

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

und dem
Walther-Straub-Institut für Pharmakologie
und Toxikologie
Institut der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

**Antioxidantien als neuartige dentale Kompositkomponente und
intranukleäre Zellaufnahme und Toxizität von Titandioxid- und
Zirkonoxid-Partikeln sowie bakterielle Adhäsion auf dentalen Titan-
und Zirkonoxid-Implantaten**

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

vorgelegt von
Julia Dhein
aus München

Jahr
2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr.rer.nat Dr.med Franz- Xaver Reichl
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Dipl.Ing (FH) Bogna Stawarczyk PD Dr. rer. nat. Uwe Baumert
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. rer.hum.biol. Christof Högg
Dekan:	Prof. Dr. med.Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	20. Dezember 2023

Für Papa

„...bis zum Himmel und eine Toastbrotsscheibe.“

1 Affidavit



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Dhein, Julia

Name, Vorname

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

Antioxidantien als neuartige dentale Kompositkomponente und intranukleäre Zellaufnahme und Toxizität von Titandioxid- und Zirkonoxid-Partikeln sowie bakterielle Adhäsion auf dentalen Titan- und Zirkonoxid-Implantaten

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

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

München, den 22.12.2023

Julia Dhein

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Einleitende Zusammenfassung der schriftlichen, kumulativen Dissertation

gemäß § 4a der Promotionsordnung der medizinischen Fakultät der Ludwig-
Maximilians-Universität München vom 1. Juni 1983 in der zehnten Änderungssatzung
vom 6. Juli 2012

2 Inhaltsverzeichnis

1 AFFIDAVIT	4
2 INHALTSVERZEICHNIS	6
3 ABKÜRZUNGEN.....	7
4 PUBLIKATIONSLISTE	8
5 BEITRAG ZU DEN VERÖFFENTLICHUNGEN	9
5.1 ANTIOXIDANTIEN ALS NEUARTIGE DENTALHARZ-KOMPOSIT-KOMPONENTE: EINFLUSS AUF ELUTION UND UMWANDLUNGSGRAD	9
5.2 INTRANUKLEÄRE ZELLAUFNAHME UND TOXIZITÄT VON TITANDIOXID- UND ZIRKONOXID-PARTIKELN SOWIE BAKTERIELLE ADHÄSION AUF DENTALEN TITAN- UND ZIRKONOXID-IMPLANTATEN	9
6 BESTÄTIGUNG DER COAUTOREN	10
7 EINLEITUNG.....	11
8 MATERIAL UND METHODEN.....	15
8.1 ANTIOXIDANTIEN ALS NEUARTIGE DENTALHARZ-KOMPOSIT-KOMPONENTE: EINFLUSS AUF ELUTION UND UMWANDLUNGSGRAD	15
8.2 INTRANUKLEÄRE ZELLAUFNAHME UND TOXIZITÄT VON TITANDIOXID- UND ZIRKONOXID-PARTIKELN SOWIE BAKTERIELLE ADHÄSION AUF DENTALEN TITAN- UND ZIRKONOXID-IMPLANTATEN	15
9 ERGEBNISSE.....	16
9.1 ANTIOXIDANTIEN ALS NEUARTIGE DENTALHARZ-KOMPOSIT-KOMPONENTE: EINFLUSS AUF ELUTION UND UMWANDLUNGSGRAD	16
9.1.1 HPLC Analyse	16
9.1.2 GC/MS Analyse.....	17
9.1.3 DC.....	17
9.2 INTRANUKLEÄRE ZELLAUFNAHME UND TOXIZITÄT VON TITANDIOXID- UND ZIRKONOXID-PARTIKELN SOWIE BAKTERIELLE ADHÄSION AUF DENTALEN TITAN- UND ZIRKONOXID-IMPLANTATEN	18
9.2.1 PARTIKELGRÖßENMESSUNG	18
9.2.2 Zytotoxizität: XTT-Viabilitätsassay.....	18
9.2.3 DNA-Schäden.....	18
9.2.4 Intranukleäre Zellaufnahme, analysiert durch LSCM	18
9.2.5 Bakterielle Adhäsion	18
10. ZUSAMMENFASSUNG/SYNOPSIS	20
10.1 ZUSAMMENFASSUNG	20
10.2.1 <i>Antioxidantien als neuartige Dentalharz-Komposit-Komponente: Einfluss auf Elution und Umwandlungsgrad</i>	20
10.2.2 <i>Intranukleäre Zellaufnahme und Toxizität von Titandioxid- und Zirkonoxid-Partikeln sowie bakterielle Adhäsion auf dentalen Titan- und Zirkonoxid-Implantaten</i>	22
10.2 SYNOPSIS	25
10.1.1 <i>Antioxidants as a novel dental resin-composite component: Effect on elution and degree of conversion</i>	25
10.1.2 <i>Intranuclear cell uptake and toxicity of titanium dioxide and zirconia particles as well as bacterial adhesion on dental titanium- and zirconia-implants</i>	27
11. PUBLIKATION 1	29
12. PUBLIKATION 2	42
13. LITERATURVERZEICHNIS	55
14. DANKSAGUNG	59
15. CURRICULUM VITAE	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

3 Abkürzungen

A.a.	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
Asc	Ascorbic acid
BHT	Butylhydroxytoluol
Bis-GMA	Bis-Glycidylmethacrylat
CF	Koffein
CQ	Campherchinon
CSA	Camphersulfonsäure
DC	Degree of conversion
DDHT	Diethyl-2,5-dihydroxyterephthalat
DMABEE	4-Dimethylamino-benzoesäure-ethylester
DNA-DSBs	DNA Doppelstrangbrüche
EC₅₀	mittlere effektive Konzentration
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer
GC/MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
HEMA	2-Hydroxyethylmethacrylat
HMBP	2-Hydroxy-4-methoxy-benzophenon
HPLC/UV/DAD	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie/UV-Diodenarray-Detektion
HPLC/FLD	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie/Fluoreszenzdetektion
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LOQ	Quantifizierungsgrenze
LSCM	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
MPs	Mikropartikel
NAC	Acetylcystein
NPs	Nanopartikel
OTM	Olive tail moment
P.i.	Prevotella intermedia
P.g.	Porphyromonas gingivalis
PDL-hTERT cells	Periodontal ligament with lentiviral gene transfer of human telomerase reverse transcriptase cells
PMMA	Polymethylmethacrylat
SEM	Rasterelektronenmikroskop
TEGDMA	Triethylenglycoldimethacrylat
Ti	Titan
TinP	2-(2-Hydroxy-5-methylphenyl)-benzotriazol
TiO₂	Titandioxid
VLE	Very low endotoxin
Zr	Zirkonium
ZrO₂	Zirkoniumdioxid

4 Publikationsliste

Yang, Y.; Reichl, F.X.; Ilie, N.; Shi, J.W.; Dhein, J.; Hickel, R.; Högg, C. *Antioxidants as a novel dental resin-composite component: Effect on elution and degree of conversion*. Dent. Mater. 2019, 35, 650–661.

Dhein, J.; Haller, C.; Reichl, F.-X.; Milz, S.; Hickel, R.; Kollmuss, M.; Högg, C. *Intranuclear cell uptake and toxicity of titanium dioxide and zirconia particles as well as bacterial adhesion on dental titanium- and zirconia-implants*. Dent. Mater. 2022, 38, 517-528.

5 Beitrag zu den Veröffentlichungen

Diese Dissertation enthält zwei Publikationen, die beide von Prof. Dr. Dr. F.-X. Reichl während der gesamten Laufzeit betreut wurden. Die Projektleitung lag in den Händen von PD Dr. Christof Högg. Nachfolgend wird der Beitrag der Autorin zu den in der Zeitschrift "Dental Materials" erschienenen Veröffentlichungen vorgestellt.

5.1 Antioxidantien als neuartige Dentalharz-Komposit-Komponente: Einfluss auf Elution und Umwandlungsgrad

Das Ziel dieser Studie war es, Asc oder NAC als neuartige Komponente von lighthärtenden Dentalkompositen auf Methacrylatbasis hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf DC, Elution von Kompositkomponenten und Freisetzung von Asc und NAC zu untersuchen. Die Autorin der vorliegenden Dissertation half bei der Optimierung der richtigen Mischungen für die Proben und führte Probenvorbereitungen für die HPLC- und GC/MS-Analyse durch. Darüber hinaus führte die Autorin die Experimente, wie in Material und Methoden beschrieben, durch. Die Autorin hat auch bei der Durchführung der Analysen und der Auswertung der Daten mitgewirkt. Schließlich half die Autorin dieser Dissertation bei der Bearbeitung des Manuskripts.

