

Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. dent. Daniel Edelhoff

Untersuchung zum Elutionsverhalten und Bakterienwachstum
von additiv, subtraktiv und klassisch zu verarbeitenden
PMMA-Schienenmaterialien

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

vorgelegt von
Lennart Paul Wedekind

aus
München

Jahr
2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. dent. Jan-Frederik GÜth

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Rainer Haas
PD Dr. Luisa Jiménez Soto

Mitbetreuung durch die
Promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Christof Högg
Dr. med. dent. Maximilian Kollmuß
Prof. Dr. med. dent. Dr. rer. nat. Franz-Xaver Reichl

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2023

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1. Computer-Aided-Design/Computer-Aided-Manufacturing.....	3
2.2. Additive Fertigung	5
2.2.2. Prozesskette der additiven Verfahren	7
2.2.3. Einsatz von additiver Fertigung in Medizin und Zahnmedizin	7
2.2.4. Gängige Verfahren der additiven Fertigung in der Zahnmedizin.....	9
2.2.4.1. Stereolithografie (STL, SL oder SLA):.....	10
2.2.4.2. Digital Light Processing (DLP).....	11
2.2.4.3. Selektives Lasersintern (SLS).....	12
2.2.4.4. Injekt-based System/3D-Print (3DP).....	13
2.2.4.5. Fused Deposition Modelling (FDM)/Fused Filament Fabrication (FFF).....	14
2.3. Dentale Kunststoffe.....	15
2.3.1. Polyreaktionen von Matrixkunststoffen	16
2.3.1.1. Polymerisation	16
2.3.1.1.1. Radikalische Polymerisation.....	17
2.3.1.1.2. Ionische Polymerisation	18
2.3.1.2. Polykondensation und Polyaddition	18
2.3.2. Polymethylmethacrylat (PMMA)/Acrylglas.....	18
2.3.3. Polymerdegradation.....	19
2.3.4. Freisetzung von Restmonomeren	20
2.4. Analysemethoden zur Monomerquantifizierung.....	21
2.4.1. Hochleistungsflüssigchromatografie	22
2.4.2. Gaschromatografie.....	22

2.4.3.	Massenspektrometrie	23
2.5.	Toxikologie und Biokompatibilität von Kunststoffmonomeren.....	23
2.5.1.	Allergische Reaktionen.....	24
2.5.2.	Mutagenität.....	25
2.5.3.	Zytotoxizität.....	26
2.6.	Zusammenhänge von Methacrylaten und Bakterien in der zytotoxischen Wirkung auf humanen Gingivafibroblasten	27
2.7.	Bioadhäsionsvorgänge in der Mundhöhle	29
2.7.1.	Plaqueorganisation und Plaquebildung	29
2.7.2.	Bakterielle Adhäsion und Vermehrung auf zahnärztlichem Restaurationsmaterialien.....	31
2.7.2.1.	Einfluss der Oberflächeneigenschaften auf bakterielle Adhäsion.....	32
2.7.2.1.1.	Oberflächenrauigkeit (SR)	32
2.7.2.1.2.	Freie Oberflächenenergie (SFE).....	33
2.7.2.2.	Einfluss der Materialzusammensetzung auf die bakterielle Adhäsion.....	33
2.8.	Die Rolle der Zahnplaque in Gesundheit und Krankheit.....	34
2.8.1.	Mundgesundheit	34
2.8.2.	Allgemeine Gesundheit	36
2.9.	Analysemethoden zur Quantifizierung der absoluten Bakterienzahl.....	36
2.9.1.	Messung der optischen Dichte.....	36
2.9.2.	Durchflusszytometrie	37
2.9.3.	Titerverfahren	37
3.	Ziel der Untersuchung.....	38
4.	Material und Methoden.....	39
4.1.	Material	39
4.2.	Methoden.....	40
4.2.1.	Versuchsvorbereitung zum Elutionsversuch.....	40

4.2.1.1.	Vorfertigung der Prüfkörper	40
4.2.1.1.1.	Additive Fertigung (3D- Druck): SHERAprint-ortho plus	40
4.2.1.1.2.	Subtraktive Fertigung: SHERAeco-disc PM20.....	40
4.2.1.1.3.	Klassische Fertigung: SHERAORTHOMER	40
4.2.1.2.	Endfertigung der Prüfkörper.....	41
4.2.1.3.	Herstellung einer Kaffeinlösung als internes Richtmaß.....	41
4.2.1.4.	Vorbereitung der Prüfkörper in Wasser	41
4.2.1.5.	Vorbereitung der Prüfkörper in Methanol	42
4.2.2.	Analysedurchführung zur Elution.....	42
4.2.3.	Versuchsaufbau zur Zytotoxizitätsbestimmung im XTT-Test.....	43
4.2.3.1.	Chemikalien.....	43
4.2.3.2.	Zellkulturen	43
4.2.3.3.	XTT-Test.....	43
4.2.4.	Schienenkonstruktion und -vermessung.....	44
4.2.5.	Datenauswertung der GC/MS und XTT-Test Ergebnisse.....	44
4.2.6.	Versuchsaufbau zur Messung des bakteriellen Wachstums.....	44
4.2.6.1.	Prüfkörperherstellung.....	44
4.2.6.2.	Desinfektion der Prüfkörper	44
4.2.6.3.	Bakterienauswahl und Stammhaltung.....	45
4.2.6.4.	Nährmedienauswahl.....	45
4.2.7.	Versuchsaufbau zur Bakterienadhärenz	46
4.2.7.1.	Versuchsphase 1	46
4.2.7.2.	Versuchsphase 2	46
4.2.8.	Statistische Auswertung zum bakteriellen Wachstum	47
5.	Ergebnisse	48
5.1.	Ergebnisse der Elution.....	48

Inhaltsverzeichnis

5.1.1.	Gelöste Substanzen aus SHERAprint-ortho plus	49
5.1.2.	Gelöste Substanzen aus SHERAORTHOMER	50
5.1.3.	Gelöste Substanzen aus SHERAeco-disc PM20	50
5.2.	Ergebnisse zur Zytotoxizitätsbestimmung im XTT-Test	51
5.3.	Ergebnisse zur Schienenvermessung	52
5.4.	Ergebnisse zur Messung des bakteriellen Wachstums	53
5.4.1.	Actinomyces naeslundii.....	53
5.4.2.	Streptococcus mutans.....	54
6.	Diskussion	56
6.1.	Diskussion von Material und Methode zum Elutionsversuch.....	57
6.1.1.	Auswahl der Kunststoffe	57
6.1.2.	Herstellung der Prüfkörper	57
6.1.3.	Messmethode.....	58
6.1.4.	Auswahl des Lösungsmittels	59
6.1.5.	Elutionszeitraum	60
6.2.	Diskussion von Material und Methode zum bakteriellen Wachstum.....	61
6.2.1.	Auswahl der Bakterien	61
6.2.2.	Analysemethode zu Quantifizierung der absoluten Bakterienzahl	63
6.2.3.	Desinfektion der Prüfkörper.....	63
6.3.	Diskussion der Ergebnisse zur Elution.....	64
6.3.1.	Elutionsverhalten der Schienenmaterialien und Einschätzungen zur toxikologischen Relevanz.....	64
6.4.	Diskussion der Ergebnisse zum bakteriellen Wachstum.....	72
6.4.1.	Bakterielles Wachstum.....	72
7.	Zusammenfassung	77
8.	Literaturverzeichnis	80

Inhaltsverzeichnis

9. Anhang	92
9.1. Abbildungsverzeichnis.....	92
9.2. Diagramm- und Tabellenverzeichnis.....	92
9.3. Abkürzungsverzeichnis	94
9.4. Politurprotokoll	96
Danksagung	97
Publikationsliste	98
Eidesstattliche Versicherung	99

1. Einleitung

Besonders in den letzten drei Jahrzehnten haben die computergestützte Planung und Konstruktion (CAD: Computer Aided Design) sowie die computergestützte Fertigungstechnik (CAM: Computer Aided Manufacturing) auch in der Zahnmedizin stetig an Stellenwert dazugewonnen [1-4]. Obwohl der Begriff „CAM“ an sich keine Aussage über die Art der Fertigungstechnik erlaubt, war diese über viele Jahre eng mit der subtraktiven Frästechnik verbunden [5]. Da diese Technik jedoch durch das Herausfräsen aus einem Block eher materialineffizient arbeitet und Detailgenauigkeit und Form in gewisser Weise limitiert sind [6], gewinnen seit einigen Jahren, ermöglicht durch technischen Fortschritt und sinkende Anschaffungs- und Produktionskosten, verschiedene Additivverfahren weiter an Stellenwert in der Zahnmedizin [7]. Im additiven Schicht-für-Schicht-Verfahren wird eine dreidimensionale Objektdatei in sehr viele feine Einzelschichten zerlegt, welche im Fertigungsprozess dann schrittweise übereinander „gedruckt“ werden. So arbeitet die additive Produktion sehr viel materialsparender gegenüber den subtraktiven Techniken und der Gestaltung sind kaum mehr Grenzen gesetzt. Zu den gängigsten Verfahren in der Zahnmedizin zählen aktuell die Stereolithographie (SLA, SL), Digital Light Processing (DLP), selektives Lasersintern (SLS), das Inkjet-Based System (3DP), sowie das Fused Deposition Modelling (FDM)[6, 8, 9]. Mit diesen können unterschiedlichste Materialklassen wie Metalle, Kunststoffe, Wachse und Keramiken verarbeitet werden [5, 10]. Durch diese neuen Fertigungstechniken, mit speziell darauf abgestimmten Materialien, ergibt sich auch im Bereich der Materialkunde neuer Forschungsbedarf. Dies trifft insbesondere auch für den Bereich der Biokompatibilität von methacrylatbasierten Materialien zu. Bei einer inkompletten Konversion steigt das Risiko der Freisetzung ungebundener (Ko-) Monomere und Additive [11, 12]. Viele In-vitro-Studien bestätigen die möglichen zytotoxischen, mutagenen, teratogenen und genotoxischen Auswirkungen von Methacrylaten wie Triethylenglykoldimethacrylat (TEGDMA), 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) und Methylmethacrylat (MMA) [13-17].

Nach der zugesprochenen Klasse-IIa-Zertifizierung gemäß dem Medizinproduktegesetz für den Polymethylmethacrylat (PMMA)-Schienenkunststoff SHERAprint-ortho plus (SHERA® Werkstoff-Technologie GmbH & Co. KG, Lemförde, Deutschland), stellt sich die Frage nach dem Elutionsverhalten und damit der Biokompatibilität dieser neuen Materialien. Hierbei ist zu prüfen, ob und in welchen Mengen bei den verschiedenen Herstellungswegen Inhaltstoffe

in Lösung gehen, die ein gesundheitliches Risiko für den Patienten darstellen könnten. Zu materialbedingten Schädigungen der Gewebe kann es jedoch nicht nur durch Substanzen direkt kommen, diese könnten auch indirekt durch ein vermehrtes bakterielles Wachstum auf den Materialien hervorgerufen oder zusätzlich gefördert werden. So kann sich nach *Schmalz* [18] ein Monomer wie Methylmethacrylat (MMA) konzentrationsabhängig hemmend bis fördernd auf das In-vitro-Wachstum von *Streptococcus mutans* auswirken.

Auch andere von der jeweiligen Zusammensetzung abhängige und damit materialspezifische Eigenschaften, wie Polierbarkeit und freie Oberflächenenergie, beeinflussen die Biofilmanlagerung [19-21]. Auch die unterschiedlichen Herstellungstechniken und damit die Polymerisationsbedingungen haben Einfluss auf die Materialhomogenität, was sich auf die bakterielle Besiedelung auswirken könnte.

Eine vermehrte Biofilmbildung kann die Entstehung zahnbezogener Krankheiten wie Karies oder Parodontitiden begünstigen, die unbehandelt zu Infektionen und Zahnverlust führen können [22, 23]. Dies kann psychosoziale Folgen mit gesellschaftlichem Rückzug und die Entwicklung von Ängsten und Depressionen mit sich bringen [24]. Biofilme der Mundhöhle werden auch mit dem vermehrten Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen [25] sowie mit Diabetes mellitus in Verbindung gebracht [26].

So besteht auch im Bereich der Biofilmbildung Untersuchungsbedarf, inwieweit sich die neuen Techniken der additiven Schichtung und die Oberflächeneigenschaften neuer Materialzusammensetzungen auf bakterielle Anlagerung und Wachstum auswirken.

Ziel dieser Studie ist es, drei PMMA-Schienenmaterialien aus drei unterschiedlichen Verarbeitungstechniken, additiv (3D-gedruckt), subtraktiv (gefräst) und klassisch laborgefertigt (Pulver-Flüssigkeits-Gemisch), auf das jeweilige In-vitro-Elutionsverhalten hin zu untersuchen. Die Einzelkomponenten sollen in einer Risikoanalyse auf Schienenmaße bezogen und mit Literaturdaten sowie, wo fehlend, mit Daten aus eigenen Zytotoxizitätstests mit humanen Gingivafibroblasten (HGF) abgeglichen werden. Des Weiteren sollen auf den Schienenmaterialien Untersuchungen zur Oberflächenbesiedelung oraler Plaquebakterien in Monospezieskultur durchgeführt werden, indem die absolute Zahl adhärenter kolonienbildender Einheiten (KBE) bestimmt wird.

Die Ergebnisse zur Elution wurden vom Autor bereits in 'Dental Materials' veröffentlicht [27].

2. Literaturübersicht

2.1. Computer-Aided-Design/Computer-Aided-Manufacturing

Neben den klassischen händischen Herstellungsverfahren der Zahntechnik haben mit Beginn der 1980er Jahren Schritt für Schritt die computergestützten Design- und Fertigungstechniken, sogenannte Computer-Aided-Design (CAD)/Computer-Aided-Manufacturing (CAM) - Techniken, einen immer größer werdenden Stellenwert eingenommen. Sie sind heute zu einem festen Bestandteil der Arbeitsabläufe vieler Zahnärzte und Zahntechniker geworden und sind aus der Zahnmedizin kaum mehr wegzudenken [1-4]. Da die traditionelle Zahntechnik mit hohem Personalaufwand und viel Arbeitszeit verbunden ist und die Qualität der Arbeit sehr stark von handwerklichen Fähigkeiten abhängt, wird der klare Trend zur Ausweitung der Digitalisierung mit Verknüpfung aller Arbeitsschritte von der Datengenerierung bis zur Produktfertigung in einem sogenannten „digitalen workflow“ weiter anhalten [28].

Hinter den Begriffen „CAD/CAM“ verbergen sich zum einen das „Computer Aided Design“, also die virtuelle Planung und der Entwurf, zum anderen das „Computer Aided Manufacturing“, die computergesteuerte Fertigung. Beim Fertigungsprozess können dabei sowohl subtraktive als auch additive Fertigungstechniken herangezogen werden. Der CAD/CAM-Prozess als Ganzes gliedert sich dabei grob in drei Abschnitte [1, 4, 7]:

1. Zu Beginn steht die Digitalisierung von Raumformen in Datensätze durch ein Digitalisierungsgerät.
2. Im zweiten Abschnitt des CAD/CAM-Prozesses wird anhand der erstellten digitalen Datensätze mit Hilfe von CAD-Software ein Produkt entworfen, beispielsweise eine Krone, eine Prothese oder eine Schiene.
3. Im letzten Abschnitt des CAD/CAM-Prozesses wird die Datei an eine Produktionsstelle übermittelt, welche schließlich das gewünschte Endprodukt fertigen kann.

Im ersten Abschnitt der Digitalisierung gibt es zwei Möglichkeiten des Herangehens. Zum einen die Kontaktabtastung und zum anderen die kontaktfreie Digitalisierung der Oberflächen [29]. Bei der Kontaktabtastung fährt dabei eine Sensorspitze die Konturen des Objektes mechanisch ab und wandelt die Daten in ein dreidimensionales digitales Bild um. Sie liefert

gleichbleibende Genauigkeit, hat keine Probleme mit Reflexionen, Transparenz oder Farben und ist günstiger in der Anschaffung. Nachteilig ist die mögliche Verzerrung nachgiebiger Oberflächen sowie die Limitierung in der Erfassung feinsten Strukturen. Bei der kontaktlosen Digitalisierung werden optische Verfahren wie Licht oder Laser in verschiedensten Techniken eingesetzt.

Der zweite Schritt beinhaltet die Planung und das Design mittels Software, wobei anhand der digitalen Datensätze zunächst das gewünschte Produkt entworfen und dann für die jeweilige Fertigungstechnik Durchführungsbefehle erstellt werden. Die Software schafft damit erst die Basis für die computergestützte Fertigung; durch sie wird der Entwurf von Objekten und ganzen Baureihen im virtuellen Raum möglich.

Beim letzten Schritt, der Fertigung, wurde in der Zahnmedizin zunächst fast ausschließlich auf subtraktive/abtragende Verfahren zurückgegriffen. Hierbei werden für gewöhnlich Numerical- Control- Maschinen (NC-Maschinen) in meist fräsender Technik angewendet [5]. Weitere subtraktive Methoden sind zum Beispiel das Dreheln, das Schleifen, sowie das Brenn-, Laser- und Wasserstrahlschneiden. Die maschinelle Fertigung hat nicht nur viele zahntechnische Abläufe stark beeinflusst, sondern hat auch im Bereich der Werkstoffe zu einer Weiter- und Neuentwicklung vieler Materialien geführt. Vor allem durch die Entwicklung von Hochleistungskeramiken mit gesteigerter Materialgüte und Materialverlässlichkeit hat sich die Bandbreite an Behandlungsmöglichkeiten stark erweitert [30, 31]. Mit Hilfe der CAD/CAM-Technologien können diese Hochleistungskeramiken in der Frästechnik heute mit hoher Genauigkeit verarbeitet werden [1].

Es gibt jedoch auch einige entscheidende Nachteile und limitierende Faktoren, die mit der subtraktiven Frästechnik einhergehen. So limitieren beispielsweise die Größe sowie der ansetzbare Winkel des Fräsaufsatzes die Detailgenauigkeit und Formwiedergabe des Fräsobjektes und damit die Passung [10, 32]. Ist der Durchmesser des kleinstmöglichen Werkzeuges größer als Details des zu erstellten Objektes, so resultiert dies in einem stärkeren Abtrag dieser Bereiche und damit in einer Minderung der Passung. Auch sind starke Unterschnitte meist nicht und Hohlräume nie realisierbar. Bei Bearbeitung extrem harter Materialien, wie vorgesintertem Zirkoniumdioxid, unterliegen die Fräsen einer starken Abnutzung und müssen regelmäßig ersetzt werden [33]. Durch die Sprödigkeit von Keramiken kann es beim Fräsprozess zur Entstehung kleinster Oberflächenrisse kommen, welche sich

später vergrößern und zum Versagen der Versorgung führen können. Ein entscheidender Nachteil der subtraktiven Techniken ist auch die Materialineffektivität, bei welcher aus einem vorgefertigten Materialblock unter hohem Abtrag ein Objekt herausgefräst wird. Im Mittel werden dabei für eine Einzelzahnrestauration etwa 90% des Materialblocks ungenutzt verworfen [4].

Seit einigen Jahren erleben additive Fertigungsverfahren nicht nur in der Industrie, sondern auch in der Medizin und Zahnmedizin einen kontinuierlichen Aufschwung. Durch stetig steigende Genauigkeit und durch die Entwicklung immer ausgereifterer Fertigungstechniken und Abläufe wird den additiven Verfahren das Potenzial zugesprochen, die Zukunft der Zahnmedizin und der Zahntechnik mit zu prägen [34]. Unter anderem haben laut *Torabi et al.* [10] die additive Verfahren 'the potential to overcome known drawbacks of subtractive techniques such as fit problems'.

2.2. Additive Fertigung

Die Internationale Standardisierungsorganisation definiert die additive Fertigung unter dem Standard EN ISO/ASTM 52,900 wie folgt: 'The process of joining materials to make objects from 3D model data, usually layer upon layer, as opposed to subtractive manufacturing technologies' [35]. In der Literatur sind additive Verfahren mehrheitlich unter den Überbegriffen 'Rapid Prototyping' und '3D-printing' zu finden unter denen oft viele verschiedene Herangehensweisen und Techniken der additiven Fertigung verstanden werden. Auch andere Bezeichnungen wie 'Layered Manufacturing' und 'Solid Freeform Fabrication' sowie einige Herstellungsprozesse an sich werden teilweise als Synonyme für das gesamte Feld der additiven Fertigung verwendet. Zudem gibt die DIN EN ISO 17296-2 [36] eine Einteilung zum Überblick über die Prozesskategorien additiver Fertigung, wobei nur ein Teildieser im zahnmedizinischen Bereich Anwendung findet [9].

Der Begriff 'Prototyping' kam dadurch auf, dass in den Anfängen im additiven Verfahren fast ausschließlich Prototypen hergestellt wurden [37]. Dies begründet sich darin, dass besonders bei niedrigen Stückzahlen die Vorteile der additiven Fertigung hervortreten (Abb. 1a), da beispielsweise sehr arbeitsintensive Schritte der klassischen Spitzformherstellung, die sich erst bei steigenden Stückzahlen wirtschaftlich auszahlen, wegfallen. Auch bei steigender Komplexität der Bauteile wird die additive Fertigung immer ökonomischer und ab einem gewissen Grad an Komplexität (z.B. bei Hohlräumen) zur einer sogenannten Killerapplikation,

was bedeutet, dass diese Bauteile nur noch über additive Verfahren hergestellt werden können (Abb. 1b). Dies macht die additive Fertigung in der Zahnmedizin, in der meist patientenindividuelle Einzelstücke gefertigt werden, zu einem überaus interessanten Fertigungsverfahren.

‘Rapid’, also "schnell“, wurde der Prozess aufgrund seiner Geschwindigkeit gegenüber konventionellen Techniken wie der Gussformherstellung genannt. Dass das Verfahren technisch bedingt grundsätzlich schneller abläuft als andere, ist jedoch nichtzutreffend und kann nicht verallgemeinert werden. Subtraktive Techniken beispielweise sind bei einfachen Formen mit den additiven Techniken in der Geschwindigkeit der Umsetzung vergleichbar. Nimmt die Komplexität der Objekte jedoch zu, so kann sich der Berechnungsprozess der fein abgestimmten Instrumentenbewegungen erheblich verlängern. Auch der Arbeitszeitaufwand mit klassischen Methoden wie etwa den Spitzgusstechniken steigt mit der Komplexität der Bauteile stark an. Je größer die Komplexität der Bauteile, desto mehr überwiegen additive Techniken damit in der Kosteneffizienz (Abb. 1b). Mitunter ist ein Bauteil durch seine Komplexität nur additiv herstellbar, was dann eine sogenannte „Killerapplikation“ der additiven gegenüber anderen Fertigungstechniken darstellt.

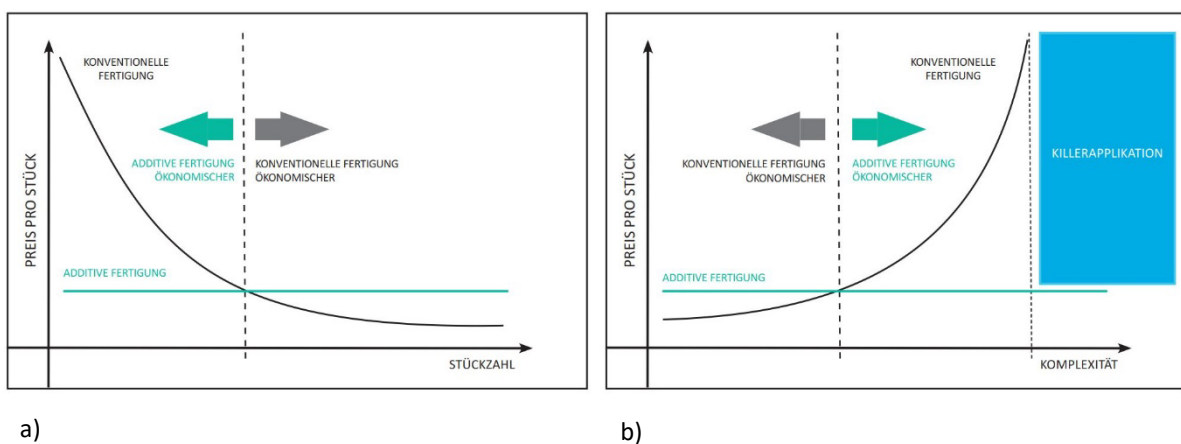


Abbildung 1: Darstellung der Stückpreise von Bauteilen in Abhängigkeit von der Stückzahl (a), sowie der Komplexität (b). Abbildung nach Güth et al. [38]

2.2.2. Prozesskette der additiven Verfahren

In automatisierten, sich wiederholenden Abläufen werden in dieser Technologie Schicht für Schicht dreidimensionale Bauteile aufgebaut. Die Prozessketten, die dabei durchlaufen werden, sind bei allen verfügbaren Geräten gleich. Unterschiede liegen im Erstellungsweg der einzelnen Schichten und deren Verbund.

Zu Beginn steht die softwaregesteuerte Zerlegung eines dreidimensionalen CAD-Datensatzes – dem gewünschten Bauteil – in viele einzelne Schichtdatensätze. Die Schichtdatensätze „bestehen aus den Konturdaten (x-y), der Schichtdicke (z) und der Schichtnummer (oder Z-Koordinate)“ [39]. Die zugrundeliegenden CAD-Datensätze des Bauteils können beispielsweise durch das Scannen von Oberflächenformen, durch bildgebende Verfahren wie der Computertomografie (CT) und der Magnetresonanztomografie (MRT), sowie durch die Konstruktion von CAD-Daten mittels Software erstellt werden.

Die Schichtdatensätze werden an den Drucker übergeben, woraufhin gemäß den Konturen und der gewählten Schichtstärke Schicht für Schicht das Bauteil entsteht. Eine Gemeinsamkeit der additiven Verfahren ist auch, dass neben der Geometrie auch die mechanisch-technologischen Materialeigenschaften des Bauteils erst im Bauprozess selbst entstehen. Ebenso können die Bauteile, solange sie nicht über den Bauraum hinaus ragen, in beliebiger Orientierung platziert werden, wodurch die Problematik des richtigen Verspannens des Werkstückes und der Werkzeuge entfällt [39, 40].

2.2.3. Einsatz von additiver Fertigung in Medizin und Zahnmedizin

Schon seit den 1990er Jahren kommt in der Medizin die additive Fertigung bei der Visualisierung komplexer anatomischer Strukturen und zum Einstudieren von Vorgehensweisen zum Einsatz, wie sie zum Beispiel für die chirurgische Eingriffsplanung nötig sein kann [41-43]. Durch die präzise Darstellung von dreidimensionalen anatomischen Gegebenheiten kann der/die Operateur/-in schon vor dem eigentlichen Eingriff das chirurgische Vorgehen simulieren [44]. Für sehr komplexe Eingriffe kann eine Führungsschablone helfen, wichtige Nachbarstrukturen zu schonen und gute funktionelle und ästhetische Ergebnisse zu erzielen. Wenn nötig, können patientenindividuelle Implantate und Prothesen hergestellt werden, die genau auf die anatomischen Gegebenheiten abgestimmt sind [45]. Im Jahr 1997 berichteten *Van Brussels et al.* [46] als erste über den Entwurf und die

Herstellung einer patientenindividuellen Bohrschablone zur Schraubensetzung bei Wirbelsäuleneingriffen. Heute spielt diese Form der patientenindividuellen Fertigung von chirurgischen Eingriffsschablonen, Implantaten und anatomischen Studienmodellen eine immer größere Rolle in Bereichen wie der Orthopädie, Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Oralchirurgie, Kopfchirurgie, Wirbelsäulenchirurgie und vielen weiteren medizinischen Disziplinen [47].

All diese Vorzüge der Simulation und Eingriffsplanung wären ohne die Möglichkeiten der räumlichen Bildgebung wie beispielsweise der CT, die im Jahr 1973 in die Medizin eingeführt wurde [48], nicht möglich. Bei der CT werden mittels ionisierender Strahlung Unterschiede in der Gewebedichte erkannt und zu einem Schnittbild zusammengesetzt. Schicht für Schicht werden Bilder des Untersuchungsabschnittes aufgenommen, welche dann miteinander verrechnet werden und eine dreidimensionale Wiedergabe anatomischer Strukturen ermöglichen. Eine sehr wichtige Eigenschaft ist dabei die präzise Dimensionswiedergabe, bei welcher, im Gegensatz zu normalen Röntgenaufnahmen, keine Verzerrungsfehler auftreten [49, 50]. Die MRT, die als bildgebende Methode mehr oder weniger zur gleichen Zeit auf den Markt kam, arbeitet wie die CT im Schicht-für-Schicht-Verfahren. Die MRT funktioniert jedoch, anders als die CT, auf der Basis von starken Magnetfeldern und magnetischen Wechselfeldern im Radiofrequenzbereich. Wasserstoffatomkerne werden zur Resonanz angeregt, wobei durch die spezifische Relaxationszeit und die unterschiedliche Dichte an Wasserstoffatomen der einzelnen Gewebe über Umwandlung in elektrische Spannung ein Schnittbild errechnet werden kann.

Diese Bildgebungstechniken bedeuten einen immensen Gewinn für die Diagnostik und Therapie. Für die Therapieplanung und -durchführung können die gewonnenen Bilddaten mit CAD-Software über Standard Transformation/Tesselation Language (STL)-Datensätze kompatibel gemacht werden, was es erlaubt, patientenindividuell angefertigte Schablonen, Guides und Studienmodelle schon in der Phase der Therapieplanung anzufertigen. Hierbei spielt das RP eine zunehmend größere Rolle, da mit eher geringem Zeit-, Kosten- und Personalaufwand komplexe Objekte erbaut werden können. Dabei ist ein wesentlicher Vorteil gegenüber den subtraktiven und klassischen Verfahren, dass kleinste Details wie komplexe innenliegende Strukturen, etwa Nervenkanäle und Sinusse, sowie Hohlräume und Unterschnitte dargestellt werden können. Diese Möglichkeiten der Eingriffsplanung und der

geführten Chirurgie können den Operationserfolg steigern, die Schmerzen der Patienten verringern, sowie die Eingriffszeiten und damit auch signifikant das Risiko für den Patienten senken [42, 51].

Die Möglichkeiten der medizinischen Anwendung additiver Verfahren sind dabei ausgesprochen vielfältig und könnten in einigen Bereichen zu einer Revolutionierung des Gesundheitswesens führen. So wird es in Zukunft vielleicht sogar möglich werden, Gewebe oder ganze Organe im sogenannten 'Bio-Printing' durch additives Zusammensetzen von Zellen zu erbauen. Hierbei könnten neben differenzierteren Körperzellen auch embryonale Stammzellen eingesetzt werden [52].

Seit einigen Jahren findet die additive Fertigung immer häufiger und in immer mehr Bereichen der Zahnheilkunde sowie der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie Anwendung.

Der steigende Einsatz von additiven Techniken liegt zum einen an den sich stetig verbessernden Techniken und der damit verbundenen Eröffnung neuer Möglichkeiten und Felder der Zahnmedizin, zum anderen werden auch Materialien optimiert sowie die Kosteneffizienz gesteigert. Durch die wohl auch zukünftig anzunehmende, anhaltende Kostenreduktion, die stetige Verbesserung der Fertigungsgenauigkeit, sowie die Optimierung der verwendeten Materialien wird die additive Fertigung von *Torabi et al.* [10] auch als „vielversprechende Alternative zur Herstellung von Zahnersatz“ angesehen.

2.2.4. Gängige Verfahren der additiven Fertigung in der Zahnmedizin

Zu den aktuell wichtigsten Herstellungsprozessen der additiven Fertigung in der Zahnmedizin zählen die Stereolithographie (STL, SL, SLA), das Selektive Lasersintern (SLS), das Inkjet-Based System (3DP), sowie das Fused Deposition Modelling (FDM) [6, 8].

2.2.4.1. Stereolithografie (STL, SL oder SLA):

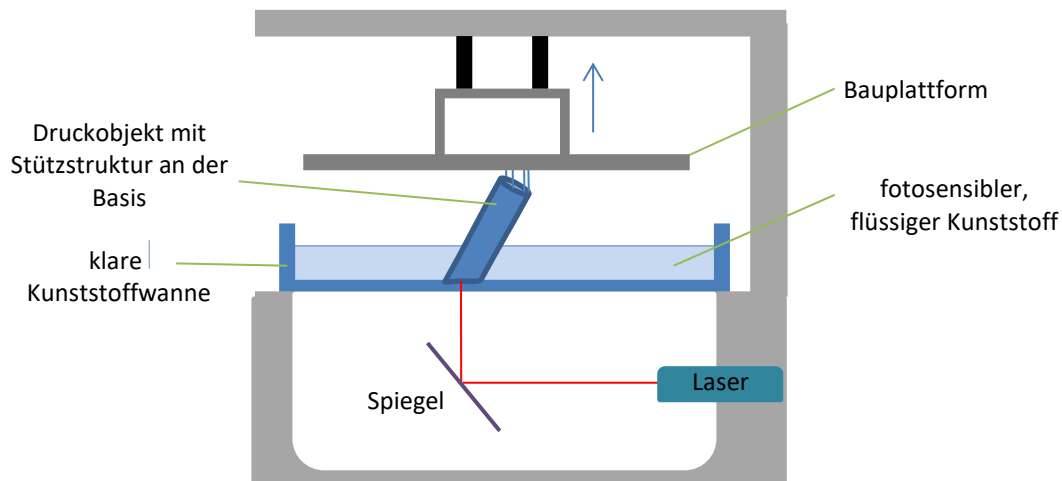


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Stereolithografie

Die Hauptkomponenten der Stereolithografie sind ein fotosensitiver flüssiger Kunststoff (Duomere (Epoxidharze, Acrylate) oder Elastomere) in einer Wanne, eine Bauplattform und eine Lichtquelle (383-405nm) zur Polymerisation/Aushärtung des Kunststoffs.

Die Belichtung der Schichten erfolgt meist durch einen Laser, der, durch computergesteuerte bewegliche Spiegel gerichtet, sukzessive die zu belichtenden Punkte abfährt und dadurch aushärtet. Die Standardschichtstärke bewegt sich je nach Einstellung meist zwischen 0,05 - 0,25 Millimetern [53].

Bei der Baurichtung und Anordnung der Komponenten gibt es Unterschiede. So kann sich die Lichtquelle oberhalb der Kunststoffwanne befinden, wobei sich die Bauplattform während des Druckprozesses immer weiter in den fotosensitiven Kunststoff absenkt. Bei der Belichtung wird die Oberflächenschicht belichtet. Nach der Härtung einer jeden Schicht senkt sich die Bauplattform mitsamt Druckobjekt um einige Millimeter ab, um die Oberfläche mit neuer Kunststoffflüssigkeit zu bedecken, hebt sich dann wieder leicht, und die Oberfläche wird durch eine Schiene eben abgezogen. Dies verhindert einerseits die Blasenbildung und damit die Entstehung von Materialfehlern, und andererseits wird überschüssige Flüssigkeit abgezogen und die gewünschte Schichtstärke erstellt. Zurück bleibt eine Schichtstärke flüssigen Materials, welches nun wieder mit UV-Licht belichtet wird. Dieses Vorgehen wiederholt sich bis zur Fertigstellung des Druckobjekts. Eine weitere Möglichkeit der Komponentenordnung ist die 'bottom-up'-Stereolithografie. Hierbei erfolgt die Belichtung von unten durch eine klare Kunststoffwanne, wobei das Druckobjekt an der Trägerplattform langsam Richtung

Oberfläche entsteht. Nach der Belichtung einer Schicht wird diese vom Wannengrund abgezogen und im Abstand einer Schichtstärke erneut positioniert. Die nächste Schicht wird belichtet. Ein Vorteil hierbei ist, dass das Bauteil in der Z-Achse über den Trägerwannenrand gebaut werden kann, wodurch sehr viel weniger flüssiges Material in der Wanne vorhanden sein muss.

