

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

**In vitro Untersuchung der Wirkung verschiedener
Sealermaterialien auf Zellen des oralen Systems im
Hinblick auf Zytotoxizität und Entzündungsreaktion**

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

vorgelegt von

Nathalie Gebhardt

aus

München

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Michael Stimmelmayer

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

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.05.2023

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Endodontie	5
1.1.1 Pulpale Erkrankungen	5
1.1.2 Vorgehen bei einer Wurzelkanalbehandlung	7
1.2 Sealer	10
1.2.1. Anforderungen an einen Sealer	10
1.2.2. Klassifikation von Sealern	11
1.2.3. Sealer auf Zinkoxid-Eugenol-Basis	11
1.2.4. Sealer auf Calciumhydroxid Basis	13
1.2.5. Silikonbasierende Sealer	13
1.2.6. Sealer auf Epoxidharzbasis	14
1.2.7. Calciumsilikatbasierende Sealer	15
1.3. Biologische Eigenschaften von Sealern	17
1.3.1. Zytotoxizität	17
1.3.2. Apoptose	18
1.3.3. Nekrose	21
1.3.4. Entzündungsreaktion	22
1.3.5. Transkriptionsfaktor NF- κ B	23
1.3.6. Prostaglandin E ₂	24
1.3.7. Interleukin-6	26
2. Fragestellung und Ziel der Untersuchung	27
3. Material und Methode	28
3.1. Methoden in der Zellkultur	28
3.1.1. Zellarten	28
3.1.2. Auftauen der Zellen und Mediumwechsel	29
3.1.3. Splitten	29
3.1.4. Zählen der Zellen	30
3.2. Sealereluate	31
3.3. Versuchsaufbau und Nachweisverfahren	32
3.3.1. Versuchsbedingungen	32
3.3.2. WST-8-Assay	32

3.3.3. Annexin-V-Assay	34
3.3.4. ELISA zur Bestimmung der Interleukin-6-Konzentration	35
3.3.5. EIA zur Bestimmung der PGE ₂ -Konzentration.....	37
3.3.6. Statistische Auswertung	39
4. Ergebnisse	40
4.1. Zytotoxizitätsuntersuchung	40
4.1.1. WST-8-Assay	40
4.1.2. Annexin-V-Assay	44
4.2. Einfluss auf die Entzündungsreaktion.....	50
4.2.1. ELISA zur Bestimmung der IL-6- Konzentration.....	50
4.2.2. EIA zu Bestimmung der PGE ₂ -Konzentration	52
5. Diskussion	55
6. Zusammenfassung.....	65
7. Literaturverzeichnis	68
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	78
8.1. Abbildungen	78
8.2. Tabellen	79
9. Abkürzungsverzeichnis	80
10. Reagenzien und Chemikalien.....	81
10.1. verwendete Chemikalien	81
10.2. verwendete Kits	81
11. Danksagung	82

1. Einleitung

1.1 Endodontie

Die Endodontie ist ein wesentlicher Bestandteil der modernen Zahnmedizin. Sie umfasst sowohl vitalerhaltende Therapien des Zahnes wie die direkte oder indirekte Überkappung und die Vitalamputation, als auch die Wurzelkanalbehandlung von Zähnen. Eine Wurzelkanalbehandlung wird durchgeführt, wenn die Pulpa nicht mehr vital ist oder entfernt wurde, um eine apikale Parodontitis zu verhindern oder zu behandeln (Quality guidelines for endodontic treatment: consensus report of the European Society of Endodontology, 2006). Etablierte Techniken in der Endodontie machen es möglich, selbst Zähne mit schwerer Entzündung der Pulpa oder des periapikalen Gewebes zu reinigen, aufzubereiten und zu füllen (Huang *et al.*, 2002). So können erfolgreich behandelte, pulpentote Zähne in der Mundhöhle erhalten werden. Durch den Zahnerhalt kann entweder die vollständige Zahnreihe erhalten oder festsitzender sowie herausnehmbarer Zahnersatz besser verankert werden. Die Zahl der fehlenden Zähne hat sich in den letzten Jahren in allen Altersgruppen reduziert und der Trend geht heutzutage definitiv zu festsitzendem Zahnersatz (Deutsche Mundgesundheitsstudie DMS V, 2016). Je mehr natürliche Zähne im Mund erhalten sind, desto besser kann dieser realisiert werden. Endodontische Maßnahmen kommen zum Einsatz, wenn der Vitalerhalt des Zahnes nicht mehr möglich ist und sollten, wenn möglich, der Extraktion eines Zahnes vorgezogen werden.

1.1.1 Pulpale Erkrankungen

Bei Schädigung des Zahnes mit Beteiligung der Pulpa unterscheidet man zwischen reversibler Pulpitis, irreversibler Pulpitis und der Pulpanekrose. Unter Pulpitis versteht man eine Entzündung des pulpalen Gewebes. Bei Ausbreitung der Entzündung auf den periradikulären Raum, kann es zur apikalen Parodontitis kommen, also einer lokalen Entzündung des periapikalen Parodonts, welche in diesem Bereich zur Knochenresorption führen kann, in einigen Fällen auch zur Ausbildung von Granulomen, Zysten oder Abszessen (Hellwig *et al.*, 2013).

Die dentale Pulpa ist von Hartgewebe umgeben, welches einen Schutz vor schädlichen Einflüssen der Mundhöhle darstellt und so die Gesundheit und Funktionsfähigkeit der Pulpa gewährleistet (Bergenholtz, 1990). Schädigungen dieser natürlichen Barriere können Erkrankungen der Pulpa zur Folge haben. Typische Auslöser pulpaler Erkrankungen sind kariogene und parodontalpathogene Mikroorganismen. Traumata oder iatrogene Schädigung der Pulpa bei operativen Eingriffen, Randundichtigkeit von Restaurationen oder Toxizität dentaler Materialien stellen weitere Ursachen dar (Bergenholtz, 1990). Die Erkrankung der Pulpa kann unterschiedliche Ausprägungen haben. Handelt es sich um eine Reaktion auf Karies, ist die Stärke der Reaktion anhängig von der Eindringtiefe. Bei Pulpabeteiligung kommt es in der Regel zu einer irreversiblen Pulpitis. Aber auch sehr tiefe kariöse Läsionen, die noch nicht in die Pulpahöhle durchgebrochen sind, können zur irreversiblen Pulpitis führen. Diese ist das Ergebnis einer starken bakteriellen Invasion der Dentintubuli, was zu einer „funktionellen Exposition“ der Pulpa führen kann (Ricucci *et al.*, 2014).

Die Einteilung in reversible und irreversible Pulpitis kann einerseits durch das histologische Bild erfolgen, in der Praxis muss jedoch der Behandler anhand anderer Kriterien entscheiden. Dabei orientiert er sich an der zahnärztlichen Anamnese, der klinischen Untersuchung, Schmerzsymptomatik und dem röntgenologischen Befund. Diese Einteilung ist von Bedeutung, da sie die Entscheidungsgrundlage für die Behandlungsstrategie darstellt. Eine irreversible Pulpitis macht die Entfernung des Nervs im Sinne einer Wurzelkanalbehandlung notwendig, wohingegen bei einer reversiblen Pulpitis mit konservierenden Behandlungen Symptombefreiung geschaffen werden kann. Ricucci ordnete 2014 in einer Studie der gesunden Pulpa, der reversiblen und irreversiblen Pulpitis histologische Kriterien zu. Er ließ Zähne anhand des klinischen Befundes von Behandlern in eine dieser Kategorien einordnen und verglich deren Ergebnis mit dem histologischen Befund. Er konnte zeigen, dass histologischer Befund und Diagnose des Zahnarztes häufig korrelieren (Ricucci *et al.*, 2014).

Ob es zu pathologischen Prozessen und pulpalen Erkrankungen kommt hängt vom Vorhandensein von Mikroorganismen ab. Kakehashi zeigte dies bereits 1965 anhand einer Studie an Ratten. Bei konventionellen Ratten führte eine eröffnete Pulpa zur Pulpanekrose oder Abszessen. Bei keimfreien Ratten heilten

Pulpen- und Hartgewebe, obwohl die Pulpa Essensresten, Haaren und anderen Stoffen ausgesetzt war (Kakehashi *et al.*, 1965).

Das Absterben der Pulpa und eine anschließende Nekrose, bietet eine ideale warme und feuchte Umgebung und Nährstoffquelle zur Proliferation von Mikroorganismen, welche in einer flüssigen Phase vorkommen oder als dichte bakterielle Aggregate oder Koaggregate an den Wänden des Wurzelkanals haften und mehrschichtige Gemeinschaften bilden. Hier haben sie die Möglichkeit, Pathogenität und eine entzündliche Erkrankung des periradikulären Gewebes zu entwickeln. Primäre endodontische Infektionen werden also durch orale Bakterien verursacht, bei denen es sich in der Regel um opportunistische Krankheitserreger handelt (Tomson und Simon, 2016). Deshalb ist die Eliminierung von Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukten der Schlüssel zum Erfolg in der Endodontie (Tomson *et al.*, 2014). In der Praxis erfolgt die Reduktion der Mikroorganismen, die für die Infektion verantwortlich sind, meist durch eine Wurzelkanalbehandlung.

1.1.2 Vorgehen bei einer Wurzelkanalbehandlung

Ziel der Wurzelkanalbehandlung ist die Beseitigung von Mikroorganismen aus dem Wurzelkanalsystem und die Verhinderung einer Reinfektion (Tomson und Simon, 2016). Bei der Eliminierung endodontischer Infektionen sind das Wirtsabwehrsystem, Instrumentierung und Spülung des Wurzelkanalsystems, in den Kanal eingebrachte Medikamente, eine permanente Wurzelkanalfüllung sowie die koronale Restauration für den Erfolg entscheidend. Gelegentlich und bei besonderen Indikationen kann eine systemische Antibiotikatherapie notwendig sein (Haapasalo *et al.*, 2003).

Folgende Schritte haben sich bei der Durchführung einer Wurzelkanalbehandlung etabliert. Nach Eröffnung des Pulpenkavums werden die Wurzelkanäle aufgesucht und dargestellt. Der Zugang zum Wurzelkanal sollte so gestaltet werden, dass die Feilen einen geradlinigen, ungehinderten Zugang zum Wurzelkanal haben und der Kanal mechanisch aufbereitet werden kann. Zur Entfernung der koronalen Krümmung eignen sich beispielsweise Gates Glidden Bohrer. Zu Beginn der Aufbereitung sollte ein Gleitpfad mit einer schmalen Handfeile der ISO Größe 6, 8 oder 10 bis zum Ende des Kanals am

anatomischen Apex gebildet werden. Für das beste Ergebnis sollte der Kanal in seiner vollen Länge gefüllt werden, wofür es essentiell ist, die Länge des Kanals zu kennen. Zur Längenbestimmung des Kanals gibt es unterschiedliche Methoden wie beispielsweise die Längenbestimmung anhand des Röntgenbildes, durch taktile Diskrimination oder die Papierspitzen-Methode. Am genauesten kann die Länge allerdings mit Hilfe eines elektronischen Apex-Locators bestimmt werden, welcher heute als obligatorisches Instrument in der Endodontie gilt (Tomson und Simon, 2016). Nach der Schaffung des Zugangs, des Gleitpfades und der Längenbestimmung des Kanals folgt die mechanische Aufbereitung. Die mechanische Aufbereitung dient der direkten Entfernung von Bakterien aus dem Wurzelkanalsystem und ermöglicht es, desinfizierenden Spüllösungen tiefer in das Wurzelkanalsystem einzudringen (Tomson und Simon, 2016). Zur Aufbereitung existieren verschiedene Instrumente wie beispielsweise konventionelle Handinstrumente aus Stahl oder auch moderne Nickel-Titan (NiTi) Instrumente, die eine maschinelle Aufbereitung des Kanals ermöglichen. Es existieren Systeme, die in mehreren Schritten mit Feilen in aufeinanderfolgenden Größen, den Wurzelkanal erweitern. Diese Feilen bewegen sich in der Regel kontinuierlich in eine Richtung. In letzter Zeit wurden neuere Feilen mit einer reziproken Bewegung entwickelt. Diese rotieren abwechselnd im und gegen den Uhrzeigersinn und machen nie eine ganze 360° Bewegung, was die Belastung der Feilen reduziert und sie leichter dem Kanal folgen lässt. Reziproke Feilen sind meist so konzipiert, dass nur eine einzige Feile zur Erweiterung des Wurzelkanals benötigt wird (Tomson und Simon, 2016), was die Aufbereitung weniger zeitintensiv macht.

Auch die chemische Aufbereitung ist ein Schlüssel zum Erfolg in der Endodontie. Je nach verwendeter Spüllösung erfüllt sie verschiedene Funktionen wie die Reduktion der Friktion zwischen Feile und Dentin, Verbesserung der Schneideleistung der Feilen, Auflösung von Gewebe, Kühlung von Feile und Zahn, Spülung und Wirkung gegen Mikroorganismen sowie den Biofilm. Die Spülung ist auch die einzige Möglichkeit, Bereiche der Wurzelkanalwand zu erreichen, die von den mechanischen Instrumenten nicht berührt werden (Haapasalo *et al.*, 2014). Natriumhypochlorit (NaOCl) ist seit vielen Jahren die Spüllösung der Wahl, aufgrund seiner antimikrobiellen Wirkung (Tomson und Simon, 2016) und der Fähigkeit organisches Gewebe aufzulösen (Beltz *et al.*,

2003, Stojicic *et al.*, 2010, Cobankara *et al.*, 2010). Auch Chlorhexidin (CHX) ist eine im Rahmen endodontischer Behandlungen verwendete Spüllösung, die ebenfalls antimikrobiell wirkt. CHX bindet elektrostatisch an die negativ geladenen Oberflächen von Bakterien und schädigt so die äußeren Schichten der Zellwand, indem es sie durchlässig macht. CHX ist allerdings nicht in der Lage organisches Gewebe oder Biofilm aufzulösen und kann daher nicht als einzige Spüllösung verwendet werden (Tomson und Simon, 2016). Ethylendiamintetraacetat (EDTA) wird als Spüllösung verwendet, da es ein Chelatbildner ist und in der Lage ist, den mineralisierten Teil der Schmierschicht im Wurzelkanal zu entfernen, welche nach der Aufbereitung des Kanals entsteht (Basrani und Haapasalo, 2012, Tomson und Simon, 2016).

Nach der mechanischen und chemischen Aufbereitung wird der Kanal getrocknet und es folgt die Obturation. Das Ziel der Obturation ist eine flüssigkeitsdichte Barriere zu bilden, um das periradikuläre Gewebe vor Mikroorganismen zu schützen, die sich in der Mundhöhle befinden (Tomson *et al.*, 2014).

Als Material für die Wurzelfüllung wird am häufigsten Guttapercha genutzt. Dabei handelt es sich um einen natürlich vorkommenden Kautschuk mit der chemischen Bezeichnung trans-1,4-Polyisopren. Auch Calciumsilikatzemente werden in speziellen Fällen zur Wurzelfüllung verwendet. Indikationen hierfür wären Zähne mit noch offenem Apex oder auch Perforationen.

Unter den Obturationstechniken wird die laterale Kompaktion immer noch als Goldstandard angesehen. Hierbei wird zunächst eine Guttaperchaspitze, die auf Arbeitslänge klemmt, mit Sealer bestrichen und in den aufbereiteten Kanal eingebracht. Daraufhin werden akzessorische Guttaperchaspitzen in den Kanal eingebracht, die mit Hilfe eines Spreaders gegeneinander kompaktiert werden (Bhandi *et al.*, 2021). In den 1960er Jahren entwickelte Schilder die warm-vertikale Füllmethode für Wurzelkanäle, bei der erwärmte Guttapercha im Kanal kondensiert wird, um sich dem aufbereiteten Wurzelkanal anzupassen. Seitenkanäle können so häufig mit Guttapercha gefüllt werden (Schilder, 2006). Der Vorteil hierbei ist, dass erwärmte Guttapercha sich besser an die kleinen Unregelmäßigkeiten in den Wänden des aufbereiteten Wurzelkanalsystems anpassen kann (Epley *et al.*, 2006).

Eine weitere Möglichkeit der warmen Wurzelfüllung ist die trägerbasierte Fülltechnik. Die Idee, Guttapercha mit einem Träger in den Wurzelkanal

einzubringen, stammte ursprünglich von Johnson (Johnson, 1978), auf deren Basis anschließend das ThermoFüll System entwickelt wurde. Bei dieser Methode werden flexible Metall- oder Kunststoffträger, die mit Guttapercha beschichtet sind, verwendet. Diese werden in einem Ofen mit präziser Temperaturkontrolle erwärmt und dann in den Kanal eingebracht, mit dem Ziel einer vorhersagbaren Thermoplastizität und Fließfähigkeit (Gambarini *et al.*, 2016). Es wurden inzwischen neuere Systeme entwickelt, deren Träger aus kreuzvernetzter Guttapercha besteht, was Vorteile beim Setzen von Stiften sowie bei der Revision mit sich bringt (Tomson *et al.*, 2014). Bei allen erwähnten Fülltechniken ist die Verwendung von Sealer obligat.

1.2 Sealer

Bei Sealern handelt es sich um Materialien, die zusätzlich zur Kernfüllung bei der Obturation von Wurzelkanälen verwendet werden, um einen flüssigkeitsdichten Verschluss des Wurzelkanals zu gewährleisten (Gatewood, 2007). Sie werden zwischen Wurzelkanalwand und Kernfüllung eingebracht. Die Kernfüllung alleine reicht nicht für einen suffizienten Verschluss des Wurzelkanals aus, da sie nicht in der Lage ist, Unregelmäßigkeiten im Wurzelkanalsystem sowie laterale Kanäle zu verschließen, weshalb ein Sealer benötigt wird, um eben diese Schnittstelle zwischen Kanal und Guttapercha zu versiegeln (Gatewood, 2007).

1.2.1. Anforderungen an einen Sealer

Die Anforderungen an einen Sealer beschrieb Grossman in seinen Kriterien für einen idealen Sealer, welche in folgender Tabelle (Tabelle 1) aufgelistet sind.

Grossmanns Kriterien für einen idealen Sealer

- er bietet abgebunden eine exzellente Abdichtung des Wurzelkanals
- er erzeugt eine ausreichende Haftung zwischen der Kanalwand und dem Obturationsmaterial
- er ist radioopak
- er verfärbt den gefüllten Zahn nicht
- er ist dimensionsstabil
- er kann leicht angemischt und in die Kanäle eingebracht werden
- er kann, wenn notwendig leicht entfernt werden
- er ist nicht durch Gewebsflüssigkeiten löslich
- er ist bakterizid oder hemmt bakterielles Wachstum
- er soll das periradikuläre Gewebe nicht irritieren
- er bindet langsam ab, um suffizientes Arbeiten sicherzustellen

Tabelle 1: Kriterien für einen idealen Wurzelkanal Sealer nach Grossman (Torabinejad und Walton, 2009)

1.2.2. Klassifikation von Sealern

Auf dem Markt gibt es verschiedene Gruppen von Sealern, welche sich in ihrer Zusammensetzung und damit auch in ihren werkstoffkundlichen Eigenschaften unterscheiden. Man unterteilt sie in zinkoxideugenolhaltige und zinkoxideugenolfreie Präparate. Bei Letzteren kann nochmals zwischen Sealern auf Calciumhydroxidbasis, silikonbasierenden Sealern, kunststoffbasierenden Sealern und calciumsilikatbasierenden Sealern unterschieden werden.

1.2.3. Sealer auf Zinkoxid-Eugenol-Basis

Sealer auf Zinkoxid-Eugenol-Basis gehören seit langer Zeit aufgrund ihres Langzeiterfolges zu den etablierten Materialien in der Endodontie (Komabayashi *et al.*, 2020). Die Sealer dieser Gruppe sind klinisch bewährt und galten früher

als Standard in der Zahnmedizin (Gatewood, 2007). Problematisch sind allerdings die zytotoxischen Eigenschaften dieser Sealergruppe.

Die Abbindereaktion des Sealers ist eine Säure-Base-Reaktion, bei der Zinkoxid als Base und Eugenol als Säure fungiert, was zur Bildung eines Zink-Eugenolat-Chelatsalzes und Wasser führt (Crisp *et al.*, 1980).

Freies Eugenol ist vor allem zu Beginn der Reaktion vorhanden und nimmt im Laufe des Abbindeprozesses ab. Das freie Eugenol ist für die Zytotoxizität des frisch angemischten, nicht abgebundenen Sealers verantwortlich (Gatewood, 2007). Huang und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Freisetzung von Eugenol aus dem ausgehärteten Material eine zytotoxische Wirkung auf Zellen des parodontalen Ligaments hat (Huang *et al.*, 2002). Da Sealer über den Apex des Zahnes direkt in Kontakt mit periapikalem Gewebe kommen können, stellt dies ein ernstzunehmendes Problem dar. Auch die Überpressung des Materials in den Canalis mandibularis sollte aufgrund des neurotoxischen Potenzials dieser Sealer vermieden werden. Das Paraformaldehyd, welches häufig in den Sealern dieser Gruppe enthalten ist, kann bei versehentlichem Überpressen in den Canalis mandibularis eine Langzeitanästhesie und Dysästhesie des N. alveolaris inferior verursachen (Kleier und Averbach, 1988). Material, das bei der Behandlung in den Sinus maxillaris gelangt, was bei Molaren im Oberkiefer aufgrund der anatomischen Nähe zum Sinus leicht passieren kann, kann dort zu einer Aspergillose führen. Auch hier spielt wieder Paraformaldehyd eine Rolle, da es bei Überpressung in die Kieferhöhle zu lokaler Nekrose der Antrum-Schleimhaut führt. Wenn nach einiger Zeit die antibakteriellen Inhaltsstoffe des Sealers verschwinden, begünstigt Zinkoxid dort das Wachstum von luftgetragenen Aspergillus-Sporen, die der Patient durch die Nase einatmet (Beck-Mannagetta und Necek, 1986). Deshalb sollten Zinkoxid-Eugenol haltige Sealer, vor allem solche die Paraformaldehyd freisetzen, nicht bei Oberkiefermolaren verwendet werden (Geurtsen, 2001).

Vertreter der Sealer auf Zinkoxid-Eugenol-Basis sind beispielsweise Pulp Canal Sealer und Tubliseal (Kerr, Bioggio, Schweiz).

1.2.4. Sealer auf Calciumhydroxid Basis

In der Endodontie wird Calciumhydroxid hauptsächlich zur Überkappung der Pulpa, als Medikament, das in den Wurzelkanal appliziert wird, für manche Apexifikationstechniken, aber auch als Komponente einer Vielzahl von Wurzelkanal Sealern verwendet (Desai und Chandler, 2009).

Die beiden wichtigsten Gründe für die Verwendung von Calciumhydroxid sind dessen biologische Eigenschaften, nämlich einerseits die Stimulation des periapikalen Gewebes zur Förderung seiner Heilung, sowie seine antimikrobielle Wirkung (Desai und Chandler, 2009). Sealer auf Calciumhydroxid-Basis werden deshalb auch als biokeramische Materialien bezeichnet (Giacomino *et al.*, 2019). Um jedoch wirken zu können, muss Calciumhydroxid in Calcium- und Hydroxyl-Ionen dissoziieren. Damit dies geschehen kann, müsste sich der Sealer zu einem gewissen Grad zersetzen oder auflösen, was die Abdichtungsfähigkeit beeinträchtigen würde. Es gibt noch keine Daten, die zeigen, dass die erwähnten biologischen Eigenschaften bei Sealern auch wirklich genutzt werden können (Gatewood, 2007).

Beispiele für Materialien aus der Gruppe der Sealer auf Calciumhydroxid Basis sind Apexit (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) und Sealapex (Kerr).

1.2.5. Silikonbasierende Sealer

Im Bereich der silikonbasierten Sealer gibt es bisher nur das Produkt Roeko Guttaflow bioseal (Coltène/Whaledent AG, Altstätten, Schweiz) auf dem Markt, dessen Vorläufer Guttaflow 2 und Roeko-Seal waren.

Vorteil dieser Sealer ist, dass sie im Vergleich zu anderen Sealergruppen die geringste und langsamste Dimensionsänderung im Sinne einer leichten Expansion besitzen (Ørstavik *et al.*, 2001). Zu starke Expansion könnte zur Fraktur der Wurzel, zu starke Schrumpfung des Sealers zu Undichtigkeit der Wurzelfüllung und daraus resultierender Penetration von Bakterien führen (Ørstavik *et al.*, 2001).

Ein Nachteil dieser Materialgruppe ist, dass silikonbasierte Sealer laut Hersteller nicht für warme Füllmethoden verwendet werden können, da dies zu einem vorzeitigen Abbinden des Materials führen würde.

Außerdem ist zu erwähnen, dass im Vergleich zu epoxidharzbasierten Sealern und methacrylatbasierten Sealern, silikonbasierende Sealer das beste Benutzungsverhalten an den Tag legen (Bohn und Ilie, 2014).

Stellvertretend für die Gruppe der silikonbasierenden Sealer soll nun das Material Roeko GuttaFlow bioseal (Coltène/Whaledent AG) betrachtet werden.

Guttaflow bioseal besteht aus Guttaperchapulver, Polydimethylsiloxan, Platinkatalysator, Zirkondioxid, Micro-Silber (Konservierungsmittel), Farbstoff und bioaktiver Glaskeramik. Der Hersteller beschreibt Guttaflow bioseal als äußerst gewebeverträgliches und bioaktives Material, welches die Bildung von Hydroxylapatitkristallen induziert. Die Kristalle sollen für eine Verbesserung der Adhäsion sorgen und als natürliche Trigger fungieren, welche die Regeneration von Knochen- und Dentinegewebe anregen.