5.2 Intranukleäre Zellaufnahme und Toxizität von Titandioxid- und Zirkonoxid-Partikeln sowie bakterielle Adhäsion auf dentalen Titan- und Zirkonoxid-Implantaten

Ziel dieser Studie war es, die Toxizität und intranukleäre Aufnahme von TiO_2 -MPs, TiO_2 -NPs, ZrO_2 -MPs und ZrO_2 -NPs in PDL-Zellen, sowie die Adhäsion von P.g., P.i. und A.a. auf Ti- und ZrO_2 -Implantaten. Die Autorin gestaltete die Studie, indem sie die zu verwendenden Partikel, Bakterien und Implantate, basierend auf ihren Eigenschaften, passend zum Studiendesign auswählte. Darüber hinaus optimierte die Autorin die experimentellen Protokolle und führte die Experimente, wie im Abschnitt Material & Methoden beschrieben, durch. Die Verantwortung für die Pflege, Auswertung und Analyse der Daten lag bei der Autorin, ebenso die statistische Auswertung. Abschließend verfasste die Autorin das Manuskript, überarbeitete es, reichte es zur Veröffentlichung ein und integrierte die Anmerkungen des Gutachters zur Veröffentlichung in der Zeitschrift.

6 Bestätigung der Coautoren

Die Bestätigung der Co-Autoren wird separat eingereicht.

7 Einleitung

Heutzutage sind Zahnimplantate sowie Kompositfüllungen aus der modernen Zahnheilkunde nicht mehr wegzudenken. Die ständig steigenden ästhetischen Ansprüche der Gesellschaft schaffen Raum für kontinuierliche Weiterentwicklungen und Verbesserungen bestehender Dentalmaterialien und Arbeitstechniken.

In der modernen Zahnarztpraxis gibt es kaum ein Patientenanliegen, welches nicht optisch ansprechend gelöst werden kann.

In der konservierenden Zahnheilkunde sind dentale Kunststoffkomposite das Material der Wahl, wenn es um die Versorgung kleinerer kariöser Läsionen geht. Durch die Mehrschichttechnik und ein breites Spektrum an Farben der verschiedenen Hersteller lässt sich in nahezu allen Fällen ein hochästhetisches Ergebnis erzielen.

In der modernen prothetischen Zahnheilkunde werden Implantate bei Patienten, sowie Behandlern, immer beliebter. Sie stellen eine hochästhetische und dauerhaft verankerte Versorgung von Zahnlücken dar, ohne dass die Nachbarzähne präpariert werden müssen.

Seit Bowen 1962 Bis-GMA als neuen Bestandteil dentaler Kunststoffkomposite einführte, haben Kunststofffüllungen nach und nach jene aus Amalgam ersetzt, welches zuvor das meist verwendete Material darstellte [1]. Dentale Amalgame sind metallische Legierungen [2]. Diese waren lange Zeit aufgrund ihrer gut dokumentierten Erfolgsraten kostengünstige Restaurationsmaterialien für Seitenzahnfüllungen. Die Verwendung von Amalgam in der Zahnmedizin ist jedoch wegen seines unästhetischen silbergrauen Aussehens und Bedenken hinsichtlich des Quecksilbergehalts immer weiter zurückgegangen [3, 4]. Demgegenüber hat sich die Indikation für dentale Kunststoffkomposite immer weiter entwickelt: Von anfänglich reinen Frontzahnfüllungen, über begrenzte Seitenzahnrestaurationen, bis hin zu belastbaren Seitenzahnrestaurationen, die die Amalgamfüllungen vollständig ersetzen können [5]. Dies ist vor allem auf die stetige Verbesserung der mechanischen Eigenschaften von dentalen Kunststoffkompositen zurückzuführen: Neben einer Reduzierung von Schrumpfung und Polymerisationsstress, wurden Verschleiß- und Bruchfestigkeit gesteigert, sowie der Randschluss verbessert [6-9]. Ebenso unterliegen die optischen Eigenschaften und die Handhabung einer ständigen Verbesserung [10, 11]. Dennoch werden immer wieder Bedenken hinsichtlich der potenziellen Toxizität von Verbundharzmaterialien geäußert.

Lichthärtende Kunststoff-Komposite bestehen aus verschiedenen (Co-)Monomeren und Additiven [12]. Aufgrund der unvollständigen Polymerisation von Dentalkompositen können die restlichen (Co-)Monomere und Zusatzstoffe auslaugbar sein [13]. Sie können über die Dentinkanälchen die Aktivität der Pulpazellen beeinträchtigen oder durch die Nahrungsaufnahme in den Darm und von dort in den Kreislauf und in die Organe gelangen [14, 15]. Darüber hinaus können durch Methacrylate allergische Reaktionen wie Asthma und Kontaktdermatitis ausgelöst werden [16].

Die Toxizität von (Co-)Monomeren wie HEMA und TEGDMA wurde bereits in vielen Studien nachgewiesen [17, 18]. Diese (Co-)Monomere können aus unvollständig polymerisierten Harzen herausgelöst werden und DNA-DSBs induzieren [14], die zu karzinogenen und mutagenen Auswirkungen führen können und als die toxischste Art von DNA-Läsionen gelten [19].

Es konnte bereits bewiesen werden, dass die Zugabe der Antioxidantien Asc und NAC die zytotoxischen Effekte und DNA-DSBs verringern kann [20-22].

Eine frühere Studie zeigt, dass die Einarbeitung von NAC in selbsthärtendes PMMA die DC im Vergleich zu unbehandeltem PMMA reduzierte [23].

Die DC steht in direktem Zusammenhang mit der Freisetzung von Kompositkomponenten: Je niedriger der Wert ist, desto mehr Kompositkomponenten können freigesetzt werden [24].

Die Wirkung auf die DC und die Elution nach Einarbeitung von Asc und NAC in lichthärtende Dentalkompositmaterialien auf Methacrylatbasis ist jedoch noch unbekannt. Folglich wurde in dieser Studie die Wirkung auf die DC und die Elution von Kompositkomponenten nach Zugabe von Asc und NAC als neuartige Komponenten in lichthärtenden Dentalkompositen untersucht. Zudem wurden die Mischungen auf ihre Freisetzung von Asc und NAC erforscht.

Diese Arbeit wurde in folgender Publikation illustriert:

Yang, Y.; Reichl, F.X.; Ilie, N.; Shi, J.W.; Dhein, J.; Hickel, R.; Högg, C. *Antioxidants as a novel dental resin-composite component: Effect on elution and degree of conversion*. Dent. Mater. 2019, 35, 650–661.

In den letzten 60 Jahren hat sich die dentale Implantologie von einer neuen, experimentellen Methode zu einem nicht mehr wegzudenkenden, vorhersagbaren Zweig der prothetischen Zahnmedizin entwickelt. Nachdem Brånenmark 1965 die ersten dentalen Titanimplantate bei einem Patienten gesetzt, sowie präklinische und klinische Studien zu diesem Thema

durchgeführt hat [25], begann eine Zeit großer Weiterentwicklungen und Fortschritte auf dem Gebiet der dentalen Implantologie.

Ti-Implantate haben sich aufgrund ihrer hohen Biokompatibilität, Korrosionsbeständigkeit und besonders guten mechanischen Eigenschaften in der dentalen Implantologie etabliert [26-28]. Diese positiven Eigenschaften werden durch die TiO₂-Schicht auf jedem Implantat verstärkt [29-31], welche durch die Passivierung des Ti entsteht [29, 30].

Die gestiegene Nachfrage nach einem metallfreien Restaurationsmaterial hat nicht nur in der konventionellen prothetischen Zahnheilkunde, sondern auch in der Implantologie, die Forschung und Entwicklung immer weiter vorangetrieben.

Als neuere Alternative zu Titanimplantaten stehen ZrO₂-Implantate zur Verfügung, die eine geringere Wärmeleitfähigkeit und ein geringeres Elastizitätsmodul als Titanimplantate aufweisen [32, 33]. Als unverarbeitetes Material hat ZrO₂ eine geringe Plaqueaffinität, ist zudem gut zu verarbeiten und hat eine zahnähnliche Farbe [34, 35].

Eine kürzlich durchgeführte Studie von Straumann über dentale Ti-Implantate ergab, dass biologische Komplikationen wie Mukositis oder Periimplantitis oft die Ursache für Implantatverluste sind [36]. Die Versagensrate bei 55 Patienten (mit insgesamt 131 Implantaten) im Zeitraum von 10-16 Jahren nach Insertion liegt bei 17,06 %, wobei technische und biologische Komplikationen (48,03 % bis 16 Jahre) häufig auftraten [36]. Über die Ursache des Implantatversagens bei ZrO₂-Implantaten können noch keine verlässlichen Aussagen getroffen werden, da klinische Langzeitstudien bis zum heutigen Zeitpunkt fehlen [37]. In einer aktuellen Metaanalyse beträgt die Implantatverlustrate von ZrO₂-Implantaten 12 Monate nach dem Einsetzen 4,4 % [38].