Das Druckobjekt ist an seiner Basis und an kritischen Überhangstellen über Stützstrukturen mit der Bauplattform verbunden; diese müssen nach dem Fertigungsprozess bei einigen Systemen teilweise mühsam entfernt werden.

2.2.4.2. Digital Light Processing (DLP)

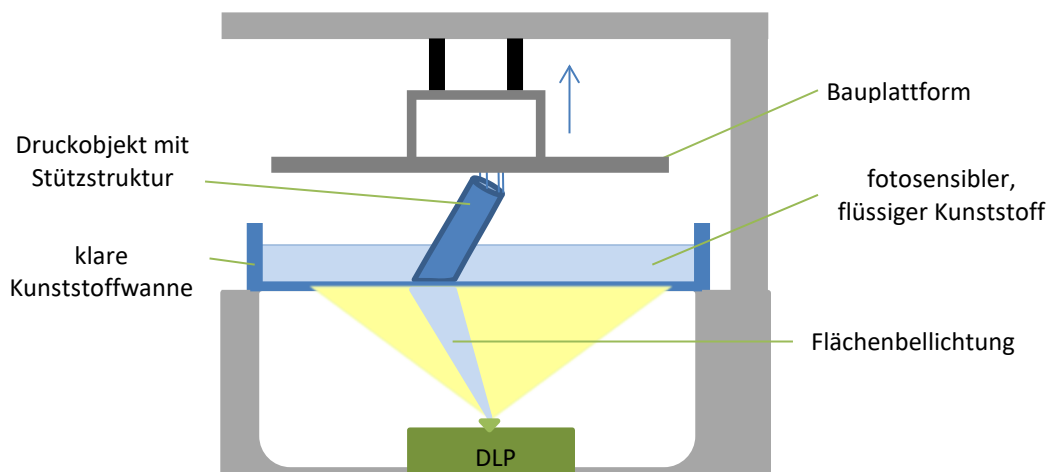


Abbildung 3: Schematische Darstellung der DLP-Technik

Die Hauptkomponenten der DLP- Technik sind der `bottom-up`-Stereolithografie sehr ähnlich. Statt eines Laserpunkts kommt hier ein hochauflösender Digital-Light-Processing-(DLP)-Projektor zum Einsatz. Gemäß dem Schichtbild erfolgt durch ultraviolettes Licht schichtweise die punktgenaue Aushärtung des fotosensitiven Kunststoffs.

Bei der Flächenbelichtung wird die Druckgeschwindigkeit gegenüber der Stereolithografie erhöht, da jede Schicht als Ganzes belichtet wird und kein einzelner Laserpunkt alle Bereiche nacheinander abfahren und belichten muss. Die Oberflächenqualität sowie die Darstellbarkeit von Kanten und Details wird als gut beschrieben [39, 53].

2.2.4.3. Selektives Lasersintern (SLS)

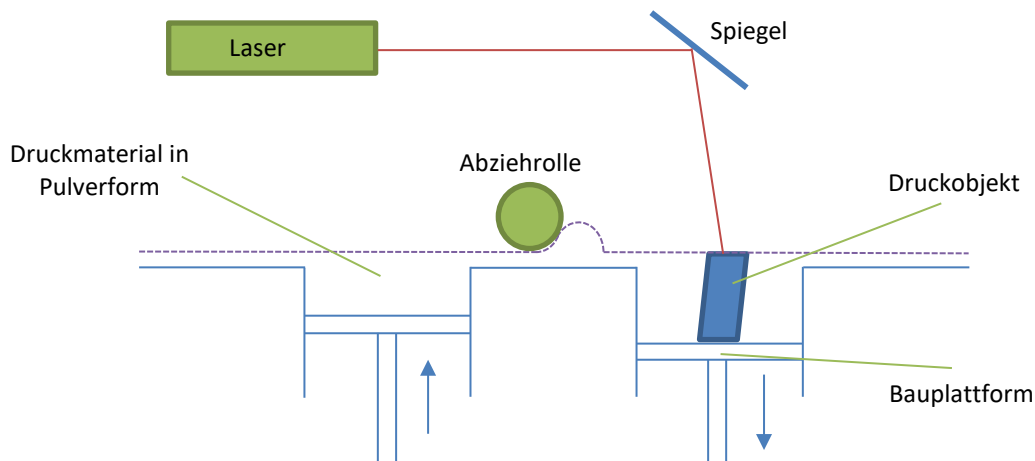


Abbildung 4: Schematische Darstellung der SLS-Technik

Die Hauptkomponenten des SLS sind das jeweilige Material in Pulverform, ein gerichteter Laser, der Bauraum sowie ein Abzieher oder eine Rolle, durch die neues Material verteilt und verdichtet wird.

In der SLS-Technik, welche seit Mitte der 1980er Jahre auf dem Markt ist [54], können verschiedenste thermoplastische Materialien wie beispielsweise einige Metalle/Legierungen, Keramiken, thermoplastische Kunststoffe, eine Vielfalt an Nylonmaterialien sowie Gusswachse verwendet werden. Die große Bandbreite an einsetzbaren Materialien macht diese Technik durchaus sehr interessant für den zahnmedizinischen Gebrauch [5]. In Bezug auf den Einsatz von Metallen im Rahmen dieser Technik wird in der Literatur auch häufig von 'Selektive Laser Melting' (SLM) oder vom 'Direct Metal Laser Sintering' gesprochen, obwohl hierbei feine Unterschiede in der Art des Aufschmelzens bestehen [6, 10].

Der Bauprozess läuft wie folgt ab: Aus einem Pulverreservoir wird die gewünschte Schichtstärke Pulver über der Bauplattform verteilt und durch Abzieher oder eine Rolle verdichtet. Ein computergesteuerter Laser fährt die Oberfläche ab und verschmelzt die Partikel gemäß dem jeweiligen Schichtbild. Der Bauraum senkt sich um eine Schichtstärke ab und eine neue Schicht Pulver wird auf der Oberfläche verteilt, verdichtet und auf die vorangegangene Schicht aufgeschmolzen. Schicht für Schicht entsteht das Bauteil [5].

Der Prozess ist durch das Pulverbett selbststützend und bedarf an sich keiner Stützstrukturen am Druckobjekt. Um mit einer möglichst kurzen Einwirkzeit des Lasers auszukommen, sollte das Pulverbett bereits bis kurz unter den Schmelzpunkt erhitzt sein. Die

Dimensionsveränderung durch das Schrumpfen beim Abkühlen sollte einberechnet werden, durch sie können zudem Spannungen im Druckobjekt entstehen. Neben der Schrumpfung beim Erstarren wirkt sich auch die Partikelgröße und die Größe des Laserstrahls limitierend auf die Genauigkeit des Drucks aus. Im SLM-Verfahren kann wie bei gegossenen Objekten eine nahezu perfekte Dichte ohne Porosität oder Risse erzielt werden. Teilweise enthält der Bauraum ein Schutzgas, um ungewünschte Oxidationsvorgänge zu verhindern [53, 55].

Zahnmedizinisch sehr interessant ist auch die Möglichkeit der additiven Fertigung von Metallen und Metalllegierungen wie etwa Kobalt-Chrom-Legierungen, welche zwar über sehr gute mechanische Eigenschaften verfügen, für gewöhnlich jedoch weit schwieriger zu verarbeiten sind als Edelmetalle. Auch ist die Fertigung mit Titan, Titanlegierungen und rostfreiem Stahl möglich [6].

Die verfügbaren Polymerisate verfügen über sehr gute Materialeigenschaften und haben hohe Schmelzpunkte, oberhalb der Autoklaviertemperatur von 134° Celsius.

Als nachteilig wird der teils hohe Aufwand in der Nachbearbeitung mit Entfernung von überschüssigem Pulver angesehen. Das extrem feine, teilweise in Nanopartikelgröße vorliegende Metallpulver könnte zudem sicherheits- und gesundheitsrelevante Problematiken mit sich bringen [6].

2.2.4.4. Injekt-basiertes System/3D-Print (3DP)

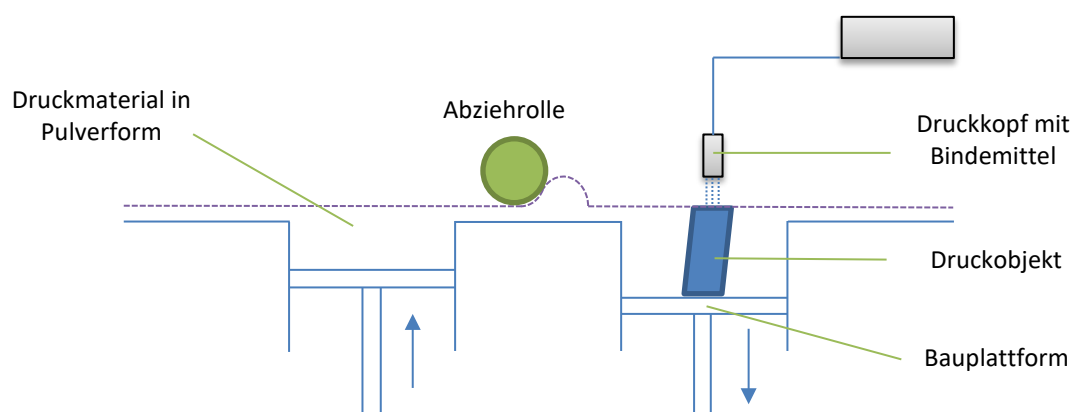


Abbildung 5: Schematische Darstellung der 3DP-Technik

Die Hauptkomponenten der 3DP- Technik sind das jeweilige Material in Pulverform, ein Druckkopf mit Bindemittel, der Bauraum, ein Materialdepot sowie ein Abzieher oder eine Rolle, wodurch neues Material verteilt und verdichtet wird.

Einsetzbare Materialien sind unter anderem Gipse, Kunststoffe, Keramiken und Zellulose. Die 3DP-Technik funktioniert im Prinzip ähnlich dem zweidimensionalen Tintenducken, beziehungsweise im Aufbau dem SLS. Ein Druckkopf mit Düsen verteilt feinste Tröpfchen Bindemittel auf einem Pulverbett über dem Bauraum. Durch das Bindemittel kommt es zur Verklebung oder Kristallisierung der Partikel. Der Bauprozess läuft ähnlich der SLS-Technik ab. Statt einem Laser kommt jedoch der Druckkopf mit Bindemittel zur Härtung des Pulvers zum Einsatz. Dieser Druckkopf bewegt sich dabei in der x- und y-Achse. In der z-Achse bewegt sich der Bauraum. Durch farbige Bindemittel ist unter Verwendung mehrerer Druckköpfe die Herstellung von vielfarbigen Bauteilen möglich. Im Anschluss an den Druckvorgang wird das Bauteil vom umgebenden und anhängigen Pulver gefreit. Nicht verklebtes Pulver wird nach dem Aussieben erneut verwendet. Die Oberfläche des Bauteils kann abschließend durch ein Versiegelungsmittel (beispielsweise Epoxidharze, Wachse oder Kunststoff) geglättet und gehärtet werden [6, 53].

2.2.4.5. Fused Deposition Modelling (FDM)/Fused Filament Fabrication (FFF)

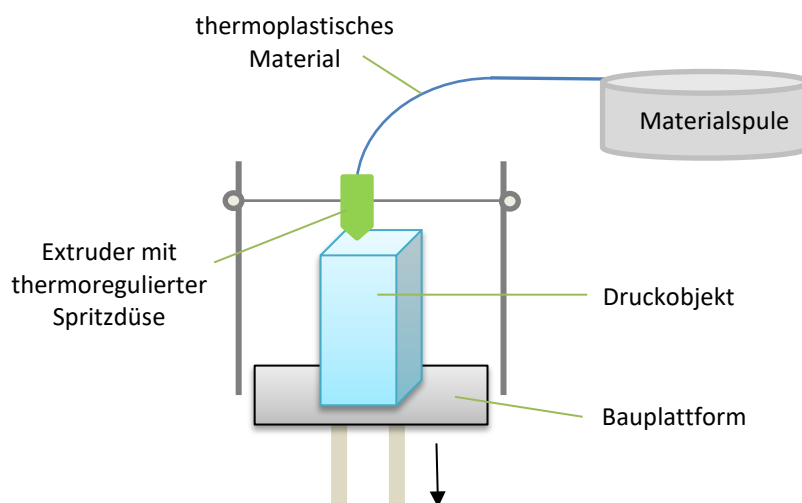


Abbildung 6: Schematische Darstellung der FDM-/FFF-Technik

Die Hauptkomponenten der FDM-Technik, (Namens- sowie Patentrecht bei der Firma Stratasys) sowie der grundsätzlich vergleichbaren FFF-Technik, sind eine Spule mit einem drahtförmigen thermoplastischen Kunststoff, Wachs oder Silikon, ein Extruder, welcher das zähplastische Material aus einer thermoregulierten Spritzdüse presst, und der Bauraum.

Eingesetzt werden Materialien wie Acrylnitril-Butadien-Styrol (ABS), Polylactide (PLA), Wachs, Laywood (Holzdraht) und Laybrick (Sandstein) [53]. Aufgrund des verhältnismäßig geringen

Anschaffungspreises ist vor allem die FFF-Technik das am meisten verbreitete RP-Verfahren im Hobbybereich [53].

Der Bauvorgang läuft wie folgt ab: Von einer Spule wird ein drahtförmiges, schmelzfähiges Baumaterial abgerollt und von einem Extruder durch eine beheizte Spritzdüse geführt, wodurch das Baumaterial in eine plastische Phase überführt und in Linien auf die Bauplattform bzw. auf selbiger auf bereits erstarrtes Baumaterial aufgetragen wird. Nach dem Aufbringen einer Schichtebene werden Bauteil oder Spritzdüse um eine Schichtstärke voneinander entfernt und die nächste Schicht aufgedruckt.

Da das Bauteil nicht wie bei einigen anderen Techniken durch ein Pulverbett gestützt wird, werden an einigen Überhangstellen Stützstrukturen notwendig. Diese müssen nach der Fertigstellung entfernt werden. Die Oberflächenbeschaffenheit ist bei der FDM-/FFF-Technik vergleichsweise meist gröber strukturiert und weniger glatt [8, 39, 53].

2.3. Dentale Kunststoffe

Kunststoffe sind hochmolekulare Verbindungen und setzen sich aus synthetisierten niedermolekularen Monomeren oder umgewandelten Naturstoffen zusammen. Ihre Eigenschaften ergeben sich aus der Verknüpfungsart, der räumlichen Anordnung sowie aus den intermolekularen Wechselwirkungen der Polymere. Der grundsätzliche Aufbau von Kunststoffen beinhaltet die Monomere, welche sich durch Initiatoren oder Katalysatoren zu Polymeren, dem sogenannten Matrixharz, vernetzen. Maßgeblich für die chemischen und physikalischen Eigenschaften des entstehenden Werkstoffs sind neben den Monomeren auch die Füllkörper, Pigmente und Additive, die beispielsweise das Elastizitätsmodul, die Abrasionsbeständigkeit und die Farbstabilität je nach Zusammensetzung beeinflussen [56].

Harzbasierte dentale Kunststoffe sind in der heutigen Zahnmedizin von zentraler Bedeutung und kommen in nahezu allen Anwendungsformen zum Einsatz. Eingesetzt werden diese z.B. bei Versiegeln, Adhäsivsystemen, Füllungsmaterialien, Kronen- und Brückenprovisorien, Zahnschutzschienen, Therapieschienen, Schienen zur chirurgischen Eingriffsplanung und Eingriffsführung, funktionskieferorthopädischen Geräten, sowie bei Prothesenbasen und -zähnen [56].

Neben vielen verschiedenen Matrixharzen stellen das Polymethylmethacrylat (PMMA), welches sich in einer Polyreaktion aus Methacrylat (MMA)-Monomeren bildet, und die

Polysiloxane die am meisten verwendeten Verbundpolymere dar. PMMA wird besonders in der Total- und Teilprothetik, in funktionskieferorthopädischen Geräten und bei verschiedenen Zahnschienen verwendet [56].

2.3.1. Polyreaktionen von Matrixkunststoffen

Bei der Überführung von Monomeren zu Polymeren läuft eine Polyreaktion ab, bei der abhängig vom eingesetzten Monomer unterschiedliche Verknüpfungsarten entstehen, die sich charakteristisch auf die Polymereigenschaften auswirken. Zahnmedizinisch bedeutende Synthesereaktionen sind die Polymerisation, die Polykondensation und die Polyaddition. Die Polymerisation ist eine Kettenreaktion, die Polykondensation und die Polyaddition sind Stufenreaktionen. [56, 57](Seite 176-181 bzw. Seite 7-8).

Da toxikologischen Gesichtspunkten und der Biokompatibilität beim medizinischen Einsatz von Matrixkunststoffen eine hohe Bedeutung zukommt, spielt der Grad der Monomerumsetzung, die sogenannte Konversionsrate, von acrylharzbasierten Kunststoffen eine wichtige Rolle. Je unvollständiger die Polymerisationsreaktion abläuft, desto höher ist der Anteil an ungebundenen Monomeren. Durch deren Wirkung als Weichmacher kommt es neben der Verminderung der physikalischen Qualität zu einer Abnahme der Biokompatibilität und damit zu einem Anstieg der Wahrscheinlichkeit des vermehrten Auftretens unerwünschter Reaktionen bei Anwendern und Patienten. Allgemein ist ein möglichst hoher Polymerisationsgrad essentiell zur Optimierung sowohl physikalischer als auch biologischer Eigenschaften [58].

2.3.1.1. Polymerisation

Die Polymerisation definiert sich als die Umwandlung eines Monomers oder verschiedener Monomere in ein Polymer [59]. Bei der Polymerisation unterscheidet man je nach Typ der Reaktionsaktivierung zwischen der radikalischen, der koordinativen und der ionischen Polymerisation. Die Polymerisationskettenreaktion gliedert sich in drei Abschnitte: Kettenstart, Kettenwachstum und Kettenabbruch, denen zudem die primäre Radikalbildung vorrausgeht [56, 57](Seite 178-180 bzw. Seite 7-8).

2.3.1.1.1. Radikalische Polymerisation

Die radikalische Polymerisation ist die wichtigste und meistangewandte Polymerisationsreaktion. Ein bedeutendes Beispiel sind die frei-radikalischen Polymerisationsreaktionen von MMA zu PMMA.

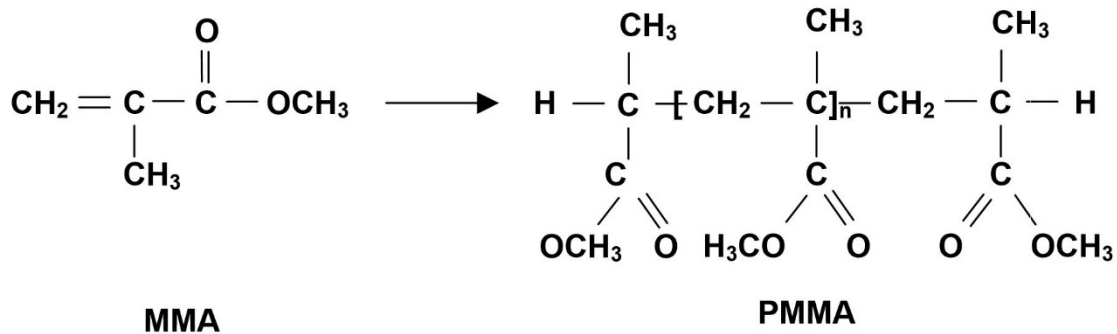


Abbildung 7: Radikalische Polymerisation von Methylmethacrylat (MMA) zu Polymethylmethacrylat (PMMA)

Für den Kettenstart sind Initiatoren nötig, die durch Energieeinwirkung in Radikale zerfallen, bei der man je nach Reaktionsauslöser licht-, wärme- und chemisch aktivierte Acrylate unterscheidet. Das Initiatorradikal spaltet die Doppelbindung eines Monomermoleküls, so dass ein neues Radikalmolekül entsteht, das sich aus Initiatorradikal und Monomermolekül zusammensetzt und eine weitere Monomerdoppelbindung aufbrechen kann. So lagern sich in einer exothermen Reaktion am reaktionsfreudigen Ende weitere Monomere an, und es entstehen unverzweigte Polymere in allen Raumebenen. Durch das Kettenwachstum in nur eine Richtung bilden sich auch schon bei geringem Polymerisationsgrad schnell große Molekülmassen. Wenn kein Reaktionspartner mehr verfügbar ist oder zwei radikale Kettenenden aufeinandertreffen, kombinieren sich diese, und es kommt zu einer irreversiblen Kettenabbruchreaktion und folglich zum Ende des Kettenwachstums [56, 57](Seite 178-180 bzw. Seite 7-8).

Gegen Ende der Polymerisationsreaktion bewirken die ansteigende Steifigkeit und die sterischen Hinderungen, dass die weitere Anbindung an das Reaktionszentrum durch die Anwesenheit anderer Atome immer weiter erschwert wird. Dadurch verbleiben nach Reaktionsende zwischen den Ketten des Polymernetzwerkes auch immer nicht reagierte Monomere als sogenannte Restmonomere [56, 57](Seite 178-180 bzw. Seite 7-8).

Einen Kettenabbruch können auch Inhibitoren erwirken, indem sie mit den Radikalen reagieren und diese stabilisieren. Stabilisatoren werden eingesetzt, um eine verfrühte, nicht gewünschte Polymerisation durch zufällige Radikalentstehung abzufangen. Auch Sauerstoff stellt einen Inhibitor dar, durch den es an den Grenzflächen zur Bildung einer nicht vollständig polymerisierten Sauerstoffinhibitionsschicht kommen kann [55-57](Seite 58 bzw. Seite 178-180 bzw. Seite 7-8).

2.3.1.1.2. Ionische Polymerisation

Es werden bei den ionischen Polymerisationen die anionische und die kationische Polymerisation unterschieden. Bei der anionischen Polymerisation kann der Start durch Lewis-Basen oder Alkalimetalle, bei der kationischen durch Lewis-Säuren oder Carbenium- und Oniumsalze erfolgen. Kationische Polymerisationen bedürfen einer sehr geringen Aktivierungsenergie. Ionische Polymerisationen sind im Gegensatz zur radikalischen nicht durch die Anwesenheit von Sauerstoff beeinflusst [56, 57](Seite 178-180 bzw. Seite 7-8).

2.3.1.2. Polykondensation und Polyaddition

Bei der Stufenreaktion unterscheidet man die Polykondensation (z.B. Polycarbonatbildung), die über eine Kondensationsreaktion abläuft, und die Polyaddition (z.B. Epoxidharzbildung), bei der eine Additionsreaktion stattfindet. Die Monomere bei der Stufenwachstumsreaktion haben immer mindestens zwei unabhängig voneinander reagierende funktionelle Gruppen pro Molekül. Dabei können unterschiedliche funktionelle Gruppen untereinander Verbindungen eingehen. Der Aufbau erfolgt in Stufen, und es bedarf eines hohen Umsetzungsgrades an Reaktionen, um hochmolekulare Strukturen entstehen zu lassen. Bei geringerer Umsetzungsrate entstehen zunächst nur kurzkettige Polymere, die sich erst bei hohen Umsetzungsraten untereinander zu langkettigen Polymeren verbinden. Beide Reaktionstypen werden durch Katalysatoren (z.B. Metallorganyle, Säuren und Basen) und nicht durch Initiatoren initiiert. Da hierbei keine Radikale entstehen, gibt es keinerlei Beeinträchtigung durch Sauerstoff oder andere Radikalfänger. Bei der Polykondensation verbinden sich Moleküle unter Abspaltung niedermolekularer Verbindungen. Dies ist bei der Polyaddition nicht der Fall [56, 57](Seite 180-181 bzw. Seite 7-8).

2.3.2. Polymethylmethacrylat (PMMA)/Acrylglas

Polymethylmethacrylat (PMMA)/Acrylglas ist ein in der Zahnmedizin sehr stark verbreiteter Werkstoff, der in vielen verschiedenen Therapieformen zum Einsatz kommt. Das Einsatzgebiet

reicht von Prothesenbasen über Therapieschienen und Bohrschablonen bis hin zu provisorischem Zahnersatz, Abdrucklöffeln und kieferorthopädischen Anwendungen. Zu den Vorteilen zählen neben einer guten Verarbeitbarkeit und guter Ästhetik auch die geringen Materialkosten und die akzeptablen physikalischen und chemischen Eigenschaften [60].

Die Zusammensetzung der meisten Materialien besteht aus einem bereits vopolymerisierten Polymethylmethacrylat (PMMA)- oder Polyethylmethacrylat (PEMA)-Pulver und Peroxidinitiatoren, welche sich bei der Polymerisationsreaktion mit verschiedensten Methacrylatmonomeren wie Methylmethacrylat (MMA), Hexamethyldiacrylat, Hydroxyethylmethacrylat (HEMA), *n*-Butylmethacrylate oder Tetrahydrofurfurylmethacrylat (THFMA), sowie mit Vernetzungsmitteln wie Ethylenglykoldimethacrylat (EGDMA) oder Trimethylpropantrimethacrylat (TMPTMA) verbinden. Abhängig vom System kommen mitunter Initiatoren der Polymerisationsreaktion hinzu. Bei Autopolymerisaten sind dies häufig Reaktionsbeschleuniger wie tertiäre Amine oder Sulfinsäuren [61].

2.3.3. Polymerdegradation

In acrylharzbasierten Kunststoffen kommt es durch die intraoralen Bedingungen mechanischer, chemischer und physikalischer Natur zu Biodegradationsprozessen im Werkstoff. Diese Polymerdegradation ist vielschichtiger Genese und könnte unter anderem von der Zusammensetzung des Speichels, den Kauvorgängen, von thermischen Schwankungen in der Mundhöhle und von Nahrungsmiteleinflüssen abhängen [62].

Bei der Biodegradation spielt Wasser eine große Rolle. Wasser aus dem Speichel dringt in das Polymernetzwerk ein und kann zu einer Auslaugung von ungebundenen Monomermolekülen und Zusatzstoffen führen [63]. Neben der Anfälligkeit für Hydrolyseprozesse haben auch die Speichelenzyme einen negativen Einfluss auf die Oberflächenhärte und die Verschleißbeständigkeit. Indem sie als Katalysator für chemische Prozesse wirken, könnten sie zur Degradation des Polymernetzwerks beitragen [64]. Auch könnte bakterielle Enzymaktivität zur Degradation beitragen [65, 66].

Kaukräfte beanspruchen das PMMA mit Druck- und Scherkräften, was in der Folge zu verstärktem Materialverschleiß sowie Rissbildung und Risswachstum führen kann. Bei *Graham et al.* [67] führte dies bei einem weichbleibenden Unterfütterungsmaterial zu einem signifikanten Anstieg der Weichmacherfreisetzung.

2.3.4. Freisetzung von Restmonomeren

Es konnte in viele Studien gezeigt werden, dass es, auch wenn die Polymerisation strikt nach Herstellerangaben erfolgt und auch wenn zusätzlich verschiedenste Methoden der Nachbehandlung mit unterschiedlichen Polymerisationstemperaturen und -zeiten angewendet wurden, nie zu einer vollständigen Umsetzung aller Monomere in Polymer kommt. Folglich gibt es immer (Ko-)Monomere, Zusatzstoffe oder Reaktionsprodukte, die nicht fest in das Polymernetzwerk eingebettet sind und so potenziell in einem wässrigen Milieu in Lösung gehen könnten [11, 12, 68]. Nach *Smith und Bains* [69] bleibt ein Teil der ungebundenen Monomere jedoch zwischen den Molekülketten eingeschlossen und ist nicht löslich. Der eluirbare Restmonomeranteil kann hingegen sowohl lokale als auch systemische Auswirkungen nach sich ziehen [70]. Der Grad der Konversion, also der Umsetzung von Monomer in Polymer, spielt demnach eine bedeutende Rolle. Monomere an sich besitzen toxische Eigenschaften und werden nur in der polymerisierten Form biologisch inert [71](Seite 328). Des Weiteren können infolge der Polymerisation Reaktionsprodukte anfallen, die im Ausgangsmaterial so nicht enthalten waren.

Die Auslaugung von löslichen Monomeren läuft dabei zeitlich nicht linear. Innerhalb der ersten Stunden noch der Polymerisation kommt es im wässrigen Milieu zu einem starken Anstieg der Eluate und im weiteren Verlauf zu einem kontinuierlichen Abflachen der Elutionskurve. So ging nach *Iça et al.* [72] bei kieferorthopädischem PMMA-Material in der Anteil- und Streumethode innerhalb der ersten 24 Stunden mehr Monomer in Lösung als in den darauf folgenden 3 Monaten. Auch bei *Nik et al.* [12] zeigte sich eine kontinuierliche Reduktion ohne signifikante Unterschiede bei verschiedenen Verarbeitungstechniken.

Nach Art der Polymerisation klassifiziert man heiß-, licht- und autopolymerisierte Acrylate. Auch hier konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die Art der Polymerisation sich auf die Umsetzungsrate von Monomer zu Polymer auswirken und damit den Restmonomergehalt erhöhen kann [12, 72, 73]. Der Restmonomergehalt bei Heißpolymerisaten ist dabei sowohl *in vitro* [74-76] als auch *in vivo* [77] niedriger als bei Autopolymerisaten, was mit der erhöhten Polymerisationstemperatur zu erklären ist. Zu einer signifikanten Verringerung der auslaugbaren Bestandteile kann eine Nachbehandlung der Materialien führen, wodurch mitunter der Polymerisationsgrad weiter erhöht und nicht gebundene Bestandteile im Vorlauf vorzeitig gelöst werden können [73]. So konnten

Bayraktar et al. [73] unter anderem zeigen, dass sich bei einem Heißpolymerisat durch eine dreistündige Nachbehandlung in 100°C heißem Wasser mit anschließender einmonatiger Lagerung in destilliertem Wasser die Menge an auslaugbaren Methylmethacrylaten (MMA) um bis zu 71% senken ließ. Auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Nachbearbeitung durch Erhitzen sowie das Einlegen in Wasser zu einer Erhöhung der Vernetzungsrate führen kann [11], wodurch auch die Konzentration an auslaugbarem Methylmethacrylat herabgesetzt wurde [58, 78].

Zu einer signifikanten Reduktion des Restmonomergehalts führt auch die mechanische Politur der Materialien [79, 80].

Bedeutenden Einfluss auf die Löslichkeit hat neben den chemischen Eigenschaften und der Molekülgröße auch die Wahl des Lösungsmittels. So gehen bei organischen Lösungsmitteln (z.B. Methanol, Ethanol, Aceton) signifikant mehr Bestandteile in Lösung als bei anorganischen Lösungsmitteln (z.B. Wasser, isotonische Kochsalzlösung) [81, 82]. Dies liegt unter anderem daran, dass viele (Ko-)Monomere und Zusatzstoffe eine sehr schlechte bis keine Löslichkeit in anorganischen Lösungsmitteln aufweisen. Zudem ist die Durchdringung der organischen Matrix durch organische Lösungsmittel erhöht, wodurch sich eine größere Zahl ungebundener Monomere lösen kann [83]. *Rothmund et al.* [82] stellten in natürlichem (proteinhaltigem) Speichel eine signifikant niedrigere Monomer- und Additivmenge als in proteinfreiem Speichel oder Wasser fest. Dies verdeutlicht, dass es nicht nur wichtig ist, die einzelnen sich lösenden Monomere und deren Menge zu erforschen, sondern auch deren Eigenschaft zur Bindung an Proteine. Denn eine Bindung an Speichelproteine könnte bedeuten, dass es in vivo eine geringere Bioverfügbarkeit dieser Substanzen gibt [84].

2.4. Analysemethoden zur Monomerquantifizierung

Eine Vielzahl an Autoren hat sich mit der Bestimmung und der Quantifizierung von sich lösenden Bestandteilen polymerisierter Kunststoffe auseinandergesetzt. Eingesetzt wurden dabei vornehmlich die Hochleistungsflüssigchromatografie (high performance liquid chromatography – HPLC), die Gaschromatografie (GC) sowie die Gaschromatografie in Verbindung mit der Massenspektrometrie (MS) [72, 79, 82, 85, 86].

2.4.1. Hochleistungsflüssigchromatografie

Die Hochleistungsflüssigchromatografie (HPLC) ist eine häufig eingesetzte Form der Flüssigchromatografie. Sie trennt die untersuchten Substanzmoleküle nach ihrer Polarität und dient zu deren Identifizierung und Quantifizierung. Mit der HPLC können im Gegensatz zur GC auch nicht flüchtige Substanzen untersucht werden. Ein HPLC-Gerät setzt sich aus fünf oder mehr Einheiten zusammen: Pumpen zur Eluatförderung, Injektionssystem, Trennsäule, Detektor und Auswerteinheit. Man unterscheidet unter anderem Adsorptionschromatografie und Verteilungschromatografie. Bei der Adsorptionschromatografie/Normalphasen-HPLC erfolgt die Trennung der Moleküle, die in einer apolaren mobilen Phase (z.B. Hexan oder Heptan) gelöst sind, anhand ihrer Polarität durch unterschiedlich starke Bindung an die polare stationäre Phase (meist Kieselgel). Bei der Verteilungschromatografie/Umkehrphasen-HPLC liegt eine apolare bzw. hydrophobe stationäre Phase und eine polare mobile Phase (z.B. Wasser oder Methanol) vor, wodurch sich die Moleküle im Vergleich zur Adsorptionschromatografie in umgekehrter Reihenfolge auftrennen [87].

2.4.2. Gaschromatografie

Die Gaschromatografie (GC) bietet die Möglichkeit, flüchtige und schwer flüchtige Gemische verschiedenster chemischer Verbindungen gemäß ihrem Siedepunkt in Einzelverbindungen aufzutrennen. Ihr Anwendungsbereich ist weniger breit als der der HPLC, da mitunter thermisch instabile, große oder nichtflüchtige Substanzen nicht bestimmt werden können. Zur Verbesserung der Verflüchtigung kann die Derivatisierung eingesetzt werden. Um analysierbar zu sein, müssen sich die Analyte unter Hitzezufuhr im GC-Ofen verdampfen und in den gasförmigen Zustand überführen lassen können, ohne sich dabei zu zersetzen. Als Trägergas werden chemisch inerte Gase wie Helium, Wasserstoff oder Stickstoff verwendet, die die Analyte, ohne Wechselwirkungen mit diesen, durch eine Trennsäule mit definierter stationärer Phase tragen. Die Verweildauer der Moleküle an der stationären Phase steht dabei in Abhängigkeit zu deren Polarität und Dampfdruck. Die Durchlaufzeit durch die Trennsäule (die sogenannte Retentionszeit) ist umso kürzer, desto höher der Partialdampfdruck bzw. desto niedriger der Siedepunkt der einzelnen Moleküle ist. Anhand der Retentionszeit, vom Einspritzen der Substanz bis zur Erfassung durch einen Detektor beim Austritt aus der Trennsäule, werden die Substanzen identifiziert. Als Detektor kann dabei auch die Massenspektrometrie (MS) mit der GC gekoppelt werden [88].

