

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



**Untersuchung der Biokompatibilität von 3D-Druckmaterialien zur  
Herstellung von temporären und definitiven Kronen und Brücken:  
Zytotoxizität, Apoptose und Entzündungsmarker**

Dissertation

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

vorgelegt von  
Sophie Woitalka

aus  
Günzburg

2024

---

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

Erstes Gutachten: Prof. Dr. med. dent. Karin Christine Huth

Zweites Gutachten: PD Dr. med. dent. Christine Keul

Drittes Gutachten: Prof. Dr. med. dent. Franz-Xaver Reichl

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

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 2024

meiner Mama gewidmet

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Zusammenfassung.....</b>	<b>8</b>
<b>3. Abstract .....</b>	<b>10</b>
<b>4. Einleitung .....</b>	<b>12</b>
4.1. CAD/CAM-Technologie .....	12
4.1.1. Historischer Überblick der CAD/CAM-Technologie im Dentalbereich .....	12
4.1.2. Workflow der CAD/CAM-Technologie .....	13
4.1.3. CAD/CAM-Technologie in der Zahnmedizin .....	16
4.1.4. Anforderungen an dentale Restaurationen .....	16
4.1.4.1. Mechanische Eigenschaften .....	17
4.1.4.2. Biokompatibilität .....	17
4.1.5. Erfolgsraten CAD/CAM-gefertigter Restaurationen .....	18
4.2. Grundlagen des 3D-Drucks.....	18
4.2.1. Historischer Überblick des 3D-Drucks im Dentalbereich .....	18
4.2.2. Anwendungsbereiche des 3D-Drucks in der Zahnmedizin .....	19
4.2.3. Workflow der additiven Fertigung.....	21
4.2.4. 3D-Druck-Technologien .....	22
4.2.4.1. Stereolithographie (SLA).....	23
4.2.4.2. Digitale Lichtprojektion (DLP).....	23
4.2.4.3. Extrusionsverfahren .....	24
4.2.4.4. Selektives Lasersintern (SLS).....	24
4.2.4.5. Photopolymer-Jetting .....	25
4.2.4.6. Pulver-Bindemittel-Drucker .....	25
4.2.4.7. Axiale Computerlithographie .....	25
4.2.5. Materialien im 3D-Druck-Bereich .....	26
4.2.6. Verbundkunststoffe – Acrylharze .....	26
4.2.7. Vor- und Nachteile des 3D-Drucks.....	28
4.3. Zukünftige Perspektiven des 3D-Drucks .....	29
<b>5. Zielsetzung.....</b>	<b>31</b>
<b>6. Material und Methoden .....</b>	<b>32</b>
6.1. Allgemeine Zellkultur .....	32

6.1.1.	Zellkultivierung .....	32
6.1.2.	Mediumwechsel.....	33
6.1.3.	Subkultivierung der Zellen.....	34
6.1.4.	Bestimmung der Zellzahl.....	35
6.2.	Materialwahl .....	36
6.3.	Herstellung der Probekörper .....	41
6.4.	Herstellung der Eluate .....	43
6.5.	Spezielle Methoden.....	44
6.5.1.	Zytotoxizitätsuntersuchung mittels WST-8-Assay.....	45
6.5.2.	Untersuchung der Apoptoseinduktion mittels Caspase-Assay .....	47
6.5.3.	Untersuchung der Entzündungsinduktion mittels ELISA auf IL-6 ..	49
6.6.	Datenerhebung.....	53
<b>7.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>54</b>
7.1.	Colorimetric Cell Viability Kit I (WST-8).....	54
7.2.	Caspase-Glo 3/7-Assay .....	55
7.3.	ELISA - Human IL-6 Immunoassay.....	57
<b>8.</b>	<b>Interpretation und Diskussion.....</b>	<b>60</b>
<b>9.</b>	<b>Fazit .....</b>	<b>74</b>
<b>10.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>76</b>
<b>11.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>84</b>
<b>12.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>84</b>
<b>13.</b>	<b>LOT-Nummern-Verzeichnis.....</b>	<b>85</b>
<b>14.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>86</b>
<b>15.</b>	<b>Affidavit .....</b>	<b>87</b>

## 1. Abkürzungsverzeichnis

3D-Druck	dreidimensionaler Druck
BisDMA	Bisphenol-A-Dimethacrylat
BisEMA	Ethoxylated Bisphenol-A-Dimethacrylat
BisGMA	Bisphenol-A-Diglycidylmethacrylat
BPA	Bisphenol-A
CAD	Computer-aided-Design
CAM	Computer-aided-Manufacturing
CCVK-1	Colorimetric Cell Viability Kit I
CEREC	Ceramic Reconstruction
CNC	Computerized Numerical Control
DC	Degree of Conversion
DEGDMA	Diethylenglykol-Dimethacrylat
DLP	Digitale Lichtprojektion
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGDMA	Ethylen-Glycol-Dimethylacrylat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FBS	Fetal Bovine Serum
FDM	Fused Deposition Modeling
GDMA	Glyceroldimethacrylat
GMA	Glycidyl-Methacrylat
GSH	Glutathion
HEMA	Hydroxyethylmethacrylat

HGF	Human Gingival Fibroblasts
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPMA	Hydroxypropylmethacrylat
IL	Interleukin
IQA	Interquartilsabstand
ISO	International Standards Organization
MMA	Methacrylsäure-Methylester
NC	Numerical Control
ND	NextDent C&B (MFH), NextDent
P	P pro Krone und Brücke, Straumann
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMMA	Polymethylmethacrylat
PT	Protemp IV, 3M ESPE
SLA	Stereolithographie
SLS	Selektives Lasersintern
SSP	Staurosporin
STL	Standard Transformation Language
TC	Tetric CAD, Ivoclar Vivadent
TEC	Tetric Evo Ceram, Ivoclar Vivadent
TEGDMA	Triethyleneglycoldimethacrylat
TEL	Telio CAD, Ivoclar Vivadent
THFMA	Tetrahydrofurfuryl-Methacrylat
TMPTMA	Trimethylolpropan-Trimethacrylat
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha
TP	TEMP Print, GC
TPMA	Tetramethylpiperidiny-Methacrylat

TTX100	Triton-X-100, Octylphenoxypolyethoxyethanol
UDMA	Urethan-Dimethacrylat
VSC	Varseo Smile Crown +, BEGO
VST	Varseo Smile Temp, BEGO
WST-8	Water Soluble Tetrazolium Salt 8

## **2. Zusammenfassung**

### **Zielsetzung**

In den letzten Jahren zeichnete sich eine rasante Verbreitung der additiven Fertigung in der Zahnmedizin ab. Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung eines möglichen Einflusses von 3D-druckbaren Materialien auf orale Zellen. Es besteht dabei größtes Interesse, einen Vergleich zu bereits langjährig etablierten Materialien hinsichtlich deren Biokompatibilität herzustellen.

### **Material und Methoden**

Es wurden neun verschiedene - additiv, CAD/CAM- bzw. konventionell gefertigte - zahnmedizinische direkte und indirekte Restaurationsmaterialien [Tetric Evo Ceram (Ivoclar Vivadent), Tetric CAD (Ivoclar Vivadent), Varseo Smile Crown + (BEGO), NextDent C&B (NextDent), Protemp IV (3M ESPE), Telio CAD (Ivoclar Vivadent), Varseo Smile Temp (BEGO), TEMP Print (GC), P pro Krone und Brücke (Straumann)] Zellkultur-Versuchen an humanen gingivalen Fibroblasten (HGF-1) unterzogen, um deren Biokompatibilität zu detektieren. Von jedem Material wurden kreisrunde Probekörper mit einer Fläche von 162,84 mm<sup>2</sup> und einer Schichtstärke von 1 mm hergestellt. Zur Herstellung von Eluaten erfolgte ein Einlegen der Plättchen in Medium („DMEM (1X) + GlutaMAX-I“, 10% FBS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) für sieben Tage sowie eine anschließende Probenfiltration mittels eines 0,2 µm Membranfilters (VWR, 2 µm Polyethersulfon Membran). Um den Einfluss der Materialien auf den Zellstoffwechsel zu untersuchen, wurden Assays zur Detektion der Zellviabilität (Colorimetric Cell Viability Kit – WST-8), der Einleitung der Apoptose (Caspase-Glo 3/7-Assay) und des Einflusses auf die Entzündungsregulation (ELISA – Human IL-6-Immunoassay) durchgeführt. Die Studie baut auf insgesamt drei Versuchsdurchläufen auf. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte deskriptiv und mittels nicht-parametrischer Tests (Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test, Signifikanzniveau 0,05). Dabei kam das Programm SPSS (v28, SPSS Inc, Chicago, IL, Vereinigte Staaten von Amerika) zum Einsatz.

## **Ergebnisse**

Bei dem WST-8-Assay zeigte kein Material eine Reduktion der Zellvitalität um mehr als 30% auf, so dass kein Werkstoff laut DIN EN ISO 10993-5-Norm als zytotoxisch eingestuft wird. Die Zellüberlebensrate nahm hier in folgender Reihenfolge ab: TP (97,42%), P (94,94%), TEL (94,70%), TC (88,90%), VSC (87,52%), VST (86,96%), ND (85,42%), PT (74,24%), TEC (71,56%). Es konnte zwischen keinem Material ein signifikanter Unterschied detektiert werden. Durch das Caspase-Glo 3/7-Assay konnten signifikante Unterschiede mit einer mittleren Effektstärke zwischen dem Material PT ( $p = 0,018$ ) sowie TEL ( $p = 0,022$ ) und der Negativkontrolle aufgezeigt werden. Es war dabei folgende abnehmende Caspasenaktivität der untersuchten Materialien festzuhalten: TC, P, TEC, ND, VST, TP, VSC, TEL, PT. Das ELISA - Human IL-6-Immunoassay detektierte signifikante Unterschiede mit einer großen Effektstärke bezüglich der IL-6-Konzentration zwischen TEL und ND ( $p = 0,011$ ), TEL und TP ( $p < 0,001$ ), TEC und ND ( $p = 0,043$ ), TEC und TP ( $p = 0,002$ ) sowie TC und TP ( $p = 0,012$ ). Dabei nahm die mittlere IL-6-Konzentration in folgender Reihenfolge ab: 517,07 pg/ml (TP), 407,79 pg/ml (ND), 304,97 pg/ml (VSC), 246,89 pg/ml (P), 224,91 pg/ml (VST), 217,64 pg/ml (PT), 208,85 pg/ml (TC), 187,17 pg/ml (TEC), 173,04 pg/ml (TEL).

## **Schlussfolgerung**

Die Materialien können laut vorliegender Ergebnisse als biokompatibel eingestuft werden. Im Vergleich zu den bereits auf dem Markt etablierten Materialien wiesen die neuen 3D-Druck-Materialien gleichwertig einzustufende Ergebnisse auf. Lediglich im Hinblick auf die IL-6-Konzentration zeigten die additiven Materialien erhöhte Werte.

### **3. Abstract**

#### **Objectives**

In recent years, a rapid spread of additive manufacturing in dentistry has become apparent. The aim of this work is to investigate the possible influence of 3D printable materials on oral cells. It is of great interest to compare the biocompatibility of these materials with those that have been established for many years.

#### **Materials and Methods**

Nine different - additive, CAD/CAM or conventional manufactured - dental direct and indirect restorative materials [Tetric Evo Ceram (Ivoclar Vivadent), Tetric CAD (Ivoclar Vivadent), Varseo Smile Crown + (BEGO), NextDent C&B (NextDent), Protemp IV (3M ESPE), Telio CAD (Ivoclar Vivadent), Varseo Smile Temp (BEGO), TEMP Print (GC), P pro crown and bridge (Straumann)] were subjected to cell culture test on Human Gingival Fibroblasts (HGF-1) to detect their biocompatibility. Circular specimens with an area of 162.84 mm<sup>2</sup> and a layer thickness of 1 mm were prepared from each material. For the preparation of eluates, the platelets were placed in medium („DMEM (1X) + GlutaMAX-I“, 10% FBS (fetal calf serum), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin) for seven days, followed by sample filtration using a 0.2 µm membrane filter (VWR, 2 µm polyethersulfone membrane). To investigate the influence of the materials on cell metabolism, assays were performed to detect cell viability (Colorimetric Cell Viability Kit - WST-8), initiation of apoptosis (Caspase-Glo 3/7-assay) and influence on inflammatory regulation (ELISA - Human IL-6 immunoassay). The study was composed of a total of three experimental runs. Statistical analysis of the results was performed descriptively and by non-parametric tests (Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney U test, significance level 0.05). The SPSS program (v28, SPSS Inc, Chicago, IL, United States of America) was used.

#### **Results**

In the WST-8 assay, no material showed a reduction in cell viability of more than 30%, so that no material is classified as cytotoxic according to the DIN EN ISO

10993-5 standard. The cell survival rate decreased here in the following order: TP (97.42%), P (94.94%), TEL (94.70%), TC (88.90%), VSC (87.52%), VST (86.96%), ND (85.42%), PT (74.24%), TEC (71.56%). No significant difference could be shown between any material. The Caspase-Glo 3/7-assay showed significant differences with a mean effect size between the PT ( $p = 0.018$ ) and TEL ( $p = 0.022$ ) materials and the negative control. It also proved the following decreasing caspase activity of the tested materials: TC, P, TEC, ND, VST, TP, VSC, TEL, PT. ELISA - Human IL-6 immunoassay detected significant differences with a large effect size regarding IL-6 concentration between TEL and ND ( $p = 0.011$ ), TEL and TP ( $p < 0.001$ ), TEC and ND ( $p = 0.043$ ), TEC and TP ( $p = 0.002$ ), and TC and TP ( $p = 0.012$ ). Among them, the mean IL-6 concentration decreased in the following order: 517.07 pg/ml (TP), 407.79 pg/ml (ND), 304.97 pg/ml (VSC), 246.89 pg/ml (P), 224.91 pg/ml (VST), 217.64 pg/ml (PT), 208.85 pg/ml (TC), 187.17 pg/ml (TEC), 173.04 pg/ml (TEL).

## **Conclusion**

According to the available results, the materials can be considered as biocompatible. Compared to the established materials already on the market, the new 3D printed materials showed results that could be classified as equivalent. Only with regard to the IL-6 concentration did the additive materials show increased values.

## **4. Einleitung**

### **4.1. CAD/CAM-Technologie**

CAD/CAM steht für „computer-aided design and computer-aided manufacturing“. Somit sind das computergestützte Design und die computergestützte Fertigung gemeint. Das CAD/CAM-Verfahren hat in den letzten Jahren in der Zahnmedizin zunehmend an Bedeutung gewonnen. Dabei stellt die computergestützte Technologie einen weit gefassten Begriff dar, welcher den Einsatz von entsprechender Software für den Entwurf, die Analyse und Herstellung von Produkten umfasst (Bidra *et al.*, 2013). Schon seit vielen Jahren werden diese Systeme in der Industrie eingesetzt. Im zahnmedizinischen Bereich sind sie seit den 1980er Jahren verfügbar. Heutzutage stellt die computergestützte Fertigung einen wichtigen Bestandteil der Zahnheilkunde dar und wird mit hoher Genauigkeit, beschleunigter Produktion und reduzierter manueller Arbeit assoziiert (Joda *et al.*, 2017). Es wird derzeit die formative, subtraktive und additive Fertigungstechnik unterschieden; formativ bedeutet, dass ein Gegenstand durch die Einwirkung von Wärme, Über- oder Unterdruck gegossen bzw. gepresst wird; additive Fertigung, auch „3D-Druck“ oder „Rapid Prototyping“ genannt, ist ein Verfahren, bei dem Material schichtweise aufgebaut wird; die subtraktive Fertigung ist gekennzeichnet durch den selektiven mechanischen oder Laser-Abtrag eines Materialblocks; dies ist aktuell die häufigste CAD/CAM-Technologie in der Zahnmedizin (Constantiniuc *et al.*, 2021).

#### **4.1.1. Historischer Überblick der CAD/CAM-Technologie im Dentalbereich**

Im 20. Jahrhundert wurden sowohl im Bereich der zahnmedizinischen Materialien als auch in der Herstellungstechnologie des Zahnersatzes bemerkenswerte Fortschritte erreicht (Miyazaki *et al.*, 2009). Es wurden dabei unter anderem neue Hochleistungskeramiken eingeführt, welche mittels konventioneller Fertigungsverfahren nicht mehr verarbeitet werden konnten und somit unter anderem die Entwicklung der CAD/CAM-Technologie vorantrieben (Raigrodski, 2004).

Die Entwicklung von CAD/CAM-Systemen geht vor allem auf die Flugzeugindustrie zurück, in welcher bereits Anfang der 1950er Jahre NC-Maschinen (Numerical Control) eingesetzt wurden; 1959 wurde das erste CAD-System von Don Hart und Ed Jacks entwickelt; die wichtigsten Fortschritte von CAD/CAM-Systemen im Dentalbereich fanden in den 1970er und 1980er Jahren statt; dabei gilt François Duret als Vater der computergestützten Fertigung (Schweiger und Kieschnick, 2017). Er stellte 1973 das Konzept der Holographie vor und die Möglichkeit der Umwandlung in elektrische Signale, welche von Computern verarbeitet werden können (Duret *et al.*, 1988). 1977 gelang John Young und Bruce Altschuler das erste Fräsen einer Okklusalfäche mittels einer CNC-Fräsmaschine (Computerized Numerical Control) aus einem Metallblock (Young und Altschuler, 1977). Anfang der 1980er Jahre entwickelten Werner Mörmann und Marco Brandestini einen Prototyp eines CAD/CAM-Systems, mit dem die Herstellung eines Keramikinlays subtraktiv ermöglicht und welches später als CEREC-System (Ceramic Reconstruction) bezeichnet wurde (Constantiniuc *et al.*, 2021). In den 1980er Jahren wurde es an der Universität in Zürich als das erste kommerzielle CAD/CAM-System in einer Zahnklinik angewandt; das erste chair-side-Keramikinlay mit dem CEREC1-CAD/CAM-System wurde 1985 eingesetzt (Mörmann, 2006). Derzeit gibt es eine Vielzahl an CAD/CAM-Verfahren von verschiedenen Herstellern; alle benötigen folgende vier Komponenten: Bildaufnahmesystem, Design-Software, Frässystem bzw. 3D-Druckeinheit sowie Kommunikationssystem (Constantiniuc *et al.*, 2021).

#### **4.1.2. Workflow der CAD/CAM-Technologie**

Der Arbeitsprozess einer CAD/CAM-gefertigten Restauration gliedert sich in die Schritte Präparation, Datenerfassung (Digitalisierung), Datenverarbeitung, CAD-Modellierung und CAM-Fertigung (Rudolph *et al.*, 2004). Nach erfolgter Digitalisierung der oralen Situation wird der spätere Zahnersatz mittels der CAD-Software entworfen. Anschließend kann mit Hilfe der CAM-Software die konstruierte Restauration maschinengerecht umgesetzt werden. Bei den Arbeitsschritten einer CAD/CAM-gefertigten Restauration bestehen zahlreiche

Varianten. Die Digitalisierung des präparierten Zahns ist ein entscheidender Aspekt der späteren Präzision und Passgenauigkeit des Zahnersatzes. Hierbei kann die Datenerfassung der intraoralen Situation direkt oder indirekt erfolgen; bei indirekten Systemen wird ein Digitalisat von einer konventionellen Abformung oder von dem daraus erstellten Modell angefertigt, wohingegen bei der direkten Variante die orale Situation über einen intraoralen Scan wiedergegeben wird (Galhano *et al.*, 2012). Eine Studie von 2009 konnte bei der indirekten Digitalisierung keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Präzision zwischen dem Scannen der konventionellen Abformung und des erstellten Modells detektieren (Persson *et al.*, 2009). Bei der direkten Variante projiziert ein intraoraler Scanner eine Lichtquelle auf das abzubildende Objekt, die mittels Sensoren aufgenommenen Bilder werden von der Scansoftware verarbeitet, eine Punktwolke wird erzeugt und anschließend trianguliert, so dass ein 3D-Oberflächenmodell entsteht (Martin *et al.*, 2015).

Bei der CAD/CAM-Fertigung können Laborsysteme (Labside-Systeme) und Chairside-Systeme unterschieden werden. Bei Laborsystemen erfolgen alle Schritte, nach einer konventionellen Abformung in der Praxis, in einem externen Labor (Miyazaki und Hotta, 2011). Eine Variation der Laborfertigung stellt ein Produktionszentrum dar. Hier findet die CAM-Fertigung des Zahnersatzes statt, die Konfiguration erfolgt jedoch durch einen Zahntechniker; Vorteile des Auslagerns liegen in geringeren Investitionskosten sowie in einem hochqualitativen Produktionsprozess (Beuer *et al.*, 2008). Chairside-CAD/CAM-System bedeutet, dass der gesamte Herstellungsprozess - Digitalisierung, CAD, CAM - in der Zahnarztpraxis stattfindet. Es besteht ebenfalls die Möglichkeit der Kombination zwischen Chairside- und Labside-System. Beispielsweise kann in der Praxis die Datenerfassung bzw. das Scannen oder bereits die CAD-Konstruktion erfolgen, die eigentliche CAM-Herstellung der Restauration jedoch in einem externen Labor (Adil *et al.*, 2018). Ein vereinfachter Überblick der Labside- bzw. Chairside-Fertigung kann folgender Abbildung entnommen werden.

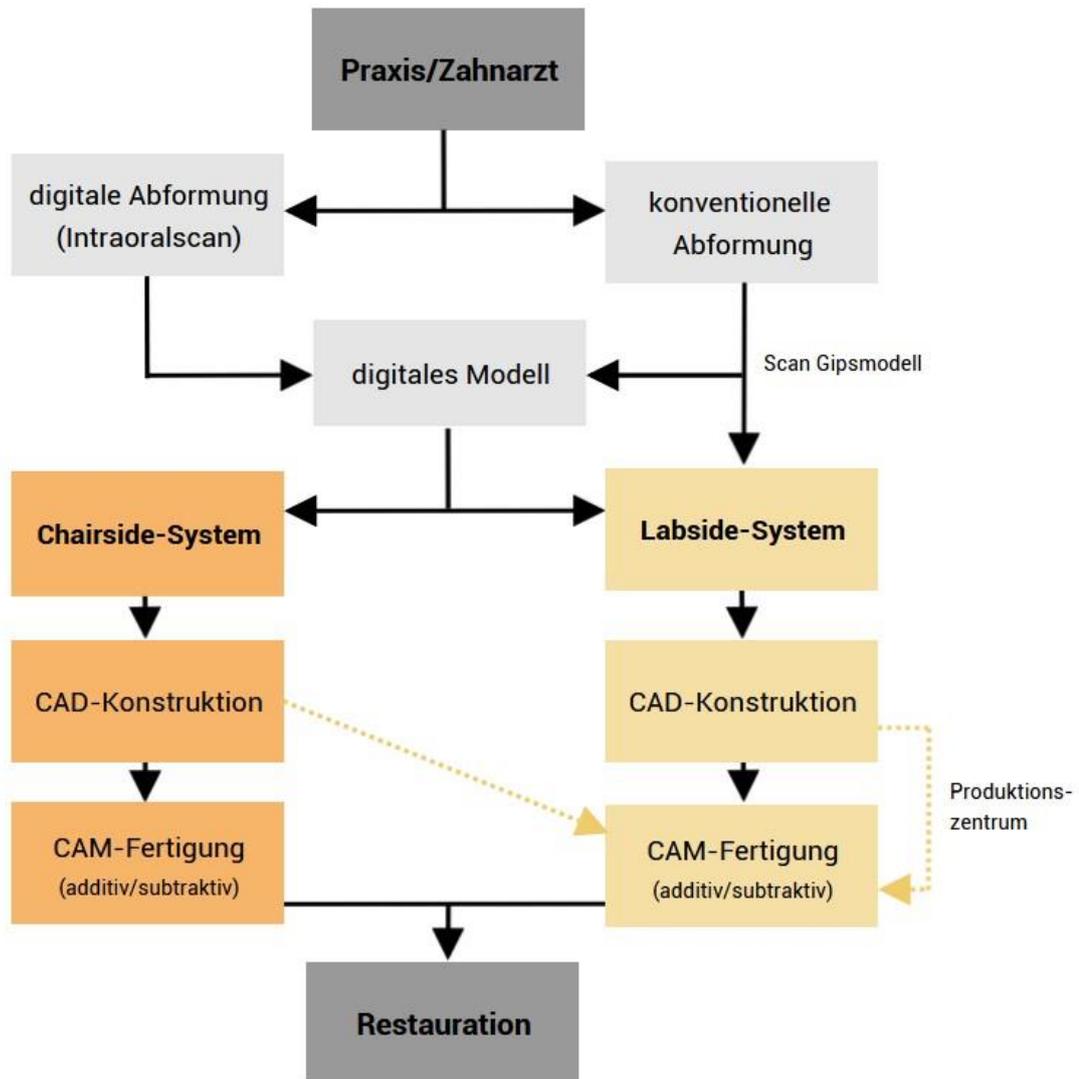


Abbildung 1: CAD/CAM Labside- und Chairside-System

Bei der CAD/CAM-Technologie sind des Weiteren offene von geschlossenen Systemen zu unterscheiden. Offene Varianten ermöglichen die Übernahme digitaler Originaldaten durch CAD-Software und CAM-Geräte von verschiedenen Herstellern. Dabei weisen die meisten Labor-CAD-Systeme ein offenes System auf, so dass ein Datenaustausch zwischen Praxis und Labor auch bei verschiedenen Modelltypen möglich wird (Adil *et al.*, 2018). Geschlossene Systeme ermöglichen den Austausch lediglich innerhalb eines Herstellers.