Die vom Hersteller beschriebene Gewebeverträglichkeit wurde bereits in einigen Studien bestätigt. Beispielsweise zeigte GuttaFlow gute Ergebnisse im Hinblick auf Zytotoxizität, welche mittels MTT-Test überprüft werden konnten. Es wurde sogar eine Stimulation der Proliferation von Fibroblasten durch GuttaFlow nachgewiesen (Bouillaguet *et al.*, 2006 und Szczurko *et al.*, 2018).

Im Vergleich zu AH 26 einem Sealer auf Epoxidharz-Basis zeigte GuttaFlow bioseal eine niedrigere Apoptoserate (Ferreira *et al.*, 2020).

1.2.6. Sealer auf Epoxidharzbasis

Sealer auf Epoxidharzbasis sind aktuell der Goldstandard in der Zahnmedizin. Ein bekannter Vertreter dieser Materialgruppe ist der Sealer AH plus (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Deutschland). Epoxidharz wurde 1938 von P. Castan entwickelt, einem Schweizer Chemiker bei de Trey (Zürich, Schweiz). Der erste Epoxidharz basierte Sealer, AH 26, wurde in den 1940er Jahren vom selben Unternehmen entwickelt. 1993 publizierten Spångberg, dass AH 26 Formaldehyd freisetzt (Spångberg *et al.*, 1993), woraufhin der formaldehydfreie Sealer AH plus entwickelt wurde. Wurzelfüllungen aus Guttapercha in Kombination mit dem Sealer AH plus gelten derzeit als Goldstandard in der Zahnmedizin (Carvalho *et al.*, 2015). AH plus besteht aus 2 Pasten, wobei eine Epoxidharze und die andere Amine enthält und ist im Vergleich zu seinem Vorgängerprodukt AH 26 formaldehydfrei. Bei der Abbindereaktion dieser Sealer handelt es sich um eine

Additionsreaktion (Komabayashi *et al.*, 2020). Der Hersteller beschreibt das Produkt als den Wurzelkanal dicht versiegelnd, dimensionsstabil, auto-adhäsiv und röntgenopak. In der Packungsbeilage warnt der Hersteller vor Überfüllung des Materials über die Wurzelspitze hinaus, beschreibt den Sealer aber im Falle des Überpressens als meist sehr gewebeverträglich. Die Dimensionsstabilität von AH plus wird in der Literatur mit einer Expansion von initial 0,4% auf 0,9% innerhalb der ersten 4 Wochen beschrieben (Ørstavik *et al.*, 2001). In mehreren Studien, in welchen die Röntgenopazität mehrerer Sealer verglichen wurde, zeigte AH plus im Vergleich die höchste Röntgenopazität (Gorduysus und Avcu, 2009; Tanomaru *et al.*, 2004). In Bezug auf die Zytotoxizität wird AH plus initial sogar als schwer zytotoxisch beschrieben (Colombo *et al.*, 2018), wobei die Zytotoxizität sukzessive sinkt und nach einer gewissen Zeit kaum mehr Zytotoxizität nachweisbar ist (Loushine *et al.*, 2011; Camargo *et al.*, 2014; Lodiene *et al.*, 2008; Pinna *et al.*, 2008). Diese Zytotoxizität wird in verschiedenen Studien entweder doch auf eine minimale Freisetzung von Formaldehyd (Leonardo *et al.*, 1999) oder freigesetzte Substanzen aus der Epoxidharz-Komponente (Huang *et al.*, 2004) zurückgeführt. Im Widerspruch zu diesen Daten existieren allerdings auch Daten, welche AH plus als nicht zytotoxisch beschreiben (Karapınar-Kazandağ *et al.*, 2011).

1.2.7. Calciumsilikatbasierende Sealer

Calciumsilikat basierte Materialien sind bioaktiv durch Freisetzung von Calcium und Hydroxyl-Ionen (Gandolfi *et al.*, 2015). Diese Ionen induzieren in Anwesenheit von Körperflüssigkeiten die Bildung von Hydroxylapatit an ihrer Oberfläche (Komabayashi *et al.*, 2020). Neben der Bildung von Hydroxylapatit ist auch die gute Biokompatibilität dieser Materialgruppe ein großer Vorteil gegenüber anderen Materialien (Komabayashi *et al.*, 2020).

Sie werden hauptsächlich zur Überkappung der Pulpa, als medikamentöse Einlage im Wurzelkanal und bei Apexifikationstechniken verwendet, sind aber auch ein Bestandteil einiger Wurzelkanalsealer.

Calciumsilikatbasierte Sealer werden auch als MTA- oder biokeramische Sealer bezeichnet. Der wohl bekannteste Vertreter der calciumsilikatbasierten Materialien ist MTA (Mineral-Trioxid-Aggregat). MTA Gray (Dentsply Sirona,

Johnson City, TN, USA) war das ursprüngliche MTA-Produkt, das seit 1997 auf dem Markt ist. Es wurde allerdings noch nicht als Sealer verwendet (Komabayashi *et al.*, 2020). Seither wurden neue calciumsilikatbasierte Materialien entwickelt, welche auch als Sealer verwendet werden. Beispiele hierfür wären Bioroot RCS (Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, Frankreich) und Totalfill BC Sealer (FKG Dentaire SA, La ChauxdeFonds, Schweiz).

Bioroot besteht aus einem Pulver und einer flüssigen Komponente, welche per Hand angemischt werden müssen. Das Pulver beinhaltet Tricalciumsilikat, Zirkoniumoxid und Povidon, die Flüssigkeit Calciumchlorid und Polycarboxylat. Laut Herstellerangaben ist das Material bioaktiv und soll so die periapikale Heilung fördern und durch die Freisetzung von Calciumhydroxid antimikrobiell wirken. Außerdem soll es den Kanal dreidimensional versiegeln, ohne dabei zu schrumpfen.

TotalFill BC wird auch unter den Namen EndoSequence BC Sealer (Brasseler USA Dental, Savannah, USA) und iRoot (Innovative BioCreamix Inc, Burnaby, Canada) vertrieben. Der Sealer bildet laut Herstellerangaben beim Aushärten Hydroxylapatit und geht eine chemische Bindung mit dem Dentin ein. Aufgrund seines stark basischen pH-Werts soll der Sealer antibakteriell wirken und im Vergleich zu traditionellen Sealern bei der Aushärtung nicht schrumpfen. Außerdem bescheinigt der Hersteller dem Produkt eine hervorragende Biokompatibilität.

Einige Studien bestätigen die gute Biokompatibilität von BioRoot RCS und TotalFill BC (Seo *et al.*, 2019; Colombo *et al.*, 2018). Zhang und Mitarbeiter beschrieben TotalFill BC als initial leicht zytotoxisch, konnten aber nach 24 Stunden keinerlei Zytotoxizität mehr nachweisen (Zhang *et al.*, 2010). Es existieren aber auch Studien, die im Widerspruch zu den bereits genannten Studien und den Herstellerangaben stehen. Bei Kebudi Benzera und Mitarbeiter zeigte sich BioRoot RCS im MTT Test zytotoxischer als AH plus und auch TotalFill BC wies zytotoxische Eigenschaften auf, wenn auch geringer als die anderen getesteten Materialien (Kebudi Benzera *et al.*, 2018). Auch wurde in einer Studie für TotalFill BC eine größere Toxizität als für AH plus nachgewiesen (Loushine *et al.*, 2011).

1.3. Biologische Eigenschaften von Sealern

Wie aus den bereits genannten Studien zu Sealern ersichtlich, können diese, da sie potentiell in Kontakt mit periapikalem Gewebe kommen, auch Auswirkungen auf dieses haben, weshalb bei der Wahl des Sealers ein besonderes Augenmerk auf die Biokompatibilität des Materials gelegt werden sollte. Santos definierte Biokompatibilität als die Fähigkeit eines Materials bestimmte Funktionen zu erfüllen, wenn es in lebendes Gewebe implantiert wird, ohne das Gewebe zu schädigen (Santos *et al.*, 2019). Zur Beurteilung können die Zytotoxizität, die Auslösung von Apoptose und Nekrose, sowie die Stimulation der Entzündungsreaktion durch Sealer ermittelt werden.

1.3.1. Zytotoxizität

Zytotoxische Substanzen sind in der Lage lebende Zellen zu schädigen. Die Zellviabilität ist ein wichtiger Parameter, um die Zytotoxizität bestimmen zu können. Dabei wird betrachtet wie viele Zellen nach Inkubation mit einer Substanz, deren Zytotoxizität bestimmt werden soll, überleben im Vergleich zu Zellen, die mit einer wesentlich nicht toxischen Substanz inkubiert wurden. Die Zellviabilität kann über bestimmte mikrobiologische Tests ermittelt werden, wie beispielsweise den MTT-Test, den Trypanblau-Test oder auch über ein WST-8 - Assay. Sowohl der MTT-Test als auch der WST-8 Assay beruhen auf der Reduktion eines Farbstoffes, welche nur in Anwesenheit von Dehydrogenasen lebender Zellen stattfinden kann. Die Reduktionsreaktion bewirkt einen Farbumschlag, welcher proportional zur Anzahl lebender Zellen ist und photometrisch gemessen werden kann. Der Trypanblau-Test beruht auf der Tatsache, dass die Zellmembran toter Zellen permeabel ist. Der Farbstoff kann nur in Zellen mit geschädigter Membran eindringen, was es ermöglicht vitale von avitalen Zellen zu unterscheiden und so eine Aussage über die Zellviabilität zu treffen.

1.3.2. Apoptose

Unter Apoptose versteht man den programmierten Zelltod, welcher sowohl durch innere als auch äußere Auslöser hervorgerufen werden kann (Rassow *et al.*, 2016). Diese Auslöser können sowohl physiologischer als auch pathologischer Art sein, wobei nicht alle Zellen als Reaktion auf den selben Stimulus sterben (Elmore, 2007). Die Apoptose hat Bedeutung im Körper bei der Differenzierung der Zellen, sie ist also für die Formung der Körpergestalt des Menschen verantwortlich. Sie ist wichtig bei der Entwicklung der Immuntoleranz, Beseitigung defekter oder infizierter Zellen und der Homöostase der Zellzahl. Gerät die Bildung und das Absterben von Zellen ins Ungleichgewicht, so kann das beispielsweise zur Entstehung von Tumoren beitragen (Rassow *et al.*, 2016). Bei der Regulation der Zellpopulation spielt die Apoptose eine komplementäre Rolle zur Mitose, stellt aber auch deren Gegenstück dar (Kerr *et al.*, 1972).

Es gibt verschiedene Wege, um die Apoptose auszulösen. Den extrinsischen, rezeptorabhängigen Weg, den intrinsischen, mitochondrienabhängigen Weg sowie den Granzym-Perforin-Weg, der entweder durch Granzym A oder Granzym B ausgelöst werden kann (Elmore, 2007). Der intrinsische Weg der Apoptose wird von der Zelle selbst als Reaktion auf eine Schädigung ausgelöst (D'Arcy, 2019). Beim intrinsischen Weg kommt es zu einer Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran, der Freisetzung von Cytochrom C und der Aktivierung von Procaspase-9 (Beere, 2005). Neben Cytochrom C, tragen auch die proapoptischen Proteine Smac/DIABLO (second mitochondria derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low PI) und die Serinprotease HtrA2/Omi (high temperature requirement protein A2) zur Caspasen Aktivierung bei, wenn auch indirekt (Saelens *et al.*, 2004). Sie aktivieren den Caspase-abhängigen mitochondrialen Signalweg. Cytochrom C bindet und aktiviert Apaf-1 sowie Procaspase-9 und es bildet sich ein "Apoptosom" (Srinivasula *et al.*, 1998 Chinnaiyan, 1999, Zou *et al.*, 1997). Die Anhäufung von Procaspase-9 auf diese Weise führt zur Caspase-9-Aktivierung. Der extrinsische Weg wird durch die Bindung von Todesrezeptoren an der Zelloberfläche an spezifische Todesliganden gekennzeichnet, um die katalytisch aktive Caspase-8 zu erzeugen (Beere, 2005). Der Mechanismus des extrinsischen Wegs lässt sich am besten anhand der Liganden und korrespondierenden Rezeptoren FasL (Fas-Ligand)/FasR (Fas-Rezeptor) und

TNF- α /TNFR1 (TNF-Rezeptor-1) beschreiben. Die Bindung des Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor führt zur Bindung des Adapterproteins FADD (Fas-Associating Death Domain-Containing Protein) und die Bindung des TNF-Liganden an den TNF-Rezeptor führt zur Bindung des Adapterproteins TRADD (Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1 Associated Death Domain Protein) mit Rekrutierung von FADD und RIP (Receptor-Interacting Protein). Dies führt zur Aktivierung von Procaspase 8 (Elmore, 2007).

Der Intrinsische, der Extrinsische sowie der Granzym B Weg führen alle in die selbe Endstrecke (Elmore, 2007), bei der es zur kaskadenartigen Aktivierung von Caspasen kommt. Caspasen werden als inaktive Proenzyme synthetisiert (Cohen, 1997). Die sogenannten Procaspasen befinden sich im Zytoplasma und werden beim apoptotischen Prozess durch proteolytische Schnitte kaskadenartig aktiviert (Rassow *et al.*, 2016). Caspasen können Proteine an Asparaginsäureresten proteolytisch spalten und andere Procaspasen aktivieren. Sobald Caspasen initial aktiviert sind führt dies unausweichlich zum Zelltod (Elmore, 2007). Man unterscheidet die Caspasen in Initiatorcaspasen (Caspase 2,8,9,10), Effektorcaspasen (Caspase 3,6,7) und Entzündungscaspasen (Caspase 1,4,5) (Cohen, 1997).

Der Granzym A Weg aktiviert einen Caspasen unabhängigen Weg zum Zelltod über einzelsträngige DNA -Brüche (Beresford *et al.*, 2001)

Charakteristisch für apoptotische Zellen ist eine umfangreiche Proteinvernetzung (Nemes *et al.*, 1996), die Bildung von DNA-Fragmenten (Bortner *et al.*, 1995), sowie die Expression von Oberflächenmarkern zu schnellen Phagozytose. Dies geschieht durch die Bewegung des normalerweise nach innen gerichteten Phosphatidylserins der Lipiddoppelschicht der Zelle in die äußere Schicht der Zellmembran (Bratton *et al.*, 1997). Neben Phosphatidylserin werden auch andere Proteine an der Zelloberfläche exprimiert wie zum Beispiel Annexin I und Calreticulin (Elmore, 2007). Das Protein Annexin V kann Phosphatidylserin binden und kann so zum Nachweis apoptotischer Zellen verwendet werden (van Engeland *et al.*, 1998).

Morphologisch betrachtet schrumpft und verdichtet sich die Zelle, weshalb Kerr die Apoptose ursprünglich auch als Schrumpfungsnekrose bezeichnete (Kerr, 1971). Der intrinsische Aktivierungsweg der Apoptose ist in Abbildung 1, der extrinsische Weg in Abbildung 2 graphisch dargestellt.

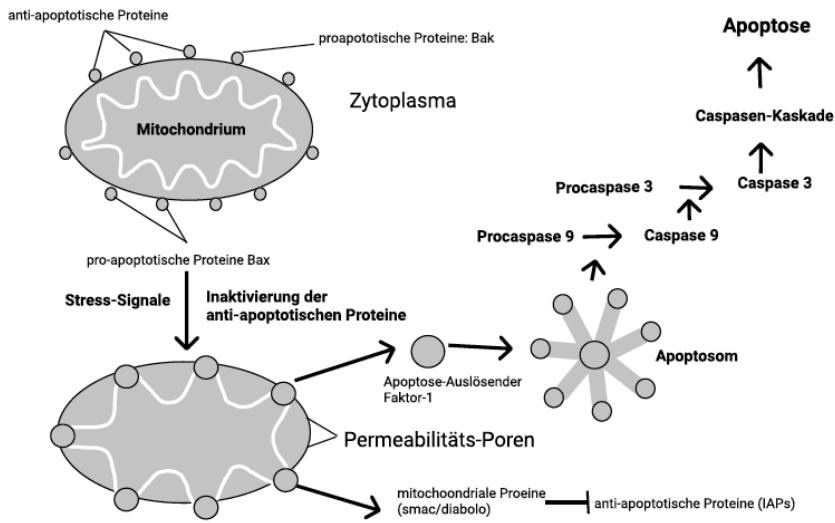


Abbildung 1: schematische Darstellung des intrinsischen Signalwegs der Apoptose (modifiziert nach Rassow *et al.*, 2016)

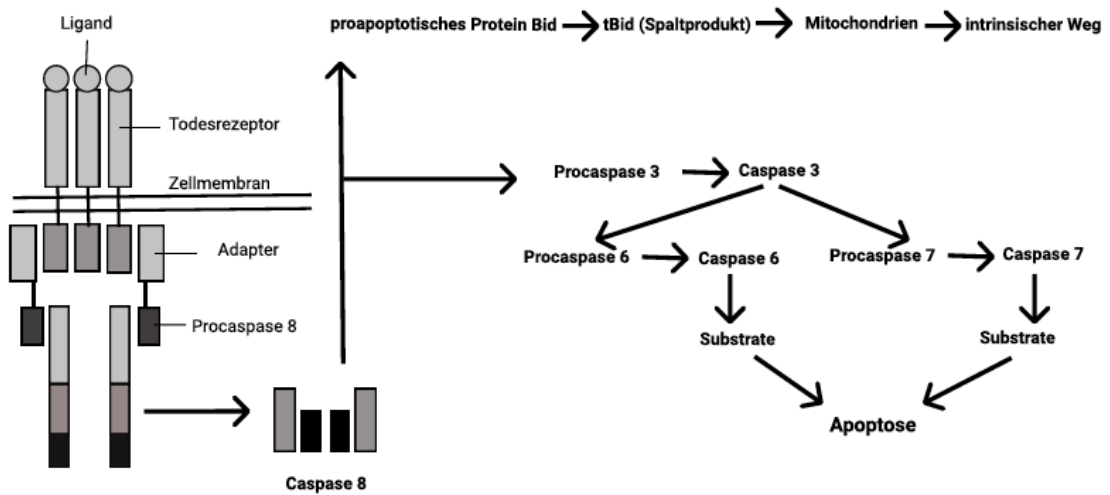


Abbildung 2: schematische Darstellung des extrinsischen Weges des Apoptose (modifiziert nach Rassow *et al.*, 2016)

1.3.3. Nekrose

Neben der Apoptose existiert eine weitere Form des Zelltodes, die Nekrose, bei der es zur irreversiblen Schädigung durch von außen einwirkende Faktoren kommt (Rassow *et al.*, 2016). Es handelt sich im Gegensatz zu Apoptose, um eine unkontrollierte Form des Zelltods (D'Arcy, 2019). Durch die Versorgung mit genügend Nährstoffen, Sauerstoff oder Wachstumsfaktoren sowie durch Anhaftung an andere Zellen oder die extrazelluläre Matrix ist eine Zelle im Normalzustand, dem sogenannten basalen Zustand. Geraten diese Grundbedingungen aus dem Gleichgewicht, so kommt es zu einer Stressreaktion der Zelle. Wenn die Veränderung dieser Parameter größer ist, als die Zelle es bewältigen kann, kommt es zur Apoptose. Ist die Veränderung noch größer, zur Nekrose (Medzhitov, 2008). Dieser Prozess ist häufig bedingt durch Strahlung, Hitze, Chemikalien oder Hypoxie und mit einer Hochregulierung verschiedener entzündungsfördernder Proteine und Verbindungen, wie z. B. NF- κ B verbunden (D'Arcy, 2019). Die Zelle reagiert mit Schwellung, ein Prozess, der als Onkose bekannt ist, da sie nicht mehr in der Lage ist, die Homöostase mit ihrer Umgebung aufrecht zu erhalten (D'Arcy, 2019). In Folge dessen kommt es zum Platzen der Zellmembran und zum Austritt des Zellinhalts in den Interzellulärraum, was eine Entzündungsreaktion und Gewebsschäden zur Folge hat (D'Arcy, 2019; Rassow *et al.*, 2016). Dieser Prozess ist in Abbildung 3 graphisch dargestellt.

Im Jahre 2005 wurde eine neue Form des Zelltodes entdeckt, die Merkmale der Nekrose aufweist, aber im Gegensatz zu früheren Beobachtungen streng reguliert zu sein scheint. Diese Form des nicht-apoptotischen, programmierten Zelltodes wurde als Nekroptose bezeichnet (Degterev *et al.*, 2005). Zur Nekroptose kommt es über die Aktivierung der Rezeptor-interagierenden Proteine 1 und 3, was durch verschiedene Stimuli wie zum Beispiel die Aktivierung durch Todesrezeptoren, insbesondere Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 erfolgen kann (Oliveira *et al.*, 2018).

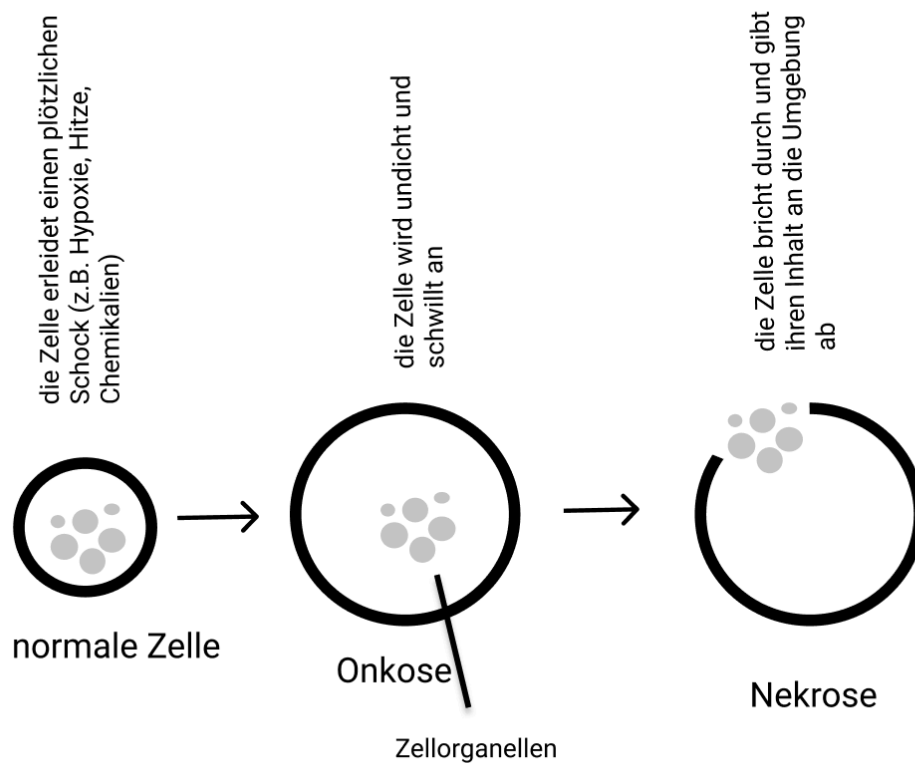


Abbildung 3: Entwicklung einer normalen Zelle zu einer onkotischen und nekrotischen Zelle (D'Arcy, 2019)

1.3.4. Entzündungsreaktion

Die Entzündungsreaktion spielt eine wichtige Rolle beim Auslösen periapikaler Destruktion (Yu *et al.*, 2010). Das Vorhandensein einer Entzündungsreaktion ist deshalb ein entscheidender Punkt zur Beurteilung der Biokompatibilität von Wurzelkanalsealern. Entzündungen liegen viele physiologische und pathologische Prozesse zu Grunde. Eine Entzündung ist eine Reaktion des Körpers, die durch schädliche Reize wie z. B. Infektionen und Gewebeerletzungen, ausgelöst wird. Die klassischen Zeichen einer Entzündung sind Rubor (Rötung), Calor (Hitze), Tumor (Schwellung), Dolor (Schmerz) und Functio laesa (gestörte Funktion).

Es wird allgemein angenommen, dass eine kontrollierte Entzündungsreaktion für den Körper von Vorteil ist, um diesen zum Beispiel vor Infektionen zu schützen. Allerdings kann eine dysregulierte Entzündung schädlich werden, wie es

beispielsweise beim septischen Schock der Fall ist (Medzhitov, 2008). Auch endodontische Behandlungen und Entzündungen an der Wurzelspitze eines Zahnes können zu einer Bakteriämie führen (Siqueira, 2002).

1.3.5. Transkriptionsfaktor NF- κ B

Bei der Entzündungsreaktion spielt auch der Transkriptionsfaktor NF- κ B (nuclear factor- κ B) eine bedeutende Rolle. NF- κ B ist eine Sammelbezeichnung für Transkriptionsfaktoren, die ein gemeinsames Sequenzmotiv erkennen. NF- κ B kommt in allen Zelltypen vor und ist an der Aktivierung einer großen Zahl von Genen als Reaktion auf Infektionen, Entzündungen und andere Stresssituationen beteiligt. Der Transkriptionsfaktor befindet sich normalerweise im Zytoplasma von nicht stimulierten Zellen und muss daher in den Zellkern verlagert werden, um zu funktionieren. NF- κ B wird durch eine Familie von Inhibitorproteinen, den I κ Bs, kontrolliert, die NF- κ B binden und so die Aufnahme in den Kern verhindern (Karin und Ben-Neriah, 2000). Es gibt zahlreiche Stimuli für NF- κ B. Einige Beispiele hierfür wären Zytokine und Wachstumsfaktoren wie z. B. Interleukine wie IL-6, Tumornekrosefaktoren wie TNF- α , TNF- β , aber auch immunmodulierende Moleküle wie Haupthistokompatibilitätsantigene (MHC) der Klassen I und II (Messer und Rupec, 2001). Diese führen zu einer raschen Phosphorylierung, Ubiquitinierung und schließlich zum proteolytischen Abbau von I κ B, wodurch NF- κ B in den Zellkern verlagert wird, wo es die Gentranskription reguliert. Die Kinase für die I κ B -Phosphorylierung, ist die I κ B-Kinase. Sie besitzt zwei katalytische Untereinheiten, IKK α und IKK β , die beide in der Lage sind, I κ B korrekt zu phosphorylieren (Karin und Ben-Neriah, 2000). Im Zellkern ist NF- κ B in der Lage an entsprechende DNA Bindungsstellen zu binden, um die Transkription einer Vielzahl von Genen, einschließlich antimikrobieller Peptide, Zytokine, Chemokine, Stressreaktionsproteine und anti-apoptotischer Proteine zu regulieren. Die NF- κ B-Aktivität ist wesentlich für Überleben und Aktivierung von Lymphozyten sowie für die normale Immunreaktion (Li und Verma, 2002). Im Rahmen der Entzündung führt NF- κ B zur Hochregulierung von an Entzündungsreaktionen beteiligten Genen (Boyce *et al.*, 2015). Abbildung 4 veranschaulicht den Aktivierungsweg von NF- κ B graphisch.