Zu den möglichen biologischen Komplikationen zählt die Periimplantitis [39], die einen entzündlichen Prozess im Knochen beschreibt und somit zum Verlust des Implantats führen kann [40, 41]. Die genaue Ätiologie der Periimplantitis wird derzeit noch in der Literatur diskutiert [42, 43]. Bei klinischen Anzeichen einer Periimplantitis findet sich jedoch häufig ein mikrobieller Biofilm (Plaque) um das Implantat herum, der eine hohe Prävalenz von Parodontitis verursachenden Stämmen aufweist [44-51]. Bisherige Studien zum Bakterienwachstum auf Abutments und Scheiben aus Ti und/oder ZrO₂ liefern derzeit nur widersprüchliche Ergebnisse, ob und auf welchem Material die Bakterienadhäsion höher ist [52, 53]. Darüber hinaus gibt es bisher keine Studien, die die bakterielle Anhaftung von Periimplantitis auslösenden Bakterien an Implantatschrauben untersucht haben.

Die Oberflächenstruktur von Implantatgewinden führt zu einer größeren Oberfläche und damit zu einer höheren möglichen Bakterienadhäsion. Folglich sind Experimente mit Implantatschrauben repräsentativer für die physiologische Situation.

In unserer früheren Studie konnte bereits gezeigt werden, dass Ti- und Zr-Partikel von Ti/ZrO₂-Implantaten in das umgebende Gewebe gelangen können [54, 55]. Folglich sollte untersucht werden, ob biologische Komplikationen durch Bakterien oder gar durch Partikel, die von den Implantaten ins Gewebe gelangen, ausgelöst werden. Darüber hinaus wurden die Zytotoxizität und Genotoxizität von Ti-MPs, Ti-NPs, ZrO₂-MPs und ZrO₂-NPs, sowie die zelluläre Aufnahme in PDL-hTERT-Zellen untersucht [55, 56]. Wie zuvor beschrieben, sind Ti-Partikel an den Kontaktflächen zwischen Implantatschraube und Gewebe üblicherweise mit einer TiO₂-Schicht bedeckt [29, 30]. Folglich sollten Partikel, die von Ti-Implantaten freigesetzt werden, eigentlich TiO₂-Partikel oder Ti-Partikel sein, die mit einer TiO₂-Schicht ummantelt sind.

Es liegen keine Daten zur Zytotoxizität und Genotoxizität von TiO₂-Partikeln in PDL-Zellen vor. Darüber hinaus sind keine Daten zur intranukleären Zellaufnahme von TiO₂- und ZrO₂-Partikeln in PDL-Zellen, sowie zur bakteriellen Adhäsion an TiO₂- und/oder ZrO₂-Implantatschrauben verfügbar.

Ziel der zweiten vorliegenden Studie in dieser Arbeit ist es, die Toxizität und intranukleäre Aufnahme in PDL-Zellen von TiO₂-MPs, TiO₂-NPs, ZrO₂-MPs und ZrO₂-NPs zu untersuchen, die von Zahnimplantaten freigesetzt werden können. Ebenso die Adhäsion auf Ti- und ZrO₂-Implantaten von relevanten humanen anaeroben Bakterien, die in der Mundhöhle zu finden sind.

Diese Arbeit wurde in der folgenden Publikation illustriert: Dhein, J.; Haller, C.; Reichl, F.-X.; Milz, S.; Hickel, R.; Kollmuss, M.; Högg, C. *Intranuclear cell uptake and toxicity of titanium dioxide and zirconia particles as well as bacterial adhesion on dental titanium- and zirconia-implants*. Dental Materials,

8 Material und Methoden

8.1 Antioxidantien als neuartige Dentalharz-Komposit-Komponente: Einfluss auf Elution und Umwandlungsgrad

In die Komposite Venus® (Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland), Grandio® (VOCO GmbH, Cuxhaven, Deutschland) und Filtek™ Supreme XTE (3M ESPE, Seefeld, Deutschland) wurden jeweils 1 Gew.%, 0,1 Gew.%, 0,01 Gew.% oder 0 Gew.% (Kontrollgruppe) von fein gemahlenem Puder von Asc (Sigma-Aldrich, China) oder NAC (Sigma-Aldrich, China) eingearbeitet und polymerisiert. Anschließend wurden die Proben in Methanol (GC Ultra Grade, RATISOLV® ≥99.9%, Roth, Karlsruhe, Deutschland) oder Wasser (LC-MS-Grade, ROTISOLV®, Roth, Karlsruhe, Deutschland) getaucht und CF-Lösung als interner Standard zugegeben.

Die Qualifizierung und Quantifizierung der Eluate erfolgte mittels GC/MS. Die Asc-Konzentrationen in den Eluaten der Komposit-Asc-Mischungen wurden durch HPLC/DAD/UV nach 5 min, 1 Tag und 5 Tagen Inkubationszeit quantifiziert. Die NAC-Konzentrationen in den Eluaten von Komposit-NAC-Mischungen wurden durch HPLC/FLD nach 5-minütiger, 1-tägiger und 7-tägiger Inkubation quantifiziert. Die DC von Komposit-Antioxidans-Mischungen wurde in Echtzeit mit FTIR gemessen.

8.2 Intranukleäre Zellaufnahme und Toxizität von Titandioxid- und Zirkonoxid-Partikeln sowie bakterielle Adhäsion auf dentalen Titan- und Zirkonoxid-Implantaten

PDL-hTERT, erhalten von der Forschungsgruppe Experimentelle Chirurgie und Regenerative Medizin, Abteilung Chirurgie, LMU, München, Deutschland, wurden bei 37 °C und 100% Luftfeuchtigkeit mit 5% CO₂ kultiviert. Das VLE Dulbecco's Modified Eagle's Medium wurde mit D-Glucose (Biochrom, Berlin, Deutschland), Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland) und fetalem Kälber Serum (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) ergänzt. Die Größe der TiO₂-MPs, TiO₂-NPs, ZrO₂-MPs and ZrO₂-NPs (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) wurde mit dem SEM Zeiss Supra 55 VP (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bestimmt. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde durch einen auf XTT basierenden Assay untersucht. DNA-Schäden durch TiO₂-MPs und TiO₂-NPs wurden mittels Comet Assay bestimmt. Die intranukleäre Aufnahme von TiO₂-MPs, TiO₂-NPs, ZrO₂-MPs und ZrO₂-NPs in PDL Zellen wurde mittels LSCM (LSM 880 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)) festgestellt. Ti-Implantatschrauben und ZrO₂-Implantatschrauben wurden von der Straumann AG, Basel,

Schweiz erhalten. Die durchschnittliche Oberfläche der Implantatgewinde wurde mit KaVo Everest Scan (KaVo, Biberach, Deutschland) gemessen. Die Bakterien P.g., P.i. and A.a. wurden von der Abteilung für Zahnerhaltung und Parodontologie der LMU, München, Deutschland zur Verfügung gestellt und auf Schaedler Agar kultiviert. Um die bakterielle Adhäsion zu untersuchen, wurden die Bakterienstämme (P.g., P.i. and A.a.) separat im Medium (sterile Brain Heart Infusion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit einer Ti-Implantatschraube oder einer ZrO₂-Implantatschraube kultiviert. Nach 5 Tagen wurden sichtbare Kolonien ausgezählt.

9 Ergebnisse

9.1 Antioxidantien als neuartige Dentalharz-Komposit-Komponente: Einfluss auf Elution und Umwandlungsgrad

Aufgrund von Polymerisation ohne Photoinitiation der Proben sind keine Daten für HPLC-, GC/MS- und DC-Ergebnisse von Venus®-1 Gew.% NAC verfügbar.

9.1.1 HPLC Analyse

HPLC/UV/DAD:

Asc wurde in Methanol- und Wassereluat von allen drei untersuchten Kompositen nachgewiesen, die 1 Gew.-% und 0,1 Gew.-% Asc enthielten. Im Gegensatz dazu waren die Konzentrationen von Asc in den Eluat von Kompositen, die 0,01 Gew.-% enthielten, immer niedriger als die LOQ. Die höchste Konzentration an eluiertem Asc, die in dieser Studie gefunden wurde, war in Venus®-1 Gew.-% Asc-Mischung nachzuweisen: Die Konzentration stieg von 185,05 µM (5 min; Methanol) auf 313,98 µM (1 Tag; Methanol). In Grandio®-Asc und Filtek™ Supreme XTE-Asc-Mischungen nahm die Konzentration von eluiertem Asc bei steigender Elutionszeit ab (Methanol und Wasser).

HPLC/UV:

NAC konnte in allen Eluat von Komposit-NAC-Mischungen nachgewiesen werden, außer bei Venus®, nach Einarbeitung von 1 Gew.-% NAC.