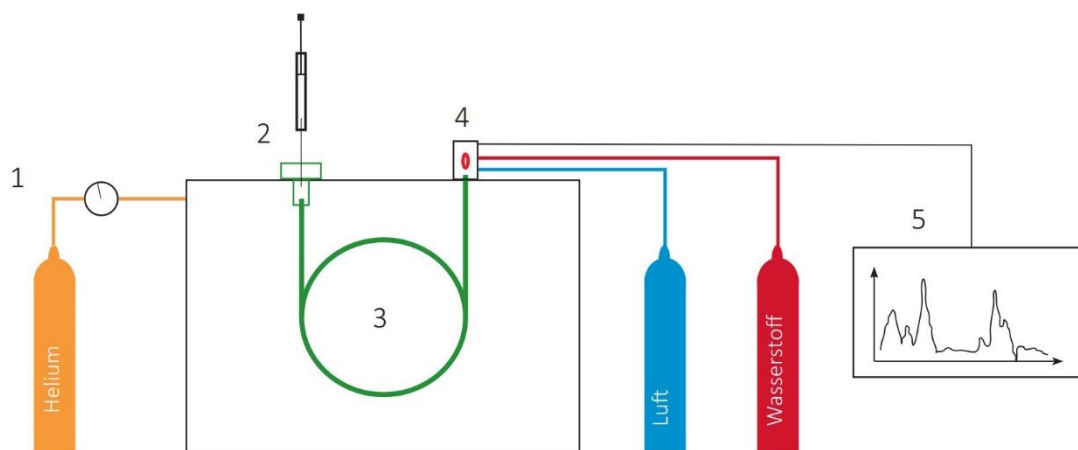


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Gaschromatografen (nach Talos [89]): (1) Trägergas, (2) Injektor, (3) Säule im Säulenofen, (4) Detektor (hier: FID, benötigt Luft und Wasserstoff), (5) Signalaufzeichnung als Chromatogramm.

2.4.3. Massenspektrometrie

In der Massenspektrometrie (MS) werden die Massen von einzelnen Atomen oder Molekülen gemessen. Die zu messenden Substanzen werden vakuumverdampft, dadurch in ihre Gasphase überführt und ionisiert. Ein elektrisches Feld beschleunigt und fokussiert die Ionen, und durch ein Magnetfeld kommt es zu einer Auftrennung und Charakterisierung nach den Masse-zu-Ladungs-Verteilungen, wobei es zum Molekülzerfall mit Fragmentierung kommen kann. Durch einen Detektor werden die separierten Ionen erfasst. Die Massenspektrometrie hat ihre Stärken in der Aufschlüsselung detaillierter Strukturinformationen zur Identifikation von Substanzen, kann diese jedoch nicht so hochauflösend auftrennen wie die GC. Die GC wiederum in der Identifikation der MS unterlegen ist. Diese beiden Techniken ergänzen sich und sind somit hochkompatibel [90].

2.5. Toxikologie und Biokompatibilität von Kunststoffmonomeren

Biokompatibilität wird in der Medizin Materialien zugesprochen, die in direktem Gewebekontakt weder einen negativen Effekt auf den lokalen Zellstoffwechsel noch auf den Körper als Ganzen haben [68]. In unterschiedlichem Ausmaß geben letztlich alle Dentalkunststoffe Substanzen in die Umgebung frei, wodurch unter Umständen lokale oder systemische Effekte beim Anwender oder Empfänger der Materialien hervorgerufen werden. Die nicht immer offensichtliche Verknüpfbarkeit von dermatologischen, rheumatischen oder neurologischen Beschwerden mit einem Material erschwert dabei zudem die Diagnostik [91].

Zur Einordnung der Toxizität können die Materialien auf eine mögliche Zytotoxizität, Mutagenität, Cancerogenität, Embryotoxizität oder Teratogenität hin getestet werden. Wichtige Bewertungspunkte sind dabei die Aufnahme, Verteilung, Verstoffwechslung und Ausscheidung der untersuchten Substanzen [92]. Um den Metabolismus der Substanzen und damit die möglichen chemischen und physikalischen Umwandlungen in Zwischen- und Endprodukte aufzudecken, kommen Tierversuche zum Einsatz. Unter anderem konnten *Reichl et al.* [93] zeigen, dass aus dentalen Kompositen freigesetzte (Ko-)Monomere wie HEMA, TEGDMA und BisGMA im Körper nach dem Verschlucken resorbiert und zu Kohlendioxid verstoffwechselt werden. *Seiss et al.* [94] wiesen jedoch nach, dass in menschlichen Lebermikrosomen durch HEMA und TEGDMA auch als mutagen und kanzerogen geltende Epoxy-Zwischenprodukte entstehen. Dies gilt auch für das Abbauprodukt Methacrylsäure (MA). Das flüchtige MMA zeigte vor allem in Dampfform im Tierversuch kardiovaskuläre Auswirkungen, Mageninhibition und abgeschwächte Dünndarmperistaltik [71] (Seite 330).

In vielen Studien konnte in den letzten Jahren eine Zunahme der Reaktionen gegenüber zahnärztlichen Kunststoffen vermerkt werden. Die am häufigsten dokumentierten Auswirkungen sind dabei die allergische Reaktion [95-97] mit unterschiedlichster Ausprägung und Erscheinungsform, Erytheme und Mundschleimhauterosionen [98]. Zudem wurden Fälle von Brennen und Schmerzen an äußerlich intakter Mundschleimhaut beschrieben [99]. In einzelnen Fällen traten auch bei zahnärztlichem Fachpersonal Überempfindlichkeiten, Asthma, lokale neurologische Symptome, Reizungen und lokale Hautreaktionen auf [70]. Die beschriebenen Fälle reichen bis zu einer generalisierten motorischen und sensorischen Neuropathie bei einer Zahntechnikerin [100].

2.5.1. Allergische Reaktionen

Das allergene Potential von Kunststoffmonomeren ist weithin bekannt und wurde bereits in vielen Fallberichten und Studien beschrieben [95, 101-103]. Dies trifft auch auf einige der PMMA- Bestandteile zu. Neben den Monomeren wie beispielsweise MMA, HEMA, TEGDMA, Bis-GMA und UDMA können dabei auch Initiatoren, Inhibitoren, Akzeleratoren, Pigmente, Vernetzungshelfer und Weichmacher eine Rolle spielen. Typischerweise handelt es sich um allergische Reaktionen vom Typ IV, welche nach wiederholtem Allergenkontakt auftreten. Meist sind die Verursacher der Immunreaktion niedermolekulare Haptene, die sich an ein Protein anhängen und erst mit diesem einen vollwertigen Antigenkomplex bilden [104]. Im

Tierversuch konnte bei Methylmethacrylat (MMA), Ethylmethacrylat (EMA) und n-Butylmethacrylat (n-BMA) eine hohe Rate an Kreuzreaktionen verzeichnet werden. Die Tiere zeigten allergische Reaktionen gegenüber Monomeren, ohne dass vorher eine Sensibilisierung mit selbigen durchgeführt wurde [105]. Auch Ethylenglycoldimethacrylat (EGDMA) und Dibenzoylperoxid (DBP), ein Initiator, haben hohes allergisches Potenzial [71] (Seite 328).

Gebhart und Geier [106] testeten 791 Patienten (davon 59 Zahntechniker/innen) mittels Epikutantest auf Kontaktallergien zu Prothesenmaterialreihen und stellten eine Sensibilisierung auf Benzoylperoxyd (BPO) bei 5,1% und auf MMA bei 1,8% der Probanden fest. Laut Literatur zeigen sich bei 0,7% – 2% der Zahnärzte Allergien gegen Monomere [107]. Kontaktallergien der Haut lassen sich jedoch nicht eins zu eins auf die Mundschleimhautreaktion übertragen, da in der Mundhöhle durch den Speichel potentiell allergene Substanzen schneller weggespült werden und so die Verweildauer kürzer ist, das Schleimhautepithel gut vaskularisiert ist, wodurch die Substanzen schneller aufgenommen werden, und die zellvermittelte Immunreaktion durch weniger ortsständige Langerhans- und T-Zellen geringer ausfällt [108].

Das klinische Erscheinungsbild einer Kontaktsensibilisierung ist dabei nicht immer einheitlich. *Gonçalves et al.* [101] berichten von einem Fall von brennender Mundschleimhaut mit Erythembildung, bitterem Geschmack, Hypersalivation und Schluckbeschwerden, ausgelöst durch einen kieferorthopädischen Retainer aus selbsthärtendem PMMA. Im anschließenden Patch-Test konnte eine positive Reaktion auf verschiedene MMA-Kunststoffproben festgestellt werden. Es wurden zudem einige Burning-Mouth-Syndrom-/Glossalgiefälle beschrieben, bestätigt durch positive Patch-Test-Ergebnisse auf Prothesenbestandteile, mit der Symptomatik einer brennenden Mundschleimhaut [99, 109].

2.5.2. Mutagenität

Mutagenität ist die Eigenschaft einer Substanz, durch chemisches oder physikalisches Einwirken zu Veränderungen im Erbgut und zu einem Anstieg der natürlichen Mutationsrate zu führen (diese liegt bei höheren Organismen bei 10^{-5} - 10^{-9} pro Gen und Mutation).

Mutagenitätstests werden zunächst meist in vitro durchgeführt und sollten an Organismen mit unterschiedlicher phylogenetischer Organisationshöhe getestet werden. Hierzu kommen

beispielsweise im sogenannten Ames-Test (Salmonella/Mikrosomen-Test) Bakterien und im V79-Test Säugetierzelllinien zum Einsatz [110].

Schweikl et al. [15] testeten verschiedene Dentinkleber mittels Ames-Test auf die mögliche Mutagenität hin und konnten dabei unter anderem für MMA, 2-Hydroxyethylmethacrylate (HEMA), Triethylenglycoldimethacrylate (TEGDMA) und Bisphenol A-Glycidyl methacrylate (Bis-GMA) keine Anzeichen einer mutagenen Wirkung feststellen. Die in einer folgenden Studie bei glutaraldehydhaltigen Dentinklebern festgestellte Mutagenität im Ames-Test konnte sich in Bezug auf den Glutaraldehydgehalt im V79-Test nicht erhärten, woraufhin Bis-GMA und TEGDMA als mögliche Verursacher diskutiert wurden [111].

2.5.3. Zytotoxizität

Zytotoxisch ist eine Substanz, wenn es durch diese zu einer Schädigung lebender Zellen und Gewebe kommt.

Um eine Aussage über eine mögliche zytotoxische Wirkung von Substanzen treffen und diese untereinander vergleichen zu können, kann z.B. eine Toxizitätsbestimmung in Form eines EC_{50} (*effective concentration*)-Wertes herangezogen werden. Dieser Wert gibt die Konzentration einer Substanz wieder, durch die ein halbmaximaler Effekt bei einer Zellpopulation beobachtet wird. Dies leitet sich von einer Konzentrations-Effekt-Kurve ab und bedeutet, dass bei 50% der Zellen eine andere Wirkung als der Zelltod eintritt. Durch den sogenannten XTT-Test kann der EC_{50} einer Substanz ermittelt werden. Hierbei wird durch ein Mono-Tetrazolium-Salz eine Vitalfärbung intakter Zellen nach Exposition zu Verdünnungsreihen der untersuchten Substanz vorgenommen. Durch zelluläre Dehydrogenasen bildet sich Formazan, welches photometrisch bestimmt und der EC_{50} - Wert folgend berechnet werden kann [71] (Seite 204).

Der Grad der Zytotoxizität von acrylharzbasierten Kunststoffen hängt vermutlich von der Polymerisationsmethode und -bedingung sowie von der Menge und der Art der nicht polymerisierten (Ko-) Monomere ab. So hat beispielsweise das Mischverhältnis von Monomer zu Polymer mit steigendem Monomeranteil auch eine erhöhte Zytotoxizität zur Folge [112]. In mehreren Studien zeigten Heißpolymerisate im Vergleich mit Autopolymerisaten eine geringere Zytotoxizität, was sich die Autoren mit einem durch die erhöhte Polymerisationstemperatur herabgesetzten Restmonomergehalt erklärten [68, 113, 114]. Auch in Tierversuchen konnte bei implantierten Heißpolymerisaten eine geringere

Gewebereaktion als bei Autopolymerisaten festgestellt werden. Zudem lag die Toxizität nach 90 Tagen signifikant unterhalb der 30-Tages-Daten, was mit dem kontinuierlichen Absinken des sich lösenden Restmonomergehalts in Verbindung stehen könnte [115]. Restmonomere können in direktem Gewebekontakt Entzündungsreaktionen hervorrufen [116]. Allgemein sollte das spezifische Toxizitätspotenzial für jedes Monomer einzeln betrachtet werden [117].

Die Methoden und die Analyse zur Zytotoxizität werden dabei durch den ISO-Standard 10993-5 der Internationalen Organisation für Standardisierung beschrieben und reguliert. Hierbei wird eine Zellproliferation von >75% als nicht zytotoxisch, 50-75% als leicht zytotoxisch, 25-50% als mäßig zytotoxisch und <25% als hoch zytotoxisch eingestuft [118].

In der Studie von *Bural et al.* [11] wiesen zwei Autopolymerisate im XTT-Test Zellproliferationswerte von 57-67% und damit eine leichte Zytotoxizität auf. Ein Zusammenhang zwischen der Konversionsrate und dem MMA-Gehalt einerseits und der Zellproliferationsrate und damit zur Zytotoxizität konnte dabei nicht festgestellt werden.

Eine herabgesenkte In-vitro-Zytotoxizität bei L-929-Fibroblasten zeigte die abschließende Nachbehandlung von Heißpolymerisaten in kochendem Wasser für eine halbe bzw. eine volle Stunde durch Reduktion des auslaugbaren MMA- Anteils [58]. Auch *Jorge et al.* [78] wiesen einen Zusammenhang zwischen Nachbehandlung in Wasser und verminderter Zytotoxizität nach; eine reine Nachbehandlung durch Mikrowellen ohne Wasserlagerung jedoch konnte keine Senkung der Zytotoxizität auf L-929-Fibroblasten herbeiführen. Durch eine Hochglanzpolitur bei Autopolymerisaten konnte eine Verminderung der Ausschüttung der Entzündungsmediatoren Interleukin-6 und -8 im Vergleich zu unpolierten Proben festgestellt werden, was die beobachtete zytotoxische Wirkung minderte [119].

Hattori et al. [120] stellten fest, dass MMA, welches sich zur Entgiftung in der Leber ansammelt, zu eine Steigerung der Genexpression des S-Transferase Alpha 1 Gens führen und so zytotoxische Auswirkungen auf Leberhepatozyten haben kann.

2.6. Zusammenhänge von Methacrylaten und Bakterien in der zytotoxischen Wirkung auf humanen Gingivafibroblasten

Einen weiteren zu berücksichtigenden Faktor stellt nach *Di Giulio et al.* [121, 122] der Einfluss des bakteriellen Biofilms auf die Zytotoxizität von (Ko-)Monomeren und Additiven gegenüber eukaryotischen Zellen dar. Durch Kokultivierung (48h und 72h) von *Streptococcus mitis-*

Stämmen mit humanen Gingivafibroblasten (HGF) kam es im Vergleich zur Einzel-HFG-Kultur nach Zugabe von HEMA (in einer Konzentration von 3mM) zu einem signifikanten Rückgang in der Zahl der toten HGF-Zellen. Auch bei den Bakterienstämmen stellten *Di Giulio et al.* [121] einen Rückgang der toxischen HEMA-Wirkung in Kokultur mit HGF fest, was auf eine wechselseitige Interaktion mit verbesserten Überlebensraten auf beiden Seiten schließen lässt. In einer sich anschließenden Studie kam es durch die Zugabe von Speichel zu einem zusätzlichen Rückgang der zytotoxischen HEMA-Wirkung. Dies erklären die Autoren mit der förderlichen Wirkung des Speichels auf die bakterielle Aggregation und Adhäsion an HGF-Zellen, die folglich auch eine Verbesserung des Schutzes der HFG vor HEMA nach sich zieht [122]. Ein weiterer Grund könnte die schon diskutierte Proteinbindung von (Ko-)Monomeren und Additiven sein.

Studienabhängig kamen Autoren zu unterschiedlichen Ergebnissen in Bezug auf die Auswirkungen von Methacrylaten auf das bakterielle Wachstum. *Hansel et al.* [123] schlossen auf einen wachstumsstimulierenden Effekt von TEGDMA und EGDMA (Konzentration jeweils 0,2-5mmol/l) auf *Streptococcus sobrinus* und *Lactobacillus acidophilus* durch Messung der optischen Dichte. *Schmalz* [18] beobachtete durch Messung der Trübung eine in Abhängigkeit von der effektiven Konzentration wachstumsfördernde ($\leq 5\text{mmol/l}$ bzw. $\leq 2\text{mmol/l}$) bis -hemmende ($> 5\text{mmol/l}$ bzw. $> 2\text{mmol/l}$) Wirkung von MMA und Dimethylparatoluidin auf *Streptococcus mutans* (*S. mutans*). Er schloss nach der Arndt-Schulz-Regel darauf, dass hohe Dosen schädigend, mittlere Dosen hemmend und geringe Dosen wachstumsfördernd wirken. Eine andere Erklärung für die vermehrte Biomassebildung und Trübung lieferten *Takahashi et al.* [124]. Nach Zugabe von EGDMA zu einer *Streptococcus sobrinus*- und *Streptococcus sanguis*- Lösung fanden sie hier keine Verbindung zwischen der sich einstellenden Trübung und der Zahl der KBE. Die Trübung war das Ergebnis einer erhöhten Partikelgröße, die durch Polymerisation der zugefügten EGDMA-Monomere um die Bakterienzellen herum erklärt wird. Diese Auslösung der Polymerisation könnte ihre Ursache in freien Radikalen aus bakteriellem Metabolismus und Wachstum haben.

2.7. Bioadhäsionsvorgänge in der Mundhöhle

2.7.1. Plaqueorganisation und Plaquebildung

Alle mit der Umwelt in Verbindung stehenden Körperoberflächen des Menschen sind mit einer einzigartigen Zusammensetzung an ortsansässigen Mikroorganismen besiedelt. Dabei ziehen es Mikroorganismen in überwiegender Mehrheit vor, sich in Form eines Biofilms auf Oberflächen in räumlich strukturierten und gut organisierten Gemeinschaften anzusiedeln. Schätzungen zufolge werden etwa 60% der Infektionen beim Menschen durch mikrobielle Biofilme hervorgerufen [125]. Die Eigenschaften der mikrobiellen Gemeinschaft spiegeln dabei weniger die Summe der Eigenschaften einzelner Populationen wider, vielmehr treten die Eigenschaften, die erst aus der Einheit heraus entstehen, in den Vordergrund [126]. Organisiert im Biofilm steigen die Gentransferraten, die Mikroorganismen zeigen entweder direkt durch den Oberflächenkontakt oder indirekt durch die Heterogenität der Bedingungen innerhalb des Biofilms eine veränderte Genexpression, veränderte Stoffwechselfvorgänge und einen Wandel des Zellphänotyps. Durch die Organisation in der Plaque entsteht so ein Resistenzverhalten gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen, das bis zu 1000-mal höher liegt als das frei schwimmender (planktonischer) Kulturen [127, 128]. Der Biofilm lässt dabei eine räumliche und zeitliche Heterogenität zu, die es anspruchsvollen Mikroorganismen ermöglicht, bei an sich lebensfeindlichen Bedingungen zu überleben [128] (Seite 68). Auch reife Zahnplaque setzt sich aus einer komplexen Gemeinschaft von bis zu 19.000 verschiedenen Phylotypen zusammen und ist dabei von Mensch zu Mensch von höchster Individualität [129]. Aufgrund unterschiedlicher physikalischer und biologischer Gegebenheiten sind dabei an verschiedenen Messpunkten eines Zahnes (z.B. Grübchen und Fissuren, Glattflächen, Approximalflächen, Sulkus) unterschiedliche Zusammensetzungen der Plaque festzustellen [130, 131]. Die Geschwindigkeit, mit der Zahnplaque gebildet wird, ist dabei von Mensch zu Mensch sehr unterschiedlich [132].

Die Bildung von Zahnplaque kann willkürlich in verschiedene Stadien eingeteilt werden, denn im Grunde handelt es sich um einen kontinuierlichen und dynamischen Vorgang, bei dem sich der Biofilm konstant neu organisiert [128] (Seite 74).

Nach dem Zahndurchbruch oder der Säuberung eines Zahnes kommt es unmittelbar zu einer Anlagerung positiv geladener Moleküle aus dem Speichel und der Sulkusflüssigkeit an die

negativ geladenen Hydroxylapatitionen des Zahnschmelzes. Dieses sogenannte Schmelzoberhäutchen (Pellikel) besteht unter anderem aus Glykoproteinen, Histatinen, Lysozym, Laktoferrin, Statherin, prolinreichen Proteinen, α -Amylase sowie Muzinen und Lipiden, und weist eine Dicke von 0,1- 1 μm auf [126, 128]. Die Zusammensetzung der Pellikel unterscheidet sich dabei zwischen Zähnen, Mundschleimhaut und Restaurationsmaterialien [133].

Gram-positive Streptokokken, wie *Streptococcus sanguis* (*S. sanguis*), *Streptococcus oralis* (*S. oralis*) und *Streptococcus mitis* (*S. mitis*), Aktinomyzeten, wie *Actinomyces viscosus* und *Actinomyces naeslundii* (*A. naeslundii*) und Neisseria-Spezies gehören mit ihrer negativ geladenen Zellwand zu den Erstbesiedlern, welche mittels langstreckenwirksamer physiochemischer Wechselwirkungen oder über nicht spezifische Van-der-Waals-Kräfte zunächst lose an die Pellikelrezeptoren anheften. In der Folge verstärken sich diese Bindungen durch Ionen- und Dipolwechselwirkungen über die Oberflächenadhäsionsmoleküle (Adhäsine) bis zur Unumkehrbarkeit [134, 135].

Die anheftenden Mikroorganismen beginnen mit dem Aufbau gallertartiger extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS) und vermehren sich durch Teilung. Aus einzelnen Mikrokolonien entsteht ein konfluenter Film. EPS erfüllen für die Mikroorganismen vielerlei Funktionen wie eine begünstigte Anheftung, den Schutz vor Austrocknung, die Speicherung von Nährstoffen und den Schutz vor schädigenden Umwelteinflüssen. Außerdem bilden EPS den Hauptteil der Biofilmmasse und ermöglichen den Stoff- und Gentransport zwischen den Mikroorganismen. Die Erstbesiedler sind überwiegend aerob oder fakultativ aerob, entziehen somit der Umgebung Sauerstoff und begünstigen dadurch die Ansiedelung von Anaerobiern [126].

In dieser frühen Phase wird durch die enge räumliche Beziehung mittels interzellulärem Genaustausch die genetische Kompetenz entwickelt und abgestoßene DNA-Moleküle lebender und abgestorbener Zellen aufgenommen [136]. Zur Etablierung bakterieller Ökosysteme, die einer genauen Koordination der Einzelprozesse mit gezielter Regulation der Genexpression bedarf, ist der Informationsaustausch (das sogenannte „quorum sensing“) über Signalmoleküle unabdingbar [137].

Durch Adhäsine wird in der Folge die sehr selektive lektinvermittelte Koaggregation oder Koadhäsion sekundärer Besiedler vorangetrieben, wobei über einen reinen Zufall hinaus

immer wieder diskrete Kombinationen bestimmter Spezies anzutreffen sind [138]. Diese sekundären Besiedler sind dabei überwiegend gram-negative Mikroorganismen wie Actinomyceten, Fusobakterien (vor allem *Fusobacterium nucleatum*) und *Prevotella intermedia*. Fusobakterien koaggregieren vielfältig, jedoch nicht untereinander und dienen wohl als Brücke zwischen Erst- und Spätbesiedlern. Mit voranschreitender Plaquereifung, welche sich nach 24-72 Stunden beginnt einzustellen, kann es im subgingivalen Biofilm zur Anlagerung pathologischer, überwiegend strikt anaerober Bakterien des roten Komplexes (z.B. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*) kommen, wodurch sich die Bedingungen im Biofilm drastisch verändern [139].

Bakterielle Mikrokolonien fügen sich zu pilzförmigen oder turmartigen Gebilden zusammen, welche auf der Oberfläche fest anheften und in den Randbereichen ineinander übergehen. Dazwischen findet sich ein ausgiebiges Kanalsystem, über welches Nährstoffe, Stoffwechselprodukte und Signalmoleküle ausgetauscht, aufgenommen und abgegeben werden [140].

Durch Erosion und Abschilferung kommt es in einem sehr dynamischen Prozess zu einem stetigen Ablösen einzelner Bakterien bis hin zu größeren Zellkonglomeraten aus dem Biofilm und damit zu einer Ausbreitung in neue Siedlungsgebiete. Mitunter findet die Ablösung von Konglomeraten dabei auch gezielt durch quorum sensing statt [125].

2.7.2. Bakterielle Adhäsion und Vermehrung auf zahnärztlichem Restaurationsmaterialien

Nicht nur auf allen natürlichen oralen Oberflächen entstehen Biofilme, sondern auch auf den Oberflächen aller Restaurationsmaterialien, die in die Mundhöhle eingebracht werden. Dabei wird vor allem bei dauerhaft im Mund verbleibenden Materialien das Ausmaß der Plaqueanlagerung als einer der wichtigsten Faktoren für die Langlebigkeit angesehen [141]. Wichtige Aspekte für die Plaqueanlagerung stellen neben der Materialzusammensetzung auch die Oberflächeneigenschaften wie Oberflächenrauigkeit (surface roughness/SR) und freie Oberflächenenergie (surface free energy/SFE) der Materialien dar, welche wiederum unter anderem von der Materialzusammensetzung abhängig sind [142].

2.7.2.1. Einfluss der Oberflächeneigenschaften auf bakterielle Adhäsion

Raue Oberflächen ermöglichen Mikroorganismen eine erleichterte Adhäsion und begünstigen die Plaquereifung. Auch hochenergetische Oberflächen mit hoher freier Oberflächenenergie ermöglichen die Adhäsion von spezifischen Bakterien mit gleichen Oberflächeneigenschaften und führen zu vermehrter Plaquebildung [143].

2.7.2.1.1. Oberflächenrauigkeit (SR)

Die wichtigste Komponente zum Ausmaß der bakteriellen Adhäsion und Biofilmbildung stellt laut *Quirynen und Bollen* [143] sowie *Quirynen et al.* [144] die Oberflächenrauigkeit (SR) dar. Ein Parameter für die Rauigkeit ist die mittlere Rauheit R_a , die dem arithmetischen Mittel der Abweichungen von der Mittellinie entspricht. Der Wert ist jedoch nicht geeignet, um die Ortsfrequenz dieser Abweichungen aufzuzeigen [145]. Raue Oberflächen bieten Mikroorganismen einen besseren Schutz vor Scherkräften, sodass über Kurzstrecken wirksame und damit starke Bindungen wohl einfacher und häufiger entstehen können [143]. So führt die Politur mit Verringerung der mittleren Rauheit zu einer Reduktion der SR [146]. Dass die Höhe der Scherkräfte eine wichtige Rolle in der initialen bakteriellen Adhäsion spielen könnte, zeigten unter anderem *Christersson et al.* [147], wobei in vitro eine Erhöhung der Scherkräfte um den Faktor 30 (von 0,03 auf 1,01 dynes/cm²) zu einer 70- 80% gesteigerten Ablösung von Bakterien führte. So gewinnt bei hohen Scherkräften, wie sie etwa auf Lingualflächen herrschen, die SR an Bedeutung, sodass *Hanning* [148] hier in vitro bei unterschiedlichen Materialien eine Plaquebildung nur in Bereichen mit Oberflächenunregelmäßigkeiten feststellen konnte. Ein Schwellenwert für die SR, unter dem weder in der Anzahl der sich anheftenden Bakterien noch in deren Pathogenität signifikante Veränderungen festgestellt werden konnten, scheint bei einem Wert von 0,2 µm mittlerer Rauheit R_a zu liegen. Steigt die mittlere Rauheit über diesen Wert an, so ist ein gleichzeitiger Anstieg der adhärenen Bakterien festzustellen [149]. Die Gründe könnten in den vergrößerten Oberflächen sowie in der erschwerten Entfernung des Biofilms liegen, wodurch eine beschleunigte Reetablierung möglich ist [142]. Die intraorale Pellikelbildung könnte, vermutlich jedoch nur in geringem Umfang, in vivo zu einer Relativierung der physikalischen und chemischen Oberflächeneigenschaften in Bezug auf die Bakterienanlagerung führen [141].

2.7.2.1.2. Freie Oberflächenenergie (SFE)

Die freie Oberflächenenergie (SFE) gibt einen Wert für die Benetzbarkeit von Materialien wieder. Niedrigenergetische hydrophobe Oberflächen neigen dabei weniger zur Plaqueanlagerung als hochenergetische hydrophile [142]. Laut *Quirynten und Bollen*, sowie *Grivet et al.* [143, 150] adhären Bakterienstämme mit niedriger SFE (und damit hydrophoben Eigenschaften) bevorzugt an Oberflächen mit niedriger SFE und Stämme mit hoher SFE (und damit hydrophilen Eigenschaften) an Oberflächen mit hoher SFE. *Grivet et al.* [150] definieren *S. mitis* als hochgradig hydrophil, *S. mutans* als hydrophob und *S. sanguis* und *S. oralis* als hochgradig hydrophob. Die Messung der freien Oberflächenenergie von Festkörpern erfolgt meist mittel Messung des Kontaktwinkels an der Phasengrenze zwischen Tropfen verschiedener Flüssigkeiten, deren Oberflächenspannung bekannt ist, und dem jeweiligen Festkörper [151, 152]. Da die freie Oberflächenenergie hauptsächlich die initiale bakterielle Anheftung beeinflusst, ist davon auszugehen, dass die Bedeutung mit fortschreitender Plaquebildung abnimmt [141]. *Quirynten und Bollen* [143] gehen vor allem in supragingivalen Bereichen von einem bedeutenden Einfluss für die initiale Adhäsion und Plaquereifung aus, subgingival falle der Einfluss durch den Schutz der Nische bedeutend geringer aus. *Ahn et al.* [153] stellten in einer In-vitro-Studie fest, dass bei kieferorthopädischen Kompositklebern die SFE für die initiale Adhäsion von *S. mutans* sogar wichtiger sei als die SR, die Pellikelbildung oder Flouridabgabeesigenschaften.

In vivo konnte an Hunden gezeigt werden, dass die Pellikeladsorption zwar zu einer Verringerung ursprünglich hoher und zum Anstieg niedriger SFE-Werte führte, trotz allem kam es jedoch zu einer vermehrten Adhäsion auf Oberflächen mit hoher SFE. Dies zeigt, dass wie auch bei der SR die Pellikelschicht die Werte zwar etwas relativiert, die physikalisch-chemischen Oberflächenwechselwirkungen von Anziehung und Abstoßung jedoch relevant bleiben [154].

2.7.2.2. Einfluss der Materialzusammensetzung auf die bakterielle Adhäsion

Rüttermann et al. [155] sehen in der Werkstoffchemie einen essentiellen Faktor für die bakterielle Adhäsion. Durch die unterschiedlichen Bestandteile besitzen dentale Kunststoffoberflächen innerhalb eines Materials keine topografisch und chemisch einheitliche Zusammensetzung. So könnten beispielsweise bei dentalen Kompositen neben den prozentualen Anteilen von Harzmatrix und Füllkörpern auch die einzelnen Komponenten der

Harzmatrix sowie die Füllkörpergröße und deren Form ausschlaggebend für die Adhäsion von Bakterien sein. Auch die Verteilung von Matrix und Füllkörpern auf der Oberfläche ist nicht vollständig homogen [146]. *Ionescu et al.* [146] kamen bei dentalen Kompositen mit variierendem Füllkörperanteil und unterschiedlicher Zusammenstellung der Harzmatrix zu dem In-vitro-Ergebnis, dass bei einem Mono-Spezies-Biofilm mit *S. mutans* der unterschiedliche Füllkörperanteil die Auswirkung der Zusammensetzung der Harzmatrix aufhob. Anders hingegen im Multi-Spezies-Biofilm, bei dem ein signifikanter Einfluss der Zusammensetzung der Harzmatrix auf die Biofilmbildung gefunden wurde. Komposite mit einer BisGMA/TEGDMA-Harzmatrix zeigten eine signifikant geringere Biofilmanlagerung im Vergleich zu einer UDMA/aliphatischen Dimethacrylat-Harzmatrix. Zudem wurde bei annähernd gleicher SR, SFE und chemischer Oberflächenszusammensetzung bei Nanofüllern (Partikelgröße 20nm) eine signifikant geringere Biofilmbildung im Vergleich zu „feinen“ Füllkörpern (Partikelgröße 7µm) festgestellt, was sich die Autoren mit einer homogeneren Oberflächentopografie erklären.

2.8. Die Rolle der Zahnplaque in Gesundheit und Krankheit

Die Zahnplaque spielt nicht nur in der Entstehung von lokalen Krankheiten wie etwa Karies und Parodontitiden eine grundlegende Rolle, sondern kann auch Auswirkungen auf den allgemeinen Gesundheitszustand des Menschen haben [24].

2.8.1. Mundgesundheit

Gesunder Zahnplaque umfasst ein symbiotisches Zusammenspiel von nicht pathogenen Mikroorganismen, der lokalen Mikroflora, welche sich mit dem Wirt im gegenseitigen und für beide Seiten nutzenbringenden Zusammenspiel befindet. Der Wirt bietet den Lebensraum für die Mikroorganismen, diese wiederum spielen im Gegenzug eine wichtige Rolle in der Abwehr invasiver Pathogene. Durch das Besetzen von Lebensräumen mit erhöhtem Konkurrenzkampf, durch Ausschüttung von Inhibitoren und durch die Etablierung ungünstiger Bedingungen kann die Ausbreitung unerwünschter Pathogene erschwert werden. Die lokale Mikroflora wird dabei vom Immunsystem des Wirtes toleriert, ohne eine schädigende Entzündungsreaktion nach sich zu führen. Gleichzeitig wird das Immunsystem durch die vielfältige Darbietung bakterieller Antigene stimuliert und hält eine Habachtstellung aufrecht, die eine gezielte Platzierung neutrophiler Granulozyten im Saumeepithel bewirkt und eine schnellere Abwehr von Pathogenen ermöglicht [22, 126, 156].

Im Zustand oraler Gesundheit stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen mikrobieller Anheftung und den ablösenden Kräften ein, welche durch die Mundhygiene sowie durch mechanisches Einwirken von Zunge, Wangen und durch das Kauen von Speisen ausgeübt wird. Ob ein Organismus sich ansiedeln kann und ob er dabei eine über- oder untergeordnete Rolle in der Gemeinschaft einnimmt, wird durch die selektiven Eigenschaften des Lebensraumes bestimmt. Für die ansässige Mikroflora spielt die Ernährung des Wirtes eine untergeordnete Rolle, aus Bestandteilen des Speichels und der Sulkusflüssigkeit werden Nährstoffe aus Aminosäuren, Proteine und Glykoproteine teilweise in gemeinschaftlicher Zusammenarbeit gewonnen [22, 157].