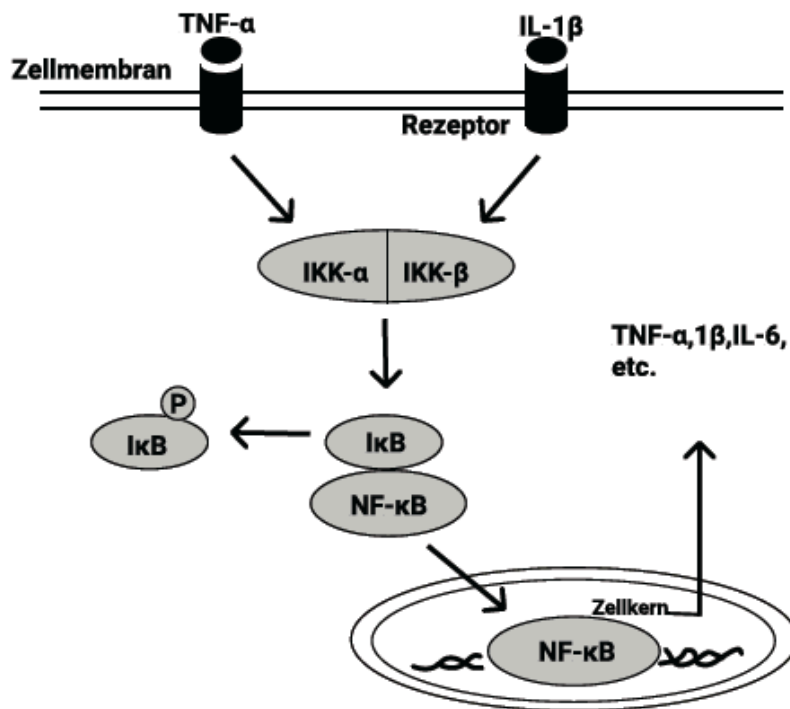


Abbildung 4: Aktivierungsweg des NF-κB (P=Phosphorylierung des Proteins; IKK= IκBKinase) (modifiziert nach Guo et al., 2012)

1.3.6. Prostaglandin E₂

Prostaglandine (PGs) gehören zur Familie der Eicosanoide (sauerstoffhaltige C₂₀-Fettsäuren) (Smith, 1989). Sie werden nicht gespeichert, sondern de novo aus membranständiger Arachidonsäure synthetisiert. Dies geschieht, wenn Zellen durch ein mechanisches Trauma oder durch spezifische Zytokine, Wachstumsfaktoren und andere Stimuli aktiviert werden (z. B. Kollagen und Adenosindiphosphat in Blutplättchen oder Bradykinin und Thrombin im Endothel). Eine Vielzahl von Enzymen reguliert die zellulären Arachidonsäurespiegel und hält die Säure verestert, bis sie von Phospholipasen mobilisiert wird (Funk, 2001). Arachidonsäure ist eine essentielle, mehrfach ungesättigte Fettsäure. Bei der Prostaglandinsynthese wird sie durch die Phospholipase A₂ aus der sn-2 Position von Membranphospholipiden freigesetzt (Mouchlis und Dennis, 2019). Arachidonsäure wird von einer Cyclooxygenase (COX) mit Sauerstoff angereichert und so in PGG₂ umgewandelt. Anschließend

wird sie von der selben COX reduziert und so das instabile Zwischenprodukt Prostaglandin H₂ gebildet (Smith *et al.*, 2000). PGH₂ wird dann in PGE₂ umgewandelt. Diese Reaktion wird von der Prostaglandin E Synthase katalysiert (Murakami *et al.*, 2002).

Prostaglandin E₂ ist ein wichtiger Entzündungsmediator, der eine wesentliche Rolle bei der Entstehung und Progression von periradikulären Erkrankungen spielt. Hohe Spiegel von PGE₂ im periradikulären Exudat sind oft mit akuter, schmerzhafter apikaler Parodontitis verbunden (Coon *et al.*, 2007). In einer Studie wurde bereits gezeigt, dass die Synthese von COX-2 durch Wurzelkanal Sealer induziert werden kann (Huang *et al.*, 2003). In Abbildung 5 ist die PGE₂ Synthese graphisch dargestellt.

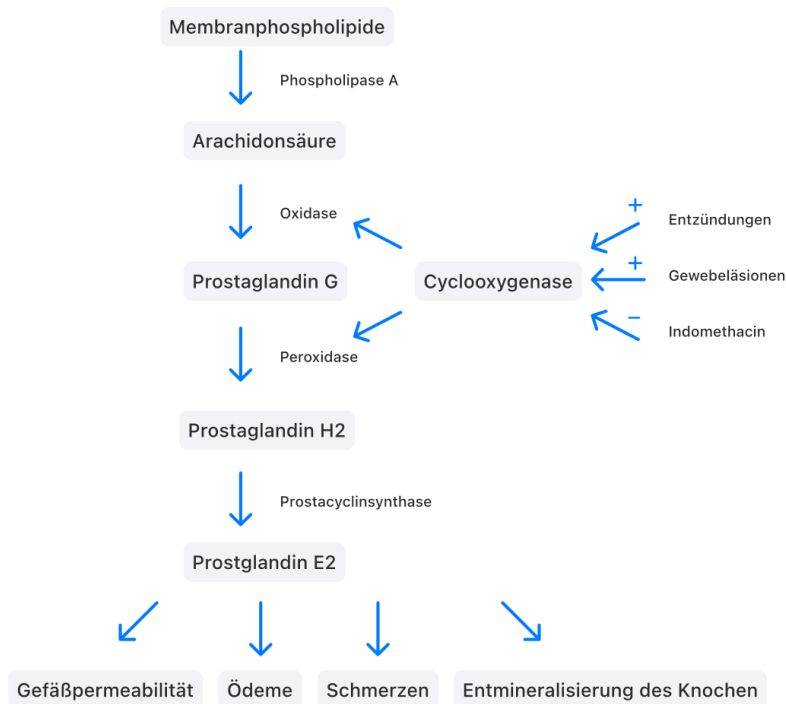


Abbildung 5: Prostaglandin E₂ Synthese und Wirkung (modifiziert nach Hein und O'Banion, 2009)

1.3.7. Interleukin-6

Interleukin 6 (IL-6) gehört zu den Zytokinen und spielt eine zentrale Rolle bei den Abwehrmechanismen des Körpers (Hirano *et al.*, 1990). Es wird als Reaktion auf Infektionen und Gewebeverletzungen gebildet und trägt durch die Stimulierung von Akutphasenreaktionen, Hämatopoese und Immunreaktionen zur Wirtsabwehr bei. Obwohl seine Expression durch transkriptionelle und posttranskriptionelle Mechanismen streng kontrolliert wird, spielt die dysregulierte kontinuierliche Synthese von IL-6 eine pathologische Rolle bei chronischen Entzündungen und Autoimmunität (Tanaka *et al.*, 2014).

Periapikale Läsionen sind entzündlich bedingt, werden durch eine bakterielle Infektion im Wurzelkanalsystem hervorgerufen und können zu periapikalen Knochendestruktionen führen (Huang *et al.*, 2005). Auch Ishimi publizierte, dass IL-6 Knochenresorption hervorrufen kann (Ishimi *et al.*, 1990). Es gibt bereits Studien, die die Expression von IL-6 und IL-8 in periapikalen Läsionen zeigen (Euler *et al.*, 1998; Bando *et al.*, 1993). Deshalb ist die Untersuchung der IL-6 Produktion durch Kontakt mit Wurzelkanalsealern interessant, wenn es um die Beurteilung deren biologischer Eigenschaften geht.

2. Fragestellung und Ziel der Untersuchung

Da Wurzelkanalsealer potentiell mit dem periradikulären Gewebe in Kontakt kommen können und so auf dieses Einfluss nehmen können, spielt deren Biokompatibilität eine wichtige Rolle. Diese soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Der Goldstandard der Wurzelkanalsealer in der Zahnmedizin ist derzeit das Material AH plus (Dentsply DeTrey GmbH). In den letzten Jahren sind allerdings viele neue Sealmaterialien auf den Markt gekommen, welche anderen Materialgruppen angehören und sich somit in der Zusammensetzung vollkommen von AH plus unterscheiden. Um sich ein Bild über deren biologische Eigenschaften zu verschaffen und festzustellen, ob die neueren Materialien in dieser Hinsicht Vorteile gegenüber AH plus zeigen, sollen diese mit dem Goldstandard AH plus verglichen werden.

Teil dieser Untersuchung sind neben dem epoxidharzbasierenden Sealer AH plus das silikonbasierende Material roeko GuttaFlow bioseal (Coltène) sowie die calciumsilikatbasierenden Materialien BioRoot RCS (Septodont) und TotalFill BC (FKG Dentaire).

Zur Beurteilung der Zytotoxizität der Sealer Materialien soll ein WST-8-Assay durchgeführt werden. Ob die Sealer Apoptose und Nekrose auslösen können soll ein Annexin-V-Assay zeigen. Der Einfluss der Materialien auf eine Entzündungsreaktion soll mit Hilfe eines ELISAs auf IL-6 und eines EIAs auf PGE₂ untersucht werden.

Die Herstellerangaben und auch die aktuelle Studienlage schreiben den neuen Materialien sehr gute biologische Eigenschaften zu. Diese Arbeit soll dazu dienen die Materialien auf ihre biologischen Eigenschaften zu untersuchen und miteinander zu vergleichen.

3. Material und Methode

3.1. Methoden in der Zellkultur

3.1.1. Zellarten

Für die Versuche wurden Zellarten ausgewählt, welche potentiell mit einem Sealer in Kontakt kommen könnten. Um den Bedingungen im menschlichen Körper möglichst nahe zu kommen, handelte es sich bei den verwendeten Zellen ausschließlich um humane Zellen. Es wurden humane Fibroblasten des parodontalen Ligaments (hPDLF) der Firma Lonza (Basel, Schweiz) und humane Osteoblasten (hOB) der Firma Promocell (Heidelberg, Deutschland) verwendet. Die Fibroblasten wurden aus dem parodontalen Ligament von Molaren gewonnen, also dem Gewebe, welches die Zähne mit dem Kieferknochen verbindet. Tests der hPDLF auf Mykoplasmen, Bakterien, Hefen und Pilze waren negativ. Desweiteren wurde bei keinem der Spender HIV, Hepatitis B oder C nachgewiesen. Die Osteoblasten (hOB) stammen aus femoralem trabekulärem Knochengewebe aus der Knie- oder Hüftgelenkregion. Fotografien der Zellen unter dem Lichtmikroskop finden sich in Abbildung 6 und 7.



Abbildung 6: Fotografie der hPDLF durch das Lichtmikroskop

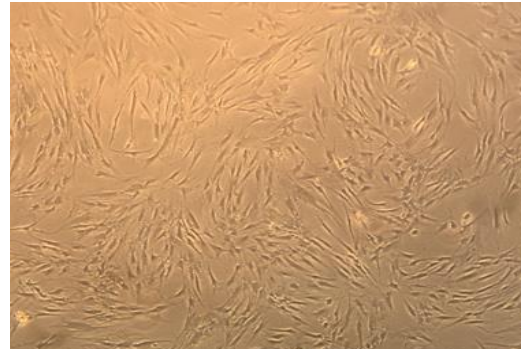


Abbildung 7: Fotografie der hOB durch das Lichtmikroskop

Die verwendeten Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich) in einem auf die jeweilige Zellart abgestimmten Zellkulturmedium kultiviert und bei 37°C, 5% CO₂-Atmosphäre und 100% Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator (HeraCell 150i, CO₂ Inkubator, Thermo Fisher Scientific) inkubiert. Die humanen Fibroblasten wurden in alpha-MEM-Medium (gibco, life technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) kultiviert,

dem 10% fetales Kälber Serum (FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) sowie 100 U/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin (Sigma-Aldrich) zugesetzt wurden. Für die humanen Osteoblasten wurde ein Medium speziell für Osteoblasten verwendet (Osteoblast Growth Medium, PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland), welchem FBS und Antibiotika in den selben Mengen und Konzentrationen, wie dem Fibroblasten-Medium zugesetzt wurde.

3.1.2. Auftauen der Zellen und Mediumwechsel

Die Zellen wurden in einem Stickstoffbehälter (Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten) bei -196°C gelagert und bei Bedarf aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden sie zusammen mit 19 ml Medium in eine Zellkultur Flasche pipettiert. Das Zellkulturmedium wurde alle 3 Tage abgesaugt und durch Neues ersetzt, um die Zellen mit ausreichend Nährstoffen zu versorgen und ideales Wachstum und Vermehrung zu gewährleisten.

3.1.3. Splitten

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellen handelte es sich um adhärenente Zellen, welche auf dem Boden der Zellkulturflasche wachsen. Da sie dem Prinzip der Kontaktinhibition unterliegen, vermehren sich die Zellen nicht mehr, wenn die Fläche, auf der sie wachsen zu dicht besiedelt ist. Deshalb war es nötig die Zellen regelmäßig unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 40 C, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) zu beobachten und sie bei einer Bedeckung des Flaschenbodens von circa 80% zu splitten, also die Zellen einer Flasche auf mehrere Flaschen aufzuteilen, um ihnen wieder genügend Platz für Wachstum und Vermehrung gewährleisten zu können.

Um die Zellen zu passagieren wurde zunächst das Zellkulturmedium abgesaugt und anschließend die Flasche mit 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, pH = 7,4, Sigma-Aldrich) gewaschen, um Rückstände des Zellkulturmediums zu entfernen, da das darin enthaltene FBS die Wirkung des Trypsins, welches im nächsten Schritt zur Ablösung der Zellen vom Flaschenboden verwendet wurde, herabsetzen kann. Das Trypsin wurde in Form einer Trypsin-EDTA Lösung (0,25% Trypsin, 0,02% EDTA, Sigma-Aldrich) verwendet, wovon 2 ml auf die Zellen pipettiert wurde. Die Flasche wurde dann

für circa zwei Minuten inkubiert, da das Trypsin bei 37°C die beste enzymatische Wirkung zeigt. Die Ablösung der Zellen wurde optisch unter dem Mikroskop kontrolliert und bei vollständiger Ablösung der Zellen wurde die Reaktion gestoppt, indem die in der Trypsinlösung befindlichen Zellen in ein vorher mit 2,5 ml Zellkulturmedium befülltes Zentrifugenröhrchen pipettiert wurden. Dann wurden die Röhrchen 5 Minuten lang zentrifugiert (bei 22°C, 300 g, Allegra X-15R, Beckman Coulter, Life Sciences, Brea, CA, USA), sodass sich unten im Röhrchen die Zellen in Form eines Pellets ansammelten und sich oben der flüssige Überstand befand, welcher abgesaugt werden konnte. Nach dem Absaugen wurde das Pellet in dem der Zellart entsprechenden Zellkulturmedium gelöst. In den neuen Flaschen wurden jeweils zu 19 ml Medium 1 ml Zellsuspension gegeben, weshalb die Menge an Medium, in der das Pellet gelöst wurde, von der Zahl der Flaschen, auf die die Zellen aufgeteilt werden sollten, abhängig war.

3.1.4. Zählen der Zellen

Für einige Versuche war vorab eine genaue Zählung der Zellen notwendig, welche mit Hilfe des Gerätes Cedex XS (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) durchgeführt werden konnte. Die Zellen wurden, wie oben beim Splitten beschrieben, mit Trypsin vom Boden der Flasche abgelöst und durch Zentrifugieren in ein Zellpellet und einen flüssigen Überstand getrennt. Nach dem Absaugen des Überstandes wurden das Pellet in 1 ml Zellkulturmedium gelöst und aus dieser Lösung zwei Stichproben von jeweils 10 µl entnommen. Diese wurden in zum Gerät gehörige spezielle Zählplatten gegeben, dort in ihrer jeweiligen Zählkammer mit 10 µl Trypanblau (Trypan Blue Stain 0,4%, Gibco, life sciences) gemischt und in das Gerät eingelesen. Trypanblau kann nur die Zellmembran geschädigter Zellen passieren. Dies ermöglicht zusätzlich zur Bestimmung der Zellzahl auch die Ermittlung des prozentualen Anteils lebender Zellen.

3.2. Sealereluat

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Proben wurden im Vorfeld aus den zu untersuchenden Sealmaterialien hergestellt. Verwendet wurden die Sealer AH plus (AH+), roeko GuttaFlow bioseal (GF) sowie BioRoot RCS (BR) und TotalFill BC (TF) (Tabelle 2). Falls notwendig wurden die Sealer nach Herstellerangaben angemischt und in selbst hergestellte Silikonförmchen (Optosil Comfort Putty, Kulzer, Hanau, Deutschland) mit einheitlicher Dicke und Durchmesser gefüllt (Durchmesser: 1 cm, Dicke: 2 mm). Die mit Sealer gefüllten Förmchen wurden dann bei 37°C und 100% relativer Luftfeuchtigkeit zum Trocknen inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Sealerplättchen aus dem Silikon entformt und jeweils in ein Well einer 6 Well Platte gegeben, wo sie mit 4 ml Zellkulturmedium bedeckt wurden. Die Platten wurden entweder 24 Stunden oder 7 Tage inkubiert (37°C, 5% CO₂, 100% relative Luftfeuchtigkeit). Nach dieser Zeit wurde die Flüssigkeit aus den jeweiligen Wells mit einer Einweg Spritze aufgenommen und durch einen Spritzenfortsatzfilter (Porengröße 0,25 µm, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt. Die Eppendorfgefäße mit den Sealereluaten wurden bis zur Verwendung bei - 20°C eingefroren.

Sealer	Hersteller	LOT-Nummer
AH plus (AH+)	Dentsply DeTrey GmbH	<ul style="list-style-type: none">• 1711001109• 1803000909• 1906000879
GuttaFlow (GF)	Coltène	<ul style="list-style-type: none">• K17827• K08416• I67554• I67555
BioRoot RCS (BR)	Septodont	<ul style="list-style-type: none">• B17312• B25783• B20650
TotalFill BC (TF)	FKG Dentaire	<ul style="list-style-type: none">• 20001SP• 17004SP

Tabelle 2: verwendete Sealer mit LOT-Nummern

3.3. Versuchsaufbau und Nachweisverfahren

3.3.1. Versuchsbedingungen

Alle folgenden Versuche wurden dreimal in voneinander unabhängigen Durchläufen durchgeführt. Es wurden immer sowohl 24 h als auch 7 d lang eluierte Sealerproben untersucht. Die verwendeten Zellen waren jeweils hPDLF und hOB.

3.3.2. WST-8-Assay

Zur Bestimmung der Zytotoxizität der verschiedenen Sealereluate wurde ein WST-8-Assay mit dem Colometric Cell Viability Kit I (CCVK I) von PromoCell (Heidelberg, Deutschland) durchgeführt, welches ein photometrisches Verfahren zur Bestimmung der Zellviabilität in einer Zelllösung darstellt. Der Test beruht auf einer Reduktionsreaktion, bei der das im CCVK I enthaltene gelbliche Tetrazoliumsalz WST- 8 in Anwesenheit des Elektronentransporters 1-Methoxy PMS (1- Methoxy-5-methylphenazinium-methyl-sulfat) zum orangefarbenen Formazan reduziert wird. Die Reaktion kann nur in Anwesenheit von Dehydrogenasen ablaufen, die in lebenden Zellen mit funktionierender Atmungskette enthalten sind. Der Formazangehalt nach Ablauf der Reaktion, welcher photometrisch gemessen werden kann, ist also proportional zur Anzahl der lebenden Zellen. Die Reaktion ist in Abb. 8 graphisch dargestellt.

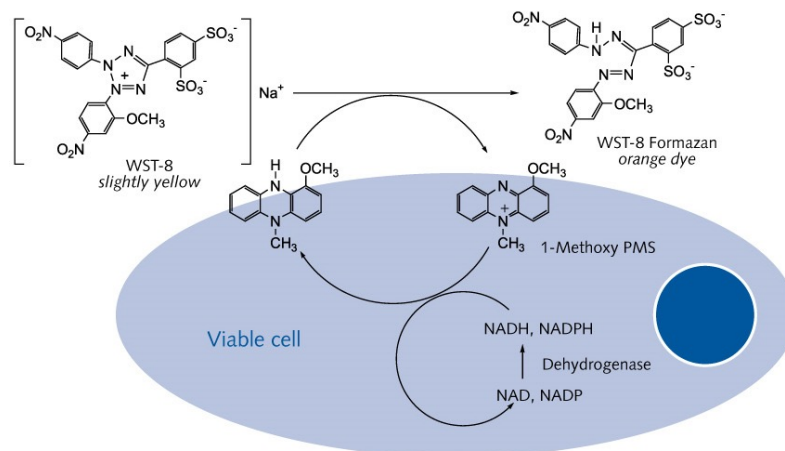


Abbildung 8: WST-8 Umsetzung zu WST-8-Formazan (Promokine, Heidelberg, Deutschland)

Für den Versuch wurden die Zellen, wie oben beschrieben, ausgezählt und mit Zellkulturmedium auf die gewünschte Konzentration von 50.000 Zellen pro ml verdünnt. Von dieser Zelllösung wurden jeweils 100 µl in jede verwendete Öffnung einer 96-Well-Platte pipettiert und über Nacht inkubiert.

Im darauffolgenden Schritt wurde das Zellkulturmedium mit einer Glaspipette abgesaugt und 100 µl der Sealereluate jeweils pur und im Verhältnis 1:1 sowie 1:5 mit Medium verdünnt zu den Zellen in der 96-Well-Platte pipettiert. Als Negativprobe wurde Zellkulturmedium und als Positivprobe das zellschädigende Triton X-100 1% (4- (1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylenglykol, Sigma Aldrich) verwendet. Um einen Blankwert zu erhalten, der die Interaktion zwischen Zellkulturmedium und WST-8-Assay-Reagenz messen soll, wurden auch Wells, in denen keine Zellen ausgesäht wurden, mit Medium befüllt.

Nach der erneuten Inkubation über Nacht wurden alle Proben mit einer Glaspipette abgesaugt und durch jeweils 10 µl WST-8 Flüssigkeit und 90 µl Zellkulturmedium ersetzt. Nach zwei, sowie nach vier Stunden Inkubationszeit wurde die Extinktion der Proben bei einer Wellenlänge von 450 nm in einem Photometer (Varioskan, Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland) gemessen. Der Blankwert wurde von allen anderen Werten abgezogen. Durch das Verhältnis der optischen Dichte der Positivprobe zur optischen Dichte der Proben konnte die prozentuale Überlebensrate der Zellen berechnet werden.

Abbildung 9 zeigt eine 96-Well-Platte nach abgelaufener Farbreaktion.

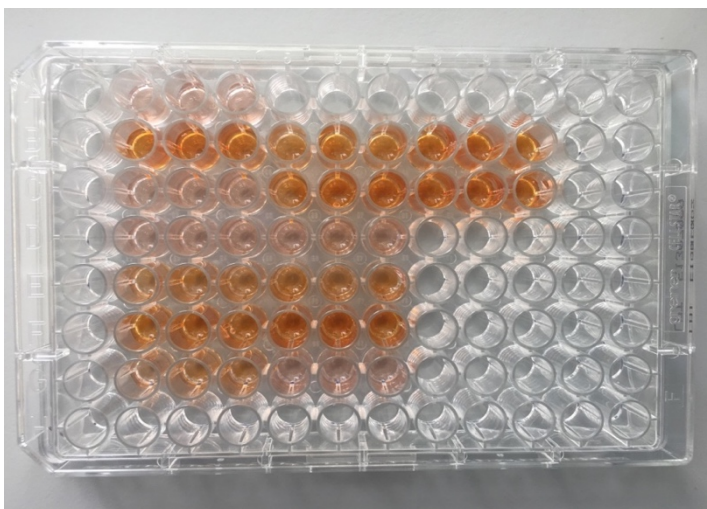


Abbildung 9: 96-Well-Platte nach abgelaufener Farbreaktion

3.3.3. Annexin-V-Assay

Zur Bestimmung der Apoptose- und Nekroseraten durch die Sealer wurde das RealTime-Glo Annexin V Apoptose und Nekrose Assay (Promega, Madison, Wisconsin, USA) verwendet. Die Ermittlung apoptotischer Zellen erfolgte über die Exposition von Phosphatidylserin (PS) auf dem äußeren Blatt der Zellmembran während der Apoptose einer Zelle. Das Nachweisreagenz enthielt nahezu äquimolare Verhältnisse der zwei Annexin-V-Fusionsproteinen (Annexin-V-LgBiT und Annexin-V-SmBiT), die komplementäre Untereinheiten der NanoBiT® Luciferase enthalten. Da die Annexin-V-LgBiT- und Annexin-V-SmBiT-Luciferase-Untereinheiten nur eine geringe Affinität zueinander haben, bleibt die Lumineszenz gering, bis apoptotische Zellen PS exprimieren und dadurch die Untereinheiten in komplementäre Nähe zueinander gebracht werden. Die Annexin-V-Bindung kann dann mit einem einfachen Lumineszenzsignal nachgewiesen werden.