9.1.2 GC/MS Analyse

In den untersuchten Kompositeluaten wurden insgesamt 9 Substanzen nachgewiesen.

In den Eluaten der Venus®-Asc-Mischung wurden CQ, CSA, BHT, TEGDMA, DDHT und HMBP nachgewiesen. Die TEGDMA-Elution nahm bei 1, 0,1 und 0,01 Gew.-% des eingearbeiteten Asc nach 1- und 7-tägiger Elution in Methanol und Wasser signifikant zu.

In den Eluaten der Grandio®-Asc-Mischung wurden HEMA, CQ, CSA, BHT, DMABEE, TEGDMA und TinP nachgewiesen. Die HEMA-Elution verringerte sich signifikant bei 1, 0,1 und 0,01 Gew.-% eingearbeitetem Asc nach 1- und 7-tägiger Elution in Methanol und Wasser. TEGDMA erhöhte sich signifikant bei 1 Gew.-% Asc-Beimischung nach 1- und 7-tägiger Elution in Methanol und Wasser und 0,01 Gew.-% Asc-Beimischung nach 1-tägiger Methanolelution. In den Eluaten der Filtek™ Supreme XTE-Asc-Mischung wurden CQ, CSA, BHT und TEGDMA nachgewiesen. Die TEGDMA-Elution nahm bei 0,01 Gew.-% eingearbeitetem Asc nach 1-tägiger Elution in Wasser und bei 1 Gew.-% eingearbeitetem Asc nach 7-tägiger Elution in Wasser signifikant zu. In den Eluaten der Venus®-NAC-Mischung wurden CQ, CSA, BHT, TEGDMA, DDHT und HMBP nachgewiesen. Die TEGDMA-Elution nahm bei 0,1 Gew.-% eingearbeitetem NAC nach 1-tägiger Elution in Wasser und 1- und 7-tägiger Elution in Methanol signifikant zu.

In den Eluaten der Grandio®-NAC-Mischungen wurden HEMA, CQ, CSA, BHT, DMABEE, TEGDMA und TinP nachgewiesen. Die HEMA-Elution nahm bei 0,1 Gew.-% eingearbeitetem NAC nach 1 Tag Elution in Methanol, 1 Gew.-% eingearbeitetem NAC nach 1 und 7 Tagen in Wasser und 0,01 Gew.-% eingearbeitetem NAC nach 7 Tagen in Methanol signifikant zu. Die TEGDMA-Elution verringerte sich signifikant bei 1 Gew.-% eingearbeitetem NAC nach 7-tägiger Elution in Methanol. Ein signifikanter Anstieg der TEGDMA-Elution wurde für die Einarbeitung von 1 und 0,1 Gew.-% NAC nach 1-tägiger Elution in Wasser und für die Einarbeitung von 1 Gew.-% NAC nach 7-tägiger Elution in Wasser gefunden.

In den Eluaten der Filtek™ Supreme XTE-NAC-Mischungen wurden CQ, CSA, BHT und TEGDMA nachgewiesen. Die TEGDMA-Elution nahm bei 0,1 Gew.-% eingearbeitetem NAC nach 7-tägiger Elution in Wasser signifikant zu.

9.1.3 DC

Bei allen Komposit-Asc-Mischungen war die DC im Vergleich zur Kontrolle signifikant verringert, mit Ausnahme von Venus®-0,01 Gew.-% Asc.

Für die Komposit-NAC-Mischung war die DC von Grandio® mit 1 Gew.-% NAC im Vergleich zur Kontrolle signifikant verringert.

9.2 Intranukleäre Zellaufnahme und Toxizität von Titandioxid- und Zirkonoxid-Partikeln sowie bakterielle Adhäsion auf dentalen Titan- und Zirkonoxid-Implantaten

9.2.1 Partikelgrößenmessung

88 % der TiO₂-MPs wurden mit einer Größe zwischen 50 und 200 nm bestimmt.

99 % der TiO₂-NPs waren kleiner als 100 nm.

9.2.2 Zytotoxizität: XTT-Viabilitätsassay

TiO₂-NPs zeigten ein 6-fach höheres toxisches Potential als TiO₂-MPs.

9.2.3 DNA-Schäden

Lediglich für TiO₂-NPs bei einer Konzentration von 1/10 EC₅₀ wurde eine signifikante Erhöhung des OTM-Wertes im Vergleich zur Kontrolle festgestellt.

9.2.4 Intranukleäre Zellaufnahme, analysiert durch LSCM

TiO₂-MPs, TiO₂-NPs, ZrO₂-MPs und ZrO₂-NPs konnten im Zellkern der untersuchten PDL-Zellen nachgewiesen werden.

Der Prozentsatz der Zellen mit im Zellkern gefundenen TiO₂-NPs stieg signifikant an, wenn die Partikelkonzentration von 0,381 µm auf 0,762 µm erhöht wurde. Darüber hinaus nahm der Anteil der Zellen mit ZrO₂-NPs im Zellkern mit zunehmender Expositionskonzentration zu.

9.2.5 Bakterielle Adhäsion

In dieser Studie wurden Ti-Implantate auf Knochenniveau und ZrO₂-Implantate auf Gewebeniveau verwendet. Daher führten die unterschiedlichen Implantatkonfigurationen zu Unterschieden in der gemessenen durchschnittlichen Gesamtgewindeoberfläche der Implantate:

Messungen der Implantatgewindeoberfläche von Ti-Implantaten ergaben eine durchschnittliche Oberfläche von 112,65 ± 1,66 mm² und eine durchschnittliche Oberfläche von 130,39 ± 1,31 mm² für ZrO₂-Implantate.

Alle untersuchten Bakterien zeigten auf ZrO₂-Implantaten eine signifikant geringere Adhäsion pro mm² als auf Ti-Implantaten. A.a. führte zu einer 0,8-mal geringeren Haftung an ZrO₂-Implantaten als an Ti-Implantaten, P.i. zeigte eine 0,6-mal und P.g. eine 0,1-mal geringere Adhäsion.

10. Zusammenfassung/Synopsis

10.1 Zusammenfassung

In der heutigen Zeit steigt nicht nur der ästhetische Anspruch an dentale Werkstoffe durch die Gesellschaft, sondern auch das Verlangen nach einer hohen Biokompatibilität, sowie einer geringen Toxizität. Sowohl dentinadhäsive Kompositfüllungen in der konservierenden Zahnheilkunde, als auch Implantate im prothetischen Bereich, sind inzwischen Standard in der modernen Zahnarztpraxis.

Jedoch ist bereits gezeigt worden, dass dentale Komposite (Co)monomere und Additive freisetzen [13, 57-59], die sich zytotoxisch, mutagen, teratogen und embryotoxisch auf den Organismus auswirken können [12, 60]. Der Werkstoff Titan, aus dem aktuell die am häufigsten gesetzten Implantate hergestellt werden [61], kann Typ-IV-Überempfindlichkeiten oder Hautempfindlichkeiten auslösen [39, 62].

Allerdings wurde bereits in unseren früheren Studien nachgewiesen, dass die Zugabe von Asc und NAC, die als Radikalfänger gelten [63], zum Zellkulturmedium die Genotoxizität von dentalen (Co)Monomeren und ihren Epoxidmetaboliten reduzieren können [20, 64, 65].

In der ersten Studie wurden Asc oder NAC als neuartige Kompositkomponente in drei verschiedene Komposite (Venus[®], Grandio[®] und Filtek[™] Supreme XTE) eingearbeitet (1, 0,1 und 0,01 Gew.-%) und hinsichtlich ihrer Auswirkung auf DC und Elution von Kompositkomponenten untersucht. Außerdem wurde die Freisetzung von Asc oder NAC aus den Mischungen analysiert. Die ausgewählten Komposite zeigten in früheren Studien bereits eine hohe Freisetzung von Methacrylaten und Additiven [57, 66, 67].

In der zweiten Studie wird die Zytotoxizität und Genotoxizität von TiO₂-MPs und TiO₂-NPs in PDL Zellen und die intranukleäre Aufnahme von TiO₂-MPs, TiO₂-NPs, ZrO₂-MPs und ZrO₂-NPs untersucht. Außerdem wurde die bakterielle Adhäsion an Ti- und ZrO₂-Implantatschrauben betrachtet. Diese Studie stellt eine Folgearbeit zu unseren früheren Studien dar, in denen Zytotoxizität, Genotoxizität und die intranukleäre Aufnahme von MPs und NPs von Ti, also der nicht oxidierten Form, und ZrO₂ untersucht wurden [54-56].

10.2.1 Antioxidantien als neuartige Dentalharz-Komposit-Komponente: Einfluss auf Elution und Umwandlungsgrad

Die signifikant reduzierte DC nach Inkorporation Asc und NAC in die Komposite kann auf die Eigenschaft der Antioxidantien zurückzuführen sein, dass diese initiierende Radikale, wie CQ,

abfangen können [68]. Dies kann folglich aber auch zu einer Unterdrückung der Initiation der Kettenpolymerisation führen.