### **4.1.3. CAD/CAM-Technologie in der Zahnmedizin**

Mit dem Aufkommen neuer Materialien haben sich die zahnmedizinischen Anwendungen von der CAD/CAM-Technologie auf alle Bereiche der Zahnheilkunde ausgeweitet; vor allem die Herstellung indirekter Restaurationen wie Inlays, Onlays oder Einzelzahnkronen ist verbreitet (Shenoy und Prabhu, 2015). Aber auch Aufbissschienen können mit reduziertem Zeitaufwand, einer glatten Oberflächenstruktur, einer guten Passform und einer hohen Materialqualität erstellt werden (Buduru *et al.*, 2019). Das CAD/CAM-Verfahren findet des Weiteren in Bereichen wie Oralchirurgie, Parodontologie, Kieferorthopädie, Implantologie oder Mundkiefergesichtschirurgie Anwendung (Adil *et al.*, 2018). Bei zuletzt Genanntem bietet die CAD/CAM-Technologie bei der Herstellung von kraniofazialen Implantaten, chirurgischen Splints oder beispielsweise Orbitalprothesen Vorteile einer verkürzten labortechnischen Arbeitszeit sowie die Möglichkeit der Fertigung von individuellen patientenspezifischen Implantaten (Tanveer *et al.*, 2021). Die CAD/CAM-Anwendung im Bereich der Kieferorthopädie untersuchte eine Studie von 2015 (Brown *et al.*, 2015 ). Das darin untersuchte CAD/CAM-Bracketsystem war in Bezug auf die Behandlungsergebnisse genauso effektiv wie Standardbrackets, zeigte jedoch weniger notwendige Behandlungssitzungen auf.

### **4.1.4. Anforderungen an dentale Restaurationen**

Es sind eine Reihe an Parametern erforderlich, welche den Erfolg einer direkten bzw. indirekten dentalen Restauration bestimmen. Exemplarisch werden einige skizziert. Der Behandlungserfolg mit CAD/CAM-Technologie hängt unter anderem von der Materialauswahl, der Fallklassifizierung, der korrekten Präparation, dem präzisen Scannen, der Planung, dem Design, der Herstellung und der Befestigungsvariante der Restauration ab (Skorulska *et al.*, 2021). Die endgültige Zahnrestauration sollte unter anderem okklusale Kräfte standhalten, die während der Klinik auftreten (Alp *et al.*, 2019), sowie eine gute Randpassung aufweisen. Es wurde bestätigt, dass die meisten CAD/CAM-gefertigten Restaurationen durch eine akzeptable Randadaptation

gekennzeichnet sind, welche jedoch von der Art des Restaurationsmaterials abhängig ist (Papadiochou und Pissiotis, 2018).

#### **4.1.4.1. Mechanische Eigenschaften**

Auch mechanische Merkmale der verwendeten CAD/CAM-Materialien wie Biegefestigkeit, Härte, Elastizitätsmodul, aber auch optische Eigenschaften haben Einfluss auf die Erfolgsrate der späteren Restauration (Skorulska *et al.*, 2021). Bei dentalen Kompositmaterialien, auf welche im Rahmen dieser Arbeit der Fokus gelegt wird, liegt der Schwerpunkt auf der Herstellung von Materialien mit ausreichender Festigkeit, hoher Verschleißbeständigkeit und guter Polierbarkeit (Ferracane, 2001). Ferner ist die chemische und mechanische Degradation für die Lebensdauer ein wichtiger Parameter (Wendler *et al.*, 2018).

#### **4.1.4.2. Biokompatibilität**

Neben den mechanischen Eigenschaften der restaurativen Materialien spielt auch deren Biokompatibilität eine entscheidende Rolle. Die Biokompatibilität umfasst biologische, chemische und physikalische Wechselwirkungen und ist eng mit der Zytotoxizität verbunden; von einem dentalen Material wird erwartet, dass es keine Reizungen, Schwellungen oder irgendeine Art von Unverträglichkeit in der Mundhöhle verursacht (Skorulska *et al.*, 2021). Bei den Kunststoffmaterialien spielt vor allem der Restmonomergehalt für die Toxizität und damit auch die Biokompatibilität des Werkstoffes eine entscheidende Rolle. Monomere besitzen zytotoxische Eigenschaften; bei dem Übergang vom monomeren in den polymeren Zustand, d.h. bei der Aushärtung, verlieren die Monomere diese und werden biologisch inert; allerdings sind in Polymeren fast immer Restmonomere enthalten, die während der Gebrauchsperiode freigesetzt werden können (Janda, 2007). Es gibt bereits einige Studien, welche die Biokompatibilität von CAD/CAM-Materialien für die subtraktive Herstellungsvariante untersuchten. Es wird in der Literatur beispielsweise darauf verwiesen, dass Kompositblöcke für die CAD/CAM-Technologie bessere Biokompatibilitätseigenschaften aufgrund eines höheren Umwandlungsgrades der Polymerisation aufweisen (Mainjot *et al.*, 2016). Es besteht allerdings nur

eine geringe Datenlage über die Biokompatibilität von den neu auf dem dentalen Markt erhältlichen 3D-Druck-Materialien, weswegen der Fokus im Rahmen dieser Arbeit auf diesen liegt.

#### **4.1.5. Erfolgsraten CAD/CAM-gefertigter Restaurationen**

Generell kann die Erfolgsrate von CAD/CAM-gefertigten Restaurationen im Vergleich zu solchen der konventionellen Fertigung als gleichwertig eingestuft werden. In einer Studie von 2006 wurden beispielsweise Erfolgsraten für Keramikinlays mittels CEREC-Verfahren von circa 84,4% nach 18 Jahren sowie Überlebensraten (lediglich Verbleib der Restauration in situ wird berücksichtigt) von circa 89,0% genannt (Reiss, 2006). Bei konventionellen Herstellungsverfahren liegen die Überlebensraten für Keramik-Restaurationen nach 10 Jahren bei circa 91,0% (Morimoto *et al.*, 2016).

#### **4.2. Grundlagen des 3D-Drucks**

Oft wird mit dem Begriff der „CAD/CAM-Technologie“ lediglich eine subtraktive Fertigung bzw. ein Fräsvorgang bezeichnet, allerdings zählt auch der 3D-Druck zum CAD/CAM-Verfahren (Schweiger und Kieschnick, 2017). Aktuell weitet sich die additive Technologie rasch in allen Bereichen des Gesundheitswesens, auch in der Zahnmedizin, aus (Liaw und Guvendiren, 2017). Mit dem Begriff des 3D-Drucks, auch additive Fertigung oder Rapid Prototyping genannt, wird ein Fertigungsverfahren beschrieben, bei dem Objekte meist schichtweise aufgebaut werden (Dawood *et al.*, 2015). Die additive Fertigung ermöglicht dabei die Herstellung spezifischer Objekte aus Metallen, Keramiken und Polymeren ohne die Notwendigkeit von Formen oder maschineller subtraktiver Bearbeitung wie für die herkömmliche formative und subtraktive Fertigung (Ligon *et al.*, 2017). Sie ist eine relativ neue Technologie der CAD/CAM-Fertigung und deckt dennoch fast alle Fachbereiche der Zahnmedizin ab (Scribante *et al.*, 2022).

##### **4.2.1. Historischer Überblick des 3D-Drucks im Dentalbereich**

Der 3D-Druck wurde ursprünglich für die schnelle Herstellung von Prototypen entwickelt (Rapid Prototyping) (Schweiger und Kieschnick, 2017), hat sich

allerdings in seiner über vierzigjährigen Geschichte rasant weiterentwickelt. Das Aufkommen der additiven Fertigung geht auf die 1980er Jahre zurück. 1986 wurde erstmals ein Patent von Charles W. Hull für eine Vorrichtung zur Herstellung von dreidimensionalen Objekten mittels Stereolithographie eingereicht (Whitaker, 2014). Es wurden darauffolgend zahlreiche andere Verfahren entwickelt. Die Einführung in die Zahnmedizin erfolgte jedoch aufgrund anfänglich hoher Kosten und Ungenauigkeiten später (Scribante *et al.*, 2022). 2002 stellte beispielsweise die Firma „Bego Medical“ das Prinzip des Lasersinterverfahrens vor (Schweiger und Kieschnick, 2017). Eine Preisrevolution im Bereich der additiven Fertigung kam circa 2010; unter anderem war die Dentalbranche bereit, in eine kompakte 3D-Druck-Technologie zu investieren, um standardisierte, schnell gefertigte und langfristig günstigere Produkte zu erhalten (Hegedus *et al.*, 2022). Heute erlebt der 3D-Druck aufgrund des Auslaufens vieler Patente eine rasante Entwicklung und wird zum Teil als Schlüsseltechnologie der nächsten industriellen Revolution bezeichnet (Kessler *et al.*, 2020).

#### **4.2.2. Anwendungsbereiche des 3D-Drucks in der Zahnmedizin**

Heutzutage findet der 3D-Druck in nahezu allen Fachbereichen der Zahnmedizin Anwendung. Es werden exemplarisch einige hiervon dargestellt.

Indikationen der digitalen Fertigung in der oralen Chirurgie und Mundkiefergesichts Chirurgie sind beispielsweise die Gewinnung hochpräziser anatomischer Prototypmodelle zur Erleichterung der präoperativen Planung, das virtuelle Planen und Drucken vorkonturierter Osteosyntheseplatten oder patientenspezifischer Implantate bzw. Prothesen sowie die Erstellung von Simulationsmodellen für die chirurgische Ausbildung (Aldaadaa *et al.*, 2018). Die Übertragung der Patientendaten und die digitale Rekonstruktion der anatomischen Scans sind die ersten Schritte des 3D-Drucks; dabei kommen in der oralen Chirurgie vor allem die Computertomographie und die Magnetresonanztomographie zum Einsatz (Mian *et al.*, 2021).

Auch in der dentalen Implantologie findet der 3D-Druck beispielsweise durch gedruckte Bohrschablonen zunehmend an Bedeutung (Rouzé l'Alzit *et al.*, 2022).

In der Kieferorthopädie können mittels additiver Fertigung unter anderem digitale Modelle erstellt werden (Groth *et al.*, 2018), aber auch der direkte Druck von kieferorthopädischen Geräten wie beispielsweise Alignern, Retainern, individuellen Brackets, Aktivatoren oder Schablonen für kieferorthopädische Minischrauben ist mittlerweile möglich (Scribante *et al.*, 2022).

Einen interessanten Einsatzbereich des 3D-Drucks stellt die zahnärztliche Prothetik dar. Ein Vorteil der Anwendung von digitalen Verfahren bei der Erstellung von zum Teil komplexem Zahnersatz stellt unter anderem die Möglichkeit der Visualisierung des Endproduktes und damit die optimale Umsetzbarkeit des Patientenwunsches dar (Khorsandi *et al.*, 2021). Während Kronen und Brücken schon länger mittels additiver CAD/CAM-Technologie erstellt werden (Schweiger *et al.*, 2021), wird aktuell die Umsetzbarkeit von 3D-gedruckten Teil- und Totalprothesen erforscht. Eine Studie von 2021 kam zu dem Ergebnis, dass sowohl gefräste als auch 3D-gedruckte Prothesen eine valide Behandlungsmethode für zahnlose Patienten darstellen, wenngleich letztere Variante in Bezug auf den Zeit- und Kostenfaktor derzeit noch unterlegen ist (Srinivasan *et al.*, 2021). Auch der Druck von Gerüsten für herausnehmbare Teilprothesen ist möglich. Dabei veranschaulichte eine Literaturübersicht von 2021, dass additive Gerüste zwar eine schlechtere Oberflächenrauigkeit als gegossene oder gefräste aufwiesen, allerdings die gedruckten Klammern eine bessere Retentionskraft aufzeigten (Suzuki *et al.*, 2021). Die additive Fertigung von Aufbissschienen ist mittlerweile ebenfalls verbreitet. In einer Studie von 2020 konnte gezeigt werden, dass die Passgenauigkeit von gefrästen und gedruckten Aufbissschienen vergleichbar ist (Reymus *et al.*, 2020).

Des Weiteren findet der 3D-Druck in der Endodontie Anwendung. Hierbei liegt der Mehrwert vor allem in dem Druck von Zahnmodellen, um chirurgische Eingriffe zu simulieren oder um komplexe Wurzelmorphologien zu visualisieren

(Shah und Chong, 2018). Dies ist ein Aspekt, welcher auch bei der Ausbildung genutzt werden kann, so dass eine endodontologische Therapie am Kunststoffzahn geübt und gleichzeitig kontrolliert werden kann (Khorsandi *et al.*, 2021). Eine Studie von 2019 untersuchte unter anderem Erfahrungsberichte von Studenten, welche Wurzelkanalbehandlungen an additiv gefertigten Unterkiefer-Molaren durchführten und mit extrahierten Zähnen verglichen; diese kam zu dem Ergebnis, dass die Wurzelkanalbehandlung als vergleichbar eingestuft werden kann und sich bei den additiven Modellen Vorteile von Standardisierung und Chancengleichheit in der Ausbildung zeigten (Reymus *et al.*, 2019).

Eine weitere innovative Idee liegt zum Beispiel im Druck von individuellen und patientenspezifischen zahnärztlichen und chirurgischen Instrumenten, welche die Behandlung durch optimale Anpassung an den Patientenfall erleichtern oder eventuell sogar erst ermöglichen (Dawood *et al.*, 2015).

#### 4.2.3. Workflow der additiven Fertigung

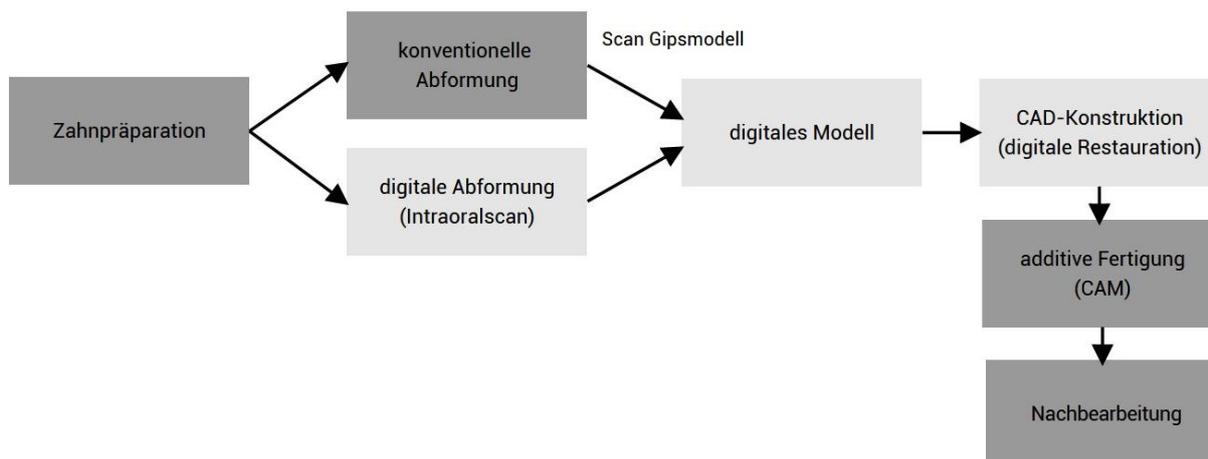


Abbildung 2: Workflow der additiven Fertigung

Nach Erfassung der Zahnmorphologie und des angrenzenden Weichgewebes, beispielsweise durch einen intraoralen Scan oder die Digitalisierung einer konventionellen Abformung, werden die Daten meist im STL-Dateiformat (Standard Transformation Language, Standard Triangulation Language,

Surface Tessellation Language) zunächst exportiert. Das STL-Format beschreibt dabei die Oberfläche von Körpern mit Hilfe der Triangulation; dies entspricht einem Netz bestehend aus Dreiecken; je kleiner die Dreiecksflächen sind, umso genauer ist die Auflösung, so dass eine Fehlerminimierung resultiert (Kessler *et al.*, 2020). Anhand einer CAD-Software kann anschließend das digitale Modell „verfestigt“, d.h. Hohlräume aufgefüllt werden, und ein virtuelles Objekt erstellt werden; dabei werden überstehende Bereiche mit temporären Stützstrukturen versehen; das Objekt wird in horizontale Schichten (xy-Ebene) zerschnitten (Slicing); die Slices enthalten dabei die Pfadinformation (xy-Koordinaten), den sogenannten G-Code, welcher zur Steuerung eines 3D-Druckers (CAM) verwendet wird; in der Regel erfolgt dabei die Fertigung schichtweise mit einer Schichtstärke zwischen 15 µm und 500 µm, eine dünnere Schichtstärke ist mit gleichmäßigeren Objekten, aber auch mit einer längeren Druckzeit verbunden; die Auflösung eines 3D-Druckers wird ebenfalls maßgeblich durch die Schichtdicke bestimmt; nach der additiven Fertigung ist oftmals eine Nachbearbeitung der Objekte abhängig von dem 3D-Druckverfahren und dem verwendeten Material wie beispielsweise das Einlegen in Isopropylalkohol, um nicht ausgehärtetes Harz zu entfernen, das Ablösen von Stützstrukturen, Sandstrahlen oder eine erneute Photopolymerisation erforderlich (Ligon *et al.*, 2017; Dawood *et al.*, 2015; Scribante *et al.*, 2022; Kessler *et al.*, 2020).

#### **4.2.4. 3D-Druck-Technologien**

Für die Herstellung von Dentalprodukten mittels additiver Fertigung können je nach verwendetem Material und gewünschter Zielanwendung mehrere Technologien eingesetzt werden (Kessler *et al.*, 2020). Die häufigsten Polymer-3D-Druck-Methoden, welche im Dentalbereich zur Anwendung kommen, sind dabei die Stereolithographie, die Digitale Lichtprojektion und das Multijet-Druckverfahren (Revilla-Leon *et al.*, 2019).

#### 4.2.4.1. Stereolithographie (SLA)

Die Stereolithographie (SLA, Stereolithography Appearance) war die erste kommerziell verfügbare und industriell angewandte 3D-Druck-Technologie; es wird hierbei schichtweise modelliert (Schweiger und Kieschnick, 2017). 1994 erfolgte die erste Anwendung in der Medizin; es handelt sich um einen Druck auf Basis der Bottich-Polymerisation (Vat Polymerization-Based Printing), wobei lichthärtendes Harzmaterial selektiv photochemisch polymerisiert wird (Fan *et al.*, 2020). Das Verfahren besteht aus den drei Hauptschritten der punkweisen Licht- bzw. Laserbelichtung, der Plattformbewegung und dem Nachfüllen von Harz; die Harzmonomere werden dabei schichtweise von unten nach oben durch eine von ultraviolettem Laser induzierte radikalische Polymerisation miteinander verbunden (Khorsandi *et al.*, 2021). Sobald die Polymerisation abgeschlossen ist, senkt sich die Plattform und es wird eine weitere Schicht Harzmenge aufgetragen (Melchels *et al.*, 2010).

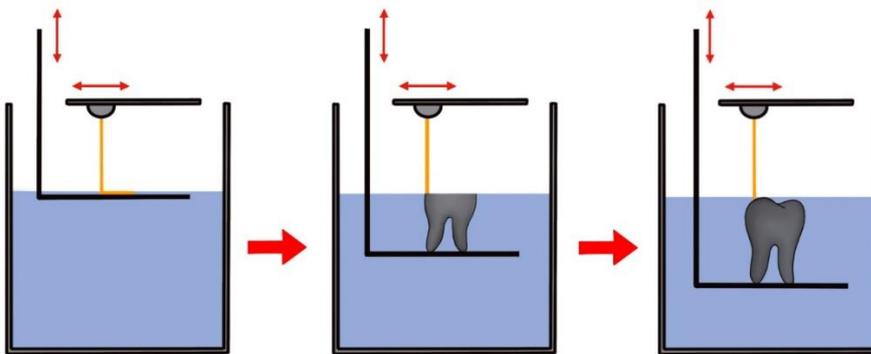


Abbildung 3: Verfahren der Stereolithographie

Anwendungsbereiche im Dentalbereich sind unter anderem die Herstellung von Implantat-Bohrschablonen, kieferorthopädischen Schienen, Kiefermodellen oder die Totalprothetik; das SLA-Verfahren hat sich schnell verbreitet und zeichnet sich durch eine hohe Präzision aus (Schweiger und Kieschnick, 2017).

#### 4.2.4.2. Digitale Lichtprojektion (DLP)

Das DLP-Druckverfahren ähnelt dem der Stereolithographie. Es werden ebenfalls per Photopolymerisation flüssige Harze schichtweise gehärtet (Quan

*et al.*, 2020). Im Gegensatz zur SLA-Fertigung kommt bei dem DLP-Verfahren jedoch UV- bzw. LED-Licht von einer Projektionsquelle zum Einsatz, so dass nicht punktwise wie bei SLA, sondern jede Schicht auf einmal ausgehärtet werden kann (Khorsandi *et al.*, 2021). Der DLP-3D-Druck weist eine sehr gute Druckauflösung von 50 µm auf; um diese hohe Präzision zu gewährleisten, ist die Größe der Objekte jedoch begrenzt; die DLP-Technologie ermöglicht demnach kleine und hochpräzise Drucke, so dass diese vor allem in der Zahnmedizin zum Einsatz kommt (Quan *et al.*, 2020).

#### **4.2.4.3. Extrusionsverfahren**

Der extrusionsbasierte Druck, welcher oft mit dem FDM-Verfahren (Fused Deposition Modeling) der Firma Stratasys gleichgesetzt wird (Schweiger und Kieschnick, 2017), wurde 1988 entwickelt (Fan *et al.*, 2020). Es handelt sich um den nach der SLA-Fertigung zweithäufigsten 3D-Druck (Jaina und Kuthe, 2013). Hierbei werden Polymere, Komposite oder Metalllegierungen erweicht und das erhitzte, zähflüssige Material wird durch einen Heißextrusionskopf schichtweise aufgetragen; die Arbeitsweise ist eine preiswerte additive Fertigungsmethode, wird aber aufgrund niedriger mechanischer Eigenschaften der Thermoplasten in der Zahnmedizin nur für den Druck von provisorischen Kronen und Brücken verwendet (Khorsandi *et al.*, 2021).

#### **4.2.4.4. Selektives Lasersintern (SLS)**

Das Prinzip des Selektiven Lasersinterns ist der pulverbasierte 3D-Druck. Es werden Pulverpartikel mit einem Laser gebunden; dabei zeichnet der Laser spezifische Muster in eine Pulverschicht, woraufhin eine Walze eine neue Pulverschicht auf der Oberfläche verteilt und somit Schicht für Schicht ein Objekt aufgebaut wird (Fan *et al.*, 2020). Es können aktuell sowohl Kunststoffpulver als auch Metallpulver mit dieser Methode verarbeitet werden (Schweiger und Kieschnick, 2017). Nachteilig ist bei den Sintertechniken, dass die gedruckten Objekte eine relativ raue Oberfläche aufweisen, da die Pulver nicht vollständig geschmolzen werden (Fan *et al.*, 2020).