Das Kit enthält außerdem einen die Zelle nicht durchdringenden, profluoreszierenden DNA-Farbstoff. Dieser kann nur bei nekrotischen Zellen, deren Zellmembran permeabel ist, in die Zelle eindringen und so über ein Fluoreszenzsignal Nekrose nachweisen. Nachfolgende Abbildung (Abb. 10) stellt schematisch das Prinzip des Assays dar.

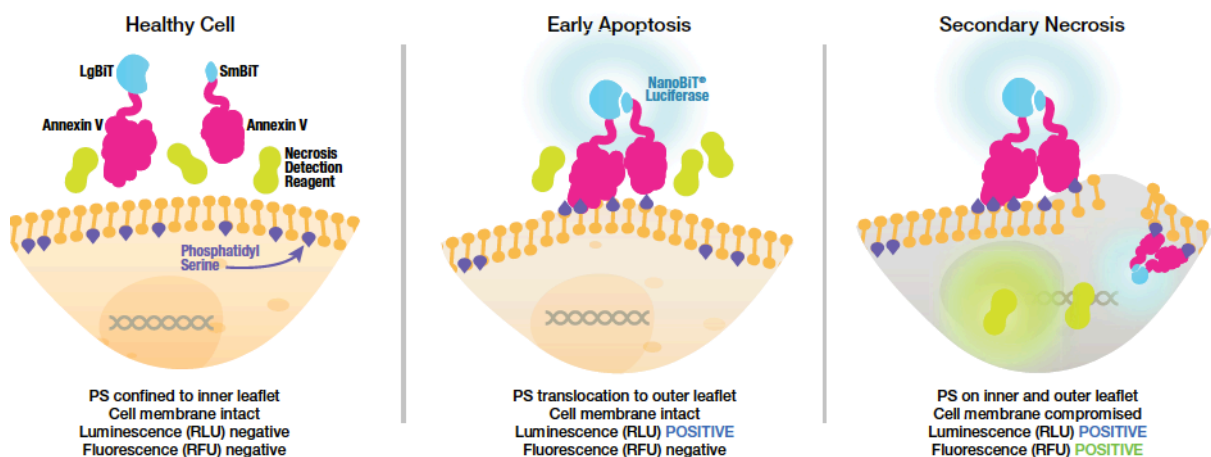


Abbildung 10: Grundprinzip des Realtime-Glo-Annexin-V-Assays (Promega)

Für den Versuch wurden die Zellen gezählt und eine Zelllösung von 50 Zellen pro Milliliter hergestellt. Davon wurden 200 µl in jedes verwendete Well einer 96

Well Platte pipettiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100 µl der Sealereluat sowie Staurosporin (1µM, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) als Positivprobe hinzugegeben. Die Proben wurden sowohl pur als auch mit Zellkulturmedium im Verhältnis 1:1 und 1:5 verdünnt verwendet. Für den Blankwert wurde auf die jeweilige Zellart abgestimmtes Medium verwendet. Der Blankwert erfasst Interaktionen zwischen Assay und Medium und wurde am Ende von allen anderen Werten abgezogen, um Hintergrundaktivitäten zu eliminieren. Daraufhin wurden 100 µl des nach Herstellerangaben gemischten Detection 2X Reagenz in jedes Well pipettiert und sowohl Lumineszenz (GloMax Navigator, Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA) als auch Fluoreszenz (485nm_{Ex}/525–530nm_{Em}, Varioscan, Thermo Electron) nach 1, 4 und 24 Stunden gemessen.

3.3.4. ELISA zur Bestimmung der Interleukin-6-Konzentration

Für den ELISA auf IL-6 wurden Zellen einer ca. 80% bewachsenen Zellkulturflasche wie beim Splitten abgelöst und anschließend in 12 ml des zur jeweiligen Zellart gehörenden Zellkulturmediums gelöst. Von dieser Zelllösung wurde jeweils 1 ml in jedes verwendete Well einer 12-Well-Platte ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und in jedes Well 1 ml der Sealereluat pipettiert. Als Positivprobe dienten 2 µl TNF-α der Konzentration 20 ng/ml (Sigma-Aldrich) in einem Milliliter Medium, als Negativprobe 1 ml reines Zellkulturmedium. Die 12-Well-Platte wurde dann genau 24 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand in den Wells abpipettiert und bei - 20 °C eingefroren.

Der IL-6 Gehalt dieser Überstände sollte dann mit Hilfe des human IL-6 Quantikine-Elisa Kits (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, Vereinigte Staaten) bestimmt werden. Dafür wurden die Überstände im Verhältnis 1:20 verdünnt. Es handelte sich um einen nicht kompetitives Sandwich ELISA, wobei ELISA für „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ steht.

Zu Beginn des Versuchs wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, bei der 6 Standards mit bekannter IL-6 Konzentration entstanden, aus denen später einer Standardkurve gebildet werden konnte. Aus dieser Kurve konnten die gesuchten IL-6 Konzentrationen der Sealerproben berechnet werden.

In eine Mikrotiterplatte, die mit einem für IL-6 spezifischen monoklonalen Antikörper beschichtet war, wurden zunächst 100 µl der Assay-Lösung RD1W pipettiert, dann 100 µl der Standards und der Überstände. Die Platte wurde luftdicht verschlossen inkubiert. Das IL-6 in den Proben band dabei an die Antikörper auf der Mikrotiterplatte. Nach zwei Stunden Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Proben abgesaugt und die Platte 4 Mal mit 400 µl Waschpuffer pro Well gewaschen. Nach jedem Waschvorgang wurde die Platte komplett entleert und an einem sauberen Tuch abgetupft. Dieser Schritt ist wichtig, um ein falsch positives Ergebnis durch nicht gebundenes Antigen zu vermeiden.

Danach wurden 200 µl einer im Assay als Conjugate Solution bezeichneten Lösung hinzugegeben, die einen sekundären Antikörper, an den ein Enzym gekoppelt ist, enthält. Der sekundäre Antikörper band an das IL-6, das im ersten Schritt gebunden wurde.

Nach zwei weiteren Stunden Inkubationszeit, in denen die Platte wieder luftdicht verschlossen werden musste und vier weiteren Waschvorgängen der Platte wurden 200 µl Substrate Solution in jedes Well pipettiert. Die Substrate Solution besteht aus Colour Reagent A, das stabilisiertes Wasserstoffperoxid enthält und Colour Reagent B, das das Chromogen Tetramethylbenzidin (TMB) enthält. Das TMB wurde durch das Enzym, am sekundären Antikörper, bei dem es sich um eine Peroxidase handelt aktiviert und erschien zunächst blau. Nach einer 20-minütigen, lichtgeschützten Inkubationszeit wurden 50 µl der im Kit enthaltenen Stopsolution, welche Schwefelsäure enthält, zugegeben. Die Schwefelsäure bewirkte einen Farbumschlag von blau zu gelb (Abb. 12). Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm und 540 nm gemessen (Varioscan, Thermo Electron), wobei der Wert bei 540 nm im Rahmen einer Wellenlängenkorrektur vom Wert bei 450 nm abgezogen wurde. Es konnte eine Standardkurve erstellt werden (Abbildung 11), aus der die gesuchten IL-6 Konzentrationen der Proben abgelesen werden konnten.

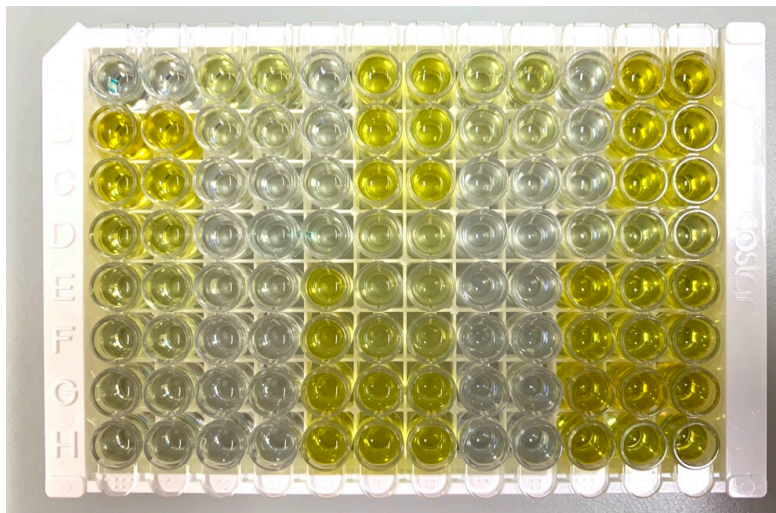


Abbildung 11: Mikrotiterplatte nach abgelaufener Farbreaktion

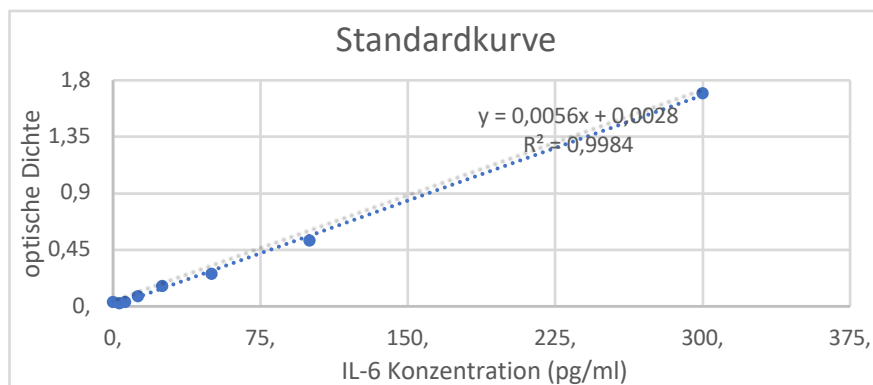


Abbildung 12: Standardkurve ELISA IL-6

3.3.5. EIA zur Bestimmung der PGE₂-Konzentration

Zur Bestimmung der PGE₂-Konzentration in den Sealerproben wurde das PGE₂ high sensitivity ELISA kit (Enzo life Sciences, Lörrach, Deutschland) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein kompetitives Immunassay. Das PGE₂ in den Proben und Standards konkurriert mit dem enzymmarkierten (alkalische Phosphatase) PGE₂ der im Kit enthaltenen Konjugatlösung um PGE₂-spezifische Bindungsstellen in einer Antikörperlösung. Dabei entstehen Komplexe, welche an eine mit Ziegen-Anti-Maus-IgG-Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte binden. Die Zugabe der im Kit enthaltenen Substratlösung führt zu einem Farbumschlag auf gelb, da das p-Nitrophenyl-Phosphat aus der Substratlösung mit der alkalischen Phosphatase zum gelben p-Nitrophenol reagiert. Die

Intensität der gelben Farbe kann mit Hilfe eines Photometers bestimmt werden und ist indirekt proportional zur PGE₂ Konzentration in Standards und Proben.

Die im Versuch verwendeten Proben wurden analog zu den Proben für den IL-6 ELISA hergestellt. Vor Gebrauch wurden die Proben im Verhältnis 1:20 mit Zellkulturmedium verdünnt. Es wurden drei voneinander unabhängige Durchläufe des Versuchs durchgeführt.

Für den Assay mussten zunächst die PGE₂-Standards bekannter Konzentrationen mittels Verdünnungsreihe hergestellt werden. Der im Kit enthaltene high Standard mit einer PGE₂-Konzentration von 50000 pg/ml wurde immer weiter mit Zellkulturmedium verdünnt und so Standards verschiedener Konzentrationen hergestellt (2500 pg/ml, 1250 pg/ml, 625 pg/ml, 313 pg/ml, 156 pg/ml, 78,1 pg/ml, 39,1 pg/ml).

100 µl der Standards und der Proben wurden dann nach vorher angefertigtem Pipettierschema in die Wells der Mikrotiterplatte pipettiert. In das Feld NSB (no significant binding) wurden 100 µl Medium und 50 µl Assay buffer gegeben (gepufferte Kochsalzlösung, die Proteine und Natriumazid als Konservierungsmittel enthält). In das Feld B₀ (Standard mit 0 pg/ml PGE₂-Konzentration) nur 100 µl Medium. Daraufhin wurden 50 µl blue conjugate (alkalische Phosphatase an PGE₂ gebunden) in jedes Feld außer TA (total activity) und blank pipettiert. Zuletzt wurde 50 µl yellow antibody (Monoklonale Antikörper gegen PGE₂) in jedes Well außer blank, TA und NSB gegeben. Zu diesem Zeitpunkt waren alle Wells grün, bis auf NSB welches blau gefärbt war. Blank und TA waren als einzige Felder noch leer. Die Mikrotiterplatte wurde dann luftdicht verschlossen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte ausgeleert und mit 400 µl Wash-buffer insgesamt drei Mal gewaschen. Dann wurde 5 µl blue conjugate in die TA Wells und 200 µl der Para-Nitrophenylphosphat-Lösung (p-Npp-Lösung) in jedes Well der Platte pipettiert. Es folgte eine erneute Inkubation unter luftdichtem Verschluss der Platte, dieses Mal bei 37°C für eine Stunde. Nach der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl Stop-solution (Trinatriumphosphat in Wasser) beendet. Die optische Dichte wurde direkt im Anschluss bei 450 nm mit einer Wellenlängenkorrektur zwischen 570 und 590 nm gemessen (Varioscan, Thermo Electron).

Von den ermittelten Werten wurde jeweils der Blankwert subtrahiert und diese Werte (B) ins Verhältnis zu B_0 gesetzt, um den prozentualen Anteil der gebundenen PGE_2 Moleküle zu ermitteln. Aus den bekannten PGE_2 Konzentrationen der Standards und dem Verhältnis B/B_0 wurde eine Standardkurve erstellt. Über die Funktion der Kurve konnten die unbekanntes PGE_2 Konzentrationen bestimmt werden. In Abbildung 13 ist die Standardkurve dieses Versuchs dargestellt.

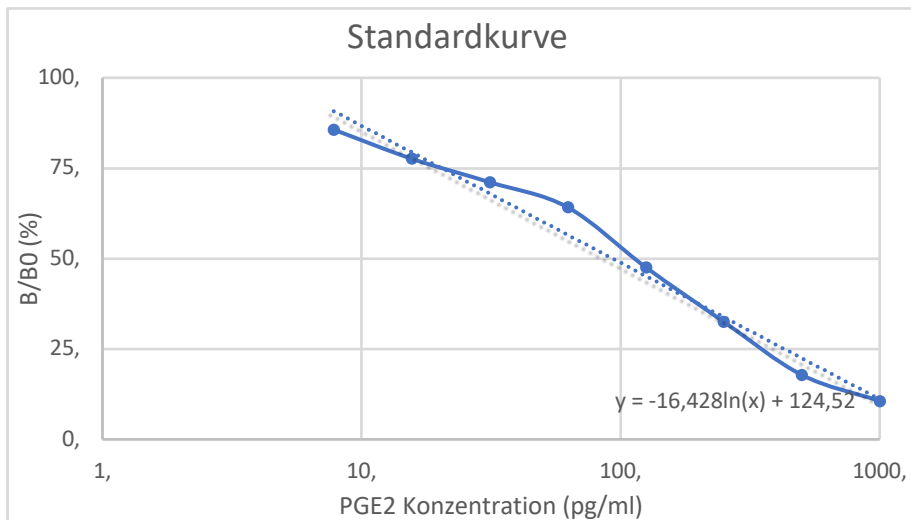


Abbildung 13: Standardkurve EIA PGE_2

3.3.6. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Daten wurde die Software PrismGraphPad (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA) verwendet. Es wurde eine einstufige Varianzanalyse (ANOVA) und zusätzlich der Tukey-Post-Hoc-Test (Tukey multiple comparison) durchgeführt. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Als deskriptive Analyse wurden die Standardabweichungen in den Graphen in Form von Fehlerbalken dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1. Zytotoxizitätsuntersuchung

4.1.1. WST-8-Assay

Folgende Abbildungen (Abb. 14 und 15) zeigen die Zellviabilitäten der mit den Sealereluataten der Sealer AH plus, GuttaFlow bioseal, BioRoot RCS und TotalFill BC inkubierten hPDLF, welche mit Hilfe eines WST-8-Assay bestimmt wurden. Die Proben wurden entweder pur, im Verhältnis 1:1 oder 1:5 mit Zellkulturmedium verdünnt verwendet. Es wurden die Lumineszenzmessungen 2 h nach Beendigung des Assays berücksichtigt.

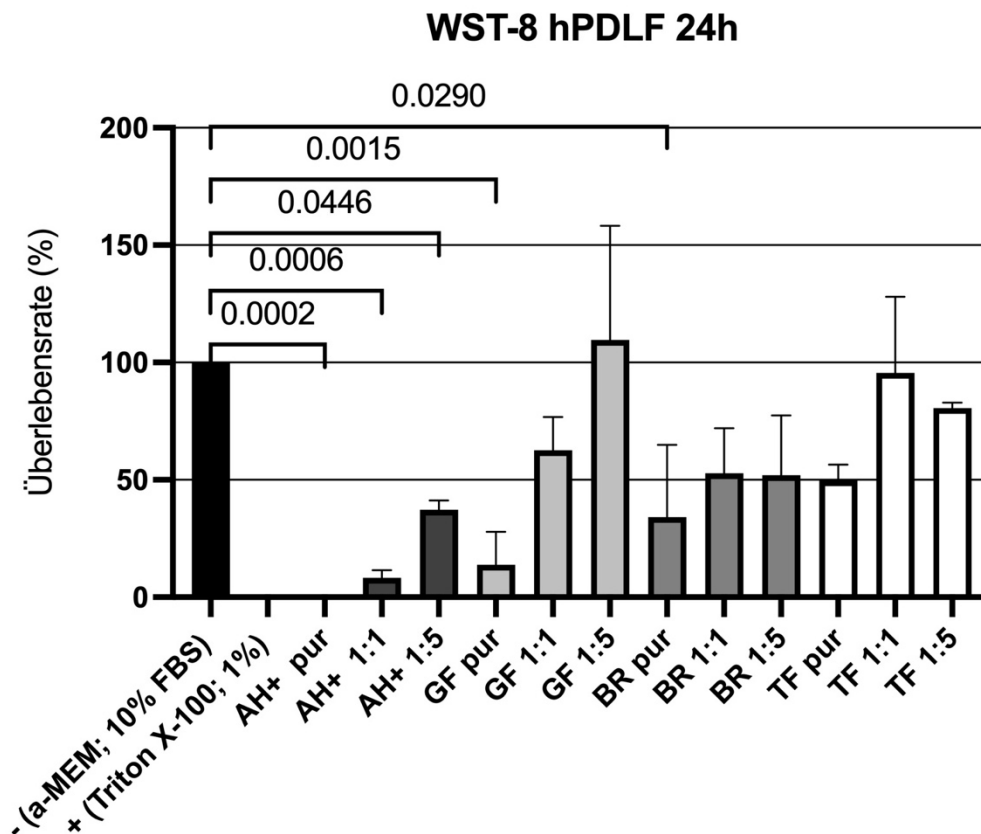


Abbildung 14: Ergebnisse des WST-8-Assays der mit den 24 h eluierten Proben inkubierten hPDLF

Bei den 24 h eluierten Sealerproben (Abb. 14) wies AH+ die größte Zytotoxizität auf. Alle AH+ Proben reduzierten die Zellzahl signifikant im Vergleich zur Negativkontrolle. Pur entsprach die Toxizität von AH+ sogar der Positivprobe. Auch wenn die Zellviabilität mit zunehmender Verdünnung stieg, betrug der Anteil

lebender Zellen dennoch auch bei der Verdünnung im Verhältnis 1:5 nur 37,29%. GF pur und TF pur zeigten im Vergleich zur Negativprobe ebenfalls eine signifikant verminderte Zellviabilität. TF zeigte die höchste Viabilität der hPDLF im unverdünnten Zustand.

Die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der verschiedenen Zellviabilitäten ($p < 0,0001$). Der Tukey-Post-Hoc-Test zeigte signifikante Unterschiede zwischen der Negativkontrolle und den mit AH + pur, AH+ 1:1, AH+ 1:5, GF pur und GF 1:1 inkubierten Zellen, die restlichen Proben unterschieden sich nicht signifikant von der Negativkontrolle.

Bei den 7 Tage lang eingelegten Proben (Abb. 15) zeigten AH+ pur und BR pur die geringsten Zellviabilitäten und ähnelten damit denen des zellschädigenden Triton X, welches als Positivkontrolle verwendet wurde. Auch GF und TF im unverdünnten Zustand zeigten eine signifikant verminderte Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle. Bei allen Proben stieg die Zellviabilität mit zunehmender Verdünnung an. BR 1:5, TF 1:1 und 1:5 ergaben sogar Zellviabilitäten über den 100% der Negativkontrolle.

Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte wieder signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Zellviabilitäten ($p < 0,0001$).

Signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle bei AH+ pur und 1:1, GF pur, BR pur und TF pur konnten durch den Tukey-Post-Hoc Test belegt werden. Die restlichen Proben unterschieden sich nicht signifikant von der Negativkontrolle.

Vergleicht man die 24 Stunden mit den 7 Tage lang eingelegten Proben so finden sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die prozentual überlebenden Zellen.

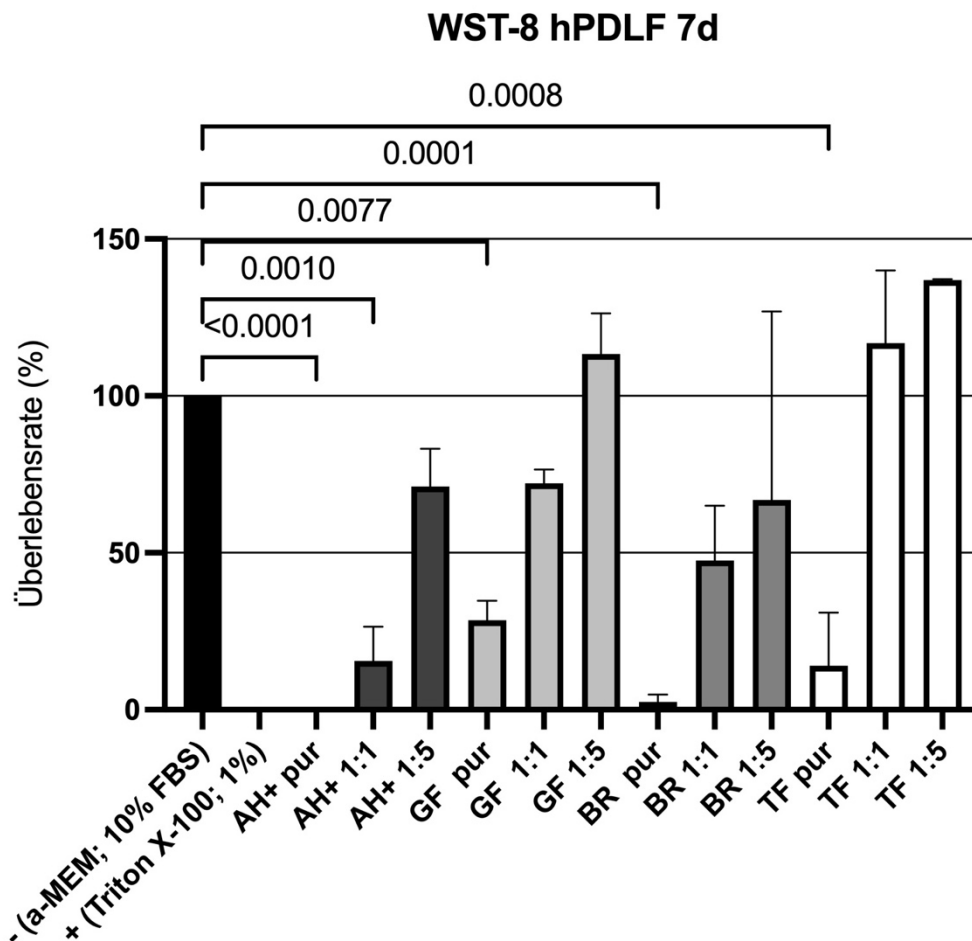


Abbildung 15: Ergebnisse des WST-8-Assays der mit den 7d eluierten Proben inkubierten hPDLF

Es wurde außerdem das zytotoxische Potential der Sealereluate auf humane Osteoblasten getestet. Die Lumineszenz wurde auch hier nach zwei Stunden Inkubationszeit des Assays gemessen.

Bei den 24 h eluierten Proben zeigte AH+ pur die niedrigste Zellviabilität, welche sogar geringer war als die der Positivkontrolle Triton X. Darauf folgten TF, BR und GF pur. Bei allen Proben stieg die Zellviabilität mit zunehmender Verdünnung .

Die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) zeigte sinifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Zellviabilitäten ($p = 0,0027$). Der Post-Hoc-Tukey-Test wies einzig für BR 1:1 verdünnt signifikant höhere Zellviabilitäten auf als für die Positivprobe Triton X (siehe Abbildung 16).