Eine signifikant niedrigere DC im Vergleich zur Kontrolle wurde für alle untersuchten Komposite mit 1, 0,1 und 0,01 Gew.-% Asc (außer Venus®-0,01 Gew.-% Asc) gefunden. Dahingegen konnte nach Inkorporation von NAC keine signifikante Änderung der DC bei Venus® und Grandio® mit 0,1 Gew.-% und 0,01 Gew.-% NAC und für Filtek™ Supreme XTE mit 1 Gew.-% NAC festgestellt werden. Daraus lässt sich schließen, dass Asc einen höheren Einfluss auf die DC als NAC hat. Asc hat nicht nur eine stärkere Möglichkeit Radikale abzufangen und die Diffusion von Elektronen zu stören, sondern eine weitere mögliche Erklärung kann sein, dass Asc kettenbrechende Eigenschaften besitzt und somit durch freie Radikale vermittelte Kettenreaktionen hemmt [69].

Ein signifikanter Anstieg von TEGDMA in Methanol- und Wassereluat in im Vergleich zur Kontrolle konnte nach Inkorporation von Asc in Venus® (1, 0,1 und 0,01 Gew.-%, 1 Tag/7 Tage) und Grandio® (1 Gew.-%, 1 Tag/7 Tage) und von NAC in Venus® (0,1 Gew.-%, 1 Tag) nachgewiesen werden. Unsere Daten zeigen, dass die Inkorporation von Asc oder NAC die Freisetzung von TEGDMA fördern können und es folglich zu negativen Begleiterscheinungen, wie Methacrylatallergien, geno- bzw. zytotoxische Wirkungen, kommen kann [17, 70].

Jedoch zeigt unsere Studie auch, dass die Einarbeitung von Asc oder NAC in bestimmten Gew.-% die Freisetzung von TEGDMA nicht beeinflussen (z. B. Filtek™ Supreme XTE-1, 0,1 und 0,01 Gew.-% Asc oder NAC 1 und 7 Tage in Methanol). Ebenso konnte eine signifikant reduzierte Freisetzung von TEGDMA nach Inkorporation von NAC in Grandio® (1 Gew.-%, 7 Tage, Methanol) sowie eine signifikant reduzierte Freisetzung von HEMA nach Inkorporation von Asc in Grandio® (1, 0,1, 0,01 Gew.-%, Methanol/Wasser, 1 Tag/7 Tage) festgestellt werden. Eine Erklärung für die geringere eluierbare Menge an TEGDMA oder HEMA kann die Wechselwirkung von Asc oder NAC mit den Kompositkomponenten sein.

In unseren früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die durch dentale (Co-) Monomere und deren Epoxidmetaboliten induzierte Zyto- und Genotoxizität durch Asc und NAC signifikant reduziert werden kann [20, 22, 64, 65]. Eine signifikante Reduktion von DNA-DSBs in HGFs im Vergleich zur Kontrolle konnte bei Konzentrationen von mehr als 50% M Asc oder NAC nachgewiesen werden [64]. In unserer aktuellen Studie wurden in Methanol- und Wassereluat von Venus® -1 Gew.-% Asc, Grandio® - 1 Gew.-% Asc, Filtek™ Supreme XTE-1 Gew.-% Asc und Filtek™ Supreme XTE-1 Gew. % NAC Konzentrationen von über 50µM an Asc

und NAC gefunden. Hieraus kann geschlossen werden, dass jene Komposite, die 1 Gew.-% Asc oder 1 Gew.-% NAC enthalten, eine ausreichende Menge an eluierten Antioxidantien enthalten, um die Metabolisierungszwischenprodukte und Epoxidmetaboliten von dentalen Komposit(co-)monomeren und somit die Genotoxizität in HGFs reduzieren können.

Jedoch zeigte die Inkorporation von 1 Gew.-% Asc in Venus[®], Grandio[®] und Filtek[™] Supreme XTE eine signifikant niedrigere DC sowie eine signifikant erhöhte Elution von TEGDMA. Einzig die Einarbeitung von 1 Gew.-% NAC in Filtek[™] Supreme XTE ergab keine signifikante Veränderung in der DC, sowie in der Elution der Kompositkomponenten und liefert eine ausreichende Menge an Antioxidans um die Toxizität zu reduzieren. Hieraus lässt sich zusammenfassend schließen, dass die Inkorporation von NAC (1 Gew.-%) in Filtek[™] Supreme XTE als neuartige Kompositkomponente ein vorteilhafter Schritt zur Reduzierung von dentalen (Co-)monomeren induzierten DNA-DSBs sein kann.

10.2.2 Intranukleäre Zellaufnahme und Toxizität von Titandioxid- und Zirkonoxid-Partikeln sowie bakterielle Adhäsion auf dentalen Titan- und Zirkonoxid-Implantaten

Es konnte nachgewiesen werden, dass TiO₂-NPs (15 mg/ml) eine 6-mal höhere Zytotoxizität in PDL-Zellen induzieren als TiO₂-MPs (92 mg/ml). Im Vergleich zu den Werten aus unserer vorangegangenen Studie über Ti-MPs und -NPs [56], ist der EC₅₀-Wert von Ti-MPs mehr als das 11-fache niedriger als der Wert von TiO₂-MPs und der EC₅₀-Wert von Ti-NPs beträgt etwa 5-mal weniger als der Wert von TiO₂-NPs.

In unserer früheren Studie konnten ZrO₂-Partikel im Kieferknochen, der direkt um das Implantat liegt, nachgewiesen werden [55]. Ebenso wurde herausgefunden, dass der EC₅₀-Wert von ZrO₂-NPs (14 mg/ml) in PDL-Zellen 6-mal niedriger ist, als der EC₅₀-Wert von ZrO₂-MPs (81 mg/ml) [55]. Somit lässt sich, unter Berücksichtigung der Standardabweichung, feststellen, dass die Zytotoxizität von TiO₂-MPs und ZrO₂-MPs einerseits und TiO₂-NPs und ZrO₂-MPs andererseits in etwa gleich groß einzustufen sind.

Die oxidierte Form der Ti-Partikel (TiO₂-MPs/-NPs) sind im Vergleich zu den elementaren Ti-NPs weniger toxisch. Ti-NPs, TiO₂-NPs und ZrO₂-NPs sind im Vergleich zur den korrespondierenden MPs zytotoxischer.

Zusammenfassend, gemäß unseren vorangegangenen Studien [55, 56] und dieser Studie, lässt sich folgende Reihenfolge der Zytotoxizität der Partikel aufstellen: Ti-NPs (3 mg/ml) > ZrO₂ -

NPs (14 mg/ml) \approx TiO₂-NPs (15 mg/ml) > ZrO₂-MPs (81 mg/ml) \approx TiO₂-MPs (92 mg/ml) > Ti-MPs (> 999 mg/ml).

Während keine der untersuchten TiO₂-MP Konzentrationen einen signifikanten Anstieg des OTM-Werts auslöste, löste eine Konzentration von 1523 µg/ml TiO₂-NPs einen etwa 3-fach erhöhten OTM-Wert im Vergleich zur Negativkontrolle aus. In unserer vorangegangenen Studie löste schon eine Konzentration von 14 µg/ml Ti-NPs einen signifikanten Anstieg des OTM-Werts aus [56]. Da ein Anstieg des OTM-Werts als Indikator für DNA-Schäden gilt [71, 72], lässt sich schlussfolgern, dass Ti-NPs ein 109-fach höheres Potential haben, DNA-Schäden auszulösen. Die Ergebnisse unserer früheren Studie zeigen einen signifikanten Anstieg des OTM-Werts bei einer Konzentration von 810 µg/ml für ZrO₂-MPs und von 70 µg/ml für ZrO₂-NPs in PDL-Zellen [55]. Somit haben TiO₂-Partikel eine geringere Genotoxizität als ZrO₂-Partikel. Abschließend lässt sich folgende Reihenfolge der Genotoxizität aufstellen: Ti-NPs (14 µg/ml) > ZrO₂-NPs (70 µg/ml) > ZrO₂-MPs (810 µg/ml) > TiO₂-NPs (1523 µg/ml) > Ti-MPs (6666 µg/ml) > TiO₂-MPs (> 9164 µg/ml).