#### **4.2.4.5. Photopolymer-Jetting**

Das Verfahren gehört zu den tröpfchenbasierten 3D-Druck-Technologien und ähnelt am meisten dem traditionellen 2D-Tintenstrahl-Drucken. Ein lichtempfindliches Polymer wird von einem Druckkopf, nach Erhitzung des flüssigen Harzes, auf eine Bauplattform gestrahlt und schichtweise per ultravioletter Lichtquelle photochemisch polymerisiert (Kessler *et al.*, 2020). Eine leicht entfernbare Stützstruktur wird dabei ebenfalls gedruckt; es eignet sich für das Drucken von Harzen, Wachsen sowie silikonähnlichen Gummimaterialien (Khorsandi *et al.*, 2021). Das Besondere an diesem Verfahren ist, dass Objekte mit unterschiedlichen Materialien und Farben gefertigt werden können (Kessler *et al.*, 2020).

#### **4.2.4.6. Pulver-Bindemittel-Drucker**

Bei dem Pulver-Bindemittel-Druck werden flüssige Bindemittel-Tropfen von einem Druckkopf freigesetzt, welche darauffolgend eine Pulverschicht infiltrieren; dabei werden nur belichtete Partikel per chemischer Reaktion miteinander verbunden; nicht belichtetes Pulver kann somit wiederverwendet werden (Stansbury und Idacavage, 2015). Durch das Auftragen neuer Pulverschichten entsteht schrittweise ein Objekt. Da die gedruckten Gegenstände jedoch zerbrechlich und relativ ungenau sind, wird dieses Verfahren in der Zahnmedizin lediglich für den Druck von Studienmodellen und Prototypen verwendet (Khorsandi *et al.*, 2021).

#### **4.2.4.7. Axiale Computerlithographie**

Die axiale Computerlithographie ist eine Form des volumetrischen 3D-Drucks; sie weist dabei Ähnlichkeiten zu der DLP-Methode auf; allerdings kann bei der axialen Computerlithographie die Lichtpolymerisation aus verschiedenen Winkeln erfolgen; somit ist nicht mehr eine schichtweise Polymerisation erforderlich, sondern das gesamte Objekt kann in einem einzigen Arbeitsprozess erstellt werden (Khorsandi *et al.*, 2021).

#### **4.2.5. Materialien im 3D-Druck-Bereich**

Die Materialauswahl im Bereich der additiven Fertigung ist vielfältig und ermöglicht zudem den Zugang zu neuen Restaurationswerkstoffen. Es können unterschiedliche Arten von Metallen bzw. Legierungen, Wachsen sowie Kunststoffen für die Erstellung von beispielsweise Modellen, Provisorien, dauerhaftem Zahnersatz und herausnehmbaren Prothesen verwendet werden (Tamas Hegedus, 2022). Aber auch der gleichzeitige Druck mit unterschiedlichen Materialien ist mittlerweile möglich; der „Multimaterial 3D-Druck“ ermöglicht es somit, mehrere Fertigungsschritte in einem Arbeitsgang zu verwirklichen (Schweiger und Kieschnick, 2017). Im Rahmen dieser Arbeit wurden unter anderem fünf additiv verarbeitete Acrylharze sowie andere Komposit-Materialien untersucht, weswegen der Fokus auf Kunststoff-Materialien gelegt wird.

#### **4.2.6. Verbundkunststoffe – Acrylharze**

Vereinfacht entstehen Kunststoffe, indem in der Polymerisationsreaktion Monomere zu Polymeren zusammengefügt werden. Bei den hier betrachteten Werkstoffen wird, mit Ausnahme des Materials PT, welches rein chemisch aushärtet, die Polymerisationsreaktion photochemisch induziert.

Neben Monomeren sind in dentalen Kunststoffen jedoch weitere Elemente enthalten. Es handelt sich demnach um Verbundpolymere bzw. Komposite. Hauptbestandteile sind die organische Matrix, Füllkörper und Haftvermittler; darüber hinaus werden unter anderem Komponenten zur Steuerung der Polymerisation (Initiatoren, Akzeleratoren, Inhibitoren), Weichmacher, Stabilisatoren und Pigmente hinzugefügt; die organische Matrix setzt sich dabei aus einer Mischung von Monomeren zusammen; als Füllkörper kommen anorganische Partikel wie Gläser oder Glaskeramiken zum Einsatz, welche in die organische Matrix eingebunden sind (Ilie, 2017). Die Füller bzw. Verstärkungspartikel erhöhen vor allem die Viskosität des Photopolymerharzes. Dies kann allerdings bei der additiven Fertigung zu Problemen wie Inhomogenitäten durch Absetzen der Partikel bzw. Lufteinschlüsse oder

Begrenzung der Aushärtungstiefe durch Lichtstreuung führen; bei Materialien für den 3D-Druck kommen deshalb vor allem Glas oder andere UV-transparente Materialien als Füllstoffe infrage (Ligon *et al.*, 2017). Als Haftvermittler dienen Silane, welche eine Bindung zwischen organischer Matrix und anorganischen Füllkörpern herstellen (Ilie, 2017).

Die vereinfachte Zusammensetzung eines Verbundpolymers kann folgender Grafik entnommen werden.

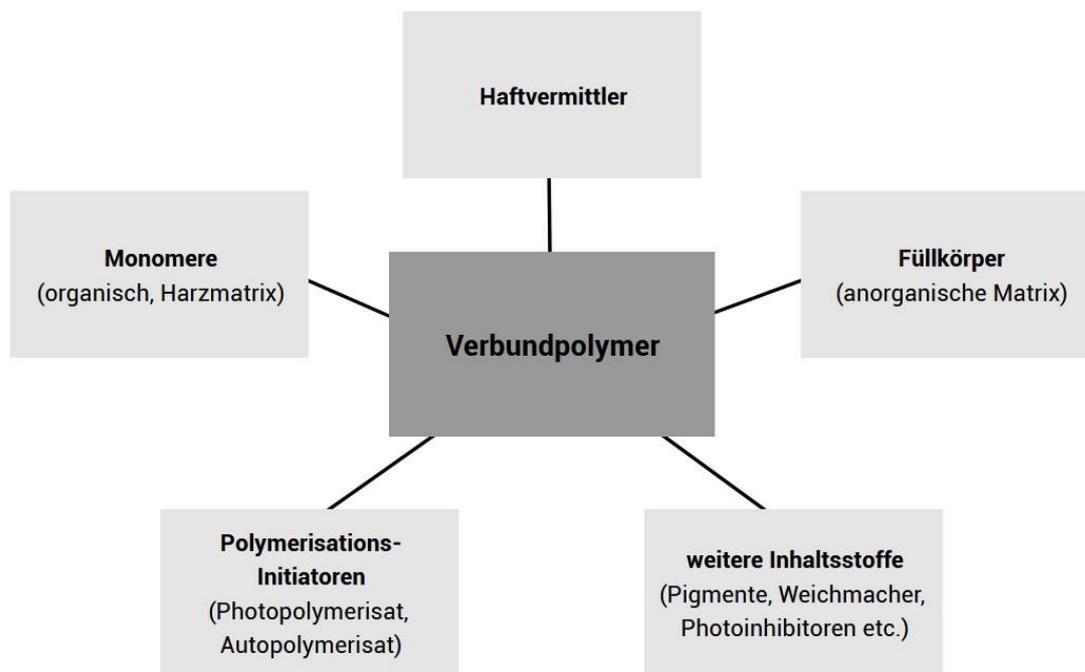


Abbildung 4: Aufbau Verbundpolymer

Es können zahlreiche Kunststoffarten unterschieden werden. Bei den hier untersuchten 3D-Druck-Materialien handelt es sich um Polymethacrylate, welche durch photochemische Polymerisation verschiedener Ester der (Meth)acrylsäure, somit (Meth)acrylat-Derivate, entstehen. Es sind demnach Acrylharze. Die Photopolymerisation ist ein schneller Prozess und wird deshalb häufig in der 3D-Druck-Technologie angewandt. Die enthaltenen radikalen Photoinitiatoren (bei den hier betrachteten Materialien Methylbenzoylformiat bzw. Diphenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinoxid) absorbieren Licht und wandeln sich mit Hilfe der photolytischen Energie in Radikale um, so dass die Polymerisation bzw. Kettenreaktion ausgelöst wird (Ligon *et al.*, 2017). Bei

zahnmedizinischen Materialien kommen Kombinationen verschiedener Methacrylat-Monomere wie BisGMA, UDMA, TEGDMA oder HEMA zum Einsatz, welche zum Teil bereits auf ihre Biokompatibilität bzw. Toxizität untersucht wurden. Beispielsweise untersuchte eine Studie von 2013 die Zytotoxizität der Methacrylate BisGMA, HEMA, TEGDMA, MMA und GDMA an epithelialen Lungenzellen (Ansteinsson *et al.*, 2013). Es wurde hierbei unter anderem eine Korrelation der toxikologischen Eigenschaften der Methacrylate mit der Sequestrierung von zellulärem Glutathion (GSH) angenommen, wobei eine Reduktion des zellulären Glutathionspiegels aufgrund einer Komplexbildung mit den jeweiligen Methacrylaten für zellulären oxidativen Stress spricht. Dabei konnte folgende abfallende Reihenfolge der Reduktion an zellulärem GSH detektiert werden: GDMA, BisGMA, TEGDMA, HEMA, MMA. Des Weiteren zeigte dieselbe Studie mit Hilfe eines MTT-Assays (Bestimmung der Zellviabilität anhand der Aktivität des mitochondrialen Enzyms Succinatdehydrogenase) folgende ähnliche abfallende zelluläre Toxizität auf: BisGMA, GDMA, TEGDMA, HEMA, MMA. Zwar werden Monomere während der Materialhärtung zu Polymeren umgewandelt, allerdings nicht vollständig, weshalb von einem Restmonomergehalt und dementsprechend von der Möglichkeit einer Freisetzung an Monomeren mit eventuell toxischen Eigenschaften ausgegangen werden muss.

#### **4.2.7. Vor- und Nachteile des 3D-Drucks**

Wie jede andere Technologie weist auch die additive Fertigung sowohl Vor- als auch Nachteile auf. Wie bereits bei der allgemeinen CAD/CAM-Technologie angeführt wurde, bestehen auch bei dem 3D-Druck hohe Anschaffungskosten sowie die Notwendigkeit einer speziellen Schulung des Fachpersonals; ebenso wird von einem Gesundheitsrisiko berichtet, welches bei dem Umgang mit nicht ausgehärteten Harzen und Reinigungsmitteln auftreten kann (Scribante *et al.*, 2022). Im Vergleich zu formgebenden Techniken wie dem Gussverfahren oder der subtraktiven Verarbeitung (CNC-Maschine) ist die additive Fertigung zudem (zum jetzigen Zeitpunkt) im Herstellungsprozess langsamer; weiterhin aktuelle

Herausforderungen der additiven Fertigung bestehen vor allem im Hinblick auf derzeit verwendete Werkstoffe wie beispielsweise unzureichende mechanische Eigenschaften oder hohe Materialkosten (Ligon *et al.*, 2017).

Ein großer Vorteil des 3D-Drucks liegt in seiner Individualität, welche ihn vor allem im medizinischen Bereich interessant macht, da jede Patientensituation spezifisch ist. Während die konventionelle Fertigung Verarbeitungszwängen der industriellen Massenproduktion unterliegt, ist die additive Fertigung flexibel und ermöglicht die Herstellung von individuellen Objekten mit spezifischen Anwendungen (Ligon *et al.*, 2017). Auch mehrachsige CAD/CAM-Fräsprozesse können in gewissem Maße das Erstellen von patientenspezifischen Objekten umsetzen, allerdings besteht hierbei eine Einschränkung bedingt durch die Größe des Schleifwerkzeugs und des Materialblocks (Dawood *et al.*, 2015). Die additive Fertigung ist des Weiteren materialeinsparend, während dagegen beispielsweise bei der subtraktiven CAD/CAM-Fertigung mit einem Werkzeugverschleiß sowie Materialverlust gerechnet werden muss.

#### **4.3. Zukünftige Perspektiven des 3D-Drucks**

Einen interessanten Bereich, in welchen sich die additive Fertigung ausweitet, stellt das sogenannte Bioprinting dar. Der 3D-Druck kann laut aktuellem Wissensstand unter anderem genutzt werden, um orale Weichgewebstransplantate mit einem funktionell und ästhetisch zufriedenstellenden Ergebnis zu drucken (Nesic *et al.*, 2020). Beim Tissue-Engineering wird eine resorbierbare Gerüststruktur in Kombination mit Zellen zur Wiederherstellung von Geweben gedruckt; das Gerüst dient dabei als vorübergehende Stützstruktur für die eingepflanzten Zellen (Melchels *et al.*, 2010). Zum Beispiel kann im Bereich der Knochenaugmentation der 3D-Druck zur Erstellung von individuellen Tissue-Engineering-Gerüsten, welche der Form des Defektes angepasst sind, aus Polymeren oder Biokeramiken mit inserierten Stammzellen verwendet werden (Salah *et al.*, 2020).

Die additive Herstellung von Kiefer- und Gesichtsprothesen stellt ebenfalls einen neuen Einsatzbereich mit großem Zukunftspotential dar. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass gedruckte Kiefergelenksprothesen sich als sichere und klinisch effiziente Innovation erweisen (Zheng *et al.*, 2019).

Einen Fortschritt im Bereich der 3D-Technologie hat eine neue Generation des dimensional Drucks hervorgebracht, welche 4D-Druck genannt wird (Khorsandi *et al.*, 2021). Es handelt sich dabei um den Druck von Materialien mit Formgedächtnis. Der 4D-Druck ist somit eine Kombination des 3D-Drucks und der Zeit; ein solch gedrucktes Bio-Objekt ist in der Lage, seine Form durch externe Stimuli zu verändern und sich der Umgebung anzupassen (Lee *et al.*, 2017). Im zahnmedizinischen Bereich kann dies einen interessanten Aspekt darstellen. Beispielsweise ändert sich der Sitz von Brückenzwischengliedern durch die sich wandelnden umgebenden Hart- und Weichgewebe; die Anwendung von Polymeren mit Selbstanpassungsfähigkeiten könnte hierbei die Entstehung von Komplikationen vermeiden (Khorsandi *et al.*, 2021).

## **5. Zielsetzung**

Durch die Verarbeitung mit Hilfe eines additiven 3D-Drucks waren Änderungen der Zusammensetzung der verwendeten Kunststoffe nötig, welche insbesondere den Einsatz von neuen Monomeren umfassen. Alle methacrylat-basierten Kunststoffe zeigen einen gewissen Einfluss auf eukaryontische Zellen und beeinflussen deren Stoffwechsel. Da in den letzten Jahren eine rasante Verbreitung dieser Technologie zu beobachten war und eine flächendeckende Verwendung solcher Systeme zu erwarten ist, besteht größtes Interesse, die hier verwendeten Materialien im Vergleich zu bereits langjährig etablierten Materialien hinsichtlich ihrer Biokompatibilität zu untersuchen.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung eines möglichen Einflusses von 3D-druckbaren Materialien auf orale Zellen. Dies ist von größter Wichtigkeit im Hinblick auf eine Ausweitung des Einsatzes dieser Materialien in der Zahnheilkunde. Zudem sind diese Untersuchungen vor geplanten klinischen Studien unabdingbar.

## **6. Material und Methoden**

### **6.1. Allgemeine Zellkultur**

Um mit den dentalen Materialien Versuche bezüglich ihrer Biokompatibilität durchführen zu können, mussten zunächst Zellen gezüchtet werden. Zur Simulation eines humanen oralen Milieus, dem die genannten Materialien ausgesetzt sind, wurden humane gingivale Fibroblasten (HGF1) kultiviert. Es handelt sich hierbei um Zellen, welche per Zahnfleischbiopsie gewonnen wurden. Die Zellen wurden über die Firma LGC (Teddington, Großbritannien) bezogen.

Die Lagerung der Fibroblasten erfolgte durch langsames Einfrieren auf  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff. Bei dieser Temperatur treten keine chemischen Reaktionen mehr auf, da unter anderem nicht genügend Wärmeenergie vorhanden ist; die Zellen sind demnach effizient vor Alterung geschützt (Mazur, 1984). Um eine Kristallbildung zu vermeiden, welche zu einer irreversiblen Schädigung führen würde, wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) (Roth, Karlsruhe, Deutschland) als Frostschutzmittel eingesetzt.

#### **6.1.1. Zellkultivierung**

Generell gilt, dass jede Art der Kontamination oder Kreuzreaktion vermieden werden muss. Um dies zu gewährleisten, wurden strengste Hygienemaßnahmen eingehalten und alle aseptischen Arbeitsschritte in einer Laminar Flow, einer sterilen Werkbank der Klasse II (Safe 2020; Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika), durchgeführt. Vor jedem Kontakt eines aseptischen Gegenstandes mit der Werkbank, wie beispielsweise eine Kulturmediumflasche oder ein Zellkulturkolben, wurde dieser mit 70%igem Ethanol desinfiziert.

Bei humanen gingivalen Fibroblasten handelt es sich um adhärente Zellen. Es kamen sterile unbeschichtete Kulturflaschen aus Polystyrol (cellstar cell culture flasks; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) mit einem Volumen von 250 ml, einer Kulturfläche von  $75\text{ cm}^2$  und einem Schraubverschluss für einen idealen, kontaminationssicheren  $\text{CO}_2$ -Austausch zum Einsatz.

Es wurde „DMEM (1X) + GlutaMAX-I“ (Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium; gibco, life technologies, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika) als Zellkulturmedium verwendet. Dem Medium wurden 10%iges fetales Kälberserum (FBS Superior; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika) für die notwendigen Wachstumsfaktoren und die Antibiotika-Kombination Penicillin-Streptomycin (100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika) hinzugefügt. Die Lagerung des Mediums erfolgte bei circa 5°C. Vor jedem Kontakt mit Zellen wurde das Kulturmedium zuerst im Wasserbad auf Raumtemperatur angewärmt.

Für die Einsaat wurden die gefrorenen Zellen zunächst ebenfalls in einem circa 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Es erfolgte eine Dekontamination der Fläschchen-Oberfläche mit 70%igem Ethanol. Um eine Einsaatdichte von etwa 10.000 - 20.000 Zellen/cm<sup>2</sup> zu erhalten, wurden circa 500.000 Zellen auf 19 ml Kulturmedium pro Kulturkolben gegeben.

Für die Zellkultur kam ein Brutschrank (Heracell 150i, CO<sub>2</sub> Inkubator; Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika) zum Einsatz. Dieser gewährleistet neben einer Temperaturkonstanz von 37°C zusätzlich eine 100%ige relative Luftfeuchtigkeit und eine kontinuierliche CO<sub>2</sub>-Zufuhr (5%) zur Konstanthaltung des pH-Wertes. Nach dem Einsäen der Zellen wurde die Kulturflasche 24 Stunden im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 40C; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) auf eine mögliche bakterielle Kontamination untersucht.

### **6.1.2. Mediumwechsel**

Für eine erfolgreiche Zellzucht mit ausreichend Zellwachstum und -vitalität war ein regelmäßiger Mediumwechsel, ungefähr alle drei Tage, aufgrund des Sinkens der Nährstoffkonzentration notwendig. Dafür wurde das alte Medium mit Hilfe einer Vakuumpumpe (ILMVAC, Ilmenau, Deutschland), möglichst ohne Verletzung der adhärennten Zellschicht auf dem Flaschenboden, vollständig in der sterilen Werkbank abgesaugt und 20 ml neues, auf 37°C angewärmtes

Kulturmedium mit einer serologischen Pipettierhilfe (Easypet 3; Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland) in die Kulturflasche hinzugefügt.

### **6.1.3. Subkultivierung der Zellen**

Sobald eine Konfluenz der Zellen von 80%, welche visuell mittels Mikroskop detektiert wurde, erreicht war, mussten eine Zellkulturpassage und ein Subkultivieren sowohl aufgrund der Anhäufung von Stoffwechselendprodukten, welche zu einer Änderung des pH-Wertes und des Redoxstatus der Zellen führen können, als auch aufgrund der eintretenden Kontaktinhibition durchgeführt werden. Dies bedeutet, dass die Zellen aus dem Monolayer gelöst und nach Verdünnung in neue Kulturflaschen ausgesät werden.

Im Zuge dieser Arbeit wurde für die Zellkulturpassage eine Trypsin-EDTA-Lösung (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA; PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland) verwendet. Trypsin ist eine Pankreasprotease (Endopeptidase), welche Peptidbindungen spaltet und somit die Zell-Matrix-Bindung löst, so dass die Zellen nicht mehr an der Kulturunterlage anhaften. EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator und löst somit die Zell-Zell-Verbindungen.

Nach Absaugen des verbrauchten Mediums mittels einer Vakuumpumpe wurden zunächst pro Flasche 5 ml PBS-Lösung (phosphatgepufferte Kochsalzlösung; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika) zum Vorwaschen eingesetzt, um mögliche Serumreste zu entfernen, welche die Enzymwirkung von Trypsin inhibieren würden. Das Passagieren erfolgte anschließend mit Hilfe von 2 ml Trypsin-EDTA pro Kulturflasche und einer Inkubation im Brutschrank für 2-3 min. Nach einer visuellen Kontrolle unter dem Mikroskop auf eine erfolgreiche Zelllösung, welche sich durch frei im Medium schwimmende, abgerundete Zellen abzeichnet, wurden die Zellen in ein mit 3 ml Medium gefülltes Falcon (cellstar tubes; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) überführt, damit das in dem Medium enthaltene Kälberserum die Wirkung von Trypsin stoppt. Darauf folgend wurde das Gemisch für 5 min bei 300 g zentrifugiert (Allegra X-15R; Beckman Coulter,

Pasadena, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika), damit die Zellen von der Trypsin-Medium-Lösung getrennt werden. Es erfolgte ein Absaugen des Überstands mit Hilfe der Vakuumpumpe, so dass ein Zellpellet zurückblieb, welches daraufhin in 1 ml Medium resuspendiert wurde.

Zum Splitten der Zellen im Verhältnis 1:4 wurden 3 ml Medium zu den resuspendierten Zellen hinzupipettiert und davon 1 ml zu je einer neuen Kulturflasche gegeben. Anschließend wurden erneut 19 ml frisches Medium pro Kulturkolben hinzugefügt. Es erfolgte eine Inkubation der Zellen im Brutschrank sowie ein Mediumwechsel alle drei Tage, bis ein erneutes Passagieren der Zellen notwendig war.

#### **6.1.4. Bestimmung der Zellzahl**

Zur Vorbereitung der Zellen für einen Versuch wurden die Schritte des Passagierens bis zur Resuspension des Zellpellets in 1 ml Medium durchgeführt.

Danach wurde die Zellzahl im Zellanalysator (Cedex XS; Roche Diagnostics, Basel, Schweiz) bestimmt. Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension auf eine Seite einer Zell-Zählplatte (ibidi, Gräfelfing, Deutschland) und 10 µl einer 0,4%igen Trypan-Blau-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika) auf die gegenüberliegende Seite der Zell-Zählplatte mittels mechanischer Pipette hinzugegeben (Eppendorf Research; Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland). Nach erfolgtem Weißabgleich des Geräts (ohne Einschieben der Zählplatte) wurde die Zählplatte eingelegt und die Zellzahl je Milliliter berechnet.

Demnach konnte der Zellsuspension die entsprechende Menge an Kulturmedium bis zur gewünschten Zellzahl je nach Assay beigefügt werden.

## 6.2. Materialwahl

Zur Überprüfung der Biokompatibilität von 3D-Druckmaterialien wurden neun verschiedene zahnmedizinische direkte und indirekte Restaurationsmaterialien Versuchen unterzogen und miteinander verglichen.

Zunächst wurde unterschieden zwischen Materialien, die der definitiven Zahnversorgung dienen, und solchen, die lediglich für eine temporäre Arbeit vorgesehen sind. In diesen beiden Gruppen gab es jeweils Vertreter von konventionell, CAD/CAM- und additiv gefertigten Materialien, um gegebenenfalls Unterschiede bezüglich der verschiedenen Herstellungsverfahren zu erkennen.