Kommt es zu andauernden Veränderungen der lokalen Bedingungen, die ein vermehrtes bakterielles Wachstum ermöglichen und damit zu einer Veränderung der Zusammensetzung der Mikroflora führen, so ist dies oft mit der Entstehung von Zahnkrankheiten wie Parodontitis und Karies verbunden [22, 23]. Bei gehäufter Zuckeraufnahme durch den Wirt resultiert dies durch bakterielle Verstoffwechslung in einem vermehrten Anfall von Säuren mit Absinken des lokalen pH-Wertes, wodurch sich säurebildende und säuretolerante Spezies wie *S. mutans* und *Lactobacillus acidophilus* anreichern. Die Säuren führen zu einer gesteigerten Demineralisierung von Zahnhartsubstanz und auf Dauer damit zur Entstehung von Karies [156].

Bei mangelnder Mundhygiene und übermäßiger Plaquebildung kommt es in Reaktion auf die Ansiedelung pathogener gram-negativer Mikroorganismen in subgingivalen Bereichen zu Entzündungsreaktionen im Saumepithel mit einer verstärkten Bildung von Sulkusflüssigkeit. Diese enthält neben Entzündungsmediatoren auch Blutbestandteile wie Hämoglobin und Transferrin. Ein Pathogen wie *Porphyromonas gingivalis* bezieht durch Proteolyse dieser Bestandteile mit Hemin einen wichtigen Wachstumsfaktor, und auch die Genexpression einiger mutmaßlicher Virulenzfaktoren wird durch Hemin hochgefahren [158]. Die Entzündungsreaktion führt zudem zu einem Anstieg des pH-Wertes von 7,0 auf 7,5 und wird zu einem Selektionsvorteil für parodontalpathogene Mikroorganismen, der zu einer Umordnung der Plaquezusammensetzung führt [159]. Parodontalerkrankungen führen zu Attachmentverlust und Knochenabbau, die bei weiterem Fortschreiten in Zahnlockerung und Zahnverlust enden können.

2.8.2. Allgemeine Gesundheit

Kommt das gesunde bakterielle Gleichgewicht des Mundraumes durcheinander, entstehen nicht nur Krankheiten an Zähnen, Zahnhalteapparat und Mundschleimhäuten, vielmehr kann dies auch Auswirkungen auf den allgemeinen Gesundheitszustand nach sich ziehen. Dabei spielt die Mundgesundheit auch unter psychosozialen Aspekten, in der möglichen Entwicklung von Depressionen und Ängsten, eine wichtige Rolle [24].

Es gibt Hinweise und Vorschläge für mögliche Wirkmechanismen der Zusammenhänge zwischen dem Vorliegen von Parodontitiden und dem Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen wie Arteriosklerose. So könnten durch orale Infektionen wie Parodontitiden Bakterien in das Blut gelangen und in Arterienwände eindringen, Entzündungsmediatoren wie CRP oder Thrombozytenaktivierungsfaktoren eine systemische Reaktion bewirken; es könnten Autoimmunreaktionen gegen körpereigene Proteine durch die Immunantwort gegen bakterielle Pathogene entstehen, und bakterielle Toxine könnten arteriosklerotische Wirkung entfalten [25, 160]. Pathogene orale Bakterien wie *Porphyromonas gingivalis* könnten zudem einen Risikofaktor für die Entstehung des akuten Koronarsyndroms mit Verschluss oder Verengung von Herzkranzgefäßen bedeuten [161]. Auch zeigt sich bei Parodontitiden und Zahnverlust unabhängig voneinander eine mögliche Verbindung zum Auftreten von Schlaganfällen [162].

Einen bidirektionalen Zusammenhang scheint es auch zwischen Diabetes mellitus und Parodontitis zu geben. So führt Diabetes mellitus zum vermehrten und auch stärkeren Auftreten des Ausmaßes von Parodontitiden, und in Gegenrichtung kann die Verhinderung oraler Infektionen vermutlich einen positiven Effekt auf den diabetischen Zustand mit Verbesserung der Kontrolle des Blutzuckerspiegels haben [26, 163].

2.9. Analysemethoden zur Quantifizierung der absoluten Bakterienzahl

2.9.1. Messung der optischen Dichte

Eine Möglichkeit zur Messung der Bakterienzahl ist die photometrische Messung der optischen Dichte/Trübung einer Bakteriensuspension. Die Trübung ist dabei bis zu einer gewissen Zahl proportional zur Anzahl der enthaltenen Bakterien.

2.9.2. Durchflusszytometrie

Bei dieser Technik bedarf es zunächst einer Fluoreszenzeinfärbung der Zellkomponenten oder der Zelloberfläche. Die Durchflusszytometrie ermöglicht parallel zur Quantifizierung die physikalische und/oder chemische Charakterisierung von 200-2000 Partikeln pro Sekunde. Hierdurch können physiologische Eigenschaften lebender Zellen, wie die Membranintegrität, Enzymaktivität oder das Membranpotenzial erfasst werden [164].

2.9.3. Titerverfahren

Aufgrund der einfachen Durchführbarkeit, des geringen technischen Aufwandes und der relativ geringen Kosten stellt das Titerverfahren noch immer den Goldstandard zur Bestimmung der absoluten Bakterienzahl dar. Dezimale Serienverdünnungsreihen der Proben werden auf Nähragarplatten ausplattiert und 2-3 Tage im Brutschrank bebrütet. Durch das anschließende visuelle Auszählen kann die Anzahl der KBE ermittelt werden [165].

3. Ziel der Untersuchung

Im Rahmen dieser In-vitro-Studie soll das Elutionsverhalten von drei verschiedenen Polymethylmethacrylat-Schienenkunststoffen aus den drei Fertigungswegen additiv (3D-gedruckt), subtraktiv (gefräst) und klassisch (Pulver-Flüssigkeits-Gemisch) gefertigt in den zwei Elutionsmedien Methanol (MeOH) und Wasser (H₂O) untersucht werden. Anhand der gewonnenen Daten wird anschließend eine Risikobewertung in Schienengröße zum zytotoxischen Potential der Einzelkomponenten auf humane Gingivafibroblasten (HGF) vorgenommen, die durch einen Abgleich der zytotoxischen Grenzwerte aus Literaturdaten und Ergebnissen aus eigens durchgeführten XTT-basierten Zellviabilitätsversuchen erfolgt. Ausgewählt werden die Polymethylmethacrylat (PMMA)-Schienenmaterialien SHERAprint-ortho plus (additive Fertigung), der Fräsrohling SHERAeco-disc PM20 (subtraktive Fertigung) und das klassische (Polymer)Pulver-(Monomer)Flüssigkeits-System SHERAORTHOMER. Als Untersuchungsmethode zur Elution wird die Gaschromatografie in Kombination mit Massenspektrometrie angewandt.

Des Weiteren werden auf den genannten Schienenmaterialien Untersuchungen zur Oberflächenbesiedelung oraler Mikroorganismen (*S. mutans* und *A. naeslundii*) in Monospezieskultur durchgeführt, indem die absolute Zahl adhärenter KBE bestimmt wird. Hierbei wird die Nullhypothese aufgestellt, dass keine signifikanten Unterschiede in der absoluten Anzahl adhärenter KBE, in Betrachtung von Monospezieskulturen mit *S. mutans* und *A. naeslundii*, zwischen den getesteten Materialien und Herstellungsprozessen bestehen.

4. Material und Methoden

4.1. Material

Untersucht wurden drei PMMA-Schienenmaterialien in unterschiedlichen Herstellungsverfahren. Das Autopolymerisat SHERAORTHOMER, das subtraktiv zu fräsende Schienenmaterial SHERAeco-disc PM20, sowie das für die additive Fertigung entwickelte SHERAprint-ortho plus (siehe Tab. 1).

Produktname	Hersteller	LOT-Nummer	Zusammensetzung gemäß der Herstellerangaben
SHERAprint-ortho plus	SHERA® Werkstoff- Technologie GmbH&Co.KG, Lemförde, Germany	11317	Acrylated resin, Tetrahydrofurfuryl methacrylate (THFMA), Aliphatic urethane acrylate, (1-methyl-1,2-ethanediyl)bis[oxy(methyl-2,1-ethanediyl)]diacrylate (TPGDA), Diphenyl (2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphine oxide
SHERAeco-disc PM20		89360	Polymethyl methacrylate (PMMA), Dimethylacrylate Colour pigments
SHERAORTHOMER		Pulver: 41565 Monomer (Flüssigkeit): 35608	Pulver: Polymethyl methacrylates (PMMA), Benzoyl peroxide Colour pigments Monomer (Flüssigkeit): Methylmethacrylate (MMA), 1,4-Butanediol dimethacrylate (BDDMA), N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-p-toluidin (DHEPT), 2(2'-hydroxy-5'-methylphenyl)benzotriazol (TinP), Hydroquinone monomethyl ether, Hydroquinone, Colour pigments Catalysts

Tabelle 1: Untersuchte Schienenmaterialien, Hersteller, LOT-Nummern und Materialzusammensetzung gemäß Hersteller [27].

4.2. Methoden

4.2.1. Versuchsvorbereitung zum Elutionsversuch

4.2.1.1. Vorfertigung der Prüfkörper

Im ersten Schritt der Prüfkörperherstellung wurden Zylinder in den Maßen 6 mm Durchmesser und 20 mm Höhe nach den jeweiligen Herstellerangaben gefertigt.

4.2.1.1.1. Additive Fertigung (3D- Druck): SHERAprint-ortho plus

Die Prüfkörper der additiven (3D) Drucktechnik wurden im CAD Programm entworfen (Geomagic Design X, 3D Systems, Rock Hill, South Carolina, USA) und durch den SHERAeco-Print 30 (SHERA®) im Digital-Light-Processing-Verfahren (DLP-Verfahren) mit einer Druckschichtstärke von 50 µm pro Schicht gefertigt. Laut Hersteller ist eine Neigung des Fertigungsteils zur Bauplattform von 20 Grad optimal, sodass diese Positionierung gewählt wurde. Gemäß den Herstellerangaben wurde überschüssiges Material nach dem Druckvorgang durch das Aufbringen von SHERAclear- p (SHERA®) und sanftes Abstreifen entfernt, die Stützstrukturen gelöst und das Druckmaterial im Anschluss für zwei mal drei Minuten im Ultraschallbad mit SHERAultra- p (SHERA®) gereinigt, wobei zwischen den zwei Bädern überschüssiges und gelöstes Material mit Druckluft weggeblasen wurde. Die Prüfkörper wurden anschließend für 60 Minuten bei Raumtemperatur (23 °C) getrocknet, um abschließend im SHERAflash- light plus (SHERA®) unter konstanter Stickstoffzufuhr (1bar) und Sauerstoffausschluss bei zwei Mal 2000 Lichtblitzen nachgehärtet zu werden.

4.2.1.1.2. Subtraktive Fertigung: SHERAeco-disc PM20

Die Prüfkörper der subtraktiven Fertigung wurden im CAD Programm entworfen (Geomagic Design X, 3D Systems, Rock Hill, South Carolina, USA) und die Zylinder aus den industriell vorgefertigten Rohlingen durch die Ceramill Motion (Ammann Girrbach GmbH, Pforzheim, Deutschland) herausgefräst.

4.2.1.1.3. Klassische Fertigung: SHERAORTHOMER

In der Anteigmethode wurden gemäß den Herstellervorgaben im Verhältnis 10 Gewichtsteile Pulver zu 5 Gewichtsteilen Monomer die Komponenten im Keramikbecher mit einem Metallspatel angerührt und anschließend in einen Polytetrafluorethylen (PTFE)-Schlauch (Reichelt Chemietechnik, Heidelberg, Deutschland) gefüllt. Es folgte die Polymerisation im Drucktopf für 10 Minuten, bei 45°C und 3 bar Druck.

4.2.1.2. Endfertigung der Prüfkörper

Im nächsten Schritt wurden die Zylinder aller Materialien mit dem Secotom 50 (Struers, Augsburg, Deutschland) durch Serienschnitte unter Wasserkühlung in gleichmäßige Scheiben von 2 mm Höhe geschnitten. Anhand eines Politurprotokolls (siehe Anhang) wurde die Hochglanzpolitur einer Zylinderquerschnittsfläche sowie der umlaufenden Zylinderfläche vorgenommen. Wie bei der Schienen- oder Prothesenanfertigung, bei der die Innenfläche nicht poliert wird, um die spätere Passung nicht negativ zu beeinflussen, blieb dabei eine der zwei Zylinderquerschnittsflächen als Schnittfläche unpoliert. Das Ergebnis waren 16 Prüfkörper eines jeden Materials mit einem Zylinderdurchmesser von 6 mm, einer Zylinderhöhe von 2 mm, sowie einer errechneten Prüfkörperoberfläche von 94,2 mm² und einem Volumen von 56,5 mm³.

4.2.1.3. Herstellung einer Kaffeinlösung als internes Richtmaß

Zur Ermittlung der aus den Prüfkörpern ausgelaugten relativen Mengen der gelösten organischen Bestandteile bedarf es eines internen Richtmaßes, dessen Konzentration in der untersuchten Lösung bekannt ist. Hier hat sich der Einsatz von Kaffein bewährt. Dieses wurde zunächst in einer Konzentration von 10 mg Kaffein (TraceCERT®, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) auf 1 ml Wasser (LC-MS-Grade, ROTISOLV®, Roth, Karlsruhe, Deutschland) bzw. Methanol (LC-MS-Grade, ROTISOLV® ≥ 99.9%, Roth, Karlsruhe, Deutschland) angesetzt, um anschließend um den Faktor 10 weiter auf 1 mg/ml verdünnt zu werden.

4.2.1.4. Vorbereitung der Prüfkörper in Wasser

Ein Prüfkörper des jeweiligen Schienenmaterials wurde in ein braunes GC-Glasfläschchen (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gegeben. Nach der Zugabe von 990 µl Wasser (LC-MS-Grade, ROTISOLV®, Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 10 µl der wässrigen Kaffeinlösung ergab sich dadurch eine Kaffeinendkonzentration von 10 µg/ml. Dicht verschlossen und unter Lichtausschluss wurden die Glasfläschchen bei 37° C gelagert. Nach 24h und nach 72h wurden die GC-Glasfläschchen entnommen und ca. 5 Sekunden gevortext, um ein eventuelles Ungleichgewicht der Konzentrationen innerhalb des Eluates auszugleichen. 100 µl Eluat wurden in ein Glasinsert in einem GC-Glasfläschchen abpipettiert und 100µl Essigsäureethylester zur Extraktion hinzugegeben, wobei sich die Phasen trennen. Um den Übergang und die Lösung der organischen Bestandteile aus der wässrigen Phase des Eluates in den Essigsäureethylester zu erreichen, wurden die GC-Glasfläschchen ca. 10 Sekunden

gevortext. Um die Phasentrennung weiter zu verbessern, wurden die Proben bei 2800 U/m für 5 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurden 100 µl der sich oben absetzenden Essigsäureethylesterphase mitsamt den gelösten organischen Bestandteilen abpipettiert, dicht verschlossen und durch die Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC-MS) analysiert.

4.2.1.5. Vorbereitung der Prüfkörper in Methanol

Hier wurden zu jeweils einem Probenplättchen 990 µl Methanol (LC-MS-Grade, ROTISOLV® ≥ 99.9%, Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 10 µl der methanolhaltigen Kaffeinlösung (1mg/ml) hinzugegeben und vermenget, um eine Kaffeinendkonzentration von 10 µg/ml zu erhalten. Dicht verschlossen wurden nach 24h und 72h, bei 37° C, 100µl des Eluates entnommen und durch die GC-MS analysiert.

4.2.2. Analysedurchführung zur Elution

Die Analyse der Eluate wurde an einem Finnigan TRACE Ultra Gaschromatographen (GC) mit Verbindung zu einem Dual-Stage Quadrupole (DSQ) Massenspektrometer (Thermo Electron, Dreieich, Deutschland) durchgeführt. Für die gaschromatographische Abscheidung wurde eine J&W VF-5ms GC Kapillarsäule (Länge 30m, Beschichtung 0.25µm, Innendurchmesser 0.25mm; Agilent, Böblingen, Deutschland) verwendet. Das Trägergas war Helium 5.0, das mit einer konstanten Fließrate von 1ml/min eingesetzt wurde. Die Transferleitung zum Massenspektrometer wies eine Temperatur von 250°C auf. Jede Injektion von 1µl wurde in einem Lösungsmittelabscheidungsmodus durchgeführt. Um den Lösungsmittelüberschuss verdunsten zu lassen, wurde der programmierbare Temperaturverdampfungszulauf (PTV) bei 65°C über eine Minute im Abscheidungsmodus betrieben (30 ml/min), um dann, für die Kapillarübertragung, für zwei Minuten auf 280°C aufgeheizt zu werden. Die Ofentemperatur des Gaschromatographen wurde zunächst für zwei Minuten isotherm bei 50°C gehalten, dann langsam auf 280°C (25°C/min) erhöht und schließlich für 5 Minuten auf dieser Temperatur belassen [166].

Der Massenspektrometer wurde im Elektronenaufprallmodus bei 70eV betrieben (Ionenquellentemperatur: 240°C); nur positive Ionen wurden dabei gescannt. Die Proben wurden im vollen Scanmodus (m/z 50-600) mit einer Scanrate von 4/min aufgenommen. Durch das in Bezug setzen der Messergebnisse zum internen Kaffeinstandard (0.01mg/ml Kaffein = 100%) konnten die relativen, durch den Kunststoff freigesetzten Substanzmengen

bestimmt werden. Alle Eluate wurden vier Mal analysiert ($n=4$). Über einen Abgleich der Massenspektren und der Retentionszeiten mit den entsprechenden Referenzstandards wurde die Identifizierung der gefundenen Substanzen vorgenommen, wobei für jede Substanz eine Kalibrierung vorgenommen wurde. Außerdem erfolgte bei nicht zuordenbaren Massenspektren und Retentionszeiten ein Abgleich mit der NIST/EPA Bibliothek und Literaturdaten, um alle gelösten Substanzen aufdecken zu können [82].

4.2.3. Versuchsaufbau zur Zytotoxizitätsbestimmung im XTT-Test

4.2.3.1. Chemikalien

Die im Sicherheitsdatenblatt gelisteten (Meth-) Acrylate THFMA, BDDMA und TPGDA (siehe Tabelle 1), zu denen keine EC_{50} -Werte bei HGF vorlagen, wurden von Sigma-Aldrich (Weinheim, Deutschland) bezogen. Eine Lösung dieser erfolgte durch Dimethylsulfoxid (DMSO, 99% Reinheit; Merck, Darmstadt). Nach der Verdünnung mit Dulbecco's modified eagle's Medium (DMEM) (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) betrug die DMSO Konzentration $< 1\%$. Die Kontrollzellen wurden nur mit Medium behandelt, die Negativkontrolle erfolgte mit Triton X (1%; Sigma-Aldrich, Weinheim, Deutschland) in Medium.

4.2.3.2. Zellkulturen

Die HGF wurden von Provitro GmbH (Bestellnr.: 1210412; Berlin, Deutschland) bezogen. Die Anzucht der HGF erfolgte in Zellkulturflaschen im Inkubator ($37^{\circ}C$, $5\% CO_2$ und 100% Luftfeuchtigkeit) bis zu einer Zellkonfluenz von $75 - 85\%$. Als Zellmedium diente Quantum 333, welchem L-Glutamin und 1% antibiotische/antimykotische Lösung ($10,000$ Einheiten/ml Penicillin, 25 mg/ml Streptomycinsulfat, 25 mg/ml Amphotericin B; (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland)) hinzugesetzt wurden. Nach Erreichen der gewünschten Konfluenz wurde das Medium entfernt, die Zellen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, PAA Laboratories GmbH) umspült und durch kurze Hinzugabe von Trypsin/EDTA (PAA Laboratories GmbH) vom Boden abgelöst.

4.2.3.3. XTT-Test

$100\mu l$ Medium (DMEM) mit 20.000 Zellen/Well wurden in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Nach $24h$ Inkubation wurde das Medium entfernt und durch Medium mit THFMA ($0,01 - 10mM$), BDDMA ($0.1 - 30mM$) und TPGDA ($0.1 - 30mM$) ersetzt und erneut für $20h$ in den

Inkubator (37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit) gegeben. Kontrollzellen wurden reinem Medium oder Medium mit DMSO (Konzentration <10%) ausgesetzt. Triton X-100 (1%) diente als Negativkontrolle. Anschließend, und damit 4h vor der spektrofotometrischen Auswertung, wurden die Zellen umspült und ein Gemisch aus XTT (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate) mit einem Elektronen-Kopplungs-Reagenz (PMS [N-methyldibenzopyrazine methyl sulphate]) hinzugegeben. Nach weiteren 4h im Inkubator wurde die Formazanbildung bei 450nm (Referenzwellenlänge 670nm) spektrofotometrisch bestimmt (MULTISKAN FC; Thermo Fisher Scientific (Shanghai) Instruments co., Ltd., China). Drei unabhängige Versuche (n=3) wurden durchgeführt.

4.2.4. Schienenkonstruktion und -vermessung

Ein Standard Arbeitsmodell AG-3 (32 Zähne; Frasco GmbH, Tettang, Deutschland) wurde eingescannt (Zirkonzahn.Scan®, Zirkonzahn S.R.L., Gais, Italien) und jeweils eine Michiganschiene für Ober- und Unterkiefer konstruiert (ZIRKONZAHN.Modellier®, Zirkonzahn S.R.L.). Die minimale okklusale Materialstärke wurde auf 1,5mm, die Peripherie mit einer Materialstärke von 1mm festgelegt. Das Schienenvolumen und die Schienenoberfläche wurden im Anschluss durch messtechnische Software (Geomagic Control X, 3D Systems, Rock Hill, South Carolina, USA) vermessen.

4.2.5. Datenauswertung der GC/MS und XTT-Test Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Versuche werden als Mittelwert (M) ± Standardabweichung (SD) in den Tabellen 3-6 angegeben.

4.2.6. Versuchsaufbau zur Messung des bakteriellen Wachstums

4.2.6.1. Prüfkörperherstellung

Jeweils 16 Prüfkörper eines Materials wurden in der gleichen Art und Weise, mit der gleichen Dimensionierung und den gleichen Arbeitsschritten wie im Elutionsversuch hergestellt und poliert (siehe Punkte 3.2.1.1 und 3.2.1.2).

4.2.6.2. Desinfektion der Prüfkörper

Da die verwendeten Materialien vom Hersteller nicht als autoklavierbar deklariert sind, musste eine effektive Desinfektionsmethode gefunden werden. Eine kurzzeitige Desinfektion von einer Minute mit Alkohol erwies sich als nicht ausreichend. Gute Ergebnisse ließen sich

schließlich mit 0,5ml einer 2-prozentigen Chlorhexidindigluconatlösung (Speikosept, Speiko®, Münster, Deutschland) und einer Einwirkzeit von 12h für jeden Prüfkörper erzielen. Nach der Einwirkzeit wurden die Prüfkörper mit einer sterilen Pinzette entnommen und überschüssiges Chlorhexidindigluconat durch ein ausgiebiges Umspülen mit steriler 0,9%-iger Kochsalzlösung (Fresenius Kabi, Bad Homburg von der Höhe, Deutschland) gelöst.

4.2.6.3. Bakterienauswahl und Stammhaltung

Bei den verwendeten Bakterien fiel die Wahl zum Einen auf die für die Kariesbildung hoch relevante Bakterienspezies *S. mutans* [167] aus der Gattung der Streptokokken, sowie aus der Familie der Aktinomyzeten das Bakterium *A. naeslundii*, welches sich als eines der ersten Bakterien auf den oralen Oberflächen anlagert, ein starker Plaquebildner ist und mit der Entstehung von Parodontitis und Karies in Verbindung gebracht wird [168].

Bakterienstamm	DSM-Nummer
<i>Streptococcus mutans</i>	20523
<i>Actinomyces naeslundii</i>	17233

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme

Die bei -80°C tiefgefrorenen Stammkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) wurden bei Raumtemperatur (21 ± 2°C) aufgetaut und mit einer sterilen Impföse (VWR, Radnor, PA, USA) in Form eines Dreifelderausstrichs auf Schädler-Agar-Platten (BD Schaedler Agar mit Vitamin K1 und 5% Schafblut, Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) überimpft und im Inkubator (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) bei 60% Luftfeuchtigkeit, 5,8% CO₂ und 37°C für 48h kultiviert. Zur weiteren Stammhaltung erfolgte alle drei bis vier Tage eine erneute Überimpfung auf frische Schädler-Agar-Platten. Nach jeweils 14-21 Tagen erfolgte eine Kultivierung neuer Bakterienstämme aus den tiefgefrorenen Stammkulturen.

4.2.6.4. Nährmedienauswahl

Als Flüssignährlösung zur Bakterienanzucht auf den Prüfkörpern wurde auf Brain Heart Infusion (BHI) - Medium (DSMZ-Medium Nr. 215) zurückgegriffen, welches nach Herstellerangaben im Verhältnis 11,1g BHI zu 300ml destilliertem Wasser in schraubverschließbaren Glasflaschen angesetzt und dicht verschlossen bei 121°C für 15 Minuten im Dampfsterilisator (H+P, München, Deutschland) autoklaviert wurde. Die Lagerung erfolgte anschließend unter Ausschluss von Licht bei 4°C. Nach Öffnung wurde die Nährlösung

nach Ablauf von zwei Tagen verworfen. Als festes Nährmedium für die Bakterienanzucht in der Versuchsvorbereitung und zur Ausplattierung der KBE am Ende der Versuchsreihe fiel die Wahl auf Schädler-Agar-Platten.

4.2.7. Versuchsaufbau zur Bakterienadhärenz

Der Versuch wurde für jedes Material (jeweils mit einem neuen Prüfkörper) 16 Mal (n=16) wiederholt.

4.2.7.1. Versuchsphase 1

Jeweils ein steriler Prüfkörper eines Materials wurde mit der unpolierten Seite nach unten in ein 15ml Falcon-Röhrchen gegeben. Die Beimpfung mit den Bakterienstämmen erfolgte durch das Aufnehmen von Bakterien der zwei Tage zuvor angesetzten Dreifelderausstriche mit einer Impföse und dem anschließenden Einbringen dieser in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1ml BHI, bis eine Trübung nach McFarland-Standard von 6.0 erreicht wurde. Dies entspricht einer geschätzten Bakterienkonzentration von 18×10^8 Zellen/ml. Die Bakteriensuspension wurde ca. 10 Sekunden gevortext, mit einer Pipettenspitze 100µl der Suspension zum Prüfkörper in die Falcon-Röhrchen gegeben und 2ml sterile BHI-Nährlösung hinzupipettiert. Um eine gleichmäßige Verteilung der Bakteriensuspension und Umspülung der Prüfkörper zu erzielen, wurden die dicht verschlossenen Falcon-Röhrchen bei 37°C für 120h in einem Forma Orbital Shaker (Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, USA) platziert. Nach 48h erfolgte ein Teilwechsel der Nährlösung, indem jeweils 1ml Nährlösung mit einer Pipette entnommen und durch 1ml frische BHI-Nährlösung ersetzt wurde.

4.2.7.2. Versuchsphase 2

Nach Entnahme der Falcon-Röhrchen aus dem Forma Orbital Shaker wurde der Prüfkörper vorsichtig mit einer sterilen Pinzette in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 2ml Kochsalzlösung gegeben und leicht geschwenkt, um nicht anheftende Bakterien wegzuschwemmen. Der Prüfkörper wurde wieder vorsichtig entnommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1ml Kochsalzlösung gegeben, dicht verschlossen, um dann 60 Sekunden gevortext zu werden. Hierbei sollte der anheftende Biofilm mitsamt den Bakterien gelöst werden. Mit dieser Ausgangslösung wurde in einem weiteren Eppendorf-Reaktionsgefäß eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 10 mit 900µl Kochsalzlösung und 100µl der Ausgangslösung gestartet. Nach 10 Sekunden auf dem Vortexgerät wurden auch von dieser Verdünnung 100µl entnommen und mit 900µl Kochsalzlösung um den Faktor 10 weiter verdünnt. Die Verdünnungsreihe

wurde bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-4} fortgesetzt. Nun folgte die Ausplattierung auf Schädler-Agar-Platten, wobei jeweils 100 μ l jeder Verdünnung sowie der Ausgangslösung mit einem Spatel (VWR) ausgestrichen wurden. Die Schädler-Agar-Platten wurden für 72h inkubiert, um anschließend die nun sichtbaren KBE auszählen zu können. Einbezogen wurden dabei nur Platten mit einer Kolonienzahl von 20- 1000 KBE. Traf dies für mehrere Platten über mehrere Verdünnungsstufen einer Versuchsreihe zu, wurden diese gemittelt. Die Anzahl der KBE/ml ergibt sich aus der Zahl der gezählten KBE multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor der jeweiligen Probe.

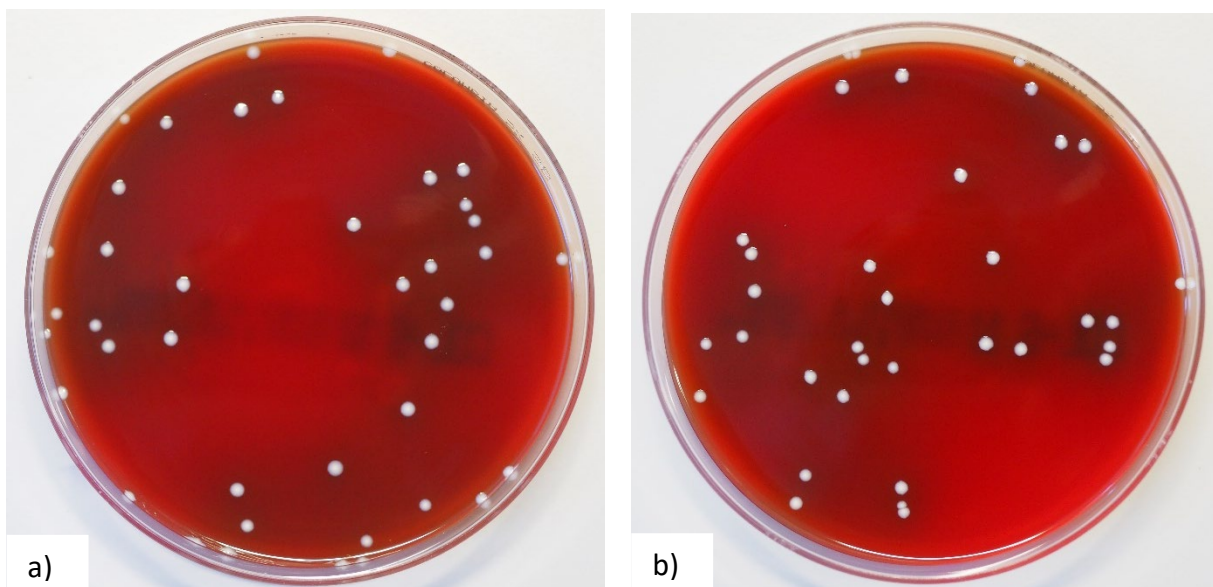


Abbildung 9: Beispiele von bebrüteten Schädler-Agar-Platten: (a) *S. mutans*, (b) *A. naeslundii*

4.2.8. Statistische Auswertung zum bakteriellen Wachstum

Neben einer deskriptiven Auswertung und Darstellung der Daten erfolgte eine statistische Auswertung mittels SPSS-Software (SPSS Version 24, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Um eine mögliche Normalverteilung der Daten nachzuweisen, wurde ein Shapiro-Wilks-Test durchgeführt (α -Level 0,05). Zur Analyse der Daten wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Tukey-HSD-Post-Hoc-Test angewendet. Zusätzlich wurden die Daten auf Varianzhomogenität mittels des Levene-Tests untersucht, was als Testvoraussetzung für die ANOVA von Nöten ist.

5. Ergebnisse

5.1. Ergebnisse der Elution

Durch die 24h- bzw. 72h-Elution in Wasser und Methanol konnten aus den untersuchten Materialien insgesamt elf verschiedene, gelöste Substanzen, darunter sechs Methacrylate nachgewiesen werden. Diese sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Zusammenfassend kann vorweggenommen werden, dass es in SHERAORTHOMER und SHERAeco-disc PM20 im Lösungsmittel Wasser, trotz teils hohen Löslichkeiten in Methanol, zu keiner nachweislichen Löslichkeit von Methacrylaten und Additiven kam. Bei SHERAprint-ortho plus konnte das Methacrylat THFMA in Methanol und auch in Wasser nachgewiesen werden.

<i>Substanz- abkürzung</i>	<i>Substanzname</i>	<i>Funktion</i>	<i>Molekulargewicht (g/mol)</i>	<i>CAS- Nummer</i>
BDDMA	1,4 Butylene glycol dimethacrylate	(Ko-)Monomer	226,27	2082-81-7
BHT	2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenon	Inhibitor, Antioxidant	220,35	128-37-0
BP	Biphenyl	Initiator	154,21	92-52-4
BPE	Phenyl benzoate	Initiator	198,22	93-99-2
DCHP	Dicyclohexylphtalat	Weichmacher	330,42	84-61-7
EGDMA	Ethylene glycol dimethacrylate	(Ko-)Monomer	198,22	97-90-5
HEMA	2-Hydroxyethyl methacrylate	(Ko-)Monomer	130,14	868-77-9
HPMA	3-Hydroxypropyl methacrylate	(Ko-)Monomer	144,17	27813-02-1
MMA	Methyl methacrylate	(Ko-)Monomer	100,12	80-62-6
THFMA	Tetrahydrofurfuryl methacrylate	(Ko-)Monomer	170,21	2455-24-5
TinP	2-(2'-Hydroxy-5'-methylphenyl)benzotriazol, Tinuvin P	Fotostabilisator	225,25	2440-22-4

Tabelle 3: Nachgewiesene Substanzen, deren Funktion, sowie Molekulargewicht und CAS-Nummer [27].

5.1.1. Gelöste Substanzen aus SHERAprint-ortho plus

Aus SHERAprint-ortho plus konnte im Lösungsmittel Wasser einzig das (Ko-)Monomer THFMA mit einer Konzentration von 2,03 ($\pm 0,22$) $\mu\text{mol/l}$ nach 24h bzw. 7,47 ($\pm 2,77$) $\mu\text{mol/l}$ nach 72h detektiert werden.

THFMA konnte neben vier weiteren (Ko-)Monomeren (MMA, HEMA, HPMA und EGDMA) auch in Methanol in messbaren Mengen in Lösung gehen. Zudem wurden in Methanol der Inhibitor BHT und der Fotostabilisator TinP detektiert.