WST-8 hOB 24h

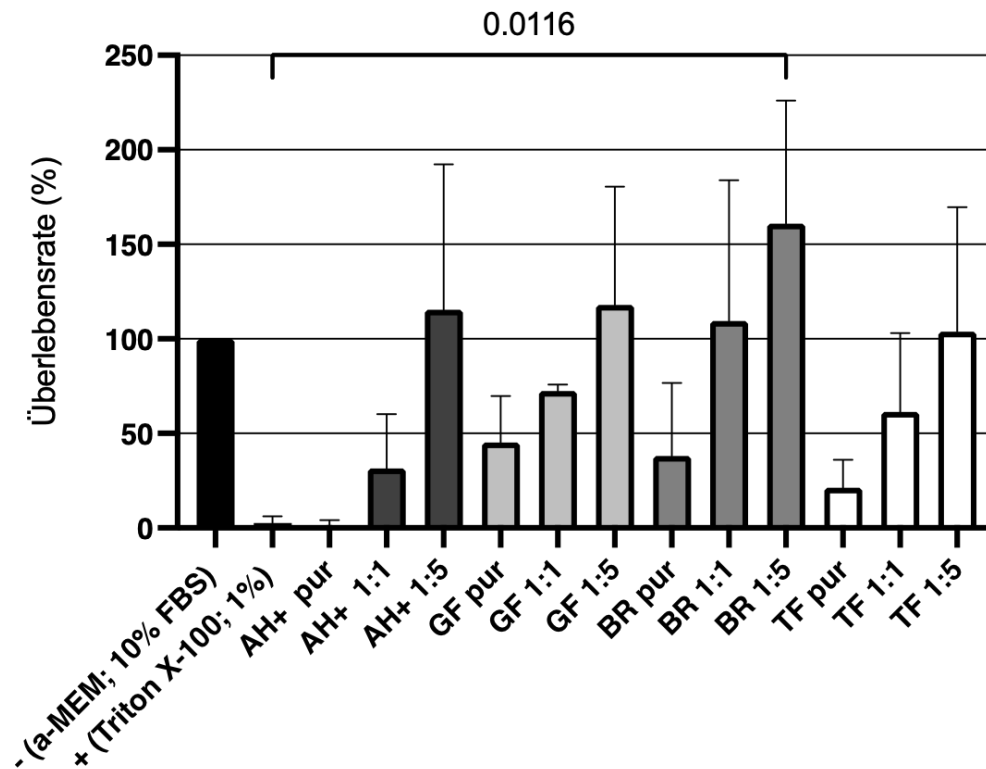


Abbildung 16: Ergebnisse des WST-8-Assays der mit den 24h eluierten Proben inkubierten hOB

Die Ergebnisse für die 7 Tage lang eingelegten Proben sind in Abbildung 17 dargestellt. Auch hier zeigte AH+ wie bei den 24 h eingelegten Proben die geringste Zellviabilität von 1,33%, welche sich signifikant von der Negativprobe unterschied. Ebenso signifikant unter dem Wert der Negativkontrolle befand sich die Zellviabilität der humanen Osteoblasten, die GF pur ausgesetzt waren. BR und TF zeigten keine signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle. Die Signifikanz wurde zunächst mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse analysiert, welche ergab, dass sich die einzelnen Gruppen signifikant unterschieden ($p < 0,0001$). Daraufhin wurde ein Tukey-Post-Hoc-Test durchgeführt, welcher wie oben beschrieben zeigte, dass sich nur AH+ pur, AH+ 1:1 und GF pur signifikant von der Negativkontrolle mit Medium unterschieden. Bei den restlichen Proben war kein signifikanter Unterschied erkennbar.

Zwischen den 24 Stunden und den 7 Tage eluierten Proben konnten mittels Post-Hoc-Tukey-Test keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

WST-8 hOB 7d

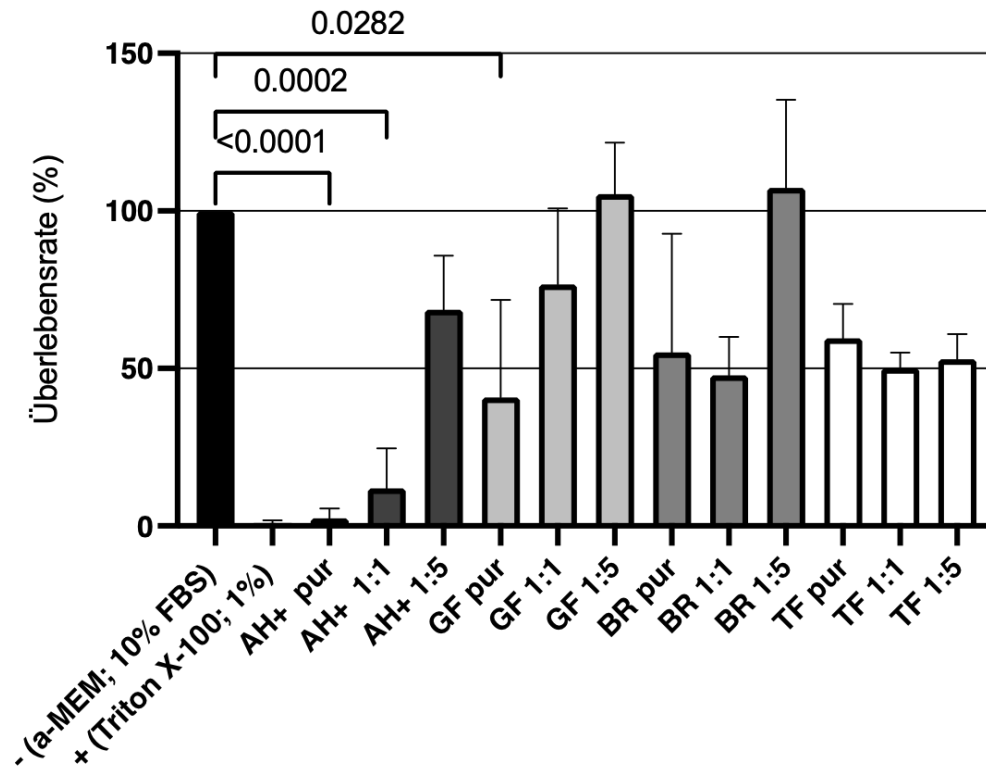


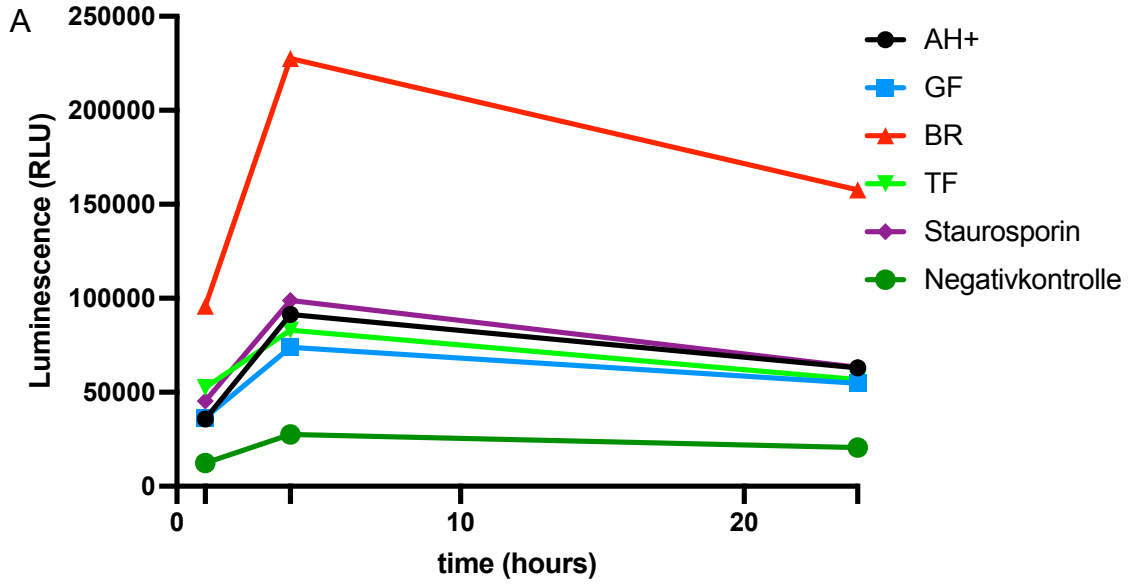
Abbildung 17: Ergebnisse des WST-8-Assays der mit den 7d eluierten Proben inkubierten hOB

4.1.2. Annexin-V-Assay

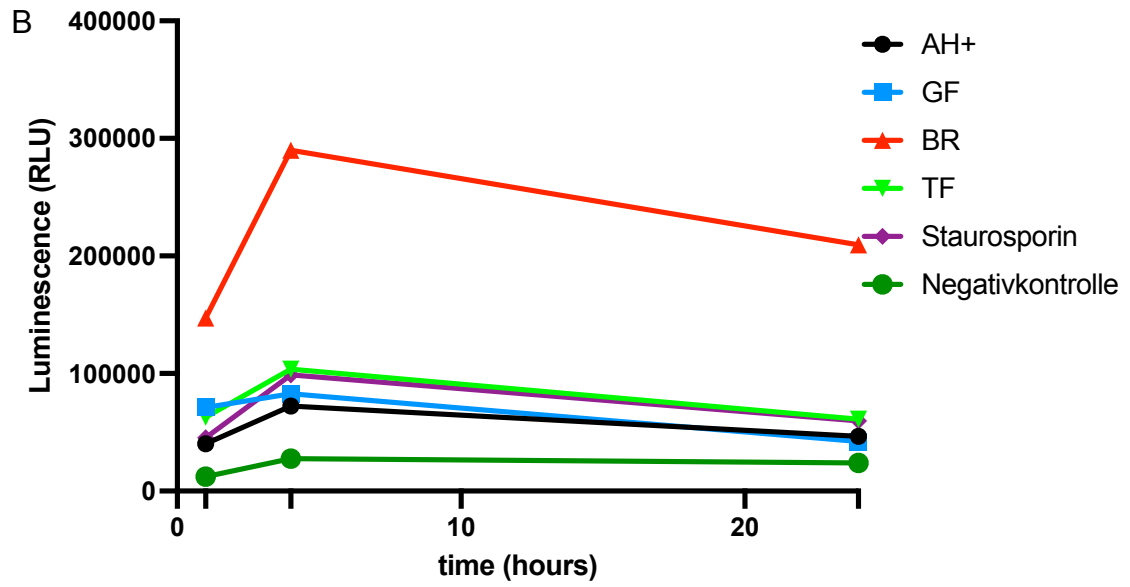
Zur Ermittlung der apoptotischen und nekrotischen Zellen nach Inkubation mit den verschiedenen Sealereluaten wurde ein Annexin-V-Assay durchgeführt. Nach 1, 4 und 24 h wurde jeweils die Lumineszenz und die Fluoreszenz gemessen. Wobei die Lumineszenz Aufschluss über die apoptotischen Zellen und die Fluoreszenz über die nekrotischen Zellen gab.

Abbildung 18 A – D zeigt den zeitlichen Verlauf der Lumineszenz, Abbildung 19 A-D den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenz. Wobei erkennbar ist, dass bei der Lumineszenzmessung die Maximalwerte meist nach 4 h erreicht sind und bis zur Messung nach 24h wieder sinken. Bei der Fluoreszenzmessung hingegen steigen die Werte auch zwischen der 4 und der 24 h Messung noch an.

Lumineszenz hOB 24h



Lumineszenz hOB 7d



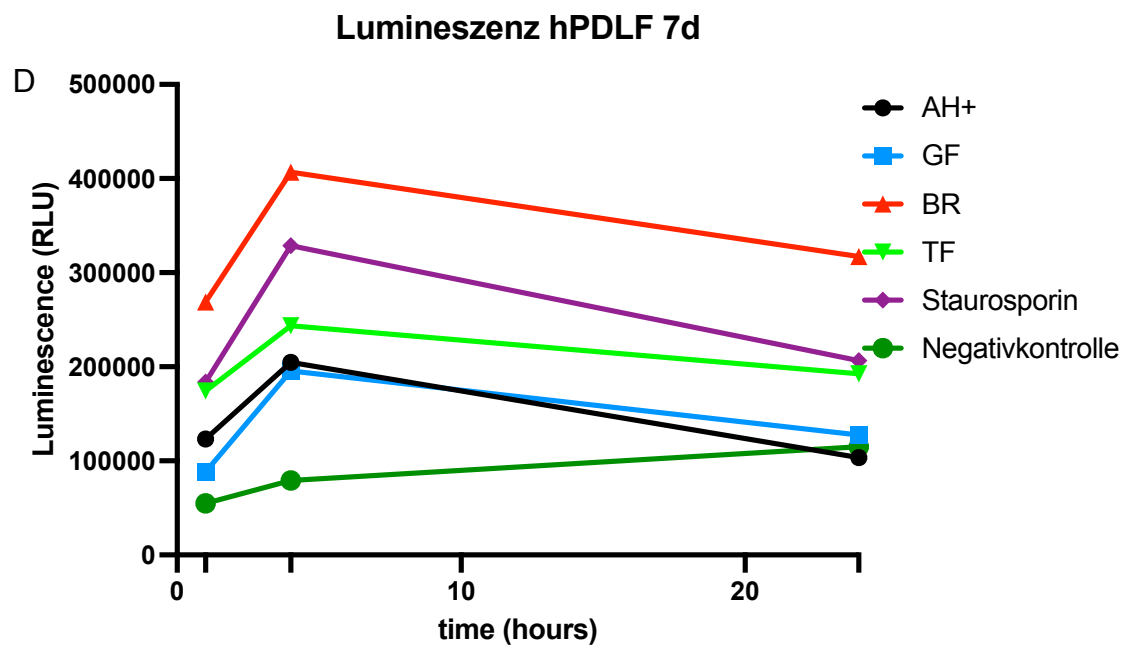
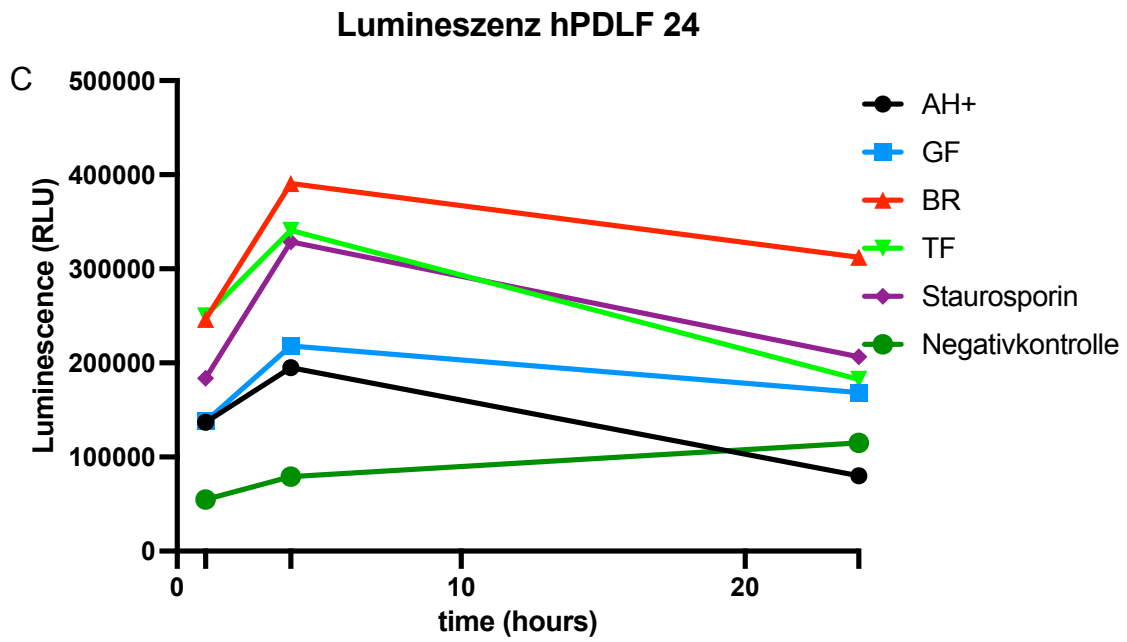
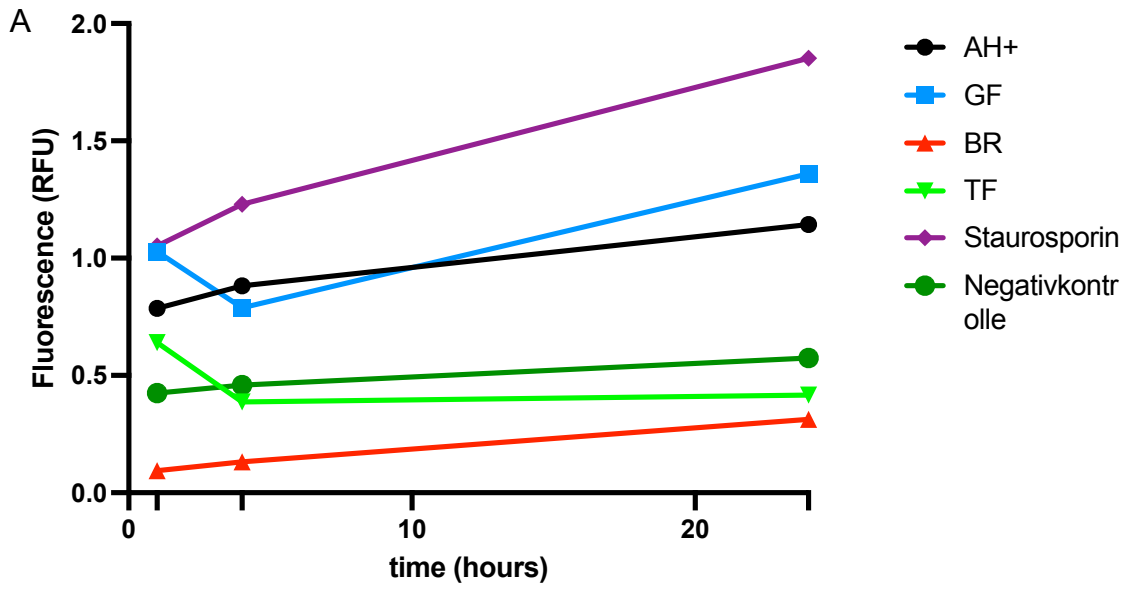
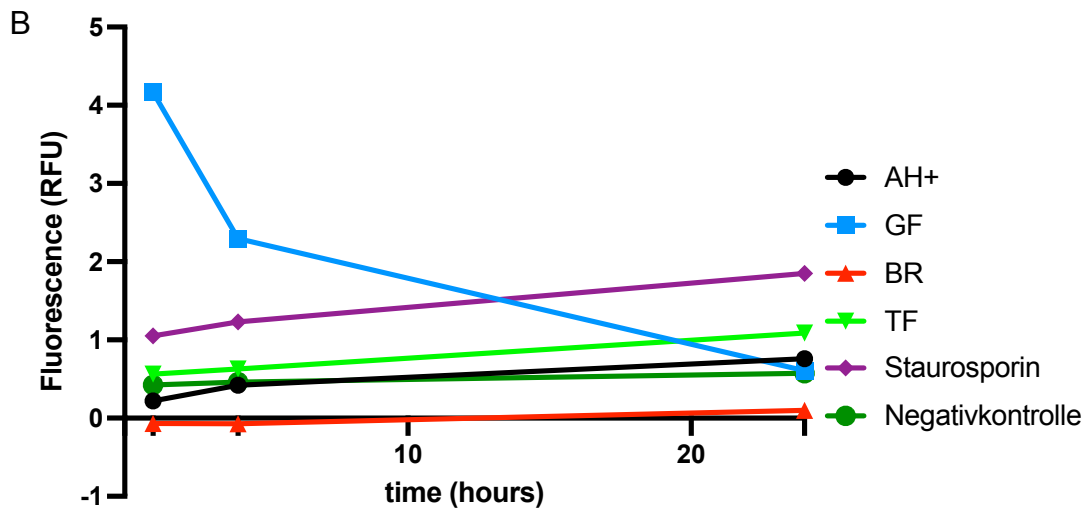


Abbildung 18: Annexin-V-Assay: zeitlicher Verlauf der Lumineszenz angegeben in relative luminescence units (RLU)

Fluoreszenz hOB 24h



Fluoreszenz hOB 7d



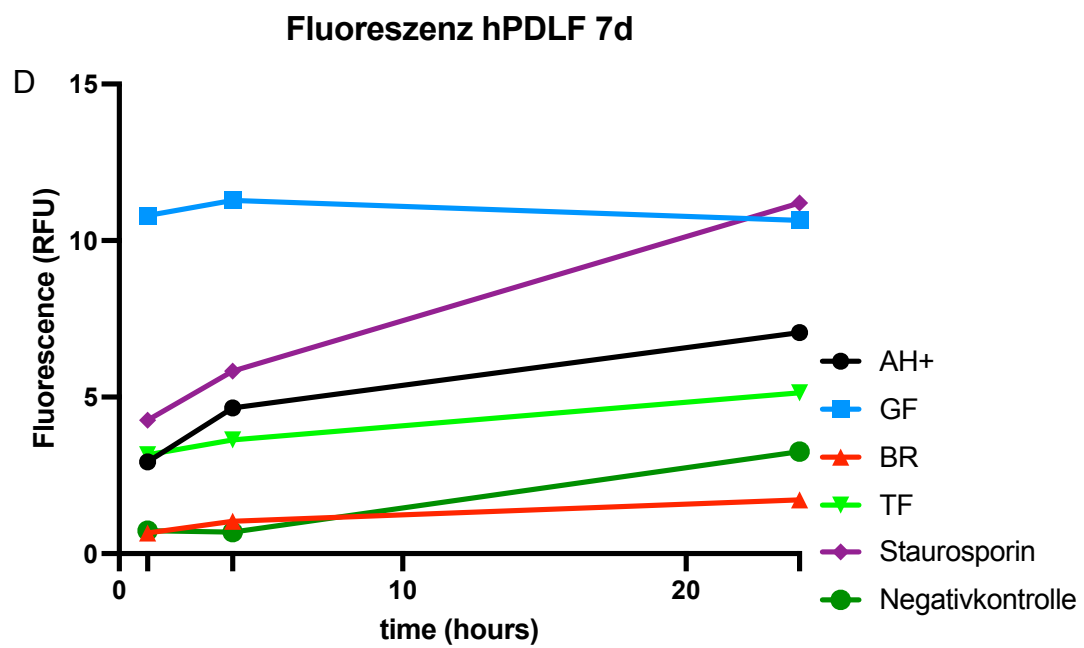
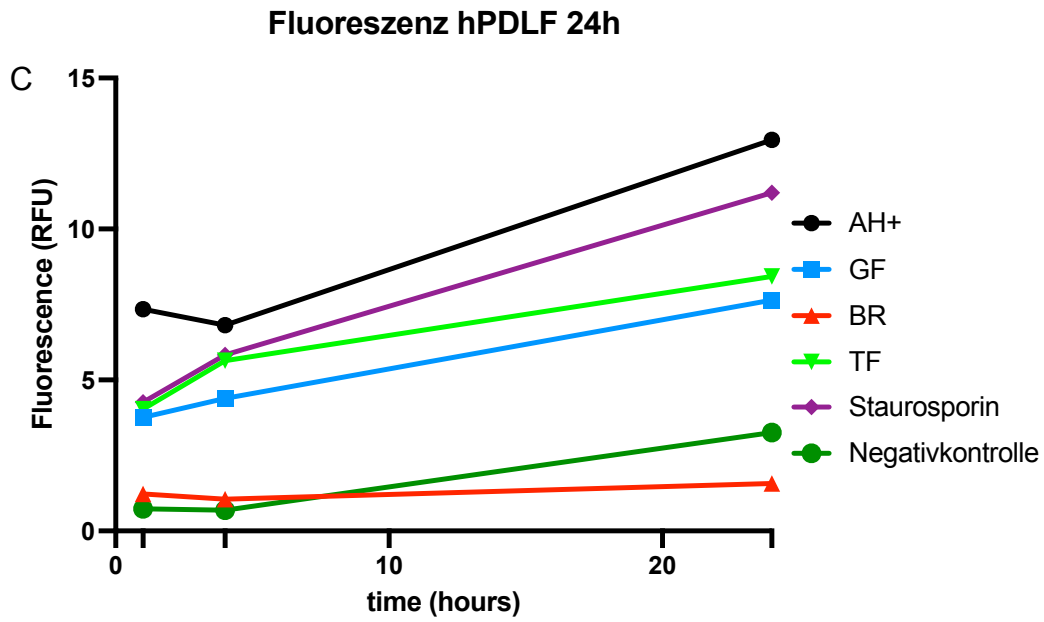


Abbildung 19: Annexin-V-Assay: zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz angegeben in relative fluorescence units (RFU)

Betrachtet man die Lumineszenz (Abb. 20) so erkennt man, dass alle Sealereleuate Lumineszenzsignale erzeugen, welche höher sind als die der Negativkontrolle, teils sogar höher als die der Positivkontrolle (hPDLF: BR 24, BR 7, TF 24 und hOB: BR 24, BR 7).

Die einfaktorielle Varianzanalyse ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen ($p < 0,05$). Allerdings konnten mittels Post-Hoc-Tukey-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Sealereleuten im Vergleich zur Negativkontrolle, aber auch untereinander nachgewiesen werden. Nur das Lumineszenzsignal, das BR 1:1 (hPDLF, 7d Elutionszeit) ergab, unterschied sich signifikant von der Negativkontrolle. Die Elutionszeit führte nicht zu signifikanten Unterschieden der Lumineszenzsignale. Das Lumineszenzsignal, das von den hPDLF emittiert wurde war generell höher als das der hOB.