In der aktuellen Studie konnten TiO₂-MPs, TiO₂-NPs, ZrO₂-MPs und ZrO₂-NPs in den Zellkernen der PDL-Zellen nachgewiesen werden. Dagegen konnten in unserer vorangegangenen Studie keine Ti-MPs in den Kernen von PDL-Zellen gefunden werden [56]. Die intranukleäre Partikel Aufnahme von TiO₂-MPs und ZrO₂-MPs kann dadurch erklärt werden, dass in den MPs auch Partikel in Nanometergröße enthalten sind, gemäß unserer aktuellen und vorangegangenen Studie [55]. Allerdings zeigten TiO₂-NPs und ZrO₂-NPs eine höhere Kernaufnahmeeffizienz als die korrespondierenden MPs. Messerschmidt et. al. sind zu dem Ergebnis gekommen, dass die Toxizität umgekehrt proportional zur Partikelgröße ist [73]. Außerdem könnte die intranukleäre Partikel Aufnahme von NPs zu einem höheren Potential an DNA-Schäden führen, was im Einklang mit den Ergebnissen der aktuellen und unseren früheren Studien steht [55, 56].

In unserer aktuellen in vitro-Studie konnte gezeigt werden, dass eine signifikant geringere bakterielle Adhäsion an den ZrO₂-Implantatschrauben nachgewiesen werden kann im Vergleich zu den Ti-Implantatschrauben. Diese Ergebnisse stimmen mit einer vorangegangenen Studie überein, bei der eine signifikant geringere Bakterienadhäsion an ZrO₂-Minidisks im Vergleich zur Ti-Minidisks in vivo nachgewiesen werden konnte [35]. Ebenso konnte, im Vergleich zu ZrO₂-Implantat-Abutments, von Nascimento et. al. auf Ti-Implantat-Abutments eine höhere Keimzahl und eine höhere Anzahl von Bakterienarten gefunden werden [74].

Allerdings lassen sich in vitro Studien nicht ohne Weiteres auf die klinische Situation übertragen und die Ergebnisse müssen von klinischen Langzeitstudien überprüft werden.

10.2 Synopsis

Today, society is not only increasing the aesthetic demands placed on dental materials, but also the demand for high biocompatibility and low toxicity. Both dentine-adhesive composite fillings in conservative dentistry and implants in the prosthetic area are now standard in modern dental offices.

However, it has already been shown that dental composites release (co)monomers and additives [13, 57-59], which can have cytotoxic, mutagenic, teratogenic and embryotoxic effects on the organism [12, 60]. Titanium, the material from which the most frequently used implants are currently made [61], can trigger type IV hypersensitivity or skin sensitivity [39, 62]. Nevertheless, it has already been demonstrated in our previous studies that the addition of Asc and NAC, which are considered radical scavengers [63], to the cell culture medium can reduce the genotoxicity of dental (co)monomers and their epoxide metabolites [20, 64, 65].

In the first study, Asc or NAC were incorporated (1, 0.1 and 0.01 wt%) as a novel composite component into three different composites (Venus[®], Grandio[®] and Filtek[™] Supreme XTE) and their effect on DC and elution of composite components was examined. In addition, the release of Asc or NAC from the mixtures was analyzed. In earlier studies, the selected composites already showed a high release of methacrylates and additives [57, 66, 67].

In the second study, the cytotoxicity and genotoxicity of TiO₂-MPs and TiO₂-NPs in PDL cells and the intranuclear uptake of TiO₂-MPs, TiO₂-NPs, ZrO₂-MPs and ZrO₂-NPs were investigated. In addition, bacterial adhesion to Ti- and ZrO₂-implant threads was examined. This study is a follow-up to our previous studies investigating the cytotoxicity, genotoxicity and intranuclear uptake of MPs and NPs of Ti, i.e., the non-oxidized form, and ZrO₂ [54-56].

10.1.1 Antioxidants as a novel dental resin-composite component: Effect on elution and degree of conversion

The significantly reduced DC after incorporation of Asc and NAC into the composites can be attributed to the property of the antioxidants that they can scavenge initiating radicals such as CQ [68]. Consequently, this can also lead to a suppression of the initiation of the chain polymerization.

A significantly lower DC compared to control was found for all investigated composites with 1, 0.1 and 0.01 wt.% Asc (except Venus[®]-0.01 wt.% Asc). In contrast, after the incorporation of NAC, no significant change in DC could be determined for Venus[®] and Grandio[®] with 0.1

wt% and 0.01 wt% NAC and for Filtek™ Supreme XTE with 1 wt% NAC. In conclusion Asc has a higher impact on DC than NAC. Not only does Asc have a stronger ability to scavenge radicals and interfere with the diffusion of electrons, but another possible explanation may be that Asc has chain-breaking properties and thus inhibits chain reactions mediated by free radicals [69].

A significant increase of TEGDMA in methanol and water eluates compared to the control could be observed after incorporation of Asc in Venus® (1, 0.1 and 0.01 wt.%, 1 day/7 days) and Grandio® (1 wt.%, 1 day/7 days) and NAC in Venus® (0.1 wt.%, 1 day). Our data show that the incorporation of Asc or NAC can promote the release of TEGDMA and consequently lead to negative side effects such as methacrylate allergies, geno- or cytotoxic effects [17, 70].

However, our study also shows that the incorporation of Asc or NAC at certain wt.% does not affect the release of TEGDMA (e.g., Filtek™ Supreme XTE- 1, 0.1 and 0.01 wt.% Asc or NAC 1 and 7 days in methanol). Likewise, a significantly reduced release of TEGDMA after incorporation of NAC in Grandio® (1 wt.%, 7 days, methanol) as well as a significantly reduced release of HEMA after incorporation of Asc in Grandio® (1, 0.1, 0, 01 wt.%, methanol/water, 1 day/7 days). An explanation for the lower elutable amount of TEGDMA or HEMA can be the interaction of Asc or NAC with the composite components. In our earlier studies it could already be shown that the cytotoxicity and genotoxicity induced by dental (co)monomers and their epoxide metabolites can be significantly reduced by Asc and NAC [20, 22, 64, 65]. A significant reduction of DNA-DSBs in HGFs compared to the control could be demonstrated at concentrations of more than 50%M Asc or NAC[64]. In our current study, Asc and NAC concentrations of over 50 µM were found in methanol and water eluates from Venus® -1 wt.% Asc, Grandio® - 1 wt.% Asc, Filtek™ Supreme XTE-1 wt.% Asc and Filtek™ Supreme XTE-1 wt.% NAC. Therefore, it can be concluded that those composites containing 1 wt.% Asc or 1 wt.% NAC contain a sufficient amount of eluted antioxidants to reduce the metabolization intermediates and epoxy metabolites of dental composite (co-)monomers and thus reduce the genotoxicity in HGFs.

However, incorporation of 1 wt.% Asc into Venus®, Grandio® and Filtek™ Supreme XTE showed a significantly lower DC as well as significantly increased elution of TEGDMA. Only the incorporation of 1 wt.% NAC into Filtek™ Supreme XTE resulted in no significant change in DC and the elution of the composite components and provides a sufficient amount of antioxidants to reduce toxicity.

In summary, it can be concluded that the incorporation of NAC (1 wt.%) into Filtek™ Supreme XTE as a novel composite component can be an advantageous step to reduce dental (co)monomer-induced DNA-DSBs.

10.1.2 Intranuclear cell uptake and toxicity of titanium dioxide and zirconia particles as well as bacterial adhesion on dental titanium- and zirconia-implants

TiO₂-NPs (15 mg/ml) were shown to induce 6-fold higher cytotoxicity in PDL cells than TiO₂-MPs (92 mg/ml). Compared to the values from our previous study [56] on Ti-MPs and NPs [56], the EC₅₀ value of Ti-MPs is more than 11-fold lower than the value of TiO₂-MPs and the EC₅₀ value of Ti-NPs is about 5 times less than the value of TiO₂-NPs.

In our earlier study, ZrO₂ particles could be detected in the jawbone, which is located directly around the implant [55]. Furthermore, the EC₅₀ value of ZrO₂-NPs (14 mg/ml) in PDL cells was 6-fold lower than the EC₅₀ value of ZrO₂-MPs (81 mg/ml) [55]. Thus, taking into account the standard deviation, it can be stated that the cytotoxicity of TiO₂-MPs and ZrO₂-MPs on the one hand and TiO₂-NPs and ZrO₂-NPs on the other hand can be classified as approximately the same. The oxidized state of the Ti particles (TiO₂-MPs/-NPs) are less toxic compared to the elemental Ti-NPs. Ti-NPs, TiO₂-NPs and ZrO₂-NPs are more cytotoxic compared to the corresponding MPs. In summary, according to our previous studies [55, 56] and this study, the following order of cytotoxicity of the particles can be established: Ti-NPs (3 mg/ml) > ZrO₂ - NPs (14 mg/ml) ≈ TiO₂-NPs (15 mg/ml) > ZrO₂-MPs (81 mg/ml) ≈ TiO₂-MPs (92 mg/ml) > Ti-MPs (> 999 mg/ml).

While none of the tested TiO₂-MP concentrations elicited a significant increase in OTM, a concentration of 1523 μg/ml TiO₂-NPs led to an approximately 3-fold increase in OTM compared to the negative control. In our previous study, even a concentration of 14 μg/ml Ti-NPs triggered a significant increase in OTM value [56]. Since an increase in the OTM value is considered an indicator of DNA damage [71, 72], it can be concluded that Ti-NPs have a 109-fold higher potential to induce DNA damage. The results of our previous study show a significant increase in OTM at a concentration of 810 μg/ml for ZrO₂-MPs and 70 μg/ml for ZrO₂-NPs in PDL cells [55]. Thus, TiO₂-particles have a lower genotoxicity than ZrO₂-particles. In conclusion, the following order of genotoxicity can be established: Ti-NPs (14 μg/ml) > ZrO₂-NPs (70 μg/ml) > ZrO₂-MPs (810 μg/ml) > TiO₂-NPs (1523 μg/ml) > Ti -MPs (6666 μg/ml) > TiO₂-MPs (> 9164 μg/ml).

In the current study, TiO₂-MPs, TiO₂-NPs, ZrO₂-MPs and ZrO₂-NPs could be detected in the nuclei of PDL cells. In contrast, in our previous study, no Ti-MPs could be found in the nuclei of PDL cells [56]. The intranuclear particle uptake of TiO₂-MPs and ZrO₂-MPs can be explained by the fact that the MPs also contain nanometer-sized particles according to our current and previous study [55]. However, TiO₂-NPs and ZrO₂-NPs showed a higher core uptake efficiency than the corresponding MPs. Messerschmidt et. al. concluded that toxicity is inversely proportional to particle size [73]. Furthermore, intranuclear particle uptake of NPs could lead to a higher potential of DNA damage, which is consistent with the results of the current and our previous studies [55, 56]. In our current in vitro study, significantly less bacterial adhesion could be demonstrated on the ZrO₂-implant threads compared to the Ti-implant threads. These results are in line with a previous study in which a significantly lower bacterial adhesion to ZrO₂-minidisks compared to Ti-minidisks was postulated in vivo [35]. Likewise, Nascimento et. al. were able to find a higher number of germs and a higher number of bacterial species on Ti-implant abutments compared to ZrO₂ implant abutments [74]. However, in vitro studies cannot simply be transferred to the clinical situation and the results must be verified by long-term clinical studies.

11. Publikation 1

Yang, Y.; Reichl, F.X.; Ilie, N.; Shi, J.W.; Dhein, J.; Hickel, R.; Högg, C. *Antioxidants as a novel dental resin-composite component: Effect on elution and degree of conversion*. Dent. Mater. 2019, 35, 650–661.

12. Publikation 2

Dhein, J.; Haller, C.; Reichl, F.-X.; Milz, S.; Hickel, R.; Kollmuss, M.; Högg, C. *Intranuclear cell uptake and toxicity of titanium dioxide and zirconia particles as well as bacterial adhesion on dental titanium- and zirconia-implants*. Dent. Mater. 2022, 38, 517-528.

13. Literaturverzeichnis

- [1] Bowen RL. Properties of a silica-reinforced polymer for dental restorations. *J Am Dent Assoc*, 1963; 66:57-64.
- [2] Ferracane JL. *Materials in Dentistry: Principles and Applications*: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
- [3] Kelly PG, Smales RJ. Long-term cost-effectiveness of single indirect restorations in selected dental practices. *Br Dent J*, 2004; 196:639-43; discussion 27.
- [4] Mitchell RJ, Koike M, Okabe T. Posterior amalgam restorations--usage, regulation, and longevity. *Dent Clin North Am*, 2007; 51:573-89, v.
- [5] Lutz F, Krejci I. Resin composites in the post-amalgam age. *Compend Contin Educ Dent*, 1999; 20:1138-44, 46, 48.
- [6] Watts DC, Issa M, Ibrahim A, Wakiaga J, Al-Samadani K, Al-Azraqi M, Silikas N. Edge strength of resin-composite margins. *Dent Mater*, 2008; 24:129-33.
- [7] Ilie N, Hickel R, Valceanu AS, Huth KC. Fracture toughness of dental restorative materials. *Clin Oral Investig*, 2012; 16:489-98.
- [8] Sripetchdanond J, Leevailoj C. Wear of human enamel opposing monolithic zirconia, glass ceramic, and composite resin: an in vitro study. *J Prosthet Dent*, 2014; 112:1141-50.
- [9] Alomari Q, Ajlouni R, Omar R. Managing the polymerization shrinkage of resin composite restorations: a review. *SADJ*, 2007; 62:12, 4, 6 passim.
- [10] Lyons K, Ministry of H. Direct placement restorative materials for use in posterior teeth: the current options. *N Z Dent J*, 2003; 99:10-5.
- [11] Rubinstein S, Nidetz A. The art and science of the direct posterior restoration: recreating form, color, and translucency. *Alpha Omegan*, 2007; 100:30-5.
- [12] Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res*, 1998; 41:474-80.
- [13] Ferracane JL, Condon JR. Rate of elution of leachable components from composite. *Dent Mater*, 1990; 6:282-7.
- [14] Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2000; 11:333-55.
- [15] Reichl FX, Durner J, Hickel R, Kunzelmann KH, Jewett A, Wang MY, Spahl W, Kreppel H, Moes GW, Kehe K, Walther U, Forth W, Hume WR. Distribution and excretion of TEGDMA in guinea pigs and mice. *J Dent Res*, 2001; 80:1412-5.
- [16] Lindstrom M, Alanko K, Keskinen H, Kanerva L. Dentist's occupational asthma, rhinoconjunctivitis, and allergic contact dermatitis from methacrylates. *Allergy*, 2002; 57:543-5.
- [17] Urcan E, Scherthan H, Styllou M, Haertel U, Hickel R, Reichl FX. Induction of DNA double-strand breaks in primary gingival fibroblasts by exposure to dental resin composites. *Biomaterials*, 2010; 31:2010-4.
- [18] Ginzkey C, Zinnitsch S, Steussloff G, Koehler C, Hackenberg S, Hagen R, Kleinsasser NH, Froelich K. Assessment of HEMA and TEGDMA induced DNA damage by multiple genotoxicological endpoints in human lymphocytes. *Dent Mater*, 2015; 31:865-76.
- [19] Mahaney BL, Meek K, Lees-Miller SP. Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J*, 2009; 417:639-50.

- [20] Lottner S, Shehata M, Hickel R, Reichl FX, Durner J. Effects of antioxidants on DNA-double strand breaks in human gingival fibroblasts exposed to methacrylate based monomers. *Dent Mater*, 2013; 29:991-8.
- [21] Kojima N, Yamada M, Paranjpe A, Tsukimura N, Kubo K, Jewett A, Ogawa T. Restored viability and function of dental pulp cells on poly-methylmethacrylate (PMMA)-based dental resin supplemented with N-acetyl cysteine (NAC). *Dent Mater*, 2008; 24:1686-93.
- [22] Walther UI, Siagian, II, Walther SC, Reichl FX, Hickel R. Antioxidative vitamins decrease cytotoxicity of HEMA and TEGDMA in cultured cell lines. *Arch Oral Biol*, 2004; 49:125-31.
- [23] Jiao Y, Ma S, Li J, Shan L, Yang Y, Li M, Chen J. The influences of N-acetyl cysteine (NAC) on the cytotoxicity and mechanical properties of Poly-methylmethacrylate (PMMA)-based dental resin. *PeerJ*, 2015; 3:e868.
- [24] Miletic VJ, Santini A. Remaining unreacted methacrylate groups in resin-based composite with respect to sample preparation and storing conditions using micro-Raman spectroscopy. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2008; 87:468-74.
- [25] Branemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*, 1969; 3:81-100.
- [26] Okabe T, Hero H. The use of titanium in dentistry. *Cells and Materials(USA)*, 1995; 5:211-30.
- [27] Watanabe K, Miyakawa O, Takada Y, Okuno O, Okabe T. Casting behavior of titanium alloys in a centrifugal casting machine. *Biomaterials*, 2003; 24:1737-43.
- [28] Zhou ZR, Zheng J. Tribology of dental materials: a review. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2008; 41:113001.
- [29] Castilho GAA, Martins MD, Macedo WAA. Surface characterization of titanium Based dental implants. *Brazilian Journal of Physics*, 2006; 36:1004-8.
- [30] Elias C, Lima J, Valiev R, Meyers M. Biomedical applications of titanium and its alloys. *Jom*, 2008; 60:46-9.
- [31] Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, Triplett RG, Woody RD. Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2000; 15:675-90.
- [32] Piconi C, Maccauro G. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials*, 1999; 20:1-25.
- [33] Scarano A, Di Carlo F, Quaranta M, Piattelli A. Bone response to zirconia ceramic implants: an experimental study in rabbits. *J Oral Implantol*, 2003; 29:8-12.
- [34] Gahlert M, Gudehus T, Eichhorn S, Steinhäuser E, Kniha H, Erhardt W. Biomechanical and histomorphometric comparison between zirconia implants with varying surface textures and a titanium implant in the maxilla of miniature pigs. *Clin Oral Implants Res*, 2007; 18:662-8.
- [35] Scarano A, Piattelli M, Caputi S, Favero GA, Piattelli A. Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study. *J Periodontol*, 2004; 75:292-6.
- [36] Simonis P, Dufour T, Tenenbaum H. Long-term implant survival and success: a 10-16-year follow-up of non-submerged dental implants. *Clin Oral Implants Res*, 2010; 21:772-7.
- [37] Hashim D, Cionca N, Courvoisier DS, Mombelli A. A systematic review of the clinical survival of zirconia implants. *Clin Oral Investig*, 2016; 20:1403-17.