SHERAprint-ortho plus (additive Fertigung)		
Substanz	MeOH	
M \pm SD [μM]	24h	72h
MMA	66,09	70,32
\pm	16,74	7,45
HEMA	238,98	378,98
\pm	33,02	37,12
HPMA	57,16	108,14
\pm	9,89	15,76
THFMA	100,83	131,92
\pm	10,82	3,08
EGDMA	1,36	3,30
\pm	0,21	2,53
BHT	0,12	0,37
\pm	0,04	0,10
TinP	1,08	1,34
\pm	0,92	1,45
Substanz	H₂O	
M \pm SD [μM]	24h	72h
THFMA	2,03	7,47
\pm	0,22	2,77

Tabelle 4: Qualifizierung und Quantifizierung von Substanzen aus Wasser- und Methanol-Eluaten aus SHERAprint-ortho plus nach 24h bzw. 72h. Angaben in Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) [μM] [27].

5.1.2. Gelöste Substanzen aus SHERAORTHOMER

Aus SHERAORTHOMER konnten im Lösungsmittel Wasser keine gelösten (Ko-)Monomere oder Additive festgestellt werden.

In Methanol konnten die Methacrylate MMA und BDDMA, der Fotostabilisator TinP, der Weichmacher DCHP, sowie die BP und BPE nachgewiesen werden, wobei beide letzteren die Zerfallsprodukte des in PMMA häufig eingesetzten Initiators Dibenzoylperoxid (DBP) sein könnten [71](Seite 328).

SHERAORTHOMER (klassische Fertigung)		
Substanz	MeOH	
	24h	72h
M ± SD [µM]		
MMA	8.173,80	8.768,23
	± 963,08	± 148,65
BP	2,90	3,10
	± 0,28	± 0,28
BDDMA	148,32	161,00
	± 48,37	± 52,13
BPE	434,82	481,70
	± 20,52	± 25,77
TinP	368,05	440,16
	± 31,15	± 20,14
DCHP	3,14	5,48
	± 0,65	± 1,08

Tabelle 5: Qualifizierung und Quantifizierung von Substanzen aus Methanol-Eluaten von SHERAORTHOMER nach 24h bzw. 72h. Angaben in Mittelwert (M) ± Standardabweichung (SD) [µM] [27].

5.1.3. Gelöste Substanzen aus SHERAeco-disc PM20

Aus SHERAeco-disc PM20 konnten im Lösungsmittel Wasser keine gelösten (Ko-)Monomere oder Additive festgestellt werden.

In Methanol gingen nachweislich das Monomer MMA, sowie die Initiatorbestandteile BP und BPE in Lösung.

SHERAeco-disc PM20 (subtraktive Fertigung)		
Substanz	MeOH	
	24h	72h
M ± SD [μ M]		
MMA	2.383,28	3.513,53
±	237,62	226,98
BP	30,94	55,83
±	2,90	1,92
BPE	957,21	1.676,58
±	109,87	76,96

Tabelle 6: Qualifizierung und Quantifizierung von Substanzen aus Methanol-Eluaten von SHERAORTHOMER nach 24h bzw. 72h. Angaben in Mittelwert (M) ± Standardabweichung (SD) [μ M] [27].

5.2. Ergebnisse zur Zytotoxizitätsbestimmung im XTT-Test

Die Ergebnisse zur Bestimmung der halbmaximalen Effektkonzentration (EC_{50}) von THFMA, BDDMA und TPGDA für HGF, sowie die relative Toxizität - definiert als das Verhältnis der Zytotoxizität (in Form des EC_{50} -Wertes) von BDDMA bzw. TPGDA zum EC_{50} von THFMA - sind in Tabelle 6 dargestellt.

	EC_{50} (M±SD) [μM]	Relative Toxizität
THFMA	3.006,0 ± 408	1
BDDMA	2.569,5 ± 308	1,2
TPGDA	596,7 ± 88	5,0

Tabelle 7: EC_{50} -Werte (Angaben in Mittelwert (M)±Standardabweichung (SD) in [μ M]) und relative Toxizität von THFMA, BDDMA and TPGDA für HGF [27].

5.3. Ergebnisse zur Schienenvermessung

Die Vermessung der konstruierten Michiganschienen für die Risikoanalyse zum Elutionsversuch ergab für eine Unterkieferschiene eine Oberfläche von $5.153,9\text{mm}^2$ und ein Volumen von $3.198,9\text{mm}^3$ sowie für eine Oberkieferschiene eine Oberfläche von $5.128,6\text{mm}^2$ und ein Volumen von $3.217,9\text{mm}^3$ (siehe Abb. 10). Der Mittelwert zwischen Ober- und Unterkiefer beträgt folglich $5.141,25\text{mm}^2$ Oberfläche und $3208,4\text{mm}^3$ Volumen.

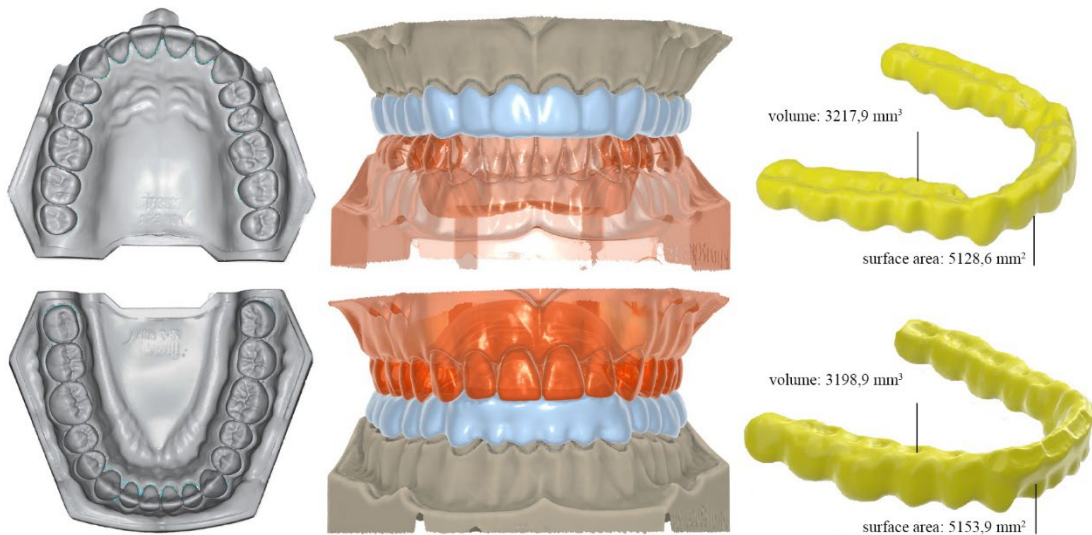


Abbildung 10: Konstruktion von Michiganschienen für Ober- und Unterkiefer mit Vermessung von Schienenoberfläche (in mm^2) und -volumen (in mm^3) [27].

5.4. Ergebnisse zur Messung des bakteriellen Wachstums

5.4.1. Actinomyces naeslundii

Tabelle 7 zeigt Mittelwert und Standardabweichung der drei getesteten Materialien, wobei die Werte sich auf KBE/ml beziehen. Diagramm 1 stellt dies grafisch dar.

Schienenmaterial	Mittelwert (KBE/ml)	Standartabweichung (KBE/ml)	N
SHERAprint ortho plus	55.631,3	±20.494,7	16
SHERAeco-disc PM20	48.725,0	±19.680,8	16
SHERAORTHOMER	67.737,5	±21.175,9	16

Tabelle 8: Messwerte von *A. naeslundii* in KBE/ml auf den untersuchten Materialien

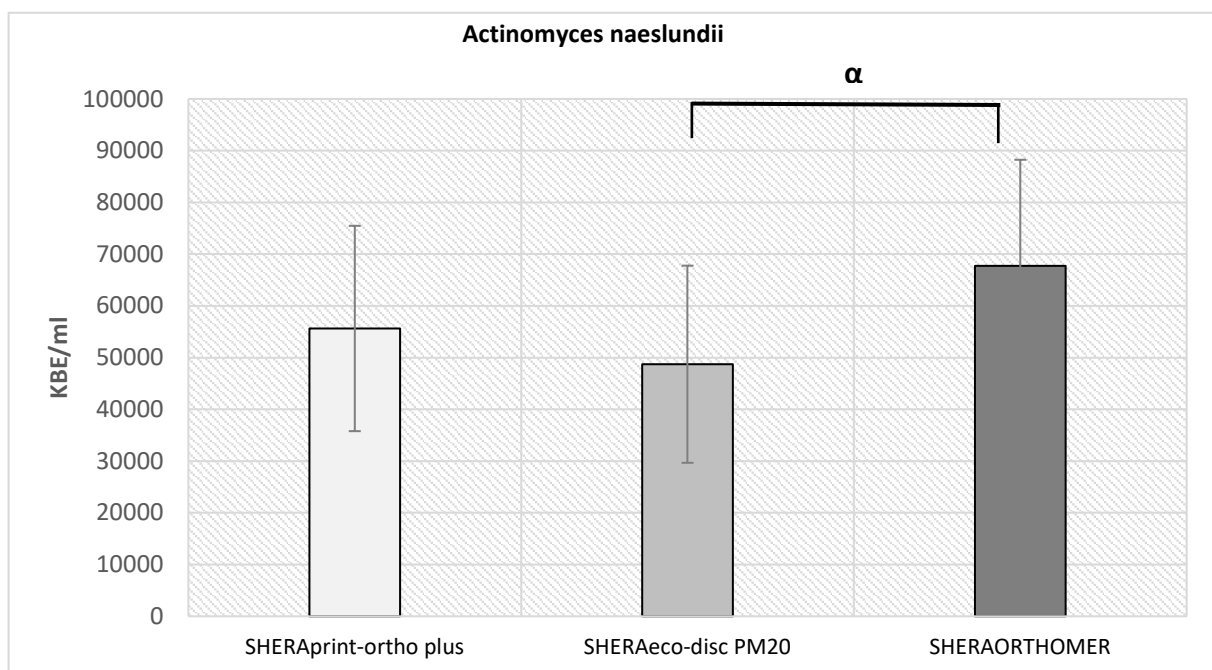


Diagramm 1: Mittelwert und Standardabweichung von *A. naeslundii* auf den untersuchten Materialien und signifikanter Unterschied ($\alpha < 0,05$) zwischen SHERAeco-disc PM20 und SHERAORTHOMER.

Der Shapiro-Wilk-Test zeigt in Tabelle 8 eine Normalverteilung der Ergebnisse.

Schienenmaterial	Statistik	df	Signifikanz
SHERAprint-ortho plus	0,909	16	0,111
SHERAeco-disc PM20	0,924	16	0,195
SHERAORTHOMER	0,972	16	0,868

Tabelle 9: Shapiro-Wilk-Test zu den Ergebnissen mit *A. naeslundii*

Die Datenvarianz zeigt sich im Levene-Test in Tabelle 9 homogen (Sig. = 0,877).

F	df1	df2	Sig.
0,132	2	45	0,877

Tabelle 10: Levene-Test zu den Ergebnissen mit *A. naeslundii*

Die ANOVA ergab einen signifikanten Einfluss des getesteten Materials auf die Anzahl der KBE von *A. naeslundii* (in KBE/ml), welche an den Prüfkörpern adhären wurden ($p=0,037$). Daraus ergibt sich eine Effektstärke von $\eta^2=0,136$. Die nachfolgend durchgeführten Post-Hoc-Tests mittels Tukey-HSD-Test ergaben einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen SHERAeco-disc PM20 und SHERAORTHOMER ($p=0,031$). Dies ist auch in Diagramm 1 dargestellt. Bei SHERAprint-ortho plus wurden keine signifikanten Unterschiede zu den Vergleichsmaterialien festgestellt.

Multiple Comparisons						
Abhängige Variable: KBE_ml						
Tukey-HSD					95%-Konfidenzintervall	
(I)Gruppe	(J)Gruppe	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Sig.	Untergrenze	Obergrenze
SHERAeco-disc PM20	SHERAprint-ortho plus	-6906,2500	7233,56794	0,609	-24437,6236	10625,1236
	SHERAORTHOMER	-19012,5000*	7233,56794	0,031	-36543,8736	-1481,1264
SHERAprint-ortho plus	SHERAeco-disc PM20	-6906,2500	7233,56794	0,609	-10625,1236	24437,6236
	SHERAORTHOMER	-12106,2500	7233,56794	0,226	-29637,6236	5425,1236
SHERAORTHOMER	SHERAeco-disc PM20	19012,5000*	7233,56794	0,031	1481,1264	36543,8736
	SHERAprint-ortho plus	12106,2500	7233,56794	0,226	-5425,1236	29637,6236

Grundlage: beobachtete Mittelwerte.
 Der Fehlerterm ist Mittel der Quadrate (Fehler) = 418596041,667
 *Die mittlere Differenz ist auf das 0,05-Niveau signifikant.

Tabelle 11: Tukey-HSD zu den Ergebnissen mit *A. naeslundii*

5.4.2. Streptococcus mutans

Tabelle 11 zeigt Mittelwert und Standardabweichung der drei getesteten Materialien, wobei die Werte sich auf KBE/ml beziehen. Diagramm 2 stellt dies grafisch dar.

Schienenmaterialien	Mittelwert (KBE/ml)	Standartabweichung (KBE/ml)	N
SHERAeco-disc PM20	52.603,1	±26.041,5	16
SHERAprint-ortho plus	65.846,9	±25.073,7	16
SHERAORTHOMER	49.240,6	±24.745,8	16

Tabelle 12: Messwerte von *S. mutans* in KBE/ml auf den untersuchten Materialien

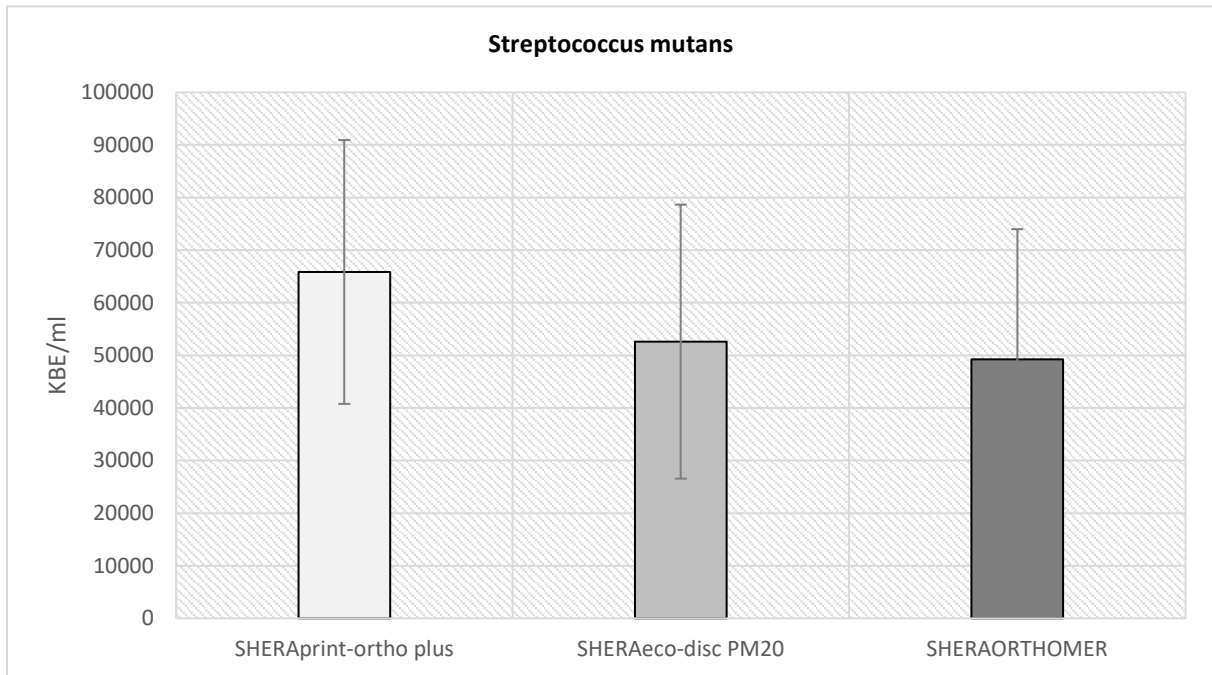


Diagramm 2: Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung von *S. mutans* auf den untersuchten Materialien

Der Shapiro-Wilk-Test zeigt in Tabelle 12 eine Normalverteilung der Ergebnisse.

Schienenmaterialien	Statistik	df	Signifikanz
SHERAprint-ortho plus	0,937	16	0,319
SHERAeco-disc PM20	0,932	16	0,264
SHERAORTHOMER	0,921	16	0,174

Tabelle 13: Shapiro-Wilk-Test zu den Ergebnissen mit *S. mutans*

Die Datenvarianz zeigt sich im Levene-Test homogen (Sig. = 0,985).

F	df1	df2	Sig.
0,015	2	45	0,985

Tabelle 14: Levene-Test zu den Ergebnissen mit *S. mutans*

Bei *S. mutans* ergab die ANOVA keinen signifikanten Einfluss des getesteten Materials auf die Anzahl der KBE/ml, welche an den Prüfkörpern adhären wurden ($p = 0,157$).

6. Diskussion

Die Biokompatibilität dentaler Kunststoffe ist von zentraler Bedeutung für den Erhalt der Gesundheit von Patienten und Personen mit beruflicher Exposition. Das erste Ziel dieser In-vitro-Studie war es daher, drei PMMA-basierte dentale Schienenkunststoffe auf ihr Löslichkeitsverhalten hin zu untersuchen, um eine erste Einschätzung ihrer Biokompatibilität vornehmen zu können. Hierfür wurden das Klasse IIa-zertifizierte und für die additive Herstellung entwickelte SHERAprint-ortho plus®, das subtraktiv zu bearbeitende und unter Industriebedingungen polymerisierte SHERAeco-disc PM20, sowie, aus dem Bereich der klassischen Methode, das im zahntechnischen Labor in der Anteiemethode verarbeitete Kaltpolymerisat SHERAORTHOMER ausgesucht. Die gefertigten Prüfkörper wurden für 24h bzw. 72h in den Lösungsmitteln Wasser und Methanol eluiert und anschließend durch Gaschromatografie und Massenspektrometrie auf Rückstände chemischer Substanzen hin analysiert. Die eluierten Substanzen werden folgend anhand vorliegender Literatur diskutiert und in einer Risikoanalyse Hochrechnungen der gemessenen Konzentrationen aus den Prüfkörpern auf Schienengröße vorgenommen. Die errechneten Werte werden anschließend mit vorliegenden EC₅₀-Werten aus der Literatur oder, wo fehlend, mit EC₅₀-Werten aus eigens durchgeführten XTT-Zytotoxizitätstest verglichen und die Ergebnisse diskutiert.

Eine Gewebeschädigung könnte jedoch nicht nur direkt durch die gelösten Substanzen selbst, sondern auch indirekt über ein durch diese Substanzen vermehrtes bakterielles Wachstum auf den Materialien hervorgerufen werden [18]. Weiterhin bedingen die Materialzusammensetzung und der Herstellungsprozess die Oberflächeneigenschaften, welche unmittelbaren Einfluss auf die Biofilmanlagerung haben können. So sollten neu entwickelte zahnmedizinische Materialien immer auf ihre Anfälligkeit für die Anlagerung von Karies und Parodontitis verursachenden Bakterien getestet werden. Folglich beschäftigte sich der zweite Teil dieser Studie mit dem Wachstum der Monospezieskulturen von *S. mutans* und *A. naeslundii* auf den bereits beschriebenen Schienenkunststoffen. Hierbei wird die Nullhypothese aufgestellt, dass keine signifikanten Unterschiede in der absoluten Anzahl adhärenter KBE, in Betrachtung von Monospezieskulturen mit *S. mutans* und *A. naeslundii*, zwischen den getesteten Materialien und Herstellungsprozessen bestehen.

6.1. Diskussion von Material und Methode zum Elutionsversuch

6.1.1. Auswahl der Kunststoffe

Durch technischen Fortschritt ist auch in der Zahnmedizin die additive Fertigung in den letzten Jahren immer weiter in den Fokus der Forschung und Wissenschaft von Industrie und Universitäten gerückt. Neben der technischen Umsetzbarkeit haben die Materialien und deren Eigenschaften eine zentrale Rolle in der Entwicklung eingenommen. Ein additiv eingesetztes Material zur Herstellung von Aufbissbehelfen ist das PMMA-basierte SHERAprint-ortho plus (SHERA®), welches die Klasse IIa-Zertifizierung gemäß dem Medizinproduktegesetz hält und damit nicht nur bis zu 30 Tage in der Mundhöhle, sondern auch in chirurgisch geschaffenen Körperhöhlen verweilen darf. Durch Betrachtung der Biokompatibilität von SHERAprint-ortho plus setzt sich diese Studie mit der Frage nach dem Elutionsverhalten und den Materialeigenschaften in Bezug auf bakterielles Wachstum und Adhäsion auseinander. Neben einem additiven Schienenmaterial sollten in dieser Studie auch Schienenmaterialien aus der subtraktiven und klassischen Fertigung aus dem Labor untersucht werden. Da die Polymerisation der Rohlinge aus der subtraktiven Fertigung unter Industriebedingungen mit standardisierten Druck- und Temperaturverhältnissen abläuft, ist anzunehmen, dass diese in Bezug auf Biokompatibilität und Homogenität eine hohe Güte aufweisen. Als Material der subtraktiven Fertigung wurde SHERAeco-disc PM20 (SHERA®) ausgewählt. Die klassisch-manuelle Fertigung im zahntechnischen Labor ist weiterhin sehr weit verbreitet und in Sachen Homogenität und Biokompatibilität auch abhängig von den vorherrschenden Verarbeitungs- und Polymerisationsbedingungen. Hierfür wurde das Kaltpolymerisat SHERAORTHOMER (SHERA®) als klassisch-laborgefertigtes Material zur Testung herangezogen.

6.1.2. Herstellung der Prüfkörper

Die Prüfkörperplättchen in Zylinderform hatten einen Durchmesser von 6mm und eine Höhe von 2mm. Diese Abmessungen wurden bereits von Autoren anderer Studien zur Löslichkeitsbestimmung von methacrylatbasierten dentalen Füllungskunststoffen verwendet [82, 83]. Bei SHERAORTHOMER wurde die Anteigmethode mit anschließender Drucktopfpolymerisation der Streumethode vorgezogen. Unter Verwendung eines Drucktopfes kamen *Nik et al.* [12] zu dem Ergebnis, dass die Streumethode gegenüber der Anteigmethode eine geringere Restmonomermenge verursache. Ohne Drucktopfpolymerisation sei die Anteigmethode vorzuziehen. *Iça et al.* [72] stellten bei einigen

kieferorthopädischen Kunststoffen bei Vergleich zwischen Anteig- und Streumethode ebenfalls höhere Restmonomerwerte bei der Anteilmethode fest.

Anhand eines Politurprotokolls (siehe Anhang) wurden eine Zylinderquerschnittsfläche und die umlaufende Umrandung der Probenkörper hochglanzpoliert. Die zweite Zylinderquerschnittsfläche blieb unpoliert, da auch bei Schienen oder Prothesen aufgrund der sich sonst einstellenden Passungenauigkeit die Unterseite keiner Politur unterzogen wird. Die Politur hat mindernden Einfluss auf den Restmonomergehalt [71, 169] (Seite 328). Dies wurde beispielsweise an einem Infiltranten gezeigt, wobei sich durch eine Politur die Löslichkeit einzelner Substanzen um bis zu einer Zehnerpotenz senken ließ, was mitunter auch an der Wärmeentwicklung mit positiver Auswirkung auf den Grad der Polymerisation liegen könnte [170]. Ein wichtiger Aspekt ist, dass die Politur auch mit einer Verkleinerung der Oberfläche einhergeht, die einen entscheidenden Einfluss auf die eluirbaren Restmonomermengen haben könnte [171]. *Gonçalves et al.* [79] stellten fest, dass ein Autopolymerisat nach mechanischer Politur gegenüber der chemischen Politur (MMA bei 70°C) eine signifikant geringere Restmonomerelution aufweise und die mechanische Politur daher vorzuziehen sei.

Darüber hinaus führt die Politur zu einer signifikanten Verringerung der bakteriellen Oberflächenbesiedelung [141, 142].

6.1.3. Messmethode

Zur Analyse des Elutionsverhaltens wurde die Gaschromatografie herangezogen. Diese Methode wurde schon durch viele andere Autoren zur Bestimmung der Elution aus PMMA verwendet [77, 79, 112, 172, 173]. *Lung und Darvell* [173] empfehlen zur MMA-Bestimmung aus PMMA die Verwendung der GC. Als Detektor wurde die hochkompatible Massenspektrometrie verwendet, wodurch eine optimale Identifikation der Substanzen mit detaillierten Strukturinformation möglich ist [90]. Eine weitere häufig verwendete Methode ist die Hochleistungsflüssigchromatografie (high performance liquid chromatography /HPLC) [11, 73, 86].

Die deutlichen Vorteile der GC liegen in der Spurenanalytik und der Aufschlüsselung komplexer Testsubstanzen durch eine entschieden höhere Bodenzahl der Trennsäule und oft empfindlichere Detektoren. Im selben Zeitfenster werden dadurch mehr Substanzen aufgetrennt [88]. Es lassen sich kleinere flüchtige Moleküle wie (Ko-)Monomere und Additive

besser als Basismoleküle mit hohem Molekulargewicht analysieren, welche teilweise nur an ihren Zerfallsprodukten erkannt werden können [85]. Das Anwendungsspektrum der GC ist aufgrund der Voraussetzung der unzerstörten Verdampfbarkeit der (überwiegend flüchtigen) Substanzen im Vergleich zur HPLC kleiner. In der HPLC lassen sich, sobald eine ausreichende Löslichkeit in der mobile Phase besteht, auch thermisch instabile und nicht flüchtige Stoffe wie Zellproteine oder andere Zellsyntheseprodukte analysieren, die nicht für die GC-Analyse geeignet wären [87].

Wie auch in bereits zitierten Studien dargestellt, kann die Gaschromatografie in Verbindung mit Massenspektrometrie bei PMMA als geeignete Methode zur detaillierten Aufschlüsselung von löslichen Substanzen und deren Mengen angesehen werden.

6.1.4. Auswahl des Lösungsmittels

In der vorliegenden Studie wurden die Proben sowohl in Methanol als auch in Wasser eluiert. Wasser bietet dabei die beste Vergleichbarkeit zu Dentinliquor und menschlichem Speichel [82, 174]. Aus den Ergebnissen zum Elutionsverhalten der drei unterschiedlichen, PMMA-basierten Kunststoffe geht hervor, dass es in Abhängigkeit vom Elutionsmedium (MeOH und H₂O) einen deutlichen Unterschied in der Zahl und in der Menge der sich nachweisbar lösenden Monomere und Additive gibt. Auch die Ergebnisse dieser Studie zum Elutionsverhalten zeigen, dass sich die überwiegende Zahl der Substanzen nur in Methanol nachweisen ließ. Auch war die Löslichkeit der Substanzen in Methanol um ein Vielfaches höher war als die Löslichkeit in Wasser.

Diese Abhängigkeit vom Elutionsmedium konnte bereits in vielen Studien festgestellt werden [82, 175] und hängt stark mit der unterschiedlichen Löslichkeit der Substanzen zusammen. Dies liegt unter anderem daran, dass viele (Ko-)Monomere und Zusatzstoffe eine sehr schlechte Löslichkeit in wässrigen Lösungsmitteln aufweisen. Eine Metaanalyse von *Van Landuyt et al.* [171] zeigt unter anderem, dass es für den Großteil der eluirbaren Bestandteile aus harzbasierten Kunststoffen eine größere Freisetzung in organischen Lösungsmitteln gibt. Diese erhöhte Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln entsteht durch die Tendenz der Monomere zur Hydrophobizität und durch die verstärkte Durchdringung der organischen Matrix durch Alkohol und andere organische Lösungsmittel, sodass sich die Abstände zwischen den Polymerketten vergrößern und insgesamt eine größere Zahl ungebundener Monomere aus dem gelockerten Netzwerk in Lösung gehen kann [63]. Je

geringer die Unterschiede der Löslichkeitsparameter zwischen Lösungsmittel und Polymer, desto höher letzten Endes die Löslichkeit [63]. Methanol als Lösungsmittel mag von geringer klinischer Relevanz sein; und doch ermöglicht es, potenziell lösliche Bestandteile aufzudecken, die sich in einem Lösungsmittel wie Wasser nicht oder nur unterhalb der Detektionsgrenze lösen. Zudem neigen (Ko-)monomere in Methanol weniger dazu, zu zerfallen, als in anderen organischen Lösungsmitteln wie beispielsweise Aceton [176].

Rothmund et al. [82] untersuchten die Freisetzung und die Proteinbindung von Kompositbestandteilen in natürlichem (proteinhaltigem) Speichel und anderen Lösungsmitteln wie proteinfreiem Speichel, Wasser und Ethylacetat und kamen zu dem Ergebnis, dass in natürlichem (proteinhaltigem) Speichel eine signifikant geringere Konzentration von (Ko-) Monomeren und Additiven zu finden war als in allen anderen getesteten Lösungsmitteln. Glykoproteine (wie Muzine, Histatine, Lysozym, Laktoferrin, Statherin, prolinreichen Proteinen und α - Amylase) des Speichels könnten durch die hohe Reaktionsfreudigkeit der Methacrylate diese binden und damit unter physiologischen Bedingungen womöglich zu einer geringeren toxischen Belastung führen [82], da aktive Substanzen pharmakologische oder toxikologische Wirkungen nur dann entfalten können, wenn sie frei und ohne Proteinbindung sind [84].

Folglich könnten im Speichel unter physiologischen Bedingungen geringere Konzentrationen gelöster Substanzen vorliegen als im Elutionsmittel Wasser.

6.1.5. Elutionszeitraum

Die Elutionszeit wurde auf 24h bzw. 72h festgelegt, denn der größte Anteil der löslichen Restmonomere und Additive geht in den ersten 24 Stunden in Lösung [77, 79, 82, 83, 177]. *Ferracane und Condon* [83, 177] stellten bei Füllungskompositen fest, dass in Wasser innerhalb von drei Stunden 50% und in Ethanol bereits 75% der eluirbaren Bestandteile in Lösung gegangen waren. Dabei wird von einem asymptotischen Verlauf mit sprunghaftem Anstieg in den ersten Stunden und sich anschließender kontinuierlicher Abflachung des Graphen mit Annäherung im Unendlichen ausgegangen. *Van Landuyt et al.* [171] merken dazu an, dass dieser Schluss auch durch das Erreichen des Sättigungsgleichgewichts zwischen Lösungsmittel und löslichen Restsubstanzen falsch gezogen sein könnte.

6.2. Diskussion von Material und Methode zum bakteriellen Wachstum

6.2.1. Auswahl der Bakterien

Das orale Mikrobiom umfasst nach *Verma et al.* [178] über 750 Spezies. Einigen Spezies kommt dabei eine besondere klinische Bedeutung in der Entstehung von Krankheiten des Mundraumes wie Karies, Gingivitis und Parodontitiden zu. Unter diesen ist das gram-positive, fakultativ anaerobe Bakterium *S. mutans* (aus der Gruppe der Viridans-Streptokokken) die wahrscheinlich am besten erforschte Spezies des Mundraumes und ätiologisch ein sehr bedeutender, wenn nicht der Hauptfaktor in der Entstehung von Karies [167, 179]. Doch nicht nur in der Mundhöhle, sondern auch systemisch wird *S. mutans* mit schwerwiegenden Erkrankungen wie Herzklappenentzündungen, bakterieller Endokarditis und Atherosklerose in Verbindung gebracht [180, 181]. Ein bedeutender Virulenzfaktor liegt in der Fähigkeit zur Ausbildung von Biofilmen, dem sogenannten Zahnplaque. Dies wird unterstützt durch eigene Glykosyltransferasen (GtfB, -C, -D), die aus Saccharose große Mengen überwiegend wasserunlösliche, extrazelluläre Polymere bilden, die wiederum den Hauptbestandteil der sich bildenden Zahnplaquematrix darstellen [180]. Durch die klebrigen extrazellulären Polymere wird die bakterielle Besiedelung harter Oberflächen und die Adhäsion anderer Mikroorganismen erleichtert und vorangetrieben [182]. Durch die diffusionshemmende Matrix bilden sich komplex strukturierte, pathogene Biofilme, die die ummantelten Mikroorganismen widerstandsfähiger gegenüber Antibiotika und anderen Umwelteinflüssen machen [167, 183]. Auch spezielle Oberflächenadhäsine (z.B. P1, SpaP und PAc) und in die Zellhülle eingelagerte Proteine (z.B. At1A, RgpG, BrpA und Psr) tragen zur Ausbildung des Biofilmes bei [180].

Des Weiteren ist *S. mutans* durch physiologische Anpassungsmechanismen, wie beispielsweise die Veränderungen in der Fettsäurezusammensetzung in die Zellmembran, die die Protonendurchlässigkeit verändern könnte [184], sehr unempfindlich gegenüber sich schnell verändernden Umgebungsbedingungen. *S. mutans* verstoffwechselt zur Energiegewinnung durch Glykolyse eine Vielzahl von Kohlenhydraten, wodurch Milchsäuren anfallen, die zu einem pH-Abfall führen, was wiederum die Etablierung anderer säureresistenter und säurebildender Spezies begünstigt [167]. Bei einem Überfluss an Kohlenhydraten können diese als intrazelluläre Polysaccharide gespeichert und in Mangelphasen unter Abgabe von Säuren verstoffwechselt werden [185]. Die pH-Werte liegen

bei *S. mutans* bei etwa pH 4 und damit deutlich unter dem für den Zahnschmelz kritischen Bereich von pH 5,5 [186]. Dies kann zur Demineralisation der Zahnhartsubstanz und damit zur Kariesentstehung beitragen.

A. naeslundii (aus der Familie der Aktinomyzeten) ist ein gram-positives, fakultativ anaerobes, kokkoid- bis stäbchenförmiges, pleomorphes Bakterium [187]. Es ist eines der vorherrschenden Bakterien des Mundraumes, gehört zu den frühen Besiedlern der Zahnoberflächen und ist auch in gesunden Mundverhältnissen immer vorzufinden [188]. Doch *A. naeslundii* tritt auch als Pathogen in Erscheinung und wird mit der Entstehung von kariösen Läsionen [189], Gingivitis und Knochenresorptionen am Zahnhalteapparat [190] in Verbindung gebracht. Auch sind in der Literatur einige wenige Fälle von Endokarditis [191] und Aktinomykosen [192, 193] beschrieben, die durch *A. naeslundii* bedingt sein sollen.

Wie bereits erwähnt, ist *A. naeslundii* ein wichtiger Bestandteil der initialen bakteriellen Oberflächenbesiedelung des Mundraumes [187]. Nach *Al-Ahmad et al.* [194] lag im in-vivo-Versuch der Anteil an *A. naeslundii* im Biofilm nach einem Tag mit 7,7% am höchsten und in den Tagen 2, 3, 5 und 7 signifikant darunter (0,2%, 6,1%, 4,4% und 0,2%). Diese relative Verschiebung könnte durch die geringere Zellteilungsrate von *A. naeslundii* im Vergleich zu Streptokokken und anderen Biofilmbakterien bedingt sein [187], da die Zellteilung als die Hauptursache für die schnelle Zunahme der Biomasse in der frühen Phase der Biofilmbildung angesehen wird [195]. *A. naeslundii* wird dabei hauptsächlich im Innersten des mehrschichtigen Biofilmes vorgefunden und bindet durch seine Typ 1 Fimbrien offenbar unmittelbar an das erworbene Pellicel an [187, 196]. Über Typ 2 Fimbrien kommt es zu Koadhäsion mit anderen Bakterien [196]. Besonders die Koadhäsion von *A. naeslundii* mit Streptokokken und anderen Bakterien scheint dabei von großer Wichtigkeit in der frühen Phase der Plaquebildung zu sein [187]. Auch an Epithelzellen kann *A. naeslundii* durch seine Typ 2 Fimbrien anheften [197].