Es handelte sich bei allen Materialien, wie bereits erwähnt, um Polymethacrylate, somit um Acrylharze. Insgesamt wurden zwei konventionell hergestellte Werkstoffe, zwei mittels CAD/CAM-Verfahren gefräste sowie fünf additiv gedruckte Restaurationsmaterialien untersucht.

Dabei wurde darauf geachtet, Materialien unterschiedlicher Hersteller zu wählen, um einen ausreichenden Vergleich zu gewährleisten, sowie in der Praxis übliche Materialien zu verwenden. Die LOT-Nummern der einzelnen Werkstoffe können dem Anhang entnommen werden.

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über die dentalen Restaurationsmaterialien, welche im Zusammenhang dieser Studie auf ihre Biokompatibilität untersucht wurden.

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Herstellungsverfahren</b>
Tetric Evo Ceram	Ivoclar Vivadent	TEC	konventionell/definitiv
Tetric CAD	Ivoclar Vivadent	TC	CAD/CAM/definitiv
Varseo Smile Crown+	BEGO	VSC	3D-Druck/definitiv
NextDent C&B (MFH)	NextDent	ND	3D-Druck/definitiv
Protemp IV	3M ESPE	PT	konventionell/provisorisch
Telio CAD	Ivoclar Vivadent	TEL	CAD/CAM/provisorisch
Varseo Smile Temp	BEGO	VST	3D-Druck provisorisch
TEMP Print	GC	TP	3D-Druck provisorisch
P pro Krone und Brücke	Straumann	P	3D-Druck provisorisch

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Materialien

Für jedes Material wurden das entsprechende Sicherheitsdatenblatt sowie die Gebrauchsanweisung vom jeweiligen Hersteller bezogen, auf welchen die folgenden Informationen zu den einzelnen Werkstoffen beruhen.

Bei dem Restaurationsmaterial „Tetric Evo Ceram“ (TEC) der Firma Ivoclar Vivadent (Schaan, Liechtenstein) handelt es sich um ein handelsübliches lichthärtendes Nanohybrid-Komposit für die direkte Füllungstherapie im Front- und Seitenzahnbereich (Ivoclar-Vivadent, 2017c). Im Rahmen dieser Arbeit kamen 0,2-g-Kartuschen der Farbe A2 zum Einsatz. Der Werkstoff „Tetric CAD“, ebenfalls von der Firma Ivoclar Vivadent (Schaan, Liechtenstein), ist ein

Komposit-Block für indirekte Einzelzahnrestorationen mittels subtraktiven CAD/CAM-Verfahrens (Ivoclar-Vivadent, 2017b). Es wurden in dieser Studie Blöcke der Farbe A2 und der Größe C14 betrachtet. „VarseoSmile Crown“ von der Firma BEGO (Bremen, Deutschland) ist ein lichthärtender, fließfähiger Kunststoff auf der Basis von Methacrylsäureestern zur additiven Herstellung von definitiven Einzelkronen, Inlays, Onlays und Veneers (BEGO, 2019a). Bei „NextDent C&B (MFH)“ der Firma NextDent (Soesterberg, Niederlande) handelt es sich ebenfalls um ein 3D-Druck-Material auf Basis von Acrylestern zur Fertigung von Kronen und Brücken (NextDent, 2016). „Protemp IV“ ist ein temporäres Kronen- und Brückenmaterial von dem Hersteller 3M ESPE (Saint Paul, Minnesota, Vereinigte Staaten von Amerika). Es handelt sich um ein Zweikomponentensystem mit füllungsähnlichen Eigenschaften (3M-ESPE, 2012). Zur Erstellung der Probekörper kamen 67-g-Kartuschen der Farbe A2 zum Einsatz. Das CAD/CAM-Material „Telio CAD“ der Firma Ivoclar Vivadent (Schaan, Liechtenstein) stellt vernetzte PMMA-Scheiben für die Herstellung von Langzeitprovisorien dar (Ivoclar-Vivadent, 2017a). Es kam im Rahmen dieser Studie eine 20 mm starke Scheibe der Farbe A2 zum Einsatz. Bei dem additiv hergestellten Restaurationsmaterial „VarseoSmile Temp“ der Firma BEGO (Bremen, Deutschland) handelt es sich um einen lichthärtenden, fließfähigen Kunststoff auf der Basis von Methacrylsäureestern zur Herstellung von provisorischen Kronen, Brücken, Inlays, Onlays sowie Veneers (BEGO, 2019b). „P pro Crown & Bridge“ ist wiederum ein lichthärtendes Kompositmaterial für die Fertigung temporärer Front- und Seitenzahnrestorationen mittels 3D-Druck-Verfahren und wird von der Firma Straumann (Basel, Schweiz) vermarktet (Straumann, 2020). Bei zuletzt genanntem Material „Temp Print“ des Herstellers GC EUROPE N.V. (Leuven, Belgien) handelt es sich gleichfalls um ein druckfähiges lichthärtendes Komposit für provisorische Kronen und Brücken (GC-EUROPE-N.V, 2020).

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung der jeweiligen Materialien anhand der veröffentlichten Sicherheitsdatenblätter sowie, falls vorhanden, vom Hersteller bereitgestellte wissenschaftliche Dokumentationen.

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung laut Hersteller</b>	<b>Gew.-%</b>
<b>Tetric Evo</b>	BisGMA, UDMA, BisEMA	16,8
<b>Ceram</b>	Bariumglasfüller, Ytterbiumtrifluorid, Mischoxide	48,5
	Präpolymere	34,0
	Additive	0,4
	Katalysatoren, Stabilisatoren	0,3
	Pigmente	< 0,1
<b>Tetric CAD</b>	BisGMA, BisEMA, TEGDMA, UDMA	28,4
	Bariumglasfüller	64,0
	Siliciumdioxid	7,1
	Additive, Pigmente	0,5
<b>Varseo</b>	Veresterungsprodukte von 4,4'-Isopropylidendi-	≥ 50 - < 75
<b>Smile</b>	phenol, ethoxyliert und 2-Methylprop-2-ensäure	
<b>Crown +</b>	Diphenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinoxid	< 2,5
	silanisiertes Dentalglas	
	Methylbenzoylformiat	
	anorganische Füllstoffe	30 - 50
<b>NextDent</b>	UDMA, HEMA	> 60
<b>C&amp;B (MFH)</b>	Ethylendimethacrylat	15 - 25
	Diphenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinoxid	< 2,5
<b>Protemp IV</b>	<b>Basis Paste</b>	
	Dimethacrylat (BIS-MEPP)	45 - 55
	modifizierte Kieselsäure	20 - 30

	methacryliertes Polyurethan	10 - 15
	silanisierte Kieselsäure	5 - 10
	<b>Katalysator Paste</b>	
	2,2'-[(1-Methylethyliden)bis(4,1-phenylenoxy)]	70 - 80
	bisethyldiacetat	
	1-Benzyl-5-phenylbarbitursäure	5 - 15
	Kieselsäure	5 - 15
	(1-Methylethyliden)bis(4,1-phenylenoxy-2,1-ethanediyl)(1-phenylenoxy-2,2'ethoxyethanediyl)	1 - 10
	bisacetate	
	t-Butylperoxy-3,5,5-trimethylhexanoat	< 0,4
<b>Telio CAD</b>	PMMA	99,5
	Pigmente	< 1,0
<b>Varseo</b>	Veresterungsprodukte von 4,4-Isopropyliden-	≥ 50 - < 75
<b>Smile Temp</b>	diphenol, ethoxyliert und 2-Methylprop-2-ensäure	
	Diphenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinoxid	< 2,5
<b>TEMP Print</b>	UDMA	50 - < 70
	Quarz	10 - < 25
	TEGDMA	10 - < 25
	Erzeugnisse der Esterifizierung von 4,4'-Iso-	2,5 - < 5
	propylidenediphenol, ethoxylierte und 2-	
	Methylprop-2-Enolsäure	
	Diphenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinoxid	1,0 - < 2,5
	2-(2H-Benzotriazol-2-yl)-p-kresol	0,1 - < 0,2

<b>P pro</b>	acrylic resin	20 - 40
<b>Krone und Brücke</b>	UDMA	< 25
	acrylic resin	< 10
	2,2-Bis(acryloyloxymethyl)butyl acrylate; trimethylolpropane triacrylate	< 1,0
	Diphenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphine oxide (TPO)	< 1,0

Tabelle 2: Zusammensetzung Materialien laut Hersteller

### 6.3. Herstellung der Probekörper

Zunächst wurden von jedem der oben genannten Materialien fünf Probekörper pro Versuchsdurchlauf mit einer runden Fläche von 162,84 mm<sup>2</sup> und einer Schichtstärke von circa 1 mm hergestellt.

Im Folgenden werden die Herstellungsprozesse und Nachbearbeitung der Plättchen je nach verwendetem Material kurz skizziert. Es wurden bei der Fertigung die Gebrauchsanweisungen des jeweiligen Herstellers berücksichtigt.

Bei dem konventionellen Material „Tetric Evo Ceram“ wurden zur Herstellung eines Plättchens drei Kartuschen (0,2 g) benötigt. Das Material wurde in eine Silikonform, bestehend aus Optosil (Kulzer, Hanau, Deutschland), mit kreisrunden Vertiefungen mit je einem Durchmesser von 7,2 mm in einem Inkrement geschichtet und von beiden Seiten jeweils für 20 s mittels einer 470 nm-LED-Polymerisationslampe (Bluephase Style, 10 mm Lichtleiter, 1.000 mW/cm<sup>2</sup>; Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) lichtgehärtet. Die Politur erfolgte per Handstück mit einem Silikonpolierer (Acurata, Thurmansbang, Deutschland). Zur Erstellung von Probekörpern des Provisoriummaterials „Protemp IV“ wurde ebenfalls die Silikonform herangezogen. Hierbei handelt es sich um einen zwei-phasigen Werkstoff in Doppelmischkartuschen (67 g). Das Material wurde in die Silikonform aus Optosil appliziert und für den Erhalt einer glatten Oberfläche mit einer Kunststoff-Petrischale abgedeckt. Die Mischkanüle

wurde nach Herstellung von zwei Probekörpern erneuert und vor jeder Applikation wurde eine kleine Materialmenge verworfen. Die Entnahme der Plättchen aus der Silikonform erfolgte nach dem vom Hersteller empfohlenen Zeitraum von circa 1 min 40 s in der hart-elastischen Phase des Werkstoffs. 5 min nach Mischbeginn wurde die durch den Luftsauerstoff entstandene Schmierschicht mit 96% Ethanol entfernt. Nachfolgend erfolgte eine Politur mittels Bimsstein und Ziegenhaarbürstchen sowie Polierpaste (Universal Polishing Paste; Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) am Poliermotor.

Die CAD/CAM-Blöcke (Größe C14) des Materials „Tetric CAD“ wurden mit einer Diamantscheibe (Vari Cut VC-50; Leco Corporation, St. Joesph, Michigan, Vereinigte Staaten von Amerika) unter Wasserkühlung in circa 2 mm dicke, rechteckige Plättchen geschnitten, wobei das äußere Ende verworfen wurde. Die Politur erfolgte mittels Bimsstein und Ziegenhaarbürstchen sowie Polierpaste und Wollschwabbel am Poliermotor. Der CAD/CAM-Werkstoff „Telio-CAD“ liegt in Form einer Ronde vor. Zunächst wurden mittels CAD/CAM-Maschine (Tizian Cut 5.2; Schütz Dental, Rosbach, Deutschland) im Dentallabor „Dentaltechnik Kollmuß GmbH“ mehrere Zylinder mit jeweils einem Durchmesser von 15 mm und einer Höhe von 18 mm aus der Ronde gefräst. Die Zylinder wurden ebenfalls mit der Diamantscheibe unter Wasserkühlung in circa 2 mm dicke Plättchen geschnitten. Diese wurden unter Zuhilfenahme von Bimsstein und Ziegenhaarbürstchen sowie von Polierpaste und Wollschwabbel am Poliermotor auf Hochglanz poliert.

Die Probekörper der 3D-Druck-Materialien „Varseo Smile Crown +“ sowie „Varseo Smile Temp“ wurden in der Prothetik-Abteilung der Zahnklinik LMU München mit Hilfe des 3D-Druckers „Varseo XS“ (BEGO, Bremen, Deutschland) gefertigt. Es handelt sich hierbei um einen speziell auf BEGO-Materialien ausgelegten DLP-3D-Drucker (Digitale Lichtprojektion). Die Objekte ruhten 24 Stunden nach dem Druck. Anschließend wurden die Druckobjekte zur Reinigung 3 min in 80%igen Ethanol eingelegt. Diese Prozedur wurde nach 2 min wiederholt. Nach Abstrahlen in einem Sandstrahlgerät (P-G 400; Harnisch + Rieth, Winterbach, Deutschland) mit Glanzperlen (50 µm, 0,9 bar) wurden die

Plättchen in einem UV-Lichtblitzgerät (Otoflash G171 Polymerisationsgerät; NK-Optik, Baierbrunn, Deutschland) zweimal mit jeweils 1.500 Blitzten erneut lichtgehärtet.



Abbildung 5: Otoflash G171 UV-Blitzlichtgerät, Zahnklinik LMU München

Im Anschluss daran erfolgte eine Politur mittels Bimsstein und Ziegenhaarbürstchen sowie Polierpaste und Wollschwabbel am Poliermotor. Plättchen der 3D-Druck-Materialien „NextDent C&B (MFH)“, „TEMP Print“ sowie „P pro Krone und Brücke“ wurden im Dentallabor „Dentaltechnik Kollmuß GmbH“ unter Berücksichtigung der Gebrauchsanweisung mit Hilfe des 3D-Druckers „Straumann CARES P series P30+“ (Straumann, Basel, Schweiz) gedruckt. Dieser weist ebenfalls das DLP-Druckverfahren auf. Die Objekte ruhten 24 Stunden nach dem Druck vor einer weiteren Bearbeitung. Eine abschließende Politur erfolgte erneut am Poliermotor.

#### **6.4. Herstellung der Eluate**

Vor dem Einlegen der Plättchen wurden diese gereinigt, indem sie abgedampft, für wenige Minuten in 80%igen Ethanol eingelegt und für 5 min in ein Ultraschallbad (Sonorex RK 31; Bandelin, Berlin, Deutschland) gegeben wurden. Es wurden jeweils fünf Plättchen eines Materials in 5 ml Medium („DMEM (1X) + GlutaMAX-I“; 10% FBS; 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml

Streptomycin) für eine siebentägige Inkubation im Brutschrank bei 37°C eingelegt. Hierfür wurde eine sterile, unbehandelte 6-Well-Platte (cellstar cell culture plate; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) verwendet. Die Plättchen wurden vollständig mit Medium bedeckt. Es wurde darauf geachtet, dass das Einlegen der Probekörper innerhalb von 24 Stunden nach Fertigung der Probekörper erfolgte und dass die resultierenden Eluate nicht länger als vier Wochen aufbewahrt wurden.

Während der siebentägigen Inkubation im Brutschrank konnten potentiell schädliche Stoffe aus den Probekörpern austreten und in das Nährmedium übergehen, so dass bei einer späteren Zellkultivierung in ebendiesen Eluaten mögliche Auswirkungen der Materialien auf die Zellen detektiert werden konnten.

Nach erfolgter Inkubation wurde das Nährmedium unter Zuhilfenahme einer stumpfen Kanüle mit einer 5 ml-Einmalspritze aus den Vertiefungen aufgenommen. Es erfolgte eine Probenfiltration unter Verwendung eines Membranfilters (Sterile Syringe Filter, 2 µm Celluloseacetat-Membran; VWR, Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten von Amerika). Dazu wurden die Eluate mit Hilfe der Spritze aufgezogen, der Filter an der Spritzenöffnung befestigt und das Medium durch den Filter gepresst.

Das Filtrat wurde in Falcons abgefüllt. Dabei wurden die berechneten Aliquot-Volumina der Eluate für die jeweiligen Versuche berücksichtigt.

Die gefilterten Eluate wurden anschließend bei -80°C bis zum Versuchsdurchlauf für maximal vier Wochen eingefroren.

## **6.5. Spezielle Methoden**

Zur Untersuchung des Materialeinflusses auf den Zellstoffwechsel wurden Assays zur Detektion der Zytotoxizität, der Einleitung der Apoptose und des Einflusses auf die Entzündungsregulation durchgeführt. Die Wahl fiel auf folgende Versuche:

1. Colorimetric Cell Viability Kit I (WST-8); PromoKine
2. Caspase-Glo 3/7-Assay; Promega
3. ELISA-Human IL-6 Immunoassay; R&D Systems

### 6.5.1. Zytotoxizitätsuntersuchung mittels WST-8-Assay

Bei dem WST-8-Test (Colorimetric Cell Viability Kit I; PromoKine, Heidelberg, Deutschland) handelt es sich um einen Vitalitätstest. Das Prinzip basiert auf der Bestimmung der Anzahl der lebensfähigen Zellen anhand ihrer Stoffwechselaktivität durch Quantifizierung der Reduktionsäquivalente mit Hilfe eines Farbstoffes. Bei dem kolorimetrischen Assay wird das schwach gelbe Tetrazoliumsalz WST-8 (water soluble tetrazolium salt-8; 2-(2-Methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-Disulfophenyl)-2H-Tetrazolium, Mononatriumsalz) durch mitochondriale Dehydrogenasen mit Hilfe eines Elektronentransporters (1-Methoxy PMS; 1-Methoxy-5-methylphenazinium-methyl-sulfat) zu einem orangefarbenen Formazan-Produkt bio reduziert; die Menge des produzierten Formazans ist dabei direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen und kann photometrisch quantifiziert werden (PromoKine, 2016).

Folgende Abbildung veranschaulicht den Reaktionsmechanismus.

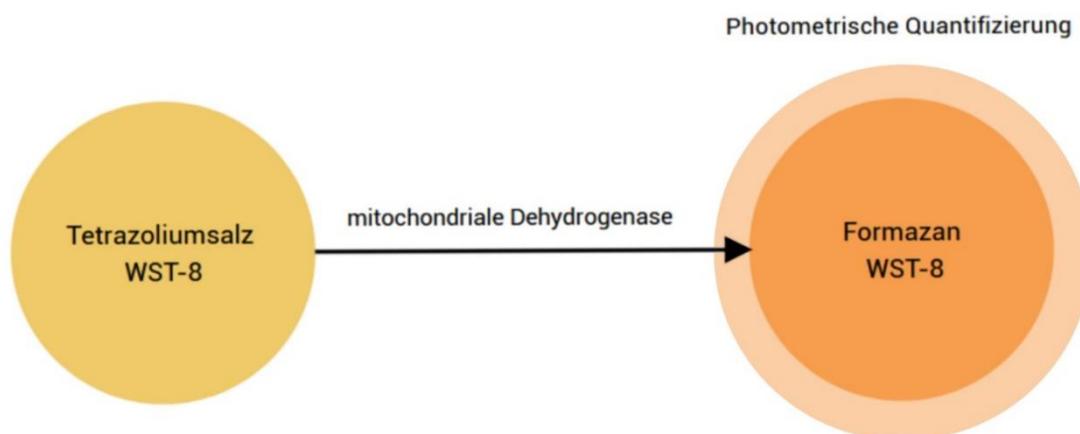


Abbildung 6: WST8-Assay-Mechanismus

Wichtig ist hierbei, dass nur die Stoffwechselaktivität als Parameter zur Detektion der Vitalität bei diesem Assay verwendet wird. Somit ist es durchaus möglich, dass vitale, aber nicht-stoffwechselaktive Zellen fälschlicherweise als nicht-lebensfähig durch diesen Test quantifiziert wurden.

Zur Durchführung des WST-8-Tests wurden am Vortag die Zellen mit einer Zellzahl von 30.000 Zellen/ml in die Wells einer 96er-Well-Platte (200 µl pro Vertiefung; cellstar cell culture plate; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät. Um die gewünschte Zellanzahl zu erreichen, wurden die Zellen zunächst mit Hilfe der Trypsin-EDTA-Lösung in Suspension gebracht und mittels des Zellanalysators (Cedex XS) gezählt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Zellkulturmedium („DMEM (1X) + GlutaMAX-I“; 10% FBS; 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) bis zur gewünschten Zellanzahl verdünnt. Die mit Zellen besetzte 96er-Well-Platte wurde daraufhin, mit einem Deckel abgedeckt, für circa 18 bis 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Am ersten Versuchstag wurden, nach Auftauen der Eluate, die Testsubstanzen (Eluate und Kontrollen) nach einem zuvor festgelegten Pipettierschema hinzugegeben. Es wurden je Well 100 µl Eluat pipettiert. Als Positivkontrolle wurden pro Well 100 µl Triton-X-100 (TTX100; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika) in einer 1%-Lösung eingesetzt. Triton-X-100 ist ein nicht-ionisches Tensid, welches unter anderem zur Zellyse führt. Zur Herstellung der 1%-Lösung wurden zunächst 100 µl Triton X-100 mit 10 ml Medium vermischt. Ausschließlich das Hinzupipettieren von 100 µl Zellkulturmedium diente als Negativkontrolle. Bei der Zugabe der Substanzen wurde darauf geachtet, dass immer nur in einem bestimmten Abschnitt der Wells das Medium zunächst abgesaugt wurde und dann die Testsubstanzen hinzugegeben wurden, damit die Zellen nicht austrockneten. Nach Hinzufügen der Eluate und der Kontrollsubstanzen wurde die Well-Platte auf einem Orbitalrüttler (MS1 Minishaker; IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland) auf niedrigster Stufe für 30 Sekunden sanft geschwenkt, damit sich die Testsubstanzen gut verteilen. Darauffolgend wurde die Well-Platte für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Das CCVK-1 (Colorimetric Cell Viability Kit I, PromoKine) wurde, nach erfolgtem Auftauen, am zweiten Versuchstag zunächst im Verhältnis 1:10 verdünnt. Zu diesem Zweck wurden 700 µl CCVK-1 (pur) zu 6.300 µl Zellkulturmedium hinzugegeben. Nach abschnittweisem Absaugen der Eluate und Testsubstanzen, um ein Austrocknen zu vermeiden, wurden jedem Well 100 µl CCVK-1 in verdünnter Form hinzugegeben. Zusätzlich wurden in drei Wells ausschließlich 100 µl verdünntes CCVK-1 hinzugefügt, um bei der Auswertung der Ergebnisse die Hintergrundaktivität des Mediums ohne Zellen messen zu können. Nach Zugabe der CCVK-1-Verdünnung in jede Vertiefung wurde die Platte im Brutschrank inkubiert. Die optische Dichte wurde nach einer, nach zwei und nach drei Stunden bei 450 nm im Spektrophotometer (Varioskan; Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika) gemessen.

### **6.5.2. Untersuchung der Apoptoseinduktion mittels Caspase-Assay**

Das Caspase-Glo 3/7-Assay (Promega, Madison, Wisconsin, Vereinigte Staaten von Amerika) dient zum Nachweis der Apoptoseinduktion anhand der Messung der Caspase-3- und Caspase-7-Aktivitäten. Diese beiden Effektor-Caspasen spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Apoptose. Sie sind in der Lage, Zielproteine zu schneiden und demnach den Zelltod herbeizuführen (Kumar, 2007). Grundsatz des Assays ist, dass die Zugabe der Caspase-Glo-3/7-Reagenz mit enthaltener Tetrapeptidsequenz DEVD (Aminosäuresequenz; Asparaginsäure – Glutaminsäure – Valin – Asparaginsäure) zu einer Zellyse, einer anschließenden Spaltung des Caspase-Glo-3/7-Substrats durch eventuell vorhandene Caspasen-3 bzw. -7 und zu einer Erzeugung eines lumineszierenden Signals durch eine thermostabile Luciferase (Ultra-Glo Recombinant Luciferase) führt; die Lumineszenz ist somit direkt proportional zu der Caspasenaktivität (Promega-Corporation, 2019). Das schematische Protokoll des Caspase-Glo 3/7-Assays kann Abbildung 7 entnommen werden.