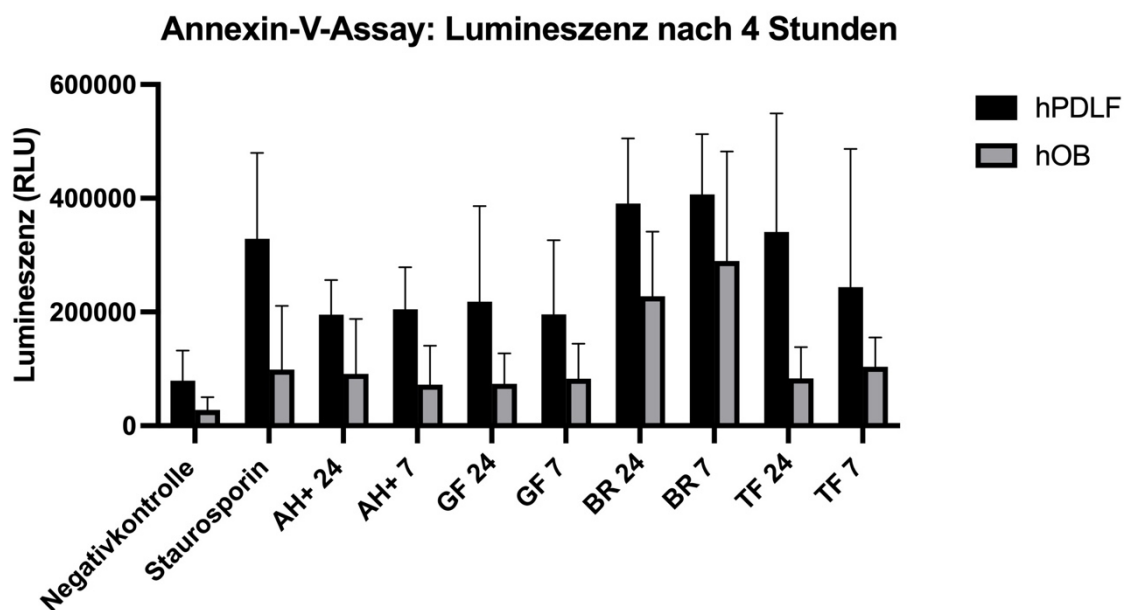


Abbildung 20: Annexin-V-Assay: Ergebnisse der Lumineszenzmessung der hPDLF und hOB

Bei der Fluoreszenz (Abb. 21) lagen die gemessenen Werte ebenfalls über der Negativkontrolle, bis auf BR 7 bei den Osteoblasten, welches geringfügig unterhalb der Negativkontrolle lag. Oberhalb der Positivkontrolle lagen bei den Fibroblasten AH+ 24 und GF 7, bei den Osteoblasten nur GF 7. Die einfaktorielle

Varianzanalyse zeigte signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben. Der Post-Hoc-Tukey Test zeigte lediglich einen signifikanten Unterschied von GF 7 (hPDLF) zur Negativkontrolle. Dies zeigt, dass durch die Inkubation mit GF mehr Zellen nekrotisch wurden, als unter dem Einfluss von Zellkulturmedium. Bei den anderen Proben konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Es machte keinen signifikanten Unterschied, ob die Sealer 24 h oder 7 d eingelegt worden waren.

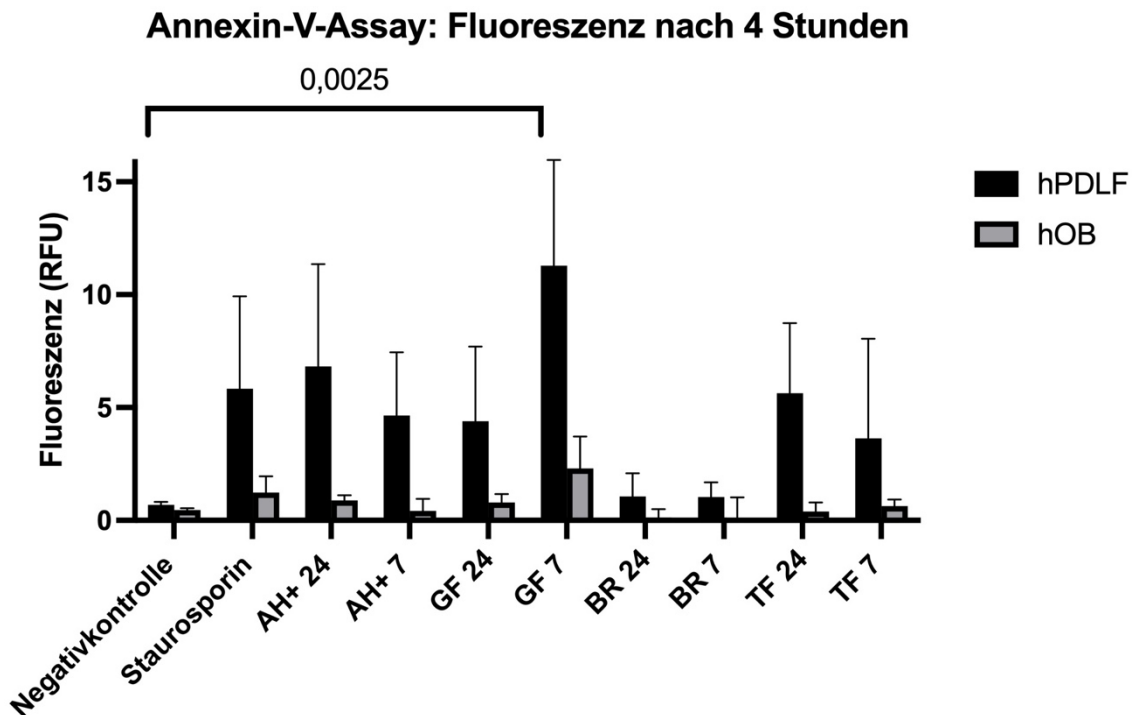


Abbildung 21: Annexin-V-Assay: Ergebnisse der Fluoreszenzmessung der hPDLF und hOB

4.2. Einfluss auf die Entzündungsreaktion

4.2.1. ELISA zur Bestimmung der IL-6 Konzentration

Zur Ermittlung der IL-6 Konzentration nach Inkubation der Zellen mit verschiedenen Sealerelutaten wurde ein ELISA durchgeführt. Die gemessenen IL-6 Konzentrationen sind in Abb. 22 und Abb. 23 dargestellt. Die Abbildungen stellen die Mittelwerte dreier unabhängiger Versuche dar.

ELISA IL-6 hPDLF

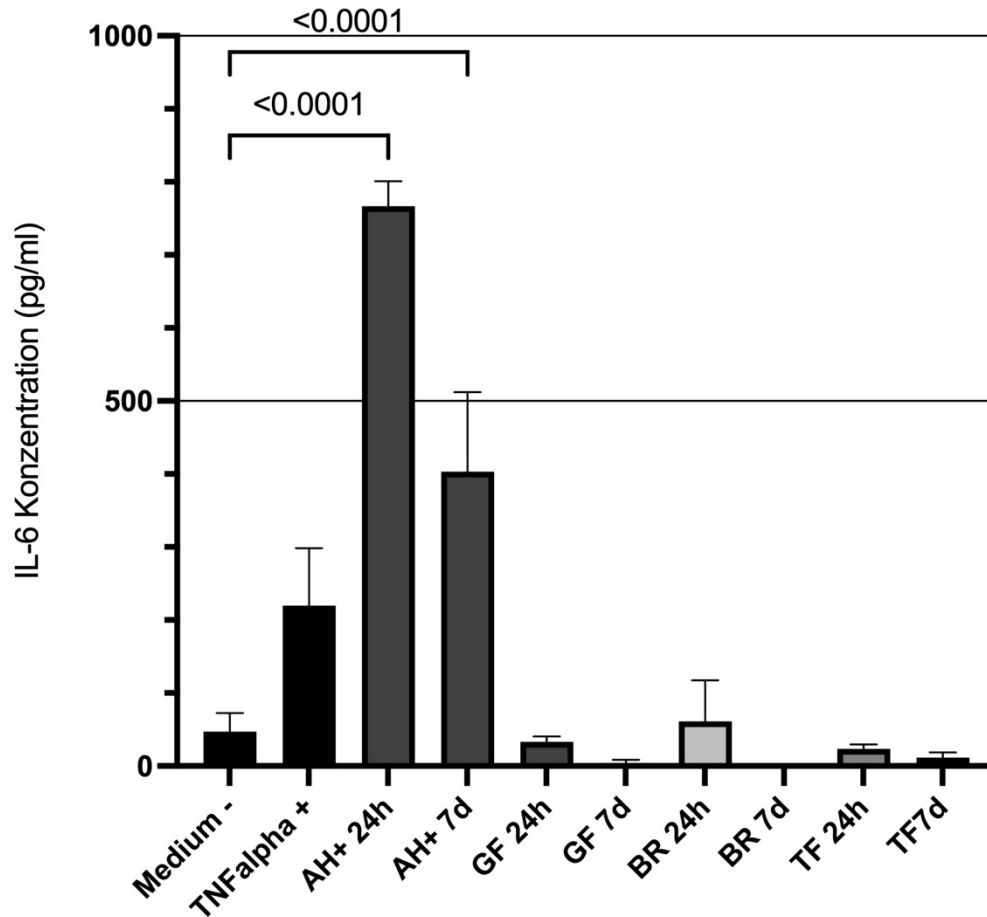


Abbildung 22: Ergebnisse des IL-6-ELISAs (hPDLF)

Bei den Fibroblasten (Abb. 22) ist deutlich zu erkennen, dass die AH+ Exposition der Zellen zu erheblich höheren IL-6 Konzentrationen führte als die Inkubation mit Zellkulturmedium, welches als Negativkontrolle in diesem Versuch verwendet wurde. Der Post-Hoc-Tukey-Test ergab, dass die IL-6 Konzentrationen der übrigen Sealereluate sich nicht signifikant von der Negativkontrolle unterschieden. AH+ stimulierte also die IL-6 Produktion der hPDLF am meisten. Die 7 Tage lang eingelegten Proben ergaben geringere IL-6 Konzentrationen als die 24 Stunden lang eingelegte Proben, wobei sich diese allerdings nicht signifikant unterschieden.

Im Vergleich zu den Fibroblasten produzierten die humanen Osteoblasten höhere Konzentrationen an IL-6, allerdings unterschieden sich die Werte nicht signifikant von der IL-6 Konzentration, welche von den mit Zellkulturmedium inkubierten Zellen produziert wurde. TF 24 h und AH+ 24 h produzierten die

größten Mengen an IL-6, GF 7d die geringste. Mit Ausnahme von BR 7d lagen die IL-6 Konzentrationen der 7 Tage lang eingelegten Proben unter denen der 24h lang eingelegten.

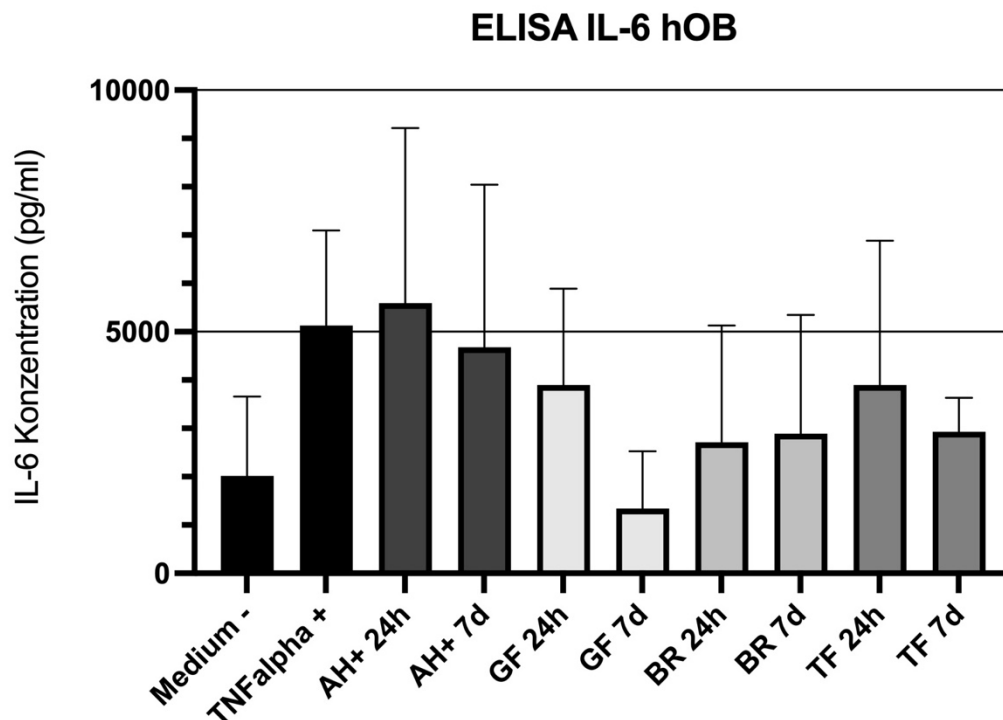


Abbildung 23: Ergebnisse des IL-6-ELISAs (hOB)

4.2.2. EIA zu Bestimmung der PGE₂-Konzentration

Mit Hilfe eines EIA wurde die PGE₂-Konzentration in Zellkulturüberständen nach Inkubation der Zellen mit den verschiedenen Sealereluaten bestimmt.

Abbildung 24 zeigt die PGE₂-Konzentrationen, die in den Zellkulturüberständen der hPDLF ermittelt wurden. Die größte PGE₂-Konzentration konnte bei den BR 7d Proben gemessen werden. Darauf folgten AH+ 24h und 7d. Die geringste PGE₂-Konzentrationen wurden bei GF gemessen. Die einfaktorielle Varianzanalyse und der Post-Hoc-Tukey-Test ergaben allerdings keine signifikanten Unterschiede der einzelnen Proben zur Negativkontrolle, sowie untereinander.

EIA PGE₂ hPDLF

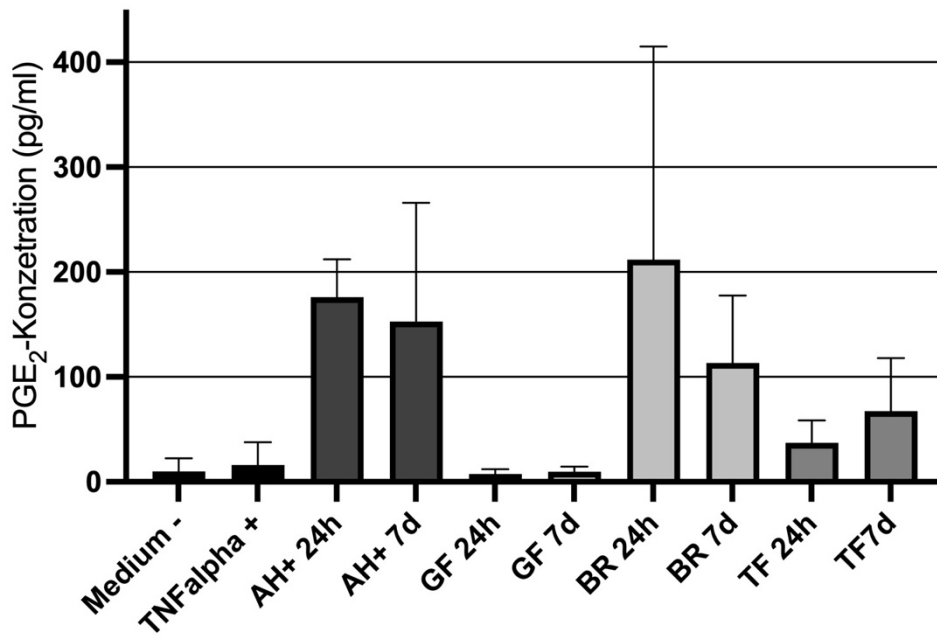


Abbildung 24: Ergebnisse des PGE₂-EIAs (hPDLF)

Bei den Osteoblasten wurden die größten PGE₂-Konzentrationen bei BR 7d gemessen, welche signifikant höher waren, als die der Negativkontrolle. Darauf folgten BR 24h, AH+ 24h und AH+ 7d. GF und TF erzeugten nur sehr geringe PGE₂-Konzentrationen (siehe Abbildung 25).

Die einfaktorielle Variananalyse zeigte, dass sich die PGE₂-Konzentration bei BR 7d als einzige signifikant von der Negativkontrolle unterschied. Die restlichen Gruppen unterschieden sich weder signifikant von der Negativkontrolle noch von den anderen Gruppen. Auch TNF- α , welches als Positivkontrolle eingesetzt wurde zeigte keine höheren Werte als die Negativkontrolle.

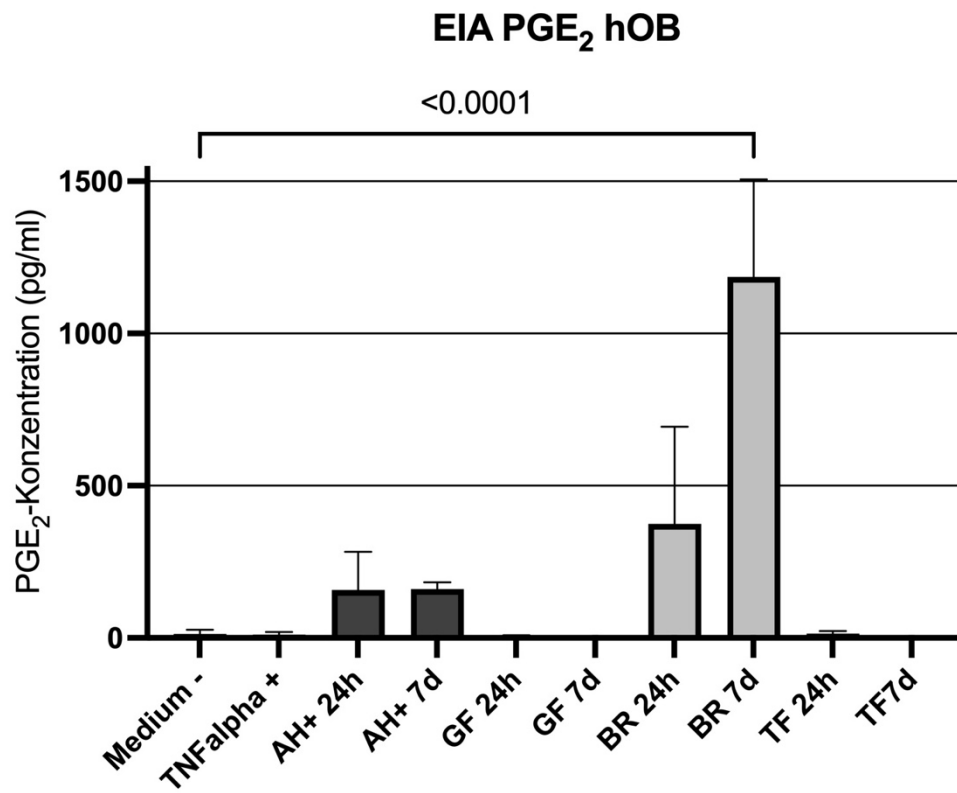


Abbildung 25: Ergebnisse des PGE₂-EIAs (hOB)

5. Diskussion

Die Biokompatibilität ist bei der Auswahl eines Materials für die endodontische Therapie von besonderer Bedeutung, da die Materialien potentiell in Kontakt mit dem den Zahn umgebenden vitalen Gewebe kommen können. Dies kann direkt durch Überfüllung des Wurzelkanals über den Apex hinaus oder auch indirekt durch Auswaschen des Materials mit der Zeit über den Apex, Seitenkanäle oder auch die Dentintubuli geschehen. Ziel der Versuche im Rahmen dieser Arbeit war es, die Biokompatibilität der Sealer AH plus, GuttaFlow bioseal, BioRoot RCS und TotalFill BC zu untersuchen. Bei AH+ handelt es sich um einen Sealer auf Epoxidharzbasis, GF ist silikonbasiert und BR und TF zählen zur Gruppe der calciumsilikatbasierten Sealmaterialien. Es wurde deren Einfluss auf humane Osteoblasten, welche eine wichtige Rolle bei der Ausheilung apikaler Knochendefekte nach Infektionen der Pulpa spielen und auf humane Fibroblasten des parodontalen Ligaments getestet.

Um eine Aussage über die Zytotoxizität der Materialien treffen zu können, wurde ein WST-8 Assay durchgeführt. Dieses zeigte, dass die Sealereluate einen erheblichen Einfluss auf die Zellviabilität der humanen Fibroblasten des parodontalen Ligaments hatten. Fast alle unverdünnten Sealereluate waren in der Lage, die Zahl der lebenden Zellen, mit denen sie inkubiert wurden, signifikant zu reduzieren. Besonders AH+ 24 wirkte pur in gleichem Maße zytotoxisch wie das als Positivprobe verwendete Triton X. Einzig TF pur aus der Gruppe der 24 h lang inkubierten Eluate unterschied sich nicht signifikant von der Negativprobe und wirkte so als einziges nicht zytotoxisch auf die humanen Fibroblasten. Statistisch konnte kein Unterschied zwischen den 24 Stunden und den 7 Tage lang eluierten Proben festgestellt werden.

Der selbe Versuch wurde auch mit den humanen Osteoblasten durchgeführt. Bei den 24 Stunden eingelegten Proben unterschied sich keine signifikant von der Negativprobe, wobei AH+ wieder die geringsten Zellviabilitäten aufwies. Das heißt die Viabilität der Zellen wurde durch die Inkubation mit den Sealerelaten nicht signifikant beeinträchtigt. Bei den 7 Tage lang eingelegten Proben wurden sowohl für AH+ pur als auch für GF pur signifikant verringerte Zellviabilitäten

gemessen. Auch bei den Osteoblasten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den 7 Tage und den 24 Stunden eingelegten Proben ermittelt werden. Vergleicht man die Zellviabilitäten der hPDLF mit denen der hOB so fällt auf, dass bei den Osteoblasten die Zellviabilitäten trotz der selben Bedingungen und der Inkubation mit den selben Sealereluates höher ausfielen als die der hPDLF. Die hOB scheinen weniger sensibel auf die Sealereluate zu reagieren. Dies lässt vermuten, dass die Zytotoxizität der Sealereluate abhängig von der Zellart ist. Es existieren bereits Studien, die diese These stützen (Souza *et al.*, 2019, Huang *et al.*, 2002). In einer Studie von Huang reagierten humane PDL Zellen aus gesunden Prämolaren im MTT-Test sensibler auf den Einfluss von Sealmaterialien als V79 Zellen, welche aus der Lunge von chinesischen Hamstern stammen. Laut Huang ist diese unterschiedliche Reaktion schwierig zu erklären und hängt wahrscheinlich mit der unterschiedlichen Herkunft der beiden Zellarten zusammen (Huang *et al.*, 2002). Da es sich bei den im Rahmen unserer Arbeit verwendeten Zellen ausschließlich um humane Zellen handelt, die dennoch unterschiedlich auf die selben Stimuli reagieren, könnte man darauf schließen, dass nicht wie von Huang vermutet die Herkunft der Zellen, sondern allein die Art der Zellen, für unterschiedliche Reaktion verantwortlich sein könnte. Die Sealereluate wurden nicht nur pur getestet, sondern auch im Verhältnis 1:1 und 1:5 verdünnt. Dies sollte die Tatsache simulieren, dass die Sealer auch im menschlichen Körper durch extrazelluläre Flüssigkeiten verdünnt werden. Auffällig war, dass bei beiden verwendeten Zellarten sowohl bei den 24 Stunden als auch bei den 7 Tage lang eluierten Proben die Zellviabilitäten mit zunehmender Verdünnung stiegen. GF, BR und TF konnten im verdünnten Zustand teils sogar Zellviabilitäten über 100% erzielen, was eine Zellproliferation durch den Einfluss der Sealer vermuten lässt. Dies wäre sehr von Vorteil, um die Ausheilung von periapikalen Knöcheläsionen durch pulpale Infektionen zu beschleunigen. Diese Beobachtung bestätigt eine Studie, die ebenfalls für iRoot, dem Äquivalent zu TotalFill, in geringen Konzentrationen Zellproliferation nachweisen konnte (Tu *et al.*, 2019).

Die Tatsache, dass die Zellviabilität mit zunehmender Verdünnung steigt, wird von anderen bereits publizierten Studien gestützt. Mukhtar-Fayyad publizierte bereits 2011 in einer Studie, in der die Zytotoxizität von iRoot SP und einem weiteren biokeramischen Sealer mittels MTT Test ermittelt wurde, dass die Zytotoxizität der Materialien mit zunehmender Konzentration steige (Mukhtar-

Fayyad, 2011). Auch Ferreira beschrieb in ein Studie, die sich mit der Biokompatibilität des Sealers AH 26 und GuttaFlow bioseal beschäftigte, den Zusammenhang zwischen geringer Konzentration und daraus resultierender geringer Zytotoxizität. Mit zunehmender Konzentration nehme die Zahl der lebenden Zellen ab und es komme zunächst zu einer Zunahme der Apoptose und daraufhin zu einer späten Apoptose oder Nekrose (Ferreira *et al.*, 2020). Die höhere zytotoxische Wirkung bei höheren Konzentrationen könnte auf den hohen pH-Wert der Materialien zurückzuführen sein, der eine Denaturierung der Zellen und der Proteine des Mediums bewirkt (Mukhtar-Fayyad, 2011). Allerdings existiert eine Studie, die für ein biokeramisches Material Gegenteiliges festgestellt hat. Benetti und Mitarbeiter untersuchten den biokeramischen Sealer Sealer Plus BC im Vergleich zu AH plus und MTA Fillapex (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, Brazil). Bei MTA Fillapex und AH plus sank die Zytotoxizität mit zunehmender Verdünnung, bei Sealer Plus BC stieg sie mit zunehmender Verdünnung. Bei der Studie handelte es sich um einen in vivo Versuch, in dem sehr hohe Verdünnungen von 1:50, 1:100 und 1:200 verwendet wurden, wodurch sie sich von vielen anderen unterscheidet (Benetti *et al.*, 2019).