Die Energiegewinnung erfolgt überwiegend durch Glykolyse von Kohlehydraten sowie, unter aeroben Bedingungen, durch Laktatabbau, wobei jeweils große Mengen Sauerstoff verbraucht werden [198]. Überschüssige Kohlehydrate werden als intrazelluläre Polysaccharide gespeichert und bei Energiemangel unter Abgabe von Säuren verstoffwechselt [199]. Nach *Takahashi* und *Yamada* [188] könnte *A. naeslundii* mit voranschreitender Reifung der Plaque und damit einhergehender Veränderung hin zu anaeroben Bedingungen eine

bedeutende Rolle in der Veränderung des Biofilms in Richtung erhöhter Kariogenität und parodontaler Pathogenität innehaben. Unter anaeroben Bedingungen vergärt *A. naeslundii* Kohlehydrate zu organischen Säuren, wodurch günstige Bedingungen für die weitere Etablierung von anderen säuretoleranten und -bildenden Spezies wie *S. mutans* entstehen [188]. Ein weiteres Stoffwechselprodukt ist Succinat, eine der kurzkettigen Fettsäuren, die die Adhäsion und Proliferation von Fibroblasten des parodontalen Ligaments und damit die Regenerationsmechanismen des Wirts beeinträchtigen können [200]. Durch Zellwand-Antigene von *A. naeslundii* können, im Zusammenspiel mit Lipopolysacchariden von gram-negativen Bakterien, Makrophagen zur übermäßigen Ausschüttung von entzündlichen Zytokinen bewegt werden, die zu parodontaler Entzündung und lokaler Gewebeauflösung beitragen könnten [201].

Diese hohe klinische Relevanz von *S. mutans* und *A. naeslundii* rechtfertigt die Untersuchung des Wachstums auf Schienenmaterialien, da diese großflächig in direktem Kontakt mit Zahnoberflächen und Weichgewebe stehen.

S. mutans und *A. naeslundii* wurden auch schon von anderen Autoren zur Messung von Wachstum und Adhäsion im Monospezies-Biofilmmodell auf Schienen- [202] und Füllungsmaterialien [203, 204] herangezogen.

6.2.2. Analysemethode zu Quantifizierung der absoluten Bakterienzahl

Zu Messung der absoluten Bakterienzahl wurde das Titerverfahren angewendet, bei welchem dezimale Verdünnungsreihen der Proben ausplattiert und die sich unter Bebrütung bildenden KBE nach 2-3 Tagen visuell ausgezählt werden. Dies stellt seit Jahrzehnten den Goldstandard zur Bestimmung absoluter Bakterienzahlen dar [165]. Als nachteilig werden der Zeitaufwand bei der Kultivierung und die Anfälligkeit für Fehler bei der visuellen Auszählung genannt [205]. Eine Vereinfachung und Fehlerminimierung kann durch eine automatisierte Auszählung erreicht werden [165, 205]. Eine KBE entspricht dabei auch nicht immer einem Bakterienindividuum; so können zwei Individuen beim Ausplattieren in unmittelbarer Nähe zueinander liegen oder aneinander heften, wodurch sie eine einzelne gemeinsame Kolonie bilden können [206] (Seite 157).

6.2.3. Desinfektion der Prüfkörper

Aufgrund der nicht freigegebenen Autoklavierbarkeit der Materialien wurde die Sterilisation eines jeden Prüfkörpers durch eine 12h-Lagerung in 0,5ml einer 2%igen

Chlorhexidindigluconatlösung (Speikosept, Speiko, Münster, Deutschland) erreicht. Vorversuche mit alkoholischen Lösungen, die für 1 Minute angewendet wurden, zeigten keine ausreichende Sterilisationswirkung. Chlorhexidindigluconat (CHX) hat ein breites Wirkspektrum gegen gram-positive wie gram-negative Bakterien sowie gegen Hefen und Pilze [128] (Seite 114). Die hohe Substantivität von CHX könnte durch die bakterio-statische Wirkung zu einer geringeren Anheftung und Vermehrung der Mikroorganismen geführt haben. Da die Prüfkörper jedoch alle die gleiche Behandlung durchliefen, wird die Vergleichbarkeit nicht negativ beeinflusst.

6.3. Diskussion der Ergebnisse zur Elution

6.3.1. Elutionsverhalten der Schienenmaterialien und Einschätzungen zur toxikologischen Relevanz

Da von eluierten Methacrylaten und Additiven mitunter gesundheitsgefährdendes Potential ausgehen kann, werden in den folgenden Abschnitten alle nachgewiesenen Methacrylate und relevanten Additive diskutiert und in einem Worst-Case-Szenario, wo möglich, mit Zytotoxizitätsdaten in Form von EC_{50} -Werten für HGF aus der Literatur verglichen. Aus Mangel an Literaturdaten wurden für die Methacrylate THFMA, BDDMA und TPGDA eigens Zytotoxizitätsversuche in Form von XTT-Tests an HFG durchgeführt, um den jeweiligen EC_{50} zu bestimmen. Um eine möglichst realitätsnahe Risikobewertung für eine Aufbissschiene zu erhalten, werden die Dimensionen der Probenkörper auf die Dimensionen einer Michiganschiene hochgerechnet. Hierbei ergab sich eine zwischen Ober- und Unterkieferschiene gemittelte Oberfläche von $5.141,25\text{mm}^2$ und ein Volumen von $3.208,40\text{mm}^3$ (siehe Punkt 4.3.). Folglich liegt die Schienenoberfläche um den Faktor 54,6 und das Volumen um den Faktor 56,8 über den Dimensionen der verwendeten Prüfkörper. Da keine eindeutigen Literaturdaten vorliegen, ob Volumen oder Oberfläche größeren Einfluss auf die Elutionseigenschaften haben, und diese in ihrem Faktor nur gering abweichen, wird der Mittelwert von 55,7 als Faktor für die Berechnung möglicher Elutionen in Schienengröße verwendet.

Das PMMA-Basismethacrylat MMA wurde in sehr unterschiedlichen Konzentrationen in allen drei untersuchten Schienenkunststoffen, jedoch ausschließlich im Lösungsmittel Methanol

nachgewiesen. Die Zytotoxizität von MMA wurde unter anderem von *Dahl et al.* [207] untersucht, wobei sich 10µg/ml (entspricht 99,88µmol/l) MMA nach einer Minute Einwirkzeit als die kritische zytotoxische Dosis für Monozyten, Granulozyten und Endothelzellen herausstellte. *Baker et al.* [77] konnten bei neuversorgten Prothesenträgern jedoch kein MMA in Blut feststellen. In einer Studie von *Kedjarune et al.* [112] wurden im In-vitro-Versuch mit Speichel nach 24h bzw. 48h MMA-Konzentrationen von bis zu 243,20µg/ml gemessen, die im parallel durchgeführten MTT-Test als zytotoxisch bewertet wurden. *Ishihara und Fujisawa* [208] ermittelten mit HGF für MMA einen EC₅₀ von 70,1mmol/l. Dieser Wert liegt für Humane Pulpafibroblasten (HPF) laut *Fujisawa und Atsumi* [209] bei etwa 30mmol/l. Zudem ist MMA ein bekanntes Allergen und kann zur Ausbildung von lokalen bis systemischen Reaktionen führen [72].

In Methanol wurden die höchsten MMA-Konzentrationen von 8.768,23µmol/l nach 72h bei SHERAORTHOMER gemessen. Im Worst-Case-Szenario, mit Hochrechnung auf eine beispielhafte Michiganschiene, ergeben sich dadurch nach 72h mögliche MMA-Werte von 488.378µmol/l. Diese Werte würden den EC₅₀ für HGF etwa um den Faktor 7 übersteigen. Die zweithöchsten Konzentrationen für MMA wurden mit einem Wert von 3.513,53µmol/l nach 72h in SHERAeco-disc PM20 gemessen. Bezogen auf Schienengröße, könnte es innerhalb von 72h zu einer Elution von 195.729µmol/l MMA kommen, wodurch die Zytotoxizitätswerte für HGF nahezu um den Faktor 3 überschritten würden. SHERAprint-ortho plus wies mit 70,32µmol/l nach 72h von den drei getesteten Materialien die geringsten Mengen an MMA auf. In Schienengröße könnte es in 72h in Methanol zu einer Elution von 3.899µmol/l MMA kommen. Diese Werte würden um einen Faktor von etwa 18 unterhalb des EC₅₀ liegen. Dass die EC₅₀-Werte im Falle von SHERAORTHOMER und SHERAeco-disc PM20 im Worst-Case-Szenario überschritten wären, ist dabei nicht zwangsläufig ein Grund zur Besorgnis, da Methanol in seinen Elutionseigenschaften nicht mit Speichel zu vergleichen ist. Durch das Lösungsmittel Wasser, das die höchste Vergleichbarkeit zum Speichel bietet [82, 174], kam es in keinem der untersuchten Materialien zu einer nachweislichen Lösung von MMA. Aufgrund der Ergebnisse sind unter physiologischen Bedingungen keine zytotoxischen Auswirkungen durch MMA zu erwarten.

In SHERAprint-ortho plus wurden neben MMA die Methacrylate THFMA, HEMA, EGDMA und HPMA nachgewiesen.

Das Methacrylat THFMA ist als Bestandteil von SHERAprint-ortho plus im Sicherheitsdatenblatt gelistet und wurde auch ausschließlich in diesem gefunden. THFMA ließ sich dabei als einzige Substanz überhaupt nicht nur in Methanol, sondern auch im Lösungsmittel Wasser nachweisen. THFMA wird als niedrig visköses, heterozyklisches Monomethacrylat aufgrund seiner verhältnismäßig geringen Polymerisationsschrumpfung von 13,8% (im Vergleich TEGDMA mit 17%) unter anderem als Komonomer zur Verdünnung hoch visköser Komposit-Polymerphasen aus Bisphenol A- Glycidylmethacrylat (Bis-GMA) verwendet [210, 211]. Je höher dabei die Konzentration des Verdünnungsmittels, desto höher sind die Polymerisationsschrumpfung und auch der Polymerisationsgrad/Konversionsrate [210], was mit einem niedrigeren Restmonomergehalt einhergehen könnte [83].

In einem In-vivo-Versuch an Affen (*Macacus fascicularis*) zeigte sich THFMA-haltiges provisorisches Kronenmaterial als nicht pulpentoxisch [212]. THFMA wurde auch schon erfolgreich in vitro als Biomaterial in einem Polyethylmethacrylat (PEMA)/THFMA-Polymer zur Knorpelregeneration getestet [213, 214]. Im In-vivo-Versuch an Hasen wurde intraoperativ ein in situ polymerisiertes PMME/THFMA-Polymer zur Knorpelregeneration erfolgreich und ohne Zeichen einer Entzündungsreaktion über einen Zeitraum von einer Woche bis zu acht Monaten eingesetzt [215]. Dennoch liegen auch Berichte über positive Epikutantestreaktionen auf THFMA vor. Der spezifische Nachweis über eine THFMA-Exposition, die für die Sensibilisierung verantwortlich wäre, wird in den meisten Fällen nicht aufgeführt. Es könnte sich demnach in einigen Fällen auch um Kreuzreaktionen zu anderen Monomeren gehandelt haben [216].

Aufgrund mangelnder Daten zum zytotoxischen Potenzial wurden zur besseren Bewertbarkeit eigens XTT-Tests mit HGF durchgeführt. Diese ergaben für THFMA einen EC_{50} -Wert von $3.006,0\mu\text{mol/l}$ (siehe Tabelle 6 unter Punkt 5.2.). Im Lösungsmittel Methanol lagen die maximalen THFMA-Werte bei SHERAprint-ortho plus bei $131,92\mu\text{mol/l}$ nach 72h. Im Worst-Case-Szenario in Schienengröße könnten sich innerhalb von 72h in Methanol THFMA-Konzentrationen von $7.352\mu\text{mol/l}$ ergeben. Der EC_{50} würde um mehr als das 2-fache überschritten werden. Im Lösungsmittel Wasser wurden in SHERAprint-ortho plus die maximale THFMA-Konzentration von $7,47\mu\text{mol/l}$ nach 72h gemessen. Im Worst-Case Szenario könnte sich daraus in Schienengröße eine THFMA-Elution von $416,08\mu\text{mol/l}$ nach 72h ergeben, die um den Faktor 7 unterhalb des EC_{50} -Wertes und damit im nicht zytotoxischen Bereich läge. Die Werte aus den Methanolproben lagen dabei um den Faktor 18 über den

entsprechenden Wasserproben. Anhand der Ergebnisse sind unter physiologischen Bedingungen keine zytotoxischen Auswirkungen durch THFMA zu erwarten.

Auch HEMA wurde ausschließlich im Schienenkunststoff SHERAprint-ortho plus und nur in Methanol nachgewiesen. HEMA ist ein sehr hydrophiles Molekül mit niedrigem Molekulargewicht und ist dadurch in Bezug auf die Biokompatibilität kritisch zu betrachten. Es ist aufgrund seiner physikalisch-chemischen Materialeigenschaften und der Affinität zu Wasser, die ein Herabsetzen der Oberflächenspannung der Wassermoleküle bewirkt, sehr häufig in der Zusammenstellung von Primern und Dentinbondings zu finden [217]. Durch das geringe Molekulargewicht und die Hydrophilie kann HEMA bei geringen Restdentinstärken durch offene Dentintubuli diffundieren und eine Schädigung von Pulpazellen verursachen [218].

HEMA wird ein mittleres zytotoxisches Potenzial zugeschrieben [219], was HEMA weit weniger zytotoxisch als die bifunktionellen Monomere macht [175, 220]. In einigen Studien wurden durch HEMA oxidativer Stress und Zellapoptosen ausgelöst [221]. Oxidativer Stress entsteht dabei durch die Bindung von HEMA an das wichtige Antioxidans Glutathion (GSH), das für einen Schutz der Zellen vor Sauerstoffradikalen sorgt [222] und zur Entgiftung von Methacrylaten beitragen kann [223]. Der Anstieg von anfallenden Sauerstoffradikalen ist dabei nicht nur auf die Glutathionerschöpfung zurückzuführen, vielmehr scheint HEMA selbst, schon bei einer Konzentration von 1mmol/l, zu einer übermäßigen Entstehung von Sauerstoffradikalen beizutragen [224]. Konzentrationen von 5-10mmol/l führten laut *Samuelsen et al.* [225] zu einer starken Sauerstoffradikalbildung und konzentrationsabhängig zur Apoptose. *Teti et al.* [226] stellten bei HGF, bei einer HEMA-Konzentration von 3mmol/l, eine durch oxidativen Stress ausgelöste Einleitung von Zelltotmechanismen durch Autophagie zum Erhalt zellulärer Homöostase und Vitalität fest.

HEMA ist nicht als Inhaltsstoff im Sicherheitsdatenblatt von SHERAprint-ortho plus gelistet. Eine mögliche HEMA-Quelle könnte auch Urethandimethacrylat (UDMA) darstellen, da das langkettige UDMA in der GC/MS-Analyse in geringe Mengen von HEMA zerfallen kann [85, 227]. UDMA ist ebenfalls nicht als Inhaltsstoff gelistet. In lichterhärtendem PMMA wird PMMA jedoch häufig durch UDMA ersetzt [71](Seite 328). Die genaue HEMA-Quelle bleibt damit unbekannt.

Der EC_{50} von HEMA für HGFs liegt nach *Urcan et al.* [228] bei 11,20mmol/l. Die höchste mittlere HEMA-Konzentration in Methanol lag bei 378,98 μ mol/l nach 72h. Im Worst-Case-

Szenario könnten sich in 72h Werte von 21.110 $\mu\text{mol/l}$ ergeben und damit den EC_{50} etwa um den Faktor 2 übersteigen. In den Wasserproben konnte keine HEMA-Elution nachgewiesen werden, wodurch unter physiologischen Bedingungen keine zelltoxischen Wirkungen zu erwarten sind.

Ein weiteres nur in Methanol aus SHERAprint-ortho plus identifiziertes Methacrylat ist EGDMA. EGDMA dient als Dimethacrylat als Vernetzer der linearen Polymere [63]. Es gilt als starker Sensibilisator für allergische Reaktionen [229] und zeigte eine sehr hohe Rate an Kreuzreaktionen zu HEMA [230]. Neben anderen Methacrylaten wurde EGDMA von *Hansel et al.* [123] mit der Wachstumsförderung von Bakterien (*Lactobacillus acidophilus* und *Streptococcus sobrinus*) in Verbindung gebracht, die kariogene Eigenschaften entfalten. Der EGDMA- EC_{50} für HGF liegt nach *Geurtsen et al.* [231] bei 0,46mmol/l. Die maximale EGDMA-Konzentration lag nach 72h bei 3,30 $\mu\text{mol/l}$. Die möglichen EGDMA-Werten von 184 $\mu\text{mol/l}$ nach 72h in Methanol würden den EC_{50} im Worst-Case-Szenario nicht überschreiten und lägen etwa um den Faktor 2,5 darunter. In Wasser kam es zu keiner nachweislichen Elution von EGDMA.

Ein letztes nur in SHERAprint-ortho plus identifiziertes Methacrylat ist HPMA. Da kein EC_{50} für HGF in der Literatur vorliegt, wird der EC_{50} für HeLa S3-Zellen (menschliche Zervixkarzinomepithelzellen) zur Zytotoxizitätseinschätzung herangezogen. Dieser liegt nach Ishihara und Fujisawa [208] bei 8,67mmol/l. Die höchste HPMA-Konzentration wurde nach 72h in Methanol erreicht und lag im Mittel bei 108,14 $\mu\text{mol/l}$. Im Worst-Case-Szenario könnte durch eine Schiene in 72h eine HPMA-Konzentration von 6.023 $\mu\text{mol/l}$ vorliegen. Diese würden circa um den Faktor 1,5 unterhalb des EC_{50} für HeLa S3-Zellen liegen. In Wasser kam es zu keiner nachweislichen Elution von HPMA.

Neben den erwähnten Methacrylaten wurden auch relevante Additive wie BHT in SHERAprint-ortho plus gefunden. Mit einem EC_{50} von 170 $\mu\text{mol/l}$ für HGF bewerteten *Geurtsen et al.* [231] BHT als stark zytotoxische Substanz. Die höchste mittlere BHT-Konzentration von 0,37 $\mu\text{mol/l}$ wurde nach 72h in Methanol gemessen. Die zu erwartende Menge BHT bei einer Probe in Schienengröße mit dem Lösungsmittel Methanol liegt damit bei 21 $\mu\text{mol/l}$ nach 72h. Diese Werte liegen noch circa um den Faktor 8 unterhalb des EC_{50} . Im Lösungsmittel Wasser konnten keine BHT-Konzentrationen nachgewiesen werden.

Interessant ist auch, dass TPGDA zwar vom Hersteller als Bestandteil von SHERAprint-ortho plus gelistet wird, jedoch in keinem der beiden Lösungsmittel nachgewiesen werden konnte. Dazu könnten eine hohe Vernetzungsrate durch die multifunktionalen Gruppen des Acrylates oder auch eine sehr geringe Löslichkeit in den verwendeten Lösungsmitteln ursächlich sein. Der eigens ermittelte EC_{50} von TPGDA für HGF liegt bei $597\mu\text{mol/l}$ (siehe Tabelle 6 unter Punkt 5.2.). Die relative Toxizität im Verhältnis zu THFMA liegt damit bei 5, was bedeutet, dass die zytotoxische Wirkung um den Faktor fünf über der von THFMA liegt.

In SHERAORTHOMER wurde neben dem bereits diskutierten MMA auch das im Sicherheitsdatenblatt gelistete Methacrylat BDDMA gemessen. Zu einer BDDMA-Elution kam es nachweislich nur in Methanol.

Nocca et al. [232] zeigen, dass BDDMA-Konzentrationen von $0,4\text{mmol/l}$ zu einem 80%igen Abfall der zellulären Proliferationsrate und zu einer Steigerung der Zelltodrate von HL-60-Zellen gegenüber der Kontrollgruppe führten. Im eigens durchgeführten XTT-Test an HGF ergab sich für BDDMA ein EC_{50} von $2.569,5\mu\text{mol/l}$ (siehe Tabelle 6 unter Punkt 5.2.). Die höchste BDDMA-Konzentration wurde mit einem Mittelwert von $161,0\mu\text{mol/l}$ nach 72h gemessen. Durch eine Schiene könnten in Methanol folglich Werte $8.968\mu\text{mol/l}$ nach 72h erwartet werden, wodurch der EC_{50} für HGF etwa um den Faktor 3 überschritten würde. Da in Wasser keine Elution gemessen wurde, sind unter physiologischen Bedingungen auch keine zytotoxischen Auswirkungen zu erwarten.

Durch das Lösungsmittel Methanol ließen sich aus allen untersuchten Schienenmaterialien Substanzen wie Methacrylate und Additive lösen, deren Konzentrationen im Worst-Case-Szenario in Schienengröße die zytotoxischen Grenzwerte teilweise unter-, teilweise jedoch auch überschreiten. Diese Werte sind jedoch stark zu relativieren und die Ergebnisse des Lösungsmittels Wasser, welches dem Speichel in seinem Löslichkeitsverhalten am nächsten kommt [82, 174], entgegen zu setzen. In den Wasserproben konnte einzig das Methacrylat THFMA aus SHERAprint-ortho plus in Konzentrationen nachgewiesen werden, die sich in der Risikoanalyse etwa um den Faktor 7 unterhalb der zytotoxischen Konzentrationen für HGF erwiesen. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass unter physiologischen Bedingungen von keinem der getesteten Materialien zytotoxische Auswirkungen zu erwarten sind. Diese Betrachtung bezieht sich jedoch immer auf die Einzelzytotoxizität der Substanzen. Bei Betrachtung der Gesamtzytotoxizität ist zu beachten, dass in der Literatur gezeigt werden

konnte, dass diese sich nicht zwangsläufig aus der Summe der Einzeltoxizitäten ergibt, sondern es mitunter sogar zu einem geringeren Effekt bei gleichzeitigem Vorhandensein vieler Substanzen kommt. So stellten *Wisniewska-Jarosinska et al.* [233] fest, dass die Kombination von mehreren Methacrylaten (hier TEGDMA und UDMA) im Vergleich zur Einzelanwendung der Methacrylate zu einer signifikant geringeren Apoptoseeinleitung bei CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary) führte (2,5-fach zu 10-12-fach). Auch *Ratanasathien et al.* [234] konstatierten, dass für die Zytotoxizitätsbestimmung die Wechselwirkungen der Methacrylate untereinander und die Einwirkzeit bedeutende Kennzahlen sein könnten.

Erwähnenswert ist dabei auch, dass deutlich mehr eluirbare Methacrylate aus SHERAprint-ortho plus (fünf) nachgewiesen werden konnten als aus SHERAORTHOMER (zwei) und SHERAeco-disc PM20 (eins). Dies könnte sich durch möglicherweise höhere technische Anforderungen im Druckprozess erklären lassen. Auch die vorgemischte Darreichungsform könnte eine Rolle spielen.

Zu beachten ist auch, dass die In-vivo vorliegenden Substratmengen in bestimmten Bereichen auch höher liegen könnten als in dieser Studie angenommen. *Baker et al.* [77] untersuchten In-vivo die MMA-Konzentrationen unter Prothesen und im Gesamtspeichel. An der Prothesenunterseite wurden dabei maximale MMA-Konzentrationen von 180µg/ml (entspricht 1798µmol/l) gemessen, im Gesamtspeichel hingegen mit maximal 40µg/ml (entspricht 400µmol/l) deutlich weniger. Damit könnten sich einzelne Substanzen in unpolierten Bereichen wie unter Schienen oder Prothesen, die zudem weniger von Speichel umspült sind, kumulieren und eine höhere Konzentration erreichen, die auch das zytotoxische Potenzial lokal erhöhen könnte.

Ein weiterer noch nicht umfassend untersuchter Faktor scheint das Zusammenspiel von Mundhöhlenbakterien, HGF und Kunststoffbestandteilen zu sein. *Di Giulio et al.* [121] konnten, im Vergleich zur Einzelexposition, durch Kokultivierung von HGF und *S. mitis*-Stämmen auf eine wechselseitige nutzenbringende Interaktion schließen, die bei Zugabe einer toxischen HEMA-Konzentration verbesserte Überlebensraten für HGF und *S. mitis* zur Folge hatte. Die Zugabe von Speichel verbesserte diese Wirkung noch weiter [122].

Methacrylate sind sehr potente Sensibilisatoren und können nach vorangegangener Sensibilisierung auch in geringsten Konzentrationen zur Ausbildung und Auslösung von

Allergien und Kreuzreaktionen führen (86, 89). Dabei kann es durch die Sensibilisierung mit einem Methacrylat auch beim Kontakt mit einem anderen Methacrylat ohne eine vorherige Sensibilisierung mit selbigem zum Auftreten von allergischen Reaktionen kommen. Eine Sensibilisierung ist auch durch nicht dentale Kunststoffe möglich. Durch einen umfangreichen Einsatz von methacrylatbasierten Materialien im zahnmedizinischen Umfeld und die stetigen Neu- und Weiterentwicklungen könnte das Risiko einer Sensibilisierung bei Personal und Patienten in Zukunft weiter steigen. Zudem sollte besonderes Augenmerk daraufgelegt werden, keine Materialien einzusetzen, auf deren Bestandteile, sofern bekannt, bereits positive Reaktionen im Epikutantest vorliegen.

In welchen Mengen sich Substanzen besonders in kaum von Speichel umspülten Bereichen wie unter Prothesen und Schienen anreichern könnten und inwiefern diese eine zytotoxische Wirkung auch In-vivo entfalten, bleibt Gegenstand zukünftiger Forschung.

Zu fordern ist von wissenschaftlicher und industrieller Seite eine weitere Optimierung der Materialien und deren Verarbeitung im Sinne der Biokompatibilität, was sowohl die Elutionseigenschaften als auch die Optimierung des Materialgefüges und der Oberflächeneigenschaften im Hinblick auf die Biofilmanlagerung betrifft. Wo immer möglich, sollte eine Hochglanzpolitur der Materialien erfolgen, da dies zu einer signifikanten Reduktion der eluierbaren Restmonomermengen führt [169]. Auch durch eine Nachbehandlung in kochendem Wasser [73], durch Lagerung in destilliertem Wasser [58, 73] und durch Tiefkühlen [80] konnten eluierbare Restmonomermengen signifikant reduziert werden. Eine Lagerung in destilliertem Wasser bei 37°C für mindestens 24h vor Übergabe an den Patienten wird als klinisch einfach durchzuführende und effektive Möglichkeit empfohlen, den Restmonomergehalt signifikant zu reduzieren [73].

Speziell die Zusammensetzung von Materialien für die additive Fertigung scheint sowohl im Hinblick auf die Herstellerangaben im Sicherheitsdatenblatt als auch durch die gemessenen Substanzen komplexer. Dies sollte jedoch auch Spielraum für mögliche Optimierungen bieten. Ein Ansatzpunkt könnte sein, nach Möglichkeit das im Lösungsmittel Wasser nachgewiesene Methacrylat THFMA durch ein weniger wasserlösliches zu ersetzen. Im Hinblick auf die Biokompatibilität, auch in Anbetracht der nicht polierbaren Schieneninnenfläche, bieten subtraktive Techniken mit industriell polymerisierten Ausgangsmaterialien aktuell womöglich

die höchste Sicherheit. Jedoch scheinen auch die getesteten additiven bzw. konventionellen Materialien den hohen Anforderungen an die Biokompatibilität gerecht zu werden.

6.4. Diskussion der Ergebnisse zum bakteriellen Wachstum

Nach *Schmalz* [18] kann von zahnmedizinischen Kunststoffen nicht nur eine direkte chemisch-toxische Gewebeschädigung ausgehen, sondern auch auf indirektem Weg kann eine Gewebeschädigung über eine Förderung des bakteriellen Wachstums erfolgen. Der zweite Teil dieser Studie beschäftigte sich deshalb mit dem Wachstum von *S. mutans* und *A. naeslundii* auf den drei bereits toxikologisch analysierten PMMA-Schienenkunststoffen.

6.4.1. Bakteriellles Wachstum

Die statistische Auswertung zum bakteriellen Wachstum von *S. mutans* zeigte keinerlei signifikante Unterschiede in der Anzahl der KBE zwischen den drei untersuchten Materialien, was die zu Beginn aufgestellte Nullhypothese bestätigt. Eine signifikant höhere Anzahl der KBE ergab sich im Wachstum von *A. naeslundii* auf dem laborgefertigten Autopolymerisat SHERAORTHOMER im Vergleich zum CAD/CAM-gefertigten und unter Industriebedingungen polymerisierten SHERAeco-disc PM20, wodurch die Nullhypothese hier widerlegt wurde. Eine Erklärung für die aufgetretene Signifikanz könnte die mutmaßlich geringere Materialhomogenität von SHERAORTHOMER gegenüber SHERAeco-disc PM20 sein, die sich aus dem händischen Anmischen und Verarbeiten sowie aus den nicht an Industriestandards heranreichenden Polymerisationsbedingungen ergeben könnte. Kleinere Lufteinschlüsse, Verunreinigungen und Materialfehler könnten dabei an den Oberflächen zu Unregelmäßigkeiten führen, welche sich auf die bakterielle Adhäsion förderlich auswirken. Die Oberflächenrauigkeit (SR) stellt nach *Quiryne und Bollen* die wichtigste Komponente zum Ausmaß der bakteriellen Adhäsion und Biofilmbildung dar [143] (siehe auch Kapitel 2.7.2.1.1). Dies erklärt jedoch nicht, warum sich bei *S. mutans* keine signifikanten Unterschiede ergaben. Ein Grund könnten die vermutlich geringen Scherkräfte im Versuch sein. Der Einfluss der SR steigt mit dem Einwirken von Scherkräften [148]. Auch *Lewis et al.* [202] fanden durch Trübungsmessung bei *S. mutans* keine signifikanten Unterschiede in der Zahl anheftender Bakterien zwischen heiß-, kalt- und lichtpolymerisierten Prothesenmaterialien. Bei *A. naeslundii* fanden sie signifikant mehr Bakterien auf dem Heißpolymerisat als auf dem Kalt- und Lichtpolymerisat. Sie untersuchten die Oberflächen rasterelektronenmikroskopisch und fanden die einheitlichste Oberfläche ohne Mikroporosität auf dem Heißpolymerisat, das

Lichtpolymerisat schien weniger homogen mit leichten Unregelmäßigkeiten, das Autopolymerisat wies die größten Unregelmäßigkeiten auf. Mutmaßlich könnten demnach auch die Adhäsionseigenschaften von *A. naeslundii* stärker durch das Substrat und dessen physiochemische Eigenschaften beeinflusst sein, als dies bei *S. mutans* der Fall ist [204]. Hinweise auf Unterschiede im Einfluss der SR auf die Adhäsionskraft zwischen Bakterienstämmen wurden auch bei dentalen Füllungskompositen gefunden. So stellten auch *Mei et al.* [235] in ihrer Studie fest, dass die SR die Adhäsionskräfte von *S. mutans* weniger stark beeinflussten als die von *S. sanguinis*. Nach *Ionescu et al.* [146] steigen die Einflüsse der Oberflächeneigenschaften und der Oberflächennachbearbeitung auf die Biofilmformierung von *S. mutans* mit der Länge der Inkubationszeit an und könnten letztlich wichtiger sein als der Einfluss der SR. Neben der SR zeigte sich in vielen Studien, dass auch die freie Oberflächenenergie (SFE) (siehe auch Kapitel 2.7.2.1.2), vor allem in der initialen Phase [141], ein wichtiger Parameter für das Ausmaß der bakteriellen Besiedelung sein kann. Dieser Einfluss scheint jedoch mit fortschreitender Plaquereifung stetig geringer zu werden [236]. Bei *Ionescu et al.* [146] zeigte sich jedoch auch noch nach 96h eine signifikant geringere *S. mutans*-Biofilmbildung auf Kompositoberflächen mit niedriger SFE im Vergleich zu jenen mit hoher SFE. Niedrigenergetische und damit hydrophobere Oberflächen führen unter dem Einfluss schwankender Scherkräfteinwirkung, wie sie in vivo im supragingivalen Bereich vorherrschen, zu weniger bakterieller Besiedelung als bei hochenergetischen, hydrophilen Oberflächen [142, 236]. Auch die einzelnen Bakterienstämme zeigen Unterschiede in ihrer SFE. Dabei binden Stämme mit hydrophoben Eigenschaften, zu denen *S. mutans* zählt, bevorzugt an niedrigenergetische Oberflächen und umgekehrt [150]. Nach *Ahn et al.* [153] könnten die SFE-Eigenschaften eines Substrates (untersucht wurden verschiedene lighthärtende kieferorthopädische Befestigungsmaterialien) in vivo einen bedeutenden Einfluss auf die *S. mutans* Adhäsion haben und in der initialen Phase wichtiger sein als die SR. Trotz einer Inkubationszeit von 120h in unserem Versuch, könnten mögliche Unterschiede in der SFE der Substrate die Ergebnisse beeinflusst haben.

Die Messung von Oberflächeneigenschaften wie SR und der SFE waren nicht Bestandteil dieser Arbeit. Diese an den von uns verwendeten Probenkörpern im Rahmen von wissenschaftlichen Folgearbeiten zu messen, wäre, besonders im Hinblick auf die nicht polierbaren Schieneninnenseiten, durchaus interessant.

Das bakterielle Wachstum könnte auch durch ungebundene, sich lösende Methacrylate beeinflusst werden. *Brambilla et al.* [237] untersuchten mittels MTT-Test (Messung der optischen Dichte) in vitro den Einfluss der Lichthärtung auf die Biofilmanlagerung bei Füllungskompositen und erklärten sich die vermehrte Biofilmbildung auf weniger lang belichteten Proben mit dem erhöhten Restmonomergehalt auf den Materialoberflächen. Nach Messung der Absorption kommt Schmalz [18] zur Schlussfolgerung, dass freie Monomere wie MMA konzentrationsabhängig Einfluss auf das bakterielle Wachstum kariogener Mikroorganismen wie *S. mutans* nehmen könnten. Weitere Autoren schlossen nach Messung der Absorption der Bakteriennährlösung auf einen wachstumsfördernden Effekt von Methacrylaten auf bestimmte Mikroorganismen [123, 238]. *Takahashi et al.* [124] fanden die Erklärung für die Zunahme der optischen Dichte und Absorption bei Zugabe von Diethyleneglycoldimethacrylate (DEGDMA) nicht in einem vermehrten bakteriellen Wachstum, sondern stellten durch chemische Analysen und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen fest, dass es zu einer Polymerisation der freien Monomere an den Bakterienoberflächen kam, wodurch diese an Masse zulegten. Offen bleibt jedoch, ob dies nur für Ethylenglykol-Monomere spezifisch ist, und ob es einen Schwellenwert für diesen Effekt gibt. Durch die in unserer Arbeit zur Sterilisation der Prüfkörper angewandte 12-stündige Lagerung in Chlorhexidindigluconat könnte ein Teil der theoretisch löslichen Substanzen bereits vor Versuchsbeginn eluiert worden sein. Aus den Versuchen zur Löslichkeit ist zu entnehmen, dass es im Lösungsmittel Wasser nur bei SHERAprint-ortho plus zu einer nachweislichen Elution des Methacrylates THFMA kam. Es kann daher vermutet werden, dass sich lösende Inhaltsstoffe nicht der Grund für die festgestellten Signifikanzen in der Anlagerung von *A. naeslundii* zwischen SHERAORTHOMER und SHERAeco-disc PM 20 sind.

