

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



# Biokompatibilität und Zytotoxizität von 3D-gedruckten zahnärztlichen Werkstoffen

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

vorgelegt von  
Katharina Netolitzky, geb. Aumer  
aus München

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Erster Gutachter: Prof. Dr. Dr. Matthias Folwaczny

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Jan-Frederik Güth

Dritter Gutachter: PD Dr. Johann Schredelseker

Weitere Gutachter: \_\_\_\_\_

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. Iris Frasheri  
Dr. med. dent. Andreas Keßler

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2023

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	3
1. Einleitung.....	5
1.1. Die Gingiva.....	6
1.2. Keratinozyten.....	7
1.3. Interleukin 6 .....	8
1.4. Interleukin 8 .....	10
1.5. Temporäre zahnärztliche Versorgungen .....	11
1.6. Dentale Kompositwerkstoffe .....	12
1.7. Luxatemp .....	15
1.8. Computer Aided Design (CAD)/ Computer Aided Manufacturing (CAM) Technologie .....	15
1.9. Additive Fertigungsverfahren .....	17
1.9.1. Selektives Lasersintern (SLS).....	19
1.9.2. Layer Lamine Manufacturing (LLM).....	19
1.9.3. Fused Layer Modeling (FLM) .....	20
1.9.4. Stereolithographie (SLA).....	20
1.9.5. Digital Light Processing (DLP).....	21
1.9.6. 3D- Druck- Materialien in der Zahnmedizin .....	22
2. Ziele der Arbeit.....	26
3. Material und Methoden .....	27
3.1. Zellen.....	27
3.2. Zellkultur.....	27
3.3. Prüfkörper .....	29
3.3.1. Nextdent C&B MFH .....	31
3.3.2. GC Temp PRINT.....	31
3.3.3. Freeprint Temp UV .....	31
3.3.4. 3Delta Temp .....	32
3.4. Eluat.....	34
3.5. Bestimmung der Zellproliferation mit dem XTT-Test .....	35
3.6. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	37
3.7. Interleukin 6 ELISA.....	39
3.8. Interleukin 8 ELISA.....	40
3.9. Indirekte Immunfluoreszenz.....	41
3.9.1. Fixierung der Objektträger für die immunhistochemische Färbung.....	42
3.9.2. Immunhistochemische Färbung .....	43

3.9.3.	Immunhistochemische Auswertung .....	44
3.10.	Rasterelektronenmikroskop.....	44
3.11.	Statistische Auswertung der Daten .....	46
4.	Ergebnisse .....	47
4.1.	Zellproliferation (XTT-Test).....	47
4.2.	Expression proinflammatorischer Zytokine .....	51
4.2.1.	Expression von Interleukin 6.....	51
4.2.2.	Expression von Interleukin 8.....	56
4.3.	Indirekte Immunfluoreszenz.....	61
4.3.1.	Interleukin 6 .....	61
4.3.2.	Interleukin 8 .....	62
3.4.	Rasterelektronenmikroskopische Analyse .....	63
5.	Diskussion.....	64
5.1.	Versuchsaufbau .....	64
5.2.	Zellvitalität .....	68
5.3.	Expression von Interleukin 6 und 8 .....	70
6.	Zusammenfassung.....	72
7.	Abstract .....	73
8.	Abkürzungsverzeichnis .....	74
9.	Abbildungsverzeichnis .....	76
10.	Diagrammverzeichnis .....	77
11.	Tabellenverzeichnis.....	77
12.	Literaturverzeichnis .....	78

## 1. Einleitung

Die Behandlung von Zahnhartsubstanzdefekten kann bis zu einer gewissen Ausdehnung mit plastischen Füllungen direkt erfolgen (Hellwig, 2013). Handelt es sich um umfassende Defekte oder auch um die Versorgung einer Zahnlücke, muss die dauerhafte Restauration indirekt hergestellt werden (Zantner, 2007). Dafür wird konventionell mit Hilfe eines elastischen Materials eine Abformung des Gegenkiefers und ein Präzisionsabdruck des Kiefers mit der Präparation angefertigt (Wenz et al., 2020). Die Abformungen werden im zahntechnischen Labor in Gipsmodelle überführt, auf welchen die Restauration oder die prothetische Versorgung vom Zahntechniker modelliert werden (Muhlemann et al., 2018). In einem nächsten Schritt müssen diese Modellierungen in das gewünschte Material, beispielsweise Metall oder Keramik, mittels Guss- oder Pressverfahren umgewandelt werden (Muhlemann et al., 2018; W.C. Heraeus, 1938). Um diesen Arbeitsablauf zu vereinfachen, zu beschleunigen und für den Patienten möglichst angenehm zu gestalten, bieten neuere Techniken die Möglichkeit, die konventionellen Abformungen mit Hilfe von Scans zu digitalisieren (Seelbach et al., 2010). Die Konstruktion der zahnärztlichen Versorgung erfolgt dann digital am Computer (Seelbach et al., 2010). Eine Fertigung der designten Werkstücke findet ebenfalls computergestützt statt (Beuer et al., 2008). Dieser Vorgang aus computergestütztem Design und Fertigung wird auch mit CAD/CAM (computer aided design/computer aided manufacturing) abgekürzt (Beuer et al., 2008). Die Herstellung kann im Sinne eines subtraktiven Verfahrens durch Herausschleifen der Werkstücke aus industriell vorgefertigten Materialblöcken erfolgen (Güß et al., 2013). Eine andere moderne Variante bietet die Herstellung der Restauration durch additive Verfahren (*additive manufacturing*, AM) (Chung et al., 2018). Diese Fertigungsart basiert auf der Idee des *rapid prototyping* (RP) (Nayar et al., 2015). Hierbei werden digitale, dreidimensionale Körper in Schichten zerlegt, diese anschließend produziert und scheinchenweise für den Aufbau des Körpers aneinander gefügt (Nayar et al., 2015). Somit entsteht die Restauration additiv durch das stetige Auflagern neuer Materialschichten (Nayar et al., 2015). Im Bereich des *additive manufacturing* gibt es unterschiedliche Herstellungsverfahren, welche unter dem Begriff dreidimensionaler (3D) Druck zusammengefasst werden können (Kessler, Reichl, et al., 2020). Als Resultat des zu Grunde liegenden Schicht-für-Schicht-Aufbaus kommt es zu einer Anisotropie, welche je nach Druckverfahren oder verwendetem Material unterschiedlich stark ausgeprägt ist (Stansbury et al., 2016). Für den

dreidimensionalen Druck gibt es verschiedene Druckermodelle, die verschiedene technische Verfahren nutzen, und unterschiedlich zusammengesetzte Methacrylate, welche speziell für den 3D-Druck zugelassen sind (Stansbury et al., 2016). Auf Grund dieser Variationen kommt es während des Drucks zu unterschiedlich starken Inhomogenitäten zwischen den verschiedenen Kunststoffen, welche in Verbindung mit einer gesenkten Biokompatibilität stehen (Jürgen Durner et al., 2010; Kessler, Reichl, et al., 2020). Dies ist vor allem längerfristig für den biologischen Erfolg der Restauration interessant, da die Materialien nach der Befestigung am Zahn in dauerhaftem Kontakt zu Weichgewebsstrukturen stehen und diese je nach Wahl des Kunststoffes individuell beeinflussen könnten (Reichl, 2011). Die Bestandteile von restaurativen Kompositen in der Zahnmedizin zeigen eine Beeinflussung von umliegenden Geweben oder sogar eine systemische Wirkung (Stanley, 1992). Da die Inhaltsstoffe der neu entwickelten 3D Kunststoffe diesen oft ähneln, könnten sie vergleichbare Reaktionen hervorrufen. Aus diesem Grund soll diese Studie anhand von Zellkulturen der oralen Keratinozyten den Einfluss von dreidimensional gedruckten Kompositen auf die Zellproliferation und die Produktion von Markermolekülen des gingivalen Epithels untersuchen und mit den Auswirkungen von subtraktiv und konventionell hergestellten Kunststoffen vergleichen.

### 1.1. Die Gingiva

Die Gingiva ist Teil der Mundschleimhaut. Sie deckt den Alveolarfortsatz ab und umrandet leicht oberhalb der Schmelz-Zement-Grenze die Zahnhäse wie ein feiner Kragen (Hellwig, 2013; Joshi et al., 2017). Gemeinsam mit dem Wurzelzement, dem Alveolarfortsatz und dem Desmodont bildet sie das Parodontium. Sie besteht aus der freien marginalen Gingiva und der befestigten, alveolären Gingiva. Während die befestigte Gingiva unbeweglich mit dem Zahn, Knochen und Parodontium verbunden ist, hat die freie Gingiva keine starre Befestigung an der Zahnoberfläche (Sebastian, 1999). Die Gingiva hat einen epithelialen Teil und eine mit Nerven, Blut- und Lymphgefäßen versorgte subepitheliale bindegewebige Schicht (Sebastian, 1999). Es lassen sich drei unterschiedliche Epithelabschnitte unterscheiden: das orale Sulkusepithel (OSE), welches dem Zahn zugewandt ist, das orale Gingivaepithel (OGE), das zur Mundhöhle gerichtet ist und das Saumepithel (SE) (Hellwig, 2013). Das orale Epithel und das Sulkusepithel sind mehrschichtig verhornte Epithelien (Hellwig, 2013; Presland et al., 2000). In diese stülpt sich das darunter liegende Bindegewebe, die Lamina propria, zapfenartig ein (Hellwig, 2013). Als Trennung des Epithels von der Lamina propria dient die Basalmembran (Presland et al., 2000). Das Saumepithel ist mit Hilfe der Hemidesmosomen für die Befestigung der Gingiva an der Oberfläche des Zahnes zuständig und reicht vom Sulkusboden der Gingiva zur Schmelz-

Zement-Grenze (Sebastian, 1999). Aufgebaut wird das Epithel aus dem Stratum basale, dem Stratum spinosum, dem Stratum granulosum und dem Stratum corneum (Presland et al., 2000). Je nachdem wie stark es beansprucht ist, kann es orthokeratinisiert oder parakeratinisiert sein (Hellwig, 2013). Bei der Orthokeratose ist das Stratum corneum eine Schicht aus Zellen, welche in den unteren Zellschichten noch Kernreste, freie Ribosomen und Lipide enthalten und in den oberflächlichen Schichten mit Zellorganellen und Kern hauptsächlich mit Keratinfilamenten gefüllt sind (Schneider et al., 1996). Dem parakeratinisierten Epithel fehlt das Stratum granulosum, welches durch das Stratum intermedium ersetzt wird (Schneider et al., 1996). Zusätzlich besteht die oberste Epithelschicht aus Zellen die ihre Zellorganellen zum großen Teil noch besitzen und deren Nuclei nach oben hin flacher und dicker werden, was als Stratum superficiale bezeichnet wird (Schneider et al., 1996).

Eine ausreichende Blutversorgung der Gingiva wird unter anderem durch die A. alveolaris inferior und die A. alveolaris superior posterior sowie durch Äste der A. lingualis, A. buccalis, A. palatina und A. mentalis gewährleistet (Hellwig, 2013).

Da die Mundhöhle schon zum ersten Teil des Verdauungstraktes zählt, hat die Gingiva direkten Kontakt mit vielen äußeren Einflüssen und besitzt somit als Barriere gegen eine Vielzahl von Mikroorganismen eine wichtige Funktion für die gesamte Mundgesundheit (Joshi et al., 2017).

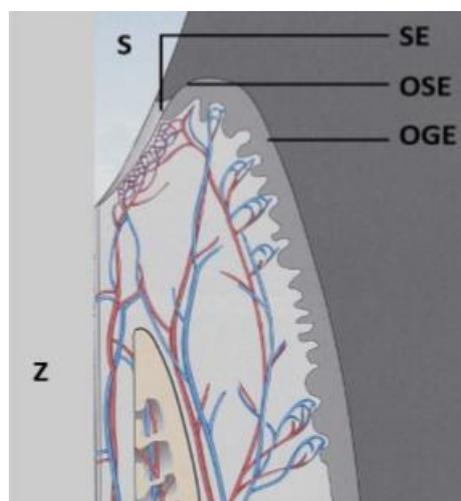


Abbildung 1: Topographie der Epithelabschnitte der Gingiva, Z: Zement, S: Schmelz (modifiziert übernommen aus (Page et al., 2004))

## 1.2. Keratinozyten

Die Gingiva besteht zu mehr als 90% aus Keratinozyten, während die restlichen 10% eine Kombination aus Melanozyten, Langerhanszellen und Merkelzellen darstellen (Hellwig, 2013). Die Keratinozyten unterliegen auf ihrem Weg durch die unterschiedlichen Schichten des Epithels einer starken Wandlung. Diese betrifft sowohl ihre Form als auch ihren Metabolismus (Fuchs, 1990). Die

Zellumsatzrate der oralen Schleimhaut beträgt 10 bis 12 Tage und weist damit eine um die Hälfte verkürzte Regenerationsdauer gegenüber der extraoralen Haut auf (Hellwig, 2013). Während sie im Stratum basale noch eine kubische Form zeigen, werden sie im Laufe ihrer Wanderung flacher und verlieren immer mehr Zellorganellen, bis sie in der obersten Schicht, dem Stratum corneum, als kernlose Zellen abgestoßen werden (Schneider et al., 1996). Dieser Zellverlust an der Oberfläche ist der Grund warum basale und parabasale Keratinozyten auch als Keimzellen bezeichnet werden und eine hohe Mitoserate besitzen (Müssig et al., 2005). Hierbei gibt es circa 5-25% der Zellen, die sich mehrmals teilen können und andere Subgruppen die nur differenzierungsfähig sind (Hunyadi et al., 1990). Eine Hauptfunktion der Keratinozyten ist die Keratinproduktion (Müssig et al., 2005). Diese Keratin-Proteine bilden den Großteil des Zytoskeletts der Epithelien, indem sie als Heterodimere zusammen gelagert die Intermediärfilamente in den Keratinozyten formen (Müssig et al., 2005). Biochemisch können sie mit hoher Sensitivität als Marker die Differenzierung in Keratinozyten nachweisen (Müssig et al., 2005). Je nach Differenzierungsgrad und Ausprägung der Keratose produzieren sie andere Keratine (Müssig et al., 2005). Basal werden vor allem die Proteine K5, K14, K19 und K15 gebildet, während suprabasal bei keratinisierten Abschnitten K1 und K10 und bei nicht-keratinisierten Bereichen K4 und K13 den Hauptanteil ausmachen (Fritsch et al., 2018; Müssig et al., 2005). Mit ihrer Hilfe kann also auch die Herkunft einer Zelle ermittelt werden (Müssig et al., 2005). Eine weitere Funktion stellt die wichtige Rolle der Keratinozyten in der Zytokinproduktion dar (Hunyadi et al., 1990). Dies sind Proteine und Peptide, welche vergleichbar mit Hormonen eine Signalfunktion besitzen (Loppnow, 2001). Dabei sezernieren Keratinozyten proinflammatorische (bspw. Interleukin 6 oder TNF- $\alpha$ ), sowie wachstumsfördernde (bspw. TGF- $\alpha$ ) Zytokine (Bock et al., 2000). Mit Hilfe dieser Zytokine können unterschiedliche Zelltypen, wie Keratinozyten und Fibroblasten, untereinander kommunizieren (Nashan et al., 1999).

### 1.3. Interleukin 6

Das Interleukin 6 wurde 1986 das erste Mal als Verstärker für die Differenzierung von B Zellen (B-Lymphozyten) zu einer antikörperproduzierenden Zelle entdeckt (Masjedi et al., 2018).

Es besteht aus 185 Aminosäuren und ist somit ein kleines Glykopeptid, welches von vielen Immun- und Nichtimmunzellen, einschließlich den Keratinozyten, sezerniert wird (Masjedi et al., 2018).

Es hat Auswirkung auf unterschiedlichste immunologische und physiologische Prozesse im Körper, wie beispielsweise die Bildung von Akute-Phase-Proteinen, die Entzündungsreaktion, die antigenspezifische Immunreaktionen, die Hämatopoese, die Zellproliferation und den

Zellstoffwechsel (Masjedi et al., 2018; Wellner et al., 2012). Zusätzlich beeinflusst es die Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen (Wellner et al., 2012). Somit ist es ein wichtiger Marker für das reagierende Immunsystem (Scheller et al., 2007). Grund für die Ausschüttung von IL6 ist das Andocken von Fremdanitgenen, wie Pilz-, bakterielle-, virale Antigene, Zelltrümmer und freie DNS, an den Toll-like-Rezeptor, welcher zum angeborenen Abwehrsystem gehört (Thomas, 2005). Zusätzlich können aber auch zahlreiche extrinsische chemische Verbindungen wie HEMA oder TEGDMA die Produktion von IL6 induzieren (Wellner et al., 2012).

Um einen intrazellulären Signaltransduktionsweg anzustoßen, muss das Zytokin IL6 an den Interleukin 6 – Rezeptor Alpha (IL6R $\alpha$ ) binden (Rose-John et al., 2006). Dabei gibt es zwei unterschiedliche Formen. Es existieren die membranständigen IL6R $\alpha$ , welche nur auf wenigen Zelltypen, wie beispielsweise Hepatozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und ruhenden Lymphozyten, exprimiert werden (Rose-John et al., 2006). Zusätzlich gibt es lösliche Interleukin 6 – Rezeptoren (sIL6R $\alpha$ ), welche durch alternatives Spleißen oder proteolytische Spaltung entstehen können (Scheller et al., 2007). Im nächsten Schritt des Signalwegs wird durch das Binden des IL6 an den membranständigen IL6R $\alpha$ -Rezeptor eine Untereinheit des Rezeptors, das Glykoprotein gp 130 aktiviert (Scheller et al., 2007). Hierbei zeigt sich der Vorteil des löslichen IL6-Rezeptors, da er mit dem Interleukin 6 einen Komplex bildet, welcher Zellen mit dem gp 130 Glykoprotein aktivieren kann (Luig et al., 2015; Rose-John et al., 2006). Da dieses Membranprotein auf allen Zellen exprimiert wird, ermöglicht dieser Prozess, welcher auch als Transsignaling bezeichnet wird, einen stark vergrößerten Einflussbereich des Interleukins 6 (Scheller et al., 2007).

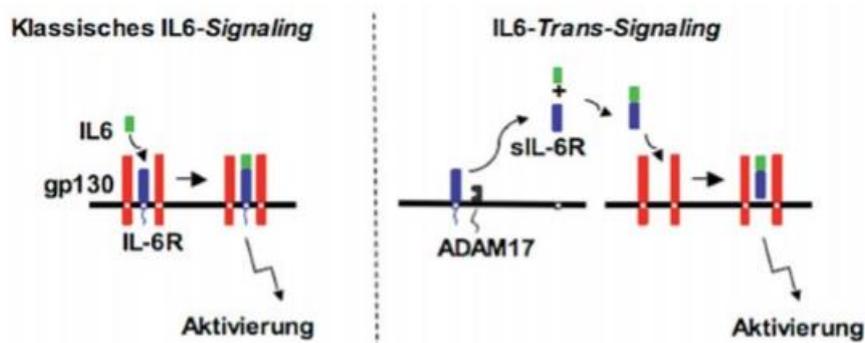


Abbildung 2: Gegenüberstellung der unterschiedlichen Arten des Signalings bei Interleukin 6 (übernommen aus (Scheller et al., 2007))

Durch die Aktivierung kommt es zu einer Dimerisierung des gp 130 und es entsteht ein Komplex aus IL6, (s)IL6R $\alpha$  und gp 130, welcher intrazellulär unterschiedliche Signalwege, wie beispielsweise den IL-6-JAK-STAT3-Signalweg, den Ras-MAPK-Signalweg oder die p38- und JNK-MAPK-Signalwege,

anstößt (Heinrich et al., 2003; Masjedi et al., 2018). Die Signalwege, welche über membranständige oder gelöste Rezeptoren angestoßen werden, ähneln sich. Allerdings scheint der klassische Signalweg eher für regenerative und entzündungshemmende Wirkungen zuständig zu sein, während das Transsignaling vor allem die Entzündungsreaktionen unterstützt (Masjedi et al., 2018).

#### 1.4. Interleukin 8

Das Interleukin 8 (IL8) ist ein chemotaktisches Zytokin und gehört zur  $\alpha$  Untergruppe, was bedeutet, dass seine ersten beiden Cysteinreste nur durch eine einzige Aminosäure getrennt sind. Das ist der Grund warum es auch als CXC Chemokin bezeichnet wird (Knall et al., 1996).

Dieses Interleukin spielt ebenso wie Interleukin 6 eine bedeutende Rolle bei der Entzündungsreaktion und ist zusätzlich auch in den Prozess der Wundheilung involviert (Nordsieck et al., 2018). So sorgt IL8 dafür, dass neutrophile Granulozyten an den Ort von Entzündungen, Verletzungen oder Infektionen gelockt werden, die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten, beispielweise an Endothelzellen, gefördert und auch deren Degranulation begünstigt wird (Knall et al., 1996; Zeilhofer et al., 2000). Des Weiteren ist es an Prozessen wie der Phagozytose nekrotischen Gewebes, der Abwehr bakterieller Infektionen und zahlreichen Autoimmunerkrankungen (z.B. Psoriasis) beteiligt (Zeilhofer et al., 2000).

Die Bildung und Ausschüttung von Interleukin 8 kann durch Entzündungssignale, wie beispielsweise dem Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), durch chemische oder umweltbedingte Reize, einschließlich Bestandteilen dentaler Kompositwerkstoffe, wie beispielsweise HEMA und TEGDMA, oder Steroidhormone, wie Androgene/Östrogene stimuliert werden (Vaughn et al., 2008; Wellner et al., 2012). Somit zeigte sich die wichtige Rolle der Keratinozyten beim Einstrom von Neutrophilen und T-Zellen in die Epidermis (Barker et al., 1991).

Das IL8 bindet an zwei membrangebundene, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Den CXCR1, welcher auch das Granulozyten-chemotaktische Protein 2 erkennt, und den CXCR2, bei dem die Aktivierung durch mehrere CXC-Chemokine erfolgen kann (Zeilhofer et al., 2000). Beide Rezeptoren werden unter anderem in neutrophilen Granulozyten exprimiert (Zeilhofer et al., 2000). Durch die Rezeptorbindung ändert sich die Konformation des Rezeptors, das Signal wird über die Membran übertragen und intrazelluläre Epitope werden frei, um die Bindung an funktionelle, heterotrimere G-Proteine zu fördern (Vaughn et al., 2008). Dadurch kann IL8 sowohl den Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Weg (MAPK) wie auch die Ras-GTP-Belastung aktivieren (Knall et al., 1996).

## 1.5. Temporäre zahnärztliche Versorgungen

Ein Provisorium (von lat. provisio = Vorsorge) (Joda et al., 2009) wird in der Zahnmedizin als vorübergehende Versorgung eines präparierten Zahnes oder einer Lückensituation bis zur Eingliederung der definitiven Restauration angesehen. Dabei lassen sich festsitzende, festsitzend-abnehmbare und abnehmbare provisorische Restaurationen unterscheiden (Joda et al., 2009). Grund für den vorübergehenden Ersatz sind unter anderem die Ästhetik, Phonetik, Kaufunktion, aber auch der Schutz der Pulpa des präparierten Zahnes vor Umwelteinflüssen. Weitere Aspekte betreffen die Ausformung der Weichgewebe, den Erhalt der Kontakte sowohl okklusal als auch approximal und das Provisorium als Mittel der Diagnostik, um Form, Funktion und Ästhetik auszutesten.

Eine provisorische zahnärztliche Versorgung kann auf verschiedene Arten hergestellt werden. Dabei gibt es die direkte Herstellung am Patienten, mit Hilfe eines Abdrucks oder einer Tiefziehfolie, die indirekte Fertigung eines individuellen Provisoriums im Labor und die indirekt-direkte Methode mit vorgefertigten Hülsen oder Provisorien die noch individualisiert beziehungsweise angepasst und anschließend lichtpolymerisiert werden müssen (Hannak, 2017). Die am häufigsten verwendete Methode stellt die Verwendung von vorher erstellten Abformungen (Schlüssel), entweder mit Alginat oder Silikon dar (Hannak, 2017). Hierbei zeigt vor allem das Silikon Vorteile im Sinne der Lagerungsfähigkeit, welche es möglich macht, auf Frakturen oder den vollständigen Verlust während der Tragezeit des Provisoriums schnell und einfach reagieren zu können (Hannak, 2017). Provisorien werden meist aus Kunststoffen gefertigt. Zur direkten Provisorienherstellung können entweder Pulver/Flüssigkeits-Systeme auf der Basis von PMMA (Polymethylmethacrylat), höhermolekulare Acrylate als selbsthärtendes Pulver/Flüssigkeits-System mit PEMA (Polyethylmethacrylat)-Pulver oder Paste/Paste-Systeme wie das in diesem Versuch als Negativprobe verwendete Luxatemp (DMG, Hamburg), auf Di-Methacrylat-Basis genutzt werden (Hannak, 2017; Stawarczyk et al., 2008).

Die Materialien müssen trotz der teils nur kurzen Verweildauer vielen Ansprüchen gerecht werden. Sie sind einfach in der Anwendung und Mischbarkeit und zeigen keine ausgeprägte Schrumpfung und Expansion, um Fehlerquellen in der klinischen Anwendung zu reduzieren. Um die Pulpa des zu versorgenden Zahnes zu schonen, wird die Temperaturentwicklung während des Abbindens niedrig gehalten. Da der Patient über die Dauer des Tragens die Funktion und Ästhetik erproben soll, weisen die Provisorien mechanische Stabilität und Farbstabilität auf. Des Weiteren ist es möglich, im Notfall Reparaturen durchzuführen, sie gut labortechnisch zu bearbeiten und zu polieren. Zusätzlich sind die

Provisorienmaterialien röntgenologisch sichtbar. Einer der wichtigsten Punkte betrifft außerdem die biologische Verträglichkeit (Hannak, 2017).

Durch die für den Kunststoff nicht optimalen Bedingungen beim Herstellungsprozess weisen direkt hergestellte Provisorien oft keine optimale Qualität auf (Edelhoff et al., 2010). Dadurch bieten kleine Risse, Poren und Unebenheiten Raum für Verfärbungen und Besiedelung des Materials durch Bakterien (Edelhoff et al., 2010). Auf Dauer kann das die Festigkeit und Gewebefreundlichkeit negativ beeinflussen (Edelhoff et al., 2010).

Das ist ein wesentlicher Grund für die Verwendung von indirekten Provisorien, falls die klinische Nutzung einer provisorischen Versorgung mehr als drei Monate dauert (Edelhoff et al., 2010). Hierbei werden heutzutage häufig sogenannte Hochleistungspolymere verwendet, welche mit Hilfe der *computer aided design/computer aided manufacturing* (CAD/CAM)- Technologie verarbeitet werden (Stawarczyk et al., 2010). Diese können auf Basis von hochvernetzten PMMA-Kunststoffen oder Kompositen sein (Edelhoff et al., 2010). Der Vorteil dieser Materialien ist die industrielle Herstellung und die daraus resultierenden deutlich besseren Materialeigenschaften (Edelhoff et al., 2010). Durch diese Langzeitprovisorien hat der Behandler die Möglichkeit, den Zahnersatz funktionell, phonetisch und auch ästhetisch klinisch über einen längeren Zeitraum zu testen, sowie eine parodontale Behandlung durchzuführen oder auch die endgültige Entscheidung über die Pfeilerqualität der für den Zahnersatz geplanten Zähne zu treffen (Edelhoff et al., 2010). Auf Grund des hohen Materialverlustes bei subtraktiv gefertigten Provisorien stieg die Nachfrage nach einem Verfahren ohne ausgeprägten Verschleiß, weshalb die Tür für die Anwendung von additiven Techniken in der Zahnmedizin geöffnet wurde.

## 1.6. Dentale Kompositwerkstoffe

Wie bereits in Kapitel 1.5. erwähnt, werden Provisorien meist aus Kompositen gefertigt. Dentale Restaurationskomposite bestehen aus unterschiedlichen organischen und anorganischen Materialien und einer Kombination von Makromolekülen, welche durch die Polymerisation von kleineren reaktiven Monomeren entstehen (Stawarczyk et al., 2008). Die drei Hauptbestandteile sind anorganische Füllkörper, die organische Matrix und Haftvermittler (Ilie, 2017). Um die Kunststoffe an die jeweiligen Einsatzgebiete anzupassen, werden Zusätze wie Weichmacher, Katalysatoren, Inhibitoren, Co-Monomere, Co-Polymere, UV-Absorber, Vernetzer, Initiatoren und Acceleratoren hinzugefügt (Stawarczyk et al., 2008). Als Füller werden kompakte Partikel, wie Glas, Glaskeramiken, Fluoride, Silikate oder Metalloxide, verwendet (Ilie, 2017). Genutzt werden teilweise auch poröse

Füllkörper, Fasern, Nanofüller und Vorpolymerisate, beispielsweise um die Schrumpfung, die bei der Polymerisation auftritt, zu verkleinern (Ilie, 2017).

In neueren Kompositen werden Füllkörper angeboten, welche eine remineralisierende Wirkung haben (Ilie, 2017). Ziel des Füllkörpereinsatzes ist die bessere Handhabung, die Reduktion der Abrasion, die Steigerung der Festigkeit, die geringere Wasseraufnahme, die oben erwähnte geringere Schrumpfung und auch die höhere Röntgendichte (Ilie et al., 2016). Dabei können die Komposite auch anhand der Füllkörpergröße unterteilt werden. Es existieren Makrofüllerkomposite (0,1- 100  $\mu\text{m}$ ), Mikrofüllerkomposite (0,05 – 0,1  $\mu\text{m}$ ), welche inhomogen oder homogen sein können, und die Hybridkomposite (Ilie et al., 2016; Lutz et al., 1983). Sie stellen eine Kombination der eben erwähnten Makro- und Mikrofüller dar und lassen sich in Feinpartikel- (mittlere Korngröße < 5  $\mu\text{m}$ ), Feinstpartikel- (< 3  $\mu\text{m}$ ) und Submikrometerhybridkomposite (mittlere Korngröße < 1  $\mu\text{m}$ ) aufteilen (Ernst, 2010). Mit der Entwicklung der Nanokomposite (2 – 75 nm) bot sich die Möglichkeit der Nano hybridkomposite, welche heutzutage auf die Füller bezogen das Mittel der ersten Wahl sind (Ernst, 2010; Ilie et al., 2016). Die organische Matrix besteht aus einer Kombination von unterschiedlichen Monomeren, beispielsweise Bis-GMA (Bisphenyl-A-Glycidyl-Methacrylat), UDMA (Urethandimethacrylat), TEGDMA (Triethylenglycoldimethacrylat) oder HEMA (Hydroxyethylmethacrylat) (Ilie, 2017). Sie bettet die Füllstoffe ein und bildet dazu unter Vermittlung von Silanen eine feste chemische Bindung aus (Ilie, 2017). Die kurzkettigen Monomere wie HEMA und TEGDMA sorgen für eine niedrigere Viskosität und durch ihre reaktiven Gruppen für eine verbesserte Vernetzung und somit für eine höhere Konversionsrate (Gonçalves et al., 2009). Eine höhere Viskosität, aber auch eine Senkung der Flexibilität und Reaktivität, entsteht durch längere Ketten mit vielen funktionellen Gruppen (Taormina et al., 2018). Solche Monomere mit hohem Molekulargewicht, wie UDMA und Bis-GMA, sorgen für verbesserte mechanische Eigenschaften, da sie eine verringerte Schrumpfung des Werkstücks ermöglichen (Samuel Clark Ligon et al., 2017; Mayer et al., 2019). Funktionell werden die Komposite erst nach der Konversion der Monomere zu Polymeren (Schweikl, 2011). Bei dieser Kettenpolymerisation werden nicht alle Monomere polymerisiert und es verbleiben vereinzelte Restmonomere, welche beispielsweise durch Speichel aus den Kunststoffen herausgelöst werden können (Schweikl, 2011). Dabei zeigen lighthärtende Komposite eine höhere Konversionsrate als chemisch, selbsthärtende Komposite (Asmussen, 1982). Dies hat einerseits negative Einflüsse auf die Stabilität, aber auch biologische Auswirkungen auf Zellen und Gewebe (Schweikl, 2011). Eine mögliche Folge ist unter anderem die Entwicklung von Allergien, insbesondere vom Spättyp, welche überwiegend bei zahnärztlichem Personal und Zahntechnikern beobachtet werden (Geurtsen, 2000; Schweikl, 2011). So konnten beispielsweise TEGDMA und HEMA während einer zahnärztlichen

Behandlung in der Raumluft nachgewiesen werden (Ansteinsson et al., 2011). Zu den Folgen der Exposition gegenüber Monomerverbindungen zählen dabei, neben den bereits erwähnten Allergien, weitere Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis, insbesondere Asthma, aber auch die Manifestation von Gingivitiden, sowie kutanen Autoimmunerkrankungen wie zum Beispiel der Lichen planus (Syed et al., 2015). Auch für eine systemische Wirkung der Monomere gibt es verschiedene Anhaltspunkte (Geurtsen, 2000). In diesem Rahmen wurde bei der Untersuchung an Tieren festgestellt, dass die im Speichel gelösten Monomere verschluckt werden, auf diesem Weg in das Verdauungssystem gelangen und hier vollständig aufgenommen werden (Reichl, 2011). Im Folgenden werden sie unter der Bildung von Zwischenprodukten zu Kohlendioxid abgebaut (Reichl, 2011). Die eben erwähnten Produkte der Verstoffwechslung zeigen aber selbst teilweise toxisches Potenzial, wie bei dem Abbau von TEGDMA und HEMA (Reichl et al., 2002). Hierbei entsteht 2,3-Epoxyethacrylsäure, welches als Mitglied der Epoxy-Verbindungen als krebserregend und erbgutverändernd gilt (Durner et al., 2010). In anderen Studien zeigten sich Effekte auf direkt umliegende Gewebe und Strukturen, indem eine Reduktion der Hydroxylapatitbildung nach TEGDMA Einfluss ermittelt werden konnte (Schweikl, 2011).