- [38] Devji T. Survival rates and marginal bone loss of zirconia implants are promising, but more evidence on long-term outcomes is needed. *J Am Dent Assoc*, 2017; 148:e128.
- [39] Sicilia A, Cuesta S, Coma G, Arregui I, Guisasola C, Ruiz E, Maestro A. Titanium allergy in dental implant patients: a clinical study on 1500 consecutive patients. *Clin Oral Implants Res*, 2008; 19:823-35.
- [40] Lang NP, Wilson TG, Corbet EF. Biological complications with dental implants: their prevention, diagnosis and treatment. *Clin Oral Implants Res*, 2000; 11 Suppl 1:146-55.
- [41] Romanos GE, Weitz D. Therapy of peri-implant diseases. Where is the evidence? *J Evid Based Dent Pract*, 2012; 12:204-8.
- [42] Pesce P, Menini M, Tealdo T, Bevilacqua M, Pera F, Pera P. Peri-implantitis: a systematic review of recently published papers. *Int J Prosthodont*, 2014; 27:15-25.
- [43] Pirih FQ, Hiyari S, Barroso AD, Jorge AC, Perussolo J, Atti E, Tetradis S, Camargo PM. Ligature-induced peri-implantitis in mice. *J Periodontol Res*, 2015; 50:519-24.
- [44] Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI, Lindhe J, Eriksson B, Sbordone L. Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures (I). A 3-year longitudinal prospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 1986; 15:39-52.
- [45] Botero JE, Gonzalez AM, Mercado RA, Olave G, Contreras A. Subgingival microbiota in peri-implant mucosa lesions and adjacent teeth in partially edentulous patients. *J Periodontol*, 2005; 76:1490-5.
- [46] Bower RC, Radny NR, Wall CD, Henry PJ. Clinical and microscopic findings in edentulous patients 3 years after incorporation of osseointegrated implant-supported bridgework. *J Clin Periodontol*, 1989; 16:580-7.
- [47] Mombelli A, Buser D, Lang NP. Colonization of osseointegrated titanium implants in edentulous patients. Early results. *Oral Microbiol Immunol*, 1988; 3:113-20.
- [48] Mombelli A, Mericske-Stern R. Microbiological features of stable osseointegrated implants used as abutments for overdentures. *Clin Oral Implants Res*, 1990; 1:1-7.
- [49] Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res*, 2008; 19:975-82.
- [50] Tabanella G, Nowzari H, Slots J. Clinical and microbiological determinants of ailing dental implants. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2009; 11:24-36.
- [51] Mombelli A, van Oosten MA, Schurch E, Jr., Land NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol*, 1987; 2:145-51.
- [52] Salihoglu U, Boynuegri D, Engin D, Duman AN, Gokalp P, Balos K. Bacterial adhesion and colonization differences between zirconium oxide and titanium alloys: an in vivo human study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2011; 26:101-7.
- [53] Ferreira Ribeiro C, Cogo-Muller K, Franco GC, Silva-Concilio LR, Sampaio Campos M, de Mello Rode S, Claro Neves AC. Initial oral biofilm formation on titanium implants with different surface treatments: An in vivo study. *Arch Oral Biol*, 2016; 69:33-9.
- [54] He X, Reichl F-X, Wang Y, Michalke B, Milz S, Yang Y, Stolper P, Lindemaier G, Graw M, Hickel R. Analysis of titanium and other metals in human jawbones with dental implants—A case series study. *Dental Materials*, 2016.
- [55] He X, Reichl FX, Milz S, Michalke B, Wu X, Sprecher CM, Yang Y, Gahlert M, Rohling S, Kniha H, Hickel R, Hogg C. Titanium and zirconium release from titanium- and zirconia implants in mini pig maxillae and their toxicity in vitro. *Dent Mater*, 2020; 36:402-12.

- [56] He X, Hartlieb E, Rothmund L, Waschke J, Wu X, Van Landuyt KL, Milz S, Michalke B, Hickel R, Reichl FX, Hogg C. Intracellular uptake and toxicity of three different Titanium particles. *Dent Mater*, 2015; 31:734-44.
- [57] Schuster L, Reichl FX, Rothmund L, He X, Yang Y, Van Landuyt KL, Kehe K, Polydorou O, Hickel R, Hogg C. Effect of Opalescence((R)) bleaching gels on the elution of bulk-fill composite components. *Dent Mater*, 2016; 32:127-35.
- [58] Rothmund L, Reichl FX, Hickel R, Styllou P, Styllou M, Kehe K, Yang Y, Hogg C. Effect of layer thickness on the elution of bulk-fill composite components. *Dent Mater*, 2017; 33:54-62.
- [59] Geurtsen W, Spahl W, Leyhausen G. Residual monomer/additive release and variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomers. *J Dent Res*, 1998; 77:2012-9.
- [60] 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; 33:49-55.
- [61] Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand*, 1981; 52:155-70.
- [62] Valentine-Thon E, Schiwara HW. Validity of MELISA for metal sensitivity testing. *Neuro Endocrinol Lett*, 2003; 24:57-64.
- [63] Kurebayashi H, Ohno Y. Metabolism of acrylamide to glycidamide and their cytotoxicity in isolated rat hepatocytes: protective effects of GSH precursors. *Arch Toxicol*, 2006; 80:820-8.
- [64] Yang Y, He X, Shi J, Hickel R, Reichl FX, Hogg C. Effects of antioxidants on DNA double-strand breaks in human gingival fibroblasts exposed to dental resin co-monomer epoxy metabolites. *Dent Mater*, 2017; 33:418-26.
- [65] Styllou P, Styllou M, Hickel R, Hogg C, Reichl FX, Scherthan H. NAC ameliorates dental composite-induced DNA double-strand breaks and chromatin condensation. *Dent Mater J*, 2017; 36:638-46.
- [66] 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; 30:619-31.
- [67] 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; 34:201-8.
- [68] Gutteridge JM. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact*, 1994; 91:133-40.
- [69] Foy CJ, Passmore AP, Vahidassr MD, Young IS, Lawson JT. Plasma chain-breaking antioxidants in Alzheimer's disease, vascular dementia and Parkinson's disease. *QJM*, 1999; 92:39-45.
- [70] Goldberg M. In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Investig*, 2008; 12:1-8.
- [71] Kleinsasser NH, Schmid K, Sassen AW, Harreus UA, Staudenmaier R, Folwaczny M, Glas J, Reichl FX. Cytotoxic and genotoxic effects of resin monomers in human salivary gland tissue and lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (Comet) assay. *Biomaterials*, 2006; 27:1762-70.
- [72] Kleinsasser NH, Wallner BC, Harreus UA, Kleinjung T, Folwaczny M, Hickel R, Kehe K, Reichl FX. Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as

- assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. J Dent, 2004; 32:229-34.
- [73] Messerschmidt C, Hofmann D, Kroeger A, Landfester K, Mailander V, Lieberwirth I. On the pathway of cellular uptake: new insight into the interaction between the cell membrane and very small nanoparticles. Beilstein J Nanotechnol, 2016; 7:1296-311.
- [74] Nascimento C, Pita MS, Santos Ede S, Monesi N, Pedrazzi V, Albuquerque Junior RF, Ribeiro RF. Microbiome of titanium and zirconia dental implants abutments. Dent Mater, 2016; 32:93-101.

14. Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinen tiefsten Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Franz-Xaver Reichl aussprechen, der mir mit seinem profunden Wissen und seiner großen Erfahrung stets zur Seite stand. Mein Dank geht außerdem an Dr. Christoph Högg: Nicht nur sein Intellekt und Scharfsinn haben es mir ermöglicht diese Dissertation zu schreiben, sondern auch seine unendliche Geduld mit mir, die größten Respekt verdient. Seine Erklärungen zu verschiedensten Fragen und Fakten ließen mich enorm wachsen.

Auch Herrn Stefan Schulz möchte ich danken: Seine Hilfsbereitschaft und entspannte Art haben mir die Stunden im Labor sehr erleichtert.