In vivo könnte auch die Pellikel, die sich aus positiv geladenen Molekülen des Speichels und der Sulkusflüssigkeit zusammensetzt, Einfluss auf die Bakterienanlagerung und Etablierung des Biofilms haben. Über Pellikelrezeptoren binden sich erstbesiedelnde Mikroorganismen wie gram-positive Streptokokken und Aktinomyzeten an Oberflächen in der Mundhöhle [126]. Die intraorale Pellikelbildung könnte in vivo, wenngleich nur in eher geringem Ausmaß, zu einer Relativierung der chemophysikalischen Substrateigenschaften führen [141]. *Fang et al.* [239] stellten fest, dass die Adhäsion von *S. mutans* zu PMMA bei Zugabe von Speichel signifikant sank. *Ahn et al.* [153] fanden bei unterschiedlichen kieferorthopädischen Klebern keinen signifikanten Einfluss des Pellikels auf die *S. mutans*-Adhäsion. Auch vor dem

Hintergrund der teilweise widersprüchlichen Ergebnisse und der nicht abschließend geklärten Rolle der Pellikel in der bakteriellen Adhäsion, wurde in unserem Versuchsaufbau auf das Einbeziehen dieser Variablen verzichtet. Dies soll eine vereinfachte Deutung der Ergebnisse ermöglichen.

In-vitro-Versuche mit einzelnen Bakterienstämmen können nicht die realen In-vivo vorzufindenden Bedingungen simulieren und sind nur als Annäherungen zu verstehen. In der komplexen Organisation eines oralen Biofilms zeigen Mikroorganismen mitunter grundlegende Veränderungen ihrer Stoffwechselforgänge, ihres Resistenzverhaltens gegenüber schädigenden Substanzen und der Expression von Genen, die auch phänotypische Veränderungen nach sich ziehen können [127, 128]. So gibt es einige Stämme, die in ihrem Wachstum stark von anderen abhängig sind. Mit unverändertem Speichel als einzigem Nährstofflieferant zeigte sich bei *Palmer et al.* [240] in In-vitro-Kokultur von *A. naeslundii* und *S. oralis* ein üppiges und ineinander greifendes Wachstum in wechselseitig nutzenbringender Gemeinschaft, wohingegen in Einzelkultur weder in planktonischer Form noch als Biofilm ein Wachstum möglich war. Durch die Vielzahl der komplexen Interaktionen zwischen den Bakterienarten könnte das Wachstumsmuster auf unterschiedlichen Materialoberflächen maßgeblich beeinflusst sein. Möglicherweise bilden Multispezies-Modelle die In-Vivo-Verhältnisse etwas näher ab, jedoch ist die Darstellung und die Einordnung und Interpretation dieser Komplexität sowie die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und letztlich auch der Vergleich zu anderen Studien deutlich erschwert.

Im Fokus dieser Studie lag der größtmögliche Informationsgehalt zu material- und/oder bakterienbedingten Unterschieden in der Adhäsion von zwei relevanten Pathogenen, im Verhältnis zum Aufwand, bei bestmöglicher Reproduzierbarkeit. Aus diesem Grund wurde in dieser In-vitro-Studie ein standardisierbares Monospezies-Modell verwendet mit dem Ziel, potenzielle bakterielle Interaktionen und Konkurrenz auszuschließen, die die Ergebnisse dieser Arbeit verfälscht haben könnten.

Folglich muss die Aussagekraft dieses Studienteils mit Einschränkungen gesehen werden, die sich aus den in-vitro-Verhältnissen eines Monospezies-Modells ohne Einbeziehung von Speichel ergeben. Und dennoch tragen die Ergebnisse der Studie zur Darstellung und zur Verbesserung des Verständnisses der komplexen wechselseitigen Zusammenhänge im Adhäsionsverhalten zwischen oralen Mikroorganismen und Substratoberflächen bei. Durch

das bessere Verständnis des Adhäsionsverhaltens von einzelnen oralen Mikroorganismen könnte für Folgestudien die Interpretation der Ergebnisse von komplexeren Multispezies-Modellen vereinfacht werden.

Die Nullhypothese, dass keine signifikanten Unterschiede in der absoluten Zahl adhärenter Bakterien zwischen den untersuchten Materialien aus unterschiedlichen Fertigungswegen erwartet werden, wurde im Fall von *A. naeslundii* im Vergleich der Materialien SHERAORTHOMER und SHERAeco-disc PM20 widerlegt. Bestätigt wurde die Nullhypothese bei der Betrachtung von *S. mutans*.

Es bedarf in Zukunft weiterführender Forschung durch In-vitro-Studien mit Mono- und Multispeziesbiofilmen und In-vivo-Studien, um die Einflüsse und komplexen Zusammenhänge der bakteriellen Plaquebildung auf Kunststoffoberflächen besser nachvollziehen und verstehen zu können und die Biokompatibilität von Materialien, auch im Hinblick auf ihren Einfluss auf die orale Mikroflora, weiter zu verbessern. Dabei könnte auch der Einfluss der additiven Schichtdicke im Druck bzw. die Fräsbahnbreite von subtraktiven Prozessen auf das Ausmaß der Biofilmbildung von Interesse sein. Da eine Politur der Schieneninnenseite die Passung stark beeinflussen würde und sich dadurch klinisch nicht empfiehlt, könnte die Untersuchung von möglichen Alternativen, wie beispielsweise der chemischen Politur mit einer Oberflächenversiegelung der Innenflächen, oder auch der Effekt der Einarbeitung von antibakteriell wirksamen Silbernanopartikeln [241] in Schienenmaterialien Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

7. Zusammenfassung

In den letzten Jahren gewinnen die additiven Drucktechniken (3D-Druck) in der Zahnmedizin stetig an Stellenwert. Da dies auch die Entwicklung und Neuzulassung von Druckmaterialien nach sich zieht, gewinnt die Frage der Biokompatibilität dieser Materialien im Vergleich zu jenen, die in den etablierten Herstellungstechniken zur Anwendung kommen, an Bedeutung. So war ein Ziel dieser Arbeit, die Biokompatibilität von methacrylatbasierten Materialien für die Anfertigung dentaler Schienen aus den drei gängigen Fertigungswegen additiv (3D-Druck), subtraktiv (gefräst) und konventionell (Anteigmethode mit Drucktopf) durch Analyse ihres Elutionsverhaltens zu untersuchen. Ein weiteres Ziel war die Messung und der Vergleich des bakteriellen Wachstums von Monospezieskulturen auf ebendiesen Schienenmaterialien. Hier wurde die Nullhypothese aufgestellt, dass es keinen signifikanten Unterschied in der absoluten Zahl der adhären KBE auf den getesteten Materialien gibt.

Ausgewählte Materialien für beide Versuchsreihen waren das für die additive Fertigung entwickelte SHERAprint-ortho plus, das auch eine Klasse IIa-Zertifizierung gemäß Medizinproduktegesetz besitzt, SHERAeco-disc PM20 in der subtraktiven und SHERAORTHOMER in der konventionellen Fertigung (alle Materialien von SHERA® Werkstoff-Technologie GmbH & Co. KG, Lemförde, Deutschland).

Um anhand der gewonnenen Elutionsdaten eine Risikobewertung in einem Worst-Case-Szenario vornehmen zu können, wurden für Inhaltsstoffe des Herstellers, für die keine EC_{50} -Werte für HGF vorlagen (THFMA, TPGDA und BDDMA), XTT-Zelltoxizitätstests in dreifacher Ausführung vorgenommen. Außerdem wurden beispielhafte Michiganschienen für Ober- und Unterkiefer konstruiert und vermessen, um die Testkörper und damit die gemessenen Konzentrationen näherungsweise auf eine Exposition in Schienengröße hochrechnen zu können.

Die Testkörper (Zylinder mit 6mm Durchmesser und 2mm Höhe) wurden zirkulär und auf einer Zylinderquerschnittsfläche hochglanzpoliert, die zweite Querschnittsfläche blieb unpoliert. Das Elutionsverhalten wurde mit GC/MS nach 24h bzw. 72h mit den Lösungsmitteln Wasser und Methanol für jedes Material jeweils viermal ($n=4$) gemessen.

Das bakterielle Oberflächenwachstum wurde mit Monospezieskulturen von *S. mutans* und *A. naeslundii* mit jedem Material jeweils 16-mal ($n=16$) untersucht. Nach 120h bei 37°C wurden im Titerverfahren dezimale Serienverdünnungsreihen auf Agarplatten angelegt und ausplattiert, um nach 72h Inkubation die absoluten Bakterienzahlen bzw. die KBE visuell

auszuzählen. Über den Verdünnungsfaktor konnten so für jedes Material die adhärenenten KBE/ml ermittelt werden. Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten wurde mit SPSS durchgeführt.

Aus dem XTT-Test ergaben sich EC_{50} -Werte von $3.006 (\pm 408) \mu\text{mol/l}$ für THFMA, $2.569,5 (\pm 308) \mu\text{mol/l}$ für BDDMA und für TPGDA $596,7 (\pm 88) \mu\text{mol/l}$ (siehe Tab. 6). Im Elutionsversuch kam es im Lösungsmittel Methanol bei allen Materialien zum Nachweis von Methacrylaten und Additiven (siehe Tab. 3-5), die im Worst-Case-Szenario die EC_{50} -Werte für HGF teilweise um bis zu einem Faktor von 8,3 überstiegen. Dies muss jedoch stark relativiert werden und stellt insofern keinen direkten Grund zur Besorgnis dar, als Methanol nur bedingt mit Speichel und damit mit den intraoralen Bedingungen vergleichbar ist. Im Lösungsmittel Wasser, das in den Elutionseigenschaften die höchste Vergleichbarkeit zum Speichel bietet, kam es nur beim additiven Material SHERAprint-ortho plus zu einem Nachweis des Methacrylates THFMA in Konzentrationen, die sich im Worst-Case-Szenario als um den Faktor 7,2 unterhalb des EC_{50} herausstellten. In der Untersuchung des bakteriellen Wachstums auf den Oberflächen wurden für *S. mutans* keine signifikanten Unterschiede zwischen den Materialien verzeichnet, für *A. naeslundii* ergab sich eine signifikant höhere Zahl der KBE bei SHERAORTHOMER im Vergleich zu SHERAeco-disc PM20 ($p=0,031$). Die aufgestellte Nullhypothese, dass keine signifikanten Unterschiede in der absoluten Anzahl adhärenenten KBE, in der Betrachtung von Monospezieskulturen mit *S. mutans* und *A. naeslundii*, zwischen den getesteten Materialien und Herstellungsprozessen bestehen, wurde damit im Fall von *A. naeslundii* für die Materialien SHERAORTHOMER und SHERAeco-disc PM20 widerlegt. Bestätigt wurde die Nullhypothese für *S. mutans* bei allen untersuchten Materialien, bei *A. naeslundii* nur im Vergleich von SHERAprint-ortho plus mit SHERAORTHOMER und SHERAeco-disc PM20.

Anhand der Ergebnisse aus dem Elutionsversuch kann geschlussfolgert werden, dass unter physiologischen Bedingungen bei keinem der untersuchten Materialien von einer zytotoxischen Wirkung ausgegangen werden muss.

Die Ergebnisse aus dem Versuch zum bakteriellen Wachstum zeigen, dass, wie schon in früheren Studien beschrieben, die physiochemischen Materialeigenschaften keine generalisierten Rückschlüsse auf das Adhäsionsmuster oraler Mikroorganismen zulassen. So zeigten sich auch innerhalb der untersuchten Materialklasse der Polymethylmethacrylate bei *S. mutans*, im Gegensatz zu *A. naeslundii*, keine signifikanten Unterschiede der

Adhäsionswerte zwischen den Materialien. Dies bestätigt vorangegangene Studien und lässt auch hier den Schluss zu, dass *A. naeslundii* stärker durch die physiochemischen Eigenschaften der Materialien beeinflusst wird als *S. mutans*.

Zusammenfassend leistet diese Studie einen wichtigen ersten Einblick in das in-Vitro-Löslichkeitsverhalten von polymethylmethacrylatbasierten Schienenmaterialien aus unterschiedlichen Fertigungsprozessen und gibt anhand der vollzogenen Risikoanalyse eine Einschätzung zu möglichen zytotoxischen Wirkungen. Des Weiteren tragen die Ergebnisse der Adhäsionsmengen und -muster oraler Mikroorganismen auf diesen Materialien zum besseren Verständnis der Komplexität der wechselseitigen Einflüsse zwischen physiochemischen Materialeigenschaften und Mikroorganismen bei. Jedoch sind in beiden Bereichen weiterführende Studien nötig, um ein noch umfassenderes Bild zur Biokompatibilität der hier untersuchten und neuer Materialien zu bekommen.

8. Literaturverzeichnis

1. Beuer F, Schweiger J, Edelhoff D: **Digital dentistry: an overview of recent developments for CAD/CAM generated restorations.** *Br Dent J* 2008, **204**(9):505-511.
2. Miyazaki T, Hotta Y, Kunii J, Kuriyama S, Tamaki Y: **A review of dental CAD/CAM: current status and future perspectives from 20 years of experience.** *Dent Mater J* 2009, **28**(1):44-56.
3. Bidra AS, Taylor TD, Agar JR: **Computer-aided technology for fabricating complete dentures: systematic review of historical background, current status, and future perspectives.** *J Prosthet Dent* 2013, **109**(6):361-366.
4. Strub JR, Rekow ED, Witkowski S: **Computer-aided design and fabrication of dental restorations: current systems and future possibilities.** *J Am Dent Assoc* 2006, **137**(9):1289-1296.
5. Azari A, Nikzad S: **The evolution of rapid prototyping in dentistry: a review.** *Rapid Prototyping Journal* 2009, **15**(3):216-225.
6. Dawood A, Marti Marti B, Sauret-Jackson V, Darwood A: **3D printing in dentistry.** *Br Dent J* 2015, **219**(11):521-529.
7. Berman B: **3-D printing: The new industrial revolution.** *Business Horizons* 2012, **55**(2):155-162.
8. Fastermann P: **Ausblick: 3D-Druck als Zukunftstechnologie.** In: *3D-Druck/Rapid Prototyping: Eine Zukunftstechnologie - kompakt erklärt.* edn. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012: 81-114.
9. Schweiger J, Edelhoff D, Güth JF: **3D Printing in Digital Prosthetic Dentistry: An Overview of Recent Developments in Additive Manufacturing.** *Journal of clinical medicine* 2021, **10**(9).
10. Torabi K, Farjood E, Hamedani S: **Rapid Prototyping Technologies and their Applications in Prosthodontics, a Review of Literature.** *J Dent (Shiraz)* 2015, **16**(1):1-9.
11. Bural C, Aktaş E, Deniz G, Ünlüçerçi Y, Kızılcan N, Bayraktar G: **Effect of post-polymerization heat-treatments on degree of conversion, leaching residual MMA and in vitro cytotoxicity of autopolymerizing acrylic repair resin.** *Dental Materials* 2011, **27**(11):1135-1143.
12. Nik TH, Shahroudi AS, Eraghihzadeh Z, Aghajani F: **Comparison of residual monomer loss from cold-cure orthodontic acrylic resins processed by different polymerization techniques.** *Journal of orthodontics* 2014, **41**(1):30-37.
13. Yang Y, Reichl FX, Shi J, He X, Hickel R, Hogg C: **Cytotoxicity and DNA double-strand breaks in human gingival fibroblasts exposed to eluates of dental composites.** *Dent Mater* 2018, **34**(2):201-208.
14. Schweikl H, Hiller KA, Bolay C, Kreissl M, Kreismann W, Nusser A, Steinhauser S, Wiczorek J, Vasold R, Schmalz G: **Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials.** *Biomaterials* 2005, **26**(14):1713-1719.
15. Schweikl H, Schmalz G, Bey B: **Mutagenicity of dentin bonding agents.** *J Biomed Mater Res* 1994, **28**(9):1061-1067.
16. Tarumi H, Imazato S, Narimatsu M, Matsuo M, Ebisu S: **Estrogenicity of fissure sealants and adhesive resins determined by reporter gene assay.** *J Dent Res* 2000, **79**(11):1838-1843.
17. Schwengberg S, Bohlen H, Kleinsasser N, Kehe K, Seiss M, Walther UI, Hickel R, Reichl FX: **In vitro embryotoxicity assessment with dental restorative materials.** *J Dent* 2005, **33**(1):49-55.
18. Schmalz G: **Der Einfluß von Methylmethakrylat-Monomer und Dimethylparatoluidin auf das in vitro Wachstum von Streptococcus mutans.** *Berichtsheft des" Eugen-Fröhlich-Fonds", Tübingen* 1977:91-94.
19. Marghalani HY: **Effect of finishing/polishing systems on the surface roughness of novel posterior composites.** *J Esthet Restor Dent* 2010, **22**(2):127-138.
20. Carlen A, Nikdel K, Wennerberg A, Holmberg K, Olsson J: **Surface characteristics and in vitro biofilm formation on glass ionomer and composite resin.** *Biomaterials* 2001, **22**(5):481-487.

21. Ono M, Nikaido T, Ikeda M, Imai S, Hanada N, Tagami J, Matin K: **Surface Properties of Resin Composite Materials Relative to Biofilm Formation.** *Dental Materials Journal* 2007, **26**(5):613-622.
22. Marsh PD, Moter A, Devine DA: **Dental plaque biofilms: communities, conflict and control.** *Periodontology 2000* 2011, **55**(1):16-35.
23. Marsh PD: **Are dental diseases examples of ecological catastrophes?** *Microbiology (Reading, England)* 2003, **149**(Pt 2):279-294.
24. John M, Micheelis W: **Lebensqualitätsforschung in der Zahnmedizin: Konzepte, Erfahrungen und Perspektiven.** *Ein Überblick zur Forschungslandschaft IDZ-Information* 2000, **4**.
25. Aarabi G, Heydecke G, Seedorf U: **Roles of Oral Infections in the Pathomechanism of Atherosclerosis.** *International journal of molecular sciences* 2018, **19**(7).
26. Mealey BL: **Periodontal disease and diabetes. A two-way street.** *J Am Dent Assoc* 2006, **137** Suppl:26s-31s.
27. Wedekind L, Güth JF, Schweiger J, Kollmuss M, Reichl FX, Edelhoff D, Högg C: **Elution behavior of a 3D-printed, milled and conventional resin-based occlusal splint material.** *Dent Mater* 2021, **37**(4):701-710.
28. Sun J, Zhang FQ: **The application of rapid prototyping in prosthodontics.** *J Prosthodont* 2012, **21**(8):641-644.
29. Chang CC, Lee MY, Wang SH: **Digital denture manufacturing-An integrated technologies of abrasive computer tomography, CNC machining and rapid prototyping.** *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology* 2006, **31**(1):41-49.
30. Luthardt RG, Holzhueter M, Sandkuhl O, Herold V, Schnapp JD, Kuhlisch E, Walter M: **Reliability and properties of ground Y-TZP-zirconia ceramics.** *J Dent Res* 2002, **81**(7):487-491.
31. Tinschert J, Schulze KA, Natt G, Latzke P, Heussen N, Spiekermann H: **Clinical behavior of zirconia-based fixed partial dentures made of DC-Zirkon: 3-year results.** *Int J Prosthodont* 2008, **21**(3):217-222.
32. van Noort R: **The future of dental devices is digital.** *Dent Mater* 2012, **28**(1):3-12.
33. Miyazaki T, Hotta Y: **CAD/CAM systems available for the fabrication of crown and bridge restorations.** *Aust Dent J* 2011, **56** Suppl 1:97-106.
34. Nayar S, Bhuminathan S, Bhat WM: **Rapid prototyping and stereolithography in dentistry.** *J Pharm Bioallied Sci* 2015, **7**(Suppl 1):S216-219.
35. **Additive manufacturing - General principles - Terminology (ISO/ASTM 52900:2015).** *Beuth* 2017-06:30.
36. **Additive Fertigung - Grundlagen - Teil 2: Überblick über Prozesskategorien und Ausgangswerkstoffe (ISO 17296-2:2015); Deutsche Fassung EN ISO 17296-2:2016** *Beuth* 2016-12.
37. Andonović V, Vrtanoski G: **Growing rapid prototyping as a technology in dental medicine.** *Mech Eng Sci J* 2010, **29**(1):31-39.
38. Güth JT, J.; Edelhoff, D.; Schweiger, J.: **3-D-Druck in der Zahnheilkunde. Zwischen Hype und Produktivitätssteigerung.** *Bayerisches Zahnärzteblatt* 2018, **September 2018**:46-55.
39. Gebhardt A: **3D-Drucken: Grundlagen und Anwendungen des additive manufacturing (AM):** Carl Hanser Verlag GmbH Co KG; 2016.
40. Gebhardt A: **Additive Fertigungsverfahren: Additive Manufacturing und 3D-Drucken für Prototyping-Tooling-Produktion:** Carl Hanser Verlag GmbH Co KG; 2016.
41. Jamieson R, Holmer B, Ashby A: **How rapid prototyping can assist in the development of new orthopaedic products - a case study.** *Rapid Prototyping Journal* 1995, **1**(4):38-41.
42. Klein HM, Schneider W, Alzen G, Voy ED, Gunther RW: **Pediatric craniofacial surgery: comparison of milling and stereolithography for 3D model manufacturing.** *Pediatr Radiol* 1992, **22**(6):458-460.
43. Potamianos P, Amis AA, Forester AJ, McGurk M, Bircher M: **Rapid prototyping for orthopaedic surgery.** *Proc Inst Mech Eng H* 1998, **212**(5):383-393.

44. Petzold R, Zeilhofer HF, Kalender WA: **Rapid prototyping technology in medicine--basics and applications.** *Comput Med Imaging Graph* 1999, **23**(5):277-284.
45. D'Urso PS, Earwaker WJ, Barker TM, Redmond MJ, Thompson RG, Effeney DJ, Tomlinson FH: **Custom cranioplasty using stereolithography and acrylic.** *British journal of plastic surgery* 2000, **53**(3):200-204.
46. Van Brussel K, Vander Sloten J, Van Audekercke R, Swaelens B, Richard F, Assaker R, Kulik J: **Medical image-based design of an individualized surgical guide for pedicle screw insertion.** In: *Engineering in Medicine and Biology Society, 1996 Bridging Disciplines for Biomedicine Proceedings of the 18th Annual International Conference of the IEEE: 1997: IEEE; 1997: 225-226.*
47. Tack P, Victor J, Gemmel P, Annemans L: **3D-printing techniques in a medical setting: a systematic literature review.** *Biomedical engineering online* 2016, **15**(1):115.
48. Hounsfield GN: **Computerized transverse axial scanning (tomography): Part I. Description of system. 1973.** *Br J Radiol* 1995, **68**(815):H166-172.
49. Lindh C, Petersson A: **Radiologic examination for location of the mandibular canal: a comparison between panoramic radiography and conventional tomography.** *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 1989, **4**(3).
50. Sonick M, Abrahams J, Faiella RA: **Comparison of the accuracy of periapical, panoramic and computerized tomographic radiographs in locating the mandibular canal.** *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 1994, **9**(4):455-460.
51. Chua CK, Chou SM, Lin SC, Eu KH, Lew KF: **Rapid prototyping assisted surgery planning.** *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology* 1998, **14**(9):624-630.
52. Murphy SV, Atala A: **3D bioprinting of tissues and organs.** *Nature biotechnology* 2014, **32**(8):773-785.
53. Fastermann P: **3D-Drucken: Wie die generative Fertigungstechnik funktioniert:** Springer-Verlag; 2016.
54. Deckard CR: **Method and apparatus for producing parts by selective sintering.** In.: Google Patents; 1989.
55. Kaiser W: **Kunststoffchemie für Ingenieure: von der Synthese bis zur Anwendung:** Carl Hanser Verlag GmbH Co KG; 2015.
56. Kappert HF, Eichner K: **Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung. 1. Grundlagen und Verarbeitung,** vol. 1: Georg Thieme Verlag; 2005.
57. Janda R: **Kunststoffverbundsysteme: Grundlagen, Anwendung, Verarbeitung, Prüfung:** VCH-Verlag-Ges.; 1990.
58. Bural C, Akta, E, Deniz G, Ünlüçerçi Yi, Bayraktar G: **Effect of leaching residual methyl methacrylate concentrations on in vitro cytotoxicity of heat polymerized denture base acrylic resin processed with different polymerization cycles.** *Journal of Applied Oral Science* 2011, **19**:306-312.
59. McNaught AD, McNaught AD: **Compendium of chemical terminology,** vol. 1669: Blackwell Science Oxford; 1997.
60. Faltermeier A, Rosentritt M, Mussig D: **Acrylic removable appliances: comparative evaluation of different postpolymerization methods.** *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2007, **131**(3):301.e316-322.
61. Gautam R, Singh RD, Sharma VP, Siddhartha R, Chand P, Kumar R: **Biocompatibility of polymethylmethacrylate resins used in dentistry.** *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2012, **100**(5):1444-1450.
62. Bettencourt AF, Neves CB, de Almeida MS, Pinheiro LM, Oliveira SA, Lopes LP, Castro MF: **Biodegradation of acrylic based resins: A review.** *Dent Mater* 2010, **26**(5):e171-180.
63. Ferracane JL: **Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks.** *Dent Mater* 2006, **22**(3):211-222.

64. Yourtee DM, Smith RE, Russo KA, Burmaster S, Cannon JM, Eick JD, Kostoryz EL: **The stability of methacrylate biomaterials when enzyme challenged: kinetic and systematic evaluations.** *J Biomed Mater Res* 2001, **57**(4):522-531.
65. Willershausen B, Callaway A, Ernst CP, Stender E: **The influence of oral bacteria on the surfaces of resin-based dental restorative materials--an in vitro study.** *Int Dent J* 1999, **49**(4):231-239.
66. Delaviz Y, Finer Y, Santerre JP: **Biodegradation of resin composites and adhesives by oral bacteria and saliva: a rationale for new material designs that consider the clinical environment and treatment challenges.** *Dent Mater* 2014, **30**(1):16-32.
67. Graham BS, Jones DW, Sutow EJ: **An in vivo and in vitro study of the loss of plasticizer from soft polymer-gel materials.** *J Dent Res* 1991, **70**(5):870-873.
68. Ata SO, Yavuzyilmaz H: **In vitro comparison of the cytotoxicity of acetal resin, heat-polymerized resin, and auto-polymerized resin as denture base materials.** *Journal of biomedical materials research part B: Applied biomaterials* 2009, **91**(2):905-909.
69. Smith DC, Bains ME: **The detection and estimation of residual monomer in polymethyl methacrylate.** *J Dent Res* 1956, **35**(1):16-24.
70. Leggat PA, Kedjarune U: **Toxicity of methyl methacrylate in dentistry.** *Int Dent J* 2003, **53**(3):126-131.
71. Reichl F-X, Mohr K, Hein L, Hickel R: **Atlas der Pharmakologie und Toxikologie für Zahnmediziner:** Georg Thieme Verlag; 2014.
72. Ica RB, Ozturk F, Ates B, Malkoc MA, Kelestemur U: **Level of residual monomer released from orthodontic acrylic materials.** *Angle Orthod* 2014, **84**(5):862-867.
73. Bayraktar G, Guvener B, Bural C, Uresin Y: **Influence of polymerization method, curing process, and length of time of storage in water on the residual methyl methacrylate content in dental acrylic resins.** *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006, **76**(2):340-345.
74. Stafford GD, Brooks SC: **The loss of residual monomer from acrylic orthodontic resins.** *Dent Mater* 1985, **1**(4):135-138.
75. Vallittu PK, Ruyter IE, Buykuilmaz S: **Effect of polymerization temperature and time on the residual monomer content of denture base polymers.** *Eur J Oral Sci* 1998, **106**(1):588-593.
76. Bartoloni JA, Murchison DF, Wofford DT, Sarkar NK: **Degree of conversion in denture base materials for varied polymerization techniques.** *J Oral Rehabil* 2000, **27**(6):488-493.
77. Baker S, Brooks SC, Walker DM: **The release of residual monomeric methyl methacrylate from acrylic appliances in the human mouth: an assay for monomer in saliva.** *J Dent Res* 1988, **67**(10):1295-1299.
78. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ: **Effect of post-polymerization heat treatments on the cytotoxicity of two denture base acrylic resins.** *Journal of applied oral science : revista FOB* 2006, **14**(3):203-207.
79. Goncalves TS, de Menezes LM, Silva LE: **Residual monomer of autopolymerized acrylic resin according to different manipulation and polishing methods. An in situ evaluation.** *Angle Orthod* 2008, **78**(4):722-727.
80. Jadhav SS, Mahajan N, Sethuraman R: **Comparative evaluation of the amount of the residual monomer in conventional and deep-frozen heat cure polymethylmethacrylate acrylic resin: An in vitro study.** *J Indian Prosthodont Soc* 2018, **18**(2):147-153.
81. Polydorou O, Huberty C, Wolkewitz M, Bolek R, Hellwig E, Kummerer K: **The effect of storage medium on the elution of monomers from composite materials.** *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2012, **100**(1):68-74.
82. Rothmund L, Shehata M, Van Landuyt KL, Schweickl H, Carell T, Geurtsen W, Hellwig E, Hickel R, Reichl FX, Hogg C: **Release and protein binding of components from resin based composites in native saliva and other extraction media.** *Dent Mater* 2015, **31**(5):496-504.
83. Ferracane JL: **Elution of leachable components from composites.** *J Oral Rehabil* 1994, **21**(4):441-452.

84. Levy G: **Effects of plasma protein binding of drugs on duration and intensity of pharmacological activity.** *Journal of pharmaceutical sciences* 1976, **65**(8):1264-1265.
85. Michelsen VB, Moe G, Skalevik R, Jensen E, Lygre H: **Quantification of organic eluates from polymerized resin-based dental restorative materials by use of GC/MS.** *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 2007, **850**(1-2):83-91.
86. Singh RD, Gautam R, Siddhartha R, Singh BP, Chand P, Sharma VP, Jurel SK: **High performance liquid chromatographic determination of residual monomer released from heat-cured acrylic resin. An in vivo study.** *J Prosthodont* 2013, **22**(5):358-361.
87. **Analytische Chemie Kapitel 3: Flüssigchromatografie (LC)**
[http://www.analytik.ethz.ch/vorlesungen/biopharm/Trennmethoden/AnalytischeChemie_Skript_3_LC.pdf]
88. **Analytische Chemie Kapitel 4: Gaschromatographie (GC)**
[https://www.analytik.ethz.ch/vorlesungen/biopharm/Trennmethoden/AnalytischeChemie_Skript_4_GC.pdf]
89. Talos: **Schema eines Gaschromatographen.**
[<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gaschromatographsvq>].
90. Hites RA: **Gas chromatography mass spectrometry.** *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry* 1997:609-626.
91. Gosavi SS, Gosavi SY, Alla RK: **Local and systemic effects of unpolymerised monomers.** *Dental research journal* 2010, **7**(2):82-87.
92. Reichl FX: **Neueste Erkenntnisse zur Komposit-Toxikologie.** *Zm* 2011, **10**.
93. Reichl FX, Seiss M, Kleinsasser N, Kehe K, Kunzelmann KH, Thomas P, Spahl W, Hickel R: **Distribution and excretion of BisGMA in guinea pigs.** *J Dent Res* 2008, **87**(4):378-380.
94. Seiss M, Nitz S, Kleinsasser N, Buters JT, Behrendt H, Hickel R, Reichl FX: **Identification of 2,3-epoxymethacrylic acid as an intermediate in the metabolism of dental materials in human liver microsomes.** *Dent Mater* 2007, **23**(1):9-16.
95. Rashid H, Sheikh Z, Vohra F: **Allergic effects of the residual monomer used in denture base acrylic resins.** *European journal of dentistry* 2015, **9**(4):614-619.
96. Minamoto K: **Allergic contact dermatitis from two-component acrylic resin in a manicurist and a dental hygienist.** *Journal of occupational health* 2014, **56**(3):229-234.
97. Lyapina M, Dencheva M, Krasteva A, Tzekova M, Kisselova-Yaneva A: **Concomitant contact allergy to formaldehyde and methacrylic monomers in students of dental medicine and dental patients.** *International journal of occupational medicine and environmental health* 2014, **27**(5):797-807.
98. Weaver RE, Goebel WM: **Reactions to acrylic resin dental prostheses.** *J Prosthet Dent* 1980, **43**(2):138-142.
99. van Joost T, van Ulsen J, van Loon LA: **Contact allergy to denture materials in the burning mouth syndrome.** *Contact dermatitis* 1988, **18**(2):97-99.
100. Sadoh DR, Sharief MK, Howard RS: **Occupational exposure to methyl methacrylate monomer induces generalised neuropathy in a dental technician.** *British Dental Journal* 1999, **186**:380.
101. Goncalves TS, Morganti MA, Campos LC, Rizzato SM, Menezes LM: **Allergy to auto-polymerized acrylic resin in an orthodontic patient.** *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006, **129**(3):431-435.
102. Kanerva L, Rantanen T, Aalto-Korte K, Estlander T, Hannuksela M, Harvima RJ, Hasan T, Horsmanheimo M, Jolanki R, Kalimo K *et al*: **A multicenter study of patch test reactions with dental screening series.** *American journal of contact dermatitis : official journal of the American Contact Dermatitis Society* 2001, **12**(2):83-87.
103. Fisher AA: **Allergic sensitization of the skin and oral mucosa to acrylic denture materials.** *Journal of the American Medical Association* 1954, **156**(3):238-242.
104. Devlin H, Watts DC: **Acrylic 'allergy'?** *Br Dent J* 1984, **157**(8):272-275.