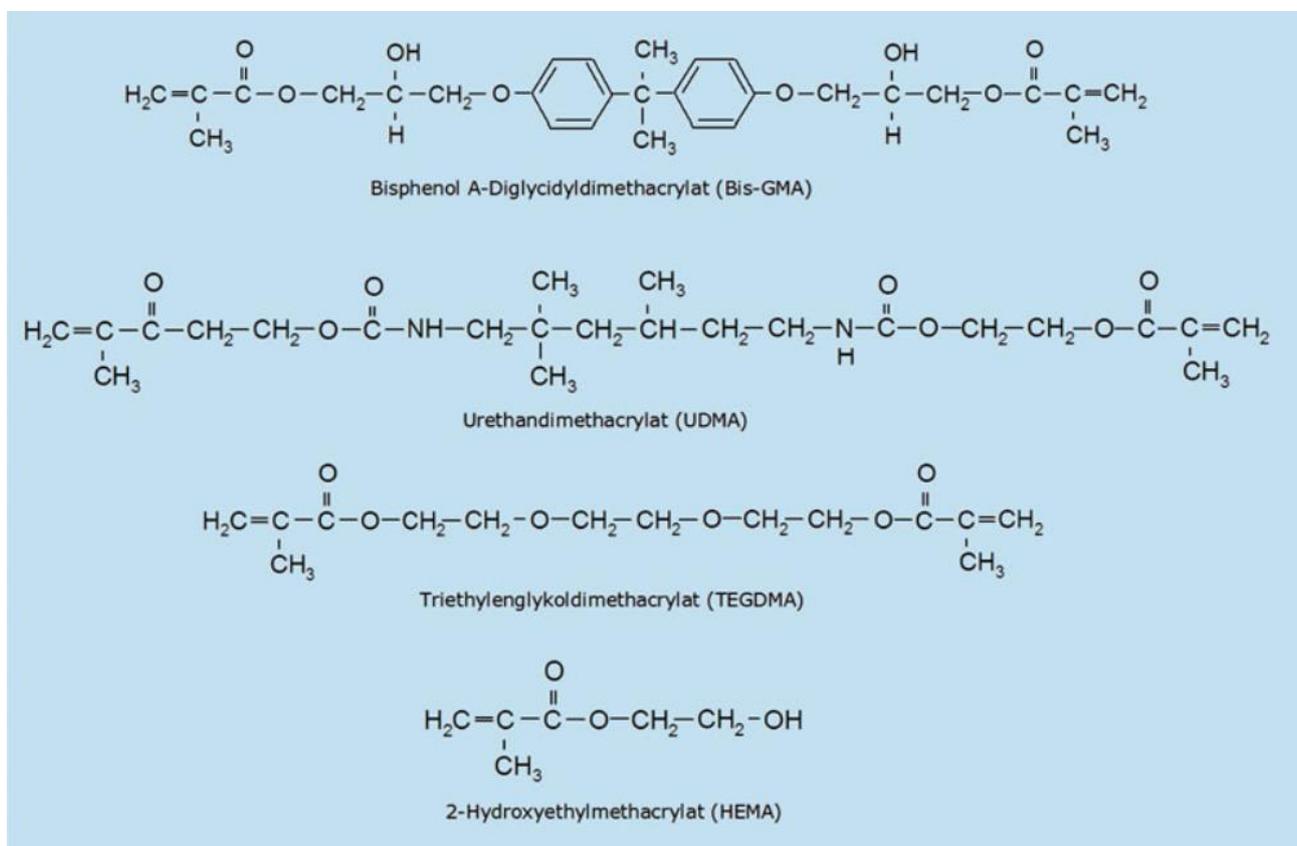


Abbildung 3: Aufbau der Monomere Bis-GMA, UDMA, TEGDMA, HEMA (übernommen aus (Schweikl, 2011))

## 1.7. Luxatemp

Luxatemp ist, wie bereits in Kapitel 1.5. erwähnt, ein selbsthärtendes Material auf Bis-Acryl-Komposit-Basis und wird durch eine Automixkartusche aus zwei pastenartigen Komponenten gemischt (DMG Chemisch-Pharmazeutische Fabrik GmbH, 2015). Das Verhältnis von Basispaste zu Katalysator beträgt 10:1 (DMG Chemisch-Pharmazeutische Fabrik GmbH). Die Hauptbestandteile sind ähnlich wie die der dentalen Restauraionskomposite und bestehen aus Glasfüllkörpern, eingebettet in multifunktionelle Methacrylate, mit Zusätzen von Katalysatoren, Stabilisatoren und Additiven (DMG Chemisch-Pharmazeutische Fabrik GmbH, 2015). Die Größe der Füllpartikel liegt zwischen 0,02 und 2,5 µm und der Füllkörperanteil beträgt 44 Gewichts% (DMG Chemisch-Pharmazeutische Fabrik GmbH, 2015). Es wird zur direkten Herstellung provisorischer Kronen, Inlays, Onlays, Teilkronen oder Brücken verwendet (DMG Chemisch-Pharmazeutische Fabrik GmbH, 2015). Das Paste/Paste-System zeigt sehr viele Vorteile. So entsteht im Vergleich zu den Pulver/Flüssigkeits-Systemen weniger Wärme bei der Abbindereaktion, es weist eine geringere Schrumpfung und nach der Abbindung eine größere Härte auf (Hannak, 2017). Durch eine oberflächliche Sauerstoffinhibitionsschicht kann, falls notwendig, ohne großen Aufwand Material ergänzt oder die Schicht durch einfaches Abspülen mit Wasser entfernt werden, um das Provisorium mit Fräsen und Polierern auszuarbeiten. Dieser Schritt kann zeitintensiv sein (Hannak, 2017). Ein weiterer Vorteil ist das Anmischen mit der Automatrix-Sicherheitskartusche, welches die Anwendung sehr einfach und zeitsparend gestaltet, sowie die Qualität durch immer gleiches Anmischen konstant hält (Joda et al., 2009). Als Nachteil gilt die kurze Abbindezeit, die in der klinischen Anwendung dieser Systeme etwas Übung erfordert, um ein gutes Ergebnis sicherzustellen (Hannak, 2017). Mehrere Untersuchungen konnten bestätigen, dass Paste/Paste Systeme auf Bis-Acryl-Komposit-Basis gegenüber den PMMA basierten Materialien überlegen sind (Edelhoff et al., 2010). Trotz der Abwesenheit von Methylmethacrylat (MMA) kann es beispielsweise durch Dimethacrylate dennoch zu einer allergischen Irritation der Haut, Augen und der Atemwege kommen (DMG, 2015). Auch eine zytotoxische Wirkung konnte nachgewiesen werden (Peralta et al., 2018).

## 1.8. Computer Aided Design (CAD)/ Computer Aided Manufacturing (CAM) Technologie

Die CAD (Computer Aided Design)/ CAM (Computer Aided Manufacturing) Technologie setzt sich aus zwei methodischen Ansätzen zusammen, die eine vollautomatisierte Fertigung (CAM) von Zahnersatz

ermöglichen, welcher zuvor am Computer digital entworfen und geplant wurde (CAD) (Stawarczyk et al., 2008). Die Fertigung kann entweder als additives Verfahren oder mittels subtraktiver Techniken erfolgen (Dauti, 2015). Notwendig dafür ist die dreidimensionale Registrierung der Präparation des Zahnstumpfes. Dies ist mittels optischer Scanner möglich, die nach dem Konfokalprinzip arbeiten (Porter et al., 2018). Hierfür wird ein Laser auf das Zahnhart- und Weichgewebe gestrahlt (Porter et al., 2018). Dabei kommt es zu einer Reflexion des Lichtbündels, welches mittels spezieller Filter in die Mitte des Brennpunktes der Linse auf den Sensor übertragen wird (Porter et al., 2018). Die Linse wird über den zu scannenden Bereich bewegt und nimmt einzelne Schnittbilder auf, welche für das vollständige Bild im Sinne der Punkt- und Stichrekonstruktion digital kombiniert werden (Porter et al., 2018).

Die CAD/CAM Technologie kann unterschiedlich verwendet werden. Beim sogenannten *chairside*-Verfahren wird die Präparation im Sinne eines digitalen Abdrucks mit Hilfe einer Intraoralkamera vermessen. So kann die Restauration in der Praxis digital konstruiert und gleich im Anschluss gefräst oder gedruckt und eingesetzt werden (Stawarczyk et al., 2008). Das bietet die Möglichkeit, den Zahndefekt noch in derselben Sitzung mit einer Restauration zu versorgen. Alternativ kann man bei anderen Systemen einen konventionellen Abdruck anfertigen, um den Vorteil der Präzisionsabformung zu nutzen, dieser wird im Labor wie gewohnt mit Gips ausgegossen und das Modell anschließend für einen extraoralen Scan genutzt (Stawarczyk et al., 2008). Diese Methode wird als *labside*-Technik bezeichnet (Stawarczyk et al., 2008). Die digitalen Datensätze der Konstruktion werden gespeichert und können so zu jeder Zeit für die Herstellung eines neuen Provisoriums genutzt werden.

Bei der Nutzung der ersten CAD/CAM-Systeme wurde vorwiegend die subtraktive Fertigung angewendet, weshalb es zum jetzigen Zeitpunkt klinisch gut erprobt ist und ein bewährtes Verfahren darstellt (Dauti, 2015). Hierbei können Fräseinheiten mit 4 oder 5 Fräsachsen zur Anwendung kommen (Beuer et al., 2008). Die dabei eingesetzten Instrumente haben einen bestimmten Durchmesser, welcher festlegt, wie groß der zu entfernende Bereich ausfallen muss (Hajtó, 2010). Die Herstellung von sehr klein dimensionierten, grazilen Strukturen ist technisch häufig nicht möglich (Hajtó, 2010). Dies wird bereits in der Modellersoftware des CAD/CAM-Systems berücksichtigt und als Fräsradiuskorrektur bezeichnet (Hajtó, 2010). Negative Auswirkungen resultieren dadurch vor allem in Bezug auf die Materialstärke und die Passung (Hajtó, 2010). Ein weiterer negativer Aspekt der subtraktiven Frästechnik ist der hohe Materialverschleiß (Beuer et al., 2008).

Eine Vielzahl unterschiedlicher Materialien, wie Metalle, Keramiken oder auch Kunststoffe können grundsätzlich gefräst werden, die in der Regel als vorgefertigte Rohlinge in die Fräseinheiten

eingebraucht werden (Beuer et al., 2008).

Die Rohlinge für CAD/CAM hergestellte Kunststoffprovisorien werden zuvor industriell polymerisiert (Stawarczyk et al., 2008). Dabei wird die Polymerisation durch zusätzliche Faktoren wie Hitze und Druck gefördert und gegenüber rein klinischen Verfahren erheblich intensiviert (B. Stawarczyk et al., 2012). Dies reduziert die Anisotropien, die bei der Polymerisation im zahntechnischen Labor und bei der direkten klinischen Anwendung auftreten können und sorgt für eine standardisierte Qualität im Materialgefüge und somit zu standardisierten physikalischen Eigenschaften (Stawarczyk et al., 2008). Es resultiert unter anderem eine größere Abrasionsstabilität im Vergleich zu manuell polymerisierten Kunststoffen (Stawarczyk et al., 2010). Auch kann der Restmonomergehalt niedrig gehalten werden, was sich zusammen mit der Methylmethacrylat (MMA)-Freiheit positiv auf die Biokompatibilität auswirkt (Stawarczyk et al., 2008).

Die industriell gefertigten Rohmaterialien bestehen aus Nanohybridkompositen die zu 86 Gewichts% mit anorganischen Partikeln gefüllt sind und eine Polymermatrix enthalten (Voco GmbH, 2018). Durch die Möglichkeiten, die CAD/CAM Technologie zur Bearbeitung von dentalen Kunststoffen einzusetzen, sowie die aktuell intensive Entwicklung von sogenannten Hochleistungswerkstoffen, konnte für diese Materialien inzwischen ein stetig wachsender Indikationsbereich in der Zahnheilkunde erarbeitet werden (Stawarczyk et al., 2010). Durch die industrielle Produktion und die Herstellung des eigentlichen Werkstücks mit dem subtraktiven CAD/CAM Verfahren können hohe Bruchlastwerte von mehr als 400 N erzeugt werden, wodurch sich diese Kunststoffe beispielsweise für den Einsatz zur Herstellung von Langzeitprovisorien eignen (Stawarczyk et al., 2010). Einen weiteren Vorteil bildet der Verzicht auf eine klinische Polymerisation während des Fertigungs des Provisoriums und die damit verbundene Abwesenheit einer Polymerisations-assoziierten Schrumpfung und der daraus resultierenden besseren Formstabilität. Nachteilig zeigt sich bei diesem Verfahren vor allem der Materialverlust, welcher bei subtraktiven Verfahren bis zu 80- 90% betragen kann und somit die Verwendung von Edelmetallen für die subtraktive Technik ausschließt. Die erhebliche Herstellungsdauer für die Fertigung der Werkstücke ist ebenfalls als Nachteil zu werten (Dauti, 2015).

### 1.9. Additive Fertigungsverfahren

Den ersten Schritt für die generative Fertigung machte François Willème 1860 (Breuninger et al., 2013). Er schaffte es durch 24 Fotografien, welche ihn zum selben Zeitpunkt aus unterschiedlichen Blickwinkeln zeigten, eine Figur seiner selbst zu erschaffen, indem er seinen Umriss auf jedem Bild ausschnitt und alles zusammenfügte (Breuninger et al., 2013). Mit dem Patent für den

stereolithographischen Druck von Chuck Hull 1986 wurde der Anstoß für die Entwicklung vieler unterschiedlicher Verfahren geliefert (Kessler, Hickel, et al., 2020). Da viele der Verfahrenspatente rechtlich geschützt waren, sorgten die daraus resultierenden hohen Kosten dafür, dass die Weiterentwicklung und Verbreitung der Technik zunächst sehr eingeschränkt wurde (Kessler, Hickel, et al., 2020). Ausschlaggebend für die intensivere Nutzung des 3D Drucks war daher das Auslaufen vieler dieser Patente vor einigen Jahren, was zur Evolution der Verfahren zu geringeren Kosten führte (Kessler, Hickel, et al., 2020). Der Dreidimensionale Druck ist ein Sammelbegriff für additive Verfahren (*additive manufacturing* = AM (Reymus et al., 2019)), denen als Grundprinzip der schichtweise Aufbau beliebig geformter Körper nach einem digital konstruierten Modell gemein ist (Aimar et al., 2019; Kessler, Reichl, et al., 2020; Stansbury et al., 2016). Mit Hilfe eines intraoralen Scanners, wird die dreidimensionale Oberfläche als digitale Punktwolke dargestellt (Kazhdan et al., 2006). Da diese aber auf Grund von Ungenauigkeiten bei der Probenahme oder durch erschwerte Zugänglichkeit des Scangebietes teilweise sehr verrauscht ist, müssen die dadurch entstehenden Löcher in der unbekanntenen Oberfläche geschlossen werden (Kazhdan et al., 2006). Dafür werden Rekonstruktionsmethoden verwendet, welche die Punkte zu einem Netz aus Dreiecken verbinden, um den leeren Raum zu schließen (Kazhdan et al., 2006). Da jede Struktur mit Hilfe von Dreiecken dargestellt werden muss, kommt es vor allem bei kreisförmigen Gebilden zu Ungenauigkeiten, welche Sekantenfehler genannt werden (Gebhardt, 2017). Dieses Format wird als *standard tessellation language* (STL) bezeichnet (Klemp, 2015). Das zu druckende Objekt wird anschließend für den Druckvorgang in Schichten geteilt (Slicen) (Aimar et al., 2019). Diese einzelnen Slice-Informationen werden nacheinander im Sinne von x- und y-Koordinaten an den Drucker übermittelt (S. C. Ligon et al., 2017). So wird der dreidimensionale Körper in vereinfachte zweidimensionale Schichten unterteilt und somit schichtweise entlang der z-Achse aufgebaut (Aimar et al., 2019; Klemp, 2015; S. C. Ligon et al., 2017). Dieses Aufbauverfahren sorgt für eine Anisotropie im Bereich der angrenzenden Schichten, welche die mechanischen Eigenschaften des Druckobjekts negativ beeinflussen kann (S. C. Ligon et al., 2017; Reymus et al., 2019). Dabei ist zu bedenken, dass die Präzision des Drucks auch von der Dicke der Schichten abhängt. Allerdings geht eine geringe Schichtdicke, welche eine hohe Genauigkeit verspricht, mit einer längeren Verarbeitungszeit einher (von See, 2019). Die Schichten haben eine Dicke von 25-100 µm (Mayer et al., 2019). Somit ist es möglich, einen Körper ohne ein formgebendes Werkzeug herzustellen (Schmid, 2015). Dadurch können auch komplexe Geometrien gedruckt werden, das Verfahren ist sehr genau und ermöglicht eine glatte Oberflächenstruktur (Aimar et al., 2019). Im Vergleich zu subtraktiven Techniken hat es den Vorteil, dass der Anteil des Materialverlustes um bis zu 40% gesenkt wird, außerdem mehrere Objekte zeitgleich hergestellt werden können und vor allem

der kostenintensive Verschleiß von Fräsen entfällt (Mayer et al., 2019; Reymus et al., 2019). In der Industrie sind die genannten Punkte zusammen mit den niedrigen Preisen trotz komplizierter Strukturen der Hauptgrund für den Einsatz dieser Technologie (Schmid, 2015). Hier kennt man das additive Fertigen unter dem Namen *rapid prototyping* (RP) bereits seit längerer Zeit (Schmid, 2015). In der Zahnmedizin müssen die Eigenschaften der so hergestellten Werkstoffe noch weiter erforscht und getestet werden. Im Folgenden werden unterschiedliche Prozesse des dreidimensionalen Drucks erläutert.

#### 1.9.1. Selektives Lasersintern (SLS)

Beim selektiven Sintern kommt es durch eine Energiequelle zum punktförmigen Schmelzen eines zuvor aufgetragenen Granulats, welches in einen zusammenhängenden Körper verwandelt wird (Deckard, 1989; Lachmayer et al., 2016). Nach Verbinden der ersten Schicht wird die Bauplatte um die vorgesehene Schichtdicke tiefer gesetzt, um nach dem erneuten Pulverauftrag folgend die nächste Schicht zu erwärmen (Lachmayer et al., 2016). Dabei dient das nicht geschmolzene Pulver als Stützelement (Rietzel et al., 2011). Das Granulat kann entweder aus Kunststoff, Keramik, Legierungen oder Metall (*selective laser melting* SLM) hergestellt werden (Feldmann et al., 2016). Beim Verwenden von Kunststoff sorgt beispielsweise der Einsatz des CO<sub>2</sub>-Lasers für ein zu geringes Aufschmelzen des Pulvers oder das Verdampfen des Kunststoffs (Exner et al., 2008). Deshalb wird das Granulat bis kurz vor den Schmelzpunkt erwärmt und der Laser steuert punktuell nur die geringe Restenergie zu (Exner et al., 2008). Zum Vorheizen werden Temperaturen von circa 200°C benötigt (Poprawe, 2005). Vorteil dieser Methode ist, dass das Stützmaterial am zu druckenden Körper nicht geschmolzen ist und somit ein Entfernen leicht fällt (Rietzel et al., 2011). Die Dichte der erzeugten Bauteile erreicht bei diesem Verfahren allerdings maximal 60-85% (Lachmayer et al., 2016)

#### 1.9.2. Layer Lamine Manufacturing (LLM)

Bei diesem Verfahren, welches auch als *laminated object manufacturing* (LOM) bezeichnet wird, müssen die Materialien keiner Umwandlung unterzogen werden und es können deshalb zusätzliche Materialien wie beispielsweise Papier verwendet werden (Feygin et al., 1998). Bereits grob geformte Schichten werden horizontal übereinander gelegt und miteinander verklebt oder verschweißt, um ohne großen Zeitaufwand voluminöse Körper herzustellen (Feygin et al., 1998). Zum Zusammenfügen der Schichten kann auf eine Seite der Materialplatten ein Adhäsiv, welches entweder hitze- oder

drucksensibel ist, aufgetragen und mit Hilfe einer Walze, die über die Platten rollt, endgültig verbunden werden (Feygin et al., 1998). Mit Hilfe eines Werkzeugs, beispielsweise eines Lasers, wird dann die Silhouette des gewünschten Körpers hervorgebracht (Feygin et al., 1998). Dabei können die Überreste als Stützstruktur verwendet werden. Extra zu planende Stützen sind nicht mehr notwendig (Hagl, 2015). Verbindet man diese Technik mit der anschließenden Bearbeitung durch Fräsen kann ein übergangloses Objekt generiert werden (Hagl, 2015).

### 1.9.3. Fused Layer Modeling (FLM)

Diese Methode, auch *fused deposition modeling* (FDM) genannt, ist vor allem wegen den niedrigen Anschaffungskosten, der simplen Bedienung, sowie der Vielzahl an kompatiblen Materialien bekannt geworden (Wang et al., 2017). Beim FLM können ausschließlich Materialien verwendet werden, die durch Hitze in einen plastischen Zustand versetzt werden können (Azari et al., 2009). Extruder wärmen das Material an, bringen es an der gewünschten Stelle auf und durch das folgende Abkühlen beim Auftreffen auf die Bauplatte werden die Schichten aneinander gefügt (Hohenhoff et al., 2018). Das Material ist somit selbsthärtend. Nachteile zeigt diese Technik vor allem, wenn sich das Material nicht ausreichend auf der vorherigen Schicht verteilt, weil sich dadurch die Anisotropie vergrößert und gleichzeitig die mechanischen Eigenschaften des Objektes verschlechtern (Wang et al., 2017). Falls Objekte mit überstehenden Bereichen gedruckt werden sollen, müssen Stützstrukturen mit kleinen Sollbruchstellen ergänzt werden (Hohenhoff et al., 2018). Diese können mit einer zweiten Düse, welche mit einem brüchigerem, auswaschbarem Material gefüllt ist, angebracht werden, damit das spätere Entfernen erleichtert wird (Breuninger et al., 2013). Durch die Möglichkeit mehrere Düsen zu verwenden, kann hiermit auch ein mehrfarbiges Werkstück produziert werden (Azari et al., 2009).

### 1.9.4. Stereolithographie (SLA)

Die Stereolithographie gilt historisch als das erste additive Verfahren, für das bereits 1951 von Otto John Munz ein Patent beantragt wurde (Breuninger et al., 2013; Munz, 1956). Bei der heutigen Technik werden flüssige, photosensitive Monomere mittels eines Lasers zu Polymeren umgewandelt (Breuninger et al., 2013). Andere Materialien können mit dieser Technik bisher nicht verwendet werden (Azari et al., 2009). Es gibt zwei Varianten, die Technik umzusetzen (Lachmayer et al., 2016). Bei der *bottom-up*-Technik findet die Herstellung des Körpers in einem Becken mit flüssigen

Photopolymerharzen statt, indem das zu produzierende Teil schichtweise in die Flüssigkeit entlang der Z-Achse abgesenkt wird und eine Belichtung entlang der X-Y-Achse von oben erfolgt (Lachmayer et al., 2016; Mayer et al., 2019). Dabei hängt die Schichtdicke davon ab, wie gut die Benetzung des jeweiligen Materials ist (Lachmayer et al., 2016). Die Regelmäßigkeit der Schicht muss mit Hilfe eines Beschichters erzeugt werden (Lachmayer et al., 2016). Bei der zweiten Methode, welche als *top-down*-Technik bezeichnet wird, wird eine Druckerplatte, auf welcher der Körper entstehen soll, in eine Wanne mit flüssigem Harz getaucht (Mayer et al., 2019). Durch einen transparenten Glasboden in der Kunststoffwanne können Lichtstrahlen gezielt von unten die lichthärtenden Polymerharze verfestigen. Die Bauplatte wird nach jedem Härten um eine definierte Schichtdicke angehoben (Lachmayer et al., 2016). Das Bauvolumen wird somit nicht vom Volumen der Kunststoffwanne begrenzt (Mayer et al., 2019). Negativ ist allerdings die Entstehung einer Kraft beim Anheben der Platte, wie bei einem feuchten Wasserglas, welches von einem Glastisch hochgehoben werden soll. Diese abziehende Kraft kann beispielsweise durch Luft einschüsse die feine Konstruktion stören (Lachmayer et al., 2016). Für beide Techniken gilt, dass die polymerisierenden Lichtstrahlen in den einzelnen Schichten jeweils nach einem definierten Muster auftreffen, das sich aus dem digitalen Design des Körpers ergibt (Kessler, Hickel, et al., 2020; Mayer et al., 2019). Nach und nach entsteht so der entworfene Körper, welcher nach abgeschlossenem Druck allerdings noch fertig polymerisiert werden muss. Auf Grund dieser nur 95%igen Aushärtung während des Drucks, kann der Körper sich verformen, eine Nachhärtung ist somit unbedingt erforderlich (Azari et al., 2009; Breuninger et al., 2013). Um das Druckobjekt in der Druckphase an der Druckplatte zu fixieren, sind Stützstrukturen notwendig. Nachteilig ist hierbei allerdings die dadurch entstehende Erhöhung der Datenmenge und das zusätzlich benötigte Material. Ein weiterer Nachteil ist das Risiko für eine Beschädigung des hergestellten Bauteils beim Entfernen der Stützen (Poprawe, 2005). Vorteile zeigen sich bei dieser Technik in der hohen Präzision und der guten Oberflächenstruktur der damit produzierten Werkstücke (Azari et al., 2009).

#### 1.9.5. Digital Light Processing (DLP)

Eine weitere 3D Druckmethode stellt das *digital light processing* dar. Diese Technik ähnelt der eben erwähnten Stereolithographie im Sinne einer Umwandlung photosensitiver Harze mittels strukturiertem Licht (Kessler, Hickel, et al., 2020). Auch hierbei befinden sich die Harze in einer Wanne, in welche eine Bauplatte getaucht wird. Ähnlich wie bei der SLA-Technik gibt es sowohl eine *bottom-up*-, als auch eine *top-down*-Methode (Kessler et al., 2019; Santoliquido et al., 2019).

Anstatt aber wie bei der SLA-Technik jeden zu belichtenden Bereich mit dem Laser abzufahren, wird eine LED-Diode mit Hilfe von rechteckig angeordneten Spiegeln ähnlich eines Musters auf die Projektionsfläche übertragen (Kessler, Hickel, et al., 2020). Dieses digitale Mikrospiegelgerät (*digital micromirror device*, DMD) besteht aus mehreren Spiegeln, welche sich in zwei verschiedene Winkel ausrichten lassen (Kadry et al., 2019; Kessler, Hickel, et al., 2020). Die Auflösung der Projektion ist abhängig von der Anzahl der im DMD enthaltenen Spiegel (Kessler, Hickel, et al., 2020). Dabei besitzen herkömmliche Drucker zwischen einer Millionen und über zwei Millionen Spiegel (J. Zhang et al., 2020). Mit Hilfe dieser Technik kann das gesamte Bild der Schicht mit nur einer LED-Diode auf einmal auf die Bauplatte projiziert und das Material ausgehärtet werden (Kessler et al., 2019; Z. C. Zhang et al., 2019). Dies bringt deutliche Vorteile in der Druckgeschwindigkeit, vor allem beim Druck mehrerer Objekte (Z. C. Zhang et al., 2019). Zusätzlich zeigte sich im Vergleich zur SLA-Technik eine höhere Druckgenauigkeit bei Schichtdicken von 100µm und eine Auflösung des Drucks bis zu 10µm (Kadry et al., 2019; Z. C. Zhang et al., 2019).

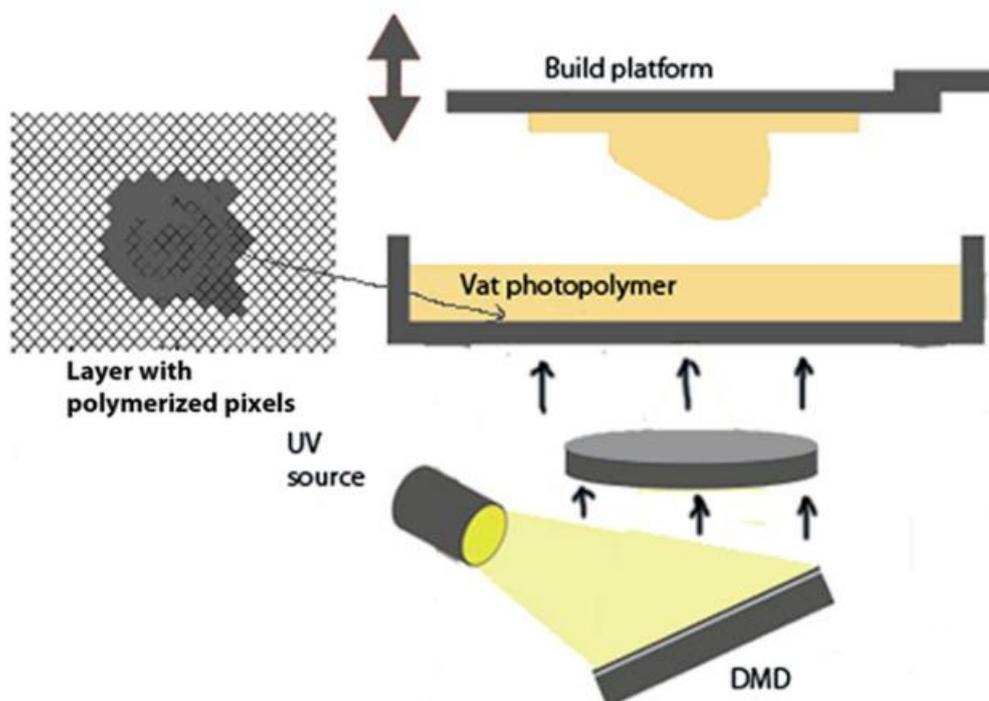


Abbildung 4: Schematische Darstellung der DLP top-down Technik (übernommen aus (Monzón et al., 2017))

#### 1.9.6. 3D- Druck- Materialien in der Zahnmedizin

Für die unterschiedlichen Druckverfahren können eine Vielzahl von Materialien verwendet werden. Unter anderem Metalle, Legierungen, Keramiken, Kunstharze, Epoxidharze, Elastomere und Kunststoffe (Feldmann et al., 2016). Für die Zahnmedizin sind hier bislang vor allem die Verwendung

von Metallen und Kunststoffen interessant, der Keramikdruck gelingt bisher nur unter rein experimentellen Bedingungen (von See, 2019). Kunststoffe bieten ein sehr wichtiges Feld, da hier der Druck mit einer Auflösung von wenigen Mikrometern möglich ist (Bruns et al., 2019). Für den 3D Druck werden photosensitive Harze verwendet (Mayer et al., 2019). Diese ähneln in den Grundbausteinen den bereits in Kapitel 1.6. erwähnten dentalen Kompositen (Mayer et al., 2019). Auch für den 3D Druck stellen Füllkörper einen wichtigen Bestandteil vieler Photopolymerharze dar, da sie für eine gesteigerte Genauigkeit durch das Reduzieren der Polymerisationsschrumpfung sorgen und zu einer Verbesserung der mechanischen Eigenschaften, sowie der Abrasionswerte beitragen (Mayer et al., 2019). Da Materialien für den 3D Druck fließfähig gehalten werden müssen, ist ihr Volumenanteil an Füllern jedoch geringer als der herkömmlicher Komposite (Kessler et al., 2019). Die Viskosität des Rohmaterials steigt proportional mit der Menge an Füllkörpern, weshalb diese nur begrenzt eingesetzt werden können (Taormina et al., 2018). Um ein gutes Nachfließen des Materials zu ermöglichen, sollte die Viskosität gering, also  $< 5 \text{ Pa/s}$ , sein (Taormina et al., 2018). Ist der relative Anteil von Füllkörpern zu hoch, kann mit dem Material auf Grund einer zu hohen Oberflächenspannung keine flache Oberflächenschicht zwischen Druckplatte und dem Boden des Kunststoffbeckens gebildet werden und das Objekt wird somit unvollständig gedruckt (Kessler et al., 2019). Eine ausreichend niedrige Viskosität wird durch weniger Füllpartikel mit größerem Durchmesser der einzelnen Füllkörper erreicht (Kessler et al., 2019). Durch ihr Gewicht kann es allerdings in den Aufbewahrungsbehältern zu einem Absinken und Verklumpen der Füllpartikel kommen, weshalb die Behälter vor dem Gebrauch geschüttelt werden sollten, um eine homogene Verteilung und somit auch immer wieder gleiche Materialbeschaffenheit zu erreichen (Taormina et al., 2018). Häufig entstehen dabei jedoch Lufteinschlüsse, die zur Blasenbildung in den gedruckten Objekten führen. Die Füllkörper nehmen durch eine Streuung des Lichts außerdem auch Einfluss auf die Aushärtungstiefe und können deshalb bei ungleicher Anordnung die Druckgenauigkeit negativ beeinflussen (Kessler et al., 2019). Der Zusammenhang zwischen Aushärtungstiefe und Lichtstreuung kann mit Hilfe des Gesetzes von Lambert Beer quantifiziert werden (Kessler et al., 2019).

$$z_p = \delta_p \ln \frac{t_p}{T_c}$$

Die Formel bezeichnet mit  $z_p$  die Eindringtiefe des Lichts entlang der z-Achse und mit  $t_p$  die benötigte Zeit bis zum Erreichen der kritischen Dosis der Aushärtung des Materials in der Tiefe  $z_p$  (Kessler, Hickel, et al., 2020).  $T_p$  beschreibt die Zeit bis die kritische Dosis der Polymerisation in der Tiefe  $z_o$  erreicht

wird und  $\delta_p$  steht für die charakteristische Eindringtiefe (Kessler, Hickel, et al., 2020). Diese Eindringtiefe setzt sich zusammen aus Parametern des Lichtes und des angewendeten Harzes (Kessler, Hickel, et al., 2020).

$$\delta_p = \frac{1}{\alpha} \quad \alpha = \frac{4\pi k}{\lambda}$$

Dabei ist  $\kappa$  der Extinktionskoeffizient, welcher die Eigenschaften des Harzes im Sinne von eingebrachten Füllkörpern, deren Oberfläche und der Brechungsindizes von Harz und Füllkörpern beschreibt und  $\lambda$  bezeichnet die Wellenlänge der verwendeten Lichtquelle (Kessler, Hickel, et al., 2020).