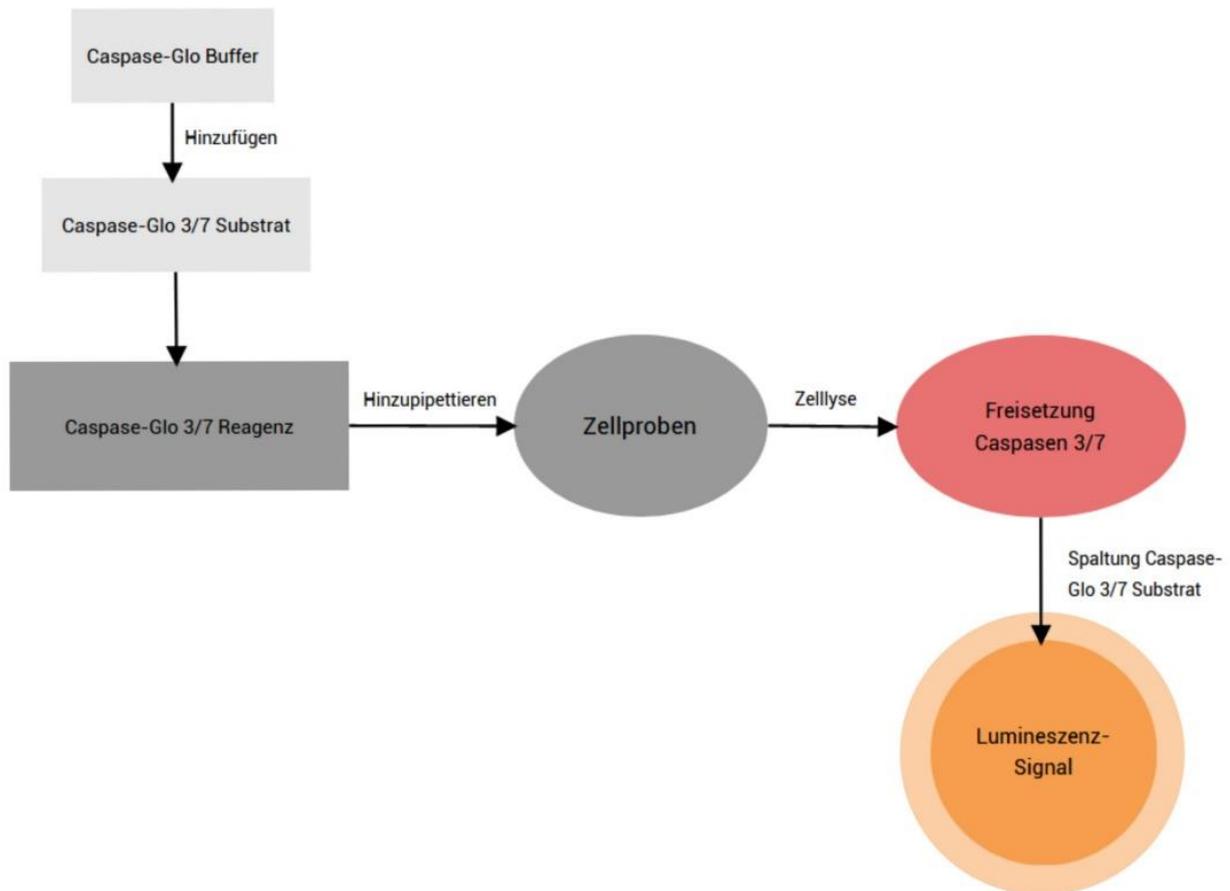


Abbildung 7: schematisches Protokoll des Caspase-Assays

Für das Caspase-Glo 3/7-Assay wurden am Vortag zunächst Zellen in jeweils drei weiß-wandige 96er-Well-Platten nach einem zuvor festgelegten Pipettierschema mit einer Zellanzahl von 75.000 Zellen/ml und 200 µl pro Well ausgesät. Um die gewünschte Zellzahl zu erhalten, wurden die Zellen mit Hilfe des Zellanalysators (Cedex XS) gezählt, die Zellanzahl pro Milliliter bestimmt und die Zellsuspension dementsprechend verdünnt. Die Platten wurden darauffolgend für circa 18 bis 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Nach Auftauen der Eluate wurde am ersten Versuchstag zunächst Staurosporin (abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich), welches als Positivkontrolle zum Einsatz kam, vorbereitet. Hierzu wurde 1 µl der 1 mM-Lösung in 1.000 µl Zellkulturmedium („DMEM (1X) + GlutaMAX-I“; 10% FBS; 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) gelöst. Staurosporin ist ein Inhibitor von Proteinkinasen und kann Apoptose durch Caspase-3-ähnliche Proteasen

auslösen (Chae *et al.*, 2000). Als Negativkontrolle diente lediglich das Zellkulturmedium. Nach zuvor vollständig erfolgtem Absaugen der Wells, wurde jedes Eluat mit je 100 µl pro Well in drei Vertiefungen nach einem Pipettierschema hinzugegeben. Staurosporin und das Medium wurden insgesamt je neunmal hinzugefügt mit ebenfalls je 100 µl pro Well. Anschließend wurden die Platten für circa 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Am zweiten Versuchstag wurde zuerst das Caspase-Glo-3/7-Reagenz hergestellt. Hierfür wurde Caspase-Glo-3/7-Buffer in die Flasche mit Caspase-Glo-3/7-Substrat überführt. Zuvor wurden beide Substanzen zunächst im Wasserbad auf Raumtemperatur gebracht. Daraufhin wurden in jedes belegte Well 100 µl des hergestellten Caspase-Glo-3/7-Reagenzes der drei 96er-Well-Platten pipettiert. Nach sanftem Schwenken der Well-Platten für 30 Sekunden auf dem Orbitalrüttler (niedrigste Stufe) wurden die Platten für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert, da ein Spitzen-Lumineszenzsignal laut Hersteller nach ein bis zwei Stunden zu erwarten sei. Die Lumineszenz-Messung erfolgte per QuickRead im Mikroplattenlesegerät (GloMax Discover; Promega, Madison, Wisconsin, Vereinigte Staaten von Amerika) über einen Zeitraum von zwei Stunden in 30-minütigem Abstand.

### **6.5.3. Untersuchung der Entzündungsinduktion mittels ELISA auf IL-6**

Mit dem ELISA-Human IL-6 Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, Vereinigte Staaten von Amerika) kann das Interleukin-6 (IL-6) in zuvor hergestellten Zellkultur-Überstandsproben nachgewiesen werden. Da es sich bei Interleukin-6 um ein pleiotropes, alpha-helikales Zytokin handelt, welches unter anderem eine wichtige Rolle bei der Akute-Phase-Reaktion spielt und ferner zusammen mit TNF-alpha und IL-1 die akute Entzündungsreaktion antreibt (R&D-Systems, 2018), kann dieser Versuch zum Nachweis einer möglicherweise durch die untersuchten Materialien hervorgerufenen Entzündungsreaktion herangezogen werden.

ELISA steht für „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“. Dieses ermöglicht es, die Menge eines bestimmten Proteins in einer komplexen Probe zu

quantifizieren; es gibt eine Vielzahl von ELISA-Methoden; bei dem hier verwendeten „Sandwich-Prinzip“ wird zunächst ein Antikörper, welcher komplementär zu dem des nachzuweisenden Antigens ist, auf eine Mikrotiterplatte gegeben; anschließend wird die zu untersuchende Probe hinzugefügt; das in der Probe enthaltene Antigen bindet den Antikörper; nach Abwaschen von nichtgebundenen Proteinen kann sich an den gebildeten Antikörper-Antigen-Komplex ein zweiter enzymgekoppelter Antikörper binden; nach erneutem Waschdurchgang wird ein Substrat hinzugegeben, welches von dem Enzym des zweiten Antikörpers unter Farbentwicklung umgewandelt wird; über die photometrische Quantifizierung der Farbentwicklung kann somit die Antigenkonzentration in der zu untersuchenden Probe nachgewiesen werden (Grange *et al.*, 2014).

Das ELISA-Human IL-6 Immunoassay basiert dabei auf von *Escherichia coli* exprimierten rekombinanten, humanen IL-6 und Antikörpern, welche gegen das rekombinante Protein gebildet wurden (R&D-Systems, 2018).

Der Versuch ist geteilt in die Arbeitsschritte der Herstellung der Testsubstanzen (Zellkulturüberstandsproben) sowie der späteren Durchführung des eigentlichen ELISA.

Zur Herstellung der Testsubstanzen wurden Zellen mit einer gewünschten Zellanzahl von 300.000 Zellen/ml mit je 2 ml pro Well einer 12er-Well-Platte (cellstar cell culture plate; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät. Um die gewünschte Zellzahl zu erhalten, wurden die Zellen mittels des Zellanalysators (Cedex XS) gezählt und entsprechend mit Zellkulturmedium („DMEM (1X) + GlutaMAX-I“; 10% FBS; 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) verdünnt. Die Platte wurde anschließend für circa 18 bis 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde, nach Auftauen der Eluate, zunächst das als Positivkontrolle eingesetzte TNF-alpha (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika) vorbereitet. Hierfür wurden 5 µl von TNF-alpha (10 µg/ml) in 1 ml Medium gelöst. Als Negativkontrolle diente lediglich das Zellkulturmedium. Nach Absaugen des Mediums wurden die Testsubstanzen nach einem zuvor festgelegten

Pipettierschema mit je 1 ml pro Vertiefung hinzugegeben. Darauffolgend wurde die 12er-Well-Platte erneut für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Der Gewinn der Überstandsproben erfolgte durch das getrennte Abpipettieren des Überstandes jedes Wells der 12er-Well-Platte und durch dessen Sammeln in einem sterilen Falcon. Diese Überstandsproben wurden anschließend bei -80°C eingefroren.

Die Durchführung des eigentlichen ELISA-Tests erfolgte mit den Zellkulturüberstandsproben aller einzelnen Versuchsdurchläufe. Zunächst wurden die Reagenzien vorbereitet, welche auf Raumtemperatur gebracht wurden. Zur Herstellung von 500 ml „Wash-Buffer“ wurden 20 ml des Waschpufferkonzentrats zu 480 ml destilliertem Wasser hinzugegeben. Danach wurde eine Verdünnungsreihe mit sechs Verdünnungen aus „Human IL-6 Standard“ und „Calibrator Diluent“ erstellt, wobei „Human IL-6 Standard“ mit 300 pg/ml unverdünnt als Hochstandard und „Calibrator Diluent“ mit 0 pg/ml als Nullstandard galt. Es ergaben sich Lösungen mit 100 pg/ml, 50 pg/ml, 25 pg/ml, 12,5 pg/ml, 6,25 pg/ml und 3,13 pg/ml. Das Prinzip der Erstellung der Standardverdünnungsreihe kann folgender Graphik entnommen werden.

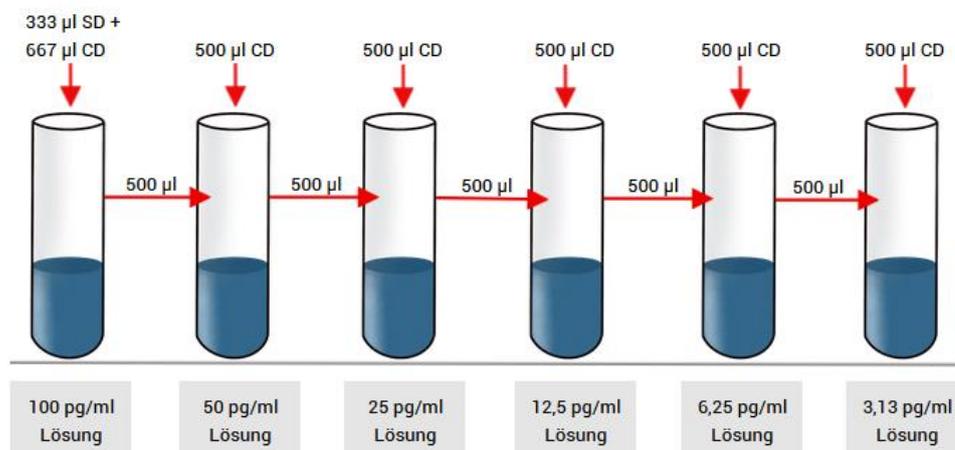


Abbildung 8: IL-6-ELISA, Erstellung einer Standardverdünnungsreihe (SD: Human IL-6 Standard, CD: Calibrator Diluent; modifiziert nach R&D-Systems, 2018)

Im Anschluss wurden in jedes Well zunächst 100 µl des Assay „Diluent RD1W“ und danach je 100 µl der Testsubstanzen (Eluate, TNF-alpha und Medium aller Versuchsdurchläufe sowie die hergestellte Human IL-6 Verdünnungsreihe) pipettiert. Nach erfolgter zweistündiger Inkubation der mit Klebestreifen (im Versuchssset enthalten) abgeklebten Platte wurden alle belegten Wells abgesaugt und ein viermaliges Waschen aller Wells durchgeführt. Für einen Waschvorgang wurden jeweils 400 µl „Wash Buffer“ pro Vertiefung hinzugegeben, alle Wells anschließend abgesaugt, die Platte umgedreht und auf einem Tuch abgetrocknet. Daraufhin wurden in jedes Well 200 µl „Human IL-6 Conjugate“ pipettiert, die Well-Platte mit neuen Klebestreifen abgedeckt und für zwei Stunden erneut inkubiert. Es folgte ein erneutes viermaliges Waschen aller Wells, wie oben beschrieben, nachdem alle belegten Wells zunächst abgesaugt wurden. Nach Herstellung der Farblösung „Substrate-Solution“, wobei das Color Reagent A und B im Verhältnis 1:1 ungefähr 15 min vor ihrem Gebrauch gemischt wurden (8,5 ml Color Reagent A und 8,5 ml Color Reagent B), wurden von dieser je 200 µl in jedes Well hinzugefügt. Die Zugabe der „Stop-Solution“ erfolgte, nach einer 20-minütigen Inkubation unter Lichtschutz, durch das Pipettieren von 50 µl in jede belegte Vertiefung. Laut Hersteller sollte ein Farbwechsel von Blau zu Gelb stattfinden, wobei bei einem ausbleibenden Wechsel durch leichtes Klopfen auf die Platte ein gründliches Mischen sichergestellt werden könne. Innerhalb von 30 min wurde die optische Dichte bei 450 nm und 540 nm mittels Spektrophotometer (Varioskan; Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika) bestimmt.



Abbildung 9: ELISA, 96er-Well-Platte, Farbwechsel zu Gelb

## **6.6. Datenerhebung**

Es wurden insgesamt drei Versuchsdurchläufe durchgeführt. Ein Durchlauf setzte sich hierbei aus allen Assays (Colorimetric Cell Viability Kit (WST-8), Caspase-Glo 3/7-Assay und ELISA - Human IL-6 Immunoassay) zusammen. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte deskriptiv und mittels nicht-parametrischer Tests (Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test). Es kam das Programm SPSS (v28, SPSS Inc; IBM, Armonk, New York, Vereinigte Staaten von Amerika) zum Einsatz.

## 7. Ergebnisse

### 7.1. Colorimetric Cell Viability Kit I (WST-8)

Für die Auswertung des WST-8-Assays wurden die Werte nach drei Stunden betrachtet. Es wurde zunächst der Mittelwert der Hintergrundextinktion, welche der optischen Dichte des zellfreien Mediums entspricht, berechnet und von den Werten der anderen Eluate subtrahiert. Anschließend wurden die Daten graphisch mittels eines Box-Whisker-Plots dargestellt. Es zeigten sich hierbei keine Ausreißer.

Es wurden der Mittelwert von „Zellen + Medium“ gebildet und mit einer Überlebensrate von 100% gleichgesetzt und dementsprechend prozentual die Überlebensraten der anderen Testsubstanzen berechnet. Die Ergebnisse können folgender Graphik entnommen werden.

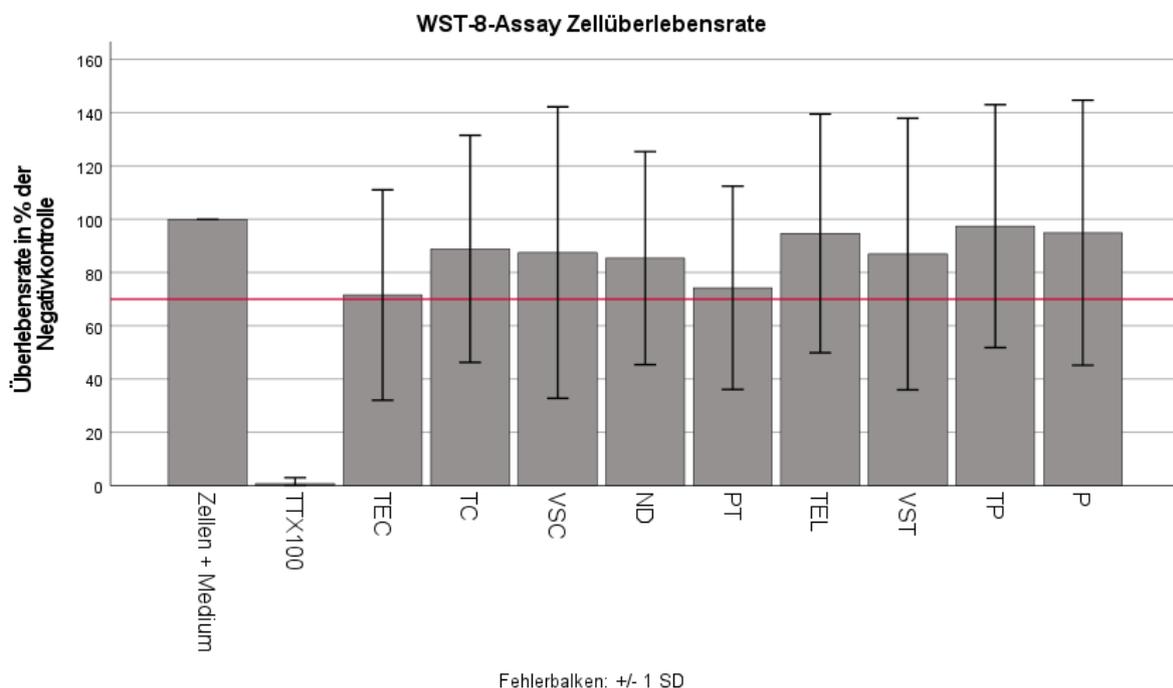


Abbildung 10: Ergebnisse des WST-8-Assays, Zellüberlebensrate

Die Bezugslinie der y-Achse stellt hierbei die Zellüberlebensrate bei 70% dar, da nach DIN EN ISO 10993-5 eine Reduktion der Zellvitalität um mehr als 30% als zytotoxische Wirkung angesehen wird (International-Standards-Organization, 2009b). Es lag hier kein Material unterhalb dieses Wertes.

Die mittlere Zellüberlebensrate weist einen Minimalwert von 71,56% (TEC) und einen Maximalwert von 97,42% (TP) auf. Dabei beträgt die mittlere Überlebensrate innerhalb der untersuchten Materialien 86,85%. Die Zellviabilität nimmt in folgender Reihenfolge ab: TP (97,42%), P (94,94%), TEL (94,70%), TC (88,90%), VSC (87,52%), VST (86,96%), ND (85,42%), PT (74,24%), TEC (71,56%). Die Positivkontrolle (TTX100) weicht hiervon mit einem Wert von 0,78% deutlich ab.

Um die Daten auf Normverteilung zu überprüfen, wurden sowohl Histogramme angefertigt als auch der Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Es zeigte sich, dass keine Normverteilung sämtlicher Daten vorliegt. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass lediglich ein Stichprobenumfang von neun Daten besteht.

Es wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test mittels SPSS-Software durchgeführt, um eventuell bestehende signifikante Unterschiede innerhalb der neun dentalen Materialien detektieren zu können. Es zeigten sich hierbei eine asymptotische Signifikanz von 0,716 ( $> 0,05$ ) und somit keine signifikanten Unterschiede der Materialien bezüglich ihrer Zellviabilität.

Ebenfalls wurde mittels SPSS-Software der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test für jedes dentale Material im Vergleich zur Negativkontrolle „Zellen + Medium“ vollzogen. Hierbei kam es bei keinem Material zu einem signifikanten Unterschied. Aufgrund von  $n < 30$  wurde die exakte Signifikanz betrachtet.

## **7.2. Caspase-Glo 3/7-Assay**

Für das Caspase-Assay wurden die Werte der Lumineszenzmessung nach 30 min herangezogen. Zunächst wurde der Mittelwert der Hintergrundlumineszenz, welche den Werten des zellfreien Mediums entspricht, berechnet (1.274,963) und von den ermittelten Lumineszenzen subtrahiert. Die Daten wurden per Box-Whisker-Plot graphisch visualisiert. Es konnten hierbei Ausreißer ( $1,5 \times IQA$ ) bei den Materialien TEC, TC und TEL detektiert werden.

Die Lumineszenzwerte können mit der Caspasenaktivität gleichgesetzt werden. Die Ergebnisse können folgender Graphik entnommen werden.

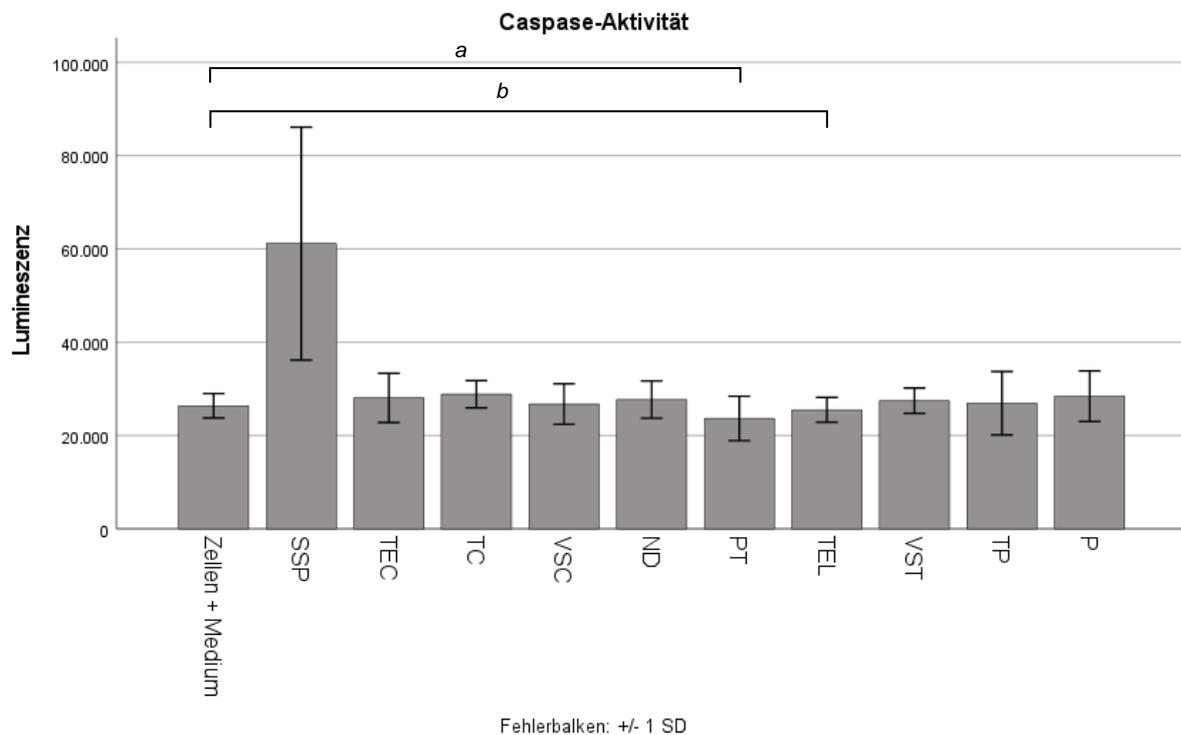


Abbildung 11: Ergebnisse des Caspase-Assays, Caspasenaktivität; <sup>a</sup> p = 0,018, <sup>b</sup> p = 0,022 (Mann-Whitney-U-Test)

Die natürliche Caspasenaktivität entspricht hierbei dem Wert der Negativkontrolle „Zellen + Medium“ mit einer mittleren Aktivität von 26.380,07. Lediglich die Materialien PT und TEL liegen mit ihren jeweiligen mittleren Caspasenaktivitäten unterhalb dieses Wertes. Die mittlere Caspasenaktivität weist einen Minimalwert von 23.660,07 (PT) und einen Maximalwert von 28.861,32 (TC) innerhalb der untersuchten dentalen Materialien auf. Dabei nimmt die Caspasenaktivität in folgender Reihenfolge ab: SSP (61.150,07), TC (28.861,32), P (28.441,32), TEC (28.063,82), ND (27.705,07), VST (27.470,07), TP (26.923,82), VSC (26.757,57), Zellen + Medium (26.380,07), TEL (25.507,57), PT (23.660,07).

