
- Abbildung 18 Ergebnisse des PGE₂-ELISA mit hPDLF nach Inkubation mit Zementeluaten; ^a $p = 0,002$, ^b $p = 0,011$
- Abbildung 19 Ergebnisse des PGE₂-ELISA mit hOB nach Inkubation mit Zementeluaten; ^a $p = 0,003$, ^b $p = 0,012$, ^c $p = 0,002$
- Abbildung 20 exemplarisches Western-Blot-Ergebnis auf RUNX2 nach Inkubation mit Zementeluaten
- Abbildung 21 exemplarisches Western-Blot-Ergebnis auf Actin zur Ladungskontrolle
- Abbildung 22 Ergebnisse des Osteocalcin-ELISA mit hPDSC_hTERT und hMSC nach Inkubation mit Zementeluaten
- Tabelle 1 Primär- und Sekundärantikörper für Untersuchungen des NF-κB-Systems (Cell Signaling, Danvers, MA, USA)
- Tabelle 2 Primär- und Sekundärantikörper zum Nachweis von COX-2 (Cell Signaling)
- Tabelle 3 Primär- und Sekundärantikörper für den Nachweis von RUNX2 (Cell Signaling)
- Tabelle 4 Mittelwert der Anzahl der Mikronuklei mit Standardabweichung

9 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A. dest.	Aqua destillata-destilliertes Wasser
AK	Antikörper
ANSI/ADA	American National Standards Institute/American Dental Association
ALP	alkalische Phosphatase
BGG	Gamma-globulin
BMP	bone morphogenetic proteins
BSP	Bone Sialoprotein
Ca²⁺	Calcium
CBBG	Coomassie-Brilliant-Blau G-250
CCVK	Colorimetric Cell Viability Kit
CER	zytoplasmatisches Extraktionsreagenz
CO₂	Kohlenstoffdioxid
COX-1/2	Cyclooxygenase-1/2
d	Tage
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	Enzym-Immunoassay
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	et alii (und andere)
FBS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GIZ	Glasionomierzemente
h	Stunden
H₂O	Wasser
HCl	Salzsäure
hGF-1	humane gingivale Fibroblasten
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
hOB	humane Osteoblasten
hPDLF	humane Fibroblasten des parodontalen Ligaments

hPDSC_hTERT	humane adulte Stammzellen des parodontalen Ligaments - humane Telomerase reverse Transkriptase
HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	ImmunglobulinG
IL-6/8/1β	Interleukin-6/8/1 β
IRM	Intermediate Restorative Material
ISO	Internationale Organisation für Normung
IκBα	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B- cells inhibitor alpha
LPS	Lipopolysaccharid
mA	Miliampere
mg	Milligramm
Mg²⁺	Magnesium
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mol	Mol
MPa	Megapascal
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTA	Mineral Trioxide Aggregate
MTT	Mosmann's tetrazolium toxicity
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid-Hydrid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NER	nukleäre Extraktionsreagenz
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
nm	Nanometer
OCN	Osteocalcin
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
PGE₂	Prostaglandin E ₂
pH	potentia hydrogenii
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rt-PCR	reversere Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

RUNX2	Runt-related transcription factor 2
s	Sekunden
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
spp.	Spezies (Plural)
sTNF	löslicher Tumor Nekrose Faktor- α
TBS-T	Tris Buffered Saline with Tween
TGF-β	Transforming growth factor beta
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor- α
TNF-R 1/2	Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor 1/2
TLR	„Toll-like“ Rezeptoren
U	Spannung
U	Units
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
V	Volt
WST-8	Water soluble Tetrazolium salts-8
X	-fach
α-MEM Medium	Minimal Essential Medium α
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer

10 Reagenzien und Chemikalien

10.1 Chemikalien

2-Propanol (Sigma)

Aqua Destillata (B. Braun)

Colorimetric Cell Viability Kit-1-Reagens (PromoCell)