105. Chung CW, Giles AL: **Sensitization potentials of methyl, ethyl, and n-butyl methacrylates and mutual cross-sensitivity in guinea pigs.** *The Journal of investigative dermatology* 1977, **68**(4):187-190.
106. Gebhart M, Geier J: **Evaluation of patch test results with denture material series.** *Contact dermatitis* 1996, **34**(3):191-195.
107. Goldberg M: **In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review.** *Clin Oral Investig* 2008, **12**(1):1-8.
108. Koutis D, Freeman S: **Allergic contact stomatitis caused by acrylic monomer in a denture.** *The Australasian journal of dermatology* 2001, **42**(3):203-206.
109. Feilzer AJ: **[Burning mouth caused by denture material].** *Nederlands tijdschrift voor tandheelkunde* 2009, **116**(9):472-474.
110. Fahrig R: **Mutationsforschung und genetische Toxikologie:** Wissenschaftliche Buchgesellschaft; 1993.
111. Schweikl H, Schmalz G: **Glutaraldehyde-containing dentin bonding agents are mutagens in mammalian cells in vitro.** *J Biomed Mater Res* 1997, **36**(3):284-288.
112. Kedjarune U, Charoenworakul N, Koontongkaew S: **Release of methyl methacrylate from heat-cured and autopolymerized resins: cytotoxicity testing related to residual monomer.** *Aust Dent J* 1999, **44**(1):25-30.
113. Sheridan PJ, Koka S, Ewoldsen NO, Lefebvre CA, Lavin MT: **Cytotoxicity of denture base resins.** *Int J Prosthodont* 1997, **10**(1):73-77.
114. Huang FM, Tai KW, Hu CC, Chang YC: **Cytotoxic effects of denture base materials on a permanent human oral epithelial cell line and on primary human oral fibroblasts in vitro.** *Int J Prosthodont* 2001, **14**(5):439-443.
115. Kallus T: **Evaluation of the toxicity of denture base polymers after subcutaneous implantation in guinea pigs.** *J Prosthet Dent* 1984, **52**(1):126-134.
116. Goiato MC, Freitas E, dos Santos D, de Medeiros R, Sonego M: **Acrylic Resin Cytotoxicity for Denture Base--Literature Review.** *Adv Clin Exp Med* 2015, **24**(4):679-686.
117. Dillingham EO, Webb N, Lawrence WH, Autian J: **Biological evaluation of polymers. I. Poly(methyl methacrylate).** *J Biomed Mater Res* 1975, **9**(6):569-596.
118. ISO E: **10993-5. Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity.** *International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland* 2009.
119. Trubiani O, Toniato E, Di Iorio D, Diomedede F, Merciaro I, C DA, Caputi S: **Morphological analysis and interleukin release in human gingival fibroblasts seeded on different denture base acrylic resins.** *International journal of immunopathology and pharmacology* 2012, **25**(3):637-643.
120. Hattori N, Suzuki T, Jinno S, Okeya H, Ishikawa A, Kondo C, Hayashi T, Ito M, Kanamori T, Kawai T *et al*: **Methyl methacrylate activates the Gsta1 promoter.** *J Dent Res* 2008, **87**(12):1117-1121.
121. Di Giulio M, D'Ercole S, Zara S, Cataldi A, Cellini L: **Streptococcus mitis/human gingival fibroblasts co-culture: the best natural association in answer to the 2-hydroxyethyl methacrylate release.** *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 2012, **120**(2):139-146.
122. Di Giulio M, di Giacomo V, Di Campli E, Di Bartolomeo S, Zara S, Pasquantonio G, Cataldi A, Cellini L: **Saliva improves Streptococcus mitis protective effect on human gingival fibroblasts in presence of 2-hydroxyethyl-methacrylate.** *J Mater Sci Mater Med* 2013, **24**(8):1977-1983.
123. Hansel C, Leyhausen G, Mai UE, Geurtsen W: **Effects of various resin composite (co)monomers and extracts on two caries-associated micro-organisms in vitro.** *J Dent Res* 1998, **77**(1):60-67.
124. Takahashi Y, Imazato S, Russell RR, Noiri Y, Ebisu S: **Influence of resin monomers on growth of oral streptococci.** *J Dent Res* 2004, **83**(4):302-306.
125. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP: **Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.** *Science (New York, NY)* 1999, **284**(5418):1318-1322.

126. Seneviratne CJ, Zhang CF, Samaranayake LP: **Dental plaque biofilm in oral health and disease.** *The Chinese journal of dental research : the official journal of the Scientific Section of the Chinese Stomatological Association (CSA)* 2011, **14**(2):87-94.
127. Marsh PD: **Dental plaque as a microbial biofilm.** *Caries Res* 2004, **38**(3):204-211.
128. Marsh P, Martin MV: **Orale Mikrobiologie: 60 Tabellen:** Georg Thieme Verlag; 2003.
129. Keijser BJ, Zaura E, Huse SM, van der Vossen JM, Schuren FH, Montijn RC, ten Cate JM, Crielaard W: **Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults.** *J Dent Res* 2008, **87**(11):1016-1020.
130. Bowden GH, Hardie JM, Slack GL: **Microbial variations in approximal dental plaque.** *Caries Res* 1975, **9**(4):253-277.
131. Theilade E, Fejerskov O, Karring T, Theilade J: **Predominant cultivable microflora of human dental fissure plaque.** *Infection and immunity* 1982, **36**(3):977-982.
132. Low B, Lee W, Seneviratne CJ, Samaranayake LP, Hagg U: **Ultrastructure and morphology of biofilms on thermoplastic orthodontic appliances in 'fast' and 'slow' plaque formers.** *European journal of orthodontics* 2011, **33**(5):577-583.
133. Yoo JH, Kho HS, Kim YK, Lee SW, Chung SC: **Experimental salivary pellicles formed on the surface of self-curing resin.** *J Oral Rehabil* 2003, **30**(3):251-259.
134. Lamont R, Jenkinson H: **Adhesion as an ecological determinant in the oral cavity.** *Oral bacterial ecology: the molecular basis* 2000:131-168.
135. Liljemark WF, Fenner LJ, Bloomquist CG: **In vivo colonization of salivary pellicle by Haemophilus, Actinomyces and Streptococcus species.** *Caries Res* 1986, **20**(6):481-497.
136. Li YH, Lau PC, Lee JH, Ellen RP, Cvitkovitch DG: **Natural genetic transformation of Streptococcus mutans growing in biofilms.** *Journal of bacteriology* 2001, **183**(3):897-908.
137. Fuqua C, Winans SC, Greenberg EP: **Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators.** *Annual Reviews in Microbiology* 1996, **50**(1):727-751.
138. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr.: **Microbial complexes in subgingival plaque.** *J Clin Periodontol* 1998, **25**(2):134-144.
139. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE: **Bacterial diversity in human subgingival plaque.** *Journal of bacteriology* 2001, **183**(12):3770-3783.
140. De Beer D, Stoodley P, Lewandowski Z: **Liquid flow and mass transport in heterogeneous biofilms.** *Water Research* 1996, **30**(11):2761-2765.
141. Cazzaniga G, Ottobelli M, Ionescu A, Garcia-Godoy F, Brambilla E: **Surface properties of resin-based composite materials and biofilm formation: A review of the current literature.** *Am J Dent* 2015, **28**(6):311-320.
142. Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M: **Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development.** *Clin Oral Implants Res* 2006, **17 Suppl 2**:68-81.
143. Quirynen M, Bollen CM: **The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature.** *J Clin Periodontol* 1995, **22**(1):1-14.
144. Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, van Steenberghe D: **The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An in vivo study in man.** *J Clin Periodontol* 1990, **17**(3):138-144.
145. Gadelmawla ES, Koura MM, Maksoud TMA, Elewa IM, Soliman HH: **Roughness parameters.** *Journal of Materials Processing Technology* 2002, **123**(1):133-145.
146. Ionescu A, Wutscher E, Brambilla E, Schneider-Feyrer S, Giessibl FJ, Hahnel S: **Influence of surface properties of resin-based composites on in vitro Streptococcus mutans biofilm development.** *Eur J Oral Sci* 2012, **120**(5):458-465.
147. Christersson CE, Glantz PO, Baier RE: **Role of temperature and shear forces on microbial detachment.** *Scandinavian journal of dental research* 1988, **96**(2):91-98.

148. Hannig M: **Transmission electron microscopy of early plaque formation on dental materials in vivo.** *European Journal of Oral Sciences* 1999, **107**(1):55-64.
149. Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M: **Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature.** *Dent Mater* 1997, **13**(4):258-269.
150. Grivet M, Morrier JJ, Benay G, Barsotti O: **Effect of hydrophobicity on in vitro streptococcal adhesion to dental alloys.** *J Mater Sci Mater Med* 2000, **11**(10):637-642.
151. Kim HY, Yeo IS, Lee JB, Kim SH, Kim DJ, Han JS: **Initial in vitro bacterial adhesion on dental restorative materials.** *Int J Artif Organs* 2012, **35**(10):773-779.
152. Sipahi C, Anil N, Bayramli E: **The effect of acquired salivary pellicle on the surface free energy and wettability of different denture base materials.** *J Dent* 2001, **29**(3):197-204.
153. Ahn SJ, Lim BS, Lee SJ: **Surface characteristics of orthodontic adhesives and effects on streptococcal adhesion.** *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010, **137**(4):489-495; discussion 413A.
154. van Dijk J, Herkstroter F, Busscher H, Weerkamp A, Jansen H, Arends J: **Surface-free energy and bacterial adhesion. An in vivo study in beagle dogs.** *J Clin Periodontol* 1987, **14**(5):300-304.
155. Ruttermann S, Bergmann N, Beikler T, Raab WH, Janda R: **Bacterial viability on surface-modified resin-based dental restorative materials.** *Arch Oral Biol* 2012, **57**(11):1512-1521.
156. Bradshaw DJ, Marsh PD: **Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities in vitro.** *Caries Res* 1998, **32**(6):456-462.
157. Sanz M, Beighton D, Curtis MA, Cury JA, Dige I, Dommisch H, Ellwood R, Giacaman R, Herrera D, Herzberg MC *et al*: **Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease.** *J Clin Periodontol* 2017, **44** Suppl 18:S5-S11.
158. Genco CA: **Regulation of hemin and iron transport in Porphyromonas gingivalis.** *Advances in dental research* 1995, **9**(1):41-47.
159. Marsh PD: **Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries.** *Dental clinics of North America* 2010, **54**(3):441-454.
160. Slade GD, Ghezzi EM, Heiss G, Beck JD, Riche E, Offenbacher S: **Relationship between periodontal disease and C-reactive protein among adults in the Atherosclerosis Risk in Communities study.** *Archives of internal medicine* 2003, **163**(10):1172-1179.
161. Renvert S, Pettersson T, Ohlsson O, Persson GR: **Bacterial profile and burden of periodontal infection in subjects with a diagnosis of acute coronary syndrome.** *Journal of periodontology* 2006, **77**(7):1110-1119.
162. Pillai RS, Iyer K, Spin-Neto R, Kothari SF, Nielsen JF, Kothari M: **Oral Health and Brain Injury: Causal or Casual Relation?** *Cerebrovascular diseases extra* 2018, **8**(1):1-15.
163. Darre L, Vergnes JN, Gourdy P, Sixou M: **Efficacy of periodontal treatment on glycaemic control in diabetic patients: A meta-analysis of interventional studies.** *Diabetes & metabolism* 2008, **34**(5):497-506.
164. Davis C: **Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria.** *Journal of microbiological methods* 2014, **103**:9-17.
165. Cui X, Ren L, Shan Y, Wang X, Yang Z, Li C, Xu J, Ma B: **Smartphone-based rapid quantification of viable bacteria by single-cell microdroplet turbidity imaging.** *The Analyst* 2018, **143**(14):3309-3316.
166. Högg C, Maier M, Dettinger-Maier K, He X, Rothmund L, Kehe K, Hickel R, Reichl FX: **Effect of various light curing times on the elution of composite components.** *Clin Oral Investig* 2016, **20**(8):2113-2121.
167. Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A: **The virulence of Streptococcus mutans and the ability to form biofilms.** *European journal of clinical microbiology & infectious*

- diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 2014, **33**(4):499-515.
168. Rosan B, Lamont RJ: **Dental plaque formation**. *Microbes and infection* 2000, **2**(13):1599-1607.
169. Vallittu PK: **The effect of surface treatment of denture acrylic resin on the residual monomer content and its release into water**. *Acta Odontol Scand* 1996, **54**(3):188-192.
170. Gurle J: **Elution von Monomeren aus einem Infiltranten im Vergleich zu verschiedenen Dentalmaterialien in vitro**. Freie Universität Berlin; 2012.
171. Van Landuyt KL, Nawrot T, Geebelen B, De Munck J, Snauwaert J, Yoshihara K, Scheers H, Godderis L, Hoet P, Van Meerbeek B: **How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach**. *Dent Mater* 2011, **27**(8):723-747.
172. Harrison A, Huggett R: **Effect of the curing cycle on residual monomer levels of acrylic resin denture base polymers**. *J Dent* 1992, **20**(6):370-374.
173. Lung CY, Darvell BW: **Methyl methacrylate in poly(methyl methacrylate)--validation of direct injection gas chromatography**. *Journal of chromatography A* 2004, **1061**(1):93-98.
174. Sevkusic M, Schuster L, Rothmund L, Dettinger K, Maier M, Hickel R, Van Landuyt KL, Durner J, Hogg C, Reichl FX: **The elution and breakdown behavior of constituents from various light-cured composites**. *Dent Mater* 2014, **30**(6):619-631.
175. Moharamzadeh K, Van Noort R, Brook IM, Scutt AM: **HPLC analysis of components released from dental composites with different resin compositions using different extraction media**. *J Mater Sci Mater Med* 2007, **18**(1):133-137.
176. Tanaka K, Taira M, Shintani H, Wakasa K, Yamaki M: **Residual monomers (TEGDMA and Bis-GMA) of a set visible-light-cured dental composite resin when immersed in water**. *J Oral Rehabil* 1991, **18**(4):353-362.
177. Ferracane JL, Condon JR: **Rate of elution of leachable components from composite**. *Dent Mater* 1990, **6**(4):282-287.
178. Verma D, Garg PK, Dubey AK: **Insights into the human oral microbiome**. *Archives of microbiology* 2018, **200**(4):525-540.
179. Hamada S, Slade HD: **Biology, immunology, and cariogenicity of Streptococcus mutans**. *Microbiological reviews* 1980, **44**(2):331-384.
180. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, Abranches J, Brady LJ: **The Biology of Streptococcus mutans**. *Microbiology spectrum* 2019, **7**(1).
181. Jung CJ, Yeh CY, Shun CT, Hsu RB, Cheng HW, Lin CS, Chia JS: **Platelets enhance biofilm formation and resistance of endocarditis-inducing streptococci on the injured heart valve**. *The Journal of infectious diseases* 2012, **205**(7):1066-1075.
182. Bowen WH, Koo H: **Biology of Streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms**. *Caries Res* 2011, **45**(1):69-86.
183. Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Lu B, Delahunty CM, Yates JR, 3rd, Heydorn A, Koo H: **The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm**. *PLoS pathogens* 2012, **8**(4):e1002623.
184. Fozo EM, Quivey RG, Jr.: **Shifts in the membrane fatty acid profile of Streptococcus mutans enhance survival in acidic environments**. *Applied and environmental microbiology* 2004, **70**(2):929-936.
185. Takahashi N, Iwami Y, Yamada T: **Metabolism of intracellular polysaccharide in the cells of Streptococcus mutans under strictly anaerobic conditions**. *Oral microbiology and immunology* 1991, **6**(5):299-304.
186. Takahashi N, Nyvad B: **Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process**. *Caries Res* 2008, **42**(6):409-418.
187. Dige I, Raarup MK, Nyengaard JR, Kilian M, Nyvad B: **Actinomyces naeslundii in initial dental biofilm formation**. *Microbiology (Reading)* 2009, **155**(Pt 7):2116-2126.
188. Takahashi N, Yamada T: **Glucose and lactate metabolism by Actinomyces naeslundii**. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 1999, **10**(4):487-503.

189. Guo B, Yang F, Jia Y, Xia Q, Zhou XD: **[The genotypic diversity of oral *Actinomyces naeslundii* of root caries in aged people]**. *Hua xi kou qiang yi xue za zhi = Huaxi kouqiang yixue zazhi = West China journal of stomatology* 2010, **28**(6):646-648, 652.
190. Sato T, Watanabe K, Kumada H, Toyama T, Tani-Ishii N, Hamada N: **Peptidoglycan of *Actinomyces naeslundii* induces inflammatory cytokine production and stimulates osteoclastogenesis in alveolar bone resorption**. *Arch Oral Biol* 2012, **57**(11):1522-1528.
191. Cortes CD, Urban C, Turett G: ***Actinomyces naeslundii*: An Uncommon Cause of Endocarditis**. *Case reports in infectious diseases* 2015, **2015**:602462.
192. Suzuki JB, Delisle AL: **Pulmonary actinomycosis of periodontal origin**. *Journal of periodontology* 1984, **55**(10):581-584.
193. Supriya BG, Harisree S, Savio J, Ramachandran P: ***Actinomyces naeslundii* causing pulmonary endobronchial Actinomycosis - A case report**. *Indian journal of pathology & microbiology* 2019, **62**(2):326-328.
194. Al-Ahmad A, Wunder A, Auschill TM, Follo M, Braun G, Hellwig E, Arweiler NB: **The in vivo dynamics of *Streptococcus* spp., *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* spp. in dental plaque biofilm as analysed by five-colour multiplex fluorescence in situ hybridization**. *Journal of medical microbiology* 2007, **56**(Pt 5):681-687.
195. Bloomquist CG, Reilly BE, Liljemark WF: **Adherence, accumulation, and cell division of a natural adherent bacterial population**. *Journal of bacteriology* 1996, **178**(4):1172-1177.
196. Yeung MK: **Molecular and genetic analyses of *Actinomyces* spp.** *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 1999, **10**(2):120-138.
197. Brennan MJ, Cisar JO, Vatter AE, Sandberg AL: **Lectin-dependent attachment of *Actinomyces naeslundii* to receptors on epithelial cells**. *Infection and immunity* 1984, **46**(2):459-464.
198. Takahashi N, Yamada T: **Catabolic pathway for aerobic degradation of lactate by *Actinomyces naeslundii***. *Oral microbiology and immunology* 1996, **11**(3):193-198.
199. Komiyama K, Khandelwal RL, Heinrich SE: **Glycogen synthetic and degradative activities by *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii* of root surface caries and noncaries sites**. *Caries Res* 1988, **22**(4):217-225.
200. Eftimiadi C, Valente S, Mangiante S, Mangiante PE, Niederman R: **Short chain fatty acids produced by anaerobic bacteria inhibit adhesion and proliferation of periodontal ligament fibroblasts**. *Minerva stomatologica* 1993, **42**(11-12):481-485.
201. Takada H, Kimura S, Hamada S: **Induction of inflammatory cytokines by a soluble moiety prepared from an enzyme lysate of *Actinomyces viscosus* cell walls**. *Journal of medical microbiology* 1993, **38**(6):395-400.
202. Lewis EA, Ogle RE, Sorensen SE, Zysik DA: **Clinical and laboratory evaluation of visible light-cured denture base resins and their application to orthodontics**. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1988, **94**(3):207-215.
203. Wei CX, Leung WK, Burrow MF: **Evaluation of in vitro *Streptococcus mutans* and *Actinomyces naeslundii* attachment and growth on restorative materials surfaces**. *Aust Dent J* 2019, **64**(4):365-375.
204. Feldner KSE: **Untersuchung der Plaqueretention auf verschiedenen Dentalen Kompositmaterialien: eine mikrobiologische in vitro Studie** *Dissertation, München, Ludwig-Maximilians-Universität* 2022:90.
205. Jung JH, Lee JE: **Real-time bacterial microcolony counting using on-chip microscopy**. *Scientific reports* 2016, **6**:21473.
206. Paetz A: **Wörterbuch Umweltuntersuchung: Begriffe, Definitionen und Erläuterungen aus den Bereichen Abfall, Boden, Wasser**: Beuth Verlag GmbH; 2011.
207. Dahl OE, Garvik LJ, Lyberg T: **Toxic effects of methylmethacrylate monomer on leukocytes and endothelial cells in vitro**. *Acta orthopaedica Scandinavica* 1994, **65**(2):147-153.

208. Ishihara M, Fujisawa S: **A structure-activity relationship study on the mechanisms of methacrylate-induced toxicity using NMR chemical shift of beta-carbon, RP-HPLC log P and semiempirical molecular descriptor.** *Dent Mater J* 2009, **28**(1):113-120.
209. Fujisawa S, Atsumi T: **Cytotoxicities of a 4-META/MMA-TBBO resin against human pulp fibroblasts.** *Dent Mater J* 2004, **23**(2):106-108.
210. Labella R, Braden M, Clarke RL, Davy KW: **THFMA in dental monomer systems.** *Biomaterials* 1996, **17**(4):431-436.
211. Labella R, Davy KW, Lambrechts P, Van Meerbeek B, Vanherle G: **Monomethacrylate comonomers for dental resins.** *Eur J Oral Sci* 1998, **106**(3):816-824.
212. Pearson GJ, Picton DC, Braden M, Longman C: **The effects of two temporary crown materials on the dental pulp of monkeys (*Macaca fascicularis*).** *International endodontic journal* 1986, **19**(3):121-124.
213. Wyre RM, Downes S: **An in vitro investigation of the PEMA/THFMA polymer system as a biomaterial for cartilage repair.** *Biomaterials* 2000, **21**(4):335-343.
214. Hutcheon GA, Downes S, Davies MC: **Interactions of chondrocytes with methacrylate copolymers.** *J Mater Sci Mater Med* 1998, **9**(12):815-818.
215. Downes S, Archer RS, Kayser MV, Patel MP, Braden M: **The regeneration of articular cartilage using a new polymer system.** *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1994, **5**(2):88-95.
216. **Tetrahydrofurfurymethacrylat [MAK Value Documentation in German language, 2001].** In: *The MAK-Collection for Occupational Health and Safety.* edn.: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2002.
217. Nakabayashi N, Watanabe A, Gendusa NJ: **Dentin adhesion of "modified" 4-META/MMA-TBB resin: function of HEMA.** *Dent Mater* 1992, **8**(4):259-264.
218. Gerzina TM, Hume WR: **Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine in vitro.** *J Dent* 1996, **24**(1-2):125-128.
219. Bakopoulou A, Papadopoulos T, Garefis P: **Molecular toxicology of substances released from resin-based dental restorative materials.** *International journal of molecular sciences* 2009, **10**(9):3861-3899.
220. Reichl FX, Seiss M, Marquardt W, Kleinsasser N, Schweikl H, Kehe K, Hickel R: **Toxicity potentiation by H₂O₂ with components of dental restorative materials on human oral cells.** *Arch Toxicol* 2008, **82**(1):21-28.
221. Gallorini M, Cataldi A, di Giacomo V: **HEMA-induced cytotoxicity: oxidative stress, genotoxicity and apoptosis.** *International endodontic journal* 2014, **47**(9):813-818.
222. Ansteinson V, Kopperud HB, Morisbak E, Samuelsen JT: **Cell toxicity of methacrylate monomers-the role of glutathione adduct formation.** *Journal of biomedical materials research Part A* 2013, **101**(12):3504-3510.
223. Toroser D, Yarian CS, Orr WC, Sohal RS: **Mechanisms of gamma-glutamylcysteine ligase regulation.** *Biochimica et biophysica acta* 2006, **1760**(2):233-244.
224. Chang HH, Guo MK, Kasten FH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, Wang RS, Jeng JH: **Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA.** *Biomaterials* 2005, **26**(7):745-753.
225. Samuelsen JT, Dahl JE, Karlsson S, Morisbak E, Becher R: **Apoptosis induced by the monomers HEMA and TEGDMA involves formation of ROS and differential activation of the MAP-kinases p38, JNK and ERK.** *Dent Mater* 2007, **23**(1):34-39.
226. Teti G, Orsini G, Salvatore V, Focaroli S, Mazzotti MC, Ruggeri A, Mattioli-Belmonte M, Falconi M: **HEMA but not TEGDMA induces autophagy in human gingival fibroblasts.** *Frontiers in physiology* 2015, **6**:275.
227. Spahl W, Budzikiewicz H, Geurtsen W: **Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry.** *Journal of Dentistry* 1998, **26**(2):137-145.

228. Urcan E, Scherthan H, Styllou M, Haertel U, Hickel R, Reichl FX: **Induction of DNA double-strand breaks in primary gingival fibroblasts by exposure to dental resin composites.** *Biomaterials* 2010, **31**(8):2010-2014.
229. Schnuch A, Uter W, Geier J, Frosch PJ, Rustemeyer T: **Contact allergies in healthcare workers. Results from the IVDK.** *Acta dermato-venereologica* 1998, **78**(5):358-363.
230. Goon AT, Isaksson M, Zimerson E, Goh CL, Bruze M: **Contact allergy to (meth)acrylates in the dental series in southern Sweden: simultaneous positive patch test reaction patterns and possible screening allergens.** *Contact dermatitis* 2006, **55**(4):219-226.
231. Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G: **Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures.** *J Biomed Mater Res* 1998, **41**(3):474-480.
232. Nocca G, Martorana GE, De Sole P, De Palma F, Calla C, Corsale P, Antenucci M, Gambarini G, Chimenti C, Giardina B *et al*: **Effects of 1,4-butanediol dimethacrylate and urethane dimethacrylate on HL-60 cell metabolism.** *Eur J Oral Sci* 2009, **117**(2):175-181.
233. Wisniewska-Jarosinska M, Poplawski T, Chojnacki CJ, Pawlowska E, Krupa R, Szczepanska J, Blasiak J: **Independent and combined cytotoxicity and genotoxicity of triethylene glycol dimethacrylate and urethane dimethacrylate.** *Molecular biology reports* 2011, **38**(7):4603-4611.
234. Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB: **Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts.** *J Dent Res* 1995, **74**(9):1602-1606.
235. Mei L, Busscher HJ, van der Mei HC, Ren Y: **Influence of surface roughness on streptococcal adhesion forces to composite resins.** *Dent Mater* 2011, **27**(8):770-778.
236. Busscher HJ, Rinastiti M, Siswomihardjo W, van der Mei HC: **Biofilm formation on dental restorative and implant materials.** *J Dent Res* 2010, **89**(7):657-665.
237. Brambilla E, Gagliani M, Ionescu A, Fadini L, Garcia-Godoy F: **The influence of light-curing time on the bacterial colonization of resin composite surfaces.** *Dent Mater* 2009, **25**(9):1067-1072.
238. Khalichi P, Cvitkovitch DG, Santerre JP: **Effect of composite resin biodegradation products on oral streptococcal growth.** *Biomaterials* 2004, **25**(24):5467-5472.
239. Fang J, Wang C, Li Y, Zhao Z, Mei L: **Comparison of bacterial adhesion to dental materials of polyethylene terephthalate (PET) and polymethyl methacrylate (PMMA) using atomic force microscopy and scanning electron microscopy.** *Scanning* 2016, **38**(6):665-670.
240. Palmer RJ, Jr., Kazmerzak K, Hansen MC, Kolenbrander PE: **Mutualism versus independence: strategies of mixed-species oral biofilms in vitro using saliva as the sole nutrient source.** *Infection and immunity* 2001, **69**(9):5794-5804.
241. Yin IX, Zhang J, Zhao IS, Mei ML, Li Q, Chu CH: **The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry.** *International journal of nanomedicine* 2020, **15**:2555-2562.

9. Anhang

9.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Stückpreise von Bauteilen in Abhängigkeit von der Stückzahl (a), sowie der Komplexität (b). (nach *Guet et al.*)

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Stereolithografie

Abbildung 3: Schematische Darstellung der DLP-Technik

Abbildung 4: Schematische Darstellung der SLS-Technik

Abbildung 5: Schematische Darstellung der 3DP-Technik

Abbildung 6: Schematische Darstellung der FDM-/FFF-Technik

Abbildung 7: Radikalische Polymerisation von Methylmethacrylat (MMA) zu Polymethylmethacrylat (PMMA)

Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Gaschromatografen: (1) Trägergas, (2) Injektor, (3) Säule im Säulenofen, (4) Detektor (hier: FID, benötigt Luft und Wasserstoff), (5) Signalaufzeichnung als Chromatogramm. (nach Talos)

Abbildung 9: Beispiele von bebrüteten Schädler-Agar-Platten: (a) *S. mutans*, (b) *A. naeslundii*

Abbildung 10: Konstruktion von Michiganschienen für Ober- und Unterkiefer mit Vermessung von Schienenoberfläche (in mm²) und -volumen (in mm³).

9.2. Diagramm- und Tabellenverzeichnis

Diagramm 1: Mittelwert und Standardabweichung von *Actinomyces naeslundii* auf den untersuchten Materialien und signifikanter Unterschied (α) zwischen SHERAeco-disc PM20 und SHERAORTHOMER.

Diagramm 2: Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung von *Streptococcus mutans* auf den untersuchten Materialien

Tabelle 1: Untersuchte Schienenmaterialien, Hersteller, LOT-Nummern und Materialzusammensetzung gemäß Hersteller

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme

Tabelle 3: Nachgewiesene Substanzen, deren Funktion, sowie Molekulargewicht und CAS-Nummer

Tabelle 4: Qualifizierung und Quantifizierung von Substanzen aus Wasser- und Methanol-Eluaten aus SHERAprint-ortho plus nach 24h bzw. 72h. Angaben in Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) [μ M].

Tabelle 5: Qualifizierung und Quantifizierung von Substanzen aus Methanol-Eluaten von SHERAORTHOMER nach 24h bzw. 72h. Angaben in Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) [μ M].

Tabelle 6: Qualifizierung und Quantifizierung von Substanzen aus Methanol-Eluaten von SHERAORTHOMER nach 24h bzw. 72h. Angaben in Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) [μ M].

Tabelle 7: EC50-Werte (Angaben in Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) in [μ M]) und relative Toxizität von THFMA, BDDMA and TPGDA für HGF.

Tabelle 8: Messwerte von *A. naeslundii* in KBE/ml auf den untersuchten Materialien

Tabelle 9: Shapiro-Wilk-Test zu den Ergebnissen mit *A. naeslundii*

Tabelle 10: Levene-Test zu den Ergebnissen mit *A. naeslundii*

Tabelle 11: Tukey-HSD zu den Ergebnissen mit *A. naeslundii*

Tabelle 12: Messwerte von *S. mutans* in KBE/ml auf den untersuchten Materialien

Tabelle 13: Shapiro-Wilk-Test zu den Ergebnissen mit *S. mutans*

Tabelle 14: Levene-Test zu den Ergebnissen mit *S. mutans*

9.3. Abkürzungsverzeichnis

3DP	Inkjet-Based System
A. naeslundii	Actinomyces naeslundii
BDDMA	1,4-Butanediol dimethacrylat
BHT	2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenon
BP	Biphenyl
BPE	Phenyl benzoate
BPO	Benzoylperoxyd
CAD	Computer-Aided-Design
CAM	Computer-Aided-Manufacturing
CHX	Chlorhexidindigluconat
CT	Computertomografie
DLP	Digital Light Processing
DBP	Dibenzoylperoxid
DMEM	Dulbecco's modified eagle's Medium
EC ₅₀	<i>engl.</i> effective concentration
EGDMA	Ethylenglykoldimethacrylat
EMA	Ethylmethacrylat
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
FDM	Fused Deposition Modelling
FFF	Fused Filament Fabrication
GC	Gaschromatografie
HEMA	Hydroxyethylmethacrylat
HGF	humane Gingivafibroblasten
H ₂ O	Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatografie (<i>engl.</i> high performance liquid chromatography)
HPMA	3-Hydroxypropylmethacrylate
KBE	kolonienbildende Einheit(en)
MeOH	Methanol
MMA	Methylmethacrylat
MRT	Magnetresonanztomografie

MS	Massenspektrometrie
PEMA	Polyethylmethacrylat
PMMA	Polymethylmethacrylat
RP	Rapid Prototyping
SFE	freie Oberflächenenergie (engl. surface free energy)
SLA/SL	Stereolithographie
SLM	Selektiv Laser Melting
SLS	selektives Lasersintern
S. mitis	Streptococcus mitis
S. mutans	Streptococcus mutans
S. oralis	Streptococcus oralis
SR	Oberflächenrauigkeit (engl. surface roughness)
S. sanguis	Streptococcus sanguis
STL	Standard Transformation/Tesselation Language
TEGDMA	Triethylenglykoldimethacrylat
THFMA	Tetrahydrofurfurylmethacrylat
TinP	2-(2'-Hydroxy-5'-methylphenyl)benzotriazol, Tinuvin P
TMPTMA	Trimethylopropantrimethacrylat
TPGDA	(1-methyl-1,2-ethanediyl)bis[oxy(methyl-2,1-ethanediyl)]diacrylate
UDMA	Urethandimethacrylat
UV	ultraviolet Licht

9.4. Politurprotokoll

Der Poliervorgang wurde wie folgt durchgeführt:

1. Schmirgeln mit Korund-Schleifpapier:
 - Erster Schritt: Körnung 320 µm
 - Zweiter Schritt: Körnung 400 µm

2. Gummieren mit Kunststoff-Polierern (3-stufig):
 - 3-stufiges Kunststoff-Polierer-Set, Best.-Nr.: 9603, 9641, 9644 (Komet Dental, Gebr. Brasseler GmbH & Co. KG, Lemgo, D)

3. Vorpolitur mit Ziegenhaarbürsten und Bimssteinmehl:
 - Ziegenhaarbürsten weiß, Polirapid, 48 mm, Best. Nr.: 52766 (Nordwest Dental GmbH & Co. KG (NWD), Münster, D)
 - Bimssteinpulver Polibims, (Benzer-Dental AG, Zürich, CH)

4. Hochglanzpolitur mit Hochglanzpolierpaste und Woll-Schwabbel:
 - Hochglanzpolierpaste Abraso-Starglanz asg, Best. Nr.: 520 0016 3 (Bredent medical GmbH & Co.KG, Senden, D)
 - Hochglanz-Nesselschwabbel, Polirapid, 100 mm, Best. Nr.: 60103 (NWD)

Danksagung

Abschließend möchte ich die Möglichkeit ergreifen, mich bei allen Menschen zu bedanken die mich bei der Erstellung meiner Arbeit unterstützend begleitet haben.

Mein Dank richtet sich zunächst an Herrn Prof. Dr. med. dent. Daniel Edelhoff, Direktor der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik der Universität München, für die Bereitstellung der klinischen Forschungsräume und damit die Ermöglichung dieser Studie.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. dent. Jan-Frederik GÜth für die Überlassung des Dissertationsthemas, für die höchst engagierte Betreuung und stetige Motivation und Förderung.

Bei Herrn Dr. Christof Högg möchte ich mich für die sehr tatkräftige und kompetente Betreuung im Bereich der Planung und Durchführung der praktischen Untersuchung im Bereich der Elutionsversuche sowie bei der Einordnung der gewonnenen Ergebnisse bedanken.

Bedanken will ich mich auch bei Herrn Dr. med. dent. Maximilian Kollmuß für die großartige Betreuung im Bereich der Biofilm-Versuche und die Hilfe in der statistischen Auswertung.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Josef Schweiger M. Sc. für Hilfe und Betreuung im Bereich der zahntechnischen Fertigung und Bearbeitung.

Bei der SHERA Werkstoff-Technologie GmbH & Co. KG bedanke ich mich für die freundliche Bereitstellung des Druckers und der untersuchten Materialien.

Zu guter Letzt bedanke ich mich von Herzen für die stets große seelische und moralische Unterstützung bei meiner Freundin Lisa, meinen Eltern Daniel und Ulrike und meinen Geschwistern Erik und Hanna.

Publikationsliste

Wedekind L, Güth JF, Schweiger J, Kollmuss M, Reichl FX, Edelhoff D, Högg C: **Elution behavior of a 3D-printed, milled and conventional resin-based occlusal splint material.** Dent Mater 2021, 37(4):701-710

Eidesstattliche Versicherung

Wedekind, Lennart Paul

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Untersuchung zum Elutionsverhalten und Bakterienwachstum von additiv, subtraktiv und klassisch zu verarbeitenden PMMA-Schienenmaterialien“

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

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

Köln, 02.08.2023

Lennart Paul Wedekind
.....