Die Partikel wirken sich nachteilig auf die Transparenz des Materials aus, da sie für eine Grenzschicht zwischen Füller und Matrix sorgen und so eine Lichtbrechung erzeugen, welche die Transparenz durch eine Reduktion der in die Tiefe gelangenden Lichtstrahlen vermindert (Ilie, 2016; Kessler, Hickel, et al., 2020; Mayer et al., 2019). Dies sorgt für eine größere Anisotropie und in Folge dessen wiederum zu verschlechterten mechanischen Eigenschaften oder sogar einem Druckabbruch, wenn sich die Schichten nicht verbinden (Kessler et al., 2019).

Bei den kommerziell verfügbaren Materialien gibt es sowohl gefüllte Harze, wie zum Beispiel GC Temp PRINT (GC Europe N. V., Leuven) und 3Delta Temp (Deltamed, Friedberg), als auch ungefüllte, wie beispielsweise Freeprint Temp UV (Detax Dental, Ettlingen) und Nextdent C&B (Nextdent, Soesterberg) (GC, 2019; Mayer et al., 2019). Die Matrix kann entweder aus den am häufigsten genutzten (Meth-)Acrylaten, welche durch radikale Photopolymerisation aushärten, oder aus Epoxiden/Vinylethern bestehen (Taormina et al., 2018). Bei der additiven Fertigung werden, ähnlich zu den dentalen Kompositen, vorwiegend UDMA, Bis-GMA, TEGDMA und HEMA verwendet (Kessler et al., 2019). Auch die Transparenz des Materials spielt eine große Rolle in der Polymerisationsreaktion, da während der kurzen Belichtungszeit ausreichend Licht die Photoinitiatoren erreichen muss, um diese zu stimulieren (Kessler, Hickel, et al., 2020; Taormina et al., 2018). Eine zusätzliche Unterstützung bieten auch die im Kapitel 1.6. erwähnten vernetzungsfähigen Monomere (Mayer et al., 2019). Da das Absorptionsspektrum des Initiators auch zur emittierten Wellenlänge des Druckers passen muss, sollte dieser Parameter bei der Materialauswahl berücksichtigt werden (Mayer et al., 2019).

Neuere Drucker arbeiten bei einer Wellenlänge von 385 nm, weshalb meistens der Initiator Diphenyl(2,4,6-trimethyl-benzoyl)phosphine oxide (TPO) mit einem Absorptionsmaximum von 365

nm zum Einsatz kommt (Kessler, Hickel, et al., 2020; Santini et al., 2013). Da die Belichtungszeit bei der additiven Fertigung nur sehr kurz ausfällt, müssen die Initiatoren in einer Konzentration von 3-5 Gewichts% vorliegen (Mayer et al., 2019). Wird ein Drucker mit einer Wellenlänge von 405 nm verwendet, muss die Menge des Initiators erhöht werden (Kessler, Hickel, et al., 2020). Angewendet wird der Kunststoffdruck für die Herstellung von Provisorien, Aufbissbehelfen, die Modellherstellung für zahntechnische Arbeiten, Bohrschablonen und auch für individuelle Löffel (von See, 2019). Um Provisorien aus Kunststoff zu drucken, können Materialien mit einer Matrix aus Monomethacrylaten oder aus multifunktionellen Acrylaten verwendet werden (Mayer et al., 2019). Eine geringere Toxizität, Wärmeentwicklung und Schrumpfung zeigen dabei die kostenintensiveren multifunktionellen Acrylate (Mayer et al., 2019). Alle Materialien haben gemeinsam, dass nach dem eigentlichen dreidimensionalen Druck eine Nachhärtung erfolgen muss, um die gewünschten mechanischen Eigenschaften und Biokompatibilität durch eine ausreichende Konversionsrate zu erreichen (Mayer et al., 2019). In der Zahnmedizin sind allerdings die Eigenschaften der additiv, mit dem 3D Druckverfahren hergestellten Kompositwerkstücke noch nicht abschließend erforscht. Beispielsweise die Bruchlast zeigte in Versuchen unserer Arbeitsgruppe einen niedrigeren Wert als bei gefrästen Kunststoffen (Reymus et al., 2019). Des Weiteren können die mechanischen Eigenschaften bei verschiedenen Verfahren auch durch die Positionierung des zu druckenden Objekts auf der Druckerplatte beeinflusst werden, weshalb bei unterschiedlicher Platzierung keine konstanten Materialeigenschaften gewährleistet werden können (Reymus et al., 2019). Ein ebenfalls negativ zu bewertender Punkt ist die deutlich höhere Flüssigkeitsaufnahme verglichen mit subtraktiv hergestellten Kunststoffen (Reymus et al., 2019). Dadurch verschlechtern sich die Eigenschaften der Kunststoffe deutlich, weshalb die Verwendung dieser Materialien für die Anfertigung von Langzeitprovisorien teilweise noch kritisch beurteilt wird (Reymus et al., 2019). In der Industrie zeigten sich Techniken bei denen eine Umformung der Materialien mit ultraviolettem (UV) Licht erfolgte, in der Langzeitstabilität ungenügend (Schmid, 2015). Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Harzmaterialien bei der Herstellung von Prothesenzähnen im Sinne der Bruchfestigkeit mit den konventionell vorgefertigten Prothesenzähnen vergleichbar sind (Chung et al., 2018).

## 2. Ziele der Arbeit

Ziel der Studie war es, mögliche Einflüsse von dreidimensional gedruckten Provisorienkunststoffen auf die Zellvitalität und Expression von proinflammatorischen Zytokinen von gingivalen Keratinozyten zu untersuchen. Dabei wurde ein Vergleich zwischen den unterschiedlichen 3D-Materialien untereinander, sowie Probenkörpern, die mittels subtraktiven CAD/CAM-Verfahrens hergestellt wurden, vorgenommen.

Bei diesen Untersuchungen wurde als Nullhypothese angenommen, dass keine Beeinflussung der Zellvitalität, sowie keine veränderte Produktion der Interleukine 6 und 8 auf Grund der Exposition gegenüber den untersuchten Materialien feststellbar ist.

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Zellen

Für die Versuche wurden humane Gingivakeratinozyten der Passage 10 des Spenders 1 (IHGK1 P10) verwendet, die von Professor Miosge (Universität Göttingen), zur Verfügung gestellt wurden. Die Zellen wurden mit Hilfe des Simian-Virus 40 immortalisiert. Das große T-Antigen des SV 40 zählt zu den meist genutzten Genen für die Immortalisierung (May et al., 2004). Durch seine Fähigkeit an Proteinprodukte von Tumorsuppressorgenen wie beispielsweise p53 oder pRB zu binden, werden diese inaktiviert und es kommt zu einer Populationsverdopplung über die natürliche Seneszenz der Zellen hinaus (Bryan et al., 1994; Itahana et al., 2001). Durch die Inaktivierung von p53 kommt es zusätzlich zu einer über weitere Gene vermittelte Hemmung der Telomeraseaktivität, was eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit und somit eine uneingeschränkte Lebensdauer zur Folge hat (Eberwein et al., 2011; Schneider-Stock et al., 2002; Shats et al., 2004).

### 3.2. Zellkultur

Die Keratinozyten wurden mit dem Keratinozyten Growth Medium 2 Kit (PromoCell, Heidelberg) unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank kultiviert. Um eine bakterielle Kontamination der Zellen durch die getesteten Materialien zu verhindern, wurde dem Zellmedium 1% Penicillin-Streptomycin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) zugesetzt. Das Medium wurde vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt. Aliquots von  $10^6$  IHGK1-Zellen der Passage 9 wurden aus zwei Kryoröhrchen, welche in flüssigem Stickstoff gelagert waren, langsam in einem Wasserbad auf eine Temperatur von 37 °C gebracht und zusammen mit frischem Medium in ein Falcon (Fa. Greiner, Nürtingen) gegeben. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand über dem Zellpellet mit einer Glaspasteurpipette abgesaugt, das Pellet mit 10 ml frischem Medium in eine T75 Kulturflasche (Fa. Greiner, Nürtingen) gegeben und für 5 Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle 3 Tage wurden die Zellen mit frischem Nährmedium versorgt. Zum Starten des Versuchs wurden die Zellen passagiert, ausgezählt und anschließend in einer definierten Zellzahl ausgesät. Dafür wurden sie nach zweimaligem Waschen mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS von Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) mit einer Trypsin/Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Lösung (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) vom Boden der Kulturflasche gelöst. Nachfolgend wurde die Flasche mit dem zugefügten Trypsin/EDTA für 10-15 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und der Zellverband aufgelöst (Schrödel, 2009). Im Anschluss wurde die Kulturflasche mit fetalem Kälberserum/fetal bovine serum (FBS) (Sigma Aldrich,

St. Louis, MO, USA) und Zellkulturmedium gespült, um die Reaktion von Trypsin und EDTA zu stoppen. Die Flüssigkeit, inklusive der gelösten Zellen, wurde abgenommen und in einem 50ml Falcon 10 Minuten bei 300g zentrifugiert (Allegra X-15R, Allegra 25R, Beckman Coulter). Dadurch sammelt sich ein Zellpellet am Boden des Falcons. Die Flüssigkeit oberhalb wird mit einer Gaspasteurpipette abgesaugt. Um die Anzahl der Zellen zu ermitteln, wurde das Zellpellet in 10ml Kulturmedium erneut gelöst und ein Aliquot von 100µl abgenommen, die mit ebenfalls 100µl des anionischen Bisazofarbstoffes Tyrpanblau (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) vermischt werden. Dieses Gemisch wurde zwischen die zwei Glasplättchen einer Neubauer Zählkammer eingebracht. Unter dem Lichtmikroskop betrachtet, zeigten sich nur noch wenig vitale Zellen als durchgehend blau gefärbt, während lebende Zellen ausschließlich einen blauen Zellkern aufwiesen. Der Mittelwert der vitalen Zellen aus den vier ausgezählten Quadraten der Zählkammer wurde mit dem Volumen der Zählkammer verrechnet, um so die Konzentration der Zellsuspension zu ermitteln. Für den Versuch wurden schließlich 5000 Zellen pro Well mit 0,5 ml Zellkulturmedium in einer 24 Wellplatte ausgesät. Da durch das Trypsinieren eine Passagierung vorgenommen wurde, befanden sich die verwendeten Keratinozyten für den Versuch in der Passage 10.

Die Versuchswells wurden sechs Tage vorkultiviert, sodass eine Konfluenz von 100 % erreicht wurde. Pro Versuch wurden vier Messzeitpunkte festgelegt. Somit wurden für jeden Versuch vier Wellplatten ausgesät. Pro Platte waren je Material drei technische Replikate enthalten und der Versuch wurde zweimal durchgeführt (n=6).

1	1	2	3	4	5	6
A	+ CADCAM Eluat 5000 Z 0,5ml	- Luxatemp Eluat 5000 Z 0,5ml	Nextdent Mfh Eluat 5000 Z 0,5ml	GC temp print Eluat 5000 Z 0,5ml	Freeprint temp Eluat 5000 Z 0,5ml	3delta temp 5000 Z 0,5ml
B	+ CADCAM Eluat 5000 Z 0,5ml	- Luxatemp Eluat 5000 Z 0,5ml	Nextdent Mfh Eluat 5000 Z 0,5ml	GC temp print ELuat 5000 Z 0,5ml	Freeprint temp Eluat 5000 Z 0,5ml	3delta temp 5000 Z 0,5ml
C	+ CADCAM Eluat 5000 Z 0,5ml	- Luxatemp Eluat 5000 Z 0,5ml	Nextdent Mfh Eluat 5000 Z 0,5ml	GC temp print Eluat 5000 Z 0,5ml	Freeprint temp Eluat 5000 Z 0,5ml	3delta temp 5000 Z 0,5ml
D	Kein PK 5000 Z 0,5ml	Kein PK 5000 Z 0,5ml	Kein PK 5000 Z 0,5ml	Nur Medium 0,5 ml	Nur Medium 0,5ml	Nur Medium 0,5ml

Abbildung 5: Verteilung der Materialien auf ein 24 Well

	Arbeitsschritt
1	Absaugen des Keratinozytennährmediums
2	2 x Waschen mit 5 ml PBS
3	Zugeben von 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung zum Lösen der Zellkontakte
4	10-15 Minuten bei 37 °C inkubieren und gelegentlich gegen Boden klopfen
5	Abstoppen der Reaktion durch 400 µl FBS
6	2 x mit 2-3 ml Nährmedium Flasche ausspülen
7	Zellsuspension in 50 ml Falcon überführen
8	10 Minuten bei 300 g zentrifugieren (mit Gegengewicht)
9	Flüssigkeit über Zellpellet absaugen
10	Pellet in 10 ml Medium resuspendieren
11	100 µl davon abnehmen und mit 100 µl Tyrpanblau gut mischen
12	Gemisch in Neubauer Zählkammer einbringen
13	Vitale Zellen in allen vier Quadranten auszählen und Mittelwert errechnen
14	Mittelwert x 10 <sup>4</sup> x 2 = Zellzahl pro ml
15	Diese Zellzahl x 10 ml = Gesamtzellzahl
16	Davon gewünschte Zellzahl auf die Wells verteilen (hier 5000 Zellen in 0,5 ml)

*Tabelle 1: Protokoll zur Passagierung und Zellzählung*

### 3.3. Prüfkörper

Im Versuch wurden vier unterschiedliche Kunststoffmaterialien, welche zur Herstellung von dentalen Werkstücken durch das additive Verfahren zugelassen sind, untersucht (Nextdent C&B MFH, GC Temp PRINT, Freeprint Temp UV, Deltamed 3Delta Temp) (Tabelle 2).

Zunächst wurden die Prüfkörper digital mit Hilfe des Programms Fusion 360 (AutoDesk) konstruiert. Dabei wurde eine zylinderförmige Gestaltung mit einem Durchmesser von 20 mm und einer Dicke von 1,5 mm gewählt. Zusätzlich wurde noch ein 0,5 mm langer Steg ergänzt.

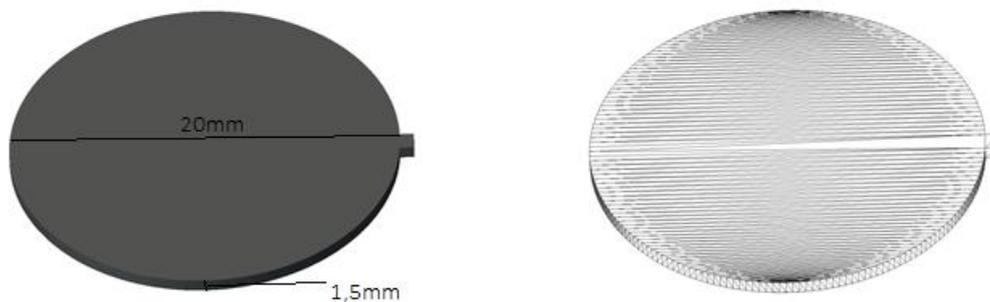


Abbildung 6: links: 3D Prüfkörperdesign mit Längenangaben; rechts: Prüfkörperdesign in STL-Format

Der digital entworfene Prüfkörper wurde mehrfach dupliziert und auf der für den Druck verwendeten Druckerplatte mittels Netfabb premium 2019 Software (AutoDesk) virtuell positioniert. So war es möglich, zeitgleich 12 identische Probenkörper in einem Druckprozess herzustellen. Die Positionierung der Zylinder erfolgte horizontal auf der Druckplatte. Deshalb wurden für die Fertigung keine zusätzlichen Stützstrukturen benötigt. Die Datei, welche die Information über die bestückte Bauplatte enthielt, wurde nachfolgend für den Druckprozess auf einen an den Drucker angeschlossenen Datenträger importiert.

Genutzt wurde für alle Materialien der 3D-Drucker D20II (Rapidshape, Heimsheim, Deutschland). Dieser DLP-Drucker verwendet die *bottom-up* Methode. Für den Druck wurden flüssige Photopolymerharze benötigt, welche in eine mit Glasboden ausgestattete Wanne eingebracht wurden. Zuvor mussten alle Materialien mit Hilfe des LC-3DMixers (NextDent B.V., Soesterberg, Netherlands) für 30 Minuten gerührt werden, um eine homogene Füllkörperverteilung zu erreichen. Die Bauplatte wurde vor dem Druck mit Ethanol (96%) gereinigt, um störende Kunststoffreste, welche die Anhaftung der Prüfkörper an der Bauplatte verhindern könnten, zu entfernen. Da die Prüfkörper horizontal gedruckt wurden, war die Anzahl der zu druckenden Schichten gering und die Druckdauer

verkürzte sich auf circa 10 Minuten. Nach dem Druck wurden die Kunststoffzylinder vorsichtig mit Hilfe eines Spatels von der Druckerplatte entfernt. Anschließend wurden die Materialien nach Herstellerangaben von überschüssigem Kunststoff gereinigt und nachpolymerisiert. Dazu werden für alle Materialien jeweils spezifische Nachbehandlungsprotokolle empfohlen.

### 3.3.1. Nextdent C&B MFH

Das Material des Herstellers Nextdent enthält vorwiegend Methacrylologomere und zu einem geringen Prozentsatz Phosphinoxide. Über den Füllkörperanteil, sowie über die Füllstoffzusammensetzung gibt es keine Angaben (Kessler et al., 2019). Die Herstellung mit Hilfe des 3D-Druckers D20II (Rapidshape, Heimsheim, Deutschland) erfolgte wie unter 3.3. angegeben. Das Nachbehandlungsprotokoll sieht vor, dass Probenkörper aus dem Material Nextdent MFH (C&B) nach dem Druck für fünf Minuten in einem ultraschallaktivierten Ethanolbad (96%) gereinigt werden und anschließend eine Nachpolymerisation mittels einer Lichthärtung für 30 Minuten (15 Minuten von jeder Seite) im Lichtofen (LC-3D Print Box von Nextdent) erfolgt.

### 3.3.2. GC Temp PRINT

Das Material besitzt eine überwiegend aus UDMA bestehende Matrix. Diese wird vorwiegend durch TEGDMA ergänzt. Das Material besitzt Füllkörper, welche zu 20 Gewichtsprozent aus Quarz bestehen. Über die restliche Füllkörperzusammensetzung gibt es keine Angaben (Kessler et al., 2019). Auch bei diesem Material verläuft das Druckverfahren wie unter 3.3. erwähnt. Für Probenkörper, die mit GC Temp PRINT oder Freeprint Temp UV (Detax Dental, Ettlingen) hergestellt wurden, erfolgte nach dem Druck zunächst die Reinigung von überschüssigen Monomeren durch das Einbringen in ein fünfminütiges Ultraschallbad mit 96% Ethanol. Die Nachhärtung wurde anschließend durch Exposition gegenüber 2000 Lichtblitzen pro Seite in einem Lichtofen (Otoflash G171; NK Optik, Baierbrunn) vollzogen.

### 3.3.3. Freeprint Temp UV

Das Kunststoffmaterial besitzt eine zu großem Anteil aus Isopropylidenediphenol Peg-2 Dimethacrylat bestehende Matrix, welche durch weitere Methacrylate und Phosphinoxide ergänzt wird. Ähnlich wie bei dem Material von Nextdent gibt es keinerlei Angaben über Füllkörperanteil und-zusammensetzung (Kessler et al., 2019). Wie bereits unter 3.3.2. erwähnt, sind der Druckablauf, sowie das Nachbehandlungsprotokoll identisch mit dem des Materials GC Temp PRINT.

### 3.3.4. 3Delta Temp

Die Polymermatrix dieses flüssigen Photopolymerharzes setzt sich aus Methacrylaten, UDMA und Phosphinoxiden zusammen. Der Hauptanteil der Füllkörper besteht aus Siliziumdioxid und zu einem geringeren Prozentsatz aus Dentalglas (Kessler et al., 2019). Der Druck der Probenkörper, findet ebenfalls wie unter 3.3. beschrieben statt. Für Probenkörper des Materials 3Delta Temp wurden nach dem Druck die Kunststoffüberreste mit Hilfe von Zentrifugalkraft entfernt. Dafür wurden die Probenkörper nach der initialen Polymerisation im Rahmen des 3D-Drucks in einem 50ml Falcon bei 1500g für vier Minuten zentrifugiert (Allegra X-15R, Beckman Coulter, Life Science, Indianapolis, IN, USA). Um eine Verformung der Testzylinder zu verhindern, wurde das Falcon mit Schaumstoff befüllt. Die abschließende Polymerisation erfolgte analog dem Vorgehen für Proben aus den Materialien GC Temp PRINT und Freeprint Temp UV mit 2x 2000 Lichtblitzen im Lichtofen (Otoflash G171; NK Optik, Baierbrunn).

<b>MFH</b>	<b>3Delta Temp</b>	<b>GC Temp PRINT</b>	<b>Freeprint Temp UV</b>
5 Minuten Ultraschallbad in 96% Ethanol	4 Minuten bei 1500g zentrifugieren	5 Minuten Ultraschallbad in 96% Ethanol	5 Minuten Ultraschallbad in 96% Ethanol
2 x 15 Minuten in LC-3D PrintBox	2 x 2000 Lichtblitze im Otoflash	2 x 2000 Lichtblitze im Otoflash	2 x 2000 Lichtblitze im Otoflash

*Tabelle 2: Zusammenfassung der jeweils für die Materialien empfohlenen Nachbehandlungsprotokolle zur abschließenden Polymerisation der Probenkörper*

Die Versuchsproben aus dem Kunststoff zur Herstellung von konventionellen Provisorien wurden mit Hilfe des Materials Luxatemp Automix Plus (DMG) hergestellt. Dafür wurde eine Dublierform der 3D gedruckten Prüfkörper aus Silikon (Adisil rosé; Siladent Dr. Böhme & Schöps GmbH, Goslar) hergestellt. In diese Zylinderform wurde das Material mittels Automix Kartusche gespritzt, durch Druck mit einer Glasplatte alle Überschüsse sowie Blasen entfernt und eine glatte Oberfläche erzeugt. Schließlich wurden zum Vergleich auch Probenkörper mit Hilfe der subtraktiven CAD/CAM-Methode hergestellt. Diese hatten die gleiche Dimension wie die 3D-gedruckten Versuchsproben. Sie wurden zunächst aus einem industriell produzierten Rohkörper (Grandio Disc von VOCO, Cuxhaven) gefräst

(Zylinder, Durchmesser: 20 mm, Dicke:15 mm), der nachfolgend mit einer Laborsäge (Isomet Low Speed Saw, Buehler) in Scheiben mit einer Dicke von 1,5 mm geteilt wurde.

Abschließend wurden die Probenkörper maschinell in drei Schritten poliert (Exakt 400 CS; WS Flex18 C: P320, P1000, P1200/4000, Exakt Vertriebs GmbH, Norderstedt), um eine möglichst vergleichbare Oberflächenstruktur für alle Versuchsproben zu gewährleisten. Dafür wurden die Prüfkörper mittels Wachs auf einer Glasplatte befestigt, welche durch Unterdruck vom Schlitten des Poliergeräts angesaugt wurde. Dieser Schlitten wurde unter Zufuhr von destilliertem Wasser über eine rotierende Scheibe mit austauschbaren Polierpapieren bewegt. Begonnen wurde der Poliervorgang mit der größten Körnung (WS Flex 18: P320) und beendet mit der feinsten Körnung (WS Flex 18: P1200/4000).

Vor dem Einbringen in das Zellkulturmedium wurden alle Prüfkörper mit Ethanol (80%) desinfiziert.

Material	Hersteller	Matrix	Füller	Lot Nummer
Nextdent C&B MFH	Nextdent, Soesterberg, Niederlande	<b>&gt;90wt%</b> Methacryloligomere <b>&lt;3wt%</b> Phosphinoxide		XG044N22
3Delta Temp	Deltamed, Friedberg, Deutschland	Methacrylate UDMA Phosphinoxide	Siliziumdioxid <b>50wt%</b> , Dentalglas <b>30vol%</b>	193314A
GC Temp PRINT	GC, Leuven, Belgien	<b>-&lt;75%</b> UDMA50, <b>-&lt;25%</b> TEGDMA10, <b>2.5-&lt;5%</b> 4,4'- isopropylidenediphenol, ethoxylatedand 2- methylprop-2-enoic acid, <b>1-&lt;2.5%</b> diphenyl(2,4,6- trimethylbenzoyl) phosphine oxide, <b>0.1&lt;0.2%</b> 2-(2H- benzotriazol-2-yl)-p-cresol	Quartz <b>20wt%</b>	1906271
Freeprint temp	Detax, Ettlingen,	<b>45- &lt;60 wt%</b>		220101

UV	Deutschland	Isopropylidenediphenol Peg-2 Dimethacrylat, <b>1- &lt; 5 wt% 2</b> Hydroxyethylmethacrylat, <b>1- &lt; 5 wt%</b> Diphenyl(2,4,6 trimethylbenzoyl) phosphinoxid, <b>1 &lt;5 wt%</b> Hydroxypropylmethacrylat, <b>&lt; 1 wt%</b> Phenyl- bis(2,4,6trimethylbenzoyl) phosphinoxid		
Luxatemp	DMG, Hamburg, Deutschland	multifunktionelle Methacrylate, Katalysatoren, Stabilisatoren	Glas <b>44wt%</b>	110908 765843
CAD/CAM	Voco, Cuxhaven, Deutschland	Polymere <b>14%</b> UDMA und DMA (Alamouh et al., 2018)	Glas <b>86wt%</b>	

*Tabelle 3: Materialübersicht mit Herstellern, Zusammensetzung und Lot Nummern*

### 3.4. Eluat

Bei den hier verwendeten Kompositarzproben könnten sich im Eluat herausgelöste ungebundene Monomere und Photoinitiatoren befinden (Jürgen Durner et al., 2010). Um die benötigte Flüssigkeitsmenge in Anwesenheit von Prüfkörpern zu ermitteln, wurden die Richtlinien der ISO 10993-12 verwendet. Hierbei sollte eine Konzentration von  $1,2 \frac{cm^2}{ml}$  erreicht werden. Somit wurde der in dieser Studie verwendete Prüfkörper mit einer Dicke von  $> 1$  mm und einer Fläche von  $3,14$   $cm^2$  (Radius der Kreisfläche  $1$  cm) in  $2,5$  ml Medium eingelegt (Wallin, 1998).

Rechnung laut ISO 10993-12:

Für die Berechnung wird zunächst die Kreisoberfläche ermittelt.

$$\pi \times (1 \text{ cm})^2 = 3,14 \text{ cm}^2$$

Anschließend wird die Dicke des Objekts berücksichtigt. Laut ISO 10993-12 dürfen Prüfkörper mit einer Dicke von > 1mm maximal 1,25 cm<sup>2</sup> besitzen, wenn sie in 1 ml Flüssigkeit eingelegt werden (Wallin, 1998). Da der in der vorliegenden Studie verwendete Prüfkörper aber 3,14 cm<sup>2</sup> Kreisoberfläche besitzt, muss nun die für diese Größe benötigte Flüssigkeitsmenge ermittelt werden.

$$3,14 \text{ cm}^2 \div 1,25 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}} = 2,5 \text{ ml}$$

Die Prüfkörper der jeweiligen Materialien wurden in einer 12 Well-Zellkulturplatte (Fa. Greiner, Nürtingen) in je 2,5 ml Keratinozyten Growth Medium 2 (PromoCell, Heidelberg) für 24h im Dunkeln bei 37 °C inkubiert. Das entnommene Eluat wurde pro Material gesammelt und davon mit je 0,5ml auf die jeweiligen Wells verteilt. Für die Eluate von Tag 3 und Tag 6 wurden die bereits 24 h ausgewaschenen Prüfkörper in einer frischen 12 Well-Zellkulturplatte (Fa. Greiner, Nürtingen) platziert, mit frischen 2,5 ml Keratinozyten Growth Medium 2 (PromoCell, Heidelberg) bedeckt und ebenfalls für die weiteren 48 h im Dunkeln bei 37 °C inkubiert. An Tag 3 wurde derselbe Schritt für die Eluate von Tag 6 wiederholt. Pro Material wurden 4 Prüfkörper für die Eluatherstellung genutzt, weshalb 10ml Eluat pro Material gewonnen wurden.

### 3.5. Bestimmung der Zellproliferation mit dem XTT-Test

Das Zellproliferations-Kit II (XTT von Fa. Roche, Mannheim) ist ein kolorimetrischer Test und dient der Quantifizierung der Zellproliferation und-vitalität und basiert auf einer Reduktion des enthaltenen löslichen gelben Tetrazoliums Salzes XTT (Natrium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4methoxy-6-nitro)-benzolsulfonsäure-hydrat) in ebenfalls lösliches orangerotes Formazan (Aguiar et al., 2017; Ried, 1952). Diese Umwandlung wird nur von vitalen Zellen erzeugt, da sie an die NAD(P)H-Produktion (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid(-Phosphat)) durch die Glykolyse

gekoppelt ist. Ein Anstieg der Anzahl teilungsfähiger Zellen führt zu einer Erhöhung der Gesamtaktivität der mitochondrialen Dehydrogenase in der Probe, welche eine vermehrte Reduktion des Tetrazoliumsalzes zur Folge hat und korreliert somit direkt mit der Menge des orangefarbenen Formazans (Rich et al., 2001). Hierbei scheint vor allem die NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase des Komplexes 1 der Atmungskette eine schnelle Reduktion zu erzeugen (Rich et al., 2001; Wendel et al., 2009). Da das entstandene Formazan wasserlöslich ist, kann es sofort mit Hilfe eines ELISA Readers (Varioskan, ThermoFisher Scientific, Waltham) photometrisch gemessen werden (Roche Diagnostics, 2016).