Um die Daten auf Normverteilung zu überprüfen, wurden sowohl Histogramme angefertigt als auch der Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Es war erkennbar, dass keine Normverteilung sämtlicher Daten vorliegt.

Es wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test hinzugezogen, um eventuell bestehende signifikante Unterschiede innerhalb der neun dentalen Materialien bezüglich ihrer Caspasenaktivität detektieren zu können. Es zeigte sich hierbei eine asymptotische Signifikanz von 0,238 ( $> \alpha\text{-Level} = 0,05$ ). Somit liegen keine signifikanten Unterschiede vor.

Der Mann-Whitney-U-Test wurde ausgewählt, um eventuell bestehende signifikante Unterschiede der jeweiligen dentalen Materialien im Vergleich zu der Negativkontrolle „Zellen + Medium“ nachweisen zu können. Aufgrund einer Werteanzahl  $n > 30$  wurde die exakte Signifikanz betrachtet. Hierbei konnten signifikante Unterschiede zwischen dem Material PT ( $p = 0,018$ ) sowie TEL ( $p = 0,022$ ) und der Negativkontrolle aufgezeigt werden (siehe Abbildung 11). Es ergab sich bei beiden Unterschieden eine mittlere Effektstärke.

### 7.3. ELISA - Human IL-6 Immunoassay

Zur Korrektur optischer Unvollkommenheit wurden zur Datenerhebung des ELISA zunächst die Messwerte bei 540 nm von den Messwerten bei 450 nm subtrahiert.

Es wurde eine Standardkurve mit Hilfe der Werte der IL-6-Verdünnungsreihe gebildet.

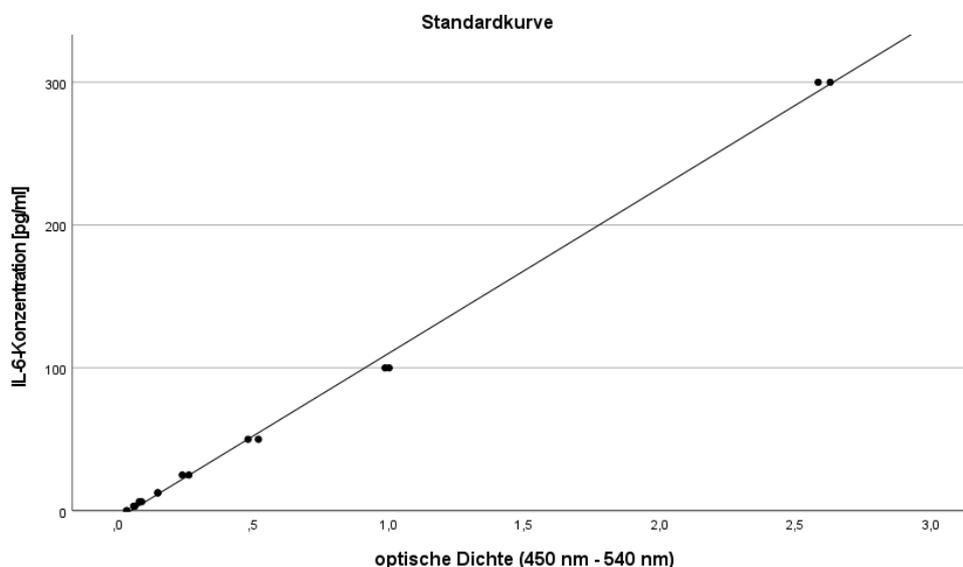


Abbildung 12: ELISA, Standardkurve IL-6-Verdünnungsreihe

Durch die Geradengleichung ( $y = 115,75 \cdot x - 5,6517$ ) konnte somit den gemessenen optischen Dichten der untersuchten Materialien die entsprechende IL-6-Konzentration zugeordnet werden. Die Ergebnisse sind in folgender Abbildung graphisch dargestellt.

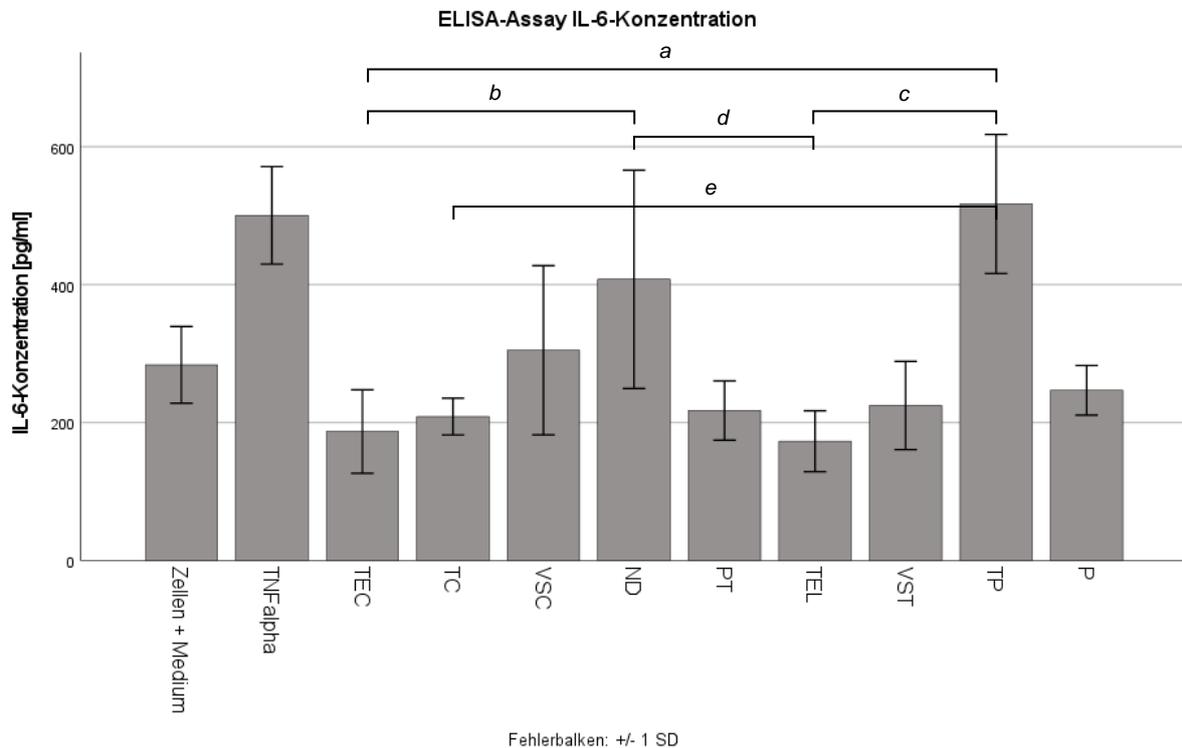


Abbildung 13: Ergebnisse des ELISA, IL-6-Konzentrationen; <sup>a</sup> p = 0,002, <sup>b</sup> p = 0,043, <sup>c</sup> p < 0,001, <sup>d</sup> p = 0,011, <sup>e</sup> p = 0,012 (Dunn-Bonferroni-Post-hoc-Methode)

Die mittlere IL-6-Konzentration weist einen Minimalwert von 173,04 pg/ml (TEL) und einen Maximalwert von 517,07 pg/ml (TP) innerhalb der untersuchten Materialien auf. Dabei nimmt die mittlere IL-6-Konzentration in folgender Reihenfolge ab: TP (517,07 pg/ml), TNF-alpha (500,59 pg/ml), ND (407,79 pg/ml), VSC (304,97 pg/ml), Zellen + Medium (283,82 pg/ml), P (246,89 pg/ml), VST (224,91 pg/ml), PT (217,64 pg/ml), TC (208,85 pg/ml), TEC (187,17 pg/ml), TEL (173,04 pg/ml).

Es wurde zudem ein Box-Whisker-Plot erstellt. Dabei konnten keine Ausreißer detektiert werden. Um die Daten auf Normverteilung zu überprüfen, wurden sowohl Histogramme angefertigt als auch der Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Es war erkennbar, dass keine Normverteilung sämtlicher Daten vorliegt. Es

muss berücksichtigt werden, dass zur Erstellung der Histogramme lediglich sechs Datenpunkte pro Material verwendet wurden.

Durch den Kruskal-Wallis-Test und die Dunn-Bonferroni-Post-hoc-Methode konnten signifikante Unterschiede bezüglich der IL-6-Konzentration innerhalb der neun untersuchten dentalen Materialien sowie im Vergleich zu der Negativkontrolle „Zellen + Medium“ aufgezeigt werden. Die signifikanten Unterschiede bestehen zwischen TEL und ND ( $p = 0,011$ ), TEL und TP ( $p < 0,001$ ), TEC und ND ( $p = 0,043$ ), TEC und TP ( $p = 0,002$ ) sowie TC und TP ( $p = 0,012$ ); sie zeigen alle eine große Effektstärke auf (siehe Abbildung 13).

## 8. Interpretation und Diskussion

Um die Biokompatibilität der dentalen Materialien zu untersuchen, wurden humane gingivale Fibroblasten (HGF-1) in Monolayern gezüchtet. Dies dient der Simulation eines oralen Milieus. Humane Zellen sind tierischen Zellen vorzuziehen, da bei einer Datenauswertung von tierischen Zellen berücksichtigt werden müsste, dass deutliche Unterschiede bezüglich des Metabolismus bestehen, was wiederum eine Übertragung der Daten zwischen den Spezies erschweren würde (Hawksworth, 1994). Das orale Parodontium enthält eine Vielzahl an Zellpopulationen, darunter Fibroblasten, Endothelzellen, Malassez'sche Epithelzellreste, Zellen des sensorischen Systems, knochenassoziierte Zellen und Zementoblasten (Beertsen *et al.*, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Fibroblasten der Gingiva untersucht. Fibroblasten stellen ein zentrales Element der Entzündungsreaktion dar. Sie sind unter anderem in der Lage, Zytokine (wie beispielsweise Interleukin-6) und Chemokine durch Stimulation eines Entzündungsauslösers zu exprimieren (Jönsson *et al.*, 2010). Alternativ können andere der oben genannten Zellen des oralen Parodontiums untersucht werden, was einen möglichen Ansatzpunkt für weitere Forschungsarbeiten darstellen könnte. Ebenso wäre eine Verwendung von 3D-Zellkulturen denkbar, welche die Dreidimensionalität von Gewebe berücksichtigen. Jedoch zeigte eine Studie von 2014, welche verschiedene Gerüste auf Hydrogelbasis auf ihre Eignung für das Wachstum von humanen, immortalisierten Pulpa-Fibroblasten untersuchte, dass sich hierbei Schwierigkeiten hinsichtlich unzureichender mechanischer Eigenschaften und hinsichtlich der Durchführbarkeit von Vitalitätstests ergaben (Schmalz *et al.*, 2014).

Es wurde eine in-vitro-Studie gewählt, da durch diese mögliche toxikologische Reaktionen von menschlichem Gewebe auf Fremdkörper unter kontrollierten experimentellen Bedingungen bewertet werden können, ohne dass dafür eine direkte Exposition des Menschen notwendig ist (Frazier *et al.*, 1989). Zudem ermöglicht diese eine bessere Reproduzierbarkeit und Geschwindigkeit, geringere Kosten, eine einfache Bestimmung von Kontrollgruppen sowie eine

Vermeidung von rechtlichen und ethischen Konflikten (Grayson *et al.*, 2009). Allerdings muss angeführt werden, dass die in-vitro-Situation in keinem Fall der in-vivo-Situation vollständig entspricht. Beispielsweise weist die orale Umgebung zum Teil Temperaturunterschiede oder schwankende pH-Werte durch Exposition gegenüber Lebensmitteln, Magensäure oder Bakterien auf, welche eine besondere Herausforderung für die Biokompatibilität darstellen können, auf welche eine in-vitro-Studie nicht eingehen kann (St John, 2007).

Bei den untersuchten dentalen Materialien handelt es sich um indirekte und direkte Restaurationsmaterialien für die definitive und provisorische dentale Versorgung. Laut International Standards Organization handelt es sich demnach um Medizinprodukte der Kategorie „B - Langzeitexposition“ (24 h < 30 d) bzw. der Kategorie „C - Dauerkontakt“ (> 30 d) (International-Standards-Organization, 2009a). Durch die neun eingesetzten Werkstoffe wurden zudem unterschiedliche Herstellungsverfahren - konventionell, CAD/CAM-gefertigt, 3D-Druck - abgedeckt. Es konnten durch die Materialauswahl sowohl Materialien, welche relativ neu auf dem dentalen Markt sind, miteinander verglichen werden als auch ein Vergleich mit bereits langjährig bewährten dentalen Materialien vollzogen werden. Obwohl neue Monomer-Technologien entwickelt wurden, stellen Komposite auf Dimethylacrylatbasis derzeit noch die überwiegende Mehrheit der kommerziell erhältlichen Materialien für die direkte Restauration dar (Leprince *et al.*, 2012). Alle untersuchten Werkstoffe sind Acrylharze mit unterschiedlichen Zusatzstoffen. Es handelt sich demnach um Komposite, auch Verbundpolymere genannt. Unter Kompositen versteht man in der Materialwissenschaft ein Gemisch aus mindestens zwei verschiedenen Werkstoffklassen. Zahnärztliche Komposite sind komplexe Restaurationsmaterialien aus einer organischen Matrix, anorganischen Füllstoffen (beispielsweise Quarze, Gläser, Lithium-Aluminium-Silikat), Molekülen, welche die Polymerisationsreaktion fördern und modifizieren, sowie aus Silan-Haftvermittlern, welche die organische Matrix und die anorganischen Füllstoffe miteinander verbinden (Ferracane, 1995). Die Matrix enthält unter anderem Monomere (beispielsweise BisGMA, UDMA), niedrig-visköse

Comonomere (beispielsweise EGDMA, DEGDMA, TEGDMA), Additive, Initiatoren (beispielsweise Camphorochinon), Co-Initiatoren und Photostabilisatoren (Geurtsen, 1998). Dabei spielt die Freisetzung von Methylacryl-Monomeren aus zahnmedizinischen Kompositen eine wichtige Rolle für die Zytotoxizität und damit auch für die Biokompatibilität der Materialien. Das Herauslösen wird als Ursache für eine Vielzahl unerwünschter Reaktionen wie lokale bzw. systemische Toxizität, Pulpareaktionen oder allergische Wirkungen angesehen (Bakopoulou *et al.*, 2009). Nach der Polymerisation werden ungebundene Monomere und Zusatzstoffe durch Lösungsmittel (z.B. Speichel) vor allem innerhalb der ersten 24 Stunden entfernt, weswegen in dieser Studie darauf geachtet wurde, die Material-Scheiben direkt nach Ausarbeitung in ein Kulturmedium einzulegen (Geurtsen, 2000). Die bei dentalen Materialien am häufigsten verwendeten Monomere sind dabei Dimethacrylate wie Bisphenol-A-Glykoldimethacrylat (BisGMA) und Urethandimethacrylat (UDMA), die seit Anfang der 1960er Jahre verwendet werden (Janani *et al.*, 2021). Durch radikalische Kettenpolymerisation verbinden sich Monomere zu Polymeren. Der Grad der Umwandlung (DC %) von Monomeren zu Polymeren ist dabei ein wichtiger Parameter, der die endgültigen physikalischen, mechanischen und biologischen Eigenschaften der Kunststoffharze bestimmt und somit unter anderem auch die Biokompatibilität der Materialien stark beeinflusst (Balagopal *et al.*, 2021). Wenn die Aushärtungsreaktion der Komposite nicht vollständig abläuft, können Bestandteile freigesetzt werden und beispielsweise im Speichel gelöst werden oder durch die Dentintubuli in die Pulpa gelangen (St John, 2007). Ein hundertprozentiger Umwandlungsgrad liegt vor, wenn alle Monomere zu Polymeren reagieren; der Grad der Umwandlung liegt allerdings normalerweise zwischen 43 und 70% (Janani *et al.*, 2021), weswegen von einer Freisetzung von Monomeren und einer dementsprechenden Beeinträchtigung der Biokompatibilität durch ebendiese ausgegangen werden muss. Verschiedene Studien haben bereits die Monomer-Freisetzung aus Harzkompositen quantifiziert. Beispielsweise konnten Janani und Mitarbeiter mittels High

Performance Liquid Chromatography (HPLC) in Eluaten von drei in Ethanol eingelegten verschiedenen dentalen Kompositen für die direkte Füllungstherapie (Swiss Tech resin composite, Coltenewhaledent Pvt Ltd.; Ceram X, Dentsply Sirona; Beautifil Injectable, Shofu Inc.) die Monomere BisGMA, TEGDMA, HEMA sowie UDMA quantifizieren, während BisGMA bei allen drei Materialien am stärksten freigesetzt wurde (Janani *et al.*, 2021). Eine weitere Studie konnte belegen, dass die Monomere TEGDMA und BisGMA die Proliferation von humanen gingivalen Fibroblasten (HGF) und von immortalisierten Keratinozyten (HaCaT) signifikant hemmen und dass BisGMA sowohl die Migration von Keratinozyten beeinflusst als auch die Expression des Glykoproteins Tenascin der Extrazellulärmatrix verändert, woraus die Autoren auf eine Beeinträchtigung der oralen Wundheilung durch das Monomer schließen (Theilig *et al.*, 2000).

Um die Materialien auf Biokompatibilität zu überprüfen, wurden die Proben Testverfahren bezüglich ihrer Zytotoxizität, Apoptose-Rate und Entzündungsreaktion unterzogen, da mit dem Begriff Biokompatibilität die angemessene Wirtsreaktion unter Anwendung eines Materials beschrieben wird. Dies bedeutet, dass es zu keiner oder lediglich zu einer tolerierbaren nachteiligen Reaktion eines lebenden Systems kommt (Polyzois, 1994). Alle Medizinprodukte, welche in der Zahnmedizin verwendet werden, müssen laut der ISO einem strukturierten biologischen Bewertungsprogramm im Rahmen eines Risikomanagementprozesses unterzogen werden (International-Standards-Organization, 2018). Die Wahl der Assays zur Überprüfung der Biokompatibilität der dentalen Materialien hängt unter anderem von deren Einsatzort und der Expositionsdauer ab. Beispielsweise müssen temporär am Patienten eingesetzte zahnärztliche Instrumente andere Ansprüche an die Verträglichkeit erfüllen als Materialien, welche dauerhaft in Kontakt mit oralem Gewebe stehen (St John, 2007). Da es sich bei den untersuchten Werkstoffen um Materialien mit längerfristigem oder dauerhaftem Kontakt zu oralem Gewebe handelt und demnach ein hohes Maß an Materialverträglichkeit gegeben sein muss, wurde versucht, mit den Testverfahren verschiedene Aspekte der

Biokompatibilität abzudecken. Als möglicher Ansatzpunkt steht zunächst die Zytotoxizität. Am häufigsten kommen für das Toxizitätsscreening von Dentalmaterialien Zellkulturen zum Einsatz, wobei nach Zugabe des Materials oder dessen Extrakts Veränderungen der Zellen beobachtet werden (Polyzois, 1994). Die Zytotoxizität der Materialien wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des WST-8-Assays, zur Darstellung der Zellviabilität über die Stoffwechselaktivität der Zellen, und des Caspase-Assays, zum Nachweis der Apoptose-Rate, überprüft.

Die Ergebnisse des WST-8-Assays belegen, dass alle untersuchten Materialien grundsätzlich als nicht-zytotoxisch angesehen werden können. Alle Materialien lagen oberhalb der 70%-Zellvitalitäts-Grenze, welche von der ISO als Referenzwert für eine zytotoxische Wirkung angegeben wird (International-Standards-Organization, 2009b). Es zeigten sich sowohl innerhalb der untersuchten Materialien als auch im Vergleich zu der Negativkontrolle „Zellen + Medium“ keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Zellviabilität. Dennoch liegt eine Spanne von 25,86 Prozentpunkten zwischen dem Maximalwert der Zellviabilität und deren Minimalwert.

Es ist des Weiteren auffallend, dass die beiden Materialien PT und TEC als Vertreter der konventionellen Herstellungsweise mit Werten von 74,24% (PT) und 71,56% (TEC) die zwei niedrigsten Zellviabilitäts-Werte aufwiesen und dass der nächst höhere Wert eine Abweichung von über zehn Prozentpunkten hat. Die relativ niedrigen Zellviabilitäts-Werte sind dadurch zu erklären, dass durch die manuelle Herstellungsweise zusätzliche Einflussfaktoren, welche die Aushärtung des Materials beeinflussen können, hinzukommen. Bei TEC handelt es sich beispielsweise um einen lichthärtenden Kunststoff. Durch die manuelle Verarbeitung wurde somit die Polymerisation nicht nur durch intrinsische Faktoren wie unter anderem Photoinitiatorotyp, Co-Monomer-Zusammensetzung und Füllstoffgehalt, sondern auch durch extrinsische Faktoren wie Lichtart und -spektrum, Strahlungsenergie, Bestrahlungsdauer und Positionierung des Lichtleiters beeinflusst (Leprince *et al.*, 2012).

Die Materialien TP (97,42%) und P (94,94%) wiesen die beiden höchsten Zellviabilitäts-Werte auf. Es handelt sich bei beiden Vertretern um additiv hergestellte Materialien für den provisorischen Einsatz. Generell zeigten additiv und CAD/CAM-gefertigte Materialien höhere Zellviabilitätsraten als konventionell hergestellte auf. Dies ist unter anderem dadurch zu begründen, dass CAD/CAM- und additiv gefertigte Materialien unter optimalen Bedingungen hergestellt werden. Neue Polymerisationsverfahren wie die Hochtemperatur- und vor allem die Hochtemperatur-Hochdruck-Polymerisation erhöhen beispielsweise nachweislich den Umwandlungsgrad im Vergleich zu lichtgehärteten Kompositen; zudem erlauben maschinelle Verfahren die Erhöhung des Füllstoffgehalts und die Realisierung homogener Strukturen (Mainjot *et al.*, 2016). Die Erkenntnis, dass das Material TP mit der höchsten Zellviabilität in den vorliegenden Ergebnissen laut Hersteller einen deutlich höheren Anteil an Monomeren aufweist (UDMA 50 - <70% w/w; TEGDMA 10 - <25% w/w) als das Material TEC, welches im WST-8-Assay die niedrigste Zellviabilität aufzeigte (Monomeranteil insgesamt 16,8%), und dennoch das Material TP weniger zytotoxisch war, kann als Bekräftigung dieser These angesehen werden. Ähnliches zeigt sich bei den beiden additiv hergestellten Materialien VSC und VST, welche beide unter anderem einen hohen Anteil von  $\geq 50$  - <75% an Veresterungsprodukten von Bisphenol-A enthalten. Bisphenol-A wird zum Beispiel bei der Herstellung von Methacrylat-Monomeren wie BisGMA, BisEMA und BisDMA verwendet (Goldberg *et al.*, 2014). Obwohl VSC und VST diesen hohen Anteil aufweisen, erreichten sie dennoch Zellviabilitätsraten von 87,52% und 86,96%. Eine Studie von 1999 bestätigt, dass die Menge des Restmonomers unter anderem von der Verarbeitungsmethode abhängig ist und dass Acrylharze mit einem höheren Restmonomergehalt nicht notwendigerweise höhere Mengen an Methacrylat-Monomeren - im Rahmen dieser Studie MMA - freisetzen (Kedjarune *et al.*, 1999). Es könnte somit geschlussfolgert werden, dass additiv und CAD/CAM-gefertigte Materialien eine geringere Restmonomer-Freisetzung nach der Polymerisation als konventionell hergestellte Materialien und demnach höhere Zellviabilitätsraten nach sich

ziehen. Um diese Vermutung zu bestätigen, müsste beispielsweise ein Konzentrationsnachweis von Restmonomeren in den jeweiligen Eluaten erbracht werden. Die Datenlage zu additiv gefertigten Materialien in dieser Hinsicht ist jedoch noch gering. 2018 untersuchte eine Studie die Zytotoxizität und Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch Eluate konventioneller dentaler Komposit-Materialien (Esthet.X HD Dentsply; Venus, Heraeus Kulzer; X-tra fil, VOCO; Clearfil AP-X, Kuraray Europe; Admira Fusion, VOCO; QuiXfil, Dentsply) an humanen gingivalen Fibroblasten (HGF). Dabei zeigte sich bei allen untersuchten Kompositen kein signifikanter Verlust der Lebensfähigkeit der Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle, jedoch zum Teil eine Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen, und es konnten unter anderem die Methacrylate TEGDMA, HEMA, HPMA, EGDMA und TMPTMA nachgewiesen werden (Yang *et al.*, 2018). Eine klinische Studie von Olea *et al.* untersuchte neben der östrogenen Aktivität von Kompositmaterialien unter anderem an 18 Probanden die Freisetzung von Kompositharz-Bestandteilen anhand von Speichelproben (Olea *et al.*, 1996). Es wurden zwölf Molaren mit einem Versiegelungsmaterial auf BisGMA-Basis (circa 50 mg pro Testperson) behandelt sowie jeweils eine Stunde vor und nach der Versiegelung Speichelproben genommen. Es konnte hierbei nach der Behandlung Bisphenol-A im Bereich von 90 pg bis 931 pg detektiert werden. Die aktuelle Forschung von Wedekind und Mitarbeitern, welche das Elutionsverhalten von 3D-gedruckten, gefrästen und konventionellen Schienenmaterialien auf Kunststoffbasis (SHERAprint-ortho plus; SHERAeco-disc PM20; SHERAORTHOMER) untersuchte, konnte die Freisetzung von Monomeren in Eluaten nachweisen, kam jedoch zu kontroversen Ergebnissen hinsichtlich der im Rahmen dieser Arbeit vorliegenden Daten. In Wedekinds Studie eluierte das additive Material die höchste THFMA-Konzentration in einer Wasser-Lösung, während dagegen für das gefräste und konventionell hergestellte Material keine Elution in Wasser festgestellt werden konnte (Wedekind *et al.*, 2021). Die Datenlage dieser Arbeit schlussfolgert aufgrund der hohen Zellüberlebensraten der additiv gefertigten

Materialien jedoch, dass diese einen geringeren Restmonomergehalt aufweisen und somit auch eine niedrigere Monomer-Elution.