Die verwendeten Sealerproben waren vor der Elution in Zellkulturmedium vollständig ausgehärtet worden. Es existieren Studien, die höhere Zytotoxizitäten für AH+ im frischen Zustand, als im ausgehärteten Zustand beschreiben (Szczurko *et al.*, 2018, Jung *et al.*, 2018, Jung *et al.*, 2019). In vivo kommt das Gewebe um den Apex zunächst mit frischem, nicht ausgehärteten Material in Kontakt (Jung *et al.*, 2018), weshalb es sein könnte, dass die Zytotoxizität höher ist, als in den Versuchen dieser Arbeit gemessen. Jung zeigte auch, dass BR weder in frischem noch in ausgehärtetem Zustand zytotoxische Eigenschaften aufwies (Jung *et al.*, 2018, Jung *et al.*, 2019). Auch GuttaFlow 2, dem Vorläufer von GuttaFlow bioseal, konnte in einer Studie weder frisch noch ausgehärtet Zytotoxizität nachgewiesen werden (Mandal *et al.*, 2014). Dies stellt einen deutlichen Vorteil gegenüber AH+ dar, da auch initial vor dem vollständigen Aushärten, keine Gefahr der Zytotoxizität für die Zellen des periapikalen Gewebes besteht, welche die Regeneration beeinträchtigen könnte.

Camargo differenzierte diesen Aspekt in einer Studie noch weiter. Er beschreibt die Zytotoxizität als abhängig von der Aushärtezeit der Sealer. Es spielt also nicht nur die Tatsache, ob ein Sealer frisch oder ausgehärtet ist eine Rolle, sondern

auch wie lange dieser ausgehärtet wurde. Die Sealer wurden entweder 0 h, 12 h oder 24 h getrocknet. Bei AH+ nahm die Zytotoxizität bei den 12 h ausgehärteten Proben im Vergleich zu den frischen ab und bei den 24 h getrockneten Proben wieder zu. Im selben Versuch waren noch ein methacrylatbasierter und ein silikonbasierter Sealer untersucht worden. Hier wirkte sich die Aushärtezeit nicht auf die Zytotoxizität aus. Bei allen Sealern konnte allerdings ein Einfluss der Aushärtezeit auf die mittels Comet-Assay untersuchte Genotoxizität festgestellt werden (Camargo *et al.*, 2014). Alle in den Versuchen dieser Arbeit verwendeten Sealer wurden 24 h lang ausgehärtet. Ob sich eine kürzere oder längere Aushärtezeit wirklich auf die Ergebnisse auswirken würde, könnte in weiteren Studien untersucht werden.

Um aussagekräftige Ergebnisse in Bezug auf die Biokompatibilität zu bekommen, wurde neben dem WST-8-Assay noch ein Annexin-V-Assay durchgeführt, welches Aussagen über die Apoptose- sowie die Nekroserate erlauben sollte. Zunächst wurde der zeitliche Verlauf der Lumineszenz und Fluoreszenz betrachtet. Bei der Lumineszenzmessung, welche die Apoptoserate widerspiegelt, wurden die Höchstwerte nach 4 h erreicht. Bis zur 24 h Messung sank die Apoptoserate wieder. Die Nekroserate stieg auch bis zur 24 h Messung bei allen Proben außer GF 7d an. GF 7d hatte allerdings initial die höchste Nekroserate aller Proben, diese fiel zwar schneller wieder ab als bei den anderen Materialien, war dann aber bei den hPDLF immer noch am zweithöchsten, bei den hOB nach 24 h geringer als die der anderen Proben, aber immer noch über der Positivkontrolle. Bei den anderen Sealerproben konnte leider keine Aussage darüber getroffen werden, ab wann die Nekroserate nach Inkubation mit den Sealereluatn wieder abnimmt, da die letzte Messung nach 24 h stattgefunden hatte. Dies wäre interessant zur Beurteilung der Toxizität der Sealer und sollte in weiteren Studien überprüft werden.

Betrachtet man die apoptotischen Zellen, so fanden sich am meisten bei BR, darauf folgt TF, dann AH + und GF. Die statistische Analyse zeigte allerdings bei keinem der Sealer einen signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle, weshalb nicht davon ausgegangen werden kann, dass die Inkubation der Zellen mit eluiertem Sealer den Zellen mehr schadet, als reines Zellkulturmedium.

Die wenigen apoptotischen Zellen bei GF, lassen das Material zunächst im Vergleich zu den anderen Sealmaterialien biokompatibel erscheinen.

Betrachtet man aber die Auswertung der Fluoreszenz fällt auf, dass bei den hPDLF GF 7d zu einer signifikant erhöhten Zahl der nekrotischen Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle führte. Die anderen Sealereluate unterschieden sich wieder nicht signifikant von der Negativkontrolle. Zur Auslösung von Zellnekrosen sind noch stärkere Reize, als zur Auslösung der Apoptose notwendig (Medzhitov, 2008). Deshalb könnte man vermuten, dass GF 7d innerhalb dieses Versuchs die höchste Zytotoxizität der untersuchten Materialien aufwies. Allerdings könnte es sich in diesem Fall auch um sekundäre Nekrose handeln, weshalb dieses Ergebnis nur von eingeschränkter Aussagekraft ist.

Auch in diesem Versuch, genau wie im WST-8-Assay reagierten die hPDLF wieder sensibler auf die Reize der Sealereluate als die hOB, was in höheren Apoptose- und Nekroseraten resultierte. Es zeigte sich wieder, dass die Zytotoxizität der Sealereluate auch von der Zellart abhängig zu sein scheint.

Es existieren bereits einige Studien, die sich mit dem Einfluss von Sealmaterialien auf Apoptose und Nekrose befassen.

Yu und Mitarbeiter veröffentlichten eine Studie, in der sie den Apoptoseweg und seine Regulierung bei Osteoblastenzellen (MC-3T3 E1) durch den Sealer AH 26 über den Weg der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) untersuchten (Yu *et al.*, 2010). MAPKs steuern eine Vielzahl physiologischer Prozesse. Die extrazellulären signalregulierten Proteinkinasen (ERK1/2), die stressaktivierten Protein/C-Jun-N-terminalen Kinasen (SAPK/JNK) und die p38 Familie gehören zu den MAP-Kinasen. Sie sind wichtige regulatorische Proteine und steuern die zelluläre Reaktion sowohl auf Proliferation als auch auf Apoptose (Xia *et al.*, 1995). Durch Kernkondensation und Aktivierung der Poly-ADP-Ribose Polymerase (PARP) in MC-3T3 E1 Osteoblastenzellen wurde eine durch AH 26 ausgelöste Apoptose bestätigt. Es wurde gezeigt, dass es sich bei dieser Apoptose um den intrinsischen/mitochondrialen Weg der Apoptose handelt, was durch die Expression von Bax und die Verschiebung von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytosol bestätigt wurde. Die Daten deuten darauf hin, dass AH 26 den oxidativen Stress in Osteoblastenzellen beeinflusst, der dann die Mitochondrien-vermittelte Apoptose auslöst. Als Beweis für die Aktivierung von MAPKs exprimierten die mit AH26 behandelten Zellen SAPK/JNK und ERK1/2. Die SAPK/JNK-Aktivierung scheint die Apoptose zu regulieren, während die ERK-Aktivierung das Überleben der Zellen schützt (Yu *et al.*, 2010).

Ferreira stellte fest, dass bei Inkubation von MDPC-23 Zellen, eine immortalisierte, osteoblastenähnliche Zelllinie, mit GuttaFlow bioseal weniger apoptotische bzw. nekrotische Zellen entstehen als bei Inkubation mit AH 26. (Ferreira *et al.*, 2020). AH 26 ist genau wie AH plus ein Sealer auf Epoxidharzbasis. Im Gegensatz dazu konnte in den Versuchen dieser Arbeit kein Unterschied zwischen AH plus und GuttaFlow bioseal in Bezug auf die apoptotischen Zellen festgestellt werden. Allerdings wies GF 7d im Vergleich zu AH+ eine signifikant erhöhte Nekroserate auf, was den Ergebnissen von Ferreira widerspricht.

Souza untersuchte in einer Studie den Einfluss von Sealer 26, AH Plus und EndoSequence BC auf Monozyten und polymorphkernige Granulozyten. EndoSequence BC und AH Plus waren für die Apoptose in polymorphkernige Granulozyten, aber nicht in Monozyten verantwortlich. Bei Monozyten wurde die Apoptose nur bei Kontakt mit Sealer 26 ausgelöst (Souza *et al.*, 2019).

Die Publikation von Souza stützt wieder die Beobachtung dieser Arbeit, dass unterschiedliche Zellarten unterschiedlich sensibel auf dieselben Stimuli reagieren. Dieser Fakt allerdings verdeutlicht, dass die bisher publizierten Arbeiten kaum miteinander vergleichbar sind, da sie sich sowohl im Hinblick auf die verwendeten Zellarten, als auch im Studiendesign unterscheiden.

Was alle zitierten Studien gemeinsam haben ist, dass sie bestätigen, dass es durch den Kontakt von Zellen mit Sealmaterialien zum Zelltod in Form von Apoptose oder Nekrose kommen kann.

Bei den Versuchen zur Zytotoxizität waren BR und TF die beiden einzigen Materialien, bei denen statistisch nie eine signifikante Verminderung der Zellzahl, der Apoptose- oder Nekroserate nachgewiesen werden konnte. Beide Materialien zählen zur Gruppe der Calciumsilikatbasierenden, biokeramischen Materialien. Es existieren zahlreiche Studien, welche die Biokompatibilität von BR (Dimitrova-Nakov *et al.*, 2015, Collado-González *et al.*, 2017, Jung *et al.*, 2018, Jung *et al.*, 2019) und TF (Giacomino *et al.*, 2019, Seo *et al.*, 2019; Colombo *et al.*, 2018) belegen. Generell deutet die aktuelle Studieinlage darauf hin, dass bioaktive Sealer ein geringeres zytotoxisches Potenzial im Vergleich zu anderen Sealergruppen aufweisen (Fonseca *et al.*, 2019).

Calciumsilikatbasierte Sealer haben einen basischen pH-Wert und setzen vermutlich bei ihrer Abbindereaktion Calciumionen frei. Diese Ca²⁺ Freisetzung

könnte für die biokeramischen Eigenschaften dieser Sealergruppe verantwortlich sein (Candeiro *et al.*, 2012). Biokeramische, bioaktive Sealer begünstigen das Überleben und die Differenzierung von Osteoblasten. Daher haben sie das Potenzial, als Hilfsmittel bei der Remineralisierung osteolytischer Läsionen bei apikaler Parodontitis zu dienen (Giacomino *et al.*, 2019).

Bei der apikalen Parodontitis entsteht der Knochenverlust hauptsächlich durch aktivierte Osteoklasten (Lee *et al.*, 2019). Verschiedene Faktoren wie IL-6, TNF- α oder auch PGE₂ aktivieren den RANK-Liganden, welcher die Osteoklastendifferenzierung induziert und die Osteoklastenaktivität erhöht (Bezerra *et al.*, 2005). In weiteren Studien wurden erhöhte IL-6- und PGE₂-Konzentrationen im periradikulären Exudat nicht nur mit periapikalem Knochenverlust, sondern auch mit klinischer Symptomatik wie Schmerzen in Verbindung gebracht (Coon 2007, Takayma 1996, Shimauchi *et al.*, 1997), weshalb es so scheint als wären erhöhte Konzentrationen dieser Mediatoren durch Sealer nicht wünschenswert.

Um herauszufinden ob die hOB und die hPDLF durch Inkubation mit den Sealerelutaten angeregt werden vermehrt IL-6 zu produzieren wurde ein ELISA auf IL-6 durchgeführt, um Aussagen über die PGE₂-Konzentration treffen zu können ein EIA auf PGE₂. Der ELISA auf IL-6 zeigte deutlich, dass die hPDLF unter dem Einfluss von AH+ am meisten IL-6 produzierten. Die IL-6 Konzentration lag bei allen AH + Proben signifikant über den Konzentrationen der Negativkontrolle. Die anderen Sealer unterschieden sich nicht signifikant von der Negativkontrolle. Dies zeigte, dass AH+ als einziges Material in der Lage war bei den hPDLF eine Entzündungsreaktion auszulösen. Bei den Osteoblasten unterschied sich keine der Sealerproben signifikant von der Negativkontrolle, was bedeutet, dass durch die Sealer keine Entzündungsreaktion induziert wurde. Dies bestätigt wieder Beobachtungen der letzten Versuche, dass die hOB weniger sensibel auf die Einflüsse der Sealereluate zu reagieren scheinen als die hPDLF. Die PGE₂-Konzentrationen der hPDLF unterschieden sich nach Sealerexposition nicht signifikant von denen der Negativkontrolle. Wobei dennoch bei BR 24 Maximalwerte von über 400 pg/ml gemessen werden konnten. Im Vergleich dazu lag die PGE₂-Konzentration bei der Negativkontrolle nur bei 9,89 pg/ml. Auch wenn keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden konnte, ist dies dennoch ein nennenswerter Unterschied.

Bei den humanen Osteoblasten fiel eine stark erhöhte PGE₂-Konzentration durch die Inkubation mit BR 7d auf ($p < 0,0001$), auch BR 24h und AH+ 24h und 7d zeigten leicht erhöhte PGE₂ Konzentrationen. Bei GF und TF konnte nahezu kein PGE₂ nachgewiesen werden. Insgesamt konnte also nur für AH+ erhöhte IL-6 Expression und für BR erhöhte PGE₂ Expression nachgewiesen werden.

In einer aktuellen Studie von Tomokiyo wurde die Expression von Entzündungsmarkern bei PDL-Zellen (human peridontal ligament stem cells; line 2-23 cells) durch die Inkubation mit einem epoxidharzbasierten, einem biokeramischen glasbasierten und einem silikonbasierten Sealer (Gutta Flow 2) untersucht. Dabei kam heraus, dass dem silikonbasierten Sealer ausgesetzte Zellen dieselbe Expression inflammatorischer Gene aufwies wie unbehandelte Zellen. Dies könnte darauf hindeuten, dass der silikonbasierte Sealer zur Regeneration des periapikalem Gewebes beiträgt, ohne die Heilung durch die PDL-Zellen zu beeinträchtigen (Tomokiyo *et al.*, 2021). Auch in einer in vivo Studie an Ratten wurde eine geringere entzündliche Reaktion durch GuttaFlow Bioseal als durch AH+ hervorgerufen (Santos *et al.*, 2019). Dies korreliert mit den Ergebnissen dieser Studie, bei denen für den silikonbasierten Sealer GuttaFlow bioseal keinerlei Expression von Entzündungsmediatoren nachgewiesen werden konnte.

Für BioRoot existiert eine Studie, die zeigt, dass das Material die IL-6 Sekretion von mit LPS (Lipopolysacchariden) stimulierten Fibroblasten des parodontalen Ligaments sogar vermindern könne und in der Lage sei die Entzündungsreaktion zu modulieren. Zusätzlich zur Funktion als Sealer könnte durch Modulation der Entzündungsreaktion, das Ergebnis der endodontischen Behandlung verbessert werden (Jeanneau *et al.*, 2019).

Die Ergebnisse dieser Studie konnten auch durch die Ergebnisse einer in vivo Studie von Zhang gestützt werden. Dieser publizierte, dass die durch iRoot hervorgerufene Entzündungsreaktion in etwa der der Kontrollgruppe entsprach (Zhang und Peng, 2015). Lee sprach EndoSequence sogar antientzündliche Aktivität zu (Lee *et al.*, 2019). Auch Chang und Mitarbeiter konnte keine schwerwiegende Entzündungsreaktion durch iRoot nachweisen (Chang *et al.*, 2014). Im Gegensatz dazu konnte in einer anderen Studie für iRoot BC eine erhöhte Expression von IL-6 nachgewiesen werden (Tu *et al.*, 2019). Hierbei ist zu beachten, dass sich die genannten Studien sowohl hinsichtlich der verwendeten Zellen als auch im Versuchsaufbau unterschieden.

Allerdings können Entzündungsprozesse nicht nur für Destruktion sondern auch für die Regeneration von Knochen von Bedeutung sein (Jakab, 2014, Liu *et al.*, 2010, Garlet, 2010). Eine apikale Parodontitis stellt eine Entzündung des Parodonts um die Wurzelspitze herum dar. Ob diese Entzündung durch Sealer, welche die Expression von Entzündungsmediatoren wie IL-6 und PGE₂ steigern, verstärkt oder verlängert wird und ob die Heilung dadurch verzögert oder angeregt wird, ist bisher nicht untersucht worden und könnte auch von der individuellen Immunantwort des jeweiligen Patienten abhängig sein. Aufgrund dessen ist es nicht möglich zu sagen, ob die Expression von Entzündungsmediatoren ausschließlich negativ zu bewerten ist.

Zusammenfassend scheinen die neueren Sealmaterialien dem bereits gut untersuchten und klinisch bewährten AH+ in Bezug auf die Biokompatibilität leicht überlegen. Im WST-8-Assay zeigte AH+ die höchste Zytotoxizität und auch die höchsten IL-6 Konzentrationen im ELISA auf IL 6, sowie die zweithöchsten PGE₂ Konzentrationen. Bei der Apoptose- und Nekroserate schnitt AH+ ähnlich wie die anderen untersuchten Materialien ab. Allerdings zeigte GF die höchste Nekroserate und BR die größte PGE₂-Konzentrationen. Lediglich TF unterschied sich nie signifikant von der Negativkontrolle mit Zellkulturmedium, weshalb dieser Sealer bei den Versuchen dieser Arbeit die beste Biokompatibilität zeigt.

Insgesamt ist es dennoch schwierig anhand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche eine Aussage darüber zu treffen ob nun ein Material den anderen überlegen ist, da es sich ausschließlich um in vitro Versuche handelte, die den Reaktionen im menschlichen Körper zwar so nahe wie möglich kommen sollen, allerdings nie in Lage sind, alle Faktoren des menschlichen Körpers zu berücksichtigen. Beispielsweise ist in vivo der Sealer bei der Wurzelkanalbehandlung nicht der einzige Einfluss in Bezug auf die Biokompatibilität. Auch Spüllösungen, medikamentöse Einlagen und das Obturationsmaterial kommen potentiell in Kontakt mit dem periapikalen Gewebe. Inwieweit diese Materialien mit dem Sealer wechselwirken, beziehungsweise wie sie sich selbst auf das Gewebe auswirken wurde in dieser Arbeit nicht getestet. Auch die individuell unterschiedliche Immunantwort jedes Menschen auf von außen einwirkende Reize konnte hier nicht berücksichtigt werden. Es existiert bisher noch keine Studie, die die selben Materialien miteinander vergleicht wie

diese Arbeit. Auch die verwendeten Versuchsaufbauten wurden in keiner Studie identisch durchgeführt. Dies erschwert die Einordnung in die vorhandene Literatur. Zur genaueren Beurteilung sind deshalb weitere in vivo und vitro Studien notwendig.

6. Zusammenfassung

In dieser Studie wurden die Sealmaterialien GuttaFlow (GF), BioRoot RCS (BR) und TotalFill BC (TF) auf ihre Biokompatibilität untersucht und mit AH plus (AH+), das derzeit als Goldstandard in der Zahnmedizin gilt, verglichen. Da Sealer potenziell in Kontakt mit dem periapikalen Gewebe kommen können, sind deren biologische Eigenschaften wichtig für den Erfolg einer Wurzelkanalbehandlung sowie für die Heilung periapikaler Knochenläsionen.

Für die Versuche wurden ausschließlich humane Zellen verwendet. Es handelte sich um humane Fibroblasten des parodontalen Ligaments (hPDLF) und humane Osteoblasten (hOB). Es wurden Eluate der verschiedenen Sealer hergestellt, indem diese zunächst 24 Stunden ausgehärtet (37°C, 100% relative Luftfeuchtigkeit) und dann 24 Stunden oder 7 Tage lang in 4 ml Zellkulturmedium eluiert wurden (37°C, 5% CO₂, 100% relative Luftfeuchtigkeit). Der Überstand wurde daraufhin filtriert und bis zur Verwendung eingefroren. Die Proben wurden entweder pur, im Verhältnis 1:1 oder 1:5 mit Zellkulturmedium verdünnt verwendet. Als Negativkontrolle wurde in allen Versuchen Zellkulturmedium verwendet. Es wurden jeweils drei voneinander unabhängige Durchläufe der Versuche durchgeführt.

Die Zytotoxizität wurde mittels WST-8-Assay und Annexin-V-Assay überprüft, wobei der WST-8-Assay Aufschluss über die prozentuale Zellviabilität, der Annexin-V-Assay über die Apoptose- und Nekroserate der mit den Sealern inkubierten Zellen gab. Zur Untersuchung des inflammatorischen Potentials der Materialien wurde ein ELISA auf IL-6 und ein EIA auf PGE₂ durchgeführt.

Im WST-8 Assay zeigte bei den hPDLF AH+ pur die größte Zytotoxizität. Auch die anderen Sealer reduzierten im unverdünnten Zustand die Zellzahl signifikant. TF aus der Gruppe der 24 Stunden eluierten Proben war die einzige unverdünnte Probe, die die Zellzahl der hPDLF nicht signifikant reduzierte.

Bei den hOB wies ebenfalls AH+ die geringsten Zellviabilitäten auf. Keine der 24 Stunden lang eingelegten Proben konnte die Zellzahl im Vergleich zur Negativprobe mit Zellkulturmedium signifikant reduzieren. BR 1:1 verdünnt führte sogar zu einer signifikanten Erhöhung der Zellzahl im Vergleich zur Negativkontrolle. Bei den 7 Tage lang eluierten Proben führten lediglich AH+ pur und GF pur zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität. Die Zellviabilitäten der mit den anderen Sealern inkubierten Zellen unterschieden sich nicht

signifikant von den in Zellkulturmedium inkubierten Zellen. Insgesamt reduzierte sich die Zytotoxizität mit zunehmender Verdünnung der Proben und die hPDLF schienen stärker auf die toxischen Reize der Sealer zu reagieren als die hOB. Das Annexin-V-Assay zeigte über die Lumineszenzmessung, dass bei den hPDLF die größte Apoptoserate durch 7 Tage lang eluiertes BR ausgelöst wurde. An zweiter Stelle folgte TF, dann AH+ und GF. Es ergaben sich allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Sealereluat und der Negativprobe mit Zellkulturmedium. Die Fluoreszenzmessung ergab bei den mit GF (7 Tage eluiert) inkubierten humanen Fibroblasten eine signifikant erhöhte Zahl nekrotischer Zellen im Vergleich zur Inkubation mit Zellkulturmedium. Der ELISA auf IL-6 ergab, dass die hPDLF unter dem Einfluss von AH+ signifikant mehr IL-6 produzierten (AH+ 24h: 766,76 pg/ml; AH+ 7d: 403,07 pg/ml) als mit Zellkulturmedium inkubierte Zellen (47 pg/ml). Die anderen Sealer unterschieden sich nicht signifikant von der Negativkontrolle. Bei den Osteoblasten unterschied sich keine der Sealerproben signifikant von der Negativkontrolle, was bedeutet, dass hier keiner der Sealer in der Lage war, eine Entzündungsreaktion zu induzieren. Die hOB reagierten weniger sensibel auf die Einflüsse der Sealereluate als die hPDLF. Die PGE₂-Konzentrationen der hPDLF unterschieden sich nach Sealerexposition nicht signifikant von denen der Negativkontrolle mit Zellkulturmedium. BR 24h führte dabei zu PGE₂-Konzentrationen von bis zu 400 pg/ml. Im Vergleich dazu lag die PGE₂-Konzentration bei der Negativkontrolle im Durchschnitt bei 9,89 pg/ml, die Positivkontrolle TNF- α bei 16,12 pg/ml. Auch wenn keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden konnte, ist dies ein nennenswerter Unterschied. Bei den humanen Osteoblasten fiel durch die Inkubation mit BR 7d (1186,44 pg/ml) eine signifikant erhöhte PGE₂-Konzentration auf, auch BR 24h (374,94 pg/ml), AH+ 24h (157,01 pg/ml) und AH+ 7d (160,70 pg/ml) zeigten erhöhte PGE₂-Konzentrationen im Vergleich zur Negativkontrolle (13,40 pg/ml) und zur Positivkontrolle TNF- α (10,72 pg/ml), welche allerdings nicht signifikant waren. Bei GF und TF konnte nahezu kein PGE₂ nachgewiesen werden. Insgesamt schienen die neueren Materialien AH+ in Bezug auf die Biokompatibilität etwas überlegen. Im WST-8 Assay zeigte AH+ die höchste Zytotoxizität und auch die höchsten IL-6 Konzentrationen im ELISA auf IL-6, sowie die zweithöchsten PGE₂-Konzentrationen. Allerdings zeigte GF die höchste Nekroserate und BR die größten PGE₂ Konzentrationen. Lediglich TF

unterschied sich nie signifikant von der Negativkontrolle und schnitt somit in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen am besten ab. Dennoch ist die Biokompatibilität des Sealers nicht das einzige Kriterium, das zu einer suffizienten Wurzelfüllung beiträgt. Auch die Eigenschaften der anderen in der Endodontie verwendeten Materialien wie die des Obturationsmaterials oder der Spüllösungen dürfen nicht außer Acht gelassen werden. Zur vollständigen Beurteilung sind weitere Studien notwendig.

7. Literaturverzeichnis

1. Bando Y, Henderson B, Meghji S, Poole S, Harris M. Immunocytochemical localization of inflammatory cytokines and vascular adhesion receptors in radicular cysts (1993). *J Oral Pathol Med* **22**: 221-227.
2. Basrani B, Haapasalo M. Update on endodontic irrigating solutions (2012). *Endodontic Topics* **27**: 74-102.
3. Beck-Mannagetta J, Necek D. Radiologic findings in aspergillosis of the maxillary sinus (1986). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **62**: 345-349.
4. Beere HM. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways (2005). *J Clin Invest* **115**: 2633-2639.
5. Beltz RE, Torabinejad M, Pouresmail M. Quantitative analysis of the solubilizing action of MTAD, sodium hypochlorite, and EDTA on bovine pulp and dentin (2003). *J Endod* **29**: 334-337.
6. Benetti F, de Azevedo Queiroz Í O, Oliveira PHC, Conti LC, Azuma MM, Oliveira SHP, Cintra LTA. Cytotoxicity and biocompatibility of a new bioceramic endodontic sealer containing calcium hydroxide (2019). *Braz Oral Res* **33**: e042.
7. Beresford PJ, Zhang D, Oh DY, Fan Z, Greer EL, Russo ML, Jaju M, Lieberman J. Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks (2001). *J Biol Chem* **276**: 43285-43293.
8. Bergenholtz G. Pathogenic mechanisms in pulpal disease (1990). *J Endod* **16**: 98-101.
9. Bezerra MC, Carvalho JF, Prokopowitsch AS, Pereira RM. RANK, RANKL and osteoprotegerin in arthritic bone loss (2005). *Braz J Med Biol Res* **38**: 161-170.
10. Bhandi S, Mashyakhy M, Abumelha AS, Alkahtany MF, Jamal M, Chohan H, Raj AT, Testarelli L, Reda R, Patil S. Complete Obturation-Cold Lateral Condensation vs. Thermoplastic Techniques: A Systematic Review of Micro-CT Studies (2021). *Materials (Basel)* **14**: 4013.
11. Bohn S, Ilie N. Wetting behaviour of silicone- and resin-based root canal sealers (2014). *Int Endod J* **47**: 542-549.

12. Bortner CD, Oldenburg NB, Cidlowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis (1995). *Trends Cell Biol* **5**: 21-26.
13. Bouillaguet S, Wataha JC, Tay FR, Brackett MG, Lockwood PE. Initial in vitro biological response to contemporary endodontic sealers (2006). *J Endod* **32**: 989-992.
14. Boyce BF, Xiu Y, Li J, Xing L, Yao Z. NF- κ B-Mediated Regulation of Osteoclastogenesis (2015). *Endocrinol Metab (Seoul)* **30**: 35-44.
15. Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase (1997). *J Biol Chem* **272**: 26159-26165.
16. Camargo CH, Oliveira TR, Silva GO, Rabelo SB, Valera MC, Cavalcanti BN. Setting time affects in vitro biological properties of root canal sealers (2014). *J Endod* **40**: 530-533.
17. Candeiro GT, Correia FC, Duarte MA, Ribeiro-Siqueira DC, Gavini G. Evaluation of radiopacity, pH, release of calcium ions, and flow of a bioceramic root canal sealer (2012). *J Endod* **38**: 842-845.
18. Carvalho CN, Martinelli JR, Bauer J, Haapasalo M, Shen Y, Bradaschia-Correa V, Manso AP, Gavini G. Micropush-out dentine bond strength of a new gutta-percha and niobium phosphate glass composite (2015). *Int Endod J* **48**: 451-459.
19. Chang SW, Lee SY, Kang SK, Kum KY, Kim EC. In vitro biocompatibility, inflammatory response, and osteogenic potential of 4 root canal sealers: Sealapex, Sankin apatite root sealer, MTA Fillapex, and iRoot SP root canal sealer (2014). *J Endod* **40**: 1642-1648.
20. Chinnaiyan AM. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine (1999). *Neoplasia* **1**: 5-15.
21. Cobankara FK, Ozkan HB, Terlemez A. Comparison of organic tissue dissolution capacities of sodium hypochlorite and chlorine dioxide (2010). *J Endod* **36**: 272-274.
22. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis (1997). *Biochem J* **326** (Pt 1): 1-16.
23. Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Ortolani-Seltenerich PS, Lozano A, Forner L, Llana C, Rodríguez-Lozano FJ.

- Biocompatibility of three new calcium silicate-based endodontic sealers on human periodontal ligament stem cells (2017). *Int Endod J* **50**: 875-884.
24. Colombo M, Poggio C, Dagna A, Meravini MV, Riva P, Trovati F, Pietrocola G. Biological and physico-chemical properties of new root canal sealers (2018). *J Clin Exp Dent* **10**: e120-e126.
25. 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.
26. Crisp S, Ambersley M, Wilson AD. Zinc oxide eugenol cements. V. Instrumental studies of the catalysis and acceleration of the setting reaction (1980). *J Dent Res* **59**: 44-54.
27. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy (2019). *Cell Biol Int* **43**: 582-592.
28. Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury (2005). *Nat Chem Biol* **1**: 112-119.
29. Desai S, Chandler N. Calcium hydroxide-based root canal sealers: a review (2009). *J Endod* **35**: 475-480.
30. Deutsche Mundgesundheitsstudie DMS V. (2016).
31. Dimitrova-Nakov S, Uzunoglu E, Ardila-Osorio H, Baudry A, Richard G, Kellermann O, Goldberg M. In vitro bioactivity of Bioroot™ RCS, via A4 mouse pulpal stem cells (2015). *Dent Mater* **31**: 1290-1297.
32. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death (2007). *Toxicol Pathol* **35**: 495-516.
33. Epley SR, Fleischman J, Hartwell G, Cicalese C. Completeness of root canal obturations: Epiphany techniques versus gutta-percha techniques (2006). *J Endod* **32**: 541-544.
34. Euler GJ, Miller GA, Hutter JW, D'Alesandro MM. Interleukin-6 in neutrophils from peripheral blood and inflammatory periradicular tissues (1998). *J Endod* **24**: 480-484.
35. Ferreira I, Laranjo M, Marto CM, Casalta-Lopes J, Serambeque B, Gonçalves AC, Sarmiento-Ribeiro AB, Carrilho E, Botelho MF, Baptista Paula A, Marques Ferreira M. GuttaFlow(®) Bioseal Cytotoxicity Assessment: In Vitro Study (2020). *Molecules* **25**: 4297.

36. Fonseca DA, Paula AB, Marto CM, Coelho A, Paulo S, Martinho JP, Carrilho E, Ferreira MM. Biocompatibility of Root Canal Sealers: A Systematic Review of In Vitro and In Vivo Studies (2019). *Materials (Basel)* **12**: 4113.
37. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology (2001). *Science* **294**: 1871-1875.
38. Gambarini G, Piasecki L, Schianchi G, Di Nardo D, Miccoli G, Al Sudani D, Di Giorgio R, Testarelli L. In vitro evaluation of carrier based obturation technique: a CBCT study (2016). *Ann Stomatol (Roma)* **7**: 11-15.
39. Gandolfi MG, Siboni F, Botero T, Bossù M, Riccitiello F, Prati C. Calcium silicate and calcium hydroxide materials for pulp capping: biointeractivity, porosity, solubility and bioactivity of current formulations (2015). *J Appl Biomater Funct Mater* **13**: 43-60.
40. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a reappraisal from host defense and tissue destruction viewpoints (2010). *J Dent Res* **89**: 1349-1363.
41. Gatewood RS. Endodontic materials (2007). *Dent Clin North Am* **51**: 695-712
42. Geurtsen W. Biocompatibility of root canal filling materials (2001). *Aust Endod J* **27**: 12-21.
43. Giacomino CM, Wealleans JA, Kuhn N, Diogenes A. Comparative Biocompatibility and Osteogenic Potential of Two Bioceramic Sealers (2019). *J Endod* **45**: 51-56.
44. Gorduysus M, Avcu N. Evaluation of the radiopacity of different root canal sealers (2009). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **108**: e135-140.
45. Guo L, Ye C, Hao X, Zheng R, Ju R, Wu D, Luo L, Wang C, Li J, Yu X, Zhu L, Zhang D. Carboxyamidotriazole ameliorates experimental colitis by inhibition of cytokine production, nuclear factor- κ B activation, and colonic fibrosis (2012). *J Pharmacol Exp Ther* **342**: 356-365.
46. Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics (2014). *Br Dent J* **216**: 299-303.
47. Haapasalo M, Udnæs T, Endal U. Persistent, recurrent, and acquired infection of the root canal system post-treatment (2003). *Endodontic Topics* **6**: 29-56.

48. Hein AM, O'Banion MK. Neuroinflammation and memory: the role of prostaglandins (2009). *Mol Neurobiol* **40**: 15-32.
49. Hellwig E, Klimek J, Attin T. Einführung in die Zahnerhaltung. 6. Auflage, 2013: Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln.
50. Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6 (1990). *Immunol Today* **11**: 443-449.
51. Huang FM, Chou MY, Chang YC. Induction of cyclooxygenase-2 mRNA and protein expression by epoxy resin and zinc oxide-eugenol based root canal sealers in human osteoblastic cells (2003). *Biomaterials* **24**: 1869-1875.
52. Huang FM, Tai KW, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of resin-, zinc oxide-eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells (2002). *Int Endod J* **35**: 153-158.
53. Huang FM, Tsai CH, Yang SF, Chang YC. Induction of interleukin-6 and interleukin-8 gene expression by root canal sealers in human osteoblastic cells (2005). *J Endod* **31**: 679-683.
54. Huang TH, Ding SJ, Hsu TZ, Lee ZD, Kao CT. Root canal sealers induce cytotoxicity and necrosis (2004). *J Mater Sci Mater Med* **15**: 767-771.
55. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A, Yoshiki S, Matsuda T, Hirano T, et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption (1990). *J Immunol* **145**: 3297-3303.
56. Jakab L. [Bone tissue: rebuilding and inflammation] (2014). *Orv Hetil* **155**: 1575-1583.
57. Jeanneau C, Giraud T, Laurent P, About I. BioRoot RCS Extracts Modulate the Early Mechanisms of Periodontal Inflammation and Regeneration (2019). *J Endod* **45**: 1016-1023.
58. Johnson WB. A new gutta-percha technique (1978). *J Endod* **4**: 184-188.
59. Jung S, Libricht V, Sielker S, Hanisch MR, Schäfer E, Dammaschke T. Evaluation of the biocompatibility of root canal sealers on human periodontal ligament cells ex vivo (2019). *Odontology* **107**: 54-63.
60. Jung S, Sielker S, Hanisch MR, Libricht V, Schäfer E, Dammaschke T. Cytotoxic effects of four different root canal sealers on human osteoblasts (2018). *PLoS One* **13**: e0194467.

61. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats (1965). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **20**: 340-349.
62. Karapınar-Kazandağ M, Bayrak OF, Yalvaç ME, Ersev H, Tanalp J, Sahin F, Bayırlı G. Cytotoxicity of 5 endodontic sealers on L929 cell line and human dental pulp cells (2011). *Int Endod J* **44**: 626-634.
63. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity (2000). *Annu Rev Immunol* **18**: 621-663.
64. Kebudi Benezra M, Schembri Wismayer P, Camilleri J. Interfacial Characteristics and Cytocompatibility of Hydraulic Sealer Cements (2018). *J Endod* **44**: 1007-1017.
65. Kerr JF. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death (1971). *J Pathol* **105**: 13-20.
66. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics (1972). *Br J Cancer* **26**: 239-257.
67. Kleier DJ, Averbach RE. Painful dysesthesia of the inferior alveolar nerve following use of a paraformaldehyde-containing root canal sealer (1988). *Endod Dent Traumatol* **4**: 46-48.
68. Komabayashi T, Colmenar D, Cvach N, Bhat A, Primus C, Imai Y. Comprehensive review of current endodontic sealers (2020). *Dent Mater J* **39**: 703-720.
69. Lee BN, Hong JU, Kim SM, Jang JH, Chang HS, Hwang YC, Hwang IN, Oh WM. Anti-inflammatory and Osteogenic Effects of Calcium Silicate-based Root Canal Sealers (2019). *J Endod* **45**: 73-78.
70. Leonardo MR, Bezerra da Silva LA, Filho MT, Santana da Silva R. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers (1999). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **88**: 221-225.
71. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system (2002). *Nat Rev Immunol* **2**: 725-734.
72. Liu YC, Lerner UH, Teng YT. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles (2010). *Periodontol 2000* **52**: 163-206.
73. Lodiene G, Morisbak E, Bruzell E, Ørstavik D. Toxicity evaluation of root canal sealers in vitro (2008). *Int Endod J* **41**: 72-77.

74. Loushine BA, Bryan TE, Looney SW, Gillen BM, Loushine RJ, Weller RN, Pashley DH, Tay FR. Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed bioceramic root canal sealer (2011). *J Endod* **37**: 673-677.
75. Mandal P, Zhao J, Sah SK, Huang Y, Liu J. In vitro cytotoxicity of guttaflow 2 on human gingival fibroblasts (2014). *J Endod* **40**: 1156-1159.
76. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation (2008). *Nature* **454**: 428-435.
77. Messer G, Rupec RA. [Nuclear factor kappa B (NF-kappa B). I. Function and regulation] (2001). *Hautarzt* **52**: 677-685.
78. Mouchlis VD, Dennis EA. Phospholipase A(2) catalysis and lipid mediator lipidomics (2019). *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* **1864**: 766-771.
79. Mukhtar-Fayyad D. Cytocompatibility of new bioceramic-based materials on human fibroblast cells (MRC-5) (2011). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **112**: e137-142.
80. Murakami M, Nakatani Y, Tanioka T, Kudo I. Prostaglandin E synthase (2002). *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**: 383-399.
81. Nemes Z, Jr., Friis RR, Aeschlimann D, Saurer S, Paulsson M, Fésüs L. Expression and activation of tissue transglutaminase in apoptotic cells of involuting rodent mammary tissue (1996). *Eur J Cell Biol* **70**: 125-133.
82. Oliveira SR, Amaral JD, Rodrigues CMP. Mechanism and disease implications of necroptosis and neuronal inflammation (2018). *Cell Death Dis* **9**: 903.
83. Ørstavik D, Nordahl I, Tibballs JE. Dimensional change following setting of root canal sealer materials (2001). *Dent Mater* **17**: 512-519.
84. Pinna L, Brackett MG, Lockwood PE, Huffman BP, Mai S, Cotti E, Dettori C, Pashley DH, Tay FR. In vitro cytotoxicity evaluation of a self-adhesive, methacrylate resin-based root canal sealer (2008). *J Endod* **34**: 1085-1088.
85. Quality guidelines for endodontic treatment: consensus report of the European Society of Endodontology. (2006). *Int Endod J* **39**: 921-930.
86. Rassow J, Hauser K, Deutzmann R, Netzker R. Duale Reihe Biochemie. 4. Auflage, 2016: Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
87. Ricucci D, Loghin S, Siqueira JF, Jr. Correlation between clinical and histologic pulp diagnoses (2014). *J Endod* **40**: 1932-1939.

88. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death (2004). *Oncogene* **23**: 2861-2874.
89. Santos JM, Pereira S, Sequeira DB, Messias AL, Martins JB, Cunha H, Palma PJ, Santos AC. Biocompatibility of a bioceramic silicone-based sealer in subcutaneous tissue (2019). *J Oral Sci* **61**: 171-177.
90. Schilder H. Filling root canals in three dimensions. 1967 (2006). *J Endod* **32**: 281-290.
91. Seo DG, Lee D, Kim YM, Song D, Kim SY. Biocompatibility and Mineralization Activity of Three Calcium Silicate-Based Root Canal Sealers Compared to Conventional Resin-Based Sealer in Human Dental Pulp Stem Cells (2019). *Materials (Basel)* **12**: 2482.
92. Shimauchi H, Takayama S, Miki Y, Okada H. The change of periapical exudate prostaglandin E2 levels during root canal treatment (1997). *J Endod* **23**: 755-758.
93. Siqueira JF, Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives (2002). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **94**: 281-293.
94. Smith WL. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action (1989). *Biochem J* **259**: 315-324.
95. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology (2000). *Annu Rev Biochem* **69**: 145-182.
96. Souza GL, Rosatto CMP, Silva MJB, Silva MV, Rocha Rodrigues DB, Moura CCG. Evaluation of apoptosis/necrosis and cytokine release provoked by three root canal sealers in human polymorphonuclears and monocytes (2019). *Int Endod J* **52**: 629-638.
97. Spångberg LS, Barbosa SV, Lavigne GD. AH 26 releases formaldehyde (1993). *J Endod* **19**: 596-598.
98. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization (1998). *Mol Cell* **1**: 949-957.
99. Stojcic S, Zivkovic S, Qian W, Zhang H, Haapasalo M. Tissue dissolution by sodium hypochlorite: effect of concentration, temperature, agitation, and surfactant (2010). *J Endod* **36**: 1558-1562.

100. Szczurko G, Pawińska M, Łuczaj-Cepowicz E, Kierklo A, Marczuk-Kolada G, Hołownia A. Effect of root canal sealers on human periodontal ligament fibroblast viability: ex vivo study (2018). *Odontology* **106**: 245-256.
101. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease (2014). *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**: a016295.
102. Tanomaru JM, Cezare L, Gonçalves M, Tanomaru Filho M. Evaluation of the radiopacity of root canal sealers by digitization of radiographic images (2004). *J Appl Oral Sci* **12**: 355-357.
103. Tomokiyo A, Hasegawa D, Ono T, Nagano R, Ipposhi K, Yamashita K, Alhasan MA, Maeda H. Characterization of a clonal human periodontal ligament stem cell line exposed to methacrylate resin-, bioactive glass-, or silicon-based root canal sealers (2021). *Odontology (online)*
<https://doi.org/10.1007/s10266-021-00648-7>
104. Tomson PL, Simon SR. Contemporary Cleaning and Shaping of the Root Canal System (2016). *Prim Dent J* **5**: 46-53.
105. Tomson RM, Polycarpou N, Tomson PL. Contemporary obturation of the root canal system (2014). *Br Dent J* **216**: 315-322.
106. Torabinejad M, Walton RE. endodontics: principles and practice 4. Auflage 2009: St. Louis
107. Tu MG, Sun KT, Wang TH, He YZ, Hsia SM, Tsai BH, Shih YH, Shieh TM. Effects of mineral trioxide aggregate and bioceramics on macrophage differentiation and polarization in vitro (2019). *J Formos Med Assoc* **118**: 1458-1465.
108. 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). *Cytometry* **31**: 1-9.
109. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis (1995). *Science* **270**: 1326-1331.
110. Yu MK, Lee YH, Yoon MR, Bhattarai G, Lee NH, Kim TG, Jhee EC, Yi HK. Attenuation of AH26-induced apoptosis by inhibition of SAPK/JNK pathway in MC-3T3 E1 cells (2010). *J Endod* **36**: 1967-1971.
111. Zhang W, Li Z, Peng B. Ex vivo cytotoxicity of a new calcium silicate-based canal filling material (2010). *Int Endod J* **43**: 769-774.

112. Zhang W, Peng B. Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of iRoot SP, MTA and AH Plus (2015). *Dent Mater J* **34**: 774-780.
113. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3 (1997). *Cell* **90**: 405-413.

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

8.1. Abbildungen

Abbildung 1: schematische Darstellung des intrinsischen Signalwegs der Apoptose (modifiziert nach Rassow et al., 2016)	20
Abbildung 2: schematische Darstellung des extrinsischen Weges des Apoptose (modifiziert nach Rassow et al., 2016)	20
Abbildung 3: Entwicklung einer normalen Zelle zu einer onkotischen und nekrotischen Zelle (D'Arcy, 2019)	22
Abbildung 4: Aktivierungsweg des NF- κ B (P=Phosphorylierung des Proteins; IKK= I κ BKinase) (modifiziert nach Guo et al., 2012).....	24
Abbildung 5: Prostaglandin E ₂ Synthese und Wirkung (modifiziert nach Hein und O'Banion, 2009)	25
Abbildung 6: Fotografie der hPDLF durch das Lichtmikroskop	28
Abbildung 7: Fotografie der hOB durch das Lichtmikroskop	28
Abbildung 8: WST-8 Umsetzung zu WST-8-Formazan (Promokine,Heidelberg,Deutschland)	32
Abbildung 9: 96-Well-Platte nach abgelaufener Farbreaktion.....	33
Abbildung 10: Grundprinzip des Realtime-Glo-Annexin-V-Assays (Promega) .	34
Abbildung 11: Mikrotiterplatte nach abgelaufener Farbreaktion.....	37
Abbildung 12: Standardkurve ELISA IL-6.....	37
Abbildung 13: Standardkurve EIA PGE ₂	39
Abbildung 14: Ergebnisse des WST-8-Assays der mit den 24 h eluierten Proben inkubierten hPDLF.....	40
Abbildung 15: Ergebnisse des WST-8-Assays der mit den 7d eluierten Proben inkubierten hPDLF.....	42
Abbildung 16: Ergebnisse des WST-8-Assays der mit den 24h eluierten Proben inkubierten hOB.....	43
Abbildung 17: Ergebnisse des WST-8-Assays der mit den 7d eluierten Proben inkubierten hOB.....	44
Abbildung 18: Annexin-V-Assay: zeitlicher Verlauf der Lumineszenz angegeben in relative luminescence units (RLU).....	46
Abbildung 19: Annexin-V-Assay: zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz angegeben in relative fluorescence units (RFU)	48

Abbildung 20: Annexin-V-Assay: Ergebnisse der Lumineszenzmessung der hPDLF und hOB	49
Abbildung 21: Annexin-V-Assay: Ergebnisse der Fluoreszenzmessung der hPDLF und hOB	50
Abbildung 22: Ergebnisse des IL-6-ELISAs (hPDLF).....	51
Abbildung 23: Ergebnisse des IL-6-ELISAs (hOB).....	52
Abbildung 24: Ergebnisse des PGE ₂ -EIAs (hPDLF)	53
Abbildung 25: Ergebnisse des PGE ₂ -EIAs (hOB)	54

8.2. Tabellen

Tabelle 1: Kriterien für einen idealen Wurzelkanal Sealer nach Grossman (Torabinejad und Walton, 2009)	11
Tabelle 2: verwendete Sealer mit LOT-Nummern.....	31

9. Abkürzungsverzeichnis

1-Methoxy PMS.....	1- Methoxy-5-methylphenazinium-methyl-sulfat
Abb.....	Abbildung
ca.....	circa
CCVK I.....	Colometric cell viability kit I
CHX.....	Chlorhexidin
EDTA.....	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA.....	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK1/2.....	extrazelluläre signalregulierte Proteinkinasen 1/2
hOB.....	humane Osteoblasten
hPDLF.....	humane Fibroblasten des parodontalen Ligaments
IgG.....	Immunglobulin G
IL-6.....	Interleukin 6
IL-8.....	Interleukin 8
LPS.....	Lipopolysaccharide
MAPK.....	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MHC.....	major histocompatibility complex/Haupthistokompatibilitätskomplex
MTA.....	Mineral-Trioxid-Aggregat
MTT.....	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaOCl.....	Natriumhypochlorit
NF- κ B.....	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NSB.....	no sognificant binding
PARP.....	Poly ADP-Ribose Polymerase
PBS.....	phosphate buffered saline/phosphatgepufferter Salzlösung
PGE ₂	Prostaglandin E2
p-Npp.....	Para-Nitrophenylphosphat-Lösung, Para-Nitrophenylphosphat
PS.....	Phosphatidylserin
SAPK/JNK.....	stressaktivierte Protein/C-Jun-N-terminale Kinasen
TA.....	total activity
TMB.....	Tetramethylbenzidin
TNF.....	Tumornekrosefaktor
WST-8.....	water soluble tetrazolium salt/ wasserlösliches Tetrazolium Salz

10. Reagenzien und Chemikalien

10.1. verwendete Chemikalien

alpha-MEM-Medium (Gibco/life technologies)
fetales Kälber Serum (Sigma-Aldrich)
Osteoblast Growth Medium (PromoCell)
Penicillin G (Sigma-Aldrich)
phosphatgepufferter Salzlösung (Sigma-Aldrich)
Staurosporin (1 μ M) (Sigma-Aldrich)
Streptomycin (Sigma-Aldrich)
TNF- α (Sigma-Aldrich)
Triton X-100 (Sigma-Aldrich)
Trypanblau (Gibco/ life sciences)
Trypsin-EDTA Lösung (Sigma-Aldrich)

10.2. verwendete Kits

Colometric Cell Viability Kit I (PromoCell)
Human IL-6 Quantikine-Elisa Kits (R&D Systems)
PGE₂ high sensitivity ELISA kit (Enzo life Scienceces)
RealTime-Glo™ Annexin V Apoptose und Nekrose Assay (Promega)

11. Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich noch bei Allen Bedanken, die mich bei meiner Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Allen voran gilt mein Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Karin Christine Huth, durch die mir diese Dissertation überhaupt erst ermöglicht wurde. Vielen Dank für die Bereitstellung aller Ressourcen und den unkomplizierten und reibungslosen Verlauf dieser Arbeit.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel, Direktor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, dass ich meine Arbeit in seiner Abteilung schreiben durfte.

Besonderer Dank gilt vor allem Herrn Dr. med. dent. Maximilian Kollmuß, der meine Arbeit mit außerordentlichem Engagement betreut hat und mir bei allen Fragen stets zur Seite stand. Ohne sein Wissen und seine Geduld wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Auch bei meinen Eltern, meiner Schwester Katharina, meiner Freundin Magdalena und meinem Freund Luca möchte ich mich für den Beistand und dafür, dass sie immer für mich da waren, bedanken.

Eidesstattliche Versicherung

Nathalie Gebhardt

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

In vitro Untersuchung der Wirkung verschiedener Sealermaterialien auf Zellen des oralen Systems im Hinblick auf Zytotoxizität und Entzündungsreaktion

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, den 26.05.2023

Nathalie Gebhardt