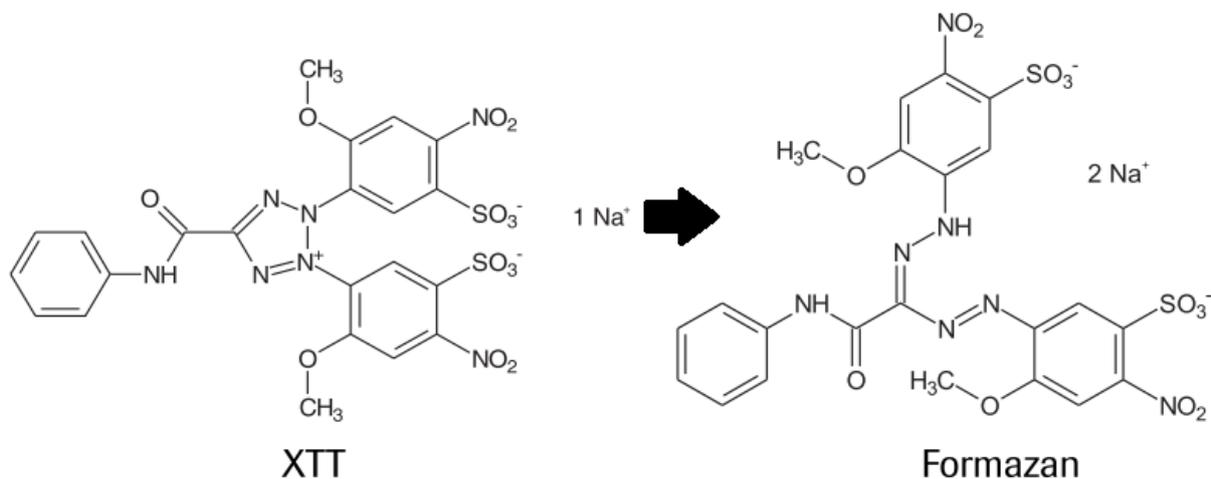


Abbildung 7: Reduktion des Tetrazoliumsalzes XTT zum orangefarbenen Formazan mittels mitochondrialer Dehydrogenase; (modifiziert übernommen aus (Roche Diagnostics, 2016))

Die XTT labeling mixture besteht zu 98 % aus XTT labeling reagent und zu 2 % aus electron coupling, welche angewärmt auf 37 °C in klarem Zustand miteinander vermischt werden. Alle XTT Flüssigkeiten wurden vor Licht geschützt. Das Verhältnis von XTT labeling mixture zum Zellmedium betrug 1:2. Somit wurden den 24 Well Platten mit 0,5 ml Medium 250 µl XTT labeling mixture zugefügt.

Die Messung der Zellvitalität wurde an den Tagen 1, 2, 3 und 6 durchgeführt. Dafür wurde das Medium der Wells entnommen, bei – 80 °C eingefroren und durch frisches Nährmedium ersetzt. In jedes Well wurden anschließend 250 µl XTT labeling mixture gegeben. Als Blank wurden im gleichen Verhältnis reines Medium ohne Zellkontakt mit XTT labeling mixture versetzt. Nachdem den Well Platten die XTT labeling mixture zugefügt wurde, wurden sie 20 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit zeigte sich eine hohe Proliferationsrate durch eine intensive Rotfärbung, während der Blank eine minimale Rosafärbung aufwies. Um die Messung am ELISA Reader (Varioskan, Thermo Electron Corporation) durchzuführen, wurden aus jedem Well zwei Aliquots von 100 µl in eine 96 Well

Platte pipettiert. Die photometrische Messung der optischen Dichte erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm (Photometrik 1) sowie 650 nm (Photometrik 2).

### 3.6. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der Enzymimmunotest ist ein quantitatives Analyseverfahren, welches durch eine enzymatische Farbreaktion enzymmarkierte Antikörper-Antigen-Komplexe nachweisen kann (Aydin, 2015). Genutzt wird dafür die spezifische Bindung von Antikörpern an das für sie entwickelte Antigen (Dolliver et al., 2008). Somit kann in einer zu untersuchenden Flüssigkeit gezielt die Konzentration eines Moleküls nachgewiesen werden. Dies ist auch bei niedrigen Konzentrationen möglich (Aydin, 2015). Die Farbreaktion, erfolgt auf Grund einer enzymatischen Spaltung und Aktivierung des zugegebenen Chromogens (R&D Systems Europe, 2015; Voigt et al., 2008). Dieser Farbumschlag kann photometrisch ausgewertet werden (Gan et al., 2013).

Diese Testmethode basiert auf einer bereits in den 1960er Jahren angewendeten Technik des Radioimmunoassays (RIA), welche 1971 weiterentwickelt wurde (Engvall et al., 1971). Dabei koppeln die markierten Antigen- und Antikörper-Radioisotope nicht wie zunächst üblich an ein radioaktives Isotop (Jod 125), sondern an Enzyme (Aydin, 2015; Engvall et al., 1971). Beschrieben wird der ELISA von Engvall und Perlmann als heterogener Festphasentest (Engvall et al., 1971).

Grundsätzlich kann man zwei Untergruppen unterscheiden: den homogenen enzymatischen Immunoassay, bei dem das Enzym durch Bindung des Antikörpers inaktiviert wird und den heterogenen enzymatischen Immunoassay (Aydin, 2015; Schuurs et al., 1980). Die homogene Methode wird weniger häufig angewendet, da sie eine geringere Empfindlichkeit aufweist und in der Anwendung zwar leichter, aber teurer ist (Aydin, 2015). Beim heterogenen enzymatischen Immunoassay sind die Antikörper-Antigenkomplexe fest mit dem Boden, des Testgefäßes verbunden, somit handelt es sich um einen Festphasentest (Stöcker, 2019a).

Bei einem Waschschrift werden die noch nicht gebundenen Antigene entfernt und allein die bereits im Komplex gebundenen Antigene bleiben für den Nachweis zurück (Aydin, 2015). Um den Test für jegliche Arten von Substanzen zu spezifizieren, wurden unterschiedliche ELISA Methoden entwickelt (Aydin, 2015).

Bei der direkten Methode wird der Boden der Wellplatte mit dem Probenmaterial, also dem nachzuweisenden Antigen, beschichtet (Aydin, 2015). Durch das Hinzufügen eines enzymmarkierten Antikörpers bildet sich ein Komplex, der nach dem Waschen durch das zum Enzym passende Substrat

im Sinne einer Farbreaktion nachgewiesen werden kann (Aydin, 2015). Für die indirekte Methode wird der Boden des Testgefäßes mit dem nachzuweisenden Antigen beschichtet und die Antikörper hinzugefügt (Gan et al., 2013). Diese passen spezifisch zu den Antigenen am Boden und bilden mit ihnen Komplexe (Aydin, 2015). Um die Komplexe sichtbar zu machen, wird nun ein weiterer vorab enzymmarkierter Sekundäantikörper benötigt, der an den ersten Antikörper bindet (Gan et al., 2013). So kann wieder mit dem passenden Substrat eine Farbreaktion erzeugt werden, welche photometrisch gemessen wird (Aydin, 2015). Die Sandwich-Methode verdankt ihren Namen dem Einbetten des nachzuweisenden Antigens zwischen zwei Antikörpern (Gan et al., 2013). Somit wird der Boden mit einem primären Antikörper beschichtet, an welchen die Antigene aus der zu testenden Substanz binden können. Nach dem Waschen wird erneut ein Antikörper hinzugefügt, welcher ebenfalls an das Antigen bindet (Aydin, 2015). Ist dieser bereits mit dem Enzym markiert, kann das passende Substrat hinzugegeben werden und die Farbreaktion läuft ab, andernfalls muss ein sekundärer, enzymmarkierter Antikörper ergänzt werden (Kramer, 2013). Mit der indirekten und der Sandwich Methode können sehr gering konzentrierte Antigene nachgewiesen und quantifiziert werden (Gan et al., 2013).

Der kompetitive ELISA wird gestartet, wie die Sandwich-Technik, indem der Boden des Wells mit einem Antikörper beschichtet wird. Im Folgenden werden die zu messende Probe und das enzymmarkierte Antigen zeitgleich in das Well gegeben (Aydin, 2015). Somit konkurrieren Probe-Antigen und markiertes Antigen um die gleichen Antikörper. Hierbei ist das Ergebnis genau umgekehrt zu betrachten: Eine hohe Absorption bedeutet eine niedrige Antigenkonzentration, da mehr enzymmarkierte Antigene gebunden wurden, während eine geringe Absorption eine hohe Konzentration anzeigt (Gan et al., 2013). Dabei zeigt sich ein großer Vorteil dieser Methode in der hohen Empfindlichkeit beim Erkennen von Unterschieden in vielschichtigen Antigenmischungen, auch wenn nur eine geringe Konzentration an Nachweisantikörpern vorliegt (Gan et al., 2013).

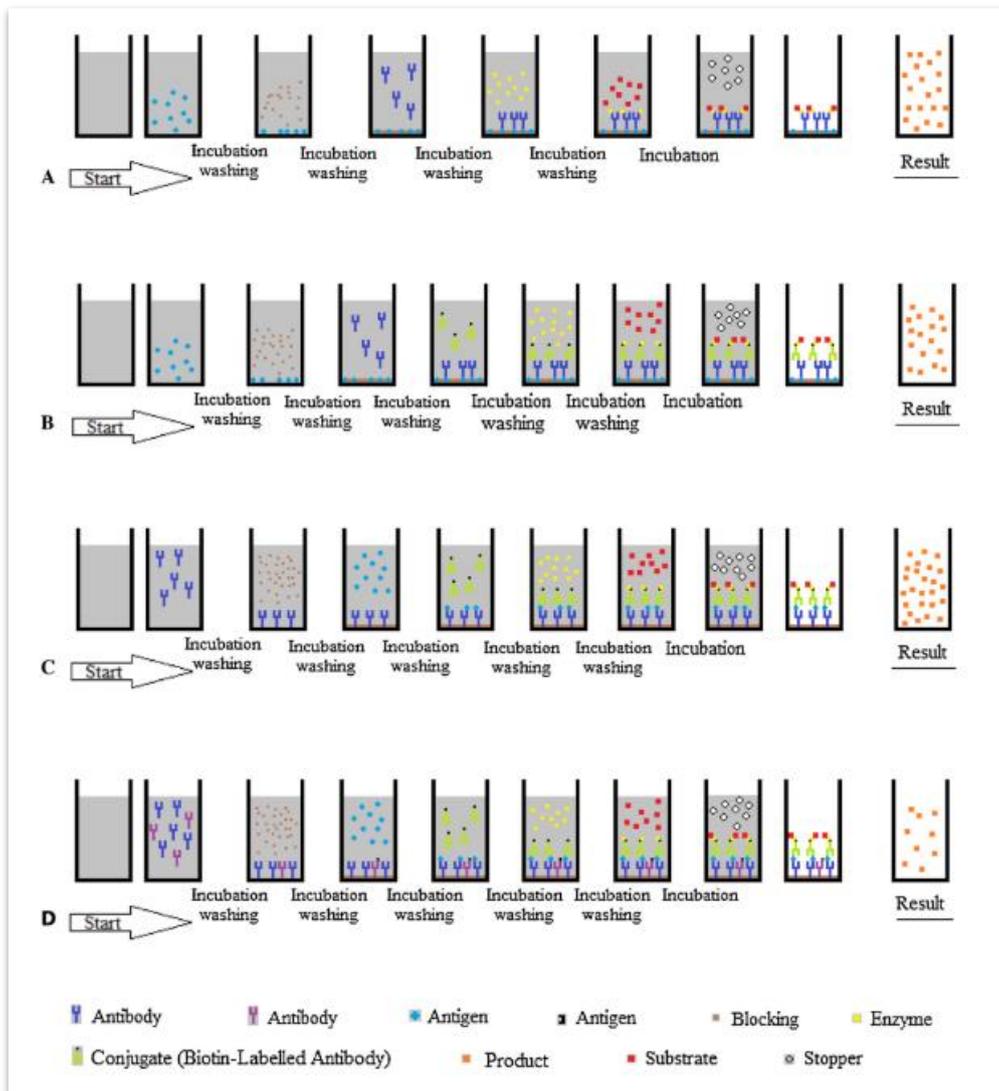


Abbildung 8: Prinzip des (A) direkten, (B) indirekten, (C) Sandwich- und (D) kompetitiven ELISA (übernommen aus (Aydin, 2015))

### 3.7. Interleukin 6 ELISA

Für den Versuch wurden die Zellüberstände nach 0 h, 24 h, 48 h, 72 h und 6 Tagen abgenommen. Die gewonnenen Zellüberstände wurden zunächst unverdünnt verwendet.

Für den Versuch wurden verschiedene Standards laut Herstellerangaben angefertigt, die benötigt werden, um eine eigene Standardkurve zu erstellen. Die einzelnen Werte betragen 300 pg/ml, 100 pg/ml, 50 pg/ml, 25 pg/ml, 12,5 pg/ml, 6,25 pg/ml, 3,13 pg/ml und einem zusätzlichen Blank als Nullwert.

Daraufhin wurde der ELISA entsprechend den Vorgaben des Herstellers durchgeführt (R&D Systems Europe, 2015). Der in dieser Studie verwendete Sandwich-Enzymimmuno-Assay (R&D USA, Minneapolis) besitzt auf dem Boden der verwendeten 96-Wellplatten bereits eine Beschichtung mit

einem spezifisch für IL6 wirkenden Antikörper. Enthalten die zu untersuchenden Zellüberstände das gesuchte Interleukin 6 (Antigen) bilden sich Antikörper-Antigen-Komplexe. In jedes verwendete Well wurden 100 µl eines Verdünners (Assay Diluent RD1W, R&D USA, Minneapolis) eingebracht. Aus den jeweiligen Zellüberstände, sowie Standards und Blanks wurden nach einem entsprechenden Layout je zwei Aliquots von 100 µl in die Wells pipettiert. Die Wellplatte wurden mit einer Klebefolie bedeckt und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben in den Wells verworfen und diese anschließend in vier Durchläufen mit je 400 µl Waschpuffer (R&D USA, Minneapolis) gereinigt. Nachfolgend wurden 200 µl des polyklonalen Antikörpers (Detektionsantikörper), ebenfalls spezifisch für IL6, eingebracht, die Platten erneut mit Folie bedeckt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der erwähnte Waschschrift wurde anschließend in gleicher Form wiederholt. Um die gebildeten Komplexe nachzuweisen, wurden 200 µl der Substratlösung (R&D UDA, Minneapolis) eine Mischung aus stabilisiertem Wasserstoffperoxid und stabilisiertem Tetramethylbenzidin, einem Chromogen, in die Wells pipettiert. Diese werden durch das Enzym des markierten Detektionsantikörpers gespalten und aktiviert und sorgen somit für die bläuliche Farbreaktion (R&D Systems Europe, 2015). Die Platte wurde abgedeckt und für weitere 20 Minuten ohne Lichtzufuhr inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Schwefelsäure (1 mol/l) hinzugefügt, um die ablaufende Reaktion zu stoppen. Hierbei schlägt die Farbe von blau zu gelb um. Je mehr Interleukin 6 in den Proben enthalten ist, umso deutlicher fällt die Farbreaktion aus. Nach Durchführung aller Schritte wurde die optische Dichte der einzelnen Wells mit Hilfe eines ELISA Readers (Varioskan, ThermoFisher Scientific, Waltham) gemessen. Dafür wurden die Wellenlängen 450 nm (Photometrik 1) und 540 nm (Photometrik 2) verwendet. Damit alle Proben für den ELISA Reader messbar sind, wurden Proben mit sehr hohen Messwerten mit Hilfe des Keratinozyten Growth Mediums 2 (PromoCell, Heidelberg) 1 zu 20 verdünnt und anschließend die Verdünnung bei der Auswertung der Daten herausgerechnet.

### 3.8. Interleukin 8 ELISA

Die quantitative Messung von Interleukin 8 wurde mit dem Quantikine ELISA Human IL-8/CXCL8 (R&D Systems) vorgenommen. Auch dieser Test basierte auf der heterogenen quantitativen Sandwich-Enzymimmunitest-Technik (R&D Systems Biotechne, 2018). Der ELISA wurde entsprechend den Vorgaben des Herstellers durchgeführt (R&D Systems Biotechne, 2018). Für den Versuch wurden vom Hersteller vorgegebene Standards benötigt, um eine eigene Standardkurve zu erstellen. In diesem Fall betragen die Werte 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3

pg/ml und einem Blank als Nullwert.

Der Boden der Wellplatten war auf Grund der gewählten Sandwich-Technik bereits mit dem spezifischen Antikörper, hier für IL8, beschichtet. In diese Probengefäße wurden zunächst 100 µl eines Verdünners (Assay Diluent RD1-85, R&D USA, Minneapolis) eingebracht. Alle Blanks, Standards und Proben wurden mit je 50 µl in zwei Aliquots nach einem vorher entworfenen Layout in die Wells pipettiert. Die Platte wurde anschließend mit Klebefolie bedeckt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben konnten anschließend verworfen werden. Die Waschung der Wellplatte erfolgte in vier Zyklen mit je 400 µl Waschpuffer (R&D USA, Minneapolis) pro Well. Nachfolgend wurden 100 µl eines enzymmarkierten, polyklonalen, IL8-spezifischen Antikörpers (Human IL-8 Conjugate, R&D USA, Minneapolis) in die Wells pipettiert und die Platte wieder mit einer Klebefolie abgedeckt. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben erneut nach dem bereits erwähnten Schema gewaschen, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden 200 µl Substratlösung, eine Mischung aus stabilisiertem Wasserstoffperoxid und dem Chromogen Tetramethylbenzidin in die Wells eingebracht und abgedeckt. Diese wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur ohne Lichtzufuhr inkubiert. Dabei entstand eine Blaufärbung. Der letzte Pipettierschritt war die Zugabe von 50 µl Schwefelsäure (1 mol/l), welche ein Umschlagen der Farbe zu Gelb verursachte. Je mehr Interleukin 8 in der Probe enthalten ist, umso stärker fällt die Farbbildung aus. Die optische Dichte der Proben wurde mit Hilfe eines ELISA Readers (Varioskan, ThermoFisher Scientific, Waltham) bestimmt. Dabei wurden die Wellenlängen 450 nm (Photometrik 1) und 540 nm (Photometrik 2) verwendet.

### 3.9. Indirekte Immunfluoreszenz

Die bereits mittels ELISA quantitativ bestimmte Konzentration der Zytokine Interleukin 6 und 8 sollten mittels immunhistochemischer Färbung auch qualitativ nachgewiesen werden. Bei der indirekten Immunfluoreszenz (IIF), welche auch Sandwichverfahren genannt wird, werden Antigene durch die Komplexbildung mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen (Federlin, 1965; Stöcker, 2019b). Um gebundene Antikörper nachzuweisen, wird ein fluoreszenzmarkierter sekundärer Antikörper hinzugefügt (Federlin, 1965). Dies wird als Markierungsreaktion bezeichnet (Stöcker, 2019b). Im Vergleich dazu wird bei der direkten Immunfluoreszenz das Antigen durch einen bereits enzymmarkierten Primärantikörper nachgewiesen, was eine höhere Spezifität, aber geringere Sensitivität zur Folge hat (Federlin, 1965).

Als Substrate können nicht nur wie in vorliegender Studie Zellen verwendet werden, sondern auch

Gewebeschnitte oder Zellausstriche, welche sich auf Objektträgern befinden (Stöcker, 2019b). Hinzugegeben werden die nachzuweisenden Autoantikörper, die bei positiven Proben einen Komplex mit den Antigenen aus dem Substrat bilden (Stöcker, 2019b). Um die an Antigene gebundenen Antikörper nachzuweisen, werden fluoreszenzmarkierte Antikörper hinzugefügt, welche an den ersten Antikörper binden (Stöcker, 2019b). Häufig werden die Fluoreszenzfarbstoffe Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), LissaminRhodamin B (RB 200) und 1-Dimethylaminonaphthylsulfonsäure-5 (DANS) verwendet (Federlin, 1965). Im Anschluss wird die Position der Komplexe unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet (Federlin, 1965; Stöcker, 2019b). Bei der beschriebenen indirekten Methode werden meist zellgebundene Antikörper detektiert (Federlin, 1965). Damit der Nachweis möglichst genau erfolgen kann, muss die Probe in einer geeigneten Verdünnung untersucht werden, weshalb oft zwei Verdünnungsstufen parallel inkubiert werden (Stöcker, 2019b). Grund für die Fluoreszenz ist die Möglichkeit von einigen Elementen fluoreszierender Moleküle Lichtenergie vorübergehend durch quantenmechanische Anregung aufzunehmen und unmittelbar nachfolgend als energieärmere und langwelligere Lichtstrahlung wieder abzugeben (Romanchuk, 1982). Diese in der Regel um 20-50 nm längere Wellenlänge sorgt für eine veränderte Lichtfarbe (Romanchuk, 1982; Walsh et al., 2008). Die Eigenschaft der Fluoreszenz kurzwelliges Licht zu absorbieren und langwelliges Licht zu emittieren, wird als Stokes-Regel bezeichnet, weshalb auch der Unterschied zwischen den Wellenlängen der aufgenommenen und abgegebenen Strahlung den Namen Stokes-Verschiebung trägt (Walsh et al., 2008).

### 3.9.1. Fixierung der Objektträger für die immunhistochemische Färbung

Bei der hier gewählten IIF sollten die bereits im ELISA mit den Zellüberständen nachgewiesenen Interleukine 6 und 8 nach Kontakt mit den verschiedenen Materialien auch qualitativ in den Keratinozyten gezeigt werden.

Dafür wurden für jedes Kunststoffmaterial sowie die Kontrollproben jeweils drei Wells der auch im Versuch verwendeten Keratinozyten der Passage 10 ausgesät und 7 Tage bei 37 °C vorkultiviert. Auf die vorkultivierten Zellen wurde das Eluat von Tag 3 gegeben. Das Eluat wurde 24 h belassen, bis die Zellen mikroskopisch Veränderungen erkennen ließen. Die Zellen wurden, wie bereits in Tabelle 1 erläutert, nach zweifacher Waschung mit PBS mittels einer Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Wells gelöst, bei 300 g 10 Minuten zentrifugiert (Allegra X-15R, Allegra 25R, Beckman Coulter) und ausgezählt.

Je 25000 Zellen wurden auf jedem Objektträger (ThermoFisher Scientific, Waltham) verteilt.

Nachdem die Zellen Zeichen der Adhärenz zeigten, wurde erneut frisches Nährmedium hinzugefügt. Pro Material und Kontrolle wurden acht Objektträger hergestellt, welche für 24 h bei 37 °C inkubiert wurden. Die Hälfte der Objektträger wurde nach der Inkubation mit 100 % Methanol für 20 Minuten bei - 20 °C fixiert, die andere Hälfte wurde mit Paraformaldehyd (PFA) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Dafür wurde zuvor das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) gewaschen und je 1 ml Methanol (Merck, Deutschland) oder PFA auf die Zellen gegeben. Nach Abnehmen der Flüssigkeit wurden die Objektträger senkrecht gelagert bis sie getrocknet waren und anschließend bei - 20 °C eingefroren.

### 3.9.2. Immunhistochemische Färbung

Die fixierten Objektträger wurden mit Hilfe eines Fettstiftes in vier Abteilungen abgegrenzt. Dabei dienten drei dem Austesten verschiedener Verdünnungen und eine als negative Kontrolle, in der nur eine Färbung des Zellkerns vorgenommen wurde. Die Zellen wurden mit Hilfe von PBS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 5 Minuten rehydriert. Die aufgetragenen Flüssigkeiten wurden nach jedem Schritt vorsichtig abgeklopft. Im Anschluss werden die Objektträger für 5 Minuten in PBS und einem Polyethylenglykol-Sorbitan-Fettsäureester (Tween 20; Carl Roth, Karlsruhe) gewaschen. Durch 1:10 verdünntes Pferdeserum (Jackson ImmunoResearch, Dianova, Pennsylvania) in PBS, das für 60 Minuten auf den Objektträgern belassen wurde, wurden unspezifische Rezeptoren geblockt. Danach wurde der Primärantikörper Anti-Interleukin-6-Antikörper (AA 29-212, Antikörper online) bzw. Anti-Interleukin-8-Antikörper (AA 72-99; NSJ Bioreagent, San Diego, CA) in drei unterschiedlichen Verdünnungen aufgebracht und bei 4 °C in einer Feucht-/Dunkelkammer über Nacht inkubiert. Es wurden die Verdünnungen 1:500, 1:250 und 1:50 gewählt. Eine negative Kontrollprobe wurde in reinem PBS inkubiert. Als nächster Schritt wurden die Objektträger drei Mal für 5 Minuten gewaschen und anschließend der Sekundärantikörper (Alexa Fluor 488 highly cross-absorbed Antirabbit IgG 1:500; Molecular Probes) aufgetragen und für 60 Minuten ohne Lichtzufuhr in der Feuchtkammer belassen. Der vorangehende Waschschrift wurde einmal wiederholt. Nachfolgend wurden die Proben für eine Minute mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas) im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellkerne zu markieren. Abschließend wurden die Proben für 5 Minuten mit Leitungswasser gewaschen, die Flüssigkeit abgeklopft und mit Hilfe eines wässrigen Eindeckmediums (ProLong Gold Antifade Mountant; Molecular Probes) und Deckgläschen (Fa. Menzel GmbH + Co. KG, Braunschweig) eingedeckt.

	Arbeitsschritt
1	4 Bereiche abgrenzen mit Hilfe eines Fettstiftes
2	5 Minuten in reinem PBS rehydrieren
3	5 Minuten in PBS und Tween 20 waschen
4	Abblocken mit 1:10 verdünntem Pferdeserum in PBS für 60 Minuten
5	Primärantikörper aufbringen und im Dunkeln bei 4°C über Nacht inkubieren
6	3 x 5 Minuten in PBS und Tween 20 waschen
7	Sekundärantikörper auftragen und im Dunkeln für 60 Minuten inkubieren
8	3 x 5 Minuten in PBS und Tween 20 waschen
9	DAPI auftragen und für 1 Minute im Dunkeln inkubieren
10	5 Minuten mit Leitungswasser waschen und Flüssigkeit abklopfen
11	Eindecken mit Eindeckmedium (Prolong) und Deckgläschen

*Tabelle 4: Protokoll der immunhistochemischen Färbung*

### 3.9.3. Immunhistochemische Auswertung

Die immunhistochemische Auswertung erfolgte nach der Markierung mit den Interleukin 6 und 8 Antikörpern mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (LSM 510, Fa. Zeiss, Deutschland).

### 3.10. Rasterelektronenmikroskop

Für die Erstellung von Raster-Elektronen-Mikroskopieaufnahmen der einzelnen Prüfkörper, wurden die Prüfkörper mit 25000 Keratinozyten inokuliert, die wie im Kapitel 3.3 beschrieben kultiviert und vorbereitet wurden. Die Prüfkörper wurden für insgesamt drei Stunden alle 30 Minuten mit frischer Zellsuspension benetzt, bis sich unter dem Lichtmikroskop (Fa. Zeiss, Deutschland) eine Adhärenz der Zellen erkennen ließ.

Daraufhin wurden die Wells zweimal mit PBS gewaschen und die Prüfkörper in frische Wellplatten (Fa. Greiner, Nürtingen) umgesetzt. Diese wurden mit 1 ml einer Fixierlösung aus 400 µl Glutardialdehyd (50% Carl Roth, Karlsruhe) und 9600 µl destilliertem Wasser (H. Kerndl GmbH, Weissenfeld) bedeckt und in einem Kühlraum gelagert.

Um die Feuchtigkeit aus den Prüfkörpern zu entfernen, wurden sie in eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 75%, 85%, 90%, 100% Ethanol; Merck, Deutschland) eingebracht. Die Proben blieben jeweils

für 45 Minuten in den einzelnen Konzentrationsschritten. Im letzten Schritt (100% Ethanol) wurden sie über Nacht eingebracht. Für das Sputtern wurden die getrockneten Versuchsproben auf einer Halterung, meist aus Aluminium, befestigt. Damit die analysierte Objektflächen optimal vom Elektronenstrahl des REMs getroffen wurde, wurde eine möglichst horizontale oder leicht gekippte Ausrichtung der Probenoberfläche gewählt (Mulisch, 2015). Die Beschichtung (Sputtern) erfolgte durch eine Gold/Palladium Legierung (Mini Sputter Coater-Vorvakuum SC7620, Quorum Technologies). Nach dem Sputtern wurden die beschichteten Prüfkörper rasterelektronenmikroskopisch (REM Supra 55-VP; Zeiss, Deutschland) analysiert. Abbildung 9 zeigt in vereinfachter Form das Gleichstrom-Plasma-Sputterverfahren.

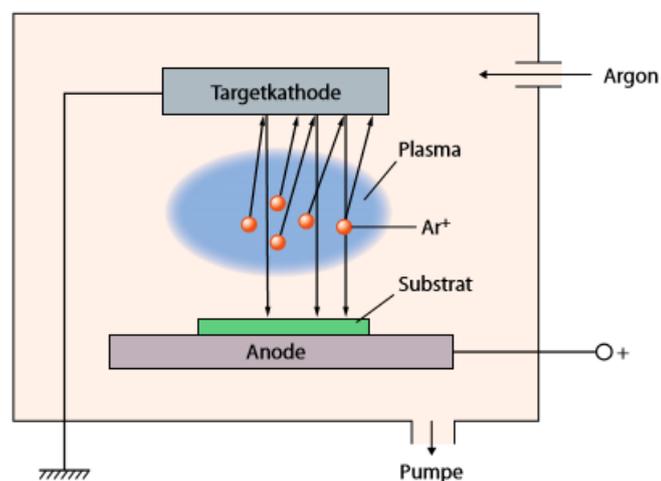


Abbildung 9: Durch Anlegen von Spannung bewegen sich Elektronen der Kathode Richtung Anode und treffen dabei auf Argonatome, welche dadurch zur Targetkathode hin beschleunigen und hier Atome herausschlagen. Diese verteilen sich im Behälter und so auch auf dem Präparat (übernommen aus (Mulisch, 2015)).

### 3.11. Statistische Auswertung der Daten

Die Ergebnisse der Bestimmung der Zellproliferation (XTT Test) sowie der zellulären Expression von Interleukin 6 und Interleukin 8 wurden als Mittelwerte ( $\pm$ Standardabweichung) für jede Untersuchungsgruppe berechnet. Nachfolgend wurde die Normalverteilung der Daten mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov- und Shapiro-Wilk-Test sowie die Gleichheit der Varianzen zwischen den Gruppen durch den Levene-Test geprüft. Zur univariaten Analyse wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen mit der einfachen Varianzanalyse sowie Mehrfachvergleiche mit dem Games-Howell-Test (Zellproliferation) und dem Bonferroni-Test (Expression IL-6 und IL-8) analysiert. Alle Berechnungen wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS (IBM, SPSS Statistics, version 26.0) vorgenommen. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p \leq 0,05$  festgelegt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Zellproliferation (XTT-Test)

Um die Frage zu beantworten, ob die unterschiedlichen, getesteten Materialien Einfluss auf die Vitalität der humanen gingivalen Keratinozyten haben, wurde der XTT-Test wie beschrieben durchgeführt und photometrisch gemessen.