Bei der Interpretation des WST-8-Assays muss kritisch betrachtet werden, dass nur stoffwechselaktive Zellen in die Auswertung miteinfließen und somit eventuell vitale, nicht-stoffwechselaktive Zellen fälschlicherweise als nicht-vital interpretiert wurden.

Deshalb wurde die Zellzytotoxizität über die Apoptose-Rate zusätzlich mit Hilfe des Caspase-Glo 3/7-Assays überprüft. Unter Apoptose wird der programmierte Zelltod verstanden, welcher auf einer geregelten Aktivierung eines Todesprogramms resultiert; die Zelle steuert dies dabei selbst; die Apoptose ist unter anderem relevant für die Entwicklung eines Organismus durch die Beseitigung von Zellen, welche durch genetische Defekte oder Alterung geschädigt wurden, oder für die geregelte Eliminierung von spezifischen Zellpopulationen im Rahmen einer Immunreaktion; eine übermäßige, aber auch unzureichende Apoptose hingegen kann zur Pathogenese einer Vielzahl von Krankheiten beitragen; diese Form muss von einer Nekrose unterschieden werden; ein durch Nekrose induzierter Zelltod basiert beispielsweise auf der Reaktion durch Toxine oder aufgrund physikalischer Reize; die Wahl eines apoptotischen oder nekrotischen Zelltods hängt dabei von der Intensität, Dauer und dem Ausmaß der schädigenden Reize ab (Saikumar *et al.*, 1999). Es muss demnach bei der Bewertung dieses Assays berücksichtigt werden, dass lediglich ein durch Apoptose eingeleiteter Zelltod in die Auswertung mit einfließt.

Eine wichtige Rolle ist dabei Caspasen zuzuschreiben. Diese sind proteolytische Enzyme (Cysteiny-Aspartat-Proteinasen), welche unter anderem entscheidend für die Kontrolle der Apoptose sind (Shalini *et al.*, 2015). Apoptotische Caspasen können in Initiatoren und Effektoren unterschieden werden. Die wichtigsten Effektor-Caspasen bei Säugetieren stellen die homologen Caspasen-3, -6 und -7 dar, welche Zielproteine schneiden und somit den Zelltod herbeiführen (Kumar, 2007). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit das Caspase-Glo 3/7-Assay herangezogen, um die Apoptose-Rate anhand der Caspase-3- und -7-Aktivität zu quantifizieren. Dabei ist Caspase-3

eine häufig aktivierte Todesprotease, welche die spezifische Spaltung vieler wichtiger zellulärer Proteine katalysiert (Porter und Jänicke, 1999). Aus einer Studie an Mäusen resultierte etwa, dass gezüchtete Caspase-3-negative Mäuse pränatal durch neuronale Hyperplasie aufgrund ausbleibender Apoptose starben (Kuida *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu Caspase-3 sind Caspase-6 und -7 weniger spezialisiert (Degterev *et al.*, 2003). Dabei ist Caspase-7 strukturell und funktionell Caspase-3 am ähnlichsten (Larner *et al.*, 2005). Studien deuten darauf hin, dass Caspase-7 eine wichtige Rolle in der Physiologie und Apoptose spielt. Beispielsweise zeigte eine Studie von 2003, welche verschiedene humane Malignome auf Caspase-7-Mutationen untersuchte, dass inaktivierte Mutationen im Caspase-7-Gen zu einem Verlust der apoptotischen Funktion führen (Soung *et al.*, 2003). Aus einer anderen Studie resultierte zudem, dass Fibroblasten von Mäusen, welche sowohl ohne Caspase-3 als auch ohne Caspase-7 gezüchtet wurden, gegen mitochondriale und Todesrezeptor-vermittelte Apoptose hochgradig resistent waren und eine defekte Kernlokalisierung des Apoptose-induzierten Faktors (AIF) aufwiesen (Lakhani *et al.*, 2006). Es ist daher durchaus interessant, zur Quantifizierung der Apoptose-Rate nicht nur die Caspase-3-Aktivität, sondern auch die Caspase-7-Aktivität zu berücksichtigen.

Bei Betrachtung der Daten des Caspase-Glo 3/7-Assays fällt auf, dass bereits die Negativkontrolle „Zellen + Medium“ eine Caspasen-Grundaktivität aufzeigt. Dies ist dadurch zu begründen, dass auch gesunde Zellen ohne äußeren Einfluss eine gewisse natürliche Apoptose-Rate besitzen. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Negativkontrolle konnten bei den Materialien PT und TEL detektiert werden. Interessanterweise lagen bei diesen Materialien die Caspasenaktivitäten unterhalb des Negativkontrollwerts. Dies bedeutet, dass sie eine geringere Apoptose-Rate als lediglich „Zellen + Medium“ aufzeigten. Das Ergebnis in Bezug auf das Material PT zeigt sich zudem kontrovers zu den Ergebnissen des WST-8-Assays. Hier wies dieses eine vergleichsweise hohe Zytotoxizitätsrate auf. Dies ist eventuell dadurch zu begründen, dass PT keine Apoptose auslöste, jedoch eine Nekrose, welche durch eine erhöhte

Caspasenaktivität nicht nachgewiesen werden kann. Mit Hilfe eines Durchflusszytogramms könnte beispielsweise der Anteil lebensfähiger Zellen, der Zellen im Stadium der Apoptose und nekrotischer Zellen quantifiziert werden (Engelmann *et al.*, 2004), was wiederum ein Ansatzpunkt für weitere Forschungsarbeiten darstellen könnte. Es konnte im Rahmen der vorliegenden Ergebnisse kein Unterschied in Bezug auf die Caspasenaktivität durch das Herstellungsverfahren der einzelnen Materialien detektiert werden. Es zeigte sich kein klarer Trend hinsichtlich der Fertigungsmethode wie beispielsweise bei dem zuvor angeführten WST-8-Assay. Der mit Ausnahme von TEL und PT zu vermerkende Anstieg der Caspasenaktivität bei Einfluss der dentalen Materialien kann möglicherweise ebenfalls auf die in den Eluaten vorhandenen Restmonomere zurückgeführt werden. Eine Studie von 2006 untersuchte zum Beispiel die durch die Harzmonomere GMA, TEGDMA und HEMA aufgrund von oxidativem Stress induzierte Apoptose und Mutagenität an Lungen-Fibroblasten (Hamster, V79-4) und Pulpa-Zellen (Ratte, RPC-C2A). Dabei konnte mittels einer Durchflusszytometrie nach 24 Stunden bei Mengen von 300  $\mu$ M GMA, 7 mM TEGDMA oder 14 mM HEMA bei den RPC-C2A-Zellen ein signifikanter Anstieg der Apoptose beobachtet werden (Lee *et al.*, 2006). Laut aktuellem Wissensstand zeigt das Comonomer TEGDMA eine zeit- und konzentrationsabhängige Zytotoxizität auf, wobei bei niedrigen Konzentrationen die Apoptose und bei höheren Konzentrationen die Nekrose überwiegt (Bakopoulou *et al.*, 2009). Engelmann und Mitarbeiter untersuchten die Auswirkung des Harzmonomers BisGMA auf die Glutathion-Konzentration und Apoptose an humanen gingivalen Fibroblasten (HGF) (Engelmann *et al.*, 2004). Dabei konnte unter anderem anhand von Wachstumskurven gezeigt werden, dass nach 24-stündiger Exposition eine BisGMA-Konzentration  $> 0,1$  mM einen signifikanten Anstieg der apoptotischen Zellen (circa 50%) induziert.

Laut Hersteller enthält das Material TC, welches im Rahmen dieses Assays die höchste Apoptose-Rate aufwies, einen Anteil an BisGMA. Angaben zu dessen relativem Anteil am Gesamtmonomer-Gehalt von 28,4% w/w wurden dabei jedoch nicht gemacht. Zur Bestätigung der im Rahmen der

Ergebnisinterpretation aufgestellten Vermutungen wäre wiederum die Bestimmung des Restmonomergehalts in den Eluaten ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Forschung.

Letztendlich kann der Caspasenaktivitäts-Anstieg bei allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Materialien als geringfügig eingestuft werden, weshalb diese als biokompatibel bezeichnet werden können.

Eine weitere Möglichkeit, Materialien auf ihre Biokompatibilität zu untersuchen, stellt der Nachweis der Induktion einer Entzündungsreaktion dar. Zu diesem Zweck wurde ein ELISA auf IL-6 (Interleukin-6) durchgeführt. Interleukine gehören neben Interferonen, Kolonie-stimulierenden-Faktoren sowie Wachstumsfaktoren zur Gruppe der Zytokine, welche kleine Proteine darstellen (Rose-John, 2018; Scheller *et al.*, 2011). Dabei sind vor allem die Zytokine IL-6, IL-1 und TNF-alpha bei den meisten Entzündungsprozessen erhöht, weswegen im Rahmen dieser Arbeit das Interleukin-6 betrachtet wurde (Scheller *et al.*, 2011). Dieses hat eine breite Wirkung auf Zellen des Immunsystems (Hunter und Jones, 2015). Es gilt als einer der wichtigsten Mediatoren der Akute-Phase-Reaktion (Heinrich *et al.*, 1990). Wenn die Homöostase durch Infektionen oder Gewebeverletzungen gestört wird, wird IL-6 produziert und trägt durch Aktivierung der Akute-Phase-Reaktion und der Immunantwort zur „Verteidigung“ des Wirts gegen den aufkommenden zellulären Stress bei (Tanaka *et al.*, 2018). Beispielsweise zeichnet es sich durch eine proliferationsfördernde Wirkung auf T-Helferzellen aus und wird in Zusammenhang mit der Differenzierung verschiedener T-Helferzellen-Untergruppen gebracht (Korn und Hiltensperger, 2021). Es wurde außerdem gezeigt, dass IL-6 die Produktion von IL-21 fördern kann, welches die Immunglobulin-Synthese reguliert (Ma *et al.*, 2012). Obwohl IL-6 meist als pro-inflammatorisches Zytokin angesehen wird, zeigt es auch regenerative und entzündungshemmende Eigenschaften auf (Scheller *et al.*, 2011). Während IL-6-Trans-Signaling entzündungsfördernd ist, ist die klassische IL-6-Signalübertragung über den membrangebundenen IL-6-Rezeptor für eine anti-inflammatorische Wirkung des Zytokins erforderlich (Rose-John, 2012).

Bei der Betrachtung der Ergebnisse des ELISA ist zunächst zu erkennen, dass eine relativ hohe IL-6-Konzentration der Negativkontrolle „Zellen + Medium“ mit einem Wert von 283,82 pg/ml vorliegt. Darüber hinaus ist auffallend, dass es sich bei allen Materialien, welche die IL-6-Konzentration der Negativkontrolle überschritten, um additiv hergestellte Werkstoffe handelt. Dabei liegt der Wert des Materials TP oberhalb des Wertes der Positivkontrolle TNF-alpha (Tumornekrosefaktor-alpha), welches ein stark entzündungsförderndes Zytokin darstellt (Baud und Karin, 2001). Es muss beachtet werden, dass nur vitale Fibroblasten in der Lage sind, IL-6 zu exprimieren. Dies bedeutet, dass durch eine eventuell bestehende Zytotoxizität der Materialien zugrunde gegangene Zellen durch dieses Assay nicht detektiert wurden. Demnach decken sich die Ergebnisse mit dem WST-8-Test. Hier erreichte etwa das Material TP die höchste Zellviabilität und zeigte im ELISA die höchste IL-6-Konzentration auf, so dass eine hohe Zellanzahl in der Lage war, IL-6 zu bilden. Als mögliche Auslöser der Entzündungsreaktion können erneut Restmonomere herangezogen werden. Einige Studien haben berichtet, dass Restmonomere, die aus Dentalpolymeren freigesetzt werden, Reizungen, Entzündungen und allergische Reaktionen hervorrufen können (Rashid *et al.*, 2015; Goldberg, 2007). Eine Studie von 2015 untersuchte die Auswirkung des Harzmonomers 10-Methacryloyloxydecyl-Dihydrogenphosphat (10-MDP) auf dentale Pulpa-Zellen (DPCs) (Kim *et al.*, 2015). Es konnte dabei nachgewiesen werden, dass 10-MDP eine Freisetzung von entzündlichen Zytokinen wie beispielshalber TNF-alpha, IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 induzierte. Auch das Material TP enthält eine hohe Konzentration an Monomeren, vor allem UDMA. Aus den Ergebnissen des WST-8-Assays wurde jedoch aus dem hohen Zellviabilitätswert des Materials geschlossen, dass kein hoher Restmonomergehalt in den Eluaten vorgelegen haben muss. Möglicherweise lag die Konzentration der Restmonomere auf einem Niveau, welches noch nicht zytotoxisch, jedoch entzündungsfördernd ist. Genauere Informationen würden hierbei wiederum Untersuchungen der Eluat-Zusammensetzung liefern. Da kaum Studien vorliegen, die ebenfalls die Beeinflussung der IL-6-Konzentration durch additive

dentale Restaurationsmaterialien untersuchen, ist es schwierig, die hier ermittelten Resultate zu vergleichen und einzuordnen. Eine Studie von Wei und Mitarbeiter betrachtete die Auswirkungen von konventionellen und CAD/CAM-Dentalpolymeren auf humane gingivale Fibroblasten (HGF) (Wei *et al.*, 2022). Dabei wurde unter anderem ein ELISA auf IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF-alpha durchgeführt. Es konnten dabei keine signifikanten Unterschiede in der Sekretion entzündlicher Zytokine zwischen konventionellen und CAD/CAM-gefertigten Materialien detektiert werden. Zu ähnlichen Ergebnissen kommt auch diese Dissertation. Hierbei konnten signifikante Unterschiede zwischen den Materialien TEL und ND, TEL und TP, TEC und ND, TEC und TP sowie TC und TP detektiert werden. Interessanterweise liegt jeder Unterschied zwischen einem additiv hergestellten Werkstoff und einem CAD/CAM bzw. konventionell hergestelltem Material, jedoch kein Unterschied zwischen einem konventionell und CAD/CAM-gefertigten Werkstoff. Dabei weist stets das additiv hergestellte Material eine höhere IL-6-Konzentration auf.

Wie bereits angeführt, müssen dentale Materialien ein Zertifizierungsverfahren durchlaufen, wobei die Biokompatibilität einen wichtigen Aspekt darstellt. In der Regel werden zunächst in-vitro-Tests herangezogen. Im Rahmen dieser Studie wurden Tests zur Zytotoxizität, Apoptose-Rate und Entzündungsreaktion durchgeführt. Mögliche weitere Ansatzpunkte zur Überprüfung der Biokompatibilität sind unter anderem Mutagenität-Tests, welche Veränderungen der zellulären DNA aufzeigen können, jedoch teuer bei der Anschaffung und zeitaufwändig in der Durchführung sind (Polyzois, 1994). Ein weiterer Parameter, der ebenfalls bewertet werden kann, ist die Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen mittels Fluoreszenzsonden, da diese in direktem Zusammenhang mit der Induktion einer Zellschädigung stehen (de Souza Costa *et al.*, 2014). Neben quantitativen Tests können die Auswirkungen von Dentalmaterialien auf Zellkulturen auch qualitativ bewertet werden, beispielsweise durch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Zellen (Lanza *et al.*, 2008). Ein interessanter Aspekt zukünftiger Forschung in Bezug auf die Biokompatibilität von 3D-Druck-Materialien in der Zahnmedizin

wären beispielsweise auch Umweltauswirkungen, in deren Bereich die Datenlage ebenfalls noch nicht ausgereift ist.

## 9. Fazit

Zusammenfassend kann angeführt werden, dass wie bei allen Medizinprodukten, welche direkten Kontakt zu lebenden Geweben haben, eine möglichst hohe Biokompatibilität von dentalen Restaurationsmaterialien und deren Optimierung angestrebt werden sollte, um Patienten in Zukunft bestmöglich versorgen zu können.

Die Verbesserung des Verbraucherschutzes, die Analyse der Materialtoxizität, die Entwicklung neuer Materialien, aber auch Schulungen des zahnärztlichen Personals stellen Ansatzpunkte zur Steigerung der Biokompatibilität von dentalen Materialien dar (Schmalz, 2014). Dabei sollte auch die Beeinträchtigung ebendieser durch Restmonomere beachtet werden. Bei der Entwicklung neuer dentaler Materialien sollte versucht werden, die Freisetzung von Restmonomeren aus dentalen Restaurationsmaterialien zu reduzieren oder den Monomeranteil direkt zu verringern. Eine Studie von Ausiello und Mitarbeitern untersuchte unter anderem die zytotoxische Wirkung von lichtgehärteten Restaurationsmaterialien mit und ohne BisGMA (Clearfil Majesty Posterior; Clearfil Majesty Flow) auf die Fibroblastenzelllinie NIH-3T3 von Mäusen (Ausiello *et al.*, 2013). Dabei hemmten zwar alle getesteten Materialien die Zellproliferationsrate, allerdings beeinträchtigte das Material ohne BisGMA jene weniger. Ein weiteres Mittel der Biokompatibilitätssteigerung stellt das Zurückgreifen auf CAD/CAM- oder 3D-Druck-gefertigte Materialien dar, da durch diese Herstellungsverfahren eine Verbesserung des Umwandlungsgrades von Monomeren zu Polymeren erreicht werden kann und somit der Restmonomeranteil sinkt. Dies scheinen auch die Daten der vorliegenden Dissertation zu bestätigen, in welcher sich CAD/CAM- bzw. 3D-gedruckte Materialien zum Teil als biologisch inerte erwiesen.

Schlussfolgernd können alle untersuchten dentalen Materialien laut vorliegender Ergebnisse als biokompatibel erachtet werden. Die neuen additiv gefertigten Werkstoffe erzielten im Vergleich zu bereits auf dem Markt etablierten Materialien gleichwertige Ergebnisse. Sie zeigten lediglich im Hinblick auf die IL-6-Konzentration erhöhte Werte.

Letztendlich sind Langzeitstudien sowie klinische Studien, wie beispielsweise in Bezug auf die Monomerfreisetzung innerhalb der klinischen Routinepraxis, erforderlich, um eine vollständige Datenlage bezüglich der Biokompatibilität von den noch neuartigen 3D-Druck-Restaurationsmaterialien in der Zahnmedizin zu erhalten.

## 10. Literaturverzeichnis

1. 3M-ESPE. Protemp IV, Gebrauchsinformation (2012). Journal
2. Adil A, Fenik M, Bowen Z, Yi L. An Overview of Computer Aided Design/Computer Aided Manufacturing (CAD/CAM) in Restorative Dentistry (2018). *Journal of dental materials and techniques* **7**: 1-10.
3. Aldaadaa A, Owji N, Knowles J. Three-dimensional Printing in Maxillofacial Surgery: Hype versus Reality (2018). *Journal of tissue engineering* **9**: 2041731418770909-2041731418770909
4. Alp G, Murat S, Yilmaz B. Comparison of Flexural Strength of Different CAD/CAM PMMA-Based Polymers (2019). *Journal of prosthodontics* **28**: e491-e495.
5. Ansteinsson V, Kopperud HB, Morisbak E, Samuelsen JT. Cell toxicity of methacrylate monomers - The role of glutathione adduct formation (2013). *Journal of biomedical materials research* **101**: 3504-3510.
6. Ausiello P, Cassese A, Miele C, Beguinot F, Garcia-Godoy F, Di Jeso B, Ulianich L. Cytotoxicity of dental resin composites: an in vitro evaluation (2013). *Journal of applied toxicology* **33**: 451-457.
7. Bakopoulou A, Papadopoulos T, Garefis P. Molecular Toxicology of Substances Released from Resin-Based Dental Restorative Materials (2009). *International Journal of Molecular Sciences* **10**: 3861-3899.
8. Balagopal S, Geethapriya N, Anisha S, Hemasathya B, Vandana J, Dhatshayani C. Comparative evaluation of the degree of conversion of four different composites polymerized using ultrafast photopolymerization technique: An in vitro study (2021). *Journal of conservative dentistry* **24**: 77-82.
9. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives (2001). *Trends in Cell Biology* **11**: 372-377.
10. Beertsen W, McCulloch CAG, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue (1997). *Periodontology 2000* **13**: 20-40.
11. BEGO. VarseoSmile Crown plus, Gebrauchsanweisung (2019a). Journal
12. BEGO. VarseoSmile TEMP, Gebrauchsanweisung (2019b). Journal
13. Beuer F, Schweiger J, Edelhoff D. Digital dentistry: an overview of recent developments for CAD/CAM generated restorations (2008). *British dental journal* **204**: 505-511.
14. Bidra AS, Taylor TD, Agar JR. Computer-aided technology for fabricating complete dentures: Systematic review of historical background, current status, and future perspectives (2013). *The journal of prosthetic dentistry* **109**: 361-366.
15. Brown MW, Koroluk L, Ko C-C, Zhang K, Chen M, Nguyen T. Effectiveness and efficiency of a CAD/CAM orthodontic bracket system (2015 ). *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics* **148**: 1067-1074.