Coomassie-Brilliant-Blau G-250 (Bio-Rad Laboratories)

Dexamethason (Sigma Aldrich)

Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺; Sigma)

Entellan (Merck Millipore)

Färbereagenz (Thermo Fisher Scientific)

Fetales Kälberserum (gibco/Life Technologies)

Formaldehyd (Sigma)

IL-1 β (Sigma)

Indomethacin (Sigma)

Methanol (Carl Roth)

Minimal Essential Medium α (gibco/Life Technologies)

Osteoblast growth Medium (PromoCell)

Penicillin G (Sigma)

Polyacrylamid-Tris-Glycin-Gel (12%; Bio-Rad Laboratories)

Protease-Inhibitor-Cocktail (1:100; Thermo Fisher Scientific)

Proteinstandard (Bio-Rad Laboratories)

Rinderalbumin (Thermo Fisher Scientific)

Salzsäure (Sigma)

Schiffs Reagens (Roche)

Stickstoff (Thermo Fisher Scientific)

Streptomycin (Sigma)

TNF- α (Sigma)

Triton X-100 (Sigma-Aldrich)

Trypanblau (PAA Laboratories)

Xylol (Sigma)

10.2 Rezepte

Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich)

0,05% Trypsin, 0,02% Ethylendiamintetraessigsäure in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

Laufpuffer

192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1% SDS

TBS-T

20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20 (Bio-Rad Laboratories)
Meerrettichperoxidase (HRP; Santa Cruz)

4X Laemmli Puffer

277,8 mM Tris-HCL, pH 6.8, 44,5% Glyzerol, 4,4% SDS, 0,02% Bromphenolblau,
10% β -Mercaptoethanol

Enzym-Substrat-Lösung

Luminol Enhancer Lösung, stabiler Peroxid Puffer (1:1; Thermo Fisher Scientific)

Transferpuffer

25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol (pH ~ 8,3)

Natriumdisulfit-Spüllösung

540 ml A. dest., 30 ml 1 N HCL, 30 ml 10% Kaliumdisulfit-Lösung

10.3 Verwendete Kits

Annexin V-Assay (Annexin V-PE Detection Kit; PromoCell)

Bradford Test (Bradford Assay; Bio-Rad Laboratories)

Extraktions Kit für nukleäre und zytoplasmatische Proteine (NE-PER; Thermo Fisher Scientific)

IL-6 ELISA (Quantikine Human IL-6; R&D Systems)

Mikrokerntest (Merck Millipore)

Osteocalcin ELISA (Quantikine ELISA human OCN; R&D Systems)

PGE₂ EIA (PGE₂ high sensitivity EIA; Enzo Life Sciences)

11 Danksagung

Zum Ende dieser Dissertation möchte ich mich herzlich bei denjenigen bedanken, die mich während dieser Zeit begleitet haben.

Zu Beginn danke ich natürlich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Karin Christine Huth, die mir den reibungslosen Fortlauf und den Abschluss dieser Arbeit in dieser Form erst ermöglicht hat.

Zudem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Reinhard Hickel, Direktor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie und Dekan der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, dass ich diese Arbeit an seiner Abteilung durchführen durfte.

Vor allem gilt mein Dank Herrn Dr. Maximilian Kollmuß, der während all dieser Zeit nicht nur ein fähiger Berater war, sondern auch ein sehr guter Freund geworden ist und mich stets tatkräftig mit all seinem Wissen und Geduld unterstützt hat.

Schließlich bedanke ich mich bei den besten Eltern der Welt und dem tollsten Bruder den es gibt für ihre unendliche Geduld und Liebe, immer. Und bei allen Zahnfeen.

Eidesstattliche Versicherung

Broos, Katharina

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Wirkung von verschiedenen hydraulischen Silikatzementen auf orale Zellen *in vitro*: Biokompatibilität, Entzündungsregulation und regeneratives Potential“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München,