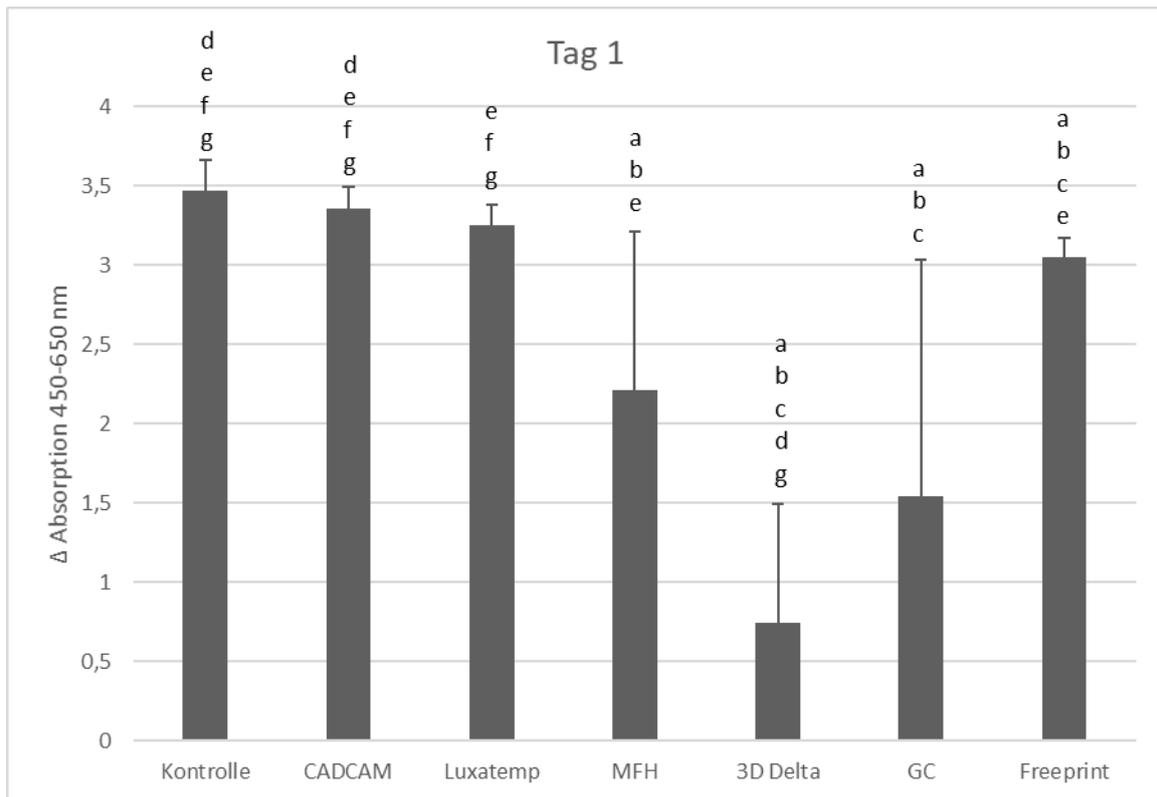


Diagramm 1: Werte der XTT Messung bei den unterschiedlichen Materialien an Messtag 1

Betrachtet man den ersten Messtag, zeigen sich bei allen Zellkulturen, welche Kontakt mit mittels 3D-Druck hergestellten Probenkörpern hatten, signifikant geringere Proliferationswerte, verglichen mit den Kontrollproben. Am deutlichsten reduziert stellen sich die Werte der Zellkultur nach Kontakt mit dem Material 3D Delta dar ( $p = 0,000$ ), während die Proben nach Exposition gegenüber Freeprint Temp UV die höchsten Messwerte der 3D Materialien aufweisen ( $p = 0,000$ ). Die Zellen nach Kontakt mit dem subtraktiv hergestellten CAD/CAM – Probenkörper zeigen gegenüber den Kontrollproben eine nicht signifikante Reduktion der Proliferation, sowie signifikant höhere Messwerte verglichen mit den Proben der additiv hergestellten Prüfkörper. Die Zellkulturen nach Kontakt mit dem konventionellen Provisorienmaterial Luxatemp zeigen ebenfalls eine nicht signifikant reduzierte Proliferation in Vergleich mit den Kontrollproben.

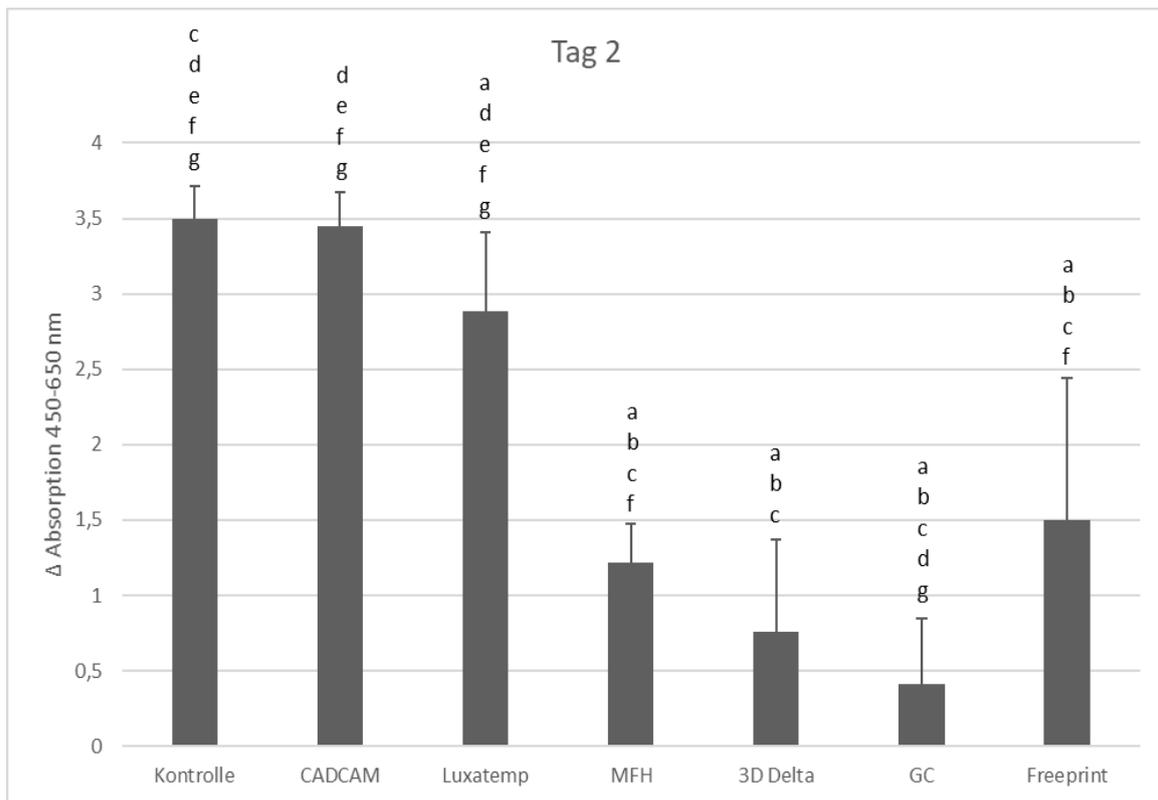


Diagramm 2: Werte der XTT Messung bei den unterschiedlichen Materialien an Messtag 2

Die Kontrollproben zeigen an Tag zwei weiterhin signifikant höhere Vitalitätswerte als die Zellkulturen nach Kontakt mit den additiv hergestellten Probenkörpern. Den geringsten Messwert weist das Material GC Temp Print auf. Eine minimale im Vergleich zu den Kontrollproben nicht signifikante Reduktion des Messwerts zeigen die Zellkulturen nach Exposition gegenüber dem CAD/CAM-Material. Zellen nach Kontakt mit dem konventionellen Provisorienmaterial Luxatemp lassen ebenfalls eine Reduktion der Proliferation erkennen, welche gegenüber den Kontrollproben signifikant ist ( $p = 0,034$ ).

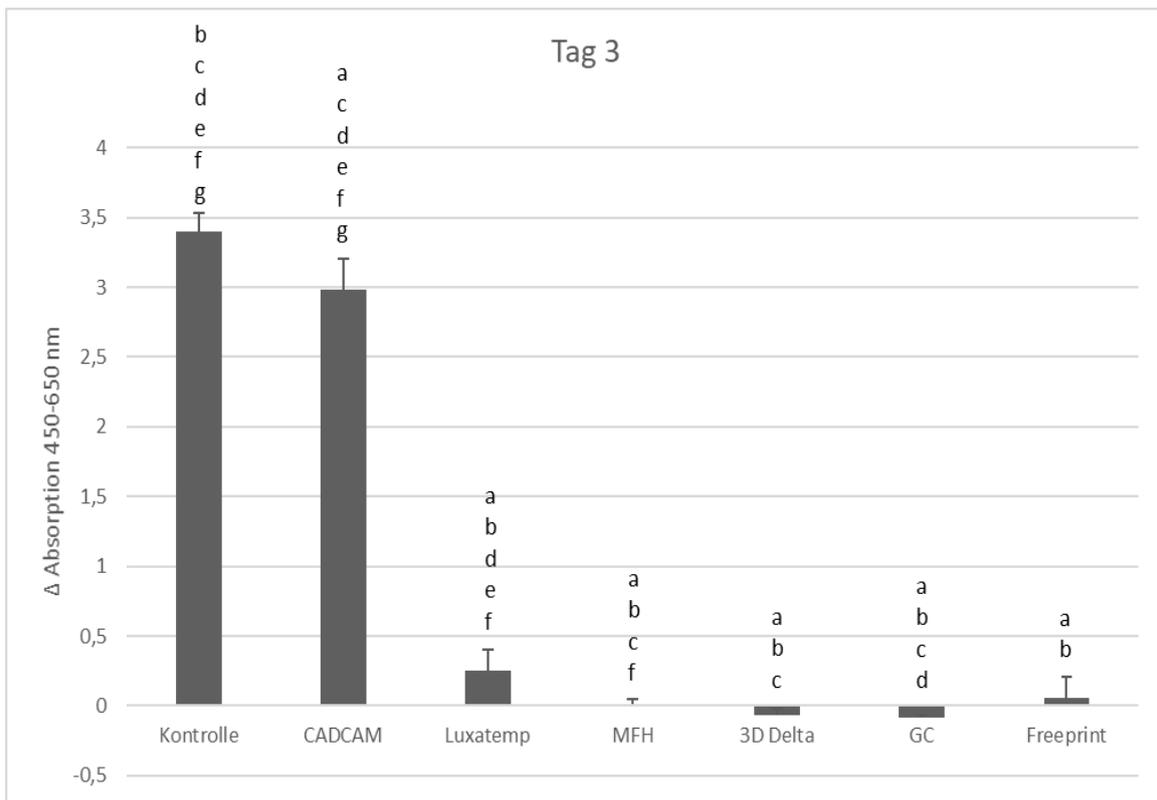


Diagramm 3: Werte der XTT Messung bei den unterschiedlichen Materialien an Messtag 3

Am dritten Messtag zeigen alle Materialien signifikant geringere Proliferationswerte als die Kontrollproben. Vor allem die Zellkulturen nach Exposition gegenüber den 3D gedruckten Materialien, sowie dem Material Luxatemp, weisen eine deutliche Reduktion der Messwerte auf. Einen zwar der Kontrolle gegenüber signifikanten, aber dennoch recht geringen Abfall der Vitalität zeigen die Zellen nach Kontakt mit dem subtraktiv hergestellten Probenkörper.

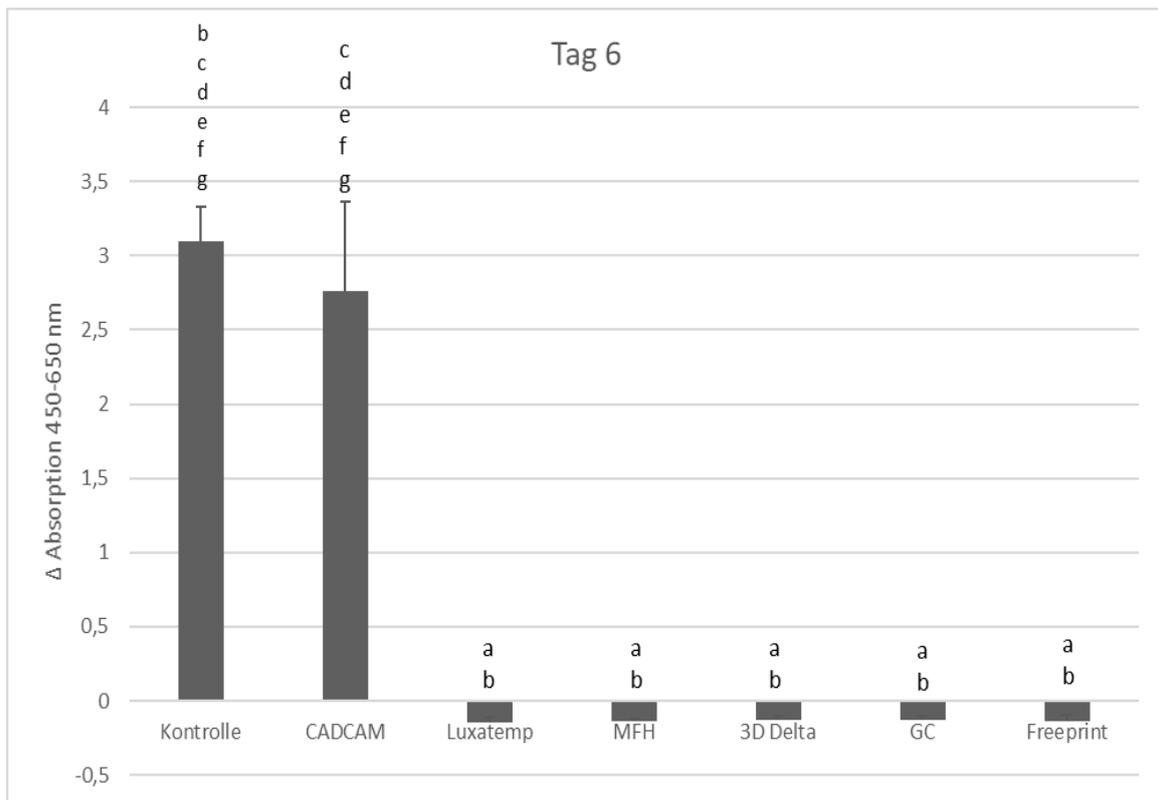


Diagramm 4: Werte der XTT Messung bei den unterschiedlichen Materialien an Messtag 6

Die Messungen an Tag sechs weisen sowohl bei den Proben nach Kontakt mit den dreidimensional gedruckten Probenkörpern als auch bei den Zellkulturen des Provisorienmaterials Luxatemp signifikant geringe Proliferationswerte verglichen mit den Kontrollproben und den Proben des CAD/CAM-Materials auf. Die Zellen nach Kontakt mit dem subtraktiv hergestellten Probenkörper zeigen eine minimale der Kontrolle gegenüber aber signifikante Reduktion der Zellproliferation.

## 4.2. Expression proinflammatorischer Zytokine

### 4.2.1. Expression von Interleukin 6

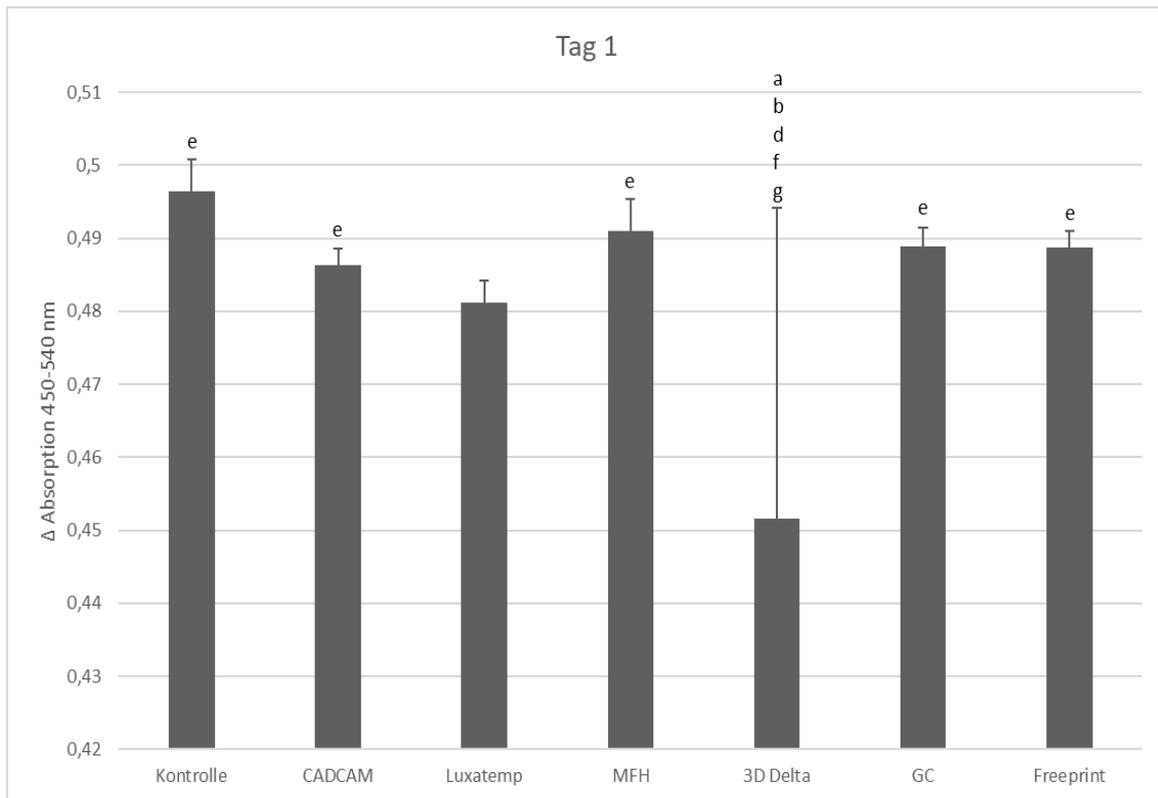


Diagramm 5: IL6 Messwerte der unterschiedlichen Materialien an Tag 1

Die Messung der Interleukin 6 Expression zeigt am ersten Messtag bei den Zellkulturen nach Kontakt mit dem Material der subtraktiven Fertigung, der konventionellen Provisorienherstellung, sowie mit den 3D gedruckten Probenkörpern von MFH, GC Temp Print und Freeprint Temp UV eine nicht signifikante Reduktion der Messwerte verglichen mit den Kontrollproben. Allein die Zellen nach Exposition mit dem mittels additiver Fertigung hergestellten Probenkörper des Materials 3D Delta weist eine deutliche, der Kontrolle gegenüber signifikante, Reduktion der IL-6 Produktion auf.

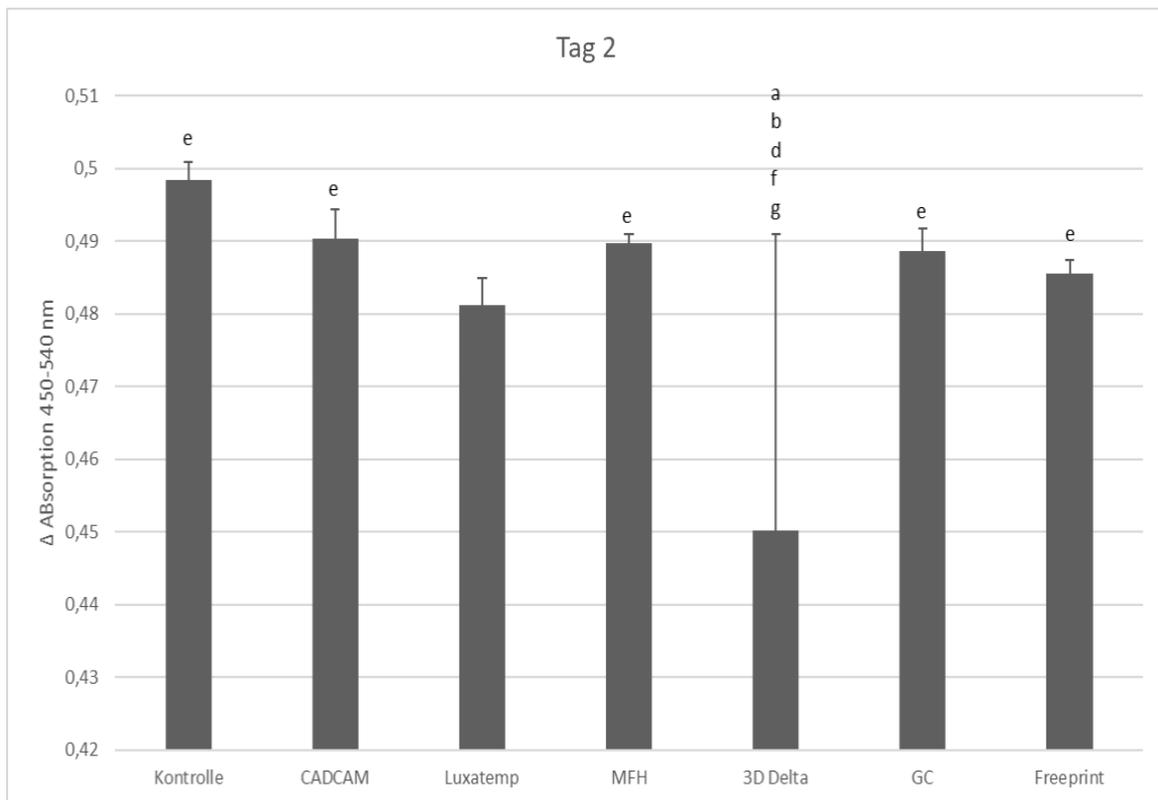


Diagramm 6: IL6 Messwerte der unterschiedlichen Materialien an Tag 2

Das Diagramm des Messtages zwei entspricht den Messungen des ersten Tages. Dabei steigen die Interleukin 6 Werte der Kontrollproben und der Proben des CAD/CAM-Materials minimal an, wobei die Zellkulturen der additiv gefertigten Prüfkörper eine minimale nicht signifikante Reduktion der Interleukin 6 Expression zeigen.

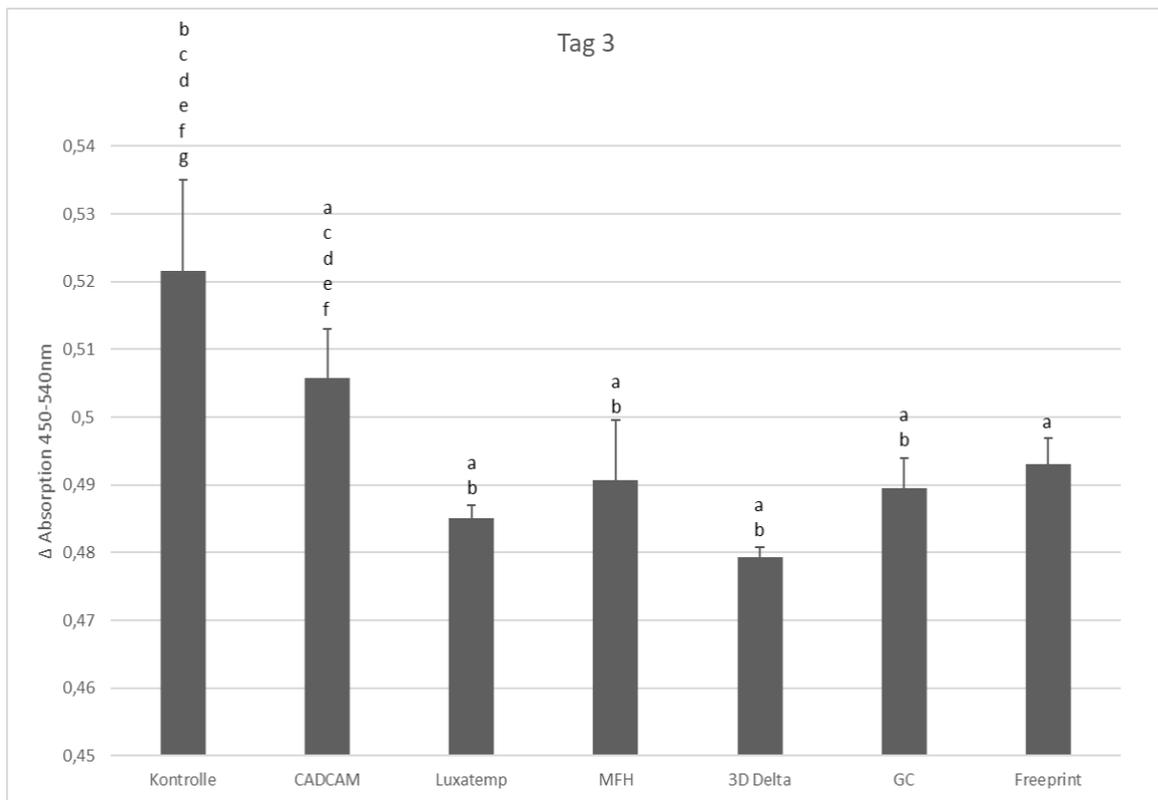


Diagramm 7: IL6 Messwerte der unterschiedlichen Materialien an Tag 3

Die Messwerte der Interleukin 6 Expression nehmen an Tag 3 bei allen Zellkulturen leicht zu, wobei alle Zellen, welche einem Probenmaterial ausgesetzt waren, einen signifikant reduzierten Messwert verglichen mit der Kontrolle zeigen. Dabei weisen erneut die Kulturen nach Kontakt mit dem additiv gefertigten Material 3D Delta die niedrigsten Messwerte auf. Die Zellen nach Exposition gegenüber dem Material der subtraktiven Fertigung zeigen den höchsten Messwert der getesteten Materialien.

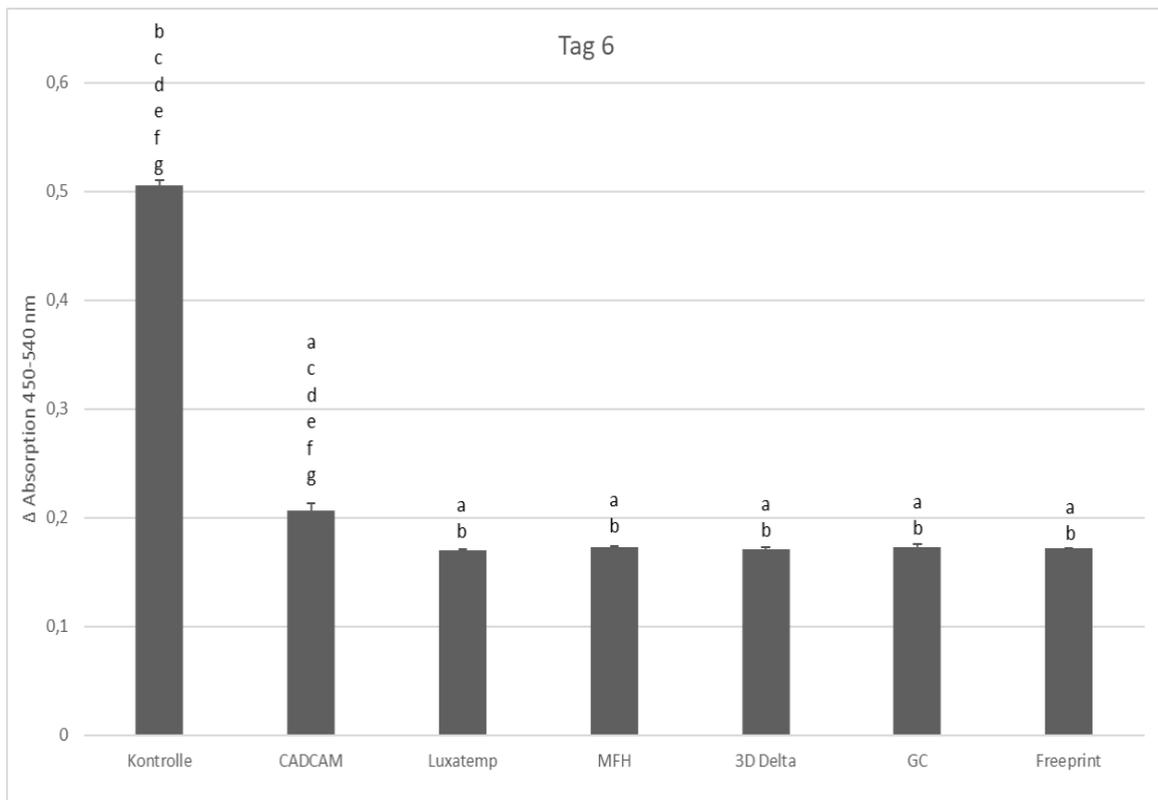


Diagramm 8: IL6 Messwerte der unterschiedlichen Materialien an Tag 6

An Tag sechs sinken die Werte der Interleukin 6 Expression bei den Zellkulturen aller getesteten Materialien deutlich ab. Die Kontrollproben zeigen ebenfalls eine leichte Reduktion der Interleukin 6 Produktion, wobei der Wert signifikant über den Werten der Materialien exponierten Zellen liegt. Die Messwerte aus den Zellkulturen nach Kontakt mit den Materialien Luxatemp, MFH, 3D Delta, GC Temp Print und Freeprint Temp UV sind miteinander vergleichbar, während der Messwert des subtraktiv gefertigten CAD/CAM-Probenkörpers signifikant über diesen liegt.

#### 4.2.1.1. Ergebnisse des Interleukin 6 ELISA isoliert pro Tag

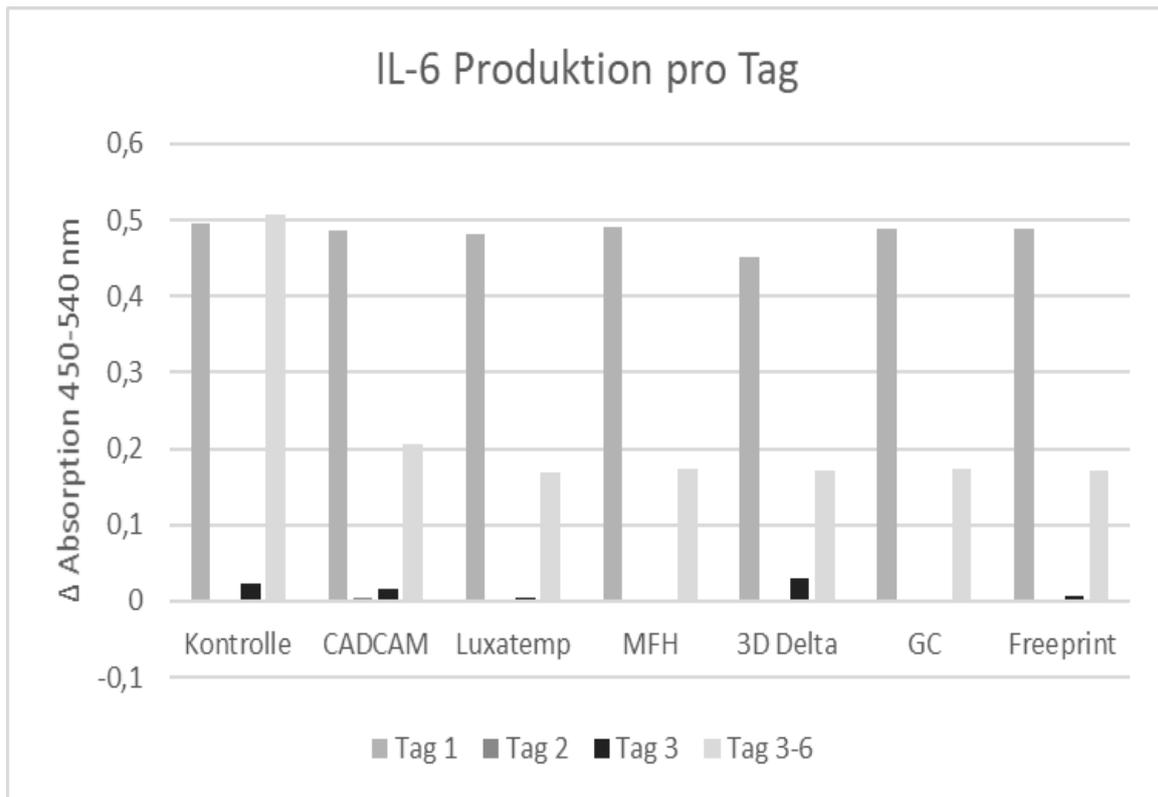


Diagramm 9: IL6 Produktion isoliert pro Tag

Die Zellkulturen der Kontrollproben zeigen an Tag 1 mit den Zellkulturen nach Materialkontakt vergleichbare Werte. Einzig die Zellen nach Exposition gegenüber dem Material 3D Delta lassen eine geringfügig geringere Produktion erkennen.

Am zweiten Messtag zeigt sich keinerlei nachweisbare Interleukin 6-Produktion bei allen Zellkulturen entsprechend den Kontrollproben.

Die Zellen der Kontrolle zeigen an Tag 3 eine geringe Produktion an Interleukin 6. Dies zeigt sich vergleichbar mit den Werten der Zellen nach Kontakt mit den subtraktiv gefertigten Probenkörpern und mit den Zellen nach Exposition gegenüber dem Material 3D Delta, wobei letzteres minimal höhere Werte als die Kontrolle aufweist. Die Zellkulturen nach Kontakt mit Luxatemp und Freeprint Temp UV lassen geringe Interleukin 6-Werte erkennen, während sich bei den Materialien MFH und GC ebenso wie an Tag 2 keine Interleukin-Produktion zeigt.

Die Kontrollproben zeigen an den Tagen 3 bis 6 die höchsten Interleukin 6-Werte. Die Zellen nach Exposition mit den mittels subtraktivem Verfahren hergestellten Probenkörpern zeigen den zweithöchsten Wert, welcher ungefähr bei  $\frac{2}{3}$  der Kontrolle liegt, während die Zellkulturen aller

anderen Materialien geringfügig unter diesem liegen.

#### 4.2.2. Expression von Interleukin 8

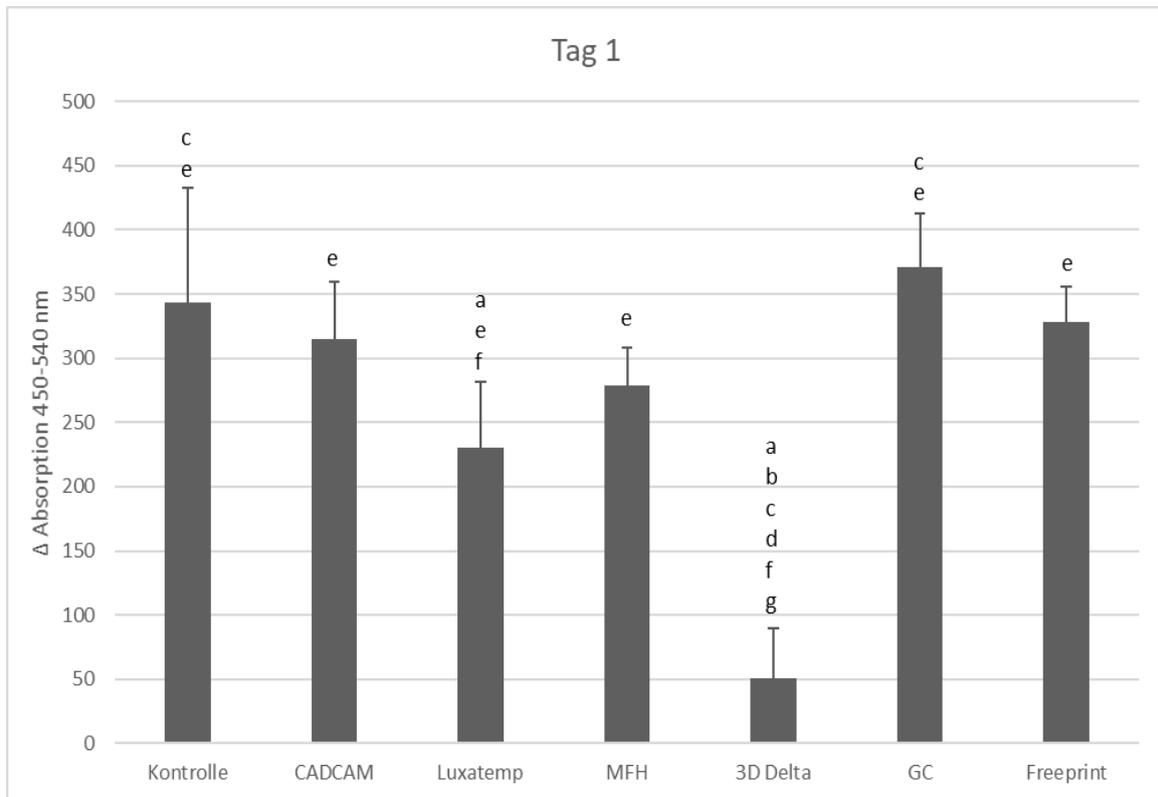


Diagramm 10: IL8 Messwerte der unterschiedlichen Materialien an Tag 1

An Messtag eins zeigen die Zellkulturen nach Kontakt mit den Materialien Luxatemp und 3D Delta eine signifikant niedrigere Interleukin 8-Produktion als die Zellen der Kontrollproben. Hierbei ergab sich vor allem für die Zellkultur nach Exposition gegenüber dem Eluat von 3D Delta ein deutlich niedrigerer Wert, welcher gegenüber allen getesteten Materialien signifikant ist. Die Zellen nach Exposition mit dem subtraktiv gefertigten CAD/CAM-Material, und den additiv gefertigten Materialien MFH und Freeprint Temp UV zeigen nicht signifikant niedrigere Werte als die Kontrollen. Alleinig die Zellproben nach Kontakt mit dem Material GC Temp Print weisen eine geringfügig, nicht signifikant höhere Interleukin 8-Produktion verglichen mit der Kontrolle auf.

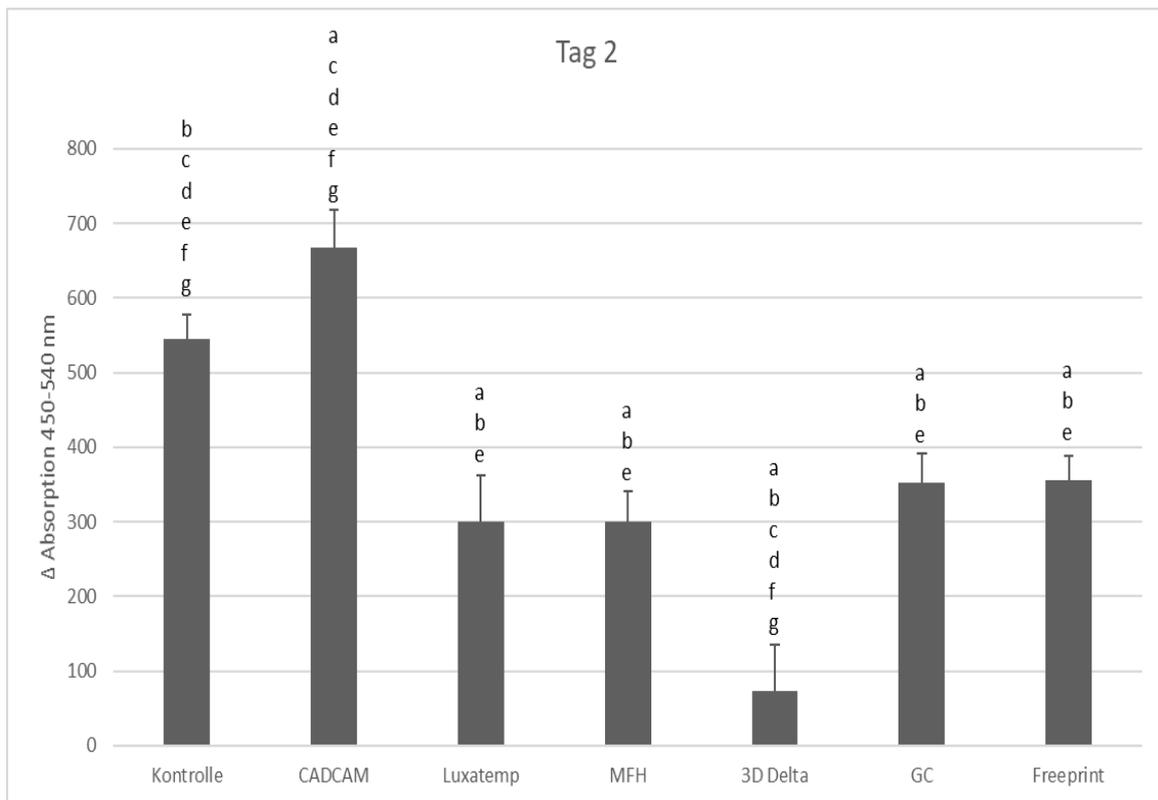


Diagramm 11: IL8 Messwerte der unterschiedlichen Materialien an Tag 2

Nach 48 Stunden zeigt sich die Interleukin 8-Produktion bei den Zellen nach Exposition gegenüber dem additiv gefertigten Material 3D Delta immer noch gegenüber allen Proben signifikant reduziert. Die Messwerte der Zellen nach Kontakt mit den Materialien GC Temp Print und Freeprint Temp UV, sowie MFH und Luxatemp, entsprechen sich weitestgehend und liegen signifikant unter dem Niveau der gemessenen Kontrollproben. Die Zellkulturen, welche dem Eluat des subtraktiv gefertigten CAD/CAM-Materials ausgesetzt waren, weisen eine gegenüber der Kontrolle signifikant höhere Interleukin 8-Produktion auf.

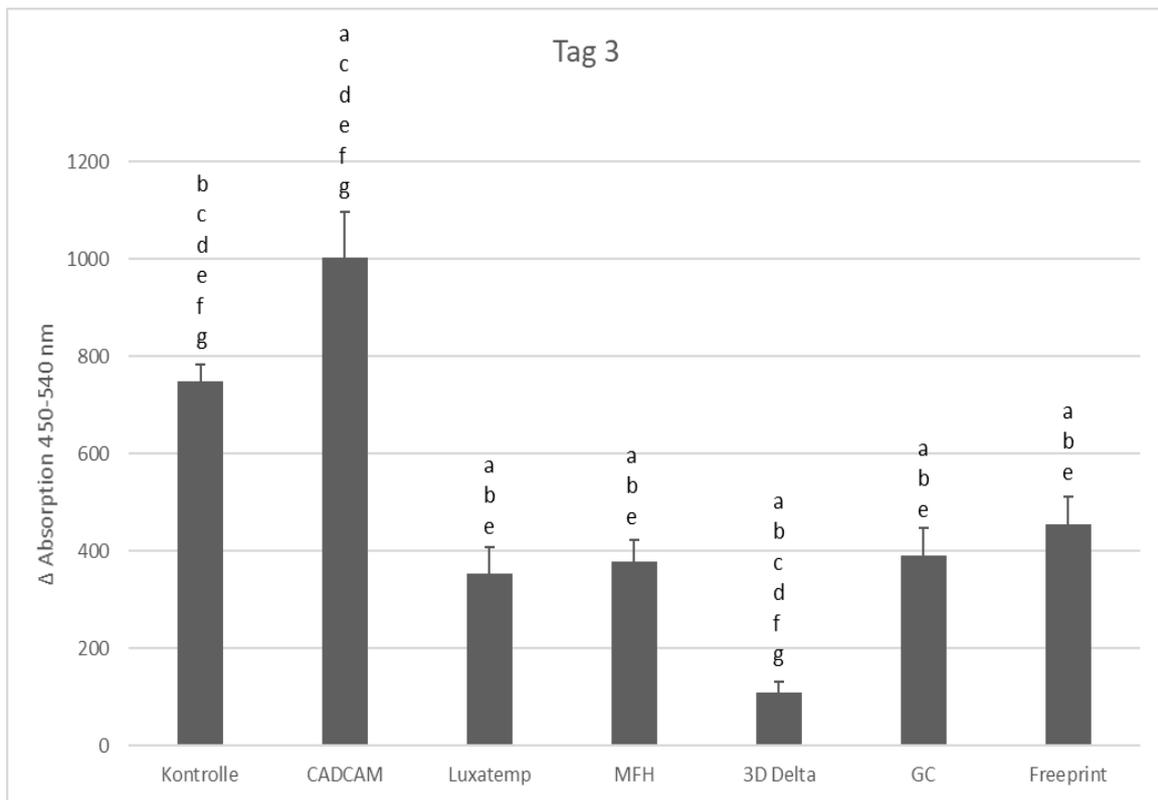


Diagramm 12: IL8 Messwerte der unterschiedlichen Materialien an Tag 3

Die Messungen an Tag drei spiegeln ein ähnliches Bild wie bereits nach 48 Stunden wider. Die Produktion steigt bei allen Zellkulturen im Vergleich zum Vortag an. Hierbei zeigt sich bei den Zellen nach Kontakt mit den additiv gefertigten Materialien vor allem die Probe von Freeprint Temp UV mit einer leicht erhöhten Interleukin 8-Produktion. Weiterhin liegen alle getesteten Zellkulturen in den Messwerten signifikant unter den Ergebnissen der subtraktiv gefertigten CAD/CAM-Probenkörper.

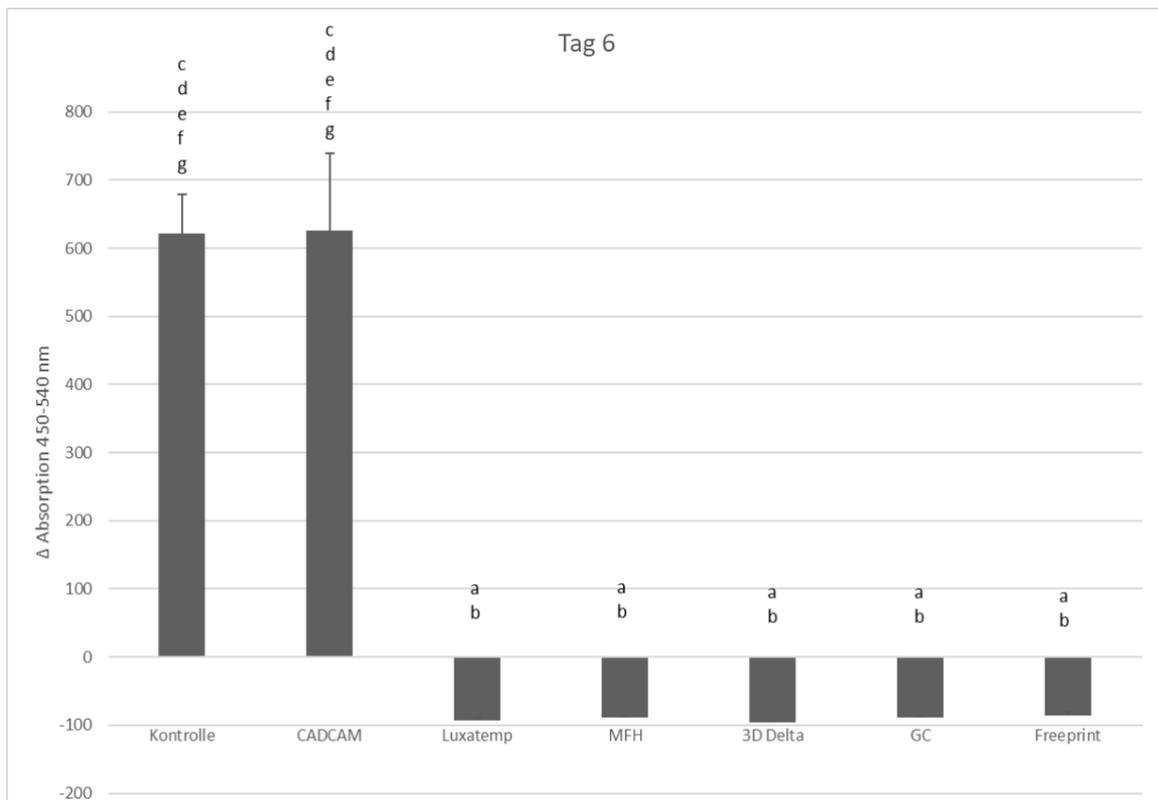


Diagramm 13: IL8 Messwerte der unterschiedlichen Materialien an Tag 6

An Tag sechs stellen sich alle Messwerte im Vergleich zum vorherigen Messtag deutlich reduziert dar. Dabei liegen die Kontrollproben und die Messungen der Zellkulturen nach Exposition gegenüber dem subtraktiv gefertigten CAD/CAM-Material auf dem gleichen Niveau, sowie signifikant über den Ergebnissen der anderen Proben. Die Zellkulturen nach Kontakt mit den additiv gefertigten Materialien, ebenso wie mit dem konventionellen Provisorienmaterial Luxatemp, zeigen kaum Interleukin 8-Produktion und weisen ähnliche Messungen auf.

#### 4.2.2.1. Ergebnisse des Interleukin 8 ELISA isoliert pro Tag

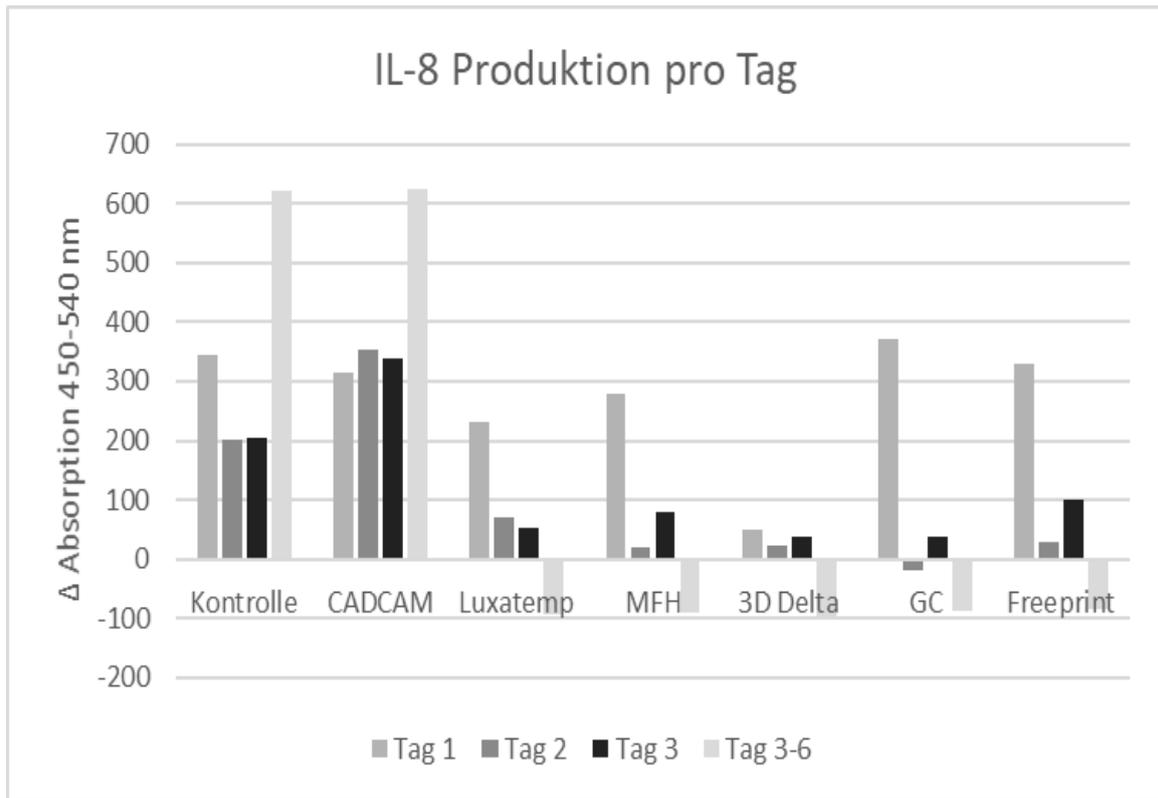


Diagramm 14: IL-8 Produktion isoliert pro Tag

Die Kontrollproben zeigen an Tag 1 mit den Zellkulturen der Materialien des subtraktiven Herstellungsverfahrens, Freeprint Temp UV und GC Temp Print vergleichbare Werte, wobei letztere minimal höhere Werte aufweisen. Die den Materialien MFH und Luxatemp exponierten Zellen lassen nur geringfügig kleinere Produktionsmengen an IL-8 erkennen. Den geringsten Wert an Tag 1 zeigen die Zellkulturen des Materials 3D Delta.

An Tag zwei sinkt der Wert bei den Kontrollproben deutlich ab, was dem Verhalten der anderen Zellkulturen entspricht, allerdings zeigt sich der Abfall hier stärker ausgeprägt. Als einzige Zellkultur zeigt die gegenüber dem subtraktiven CADCAM Material exponierte einen leichten Anstieg der Interleukin 8 Produktion an Tag 2.

Die Interleukin 8-Produktion bleibt an Tag drei bei den Kontrollproben auf gleichem Niveau, wie am Vortag. Bei den Zellen in Kontakt mit den subtraktiv hergestellten Probenkörpern und mit dem Material Luxatemp kommt es zu einem leichten Absinken der Messwerte. Die Zellkulturen der dreidimensional gedruckten Probenkörper lassen alle einen Anstieg der Interleukin 8-Produktion verglichen zum Vortag erkennen.

An Tag sechs zeigen die Kontrollproben, ebenso wie die Proben der Zellen nach Kontakt zum subtraktiv hergestellten Prüfkörper hohe Interleukin 8-Werte, während bei allen anderen

Materialien keinerlei Produktion des Interleukins mehr detektierbar ist.

### 4.3. Indirekte Immunfluoreszenz

#### 4.3.1. Interleukin 6

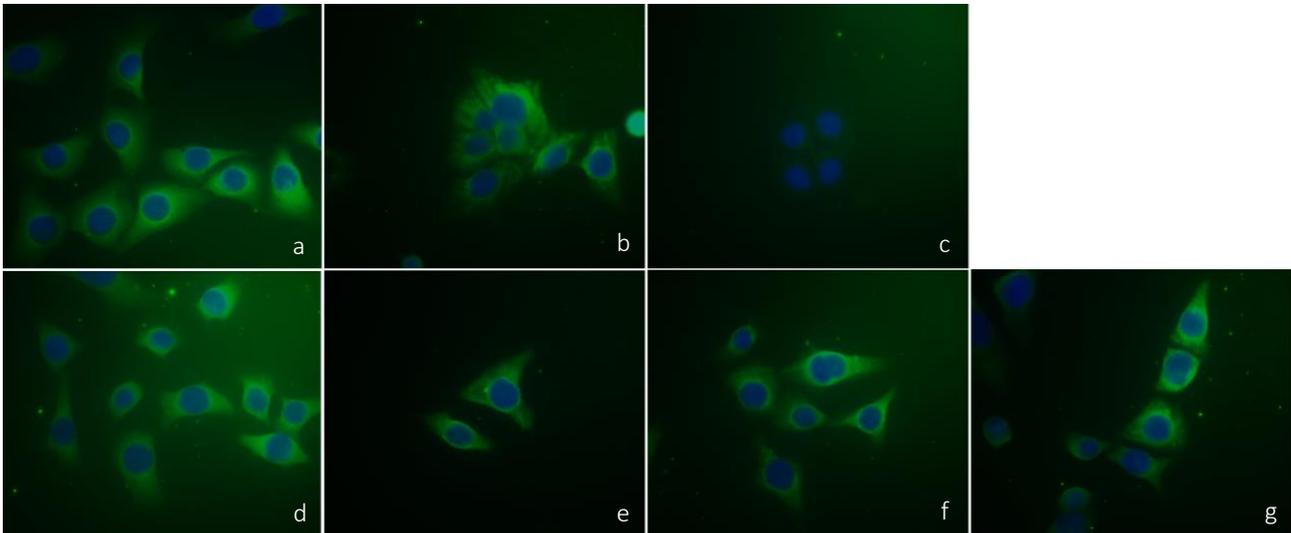


Abbildung 10: Immunhistochemische Färbung gegen Interleukin 6, Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 highly cross-absorbed Antirabbit IgG 1:500, DAPI Kernfärbung; Kontrolle (a), CAD/CAM (b), Luxatemp (c), MFH (d), 3Delta Temp (e), GC Temp PRINT (f), Freeprint Temp UV (g)

Nach Markierung der gingivalen Keratinozyten mit Interleukin 6-Antikörpern zeigte sich intrazellulär ein homogenes Färbemuster bei den Zellen nach Exposition gegenüber den Materialien des 3D Ducks, sowie gegenüber dem Material der subtraktiven CAD/CAM-Technik und der Kontrolle. Die Gruppe der Zellen, welche mit dem Eluat von Luxatemp in Kontakt waren, zeigten kein immunhistochemisches Signal.

Die Form der Zellen erscheint in allen Proben physiologisch und gegenüber den Zellen der Kontrollproben unverändert.

Kontrolle	+
CAD/CAM	+
Luxatemp	-
MFH	+
3Delta Temp	+
GC Temp PRINT	+
Freeprint Temp UV	+

Tabelle 5: Ergebnis nach immunhistochemischer Färbung gegen Interleukin 6; immunhistochemisches Signal ist erkennbar (+), kein immunhistochemisches Signal ist erkennbar (-)

#### 4.3.2. Interleukin 8

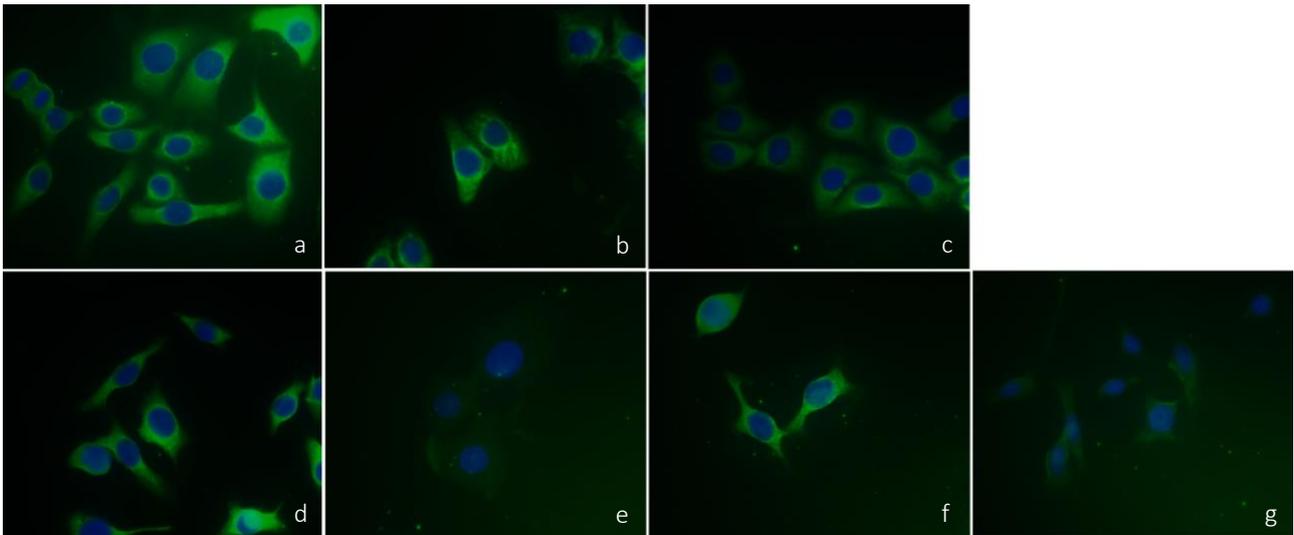


Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung gegen Interleukin 8, Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 highly cross-absorbed Antirabbit IgG 1:500, DAPI Kernfärbung; Kontrolle (a), CAD/CAM (b), Luxatemp (c), MFH (d), 3Delta Temp (e), GC Temp PRINT (f), Freeprint Temp UV (g)

Bei der Markierung der Keratinozyten mit IL8-Antikörpern zeigte sich eine homogene Färbung im gesamten Zytoplasma der Zellen nach Exposition gegenüber dem 3D Druck Material MFH, dem Material der subtraktiven CAD/CAM-Technik, sowie Luxatemp und der Kontrolle. Die Zellen, welche gegenüber 3Delta Temp und Freeprint Temp UV exponiert waren, zeigten kein immunhistochemisches Signal. Die immunhistochemisch analysierten Zellen nach Kontakt mit GC Temp Print zeigten auch ein homogenes Färbemuster, allerdings mit verringerter Intensität.

Die Form der Zellen erscheint auch hier in allen Proben physiologisch.

Kontrolle	+
CAD/CAM	+
Luxatemp	+
MFH	+
3Delta Temp	-
GC Temp PRINT	+ -
Freeprint Temp UV	-

Tabelle 6: Ergebnis nach immunhistochemischer Färbung gegen Interleukin 8; immunhistochemisches Signal ist erkennbar (+), kein immunhistochemisches Signal ist erkennbar (-), eine verringerte Intensität des immunhistochemischen Signals ist erkennbar (+-)

### 3.4. Rasterelektronenmikroskopische Analyse

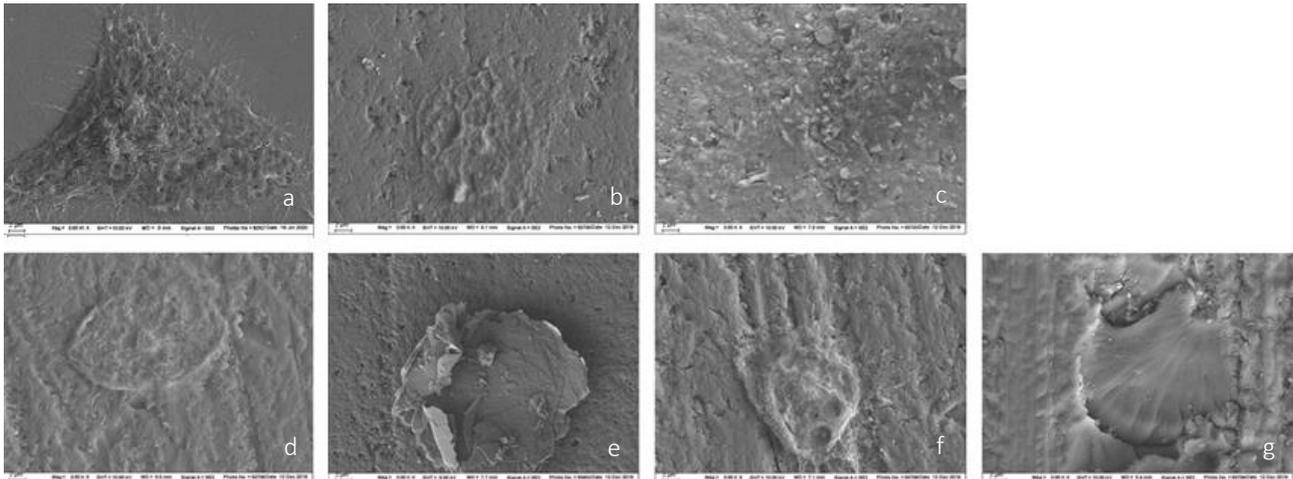


Abbildung 12: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Keratinozyten auf den Prüfkörpern in 3000facher Vergrößerung, Kontrolle (Glas) (a), CAD/CAM (b), Luxatemp (c), MFH (d), 3Delta Temp (e), GC Temp PRINT (f), Freeprint Temp UV (g)

Auf den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen ist die typische schuppenförmige Gestalt der Keratinozyten und die der Adhärenz dienenden Desmosomen, welche ihnen ein stacheliges Erscheinungsbild geben, zu erkennen. Nach dem Kontakt der Zellen mit den sechs getesteten Materialien ist zu erkennen, dass die abgebildeten Zellen eine veränderte Form zu der Zelle auf der Glasplatte aufweisen. Sie erscheinen rundlich und besitzen keine stachelförmigen Ausläufer, welche für eine Adhärenz sprechen würden. Dieser Prozess des Abrundens und auch des Verlustes von Haltestrukturen wird regelmäßig bei apoptotischen Keratinozyten beobachtet. Minimale desmosomenähnliche Ausläufer zeigt die Zelle auf dem Probenkörper des Materials GC Temp PRINT. Vor allem bei den Materialien 3Delta Temp und Freeprint Temp UV zeigen die abgebildeten Strukturen avitale Zellfragmente. Bei der Negativprobe Luxatemp zeigten sich keinerlei zellähnliche Strukturen. Die Zellen, welche gegenüber dem CAD/CAM Material exponiert waren, zeigen in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen ebenfalls Zeichen von Apoptose.

## 5. Diskussion

Die additive Fertigung von Langzeitprovisorien aus Komposit wird in Zukunft zahntechnische Arbeitsabläufe erleichtern, beschleunigen und für weniger Materialverlust sorgen, indem mit Hilfe von digitalen Abformungen die zahnärztlichen Versorgungen direkt in der Praxis gestaltet und gedruckt werden können. Dabei könnten die Form und Funktion einer prothetischen Krone oder Brücke über eine zuvor angefertigte provisorische Versorgung zunächst von Behandler und Patient geprüft werden, um schließlich die optimale Lösung für die endgültige Versorgung, ästhetisch sowie funktionell, zu finden. Dafür wurden in jüngerer Zeit zahlreiche neue Kunststoffe entwickelt, die sich für die Verarbeitung mit dreidimensionalen Druckmethoden eignen. Wie bereits in früheren Studien gezeigt, könnten dentale Restorationskomposite durch herausgelöste Bestandteile, wie freie Monomere und nachfolgend unerwünschte Nebenwirkungen, insbesondere Allergien oder Schleimhautirritationen hervorrufen (Reichl, 2011). Diesem Aspekt kommt besondere Bedeutung zu, wenn die Kunststoffe beispielsweise bei der Lückenversorgung nach einer Zahnextraktion, einer Implantation oder anderen chirurgischen Eingriffen eingesetzt werden. Grund für die Freisetzung potentiell gesundheitsgefährdender Verbindungen durch Kompositwerkstoffe können Abbauvorgänge durch die dauerhafte mechanische Belastung, die Wasseraufnahme, die unvollständige Polymerisation und auch Enzyme, welche Bestandteil des Speichels sind, sein (Munksgaard et al., 1990; Örtengren et al., 2001; Sarkar, 2000). Wie viele Monomere aus den Kompositen gelöst werden, liegt am Anteil der nicht gebundene Restmonomere, an der Menge und Art der Füllkörper und ihrer Verteilung, am Molekulargewicht, an der Löslichkeit und auch an der Dichte der Polymerstruktur (Bakopoulou et al., 2009). Die Konversionsrate von Kompositmaterialien liegt bei direkter Lichthärtung bei 55-75 % und kann durch indirekte Lichthärtung, inklusive Komponenten wie Druck oder Wärme, auf 80 % erhöht werden (Bakopoulou et al., 2009). Das bedeutet 20-45 % der Monomere bleiben ungebunden und können prinzipiell gelöst werden. Deshalb liegt die Frage nahe, wie sich die neu entwickelten Materialien für den 3D Druck gegenüber den umgebenden Geweben verhalten.

### 5.1. Versuchsaufbau

Die vorliegende Studie sollte die Beeinflussung der Zellproliferation, sowie der Expression der Entzündungsmediatoren Interleukin 6 und 8 an humanen gingivalen Keratinozyten durch verschiedene dreidimensional gedruckte Kompositmaterialien für provisorische Versorgungen

untersuchen. Dafür wurden die vier für den 3D Druck neu hergestellte Materialien mit jeweils einem Material der konventionellen Provisorienherstellung und der CAD/CAM Fertigung verglichen. Um Anhaltspunkte für die Werte von unbehandelten Keratinozyten zu erhalten, wurden ebenfalls zu jedem Zeitpunkt Kontrollen mit unbehandelten Zellen mitgeführt. Die gewählten Photopolymerharze der additiven Fertigung finden inzwischen häufig klinischen Einsatz und repräsentieren eine neuartige Materialengruppe, welche in Studien zur Biokompatibilität bisher kaum geprüft wurde. Des Weiteren wurde mit dem industriell hergestellten CAD/CAM Material eine Probe verwendet, bei der nahezu keine Beeinflussung der Zellen anzunehmen ist, da das Rohmaterial unter standardisierten industriellen Bedingungen hergestellt und polymerisiert wurde und somit eine hohe Konversionsrate sichergestellt werden kann (Stawarczyk et al., 2008). Zusätzlich bietet dieses Material eine moderne Variante der Herstellung von provisorischen Versorgung durch den Einsatz von digitaler Planung. Als Negativprobe wurde das selbstmischende konventionelle Material Luxatemp gewählt, da es in der klinischen Routinebehandlung momentan als Referenzmaterial gilt. Im Hinblick auf die individuelle Anwendung eröffnen sich mehr Fehlerquellen bei der Herstellung von Werkstücken in deren Folge eine größere Freisetzung von Restmonomeren zu erwarten ist. Die Zellen kamen mit Hilfe von Eluaten, welche durch eine 24-, 48- und 72-stündige sowie 6-tägige Inkubation der Prüfkörper im Zellmedium entstanden, in Kontakt mit dem jeweiligen Material. Dabei wurde die Stärke der Expression von Entzündungsmediatoren anhand des Zellüberstandes und die Proliferationsrate mit Hilfe der am Boden des Probengefäßes adhären Zellen ermittelt. Die auf Eluaten basierende Versuchsmethode wird bei Zytotoxizitätsermittlungen von dentalen Kompositen standardmäßig verwendet, da sie im Vergleich zu Untersuchungen mit einzelnen Komponenten der Materialien ein Gesamtbild über die Auswirkungen eines Werkstoffs gibt und somit den klinischen Gegebenheiten näher kommt (Jerg et al., 2018; Yang et al., 2018). So können nicht nur die Wirkungen einzelner Anteile des Materials getestet werden, sondern auch mögliche synergistische Reaktionen von Monomeren und Komonomeren (Massaro et al., 2019). Der kürzeste für die Inkubation gewählte Zeitraum von 24 h wurde gewählt, da nach früheren Studien in dieser Zeitspanne die meisten löslichen Stoffe eluiert sind und daraus folgend die höchste zytotoxische Wirkung angenommen werden kann (Ferracane et al., 1990). Allerdings berichten andere Studien über eine längerfristige Elution über einen Zeitraum von bis zu 28 Tagen, weshalb in dieser Studie nicht nur die ersten 24 h betrachtet wurden, sondern ein Zeitraum von sechs Tagen (Polydorou et al., 2012). Grund für die gewählten 24 h Intervalle in den ersten drei Messtagen waren die nach Exposition rasch eintretenden Veränderungen an den Zellen. Die Festlegung des letzten Messtages nach sechs Tagen erfolgte nach Orientierung an den Kontrollzellen, welche zu diesem Zeitpunkt deutlich sinkende Vitalitätswerte erkennen ließen.

Da sich viele unterschiedliche Zelltypen in anatomischer Nähe zu provisorischen Versorgungen befinden, können für diesen Zweck eingesetzte Komposite direkten oder indirekten Einfluss nehmen. In der vorliegenden Studie wurden humane gingivale Keratinozyten gewählt. Keratinozyten scheinen nach den Ergebnissen früherer Studien empfindlicher gegenüber Kompositeluatens zu sein als beispielsweise humane gingivale Fibroblasten (Jerg et al., 2018). Zur Bestimmung der zytotoxischen Wirkung wurde der XTT-Test gewählt, der durch die intrazelluläre Umwandlung von Tetrazoliumsalz mit Hilfe von mitochondrialen Dehydrogenasen die Zellvitalität bestimmt. Im Vergleich zu älteren Methoden, wie zum Beispiel der Detektion von Natriumchromat, gelingt mit dem XTT-Test ein deutlich empfindlicherer Nachweis der Zellaktivität (Bean et al., 1995). Der XTT-Test wurde dem ebenfalls in Frage kommenden MTT-Test vorgezogen, da das bei dem XTT-Test entstehende Formazan wasserlöslich ist. Dadurch ist eine raschere Messung möglich, während beim MTT Formazansalzkrystalle entstehen, die zunächst gelöst werden müssen und somit zusätzliche Fehlerquellen eröffnen (Vistica et al., 1991).

Die Bestimmung der Expression der Interleukine erfolgte mittels ELISA, welche eine sehr genaue und zudem auch eine weit verbreitete Methode für die Detektion einzelner Zytokine darstellt (Leng et al., 2008). Hierbei wurden die Interleukine 6 und 8 als Marker einer proinflammatorischen Reaktion gewählt. Vor allem IL6 scheint eine wichtige Rolle bei der Entzündungsreaktion als Folge von Kompositeluatens und im Rahmen von parodontalen Erkrankungen zu spielen (Jerg et al., 2018; Schulz et al., 2015). Für den Nachweis des Interleukin 6 in den jeweiligen Zellüberständen wurde die heterogene quantitative Sandwich-Enzymimmunoassay-Technik eingesetzt (Stöcker, 2019a).

Um zusätzlich auch die Möglichkeit zu haben, die gesuchten Zytokine nicht nur quantitativ sondern auch qualitativ nachzuweisen, wurde ergänzend eine immunhistochemische Analyse durchgeführt (Stöcker, 2019b).

Der erste Entwurf des Versuchs sah vor die nach Herstellerangaben gefertigten Prüfkörper mit frisch trypsinierten Keratinozyten zu bedecken, also die Materialien in direkten Kontakt mit den Zellen zu bringen. Hierbei zeigten sich allerdings bereits 24 h nach Versuchsbeginn überwiegend nicht adhärente und somit avitale Zellen. Aus diesem Grund wurde der Versuch mit Eluatens der jeweiligen Prüfkörpermaterialien durchgeführt. Die Abmessungen der Probenkörper (Durchmesser 20mm, Stiehl 0,5mm, Dicke 1,5mm) wurden entsprechend der Dimension der Wells ausgewählt. Diese besitzen einen Durchmesser von circa 22mm und sorgen durch den maximal nur 1,5mm breiten Randspalt für möglichst wenig Bewegung des Prüfkörpers im Well.

Die im Versuch verwendeten Prüfkörper haben eine sehr einfache und ebenmäßige Geometrie, während Kronenprovisorien auf Grund der Zahnanatomie Fissuren und Höcker aufweisen, welche im Vergleich zu unseren Versuchskörpern schwieriger zu polieren sind und somit eine rauere Oberflächenstruktur aufweisen. Dies kann, wie bereits in vorausgegangenen Studien gezeigt, ebenfalls die Menge der herausgelösten Monomere beeinflussen (Trubiani, Toniato, et al., 2012). Des Weiteren variiert bei dentalen Provisorien die Schichtstärke des Materials. In dem hier vorliegenden Versuch haben die Prüfkörper immer die gleiche Dicke, wodurch die Konversion jedes Bereichs identisch ist. Im klinischen Alltag wird die Konversionsrate je nach Schichtdicke variieren, was ebenfalls einen Einfluss auf die Menge an freigesetzten Monomeren und anderen Verbindungen haben kann (Bakopoulou et al., 2009).

Ein möglicher Nachteil des in dieser Studie durchgeführten ELISAs kann die Gewinnung der Daten über die Entzündungsmediatoren aus dem Zellüberstand gewesen sein. Da das Medium der Keratinozyten nur jeden dritten Tag gewechselt wird, blieb das Eluat für den Messtag eins 24h auf den Zellen, während es bei Messtag zwei und drei doppelt oder dreifach so lange in den Wells blieb. Das war einerseits gewünscht, da ja die Auswirkung des Eluats über die Zeit gemessen werden sollte, aber so können sich die von den Zellen produzierten Interleukine auch über diesen Zeitraum in den Wellschalen sammeln. Somit zeigen die Messwerte an Tag zwei und drei nicht isoliert die an diesen Tagen produziert Menge, sondern die kumulative Menge an Zytokin. Aus diesem Grund muss der Messwert von Tag zwei um den Wert des Tages eins reduziert werden, um zu erkennen was isoliert an Tag zwei produziert wurde. Da für das Well von Tag sechs das Medium bereits an Tag drei gewechselt wurde, zeigt dieser Messwert nur die Produktion der Interleukine über den Zeitraum von Tag drei bis sechs.

Eine Limitation der Studie zeigt sich in der eingeschränkten Auskunft über die Inhaltsstoffe der getesteten Materialien. Um zu ermitteln welche Stoffe tatsächlich aus den Materialien herausgelöst werden, sollte in weiteren Untersuchungen eine Analyse der aus den jeweiligen Materialien gewonnenen Eluate mittels Gaschromatographie/Massenspektroskopie (GC/MS) durchgeführt werden (Jürgen Durner et al., 2010). Dabei sollten unterschiedliche Lösungsmittel verwendet werden, welche der Mundsituation noch mehr ähneln, da der menschliche Speichel Enzyme enthält, welche einen Einfluss auf die eluierten Stoffe haben können (Seiss et al., 2009). Zusätzlich sollte zukünftig auch der Aspekt der Alterung der Materialien, sowie simulierte Kauprozesse in die folgenden Versuche mit einbezogen werden (J. Durner et al., 2010).

## 5.2. Zellvitalität

Die Messungen fanden über einen Zeitraum von insgesamt 6 Tagen statt und erfolgten nach 24 h, 48 h, 72 h und 6 Tagen. Wie erwartet zeigten hierbei die Zellen, nach Exposition gegenüber dem CAD/CAM Material keine signifikante Beeinflussung der Zellvitalität. Dies entspricht den Ergebnissen früherer Studien, die für CAD/CAM gefertigte Werkstücke aus Kompositen keine Beeinflussung der Zellvitalität beobachten konnten (Lee et al., 2017). Durch die industrielle und standardisierte Fertigung der Rohkörper für das CADM/CAM-Verfahren werden diese vollständig polymerisiert und haben eine sehr hohe Konversionsrate und somit einen sehr geringen Restmonomergehalt (Stawarczyk et al., 2008; Voco GmbH, 2018). Der in diesem Versuch verwendete CAD/CAM-Rohkörper von VOCO enthält 86-Gewichtsprozent Füllkörperanteil (V. GmbH, 09.2020). Zusätzlich zeigten diese Prüfkörper bei der Herstellung eine bessere Polierbarkeit, was für eine Oberfläche mit weniger Rauigkeiten und somit weniger Ablagerungsmöglichkeiten für Bakterien oder Belägen im späteren, klinischen Gebrauch spricht.

Trotz der manuellen Herstellung und der deutlich schlechteren Polierbarkeit verursachten Probenkörper des konventionellen Kunststoffmaterials Luxatemp bis zu 48 Stunden signifikant geringere Beeinträchtigung der Zellvitalität als die 3D gedruckten Proben. Verglichen mit der Kontrolle zeigten sich erst nach 48 h signifikant verringerte Messwerte der Zellvitalität. Demgegenüber beobachteten ältere Studien für das Material Luxatemp bereits nach 24 h eine erhebliche Zytotoxizität (Peralta et al., 2018). Da in dieser Studie aber keine Angaben über die Konzentration des Eluats gemacht wurden, könnte die raschere Hemmung der Zellproliferation die Folge einer höheren Konzentration von Restmonomeren sein. Bei den für den 3D Druck hergestellten Kunststoffen zeigen alle Materialien im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant niedrigere Zellvitalität. Die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase hat im Messzeitraum kontinuierlich abgenommen, was auf eine vorangehende Schädigung der Zellen hindeutet. Allerdings scheinen sich die Materialien in ihrer Toxizität am Beginn der Messperiode zu unterscheiden, da die Reduktion der mitochondrialen Aktivität an den unterschiedlichen Zeitpunkten variiert.

Proben der Materialien Freeprint Temp UV und MFH scheinen bis zu 48 Stunden die Zellaktivität weniger zu beeinflussen als Proben der beiden Materialien 3Delta Temp und GC Temp PRINT. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass sowohl Freeprint Temp UV als auch MFH, wie in der rasterelektronenmikroskopischen Darstellung des Materials zu erkennen, sehr wenig Füllkörper enthalten (Kessler et al., 2019). Je weniger Füllkörper ein Material besitzt, umso transluzenter wird es

und umso mehr Licht kann in tiefere Schichten gelangen, was sehr wahrscheinlich für eine intensivere Polymerisation auch bei dickeren Proben sorgt (Halvorson et al., 2003; Ilie et al., 2013). Diese erhöhte Polymerisationsrate kann zu weniger freien Monomeren führen, die sich im Eluat lösen und Irritationen hervorrufen können. Eine geringere Elution von Monomeren aus ungefüllten Kompositen wurde bereits in früheren Studien gezeigt (Ferracane et al., 1990).

Bei den 3D Materialien mit einem höheren Anteil an Füllkörpern (3Delta Temp; 30 %, GC Temp PRINT; 20 %) zeigt 3Delta Temp gegenüber allen getesteten Materialien, ausgenommen GC Temp PRINT, bereits nach einem Tag signifikant niedrigere Vitalitätswerte, während in Anwesenheit der Probenkörper von GC Temp PRINT erst nach zwei Tagen eine signifikante Beeinträchtigung der Zellvitalität festzustellen war.

Weitere Gründe für eine geringere Konversionsrate können die Größe der Füllkörper darstellen. So wurde festgestellt, dass besonders kleine Füllkörper durch eine Streuung des Lichtes eine geringere Konversionsrate aufweisen als Komposite mit größeren Füllkörpern (Ilie, 2016). Grund dafür ist die bei kleinen Füllkörpern und auch bei einer höheren Anzahl von Füllkörpern vergrößerte Grenzschicht zwischen Matrix und Füller, welche die Lichtstreuung verursacht (Ilie, 2016). Das für den dreidimensionalen Druck verwendete Material 3Delta Temp besitzt mit einem Füllkörperdurchmesser von  $< 1 \mu\text{m}$  kleinere Füllkörper, was wie in oben genannter Studie eine geringere Konversionsrate mit erhöhtem Restmonomergehalt zur Folge haben könnte (Kessler et al., 2019). Dieser Studie würden die geringen Vitalitätswerte im durchgeführten XTT-Test entsprechen.

Die Materialien Freeprint Temp UV und MFH enthalten das Monomer Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) (Kessler et al., 2019; Next Dent C&B, 2019). Komonomere wie HEMA oder Triäthylenglycol-dimethacrylat (TEGDMA) können auf Grund ihrer hydrophilen Eigenschaften und der geringen Molekülgröße insbesondere in wässrigen Lösungen leichter aus Kompositen gelöst werden als größere hydrophobe Moleküle (Geurtsen, 2000). HEMA ist ein hydrophiles Monomer, welches sich wegen seines geringen Molekulargewichts leicht in Geweben ausbreiten kann (Schuster et al., 1999). Allerdings gibt es Studien über ein amphiphiles Verhalten, wobei HEMA durch eine Dehydratation hydrophobe Eigenschaften erlangt (Fujisawa et al., 2001). TEGDMA ist lipophil und kann somit starken Einfluss auf die Membran der Zelle nehmen, indem es ihre Ordnung stört und die Mobilität sowie die Fluidität erhöht (Fujisawa et al., 2001).

Im Allgemeinen wird angenommen, dass durch die hydrolytische Spaltung von Monomeren Stoffe entstehen, welche in Zelllipide eingebaut werden und somit Einfluss auf unterschiedliche lipophile Wege haben (Schuster et al., 1999). Sie können die Konzentration von Gluthation in der Zelle beeinflussen und somit den zellulären Schutz gegen freie Radikale reduzieren (Schweikl, 2011).

Gluthation spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und für die Mitochondrienfunktion (Gressner et al., 2019). Da bei dem durchgeführten XTT-Test die mitochondriale Aktivität nachgewiesen wird, kann der Einfluss von HEMA und TEGDMA und die daraus resultierende Reduktion des Gluthations mit Beeinträchtigung der Mitochondrienfunktion zu niedrigeren Messwerten führen (Matziolis et al., 2002). An unterschiedlichen Zelltypen konnte gezeigt werden, dass die Inhaltsstoffe TEGDMA und HEMA eine mit der Expositionsdauer zunehmende Reduktion der Mitochondrienaktivität und somit zytotoxische Wirkung detektieren ließen, bei der sich TEGDMA als toxischer erwies (Emmler et al., 2008; Issa et al., 2004). Das in dieser Studie untersuchte Material GC Temp Print, welches das Monomer TEGDMA zu < 25 % enthält, zeigt bereits nach einem Tag deutlich verringerte Vitalitätswerte, verglichen mit den ebenfalls untersuchten HEMA enthaltenden Materialien Freeprint Temp UV und MFH. Somit kann die erhöhte Toxizität von TEGDMA aus oben genannter Studie in vorliegendem Versuch bestätigt werden. Auch Basismonomere wie UDMA, welches ebenfalls in GC Temp Print (< 75 %) sowie 3Delta Temp enthalten ist, und BisGMA zeigten in anderen Studien eine zytotoxische Wirkung, die sogar höher anzusetzen ist als bei TEGDMA (Reichl et al., 2006; Yoshii, 1997). Grund dafür scheint das höhere Molekulargewicht zu sein (Geurtsen et al., 1998; Reichl et al., 2006). Die deutlich geringeren Werte im vorliegenden XTT-Test bei den UDMA enthaltenden 3D gedruckten Materialien entsprechen somit den oben erwähnten Studien.

### 5.3. Expression von Interleukin 6 und 8

Um die Zytotoxizität von dentalen Materialien zu bestimmen, kann die Expression von proinflammatorischen Zytokinen herangezogen werden (Schmalz et al., 2000; Wellner et al., 2012). Die Interleukine 6 und 8 sind als proinflammatorische Mediatoren wichtige Marker für eine Entzündungsreaktion (Jerg et al., 2018; Schmalz et al., 2000; Trubiani, Cataldi, et al., 2012). Die Expression der beiden Zytokine wurde durch die Anwesenheit von allen Materialien gehemmt. Wie bereits in Kapitel 5.2. erwähnt, enthalten drei der untersuchten 3D gedruckten Materialien entweder das Monomer HEMA oder TEGDMA. Diese Monomere ließen in bisherigen Studien bei einer subtoxischen Konzentration bereits auf eine Hemmung der Zytokinproduktion von unterschiedlichen Zellen schließen (Rakich et al., 1999; Schmalz et al., 2000). Diese Aussagen würden somit im Sinne der Reduktion den vorliegenden Ergebnissen entsprechen, allerdings zeigten sich die hier verwendeten Konzentrationen nicht subtoxisch. Ein weiterer Effekt der bereits erwähnten Monomere und Komonomere wie HEMA, TEGDMA, UDMA und BisGMA ist das Induzieren einer Zellnekrose (Reichl et al., 2006). Dies ist eine pathophysiologische Form des Zelltodes, welche durch

eine Verletzung der Zellmembran und eine dadurch folgende Entzündungsreaktion gekennzeichnet ist und sich so vom programmierten Zelltod abgrenzt (Hug, 2000). Als Folge der Zellnekrose müssten somit Entzündungsmediatoren wie IL6 oder IL8 bei Exposition der Zellkulturen mit diesen Monomeren vermehrt ausgeschüttet werden. Die Werte der gemessenen Interleukine 6 und 8 sind im Vergleich zu den Kontrollen allerdings verringert. Bei der Messung des Interleukins 6 ließen die HEMA enthaltenden Materialien MFH und Freeprint Temp UV, sowie das TEGDMA und UDMA enthaltende GC Temp PRINT an den ersten beiden Messtagen noch vergleichbare Werte zur Kontrolle erkennen, welche nach 72 h signifikant geringer ausfallen. Dies würde mit anderen Materialtestungen im Zusammenhang mit IL6 übereinstimmen, welche eine zeitverzögernde Suppression der Interleukin 6 Produktion bei Materialien mit den Inhaltsstoffen TEGDMA, HEMA, UDMA und BisGMA feststellten (Jerg et al., 2018). Das Material 3Delta Temp, welches ebenfalls UDMA enthält, zeigt allerdings bereits nach dem ersten Tag signifikant geringere Werte.

Bei der Ermittlung der Interleukin 8 Produktion zeigt sich bei den Zellkulturen der Probenkörper von MFH, Freeprint Temp UV und GC Temp PRINT eine signifikante Reduktion der Messwerte verglichen mit den Kontrollproben nach 48 h. Wie auch schon bei der Messung des Interleukins 6 liegen die Messwerte des Materials 3Delta Temp nach 24 h signifikant unter den Kontrollwerten.

Zurückzuführen ist die Hemmung in der aktuellen Studie vermutlich auf die gesenkten Vitalitätswerte (Longo et al., 2016). Wie im XTT Test beobachtet, reduzieren fast alle getesteten Kompositmaterialien die Zellvitalität. Da nur vitale Zellen zur Zytokinproduktion fähig sind, verursacht die Reduktion der Zellvitalität gleichzeitig auch eine verringerte Expression von Interleukinen (Gregson et al., 2008). Dies würde auch die bei 3Delta Temp signifikant niedrigeren Werte nach dem ersten Tag erklären, da zu diesem Zeitpunkt die Zellvitalität bereits signifikant geringer war.

Das als Vergleichsprobe untersuchte Material für die Herstellung der Probenkörper mittels subtraktiver CAD/CAM-Technik zeigt eine Auffälligkeit in der Expression des Interleukins 8. Die Messwerte nach 48 und 72 Stunden waren signifikant höher als diejenigen der Kontrollproben, obwohl sich die Zellvitalität an Tag drei bei der Kontrolle signifikant höher zeigte. Somit scheint trotz industrieller Polymerisation und zu erwartenden niedrigen Restmonomergehalt eine negative Beeinflussung der Zellen im Sinne der Vitalität und Interleukin 8 Produktion stattzufinden. Diese Beeinflussung ist allerdings als nicht toxisch zu betrachten (Standardization 2009).

## 6. Zusammenfassung

Durch die Nutzung des dreidimensionalen Drucks in der Zahnmedizin, wurden die Methoden zur Herstellung zahnärztlicher Werkstücke erweitert und gleichzeitig eine Vielzahl neuer Materialien auf den Markt gebracht. Ziel der Studie war es, Materialien für den 3D Druck von provisorischen zahnärztlichen Versorgungsmaterialien hinsichtlich ihrer Wirkung auf gingivale Keratinozyten zu untersuchen. Dabei standen vor allem Einflüsse auf die Vitalität der Zellen, sowie auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine im Zentrum.

Untersucht wurden vier verschiedene 3D Druck Materialien auf Harzbasis (Nextdent C&B MFH, GC Temp PRINT, Freeprint Temp UV, Deltamed 3Delta Temp) im Vergleich mit einem subtraktiv (fräsend) zu bearbeitenden CAD/CAM Material und einem konventionellen Provisorienkunststoff. Die vorkultivierten Keratinozyten wurden durch Eluate in Kontakt mit den Materialien gebracht. Veränderungen der Zellvitalität wurden mittels XTT ermittelt, während die proinflammatorischen Zytokine IL6 und IL8 mit Hilfe eines ELISAs gemessen wurden.

Dabei zeigten die gedruckten Materialproben im Vergleich zur Kontrolle und den CAD/CAM Proben im XTT-Test signifikant geringere Vitalitätswerte, sowie eine Hemmung der Expression der proinflammatorischen Interleukine 6 und 8. Die untersuchten 3D-Druck Materialien mit dem geringsten Füllkörperanteil, sowie dem Inhaltsstoff HEMA (MFH und Freeprint Temp UV) ließen, verglichen mit den anderen Materialien für die additive Fertigung durch 3D Druck, die geringsten Effekte auf die biologischen Zellfunktionen erkennen. Materialien mit höheren Anteilen an Füllkörpern zeigten demgegenüber eine raschere Reduktion der Zellvitalität und Expression von Interleukin 6 und 8, wobei das Material mit den meisten Füllkörpern die Zellfunktion am schnellsten beeinträchtigt. Somit scheint die Höhe des Füllkörperanteils, sowie die Monomerzusammensetzung maßgeblich an der Beeinflussung der Zellvitalität und Interleukinproduktion beteiligt zu sein. Ein geringer Füllkörperanteil in Kombination mit der Abwesenheit der beiden Monomere TEGDMA und UDMA scheint die geringste Beeinträchtigung der biologischen Funktionen auszulösen.

## 7. Abstract

The use of three-dimensional printing in dentistry has expanded the methods for producing dental workpieces and, at the same time, introduced a variety of new materials to the market. The aim of the study was to investigate materials for 3D printing of temporary dental restorations with regard to their effect on gingival keratinocytes. The main focus was on influences on the vitality of the cells and on the production of proinflammatory cytokines.

Four different resin-based 3D printing materials (Nextdent C&B MFH, GC Temp PRINT, Freeprint Temp UV, Deltamed 3Delta Temp) were investigated in comparison with a subtractive CAD/CAM material and a conventional temporary resin. Pre-cultured keratinocytes were brought into contact with the materials by eluates. Changes in cell viability were determined by XTT, while proinflammatory cytokines IL6 and IL8 were measured by ELISA.

Thereby, the printed material samples showed significantly lower vitality values, as well as inhibition of the expression of the proinflammatory interleukins 6 and 8, compared to the control and the CAD/CAM samples in the XTT assay. The investigated 3D printed materials with the lowest filler content, as well as the ingredient HEMA (MFH and Freeprint Temp UV) suggested the lowest effects on the biological cell functions, compared to the other materials for additive manufacturing by 3D printing. In contrast, materials with higher levels of filler showed a more rapid reduction in cell viability and expression of interleukin 6 and 8. The material with the highest filler content was affecting cell function the most rapidly. Thus, the level of filler content, as well as the monomer composition, appears to be significantly involved in affecting cell viability and interleukin production. A low filler content in combination with the absence of the two monomers TEGDMA and UDMA seems to trigger the least impairment of biological functions.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

3D	Dreidimensional
3MF	3D Manufacturing Format
A.	Arteria
AM	Additive Manufacturing
AMF	Additive Manufacturing Format
Bis-GMA	Bisphenyl-A-Glycidyl-Methacrylat
CAD/CAM	Computer Aided Design, Computer Aided Manufacturing
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DANS	1-Dimethylaminonaphthylsulfonsäure-5
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Etc.	Et cetera
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FLM	Fused Layer Modeling
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
Gp 130	Glykoprotein 130
h	Stunde
HEMA	Hydroxyethylmethacrylat
IHGK1	Immortalisierte humane Gingiva Keratinozyten des Spenders 1
IgG	Immunglobulin G
IIF	Indirekte Immunfluoreszenz
IL6	Interleukin 6
IL6R	Interleukin 6 Rezeptor
IL8	Interleukin 8
ISO	Internationale Organisation für Normung
Lat.	Lateinisch
LLM	Layer Laminate Manufacturing
LOM	Laminated Object Manufacturing

MAPK	Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Weg
MMA	Methylmethacrylate
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
OE	Orales Epithel
OSE	Orales Sulkus Epithel
P	Passage
PFA	Paraformaldehyd
PBS	Phosphatgepuffertes Salzlösung
PEMA	Polyethylmethacrylat
PMMA	Polymethylmethacrylat
RB 200	LissaminRhodamin B
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RIA	Radioimmunoassay
RP	Rapid Prototyping
SE	Saumepithel
sIL6R	Löslicher Interleukin 6 Rezeptor
SLM	Selektive Laser Melting
SLS	Selektives Lasersintern
STL	Standard Tessellation Language
T75	Zellkulturflasche mit 75 cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche
TEGDMA	Triethylen-glycol-dimethacrylat
TGF- $\alpha$	Transformierender Wachstumsfaktor $\alpha$
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
UDMA	Urethandimethacrylat
UV	Ultraviolett
XTT	2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

## 9. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Page, R. C., & Tonetti, M. S. (2004). Parodontologie
- Abbildung 2 Scheller, J., Grötzinger, J., Rose-John, S., & Biochemisches Institut Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Interleukin-6 Zytokinsignale über lösliche und membranständige Rezeptoren
- Abbildung 3 Schweikl, H. (2011). Biokompatibilität dentaler Komposite
- Abbildung 4 Monzón, Ortega, Hernández, Paz, & Ortega, 2017. Schematische Darstellung der DLP Bottom-Up Technik
- Abbildung 5 Aufteilung der Materialien auf ein 24 Well
- Abbildung 6 Prüfkörperdesign in 3D- und STL-Format
- Abbildung 7 Roche Diagnostics, G. (2016). Cell Proliferation Kit II (XTT)
- Abbildung 8 Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA.
- Abbildung 9 Mulisch, M. (2015). Präparation für die konventionelle Rasterelektronenmikroskopie (REM).
- Abbildung 10 Immunhistochemische Färbung gegen Interleukin 6 an Zellen nach Exposition gegenüber den untersuchten Materialien
- Abbildung 11 Immunhistochemische Färbung gegen Interleukin 8 an Zellen nach Exposition gegenüber den untersuchten Materialien
- Abbildung 12 Rasterelektronenmikroskopaufnahme eines Keratinozyten auf einer Glasplatte und unterschiedlichen getesteten Prüfkörpern

## 10. Diagrammverzeichnis

Diagramm 1	Werte der XTT Messung bei den unterschiedlichen Materialien an Messtag 1
Diagramm 2	Werte der XTT Messung bei den unterschiedlichen Materialien an Messtag 2
Diagramm 3	Werte der XTT Messung bei den unterschiedlichen Materialien an Messtag 3
Diagramm 4	Werte der XTT Messung bei den unterschiedlichen Materialien an Messtag 6
Diagramm 5	IL6 Messwerte der unterschiedlichen Materialien an Tag 1
Diagramm 6	IL6 Messwerte der unterschiedlichen Materialien an Tag 2
Diagramm 7	IL6 Messwerte der unterschiedlichen Materialien an Tag 3
Diagramm 8	IL6 Messwerte der unterschiedlichen Materialien an Tag 6
Diagramm 9	Interleukin 6-Produktion isoliert pro Tag
Diagramm 10	IL8 Messwerte der unterschiedlichen Materialien an Tag 1
Diagramm 11	IL8 Messwerte der unterschiedlichen Materialien an Tag 2
Diagramm 12	IL8 Messwerte der unterschiedlichen Materialien an Tag 3
Diagramm 13	IL8 Messwerte der unterschiedlichen Materialien an Tag 4
Diagramm 14	Interleukin 8-Produktion isoliert pro Tag

## 11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Protokoll zur Passagierung und Zellzählung
Tabelle 2	Nachbehandlung der 3D Prüfkörper
Tabelle 3	Materialübersicht mit Herstellern, Zusammensetzung und Lot Nummern
Tabelle 4	Protokoll der immunhistochemischen Färbung
Tabelle 5	Ergebnis nach immunhistochemischer Färbung gegen Interleukin 6
Tabelle 6	Ergebnis nach immunhistochemischer Färbung gegen Interleukin 8

## 12. Literaturverzeichnis

- Aguiar, P. H. N., Fernandes, N., Zani, C. L., & Mourao, M. M. (2017). A high-throughput colorimetric assay for detection of *Schistosoma mansoni* viability based on the tetrazolium salt XTT. *Parasit Vectors*, *10*(1), 300.
- Aimar, A., Palermo, A., & Innocenti, B. (2019). The Role of 3D Printing in Medical Applications: A State of the Art. *J Healthc Eng*, *2019*, 5340616.
- Alamouh, R. A., Silikas, N., Salim, N. A., Al-Nasrawi, S., & Satterthwaite, J. D. (2018). Effect of the Composition of CAD/CAM Composite Blocks on Mechanical Properties. *BioMed Research International*, *2018*, 4893143.
- Ansteinsson, V., Solhaug, A., Samuelsen, J. T., Holme, J. A., & Dahl, J. E. (2011). DNA-damage, cell-cycle arrest and apoptosis induced in BEAS-2B cells by 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *723*(2), 158-164.
- Asmussen, E. (1982). Factors affecting the quantity of remaining double bonds in restorative resin polymers. *European Journal of Oral Sciences*, *90*(6), 490-496.
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, *72*, 4-15.
- Azari, A., & Nikzad, S. (2009). The evolution of rapid prototyping in dentistry: a review. *Rapid Prototyping Journal*, *15*(3), 216-225.
- Bakopoulou, A., Papadopoulos, T., & Garefis, P. (2009). Molecular toxicology of substances released from resin-based dental restorative materials. *Int J Mol Sci*, *10*(9), 3861-3899.
- Barker, J. N., Jones, M. L., Mitra, R. S., Crockett-Torabe, E., Fantone, J. C., Kunkel, S. L., . . . Nickoloff, B. J. (1991). Modulation of keratinocyte-derived interleukin-8 which is chemotactic for neutrophils and T lymphocytes. *Am J Pathol*, *139*(4), 869-876.
- Bean, T. A., Zhuang, W. C., Tong, P. Y., Eick, J. D., Chappelow, C. C., & Yourtee, D. M. (1995). Comparison of tetrazolium colorimetric and <sup>51</sup>Cr release assays for cytotoxicity determination of dental biomaterials. *Dental Materials*, *11*(5), 327-331.
- Beuer, F., Schweiger, J., & Edelhoff, D. (2008). Digital dentistry: an overview of recent developments for CAD/CAM generated restorations. *British Dental Journal*, *204*(9), 505-511.
- Bock, M., Meisel, S., Erdinger, L., Fried, M., Deichmann, M., Waldmann, V., . . . Näher, H. (2000). *Einfluß von Luftschadstoffen auf die Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus Keratinozyten*, Berlin, Heidelberg.
- Breuninger, J., Becker, R., Wolf, A., Rommel, S., & Verl, A. (2013). *Generative Fertigung mit Kunststoffen: Konzeption und Konstruktion für selektives Lasersintern*. Heidelberg: Springer Verlag.
- Bruns, N., & Krettek, C. (2019). 3D-Druck in der Unfallchirurgie. *Der Unfallchirurg*, *122*(4), 270-277.
- Bryan, T., & Redder, R. R. (1994). SV40-Induced Immortalization of Human Cells. *5*(4), 331-357.
- Chung, Y.-J., Park, J.-M., Kim, T.-H., Ahn, J.-S., Cha, H.-S., & Lee, J.-H. (2018). 3D Printing of Resin Material for Denture Artificial Teeth: Chipping and Indirect Tensile Fracture Resistance. *Materials* *2018*, *11*, 1798.
- Dauti, R. (2015). CAD/CAM-Technologien in der Zahnmedizin. *Stomatologie*, *112*(4), 136-139.
- Deckard, C. R. (1989). United States of America Patent No. 4,863,538.
- DMG, A. L. (2015). Luxatemp Automix Plus Safety Data Sheet. In.
- Dolliver, H., Kumar, K., Gupta, S., & Singh, A. (2008). Application of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Analysis for Determination of Monensin in Environmental Samples. *Journal of Environmental Quality*, *37*(3), 1220-1226.
- Durner, Jürgen, D., Udo I. Walther, Zaspel, J., Hickel, R., & Reichl, F.-X. (2010). Metabolism of TEGDMA and HEMA in human cells. *Biomaterials*, *31*(5), 818-823.
- Durner, J., Glasl, B., Zaspel, J., Kunzelmann, K. H., Hickel, R., & Reichl, F. X. (2010). Release of

- TEGDMA from composite during the chewing situation. *Dental Materials*, 26(7), e197-e204.
- Durner, J., Spahl, W., Zaspel, J., Schweickl, H., Hickel, R., & Reichl, F.-X. (2010). Eluted substances from unpolymerized and polymerized dental restorative materials and their Nernst partition coefficient. *Dental Materials*, 26(1), 91-99.
- Eberwein, P., Steinberg, T., Schulz, S., Zimmermann, D., Accardi, R., Beck, D., . . . Tomakidi, P. (2011). Expression of keratinocyte biomarkers is governed by environmental biomechanics. *European Journal of Cell Biology*, 90(12), 1029-1040.
- Edelhoff, D., Güth, J. F., Schweiger, J., Maier, B., & Beuer, F. (2010). Vorbehandlung komplexer Fälle in der festsitzenden Prothetik. *wissen kompakt*, 4(4), 3-16.
- Emmler, J., Seiss, M., Kreppel, H., Reichl, F. X., Hickel, R., & Kehe, K. (2008). Cytotoxicity of the dental composite component TEGDMA and selected metabolic by-products in human pulmonary cells. *Dent Mater*, 24(12), 1670-1675.
- Engvall, E., Jonsson, K., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin g, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 251(3), 427-434.
- Ernst, C.-P. (2010). Update Komposite: Einführung – Teil 2. *Zahnerhaltung: Eine Einteilung der Kompositmaterialien*.
- Exner, H., & Ebert, R. (2008). Selektives Lasersintern. *Laser Technik Journal*, 5(4), 51-53.
- Federlin, K. (1965). Die Immunfluoreszenz. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 90(15), 667-670.
- Feldmann, C., & Pumpe, A. (2016). *3D-Druck – Verfahrensauswahl und Wirtschaftlichkeit: Entscheidungsunterstützung für Unternehmen*. Wiesbaden: Springer Gabler, Wiesbaden.
- Ferracane, J. L., & Condon, J. R. (1990). Rate of elution of leachable components from composite. *Dental Materials*, 6(4), 282-287.
- Feygin, M., Shkolnik, A., Diamond, M. N., & Dvorskiy, E. (1998). United States of Amerika Patent No. 5,730,817.
- Fritsch, P., & Schwarz, T. (2018). Aufbau und Funktionen der Haut. In *Dermatologie Venerologie: Grundlagen. Klinik. Atlas*. (pp. 5-68). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Fuchs, E. (1990). Epidermal differentiation: the bare essentials. *The Journal of cell biology*, 111(6 Pt 2), 2807-2814.
- Fujisawa, S., Atsumi, T., & Kadoma, Y. (2001). CYTOTOXICITY AND PHOSPHOLIPID-LIPOSOME PHASE-TRANSITION PROPERTIES OF 2-HYDROXYETHYL METHACRYLATE (HEMA). *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 29(3), 245-261.
- Gan, S. D., & Patel, K. R. (2013). Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology* (2013) 133, e12.
- GC, E. N. V. (2019). Building bridges for the future: Temp PRINT™ from GC: 3D printable light curing composite for temporary crown and bridge.
- Gebhardt, A. (2017). *Additive Fertigungsverfahren: Additive Manufacturing und 3D-Drucken für Prototyping-Tooling-Produktion*: Carl Hanser Verlag GmbH Co KG.
- Geurtsen, W. (2000). Biocompatibility of Resin-Modified Filling Materials. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 11(3), 333-355.
- Geurtsen, W., Lehmann, F., Spahl, W., & Leyhausen, G. (1998). Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *Journal of Biomedical Materials Research*, 41(3), 474-480.
- GmbH, D. C.-P. F. Luxatemp Automix Plus Physical Properties.
- GmbH, D. C.-P. F. (2015). Luxatemp Automix Plus. In Hamburg: DMG Dental.
- GmbH, V. (09.2020). NANOKERAMISCHES HYBRID CAD / CAM-MATERIAL. In Anton-Flettner-Straße 1-3, 27472 Cuxhaven.
- Gonçalves, F., Kawano, Y., Pfeifer, C., Stansbury, J. W., & Braga, R. R. (2009). Influence of BisGMA, TEGDMA, and BisEMA contents on viscosity, conversion, and flexural strength of

- experimental resins and composites. *European Journal of Oral Sciences*, 117(4), 442-446.
- Gregson, K. S., Terrence O'Neill, J., Platt, J. A., & Jack Windsor, L. (2008). In vitro induction of hydrolytic activity in human gingival and pulp fibroblasts by triethylene glycol dimethacrylate and monocyte chemotactic protein-1. *Dental Materials*, 24(11), 1461-1467.
- Gressner, A. M., & Gressner, O. A. (2019). Glutathion. In A. M. Gressner & T. Arndt (Eds.), *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (pp. 995-995). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Güß, P. C., & Horvath, S. D. (2013). Digitale Zahnmedizin und innovative CAD/CAM-Materialien. *Stomatologie*, 110(7), 15-20.
- Hagl, R. (2015). 3D-Druck-Technologien. In *Das 3D-Druck-Kompendium: Leitfaden für Unternehmer, Berater und Innovationstreiber* (pp. 15-35). Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden.
- Hajtó, J. (2010). Gesichtspunkte zur Präparation von CAD/CAM-gefertigten Restaurationen. *ZMK-Sonderheft Mai*, 35, 14-18.
- Halvorson, R. H., Erickson, R. L., & Davidson, C. L. (2003). The effect of filler and silane content on conversion of resin-based composite. *Dental Materials*, 19(4), 327-333.
- Hannak, W. B. (2017). Tipps und Tricks bei der Provisorien-Herstellung. *ZWR*, 126(03), 115-116.
- Heinrich, P. C., BEHRMANN, I., HAAN, S., HERMANN, H. M., MÜLLER-NEUEN, G., & SCHAPER, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochemical Journal*, 374(1), 1-20.
- Hellwig, E., Klimek, J., Attin, T. (2013). *Einführung in die Zahnerhaltung: Prüfungswissen Kariologie, Endodontologie und Parodontologie*. Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag.
- Hohenhoff, G., Meyer, H., Suttman, O., Ripken, T., Obata, K., Kracht, D., & Overmeyer, L. (2018). Qualitätssicherung in der Additiven Serienfertigung von Polymerbauteilen. In R. Lachmayer, R. B. Lippert, & S. Kaierle (Eds.), *Additive Serienfertigung: Erfolgsfaktoren und Handlungsfelder für die Anwendung* (pp. 53-68). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Hug, H. (2000). Apoptose: die Selbstvernichtung der Zelle als Überlebensschutz. *Biologie in unserer Zeit*, 30(3), 128-135.
- Hunyadi, J., Simon, M., & Dobozy, A. (1990). Immunologische Bedeutung humaner Keratinozyten. In O. P. Hornstein, M. Hundeiker, & J. Schönfeld (Eds.), *Neue Entwicklungen in der Dermatologie: Band 6* (pp. 5-17). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Ilie, N. (2016). Bulk-Fill-Komposite: Eigenschaften und Perspektiven. *der junge zahnarzt*, 7(2), 14-21.
- Ilie, N. (2017). Neue Komposite – werkstoffkundliche und klinische Bewertung. *Zahnmedizin up2date*, 11(03), 247-263.
- Ilie, N., Bucuta, S., & Draenert, M. (2013). Bulk-fill resin-based composites: an in vitro assessment of their mechanical performance. *Oper Dent*, 38(6), 618-625.
- Ilie, N., Rosentritt, M., & Lohbauer, U. (2016). Update Materialforschung – direkte kunststoffbasierte Komposite. *ZWR*, 125(03), 2-7.
- Issa, Y., Watts, D. C., Brunton, P. A., Waters, C. M., & Duxbury, A. J. (2004). Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. *Dental Materials*, 20(1), 12-20.
- Itahana, K., Dimri, G., & Campisi, J. (2001). Regulation of cellular senescence by p53. *European Journal of Biochemistry*, 268(10), 2784-2791.
- Jerg, A., Schulz, S. D., Tomakidi, P., Hellwig, E., & Polydorou, O. (2018). Modulation of gingival cell response towards dental composites. *Dent Mater*, 34(3), 412-426.
- Joda, T., Pieger, S., & Heydecke, G. (2009). Kronen- und Brückenprovisorien. *Zahnmedizin up2date*, 3(05), 515-536.
- Joshi, A., Suragimath, G., Zope, S. A., Ashwinirani, S. R., & Varma, S. A. (2017). Comparison of Gingival Biotype between different Genders based on Measurement of Dentopapillary Complex. *J Clin Diagn Res*, 11(9), ZC40-ZC45.

- Kadry, H., Wadnap, S., Xu, C., & Ahsan, F. (2019). Digital light processing (DLP) 3D-printing technology and photoreactive polymers in fabrication of modified-release tablets. *Eur J Pharm Sci*, 135, 60-67.
- Kazhdan, M., Bolitho, M., & Hoppe, H. (2006). *Poisson surface reconstruction*. Paper presented at the Proceedings of the fourth Eurographics symposium on Geometry processing.
- Kessler, A., Hickel, R., & Reymus, M. (2020). 3D Printing in Dentistry-State of the Art. *Oper Dent*, 45(1), 30-40.
- Kessler, A., Reichl, F. X., Folwaczny, M., & Högg, C. (2020). Monomer release from surgical guide resins manufactured with different 3D printing devices. *Dent Mater*.
- Kessler, A., Reymus, M., Hickel, R., & Kunzelmann, K. H. (2019). Three-body wear of 3D printed temporary materials. *Dent Mater*, 35(12), 1805-1812.
- Klemp, E. (2015). 3D-Druck — die Möglichkeiten entdecken. *Wirtschaftsinformatik & Management*, 7(6), 6-17.
- Knall, C., Young, S., Nick, J. A., Buhl, A. M., Worthen, G. S., & Johnson, G. L. (1996). Interleukin-8 regulation of the Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase pathway in human neutrophils. *J Biol Chem*, 271(5), 2832-2838.
- Kramer, D. K. (Producer). (2013, 09.04.2020). Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).
- Lachmayer, R., Lippert, R. B., & Fahlbusch, T. (2016). *3D-Druck beleuchtet: Additive Manufacturing auf dem Weg in die Anwendung*: Springer Vieweg.
- Lee, J.-H., Jun, S.-K., Moon, H.-J., & Lee, H.-H. (2017). Cytotoxicity and proinflammatory cytokine expression induced by interim resin materials in primary cultured human dental pulp cells. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 118(4), 524-534.
- Leng, S. X., McElhaney, J. E., Walston, J. D., Xie, D., Fedarko, N. S., & Kuchel, G. A. (2008). ELISA and Multiplex Technologies for Cytokine Measurement in Inflammation and Aging Research. *The Journals of Gerontology: Series A*, 63(8), 879-884.
- Ligon, S. C., Liska, R., Stampfl, J., Gurr, M., & Mülhaupt, R. (2017). Polymers for 3D Printing and Customized Additive Manufacturing. *Chemical Reviews*, 117(15), 10212-10290.
- Ligon, S. C., Liska, R., Stampfl, J., Gurr, M., & Mülhaupt, R. (2017). Polymers for 3D Printing and Customized Additive Manufacturing. *Chem Rev*, 117(15), 10212-10290.
- Longo, D. L., PAULA-SILVA, F. W. G., FACCIOLI, L. H., GATÓN-HERNÁNDEZ, P. M., QUEIROZ, A. M. d., & SILVA, L. A. B. d. (2016). Cytotoxicity and cytokine expression induced by silorane and methacrylate-based composite resins. *Journal of Applied Oral Science*, 24, 338-343.
- Loppnow, H. (2001). Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen. *Der Internist*, 42(1), 13-27.
- Luig, M., Kluger, M. A., Goerke, B., Meyer, M., Nosko, A., Yan, I., . . . Steinmetz, O. M. (2015). Inflammation-Induced IL-6 Functions as a Natural Brake on Macrophages and Limits GN. *J Am Soc Nephrol*, 26(7), 1597-1607.
- Lutz, F., & Phillips, R. W. (1983). A classification and evaluation of composite resin systems. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 50(4), 480-488.
- Masjedi, A., Hashemi, V., Hojjat-Farsangi, M., Ghalamfarsa, G., Azizi, G., Yousefi, M., & Jadidi-Niaragh, F. (2018). The significant role of interleukin-6 and its signaling pathway in the immunopathogenesis and treatment of breast cancer. *Biomed Pharmacother*, 108, 1415-1424.
- Massaro, H., Zambelli, L. F., Britto, A. A. d., Vieira, R. P., Ligeiro-de-Oliveira, A. P., Andia, D. C., . . . Lima, A. F. (2019). Solvent and hema increase adhesive toxicity and cytokine release from dental pulp cells. *Materials*, 12(17), 2750.
- Matziolis, G., Rau, H. M., Klever, P., Erli, H. J., & Paar, O. (2002). Beeinflussung humaner Osteoblasten durch verschiedene Analgetika. *Der Unfallchirurg*, 105(6), 527-531.
- May, T., Hauser, H., & Wirth, D. (2004). Transcriptional control of SV40 T-antigen expression allows a complete reversion of immortalization. *Nucleic Acids Research*, 32(18), 5529-5538.
- Mayer, J., Stawarczyk, B., Kieschnick, A., Roland, B., & Reymus, M. (2019). *3-D-Druck bei der Herstellung von Modellen und Bohrschablonen*.

- Monzón, M., Ortega, Z., Hernández, A., Paz, R., & Ortega, F. (2017). Anisotropy of photopolymer parts made by digital light processing. *Materials*, *10*(1), 64.
- Muhlemann, S., Benic, G. I., Fehmer, V., Hammerle, C. H. F., & Sailer, I. (2018). Clinical quality and efficiency of monolithic glass ceramic crowns in the posterior area: digital compared with conventional workflows. *Int J Comput Dent*, *21*(3), 215-223.
- Mulisch, M. (2015). Präparation für die konventionelle Rasterelektronenmikroskopie (REM). In M. Mulisch & U. Welsch (Eds.), *Romeis - Mikroskopische Technik* (pp. 145-152). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Munksgaard, E. C., & Freund, M. (1990). Enzymatic hydrolysis of (di)methacrylates and their polymers. *European Journal of Oral Sciences*, *98*(3), 261-267.
- Munz, O. J. (1956). United States of America Patent No. 2,775,758.
- Müssig, E., Tomakidi, P., & Steinberg, T. (2005). Molecules Contributing to the Maintenance of Periodontal Tissues. *Journal of Orofacial Orthopedics / Fortschritte der Kieferorthopädie*, *66*(6), 422-433.
- Nashan, D., & Luger, T. A. (1999). Interleukin 1Teil 2: Wirkungsmechanismen und therapeutische Möglichkeiten. *Der Hautarzt*, *50*(10), 756-763.
- Nayar, S., Bhuminathan, S., & Bhat, W. M. (2015). Rapid prototyping and stereolithography in dentistry. *J Pharm Bioallied Sci*, *7*(Suppl 1), S216-219.
- Next Dent C&B, M. (2019). Document Instructions for Use.
- Nordsieck, K., Baumann, L., Hintze, V., Pisabarro, M. T., Schnabelrauch, M., Beck-Sickinger, A. G., & Samsonov, S. A. (2018). The effect of interleukin-8 truncations on its interactions with glycosaminoglycans. *Biopolymers*, *109*(10), e23103.
- Örtengren, U., Wellendorf, H., Karlsson, S., & Ruyter, I. E. (2001). Water sorption and solubility of dental composites and identification of monomers released in an aqueous environment. *Journal of Oral Rehabilitation*, *28*(12), 1106-1115.
- Page, R. C., & Tonetti, M. S. (2004). *Parodontologie*(3., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage ed.).
- Peralta, S. L., LELES, S. B. d., DUTRA, A. L., GUIMARÃES, V. B. d. S., PIVA, E., & LUND, R. G. (2018). Evaluation of physical-mechanical properties, antibacterial effect, and cytotoxicity of temporary restorative materials. *Journal of Applied Oral Science*, *26*.
- Polydorou, O., Huberty, C., Wolkewitz, M., Bolek, R., Hellwig, E., & Kümmerer, K. (2012). The effect of storage medium on the elution of monomers from composite materials. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, *100B*(1), 68-74.
- Poprawe, R. (2005). *Lasertechnik für die Fertigung: Grundlagen, Perspektiven und Beispiele für den innovativen Ingenieur*: Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Porter, J. L., Carrico, C. K., Lindauer, S. J., & Tüfekçi, E. (2018). Comparison of Intraoral and Extraoral Scanners on the Accuracy of Digital Model Articulation. *Journal of Orthodontics*, *45*(4), 275-282.
- Presland, R. B., & Dale, B. A. (2000). Epithelial Structural Proteins of the Skin and Oral Cavity: Function in Health and Disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, *11*(4), 383-408.
- R&D Systems Biotechne, L. (2018). Quantikine ELISA: Human IL-8/CXCL8 Immunoassay. In (pp. 14).
- R&D Systems Europe, L. (2015). Quantikine ELISA: Human IL-6 Immunoassay. In (pp. 13).
- Rakich, D. R., Wataha, J. C., Lefebvre, C. A., & Weller, R. N. (1999). Effect of dentin bonding agents on the secretion of inflammatory mediators from macrophages. *Journal of Endodontics*, *25*(2), 114-117.
- Reichl, F.-X. (2011). Zur Toxikologie und Allergologie von Zahnkunststoff-Materialien. *ZMK* (27) 7-8/2011, S. 466-472.
- Reichl, F.-X., Durner, J., Hickel, R., Spahl, W., Kehe, K., Walther, U., . . . Hume, W. (2002). Uptake, clearance and metabolism of TEGDMA in guinea pigs. *Dental Materials*, *18*(8), 581-589.
- Reichl, F.-X., Esters, M., Simon, S., Seiss, M., Kehe, K., Kleinsasser, N., . . . Hickel, R. (2006). Cell

- death effects of resin-based dental material compounds and mercurials in human gingival fibroblasts. *Archives of Toxicology*, 80(6), 370-377.
- Reymus, M., Fabritius, R., Kessler, A., Hickel, R., Edelhoff, D., & Stawarczyk, B. (2019). Fracture load of 3D-printed fixed dental prostheses compared with milled and conventionally fabricated ones: the impact of resin material, build direction, post-curing, and artificial aging-an in vitro study. *Clin Oral Investig*.
- Rich, P. R., Mischis, L. A., Purton, S., & Wiskich, J. T. (2001). The sites of interaction of triphenyltetrazolium chloride with mitochondrial respiratory chains. *FEMS Microbiology Letters*, 202(2), 181-187.
- Ried, W. (1952). Formazane und Tetrazoliumsalze, ihre Synthesen und ihre Bedeutung als Reduktionsindikatoren und Vitalfarbstoffe. *Angewandte Chemie*, 64(14), 391-396.
- Rietzel, D., Kühnlein, F., & Drummer, D. (2011). Selektives Lasersintern von teilkristallinen Thermoplasten. *RTeJournal - Forum für Rapid Technologie*, 6(1).
- Roche Diagnostics, G. (2016). Cell Proliferation Kit II (XTT). In (18 ed.): Sigma Aldrich.
- Romanchuk, K. G. (1982). Fluorescein. Physicochemical factors affecting its fluorescence. *Survey of Ophthalmology*, 26(5), 269-283.
- Rose-John, S., Scheller, J., Elson, G., & Jones, S. A. (2006). Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol*, 80(2), 227-236.
- Santini, A., Gallegos, I. T., & Felix, C. M. (2013). Photoinitiators in Dentistry: A Review. *Primary Dental Journal*, 2(4), 30-33.
- Santoliquido, O., Colombo, P., & Ortona, A. (2019). Additive Manufacturing of ceramic components by Digital Light Processing: A comparison between the “bottom-up” and the “top-down” approaches. *Journal of the European Ceramic Society*, 39(6), 2140-2148.
- Sarkar, N. K. (2000). Internal corrosion in dental composite wear. *Journal of Biomedical Materials Research*, 53(4), 371-380.
- Scheller, J., Grötzinger, J., Rose-John, S., & Biochemisches Institut Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. (2007). Interleukin-6 Zytokinsignale über lösliche und membranständige Rezeptoren. *BIOspektrum*.
- Schmalz, G., Schweikl, H., & Hiller, K.-A. (2000). Release of prostaglandin E2, IL-6 and IL-8 from human oral epithelial culturemodels after exposure to compounds of dental materials. *European Journal of Oral Sciences*, 108(5), 442-448.
- Schmid, M. (2015). *Selektives Lasersintern (SLS) mit Kunststoffen: Technologie, Prozesse und Werkstoffe*: Carl Hanser Verlag GmbH Co KG.
- Schneider-Stock, R., Boltze, C., & Roessner, A. (2002). Telomerase und neue Aspekte in der Tumorbilogie. *Der Pathologe*, 23(3), 177-182.
- Schneider, C., Kressin, M., & Schnorr, B. (1996). Zur Morphologie der Zungenrandpapillen neugeborener Ferkel 1. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 25(2), 95-100.
- Schrödel, A. (2009). Trypsinierung von Zellkulturzellen. *Biologie in Unserer Zeit (Biuz) \$V* 39(4), 234-234.
- Schulz, S. D., Ruppel, C., Tomakidi, P., Steinberg, T., Reichl, F.-X., Hellwig, E., & Polydorou, O. (2015). Gene expression analysis of conventional and interactive human gingival cell systems exposed to dental composites. *Dental Materials*, 31(11), 1321-1334.
- Schuster, G. S., Caughman, G. B., Ruedgeberg, F. A., Lefebvre, C. A., & Cibirka, R. (1999). Alterations in cell lipid metabolism by glycol methacrylate (HEMA). *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 10(11), 1121-1133.
- Schuurs, A. H. W. M., & Van Weemen, B. K. (1980). Enzyme-Immunoassay: A Powerful Analytical Tool. *Journal of Immunoassay*, 1(2), 229-249.
- Schweikl, H. (2011). Biokompatibilität dentaler Komposite. *ZWR*, 120(03), 80-88.
- Sebastian, M. T. (1999). *Parodontologie: Stand der Wissenschaft der American Academy of Periodontology*. München: Phillip Verlag.
- Seelbach, P., Rehmann, P., & Wöstmann, B. (2010). Die digitale Abformung. *wissen kompakt*, 4(4),

17-24.

- Seiss, M., Track, N., Hickel, R., & Reichl, F.-X. (2009). In vitro stability of methylmethacrylic acid, TEGDMA and HEMA exposed to esterases. *Dental Materials*, 25(8), 1044-1049.
- Shats, I., Milyavsky, M., Tang, X., Stambolsky, P., Erez, N., Brosh, R., . . . Rotter, V. (2004). p53-dependent Down-regulation of Telomerase Is Mediated by p21waf1\*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(49), 50976-50985.
- Standardization, I. O. f. (2009). Biological evaluation of medical devices. Tests for in vitro cytotoxicity. Switzerland, ISO copyright office. 10993.
- Stanley, H. R. (1992). Local and Systemic Responses To Dental Composites and Glass Ionomers. *Advances in Dental Research*, 6(1), 55-64.
- Stansbury, J. W., & Idacavage, M. J. (2016). 3D printing with polymers: Challenges among expanding options and opportunities. *Dental Materials*, 32(1), 54-64.
- Stawarczyk, & Schmutz, F. F., J; Hämmerle, C H F (2010). Abrasionsbeständigkeit von Provisorien-Kunststoffen: sind CAD/CAM-Kunststoffe abrasionsbeständiger? *Quintessenz Zahntechnik*, 36(7):954-962.
- Stawarczyk, Trottmann, A., & Fischer, J. (2008). *Bruchlast konventionell oder mittels CAD/CAM hergestellter Brücken-Provisorien*.
- Stawarczyk, B., Sener, B., Trottmann, A., Roos, M., Ouml, Zcan, M., . . . Mmerle, C. H. F. (2012). Discoloration of manually fabricated resins and industrially fabricated CAD/CAM blocks <I>versus</I> glass-ceramic: Effect of storage media, duration, and subsequent polishing. *Dental Materials Journal*, 31(3), 377-383.
- Stöcker, W. (2019a). Enzymimmunoassay. In A. M. Gressner & T. Arndt (Eds.), *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (pp. 791-793). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Stöcker, W. (2019b). Immunfluoreszenz, indirekte. In A. M. Gressner & T. Arndt (Eds.), *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (pp. 1204-1205). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Syed, M., Chopra, R., & Sachdev, V. (2015). Allergic Reactions to Dental Materials-A Systematic Review. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 9(10), ZE04-ZE09.
- Taormina, G., Sciancalepore, C., Messori, M., & Bondioli, F. (2018). 3D printing processes for photocurable polymeric materials: technologies, materials, and future trends. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, 16(3), 151-160.
- Thomas, L. (2005). Labor und Diagnose: 6. Auflage.
- Trubiani, O., Cataldi, A., De Angelis, F., D'Arcangelo, C., & Caputi, S. (2012). Overexpression of interleukin-6 and -8, cell growth inhibition and morphological changes in 2-hydroxyethyl methacrylate-treated human dental pulp mesenchymal stem cells. *International Endodontic Journal*, 45(1), 19-25.
- Trubiani, O., Toniato, E., Di Iorio, D., Diomede, F., Merciaro, I., D'Arcangelo, C., . . . Oriana, T. (2012). Morphological Analysis and Interleukin Release in Human Gingival Fibroblasts Seeded on Different Denture Base Acrylic Resins. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 25(3), 637-643.
- Vistica, D. T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A., & Boyd, M. R. (1991). Tetrazolium-based Assays for Cellular Viability: A Critical Examination of Selected Parameters Affecting Formazan Production. *Cancer Research*, 51(10), 2515-2520.
- Voco GmbH. (2018). Grandio disc. In.
- Voigt, J., Ebert, B., Hoffmann, A., & Macdonald, R. (2008). Validierung eines „Fluorescent Enzyme Linked Immunosorbent Assay“(ELISA). *Metrologie für die molekulare und zelluläre Medizin*, 118(4), 255.
- von See, C. (2019). Additive Verfahren in der Zahnmedizin. *ZWR*, 128(09), 440-445.
- W.C. Heraeus, G. M. B. H. H. (1938). *ALBA, das Ergebnis einer Forschung, Beiträge zur Kenntnis der Edelmetalle als Werkstoffe in der Zahnheilkunde*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH.

- Wallin, R. F. (1998). A Practical Guide to ISO 10993-12: Sample Preparation and Reference Materials. *MDDI Medical Device and Diagnostic Industry News Products and Suppliers*.
- Walsh, L. J., & Shakibaie, F. (2008). UV-induzierte Fluoreszenz wirft ein neues Licht auf dentale Biofilme und Karies. *ZWR*, *117*(05), 244-248.
- Wang, L., Gramlich, W. M., & Gardner, D. J. (2017). Improving the impact strength of Poly(lactic acid) (PLA) in fused layer modeling (FLM). *Polymer*, *114*.
- Waugh, D. J., & Wilson, C. (2008). The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*, *14*(21), 6735-6741.
- Wellner, P., Mayer, W., Hickel, R., Reichl, F. X., & Durner, J. (2012). Cytokine release from human leukocytes exposed to silorane- and methacrylate-based dental materials. *Dental Materials*, *28*(7), 743-748.
- Wendel, M., Heller, A. R., & Koch, T. (2009). Pathomechanismen des Organversagens. *Der Anaesthetist*, *58*(4), 343-352.
- Wenz, H.-J., & Schreiber, T. (2020). Präzisionsabformung analog–Strategien zur Fehlervermeidung. *QUINTESSENZ ZAHNMEDIZIN Jahrgang 71 • Ausgabe 3 • März 2020*.
- Yang, Y., Reichl, F. X., Shi, J., He, X., Hickel, R., & Hogg, C. (2018). Cytotoxicity and DNA double-strand breaks in human gingival fibroblasts exposed to eluates of dental composites. *Dent Mater*, *34*(2), 201-208.
- Yoshii, E. (1997). Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: Relationships of monomer structures and cytotoxicity. *Journal of Biomedical Materials Research*, *37*(4), 517-524.
- Zantner, A. D. C. (2007). Ästhetische Seitenzahnrestaurationen mit Kompositen. *Cosmetic dentistry 2\_2007*.
- Zeilhofer, H. U., & Schorr, W. (2000). Role of interleukin-8 in neutrophil signaling. *Curr Opin Hematol*, *7*(3), 178-182.
- Zhang, J., Hu, Q., Wang, S., Tao, J., & Gou, M. (2020). Digital light processing based three-dimensional printing for medical applications. *International Journal of Bioprinting*, *6*(1).
- Zhang, Z. C., Li, P. L., Chu, F. T., & Shen, G. (2019). Influence of the three-dimensional printing technique and printing layer thickness on model accuracy. *J Orofac Orthop*, *80*(4), 194-204.



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät  
Promotionsbüro



## Eidesstattliche Versicherung

Netolitzky, Katharina Anne Ingrid

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema  
Biokompatibilität und Zytotoxizität von 3D-gedruckten zahnärztlichen Werkstoffen

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 25.11.2023

Ort, Datum

Katharina Netolitzky

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

## Publikationsliste

Titel Effects of resin materials dedicated for additive manufacturing of temporary dental restorations on human gingival keratinocytes

Autoren Iris Frasheri DMD, PhD; Katharina Aumer DMD; Andreas Keßler DMD, PhD; Nicolai Miosge MD, PhD; Matthias Folwaczny DMD, MD, PhD

Journal Journal of Esthetic and Restorative Dentistry / Volume 34, Issue 7 / p. 1105-1112

Publikationsdatum 22.06.2022

<https://doi.org/10.1111/jerd.12938>