16. Buduru S, Talmaceanu D, Baru O, Buduru R, Szuhaneck C, Mesaros A. CAD-CAM Occlusal Splints: Milling and Printing Methods (2019). *Revista de chimie (Bucuresti)* **69**: 3461-3463.
17. Chae H-J, Kang J-S, Byun J-O, Han K-S, Kim D-U, Oh S-M, Kim H-M, Chae S-W, Kim H-R. Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts (2000). *Pharmacological Research* **42**: 373-381.
18. Constantiniuc M, Manole M, Bacali C, Ispas A, Popa D, Burde AV, Baciuc S. Benefits of using CAD/CAM technology in dental prosthetics (2021). *International journal of medical dentistry* **25**: 124-131.
19. Dawood A, Marti Marti B, Sauret-Jackson V, Darwood A. 3D printing in dentistry (2015). *British Dental Journal* **219**: 521-529.
20. de Souza Costa CA, Hebling J, Scheffel DLS, Soares DGS, Basso FG, Ribeiro APD. Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques (2014). *Dental materials* **30**: 769-784.
21. Degtarev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases (2003). *Oncogene* **22**: 8543-8567.
22. Duret F, Blouin J-L, Duret B. CAD-CAM in dentistry (1988). *The Journal of the American Dental Association* **117**: 715-720.
23. Engelmann J, Janke V, Volk J, Leyhausen G, Von Neuhoff N, Schlegelberger B, Geurtsen W. Effects of BisGMA on glutathione metabolism and apoptosis in human gingival fibroblasts in vitro (2004). *Biomaterials* **25**: 4573-4580.
24. Fan D, Li Y, Wang X, Zhu T, Wang Q, Cai H, Li W, Tian Y, Liu Z. Progressive 3D Printing Technology and Its Application in Medical Materials (2020). *Frontiers in pharmacology* **11**: 122-122.
25. Ferracane JL. Current trends in dental composites (1995). *Critical reviews in oral biology and medicine* **6**: 302-318.
26. Ferracane JL. Resin composite - State of the art (2001). *Dental materials* **27**: 29-38.
27. Frazier JM, Tyson CA, McCarthy C, McCormick JJ, Meyer D, Powis G, Ducat L. Potential Use of Human Tissues for Toxicity Research and Testing (1989). *Toxicology and applied pharmacology* **97**: 387-397.
28. Galhano GÁP, Pellizzer EP, Mazaro JVQ. Optical Impression Systems for CAD-CAM Restorations (2012). *The Journal of craniofacial surgery* **23**: e575-e579.
29. GC-EUROPE-N.V. GC Temp PRINT, Gebrauchsanweisung (2020). Journal
30. Geurtsen W. Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements (1998). *European journal of oral sciences* **106**: 687-695.
31. Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials (2000). *Critical reviews in oral biology and medicine* **11**: 333-355.
32. Goldberg M. In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review (2007). *Clinical oral investigations* **12**: 1-8.

33. Goldberg M, Dimitrova-Nakov S, Schmalz G. BPA from dental resin material: where are we going with restorative and preventive dental biomaterials? (2014). *Clinical oral investigations* **18**: 347-349.
34. Grange RD, Thompson JP, Lambert DG. Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays (2014). *British journal of anaesthesia* **112**: 213-216.
35. Grayson WL, Martens TP, Eng GM, Radisic M, Vunjak-Novakovic G. Biomimetic Approach to Tissue Engineering (2009). *Seminars in cell & developmental biology* **20**: 665-673.
36. Groth C, Neal KD, Shirck JM. Incorporating Three-Dimensional Printing in Orthodontics (2018). *Journal of clinical orthodontics* **52**: 28-33.
37. Hawksworth GM. Advantages and Disadvantages of Using Human Cells for Pharmacological and Toxicological Studies (1994). *Human & experimental toxicology* **13**: 568-573.
38. Hegedus T, Kreuter P, Kismarci-Antalffy AA, Demeter T, Banyai D, Vegh A, Geczi Z, Hermann P, Payer M, Zsembery A, Al-Hassiny A, Mukaddam K, Herber V, Jakse N, Vegh D. User Experience and Sustainability of 3D Printing in Dentistry (2022). *International journal of environmental research and public health* **19**: 1921.
39. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response (1990). *Biochemical journal* **265**: 621-636.
40. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease (2015). *Nature immunology* **16**: 448-457.
41. Ilie N. Neue Komposite – werkstoffkundliche und klinische Bewertung (2017). *Zahnmedizin up2date* **11**: 247-263.
42. International-Standards-Organization. ISO 10993-1 Biological evaluation of medical devices - Part 1: Evaluation and testing within a risk management process (2009a). Journal
43. International-Standards-Organization. ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity (2009b). Journal
44. International-Standards-Organization. ISO 7405 Dentistry - Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry (2018). Journal
45. Ivoclar-Vivadent. Telio CAD, Monolithic Solutions, Gebrauchsinformation (2017a). Journal
46. Ivoclar-Vivadent. Tetric CAD, Gebrauchsinformation (2017b). Journal
47. Ivoclar-Vivadent. Tetric Evo Ceram, Gebrauchsinformation (2017c). Journal
48. Jaina P, Kuthe AM. Feasibility Study of manufacturing using rapid prototyping: FDM Approach (2013). *Procedia engineering* **63**: 4-11.
49. Janani K, Teja KV, Sandhya R, Alam MK, Al-Qaisi RK, Shrivastava D, Alnusayri MO, Alkhalaf ZA, Sghaireen MG, Srivastava KC. Monomer Elution from Three Resin Composites at Two Different Time Interval Using High Performance Liquid Chromatography - An In-Vitro Study (2021). *Polymers* **13**: 4395.

50. Janda R. Toxikologie der polymerisierbaren Füllungsmaterialien (2007). *DFZ*
51. Joda T, Zarone F, Ferrari M. The complete digital workflow in fixed prosthodontics: a systematic review (2017). *BMC oral health* **17**: 124-124.
52. Jönsson D, Nebel D, Bratthall G, Nilsson BO. The human periodontal ligament cell: a fibroblastlike cell acting as an immune cell (2010). *Journal of periodontal research* **46**: 153-157.
53. Kedjarune U, Charoenworoluk N, Koontongkaew S. Release of methyl methacrylate from heat-cured and autopolymerized resins: Cytotoxicity testing related to residual monomer (1999). *Australian dental journal* **44**: 25.
54. Kessler A, Hickel R, Reymus M. 3D Printing in Dentistry - State of the Art (2020). *Operative dentistry* **45**: 30-40.
55. Khorsandi D, Fahimipour A, Abasian P, Saber SS, Seyedi M, Ghanavati S, Ahmad A, De Stephanis AA, Taghavinezhaddilami F, Leonova A, Mohammadinejad R, Shabani M, Mazzolai B, Mattoli V, Tay FR, Makvandi P. 3D and 4D printing in dentistry and maxillofacial surgery: Printing techniques, materials, and applications (2021). *Acta biomaterialia* **122**: 26-49.
56. Kim E-C, Park H, Lee S-I, Kim S-Y. Effect of the Acidic Dental Resin Monomer 10-methacryloyloxydecyl Dihydrogen Phosphate on Odontoblastic Differentiation of Human Dental Pulp Cells (2015). *Basic & clinical pharmacology & toxicology* **117**: 340-349.
57. Korn T, Hiltensperger M. Role of IL-6 in the commitment of T cell subsets (2021). *Cytokine (Philadelphia, Pa.)* **146**: 155654-155654.
58. Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C-Y, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice (1996). *Nature (London)* **384**: 368-372.
59. Kumar S. Caspase function in programmed cell death (2007). *Cell death and differentiation* **14**: 32-43.
60. Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA, Booth CJ, Menal WZ, Inayat I, Flavell RA. Caspases 3 and 7: Key Mediators of Mitochondrial Events of Apoptosis (2006). *Science (American Association for the Advancement of Science)* **311**: 847-851.
61. Lanza CRM, de Souza Costa CA, Furlan M, Alécio A, Hebling J. Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems (2008). *Cell biology and toxicology* **25**: 533-543.
62. Larner SF, McKinsey DM, Hayes RL, Wang KKW. Caspase 7: increased expression and activation after traumatic brain injury in rats (2005). *Journal of neurochemistry* **94**: 97-108.
63. Lee AY, An J, Chua CK. Two-Way 4D Printing: A Review on the Reversibility of 3D-Printed Shape Memory Materials (2017). *Engineering* **3**: 663-674.
64. Lee DH, Lim B-S, Lee Y-K, Ahn S-J, Yang H-C. Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures (2006). *Dental materials* **22**: 1086-1092.

65. Leprince JG, Palin WM, Hadis MA, Devaux J, Leloup G. Progress in dimethacrylate-based dental composite technology and curing efficiency (2012). *Dental materials* **29**: 139-156.
66. Liaw C-Y, Guvendiren M. Current and emerging applications of 3D printing in medicine (2017). *Biofabrication* **9**: 024102-024102.
67. Ligon SC, Liska R, Stampfl J, Gurr M, Mülhaupt R. Polymers for 3D Printing and Customized Additive Manufacturing (2017). *Chemical reviews* **117**: 10212-10290.
68. Ma CS, Deenick EK, Batten M, Tangye SG. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells (2012). *The Journal of experimental medicine* **209**: 1241-1253
69. Mainjot AK, Dupont NM, Oudkerk JC, Dewael TY, Sadoun MJ. From Artisanal to CAD-CAM Blocks: State of the Art of Indirect Composites (2016). *Journal of Dental Research* **95**: 487-495.
70. Martin CB, Chalmers EV, McIntyre GT, Cochrane H, Mossey PA. Orthodontic scanners: what's available? (2015). *Journal of orthodontics* **42**: 136-143.
71. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications (1984). *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **247**: 125-142.
72. Melchels FPW, Feijen J, Grijpma DW. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering (2010). *Biomaterials* **31**: 6121-6130.
73. Mian M, Delpachitra S, Ackland D, Fink S, Wang N, Dimitroulis G. Three- dimensional printing in oral and maxillofacial surgery: Current landscape and future directions (2021). *Oral surgery* **00**:
74. Miyazaki T, Hotta Y. CAD/CAM systems available for the fabrication of crown and bridge restorations (2011). *Australian dental journal* **56**: 97-106.
75. Miyazaki T, Hotta Y, Kunii J, Kuriyama S, Tamaki Y. A review of dental CAD/CAM: current status and future perspectives from 20 years of experience (2009). *Dental Materials Journal* **28**: 44-56.
76. Morimoto S, Rebello de Sampaio FBW, Braga MM, Sesma N, Özcan M. Survival Rate of Resin and Ceramic Inlays, Onlays, and Overlays: A Systematic Review and Meta-analysis (2016). *Journal of Dental Research* **95**: 985-994.
77. Mörmann WH. The evolution of the CEREC system (2006). *The Journal of the American Dental Association* **137**: 7S-13S.
78. Nestic D, Schaefer BM, Sun Y, Saulacic N, Sailer I. 3D Printing Approach in Dentistry: The Future for Personalized Oral Soft Tissue Regeneration (2020). *Journal of clinical medicine* **9**: 2238.
79. NextDent. Instruction Use - NextDent™ C&B (Crown & Bridge) (2016). Journal
80. Olea N, Pulgar R, Pérez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, Pedraza V, Soto AM, Sonnenschein C. Estrogenicity of Resin-Based Composites and Sealants Used in Dentistry (1996). *Environmental health perspectives* **104**: 298-305.

81. Papadiochou S, Pissiotis AL. Marginal adaptation and CAD-CAM technology: A systematic review of restorative material and fabrication techniques (2018). *The Journal of prosthetic dentistry* **119**: 545-551.
82. Persson ASK, Odén A, Andersson M, Sandborgh-Englund G. Digitization of simulated clinical dental impressions: Virtual three-dimensional analysis of exactness (2009). *Dental materials* **25**:
83. Polyzois GL. In vitro Evaluation of Dental Materials (1994). *Clinical Materials* **16**: 21-60.
84. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis (1999). *Cell death and differentiation* **6**: 99-104.
85. Promega-Corporation. Technical Bulletin, Caspase-Glo® 3/7 Assay, Instructions for Use of Products G8090, G8091, G8092 and G8093 (2019). Journal
86. PromoKine. Instruction Manual, Colorimetric Cell Viability Kit I (WST-8) (2016). Journal
87. Quan H, Zhang T, Xu H, Luo S, Nie J, Zhu X. Photo-curing 3D printing technique and its challenges (2020). *Bioactive materials* **5**: 110-115.
88. R&D-Systems I. Quantikine ELISA, Human IL-6 Immunoassay, Catalog Number D6050, S6050, PD6050 (2018). Journal
89. Raigrodski AJ. Contemporary materials and technologies for all-ceramic fixed partial dentures: A review of the literature (2004). *The Journal of prosthetic dentistry* **92**: 557-562.
90. Rashid H, Sheikh Z, Vohra F. Allergic effects of the residual monomer used in denture base acrylic resins (2015). *European journal of dentistry* **9**: 614-619.
91. Reiss B. Clinical results of Cerec inlays in a dental practice over a period of 18 years (2006). *International journal of computerized dentistry* **9**: 11.
92. Revilla-Leon M, Besne-Torre A, Sanchez-Rubio JL, Fabrega JJ, Ozcan M. Digital tools and 3D printing technologies integrated into the workflow of restorative treatment: A clinical report (2019). *The Journal of prosthetic dentistry* **121**: 3-8.
93. Reymus M, Fotiadou C, Kessler A, Heck K, Hickel R, Diegritz C. 3D printed replicas for endodontic education (2019). *International Endodontic Journal* **52**: 123-130.
94. Reymus M, Hickel R, Keßler A. Accuracy of CAD/CAM-fabricated bite splints: milling vs 3D printing (2020). *Clinical oral investigations* **24**: 4607-4615.
95. Rose-John S. IL-6 Trans-Signaling via the Soluble IL-6 Receptor: Importance for the Pro-Inflammatory Activities of IL-6 (2012). *International journal of biological sciences* **8**: 1237-1247.
96. Rose-John S. Interleukin-6 Family Cytokines (2018). *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **10**: a028415.
97. Rouzé l'Alzit F, Cade R, Naveau A, Babilotte J, Meglioli M, Catros S. Accuracy of commercial 3D printers for the fabrication of surgical

- guides in dental implantology (2022). *Journal of dentistry* **117**: 103909-103909.
98. Rudolph H, Schöne C, Luthardt RG. Einfluss der Digitalisierung auf die erreichbare Präzision CAD/CAM-gefertigter zahnmedizinischer Restaurationen (2004). *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* **59**: 73-77.
  99. Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: Definition, Mechanisms, and Relevance to Disease (1999). *American journal of medicine* **107**: 489-506.
  100. Salah M, Tayebi L, Moharamzadeh K, Naini FB. Three-dimensional bio-printing and bone tissue engineering: technical innovations and potential applications in maxillofacial reconstructive surgery (2020). *Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery* **42**: 18-18.
  101. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6 (2011). *Biochimica et biophysica acta* **1813**: 878-888.
  102. Schmalz G. Strategies to Improve Biocompatibility of Dental Materials (2014). *Current oral health reports* **1**: 222-231.
  103. Schmalz G, Gröppl F, Hiller K-A, Galler KM. Three-Dimensional Human Cell Cultures for Cytotoxicity Testing of Dental Filling Materials (2014). *Acta stomatologica croatica* **48**: 99-108.
  104. Schweiger J, Edelhoff D, Güth J-F. 3D Printing in Digital Prosthetic Dentistry: An Overview of Recent Developments in Additive Manufacturing (2021). *Journal of clinical medicine* **10**: 2010.
  105. Schweiger J, Kieschnick A. CAD/CAM in der digitalen Zahnheilkunde. 2017: teamwork media GmbH, Fuchstal.
  106. Scribante A, Gallo S, Pascadopoli M, Canzi P, Marconi S, Montasser MA, Bressani D, Gandini P, Sfondrini MF. Properties of CAD/CAM 3D Printing Dental Materials and Their Clinical Applications in Orthodontics: Where Are We Now? (2022). *Applied sciences* **12**: 551.
  107. Shah P, Chong BS. 3D imaging, 3D printing and 3D virtual planning in endodontics (2018). *Clinical oral investigations* **22**: 641-654.
  108. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases (2015). *Cell death and differentiation* **22**: 526-539.
  109. Shenoy VK, Prabhu B. Computer-aided design/computer-aided manufacturing in dentistry – Future is present (2015). *Journal of Interdisciplinary Dentistry* **5**: 60.
  110. Skorulska A, Piszko P, Rybak Z, Szymonowicz M, Dobrzynski M. Review on Polymer, Ceramic and Composite Materials for CAD/CAM Indirect Restorations in Dentistry—Application, Mechanical Characteristics and Comparison (2021). *Materials* **14**: 1592.
  111. Soung YH, Lee JW, Kim HS, Park WS, Kim SY, Lee JH, Park JY, Cho YG, Kim CJ, Park YG, Nam SW, Jeong SW, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. Inactivating mutations of CASPASE-7 gene in human cancers (2003). *Oncogene* **22**: 6104-6108.
  112. Srinivasan M, Kalberer N, Fankhauser N, Naharro M, Maniewicz S, Müller F. CAD-CAM complete removable dental prostheses: A double-

- blind, randomized, crossover clinical trial evaluating milled and 3D-printed dentures (2021). *Journal of dentistry* **115**: 103842-103842.
113. St John KR. Biocompatibility of Dental Materials (2007). *The Dental clinics of North America* **51**: 747-760.
  114. Stansbury JW, Idacavage MJ. 3D printing with polymers: Challenges among expanding options and opportunities (2015). *Dental Materials* **32**: 54-64.
  115. Straumann. Instruction use - P pro Crown & Bridge (2020). *Journal*
  116. Suzuki Y, Shimizu S, Waki T, Shimpo H, Ohkubo C. Laboratory efficiency of additive manufacturing for removable denture frameworks: A literature-based review (2021). *Dental Materials Journal* **40**: 265-271.
  117. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Interleukin (IL-6) Immunotherapy (2018). *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **10**: a028456
  118. Tanveer W, Ridwan-Pramana A, Molinero-Mourelle P, Forouzanfar T. Systematic Review of Clinical Applications of CAD/CAM Technology for Craniofacial Implants Placement and Manufacturing of Orbital Prostheses (2021). *International journal of environmental research and public health* **18**: 11349.
  119. Theilig C, Tegtmeier Y, Leyhausen G, Geurtsen W. Effects of BisGMA and TEGDMA on Proliferation, Migration, and Tenascin Expression of Human Fibroblasts and Keratinocytes (2000). *Journal of Biomedical Materials Research* **6**: 632-639.
  120. Wedekind L, GÜth J-F, Schweiger J, Kollmuss M, Reichl F-X, Edelhoff D, Högg C. Elution behavior of a 3D-printed, milled and conventional resin-based occlusal splint material (2021). *Dental materials* **37**: 701-710.
  121. Wei X, Pan Y, Wang M, Wang Y, Lin H, Jiang L, Lin D, Cheng H. Comparative analysis of leaching residual monomer and biological effects of four types of conventional and CAD/CAM dental polymers: an in vitro study (2022). *Clinical oral investigations* **26**: 2887-2898.
  122. Wendler M, Belli R, Valladares D, Petschelt A, Lohbauer U. Chairside CAD/CAM materials. Part 3: Cyclic fatigue parameters and lifetime predictions (2018). *Dental materials* **34**: 910-921.
  123. Whitaker M. The history of 3D printing in healthcare (2014). *Bulletin of the Royal College of Surgeons of England* **96**: 228-229.
  124. Yang Y, Reichl F-X, Shi J, He X, Hickel R, Högg C. Cytotoxicity and DNA double-strand breaks in human gingival fibroblasts exposed to eluates of dental composites (2018). *Dental materials* **34**: 201-208.
  125. Young JM, Altschuler BR. Laser holography in dentistry (1977). *The Journal of prosthetic dentistry* **38**: 216-225.
  126. Zheng J, Chen X, Jiang W, Zhang S, Chen M, Yang C. An innovative total temporomandibular joint prosthesis with customized design and 3D printing additive fabrication: a prospective clinical study (2019). *Journal of translational medicine* **17**: 4-4.

## 11. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: CAD/CAM Labside- und Chairside-System.....	15
Abbildung 2: Workflow der additiven Fertigung .....	21
Abbildung 3: Verfahren der Stereolithographie .....	23
Abbildung 4: Aufbau Verbundpolymer .....	27
Abbildung 5: Otofash G171 UV-Blitzlichtgerät, Zahnklinik LMU München .....	43
Abbildung 6: WST8-Assay-Mechanismus .....	45
Abbildung 7: schematisches Protokoll des Caspase-Assays.....	48
Abbildung 8: IL-6-ELISA, Erstellung einer Standardverdünnungsreihe (SD: Human IL-6 Standard, CD: Calibrator Diluent; modifiziert nach R&D-Systems, 2018).....	51
Abbildung 9: ELISA, 96er-Well-Platte, Farbwechsel zu Gelb.....	52
Abbildung 10: Ergebnisse des WST-8-Assays, Zellüberlebensrate .....	54
Abbildung 11: Ergebnisse des Caspase-Assays, Caspasenaktivität; <sup>a</sup> p = 0,018, <sup>b</sup> p = 0,022 (Mann-Whitney-U-Test).....	56
Abbildung 12: ELISA, Standardkurve IL-6-Verdünnungsreihe .....	57
Abbildung 13: Ergebnisse des ELISA, IL-6-Konzentrationen; <sup>a</sup> p = 0,002, <sup>b</sup> p = 0,043, <sup>c</sup> p < 0,001, <sup>d</sup> p = 0,011, <sup>e</sup> p = 0,012 (Dunn-Bonferroni-Post-hoc-Methode).....	58

## 12. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Materialien.....	37
Tabelle 2: Zusammensetzung Materialien laut Hersteller .....	41

### 13. LOT-Nummern-Verzeichnis

Tetric Evo Ceram, Ivoclar Vivadent	Y48205, Y14984, Y45262, Y19487, Y08997, X52693, Y42155, Y04997
Tetric CAD, Ivoclar Vivadent	Z01BB2, Z0159M
Varseo Smile Crown +, BEGO	600324
NextDent C&B (MFH), NextDent	XG181N20
Protemp IV, 3M ESPE	6795491, 7382620
Telio CAD, Ivoclar Vivadent	Z0179Y
Varseo Smile Temp, BEGO	600213
TEMP Print, GC	2008071
P pro Krone und Brücke, Straumann	210514A
Universal Polishing Paste, Ivoclar Vivadent	XL4210

## **14. Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt an erster Stelle Frau Prof. Dr. Karin Huth für die herausragende Betreuung, die Ermöglichung dieser interessanten Arbeit und das Vorantreiben eben dieser.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meinen Mitbetreuern, Herrn Prof. Dr. Jan-Frederik Güth sowie Frau PD Dr. Christine Keul, an welche ich mich ebenfalls jederzeit wenden konnte.

Ein außerordentlicher Dank für die fachliche Unterstützung, die stete Hilfsbereitschaft, die Geduld und die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe gilt Herrn PD Dr. Maximilian Kollmuß.

Gleichermaßen danke ich Frau Dr. Sabina Würsching, welche mir bei Fragen, aber auch bei der Einführung in die Zellkultur hilfsbereit zur Seite stand.

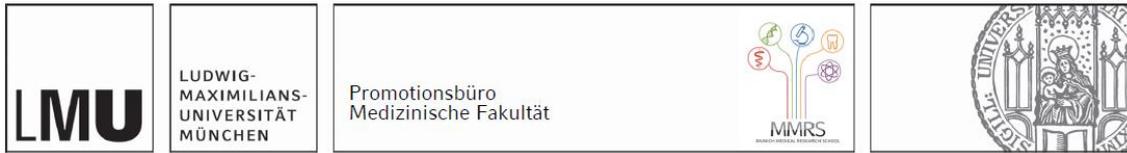
Ich danke sowohl den netten Mitarbeitern des zahntechnischen Labors der Poliklinik für zahnärztliche Prothetik LMU München, explizit Herrn Josef Schweiger, als auch den Mitarbeitern des Dentallabors „Dentaltechnik Kollmuß GmbH“ für die Umsetzung des 3D-Drucks bzw. des Schleifens meiner Materialproben, ohne welche eine Verwirklichung dieser Studie nicht möglich gewesen wäre.

Ein weiterer Dank gilt Frau Brigitte Hackel sowie Frau Dr. Julia Diegelmann des Forschungslabors der Zahnklinik LMU München, welche mir immer bei Fragen hilfsbereit und freundlich zur Verfügung standen.

Großer Dank gilt meinen Freunden Katha, Johannes, Alex und Eva, welche einen nicht zu vernachlässigen Beitrag zu dieser Arbeit leisteten.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meiner Mama, welche mir das Zahnmedizinstudium ermöglichte und mir immer bei der Umsetzung dieser Arbeit zur Seite stand.

## 15. Affidavit



### Eidesstattliche Versicherung

Woitalka, Sophie

Name, Vorname

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

Untersuchung der Biokompatibilität von 3D-Druckmaterialien zur Herstellung von temporären und definitiven Kronen und Brücken: Zytotoxizität, Apoptose und Entzündungsmarker

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, 22.07.24

Sophie Woitalka

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand