

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Falk Schwendicke



***In vitro Untersuchungen zur Biokompatibilität dentaler
Schienenmaterialien für die additive Fertigung***

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Michelle Christine Weishaupt

aus

Mindelheim

Jahr

2025

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

Erster Gutachter: Prof. Dr. Karin Huth

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Jan-Frederik Güth

Dritter Gutachter: PD. Dr. Hisham Sabbagh

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Juli 2025

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
Executive Summary	9
Abbildungsverzeichnis	12
Tabellenverzeichnis	14
Abkürzungsverzeichnis	15
1. Einleitung.....	18
1.1 Okklusionsschienen	18
1.1.1 Die Dysfunktion des Kiefergelenks	18
1.1.2 Therapie von kranio-mandibulärer Dysfunktion, Bruxismus und Myoarthropathien durch Okklusionsschienen in der Zahnheilkunde.....	19
1.2 Herstellungsverfahren und Materialeigenschaften.....	21
1.2.1 Chemische Zusammensetzung und Polymerisationsreaktion	22
1.2.2 Konventionelle Verarbeitung dentaler Kunststoffe zur Herstellung von Schienen	24
1.2.3 Geprägte dentale Kunststoffe	25
1.2.4 Additive Fertigung	25
1.2.5 Besondere Merkmale der Zusammensetzung von Kunststoffen in der additiven Fertigung	28
1.2.6 Anforderungen an Medizinprodukte im Bereich der Biokompatibilität und Zytotoxizität.....	29
2. Fragestellung und Studienziele.....	32
3. Material und Methoden.....	34
3.1 Zellarten und -kulturbedingungen	34
3.2 Routinemethoden in der Zellkultur	35
3.2.1 Auftauen von Zellen	35
3.2.2 Mediumwechsel	35
3.2.3 Subkultivierung der Zellen	35
3.2.4 Bestimmung der Zellzahl	37
3.3 Herstellung der Kunststoffeluate.....	38

3.4	Inhaltsstoffe der verwendeten Polymere.....	39
3.5	Spezielle Methoden und Anwendungen	41
3.5.1	Gewinnung von Zellüberständen	41
3.5.2	Kolorimetrische Analyse der Zell-Viabilität.....	42
3.5.3	Nachweis von oxidativem Stress durch Glutathion Messung	43
3.5.4	ELISA auf IL-6.....	46
3.5.5	Untersuchung von Apoptose und Nekrose mit luziferasemarkiertem Annexin V und fluoreszierender DNA-Färbung in Echtzeit.....	50
3.6	Statistische Auswertung.....	52
4.	Ergebnisse.....	53
4.1	Kolorimetrische Analyse der Zellviabilität mittels WST-8.....	53
4.2	Messung von intrazellulärem GSH/GSSG zur Beurteilung von oxidativem Stress.....	55
4.3	ELISA auf IL-6.....	57
4.4	Annexin V Nachweis zur Untersuchung von Apoptose- und Nekroseverhalten.....	59
5.	Diskussion.....	65
	Literaturverzeichnis	81
	Appendix	96
	Danksagung	97
	Affidavit	98

Zusammenfassung

Zielsetzung:

Ziel der Arbeit war es, biologische Auswirkungen von Eluaten 3D-gedruckter Kunststoffe auf Zellen der Mundschleimhaut zu untersuchen. Dazu wurden die hier gefundenen Ergebnisse denen der Untersuchung herkömmlicher gepresster und gefräster Materialien gegenübergestellt und hinsichtlich der Biokompatibilität ausgewertet.

Material und Methoden:

Untersucht wurden die gedruckten Materialien SHERAprint-ortho plus (SPO), NextDent Ortho Clear (NDO), Dental LT Clear (FLD) und LuxaPrint Ortho Plus (LPO) sowie die bisher üblicheren Schienenmaterialien aus Gießverfahren (PalaXpress (XPX)) und Frästechnik (SheraDisc Ortho PM20 (SDP)). Entsprechend den Herstellerangaben wurden Probenplättchen mit einem Durchmesser von 2 cm und 4 mm Dicke hergestellt. Um eine praxisnahe Verarbeitung zu simulieren, wurden die Scheiben anschließend einseitig poliert und in je 2,5 ml Zellkulturmedium eluiert. Nach sieben Tagen Inkubation bei 5% CO₂, 37°C und 100% Luftfeuchtigkeit wurde das Medium abgesaugt, gepoolt, filtriert und bei -20 °C eingefroren. Die Eluate konnten somit in den nachfolgenden Experimenten pur oder verdünnt im Verhältnis 1:1, 1:5 oder 1:10 verwendet werden.

Es wurden in vitro Versuche durchgeführt, die Aufschluss über die Intaktheit der Atmungskette und damit die Vitalität der Zellen (WST-8, CCVK-I, PromoCell, Heidelberg, Deutschland), die Aktivität der Entzündungskaskade (ELISA auf IL-6, Research and Diagnostic Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA), das Ausmaß des oxidativen Stresses (Glutathion-Assay, Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA) und das Apoptose- und Nekroseverhalten (Annexin V Assay, Promega Corporation) geben sollten.

Hierzu wurden humane Gingivafibroblasten (hGF-1) und humane Plattenepithelkarzinomzellen (BHY) (jeweils bezogen von LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland) zur späteren Verwendung in Medium kultiviert.

Mithilfe von Excel und Python in Jupiter Notebook wurden die Ergebnisse der Versuche ausgewertet. Dazu fanden die statistischen Tests Welch's ANOVA mit Games-Howell post-hoc-Test, einfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen und der Friedman-Test mit Nemenyi post-hoc-Test Anwendung. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,05$ verwendet.

Ergebnisse:

Der WST-8-Versuch wurde in fünf unabhängigen Versuchsdurchläufen und je drei technischen Replikaten durchgeführt. Es zeigte sich, dass alle pur verwendeten Kunststoffproben die prozentuale Viabilität der Zellen auf unter 70% gegenüber der Negativkontrolle mit Wachstumsmedium verringerten. Im Falle der BHY-Zellen waren diese Ergebnisse signifikant: Für Formlabs Dental LT Clear betrug die Viabilität 53,17% ($p=.001$), bei PalaXpress 58,59% ($p=.006$), bei SHERAdisc PM20 36,92% ($p=.001$), bei SHERAprint-ortho plus 40,40% ($p=.001$) und bei NextDent Ortho Clear 40,91% ($p=.001$). Außerdem wurde eine Tendenz erkennbar, die vermuten lässt, dass eine stärkere Verdünnung des jeweiligen Eluates eine bessere Zellviabilität zur Folge hat (nicht signifikant). Ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich waren die gefundenen Werte verschiedener Eluate gleicher Konzentration untereinander. Aufgrund der Ergebnisse kann also darauf geschlossen werden, dass die verwendeten Probenmaterialien konzentrations- und eventuell auch materialabhängig zytotoxische Wirkung auf die Vitalität von Zellen der Mundschleimhaut haben.

Keine signifikanten Unterschiede zwischen Kunststoffeluat und der Negativkontrolle in der Entzündungsreaktion ergab das Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) auf IL-6. Es wurden vier unabhängige Versuchsdurchläufe mit je zwei technischen Replikaten untersucht. Die absoluten Werte aller Materialproben bewegten sich leicht unterhalb des Normbereichs für Gingivafibroblasten von circa 0,5 ng/ml und waren mit Werten zwischen 18,33 pg/ml bis 13,48 pg/ml nicht signifikant unterschiedlich. Somit kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die hier verwendeten Eluate - wenn überhaupt - einen leicht hemmenden Effekt auf die Entzündungsreaktion haben können.

Im Glutathionversuch zeigt ein Wert von unter zehn für das Verhältnis von GSH zu GSSG oxidativen Stress an, welcher nur von der Positivkontrolle unterschritten wurde. Es wurden drei unabhängige Versuchsdurchläufe durchgeführt. Alle Vertreter der 3D gedruckten Schienenmaterialien wiesen, verglichen mit Vertretern aus herkömmlicher Herstellung, Frästechnik und gegenüber der Negativkontrolle, ein höheres Stresslevel auf (nicht signifikant). Der oxidative Stress der Zellen ist somit bei 3D gedruckten Materialien in diesem Versuchsaufbau leicht erhöht und liegt für das Verhältnis GSH/GSSG zwischen 14,93 für LPO und 28,63 für NDO.

Zuletzt wurde für die simultane Untersuchung von Apoptose und Nekrose über eine Zeitspanne von 24h (mit Messungen nach 1h, 2h, 4h, 8h, 12h und 24h) das Annexin-V-Assay benutzt, welches in vier biologischen Replikaten durchgeführt wurde. Als Positivkontrolle diente Staurosporin in den Konzentrationen 1, 0,5 und $0,2 \frac{\mu\text{mol}}{\text{l}}$. In dieser Arbeit zeigte sich eine signifikante Verringerung der relativen Apoptose gegenüber der Negativkontrolle im Falle von SPO pur ($p=.044$) und FLD pur ($p=.019$). Auch die anderen pur verwendeten Eluate reduzierten die Apoptose der Zellen gegenüber der Negativkontrolle (nicht signifikant). Diese apoptoseinhibierende Wirkung ließ über den Messzeitraum von 24h bei allen Proben signifikant nach ($p<.05$), und näherte sich immer weiter den Ergebnissen für das Medium (Negativkontrolle) an. Die relative Nekrose bewegte sich für pur verwendete Eluate PXP, SDP, SPO und NDO leicht unterhalb, für FLD und LPO teilweise leicht oberhalb der des Mediums. Ein typisches Muster für das Apoptose- und Nekroserieverhalten der Zellen nach Beprobung mit den Eluaten konnte nicht gefunden werden, wohingegen der Versuchsaufbau mit Staurosporin das typische Bild einer programmierten Apoptose mit passiver, sekundärer Nekrose ergab.

Schlussfolgerung:

Besonders im Hinblick auf die hohe mechanische Belastung, lange Tragedauer und Lagebeziehung der okklusalen Aufbissbehelfe zum Gewebe der Mundschleimhaut sind unabhängige Untersuchungen und Tests, die

Biokompatibilität der am Patienten zum Einsatz kommenden Materialien betreffend, unerlässlich.

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen dieser Studie keine eindeutige Bevorzugung eines Materials oder einer Materialgruppe abgeleitet werden. Jedoch können in der Praxis vorkommende lokale Schleimhautirritationen nach Verwendung der Materialien durch Zytotoxizität und oxidativen Stress der Zellen nicht ausgeschlossen werden.

Ursächlich für die Reaktionen der Zellen in den Versuchen werden verschiedene aus den Kunststoffen herausgelöste Bestandteile wie unpolymerisierte Monomere, aber auch Polymerisationsinitiatoren und andere Additive gesehen. Untersuchungen über deren Art, Konzentration im Speichel und Einfluss auf Zellen in vitro und vivo sind notwendig, um alle biologischen Mechanismen nachvollziehen und die Eignung von Materialien aus dem 3D Druck vollumfänglich beurteilen zu können.

Executive Summary

Objective:

The aim of this study was to investigate the biological effects of 3D printed resin eluates on oral mucosal cells. To this end, the results obtained here were compared with those obtained from the investigation of conventionally moulded and milled materials and evaluated with regard to biocompatibility.

Materials and methods:

The printed materials SHERAprint-ortho plus (SPO), NextDent Ortho Clear (NDO), Dental LT Clear (FLD) and LuxaPrint Ortho Plus (LPO) as well as the more common splint materials from the casting (PalaXpress (PXP)) and milling (SheraDisc Ortho PM20 (SDP)) techniques were analysed. Sample discs with a diameter of 2 cm and a thickness of 4 mm were produced according to the manufacturer's specifications. To simulate practical processing, the discs were then polished on one side and eluted in 2.5 ml of cell culture medium each. After seven days of incubation at 5% CO₂, 37°C and 100% humidity, the medium was aspirated, pooled, filtered and frozen at -20°C. The eluates could then be used pure or diluted 1:1, 1:5 or 1:10 in the subsequent experiments.

In vitro tests were performed to determine the integrity of the respiratory chain and thus the vitality of the cells (WST-8, CCVK-I, PromoCell, Heidelberg, Germany), the activity of the inflammatory cascade (ELISA on IL-6, Research and Diagnostic Systems, Inc, Minneapolis, MN, USA), the extent of oxidative stress (glutathione assay, Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA) and the apoptosis and necrosis pattern (Annexin V assay, Promega Corporation).

For this purpose, human gingival fibroblasts (hGF-1) and human squamous carcinoma cells (BHY) (both purchased from LGC Standards GmbH, Wesel, Germany) were cultured in medium for later use.

The results of the experiments were analysed using Excel and Python in Jupiter Notebook. The statistical tests used were Welch's ANOVA with Games-Howell post-hoc test, one-factor repeated measures analysis of variance and Friedman's test with Nemenyi post-hoc test. The significance level used was $\alpha=0.05$.

Results:

The WST-8 experiment was carried out in 5 independent runs with 3 technical replicates each. It was found that all the pure plastic samples used reduced the percentage viability of the cells to below 70% compared to the negative control of growth medium. In the case of BHY cells, these results were significant: for Formlabs Dental LT Clear, viability was 53.17% ($p=.001$), for PalaXpress 58.59% ($p=.006$), for SHERAdisc PM20 36.92% ($p=.001$), for SHERAprint-ortho plus 40.40% ($p=.001$) and for NextDent Ortho Clear 40.91% ($p=.001$). In addition, there was a trend suggesting that a higher dilution of each eluate resulted in better cell viability (not significant). The values found for different eluates of the same concentration were also not significantly different. Based on the results, it can be concluded that the sample materials used have a concentration-dependent and possibly also material-dependent cytotoxic effect on the vitality of oral mucosa cells.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for IL-6 showed no significant differences in inflammatory response between plastic eluates and the negative control. Four independent runs were analysed, each with two technical replicates. The absolute values of all material samples were slightly below the normal range for gingival fibroblasts of approximately 0.5 ng/ml and were not significantly different with values ranging from 18.33 pg/ml to 13.48 pg/ml. It can therefore be concluded that the eluates used here may have a slight inhibitory effect, if any, on the inflammatory response.

In the glutathione experiment, a value of less than ten for the ratio of GSH to GSSG indicates oxidative stress, which was only undercut by the positive control. Three independent experiments were performed. All of the 3D printed splint materials showed a higher level of stress (not significant) compared to the conventional production, milling technology and negative control. The oxidative stress of the cells is therefore slightly increased for the 3D printed materials in this test setup and ranges between 14.93 for LPO and 28.63 for NDO for the GSH/GSSG ratio.

Finally, the Annexin V assay was used for the simultaneous study of apoptosis and necrosis over a 24-hour period (with measurements at 1, 2, 4, 8, 12 and 24 hours), performed in four biological replicates. Staurosporine at concentrations of 1, 0.5 and $0.2 \frac{\mu\text{mol}}{\text{l}}$ was used as a positive control. This study showed a significant reduction in relative apoptosis compared to the negative control in the case of SPO pure ($p=.044$) and FLD pure ($p=.019$). The other pure eluates also reduced cell apoptosis compared to the negative control (not significant). This antiapoptotic effect decreased significantly for all samples over the 24-hour measurement period ($p<.05$) and increasingly approached the results for the medium (negative control). The relative necrosis for the pure eluates PXP, SDP, SPO and NDO was slightly below that of the medium, for FLD and LPO in some cases slightly above that of the medium. No typical pattern of apoptosis and necrosis behaviour of the cells after sampling could be found with the eluates, whereas the experimental set-up with staurosporine gave the typical picture of programmed apoptosis with passive secondary necrosis.

Conclusion:

Independent investigation and testing of the biocompatibility of materials used in patients is essential, particularly because of the high mechanical load, prolonged wearing time and physical proximity of occlusal devices to oral mucosal tissues.

In conclusion, the results of this study do not indicate a clear preference for one material or group of materials. However, local irritation of the mucosa after use of the materials due to cytotoxicity and oxidative stress of the cells cannot be entirely excluded.

Various components released from the plastics, such as unpolymerised monomers, but also polymerisation initiators and other additives, are considered to be the cause of the cell reactions in the tests. Investigations into their nature, concentration in saliva and effect on cells in vitro and vivo are needed to understand all the biological mechanisms and fully assess the suitability of 3D printed materials.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Chemisch Strukturformeln von Bis-GMA, UDMA, TEGDMA und HEMA [Krifka et al., 2013]	22
Abbildung 2:	Erste schematische Darstellung des Stereolithographieverfahrens, patentiert von Charls Hull 1984 (21: Behälter, 22: UV-härtende Flüssigkeit, 23: Arbeitsfläche, 26: programmierbare UV-Lichtquelle, 27: beweglicher Lichtpunkt, 28: programmierbarer Computer, 29: bewegliche Bauplattform, 30: dreidimensionales Bauobjekt, 30a/ 30b/ 30c: einzelne Bauschichten) [Hull, 1984]	26
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des Digital Light Processing (DLP) Verfahrens [Bae und Kim, 2021].....	27
Abbildung 4:	Mikroskopische Aufnahme von hGF-1 Zellen (10fache Vergrößerung).....	36
Abbildung 5:	Mikroskopische Aufnahme von BHY Zellen (10fache Vergrößerung).....	36
Abbildung 6:	Mechanismus des Farbumschlags im WST-8 Assay (1-Methoxy PMS: 1-Methoxyphenazin Methosulfat, NADH: Nicotinamadenindinukleotidhydrid, NADPH: Nicotinamadenindinukleotidphosphat, NAD: Nicotinamadenindinukleotid, NADP: Nicotinsäureamidadenindinukleotidphosphat) [PromoCell GmbH, 2021].....	42
Abbildung 7:	Zellviabilitätsversuch bei BHY-Zellen nach Hinzufügen des WST-8 Reagenz.....	43
Abbildung 8:	Pipettierschema Glutathion Verdünnungsreihe.....	45
Abbildung 9:	Schematische Darstellung des Glutathion Assay (GSH: Glutathion, GSSG: Glutathiondisulfid, GST: Glutathion-S-Transferasen, ATP: Adenosintriphosphat) [Promega GmbH, 2021a].....	46

Abbildung 10:	Jak/Stat-Signalweg (in embryonalen Stammzellen) [Cell Signaling Technology, 2022].....	47
Abbildung 11:	Verdünnungsreihe von IL-6.....	48
Abbildung 12:	Schematische Darstellung eines Sandwich ELISA [Bio-Techne, 2022]	49
Abbildung 13:	Schematische Darstellung des Annexin V Apoptose und Nekrose Assay [Promega GmbH, 2021b]	51
Abbildung 14:	Ergebnisse des „WST-8“ nach 48 h Inkubation bei BHY-Zellen (Messung 2 Stunden nach Versuchsbeginn)	53
Abbildung 15:	Ergebnisse des „WST-8“ nach 48h Inkubation bei hGF-1-Zellen (Messung 2 Stunden nach Versuchsbeginn)	54
Abbildung 16:	Ergebnisse des „WST-8“ nach 48h Inkubation, Vergleich von BHY- und hGF-Zellen (Messung 2 Stunden nach Versuchsbeginn)	55
Abbildung 17:	Standardkurve von totalem und oxidiertem Glutathion	56
Abbildung 18:	Konzentrationen von GSH und GSSG	56
Abbildung 19:	Ergebnisse des „Glutathion Assays“	57
Abbildung 20:	Standardkurve von IL-6.....	58
Abbildung 21:	Ergebnisse des „IL-6 ELISAs“	59
Abbildung 22:	Ergebnisse des „Apoptose-/ Nekrose-Assays“ bei Verwendung von Staurosporin in verschiedenen Konzentrationen	60
Abbildung 23:	Ergebnisse der Lumineszenzmessung nach 8 h Inkubation....	61
Abbildung 24:	Ergebnisse der Fluoreszenzmessung nach 24 h Inkubation ...	62
Abbildung 25:	Ergebnisse der Lumineszenzmessung purer Kunststoffproben über den Zeitraum von 24 h.....	62
Abbildung 26:	Ergebnisse der Fluoreszenzmessung purer Kunststoffproben über den Zeitraum von 24 h.....	63
Abbildung 27:	Ergebnisse der Lumineszenzmessung purer Kunststoffproben über den Zeitraum von 24 h im Vergleich zu Staurosporin	64
Abbildung 28:	Ergebnisse der Fluoreszenzmessung purer Kunststoffproben über den Zeitraum von 24 h im Vergleich	

	zu Staurosporin	64
Abbildung 29:	Zerfall von Dibenzoylperoxid in zwei Radikale [Ravve, 2013]	67
Abbildung 30:	Mechanismus der Spaltung von Bisacrylphosphineoxiden (BAPO) durch Photoinitiation ($h\nu$: Photonenenergie) [Ikemura et al., 2017]	67
Abbildung 31:	Schematische Darstellung eines 3D Druckers und Grafik über die Konversion im Polymer [Vitale und Cabral, 2016].....	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Endpunkte der Bewertung auf biologische Risiken [ISO.org, 2022]	31
Tabelle 2:	Vom Hersteller angegebene Inhaltsstoffe des Materials PalaXpress.....	39
Tabelle 3:	Vom Hersteller angegebene Inhaltsstoffe der Materialien SHERAprint-ortho plus, NextDent Ortho Clear, Formlabs Dental LT Clear und LuxaPrint Ortho Plus.....	41

Abkürzungsverzeichnis

1-Methoxy PMS	1-Methoxyphenazin Methosulfat
3D	<i>drei Dimensionen</i>
ANOVA	<i>einfaktorielle Varianzanalyse</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAPO	Bisacrylphosphineoxide
BHY	<i>Plattenepithelkarzinomzellen</i>
Bis-EDMA	<i>Bisphenol Ethylendimethacrylat</i>
Bis-GMA	<i>Bisphenol A-glycidylmethacrylat</i>
CAD/CAM	<i>Computer-aided design, Computer-aided manufacturing</i>
CCVK-I	<i>Colorimetric Cell Viability Kit I, Colorimetric Cell Viability Kit I</i>
CMD	craniomandibuläre Dysfunktion
Comité Européen de Normalisation	<i>Comité Européen de Normalisation</i>
Deutsches Institut für Normierung e.V.	<i>Deutsches Institut für Normierung e.V.</i>
DGFDT	<i>Deutsche Gesellschaft für Funktionsdiagnostik und -therapie</i>
DLP	<i>Digital Light Processing</i>
DMD	<i>Digital Micromirror Device</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
DTT	<i>Diethiothreitol</i>
EBV	<i>Epstein-Barr-Virus</i>
EC50	<i>Median effective concentration</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EN	<i>Europäische Norm</i>
EWG	<i>europäische Wirtschaftsgemeinschaft</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FDL	<i>Dental LT Clear</i>

GSH	<i>Glutathion in reduzierter Form</i>
GSSG	<i>Glutathion in oxidiert Form</i>
GST	<i>Glutathion-S-Transferase</i>
HEMA	<i>2-Hydroxyethylmethacrylat</i>
hGF-1	<i>humane Gingivafibroblasten</i>
HIV	<i>Humanes Immunodefizienz-Virus</i>
HPV	<i>Humane Papillomviren</i>
IL-6	<i>Interleukin-6</i>
ISO	<i>Internationale Organisation für Normierung</i>
Jak/Stat.....	<i>Januskinase/ Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
LDH	<i>Lactate dehydrogenase</i>
LPO	<i>LuxaPrint Ortho Plus</i>
MMA	<i>Methylmethacrylat</i>
MPG	<i>Medizinproduktegesetz</i>
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazoliumbromid</i>
NAD	<i>Nicotinamidadenindinukleotid</i>
NADH	<i>Nicotinamidadenindinukleotidhydrid</i>
NADP	<i>Nicotinsäureamidadenindinukleotidphosphat</i>
NADPH	<i>Nicotinamidadenindinukleotidphosphat</i>
NDO	<i>NextDent Ortho Clear</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
PBS	<i>Phosphat-gepufferte Salzlösung</i>
PS	<i>Phosphatidylserin</i>
PXP	<i>PalaXpress</i>
ROS	<i>reaktive Sauerstoffspezies</i>
SDP	<i>SHERAdisc PM20</i>
SLA	<i>Stereolithographie</i>
SPO	<i>SHERAprint-ortho plus</i>

STL	<i>Standard Triangle Language</i>
TEGDMA	<i>Triethylenglycoldimethacrylat</i>
TMD	<i>temporomandibuläre Dysfunktion</i>
TNF- α	<i>Tumornekrosefaktor Alpha</i>
Trypsin-EDTA	<i>Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure</i>
UDMA	<i>Urethandimethacrylat</i>
UV	<i>ultraviolett</i>
WST-1.....	<i>water-soluable-tetrazoliumsalt-1</i>
WST-8.....	<i>water-soluable-tetrazoliumsalt-8</i>
XTT	<i>sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl) -3,4-tetrazolium] -bis</i>
.....	<i>(4-methoxy6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate</i>
α -MEM	<i>Minimum Essential Medium Alpha</i>

1. Einleitung

1.1 Okklusionsschienen

1.1.1 Die Dysfunktion des Kiefergelenks

Die modere Gesellschaft bringt nicht nur Vorteile für Gesundheit und Wohlbefinden des einzelnen mit sich. Beispielsweis potenzieren sich seit Jahren Krankheiten in der Bevölkerung, die unter anderem mit dem Faktor Stress in Verbindung zu bringen sind [Tegethoff *et al.*, 2016]. Neben psychischen Erkrankungen gehören hierzu auch Dys- und Parafunktionen im Zusammenhang mit dem Kiefergelenk [Medeiros *et al.*, 2020, Theroux *et al.*, 2019, Al-Khotani *et al.*, 2016]. Gesch *et al.*, 2004, zeigten, dass fast 50% der erwachsenen Bevölkerung Deutschlands unter mindestens einem klinischen Symptom aus dem Formenkreis der temporomandibulären Dysfunktion (TMD) leiden. Unter dem Begriff temporomandibuläre oder auch craniomandibuläre Dysfunktion (CMD), die in der internationalen Literatur meist synonym verwendet werden, fasst man eine mit oder ohne Schmerz einhergehende gestörte Funktion der Kaumuskulatur, des Kiefergelenks gemeinsam mit anderen assoziierten Strukturen zusammen. Er beschreibt also eine Fehlfunktion oder Funktionsstörung des gesamten stomatognathen Systems [Deutsche Gesellschaft für Zahn- Mund- und Kieferheilkunde e. V. (DGZMK), 2022]. Bis zum Zeitpunkt der Verschriftlichung dieser Arbeit, konnten unter den Begriffen TMD, CMD, Craniomandibular Disorder, Craniomandibular Dysfunction, Temporomandibular Disorder und Temporomandibular Dysfunction, bei einer PubMed-Recherche insgesamt 34.609 Suchergebnisse erzielt werden. Zur Vereinfachung und aus Gründen der teilweise undurchsichtigen und uneinheitlichen Definition wird im Folgenden nur der Begriff CMD (Craniomandibuläre Dysfunktion) verwendet.

Doch nicht nur Stress und andere psychologische Faktoren beeinflussen Erkrankungen im Zusammenhang mit dem Kiefergelenk, sondern auch soziale, biologisch-genetische, biomechanische und neuromuskuläre [Brancher *et al.*, 2019, de Paiva Bertoli *et al.*, 2018, Huang *et al.*, 2002]. Die Ätiologie ist also multifaktoriell, das Resultat einer Gen-Umwelt Interaktion, die aufgrund ihrer

Komplexität noch nicht vollständig verstanden ist. Erstmalig wurde ein solches biopsychosoziales Model von Engel, 1978, vorgestellt.

Ebenso vielfältig wie die Ätiologie sind auch die Symptome, die vom Leitsymptom des Schmerzes im Schädel- und Wirbelsäulenbereich mit oder ohne Funktionseinschränkungen, über Migräne, bis hin zum Tinnitus reichen [Ettlin, 2019].

Die Diagnostik der Temporomandibulären Dysfunktion kann auf 2 Achsen aufgebaut werden. Achse I beinhaltet das klinische Screening von Schmerzen und Fehlfunktionen des Kiefergelenks und der Kaumuskulatur. Achse II befasst sich mit psychologischen Faktoren und Verhaltensfaktoren des Patienten [Schiffman und Ohrbach, 2016]. Umgesetzt werden diese wissenschaftlich validierten Empfehlungen zur Diagnostik unter anderem im CMD-Screening, dem klinischen Funktionsstatus und den psychologischen Screening Empfehlungen der DGFDK [Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde e. V. (DGZMK), 2022, Türp und Nilges, 2000].

In der Therapie der CMD ist eine interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen den Fachrichtungen Psychologie, Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Neurologie und Zahnmedizin entscheidend. Der überwiegende Teil der Maßnahmen im Bereich der Zahnmedizin ist primär konservativ, oft im Sinne einer Schienentherapie, nur in wenigen Fällen sind irreversible Maßnahmen, medikamentöse oder chirurgische Eingriffe indiziert [Ettlin, 2019].

1.1.2 Therapie von kranio-mandibulärer Dysfunktion, Bruxismus und Myoarthropathien durch Okklusionsschienen in der Zahnheilkunde

Im Jahr 2016 wurden 16% mehr Okklusionsschienen verschrieben als noch im Jahre 2012. Dies entspricht einer Zahl von etwa 1,6 Millionen und geht aus dem Zahnreport der Barmer hervor [Barmer, 2016].

Grund dafür ist auch, dass Okklusionsschienen ein weites Indikationsspektrum besitzen, zu dem nicht nur die Behandlung der schmerzhaften oder funktionseinschränkenden CMD gehört, sondern auch die des nächtlichen Bruxismus [Vavrina und Vavrina, 2020] oder die Simulation einer neuen horizontalen und/oder vertikalen Kieferrelation vor deren dauerhafter Veränderung [Calamita *et al.*, 2019].

Entsprechend der Indikation, Form und Funktion können Aufbissbehelfe grob in Stabilisierungsschienen (auch Relaxierungsschienen) und Positionierungsschienen eingeteilt werden. Sie unterscheiden sich hinsichtlich der Gestaltung und damit auch ihres Wirkprinzips.

Auch im Falle von Stabilisierungsschienen wurde früher die Meinung propagiert, das Kiefergelenk durch die Schienentherapie gegenüber der Fossa in eine bestimmte Relation führen zu müssen – die sogenannte zentrale Kondylenposition, in der die Kiefergelenksköpfe eine kranio-ventrale, nicht zu einer Seite hin verschobene Position einnehmen sollten. Inzwischen geht man dazu über, eine nicht näher definierte, entspannte Positionierung des Unterkiefers zum Oberkiefer mit allen beteiligten Geweben, besonders aber der Kaumuskulatur, anzustreben [Zonnenberg *et al.*, 2021]. Diese sollte weniger durch den Behandler oder eine akademisch definierte Kondylus-Fossa-Relation, sondern vielmehr durch verschiedenste intrinsische Faktoren des Patienten selbst bestimmt sein [Greene, 2018].

Dementgegen dienen Positionierungsschienen der Wiederherstellung einer physiologischen Kondylus-Diskus-Fossa-Relation bei Diskusverlagerung, Struktur- und Stellungsänderungen in den Kiefergelenken oder der Schonung des Diskus beispielsweise durch Distraktion im Gelenksspalt [Deutsche Gesellschaft für Funktionsdiagnostik- und therapie (DGFDT), 2015].

Alle anderen Arten von Okklusionsschienen sind nicht für eine Daueranwendung am Patienten gedacht und sind somit auch nicht Gegenstand der folgenden Betrachtungen.

Dass Schienen mit adjustierter Oberfläche einen signifikanten Effekt auf die Milderung der Symptome einer CMD haben können, wurde in zahlreichen wissenschaftlichen Studien beschrieben [Al-Moraissi *et al.*, 2020, Zhang *et al.*, 2020]. So gelten sie nach wie vor als Kernbehandlung bei Patienten mit TMD, mit nachgewiesenen positiven Auswirkungen auf die Funktion des Kiefergelenks, die maximale Mundöffnung, auf Schmerzsymptomatik und Gelenkgeräusche, aber auch auf Angststörungen und Depressionen [Zhang *et al.*, 2016, Alajbeg *et al.*, 2020]. Jedoch muss der Vollständigkeit halber erwähnt werden, dass hierzu auch kritische Meinungen existieren und wissenschaftliche Abhandlungen

geschrieben wurden, in denen eine positive Wirkung der Aufbissbehelfe nicht eindeutig nachgewiesen werden konnten [Saha *et al.*, 2019].

Ergänzend zur Schienentherapie können die Aufklärung über die Symptome der diagnostizierten CMD in Bezug auf Selbsthilfemaßnahmen, Physiotherapie, Pharmakotherapie, Übungen zur Muskelrelaxation sowie Psychotherapie erfolgen [Al-Moraissi *et al.*, 2021].

1.2 Herstellungsverfahren und Materialeigenschaften

Seit der ersten Patentierung eines Polymethylmethacrylats und dessen Verarbeitung durch die Firma Kulzer 1936 [Kulzer GmbH, 2022] sind Kunststoffe eine der wichtigsten und meistgenutzten Materialklassen in der dentalen Prothetik und Kieferorthopädie [Ali *et al.*, 2008]. Sie werden seither für die Herstellung von vielen dentalen Therapiemitteln, darunter auch Okklusionsschienen, erfolgreich verwendet. Somit kann auf einen breiten klinischen Erfahrungsschatz und viele wissenschaftliche Untersuchungen der mechanischen und biologischen Eigenschaften zurückgegriffen werden [Groß, 1979]. Über die Jahrzehnte wurden diese Eigenschaften von Methacrylaten als Biomaterialien durch Zusatz von verschiedenen Fasern und Füllkörpern, Katalysatoren, Additiven sowie veränderte Mono- und Polymerzusammensetzungen weiter optimiert und für neue Herstellungsverfahren angepasst [Raszewski *et al.*, 2021, Chen *et al.*, 2001, Ajay *et al.*, 2019].

Verschiedene Anforderungen werden an ein ideales Material zur Herstellung von okklusalen Aufbissbehelfen gestellt. Dazu gehören neben einer ausreichenden Biokompatibilität auch die Transparenz und Farbstabilität, geeignete mechanische Eigenschaften, chemische Beständigkeit, leichte Verarbeitbarkeit und geringe Adhärenz von pathogenen Keimen aus der Mundhöhle [Lee *et al.*, 2012, Bacali *et al.*, 2020]. Auch die Wirtschaftlichkeit der verwendeten Herstellungsmethode kann nicht außer Acht gelassen werden.

Im Falle des additiven Herstellungsweges müssen diese Kriterien zusätzlich um die Anwendbarkeit in der Stereolithografie und somit eine geeignete Viskosität und Photopolymerisationseigenschaften bei gleichzeitig hoher Genauigkeit ergänzt werden.

1.2.1 Chemische Zusammensetzung und Polymerisationsreaktion

Bei der Polymerisationsreaktion reagieren ungesättigte Verbindungen, die Monomere, zu Makromolekülen, den Polymeren. Wichtigste Monomerkategorie für dentale Kunststoffe sind die Methacrylate, zu ihnen gehören unter anderem Bisphenol A-glycidylmethacrylat (Bis-GMA), Urethandimethacrylat (UDMA), Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA), Bisphenol Ethyldimethacrylat (Bis-EDMA), Methylmethacrylat (MMA) und 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA). Einige chemische Konstitutionsformeln sind in der folgenden Abbildung 1 zur Veranschaulichung dargestellt.

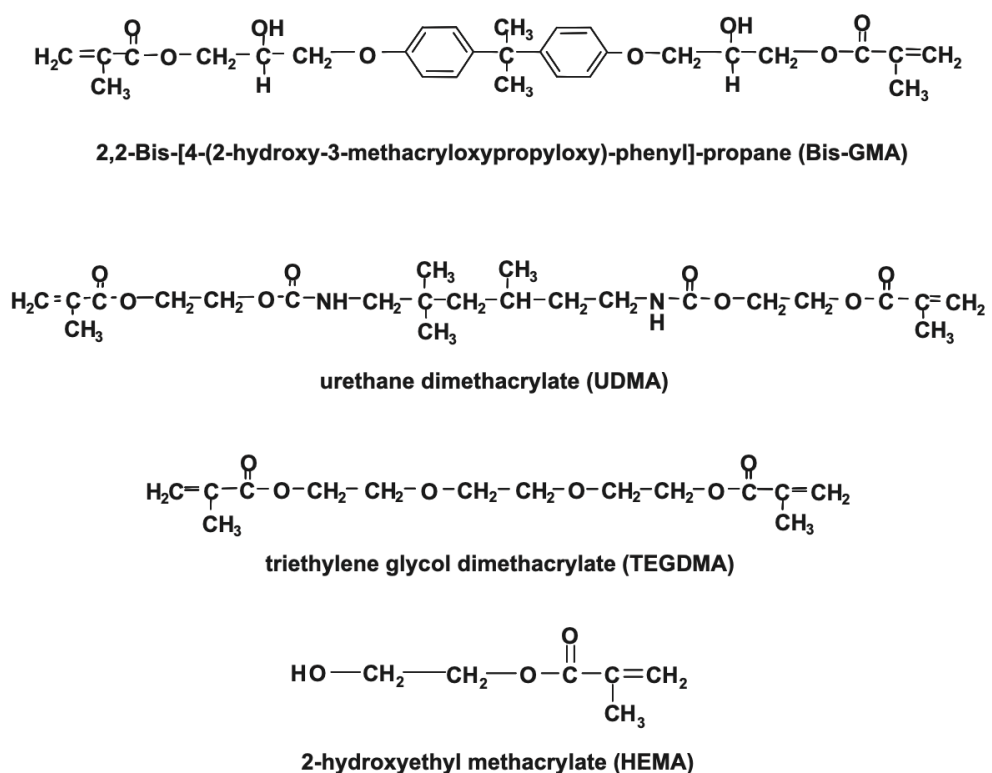


Abbildung 1: Chemisch Strukturformeln von Bis-GMA, UDMA, TEGDMA und HEMA [Krifka et al., 2013]

Sie alle besitzen eine oder mehrere Methacrylgruppen als ihre funktionelle, reaktive Einheit. Durch die unterschiedlichen Vernetzungsmöglichkeiten dieser mono-, bi- oder polyfunktionalen Monomere, aber auch beispielsweise durch deren Molmassen und genaue chemische Moleküleigenschaften werden Primär- und Sekundärstruktur und damit die chemischen, physikalischen und mechanischen Eigenschaften des daraus gebildeten Polymers wesentlich mitbestimmt. Doch auch Füllstoffe haben Einfluss auf die Materialeigenschaften,

wie zum Beispiel eine verringerte Polymerisationsschrumpfung durch organische Füllstoffe in Form von Splitterpolymeren oder eine erhöhte Abrasionsstabilität, Festigkeit, Röntgenopazität und verringerte Wärmedehnung durch anorganische Füller wie Keramiken [Kappert und Eichner, 2005].

Die Problematik des Einbindens anorganischer Füllstoffe mit hydrophiler Oberfläche in die hydrophobe Matrix des Polymers wird durch die Silanisierung der 0,005 bis 1 µm großen Partikel gelöst [Janda, 1990].

Um eine Polymerisationskettenreaktion zu starten, werden Initiatoren oder Katalysatoren benötigt. Initiatoren werden während einer chemischen Reaktion verbraucht, während Katalysatoren nur die Aktivierungsenergie herabsetzen und unverändert aus der Reaktion hervorgehen.

Im Falle einer radikalischen Polymerisation wird der Initiator unter Einwirkung von Energie in Form von Wärme, Licht oder chemischer Energie zu einem energiereichen Molekül mit einem ungepaarten Elektron, einem Radikal, welches an einer unbesetzten Doppelbindungsstelle angreifen kann und somit ein Kettenwachstum und gleichzeitig die Entstehung eines neuen Radikals initiiert. Auf diese Weise entsteht ein immer größer werdendes Polymer, bis schließlich ein Kettenabbruch durch Rekombination zweier Radikale erfolgt. Durch den immer geringer werdenden Vorrat an Monomeren, die nicht mehr genug kinetische Energie besitzen um an weit entfernte unbesetzte Bindungsstellen zu gelangen, kann die Polymerisationsreaktion vorzeitig ins Stocken geraten und ein kleiner Restmonomeranteil bleibt im gehärteten Kunststoff zurück. Doch auch Inhibitoren wie Hydrochinon oder Sauerstoff verursachen durch das Einfangen der Radikale und Bildung von weniger reaktionsfreudigen Produkten den Kettenabbruch. Inhibitoren gehören, wie auch UV-Stabilisatoren und Weichmacher zur Gruppe der Additive im Bereich der Dentalkunststoffe und dienen der Verbesserung der Verarbeitbarkeit, Lagerstabilität und des Elastizitätsmoduls [Janda, 1988].

Eine Einteilung der dentalen Kunststoffe erfolgt unter anderem in Hitze-, Auto- und Licht-polymerisierende, wobei es bei dieser Einteilung hauptsächlich auf den verwendeten Initiator ankommt. Ein typischer Initiator für die Heißhärtung ist das Dibenzoylperoxid, für die Kalthärtung kann entweder ein tertiäres aromatisches Amin zusammen mit Dibenzoylperoxid oder die Trimethylbarbitursäure

zusammen mit Sauerstoff und Kupferionen verwendet werden und für die Lichthärtung hat sich beispielsweise das Campherchinon bewährt, welches bei einer Wellenlänge von ca. 460 nm innerhalb von kurzer Zeit zu Radikalen zerfällt [Groß, 1979].

1.2.2 Konventionelle Verarbeitung dentaler Kunststoffe zur Herstellung von Schienen

Traditionell können Schienen auf drei unterschiedliche Arten hergestellt werden: im Gieß-, Injektions-, oder Stopf-Press-Verfahren. Vorbereitend muss ein Teig aus einem Teil Flüssigkeit, die zu etwa 90% aus Methylmethacrylat, 8% Vernetzer und 2% Additiven besteht, und zwei bis drei Teilen Pulver, bestehend aus vorpolymerisierten Polymethylmethacrylatpartikeln, angemischt werden. Beim Injektionsverfahren wird der angemischte Kunststoffteig während der teigartig festen Phase dann mit einem Druckkolben in den durch eine Kuvette umfassten Hohlraum, der durch eine vorhergehende Wachsmodelation vorgegeben wird, gepresst. Auch beim Stopf-Press-Verfahren wird der Hohlraum innerhalb einer Kuvette genutzt, um ein Therapiemittel herzustellen, allerdings wird dieser ausgefüllt, bevor die beiden komplementären Teile der Kuvette zusammengesetzt werden. Beim Gießen, Schütten oder Streuen von Schienen dagegen wird das pulverförmige Polymer auf die Bereiche des Modells gestreut, die später von der Schiene gefasst werden sollen, und anschließend mit dem flüssigen Monomer beträufelt, wobei ein zuvor angefertigter Silikonschlüssel die Applikation erleichtern kann. So wird Schicht für Schicht die gewünschte Dicke des Kunststoffs aufgebaut.

Abschließend muss eine Polymerisation im Drucktopf unter vom Hersteller festgelegten standardisierten Bedingungen erfolgen.

Durch die manuelle Herstellung sind diese Verfahren techniksensitiv, anwenderabhängig und anfällig für Fehler. In geübten Fachhänden werden allerdings mit dem Injektionsverfahren sehr gute mechanische Eigenschaften und Oberflächenbeschaffenheit, sowie Biokompatibilität und Genauigkeit erzielt [Ali *et al.*, 2008, Golbidi und Asghari, 2009, Parvizi *et al.*, 2004].

1.2.3 Gefräste dentale Kunststoffe

Durch die Entwicklung dentaler Fräsmaschinen hat die Computer-aided Design, Computer-aided Manufacturing (CAD/CAM) Technologie in der Dentalbranche Einzug gehalten. So ist es auch möglich geworden, am Computer modellierte Werkstücke aus Rohlingen aus sogenannten Hochleistungspolymeren herauszufräsen, die vom Hersteller unter kontrollierten Temperatur- und Druckbedingungen auspolymerisiert werden.

Dies führt gegenüber konventionell hergestellten Kunststoffen zu überlegenen und stets gleichbleibenden mechanischen Eigenschaften, die nicht anwenderabhängig sind [Güth *et al.*, 2013, Beuer *et al.*, 2008]. Kennzeichnend für dieses Herstellungsverfahren ist aber auch eine nahezu ideale Konversionsrate, und somit ein sehr geringer Restmonomergehalt, sowie die garantierte Reproduzierbarkeit und erhöhte Effizienz [Ayman, 2017, Steinmassl *et al.*, 2018, Dayan *et al.*, 2019]. Die höchste Genauigkeit kann mit Fünffachsfräsmaschinen erzielt werden [Alghazzawi, 2016]. Nachteilig ist dagegen der hohe Materialverbrauch durch Fräsabfälle und Schleifkörperverschleiß, sowie die hohen Anschaffungskosten moderner Fräsmaschinen.

1.2.4 Additive Fertigung

Eine verglichen mit den anderen in der Zahnmedizin verwendeten Verfahren neue Herstellungsmethode ist die additive Fertigung, die in den letzten Jahren starke Wachstumsraten aufwies. Auch diese greift auf die CAD/CAM Technologie zurück, wobei über eine STL Schnittstelle die 3D-Modelle in Schichtdateiformaten in einzelne Schichten zerlegt werden [Berger *et al.*, 2019]. Der 3D Druck verspricht nicht nur in der Zahnmedizin, sondern auch in vielen anderen Bereichen der Wirtschaft ein wichtiges Verfahren der Zukunft zu werden, da der geometrischen Komplexität des herzustellenden Produkts potenziell keine Grenzen gesetzt sind und es somit individuell und personalisiert hergestellt werden kann. Vorteilhaft ist neben dem auf ein notwendiges Minimum reduzierten Materialverbrauch auch die Reproduzierbarkeit und ein optimierter Workflow in Zahnarztpraxen und Laboren. Hier erhöht sich grundsätzlich die Wirtschaftlichkeit bei steigender Komplexität der Bauteilgeometrie und sinkender Stückzahl. Die additive Fertigung hat ihren Ursprung in der

Kunststoffverarbeitung und nach wie vor machen die Photopolymere die größte Gruppe aus [Ligon *et al.*, 2017].

Die wichtigsten additiven Herstellungsverfahren werden unterteilt in Sinter- oder Pulverdruckverfahren, die Extrusions- oder Filamenttechnik und die Stereolithographie. Dentale 3D-Drucker mit badbasierter Photopolymerisation von Acrylharzen nutzen die Stereolithographie (SLA), die erstmalig von Hull, 1984, beschrieben und patentiert wurde. Eine schematische Darstellung aus den Aufzeichnungen von Hull ist Abbildung 2. Auf der Basis dieses Systems wurden neue Verfahren entwickelt, wie beispielsweise die Digital Light Processing (DLP) Methode, die auch dem in dieser Arbeit verwendeten Drucker zugrunde liegt. DLP hat gegenüber der klassischen SLA den großen Vorteil der reduzierten Bauzeit, da die digitale Microspiegeleinheit (auch Digital Micromirror Device, DMD) die Belichtung einer kompletten Schicht wie bei einem Projektor ermöglicht.

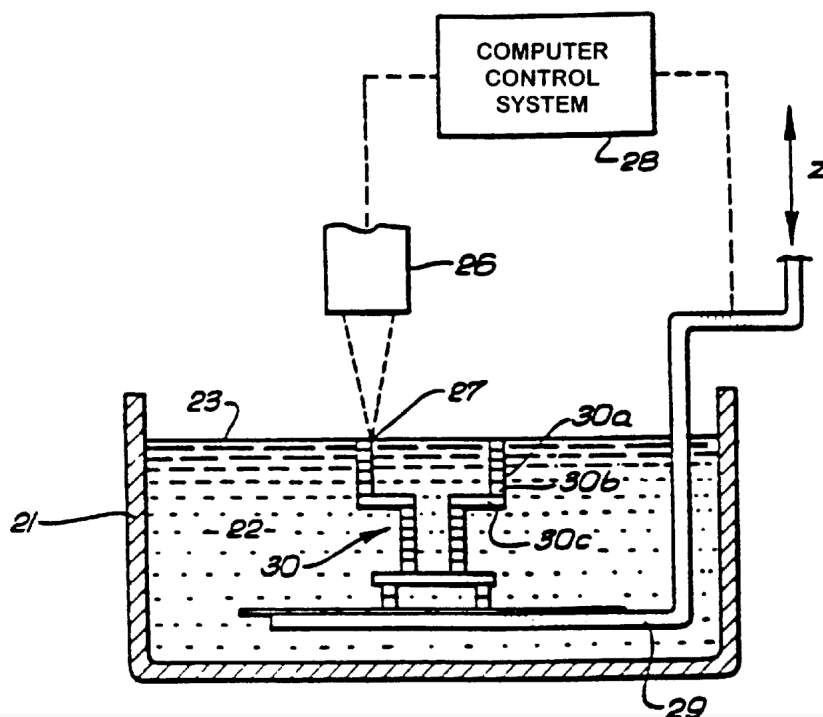


Abbildung 2: Erste schematische Darstellung des Stereolithographieverfahrens, patentiert von Charls Hull 1984 (21: Behälter, 22: UV-härtende Flüssigkeit, 23: Arbeitsfläche, 26: programmierbare UV-Lichtquelle, 27: beweglicher Lichtpunkt, 28: programmierbarer Computer, 29: bewegliche Bauplattform, 30: dreidimensionales Bauobjekt, 30a/ 30b/ 30c: einzelne Bauschichten) [Hull, 1984]

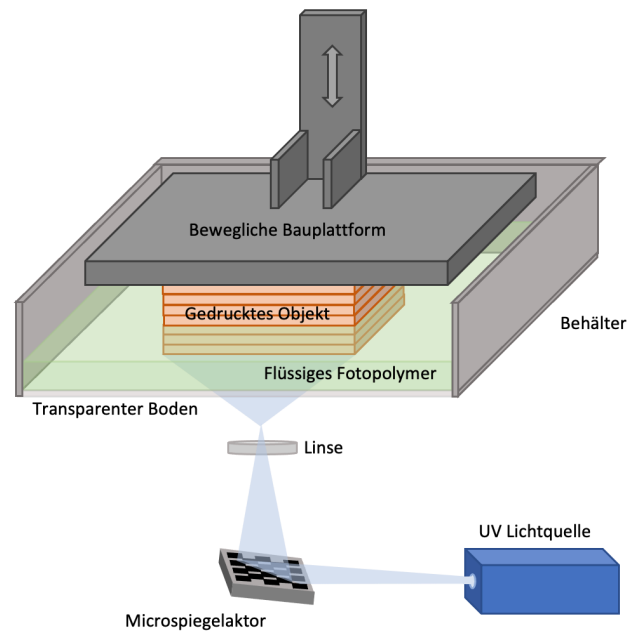


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Digital Light Processing (DLP) Verfahrens [Bae und Kim, 2021]

Abbildung 3 ist eine schematische Darstellung des DLP-Verfahrens, hier bewegt sich die Bauplattform im Gegensatz zum Stereolithographieverfahren nach oben. Durch einen Microspiegelaktor (DMD) wird nicht jeder Punkt einer Schicht einzeln, sondern wie bei einem Projektor eine ganze Schicht simultan belichtet [Bae und Kim, 2021].

Auf einer Bauplattform wird so durch schichtweise Polymerisation des flüssigen Ein-Komponenten-Polymerisats ein aus einem CAD-Modell in einzelne Schichten konvertiertes Werkstück aufgebaut. Die Polymerisation erfolgt selektiv durch den - für meist langwelliges ultraviolette Licht - transparenten Boden des Behälters. Nach der Photopolymerisation wird die Bauplattform um 50 – 100 μm entlang der z-Achse angehoben, sodass das Harz im Tank unter dem Bauobjekt nachfließen kann. Der Vorgang wird so lange wiederholt, bis die Konstruktion fertig gestellt ist [Schweiger *et al.*, 2021].

Üblicherweise ist eine Waschung und Nachhärtung im Lichthärteofen des hergestellten Werkstücks erforderlich, um eine ausreichende Konversionsrate, eine möglichst monomerarme Oberfläche und eine zufriedenstellende Dimensionsstabilität von ca. 0,1-0,2 mm zu erreichen [Shin *et al.*, 2021, Tumbleston *et al.*, 2015].

Für diese Methode mussten neuartige, niedrig viskose und lichthärtende Einkomponentenkunststoffe entwickelt werden, zu deren Eigenschaften es bislang insbesondere im Hinblick auf Löslichkeit, Rest-Monomergehalt und damit die Biokompatibilität nur wenige unabhängige Studien gibt. Oft müssen zur Verringerung der Viskosität nicht-reaktive Additive und Lösungsmittel zugefügt werden. Ligon *et al.*, 2017 geben außerdem an, dass trotz vieler Nachforschungen 3D gedruckte Materialien den herkömmlichen immer noch in vielen Fällen bezüglich ihrer mechanischen Eigenschaften unterlegen sind. Dies sei unter anderem der schichtweisen Herstellungsmethode und der daraus entstehenden Anisotropie geschuldet. Die Auflösung ist in Richtung der z-Achse auf die minimale Polymerisationsschichtstärke begrenzt, die Genauigkeit in Richtung der x- und y-Achse hängt von der Kantenlänge der Mikrospiegel (= Pixel) ab.

1.2.5 Besondere Merkmale der Zusammensetzung von Kunststoffen in der additiven Fertigung

Das Acrylharzgemisch der 3D druckbaren Schienenkunststoffe muss einen effizienten Photoinitiator enthalten, der es ermöglicht, mit möglichst wenig Energie eine Gelphase des Materials und eine ausreichende Anfangsfestigkeit zu erreichen. Die vor allem im DLP verwendete Gruppe von Radikal-Initiatoren sind Acrylphosphinoxide, welche sich unter anderem durch eine gute Farbbeständigkeit und durch die Möglichkeit der Härtung von hochgefüllten Systemen auszeichnen [Leppard *et al.*, 1995].

Die Verwendung eines auf die richtige Wellenlänge abgestimmten Photoinitiators beeinflusst außerdem die Genauigkeit in Richtung der z-Achse positiv, da dieses Licht eine geringere Eindringtiefe als das sichtbare Licht besitzt [Vitale und Cabral, 2016].

Die verwendeten (Meth-) Acrylate im Gemisch müssen gleichzeitig eine geeignete Viskosität, Aushärtungsgeschwindigkeit und Genauigkeit sicherstellen. Urethanacrylate werden beispielsweise für gute mechanische Eigenschaften dem Gemisch hinzugefügt. Doch diese Strukturmonomere haben eine zu hohe Viskosität, um sie ohne Verdünnung in der additiven Fertigung zu verwenden. Somit werden sie mit multifunktionalen, hochreaktiven

Lösungsmitteln verdünnt, die gleichzeitig durch mehrere funktionelle Gruppen eine schnelle Polymerisation sicherstellen [Ligon *et al.*, 2017].

Zusätzliche cycloaliphatische Ringe im Zentrum von zum Beispiel Bisphenol-basierten Dimethacrylat-bis-GMA Molekülen verringern die Polymerisationsschrumpfung und verbessern die mechanischen Eigenschaften weiter [Kim *et al.*, 2006]. Eine weitere Methode, die Polymerisationsschrumpfung zu verringern ist, Acrylat Oligomere mit hohem Molekulargewicht zu verwenden, während das Problem der dadurch wiederum erhöhten Viskosität durch Wärme behoben werden kann [Moraes *et al.*, 2011].

Um zu verhindern, dass Acrylate spontan aushärten, enthalten die Acrylharzgemische oft auch geringe Konzentrationen von Radikalinhibitoren [Batch und Macosko, 1990].

1.2.6 Anforderungen an Medizinprodukte im Bereich der Biokompatibilität und Zytotoxizität

Wie schon erwähnt sind Acrylharze eine in der Zahnmedizin weit verbreitete und viel verwendete Produktklasse, die den Ansprüchen einer ausreichenden Biokompatibilität, geringen Toxizität und Allergenität genügen muss. Grundsätzlich können eine Reihe von in unterschiedlichen Polymeren enthaltene Substanzen die Biokompatibilität beeinflussen, doch von besonderem Interesse ist der Anteil von unpolymerisierten Monomeren in ihrer Matrix, welche im Speichel oder in Nahrungsbestandteilen gelöst und so in Kontakt mit den Zellen der Mundschleimhaut kommen können. Hier stehen sie im Verdacht, biologische Reaktionen wie Entzündungen, Irritationen und Allergien auszulösen [Raszewski *et al.*, 2021]. Außerdem haben Studien nachgewiesen, dass (Ko-) Monomere vom Körper metabolisiert zu (geno-) toxischen, cancerogenen und mutagenen Produkten reagieren können [Schweikl *et al.*, 2006, Reichl *et al.*, 2002].

Gemessen wird der Restmonomergehalt eines Polymers beispielsweise durch die Infrarotspektroskopie, die Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie und die Gaschromatographie [Duray *et al.*, 1997, Urban *et al.*, 2006, Spahl *et al.*, 1998]. Er wird, wie oben bereits erwähnt, entscheidend durch die Monomerzusammensetzung, das Initiatorsystem, andere Additive sowie die Reaktionsbedingungen beeinflusst und schwankt je nach Herstellungsmethode etwa zwischen 0,4% und 5% [Kappert und Eichner, 2005]. Des Weiteren

beeinflusst ein hoher Restmonomergehalt die mechanischen Eigenschaften wie Biegefestigkeit und Härte eines Polymers negativ. Der Restmonomergehalt laut Herstellerangaben der hier verwendeten Polymere wird in einem späteren Abschnitt der Arbeit aufgeführt.

Die Sorption und Löslichkeit der auspolymerisierten Werkstücke in wässrigen und organischen Lösungsmitteln ist ebenfalls von zentralem Interesse für die Biokompatibilität und wird durch den Kristallinitäts- und Vernetzungsgrad, sowie durch Alterungsprozesse beeinflusst.

Kunststoffe für die Herstellung okklusaler Aufbissbehelfe unterliegen grundsätzlich dem Medizinproduktegesetz (MPG), das der Wirksamkeits- und Qualitätssicherung dient und die verbindlichen Europäischen Normen (EN) der Comité Européen de Normalisation (CEN) einschließt. In Deutschland erarbeitet das Deutsche Institut für Normierung e.V. (DIN) Leitfäden für freiwillige einheitliche Standards in verschiedenen Fachgebieten. In Zusammenarbeit mit anderen Staaten der Europäischen Union und der Internationalen Organisation für Normierung (ISO) entstehen europäische Prüf- und Qualitätsnormen, an die sich Hersteller halten müssen und die die Bezeichnung DIN EN ISO erhalten. Sie vereinfachen eine einheitliche Auswertung von Prüfergebnissen und sind so auch für die Vergleichbarkeit wissenschaftlicher Untersuchungen ein hilfreicher Anhaltspunkt [Kappert und Eichner, 2005].

Für zahnärztliche Werkstoffe gilt die Norm EN ISO 7405, die spezielle genormte Testverfahren zur Evaluation der Biokompatibilität beschreibt.

Allgemeine Methoden zur biologischen Beurteilung sowie zur Analyse von gelösten Stoffen und Substanzen werden in der Normenreihe EN ISO 10993 bestimmt und reguliert. Beispielsweise wird in der Norm DIN EN ISO 10993-5 der Grad der Zytotoxizität unter Zuhilfenahme der Zellproliferation gegenüber einer Negativkontrolle festgelegt: bei einer Zellproliferation von über 75% gilt das Medizinprodukt als nicht zytotoxisch, zwischen 50-75% als leicht, 25-50% als moderat und bei bis zu 25% als stark zytotoxisch [Rose *et al.*, 2000]. Die ISO-Normen 13485 und 7405 zielen in ähnlicher Weise auf die Prüfung dentaler Werkstoffe ab. Die nachfolgende Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Prüfungen, die bei einer medizinischen Apparatur zur oberflächlichen

Anwendung an Schleimhäuten und bei einer langen Anwendungsdauer zur Zulassung erforderlich sind.

Medical device categorization by														
Nature of body contact		Contact duration	Physical and/ or chemical information	Cytotoxicity	Sensitization	Irritation or intracutaneous reaction	Material mediated pyrogenicity ^a	Acute systemic toxicity ^b	Subacute toxicity ^b	Subchronic toxicity ^b	Chronic toxicity ^b	Implantation effects ^{b,c}	Hemocompatibility	Genotoxicity ^d
Category	Contact	A – limited (≤24h) B- prolonged (>24 h to 30 d) C – Long term (>30 d)												
Surface medical device	Mucosal membrane	A	X	E	E	E								
		B	X	E	E	E		E	E			E		
		C	X	E	E	E		E	E	E	E	E		E

Tabelle 1: Endpunkte der Bewertung auf biologische Risiken [ISO.org, 2022]

In der vorliegenden Arbeit erfüllen alle untersuchten Materialien die zur Zulassung notwendigen Auflagen und besitzen somit das CE-Kennzeichen für Verkehrsfähigkeit im europäischen Wirtschaftsraum. Sie sind nach der Medizinprodukterichtlinie 93/42/EWG auf Ihre biologische Sicherheit, wie beispielsweise auch auf Zytotoxizität, Sensitivität, Genotoxizität sowie innere und äußere Reize geprüft. Trotzdem ist eine unabhängige Prüfung von Werkstoffen in allen Bereichen und nach unterschiedlichen Faktoren und Gesichtspunkten wichtig. Die hier untersuchten Materialien gehören Medizinprodukten der Klasse IIa an.

2. Fragestellung und Studienziele

Dass die Herstellungsmethode einen signifikanten Einfluss auf die Biokompatibilität und mechanische Eigenschaften von dentalen Kunststoffen haben kann, ist in einigen wissenschaftlichen Arbeiten untersucht worden [Hada *et al.*, 2021]. Diese Abhandlungen beschäftigen sich zumeist mit herkömmlichen dentalen Kunststoffen und deren allergenem und zytotoxischem Potenzial und sind, wie oben bereits erläutert, Gegenstand der Zulassungsvoraussetzung als Medizinprodukt. Bisher gibt es allerdings nur wenige Untersuchungen hinsichtlich der Biokompatibilität von 3D gedruckten Polymeren aus der Zahnmedizin, keine einzige davon beschäftigt sich im konkreten Fall mit Schienenmaterialien aus dieser Herstellungskategorie.

Doch gerade der okklusale Aufbissbehelf unterliegt einer extremen chemomechanischen Beanspruchung, durch hohe Kraftentwicklung in der Nacht von etwa 480 N – dem 10fachen des normalen Kaudrucks. Außerdem werden im wässrigen Milieu von Enzymen, Peptiden, Kohlehydraten, Bakterien und anderen Bestandteilen des Speichels bei Temperaturen von um die 37°C und langer Tragedauer von durchschnittlich 8 h am Tag verschiedene Substanzen aus den Werkstoffen freigesetzt. Ihr potenziell schädlicher Einfluss auf Zellen der Mundschleimhaut soll anhand von Messgrößen wie Zelltod und Enzymaktivität bestimmt werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, den Effekt von 4 verschiedenen neuartigen, zur additiven Fertigung in der Dentalbranche zugelassenen Schienenkunststoffen auf humane Gingivafibroblasten (hGF-1) und Plattenepithelkarzinomzellen (BHY) zu untersuchen. Zwei herkömmliche Materialien, die im Gussverfahren und durch Frästechnik hergestellt wurden, fungieren als Kontrollgruppe.

Folgende Nullhypothesen wurden aufgestellt und überprüft:

1. Die hergestellten Extrakte aus unterschiedlichen Schienenmaterialien haben keinen Einfluss auf die Atmungskette von humanen Gingivafibroblasten und Plattenepithelkarzinomzellen.
2. Die hergestellten Extrakte aus unterschiedlichen Schienenmaterialien haben keinen Einfluss auf das Verhältnis von totalem zu oxidiertem Glutathion in humanen Gingivafibroblasten.

3. Die hergestellten Extrakte aus unterschiedlichen Schienenmaterialien haben keinen Einfluss auf die Produktion von IL-6 in humanen Gingivafibroblasten.
4. Die hergestellten Extrakte aus unterschiedlichen Schienenmaterialien haben keinen Einfluss auf das Apoptoseverhalten von humanen Gingivafibroblasten.

3. Material und Methoden

3.1 Zellarten und -kulturbedingungen

Bei den in der Arbeit verwendeten adhärent wachsenden Zelllinien handelt es sich zum einen um hGF-1 Zellen, und zum anderen um BHY-Zellen, beide bezogen von LGC (LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland). Die hGF-1 Zellen sind menschliche Fibroblasten einer Gingivabiopsie eines 28-jährigen Kaukasiers. Diese wurden in 75 cm² Kulturflaschen (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich) mit 20 ml vorbereitetem Minimum Essential Medium Alpha (α -MEM, GlutaMax, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) kultiviert.

Die BHY-Zellen stammen aus der Probe eines menschlichen, invasiven oralen Plattenepithelkarzinoms des Unterkiefers eines Japaners. Sie weisen eine Generationszeit von ca. 70 h auf und wurden gleichermaßen in T75 Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich) mit Dubecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, high glucose, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) kultiviert. Da beide verwendeten Medien keine Proteine, Lipide oder Wachstumsfaktoren enthalten, wurden sie vor Verwendung mit 10% fetalem Rinderserum (FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) supplementiert. Außerdem wurden sie zur Beibehaltung keimfreier Bedingungen in der Zellkultur zusätzlich mit Antibiotikum in einer Konzentration von 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Penicillin/Streptomycin, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) versetzt.

Die Hersteller und Zellbanken garantieren durch routinemäßige Kontrolle aller Produkte für die Qualität und Freiheit von typischen mikrobiellen Kontaminationen. Dazu gehören die Untersuchung auf Mycoplasmen und bestimmte Viruserkrankungen, wie Hepatitis, Humanes Immunodefizienz-Virus (HIV), Humane Papillomviren (HPV) und Epstein-Barr-Virus (EBV).

Zur Aufrechterhaltung des physiologischen pH-Werts unter Verwendung eines Natriumbicarbonat-Puffersystems im Medium wurden die Zellen bei 5% CO₂, 37°C und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert (Heracell 150i, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

3.2 Routinemethoden in der Zellkultur

3.2.1 Auftauen von Zellen

Zum Erhalt einer optimalen Zellviabilität wurden die Zellen in einem Kryo Tiefkühlschrank über flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Das Auftauen der Zellsuspension erfolgte innerhalb von einer Minute im 37°C warmen Wasserbad, danach wurde diese mit einer Pipette aufgenommen und in einem Falcon-Röhrchen zusammen mit 9 ml des entsprechenden vorgewärmten kompletten Wachstumsmediums bei 300 g 5 min zentrifugiert (Mikrofuge 18, Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Nach Absaugen des Überstandes wurde das verbleibende Zellpellet in Medium resuspendiert und die Zelllösung in Kulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich) mit 20 ml erwärmtem Wachstumsmedium ausgesät.

3.2.2 Mediumwechsel

Nach zwei bis drei Tagen, abhängig von der Anzahl und Stoffwechselaktivität der Zellen, wurde das Zellkulturmedium gewechselt. Hierzu wurde dieses mit einer zur einmaligen Verwendung bestimmten Glaspipette abgesaugt, ohne dabei das Monolayer zu beschädigen. Anschließend wurden 20 ml des zuvor erwärmten entsprechenden Mediums zu pipettiert, und die Zellen wieder für mehrere Tage inkubiert.

3.2.3 Subkultivierung der Zellen

Um eine optimale Dichte der Zellen in Zellkulturen zur weiteren Proliferation beizubehalten ist es notwendig, diese zu subkultivieren und mit frischem Medium zu versorgen. Dies geschah in einer Phase des exponentiellen Wachstums und vor Konfluenz der Zellen. Eine Aufnahme konfluent wachsender hGF- und BHY-Zellen ist in Abbildung 4 und 5 zu sehen. Auch ein schnelles Sinken des pH-Werts des Nährmediums ist über den Farbumschlag des Indikators ein erkennbares Indiz für eine zu hohe Zellkonzentration und somit für die Notwendigkeit der Passagierung [Schmitz, 2020].

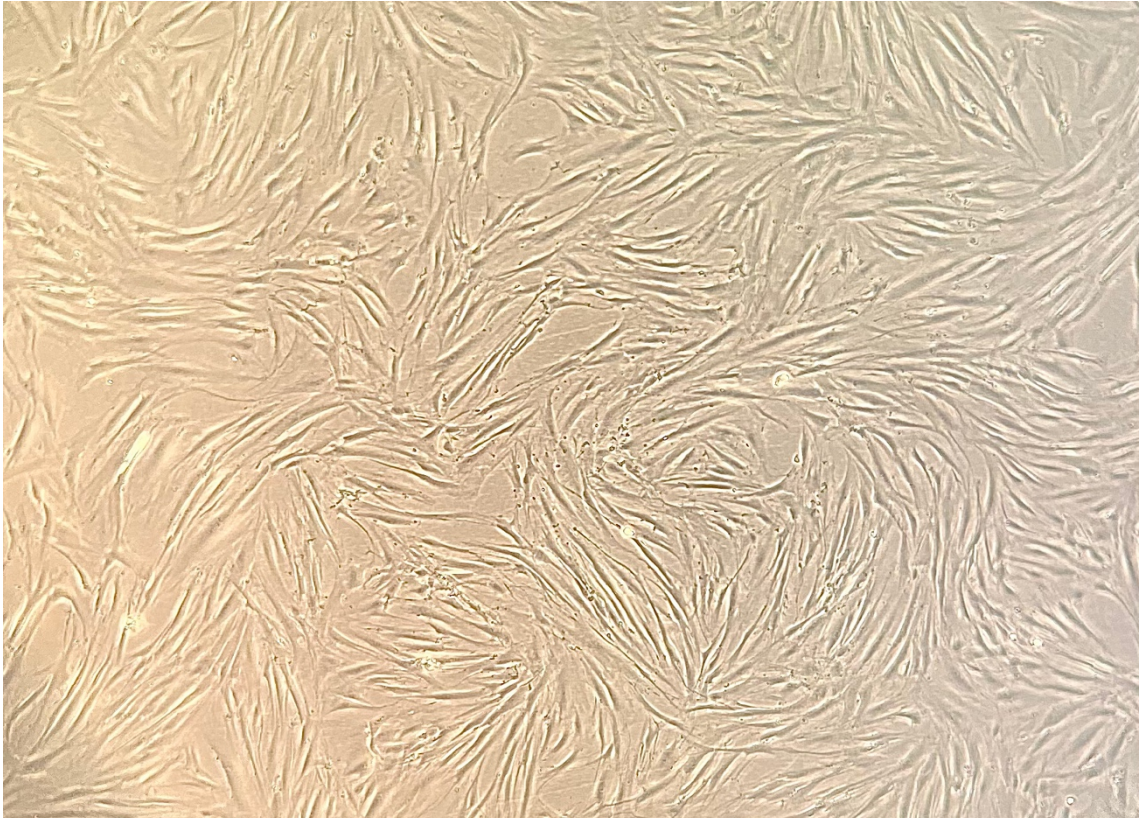


Abbildung 4: *Mikroskopische Aufnahme von hGF-1 Zellen (10fache Vergrößerung)*

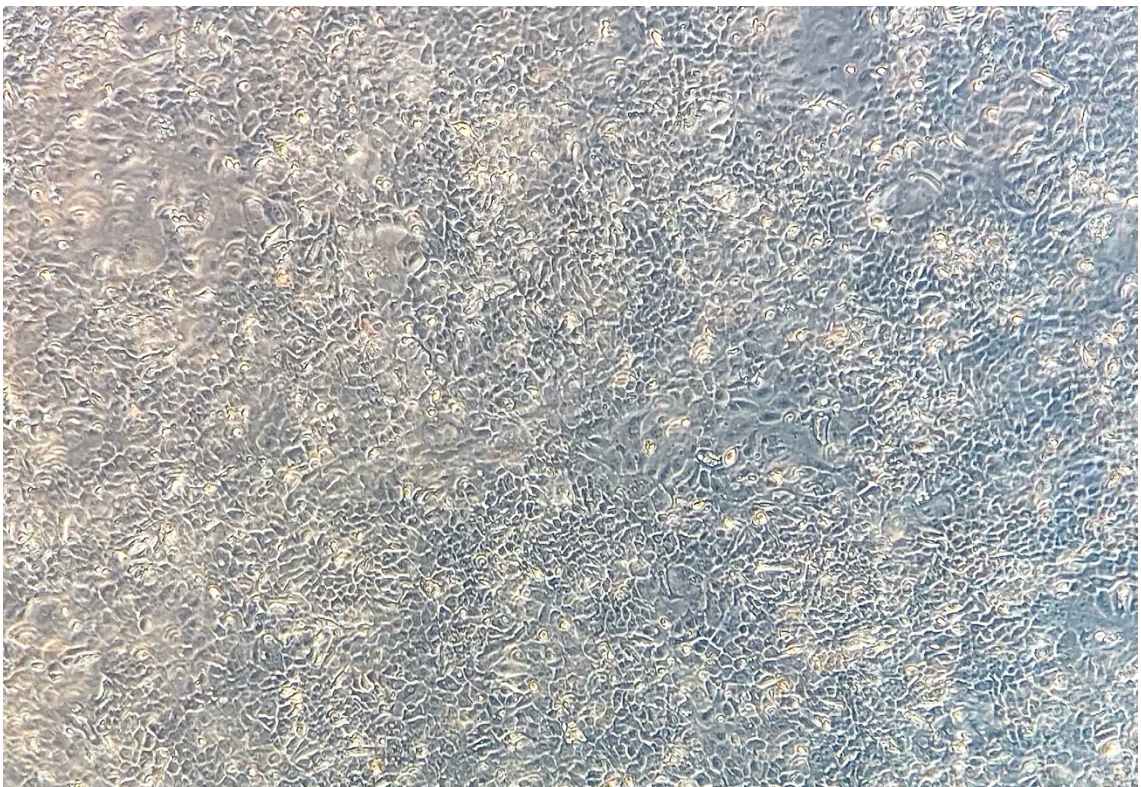


Abbildung 5: *Mikroskopische Aufnahme von BHY Zellen (10fache Vergrößerung)*

Zunächst wurde das Medium in der Zellkulturflasche mit einer Glaspipette abgesaugt und anschließend die Zellen mit 5 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) gewaschen. Zur Ablösung der adhärenen Zellen von der Unterlage wurden 2 ml auf 37°C vorgewärmtes Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (Trypsin-EDTA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) verwendet. Die Protease Trypsin bricht durch Spaltung von Adhäsionsmolekülen wie Fibronectin und Laminin die Desmosom-ähnlichen Zellverbindungen zum beschichteten Flaschenboden auf, während das EDTA gleichzeitig Chelatverbindungen mit zweiwertigen Calcium- und Magnesium-Kationen eingeht, die die Membranproteine stabilisieren [Schmitz, 2020]. Nach etwa 5 min Inkubation bei 37°C und Begutachtung der Ablösung der Zellen unter dem Mikroskop (Axiovert 40 C, Karl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) wurde die Zellsuspension mit einer Pipette in Falcons überführt und mindestens im Verhältnis 1:1 mit Wachstumsmedium vermischt. Durch das serumhaltige Medium wird die Trypsin-Aktivität inhibiert. Anschließend wurde die Zellsuspension 5 min bei 300 g und 22°C zentrifugiert (Allegra X-15R, Beckman Coulter GmbH, Brea, CA, USA), der Überstand abgesaugt, und das Zellpellet entsprechend der gewünschten Verdünnung – meist 1:3 bis 1:4 – in Medium resuspendiert, um je 1 ml der Lösung gleichmäßig auf Zellkulturflaschen mit 19 ml des entsprechenden Mediums aufzuteilen.

3.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Für die Durchführung einiger Versuche war es notwendig, zuvor die Anzahl vitaler Zellen zu bestimmen, um möglichst genau die optimale Zellzahl für den entsprechenden Versuch in jedem Reaktionsraum aussäen zu können. Hierfür wurden die Zellen wie beim Subkultivieren von ihrer Unterlage gelöst, zentrifugiert und anschließend in 1 ml Medium resuspendiert. 10 µl der gut vermischten Zellsuspension wurden dann zusammen mit 10 µl 0,4%igem Trypanblau (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in eine Durchflusszelle (Roche Applied Sciences, Mannheim, Deutschland) pipettiert, und die Zellzahl und Viabilität der Zellen im Zählgerät (Cedex XS Analyzer, Roche Innovatis AG, Bielefeld, Deutschland) gemessen. Das Verfahren beruht auf dem Prinzip der Ausschlussfärbung, bei dem der Farbstoff nur durch die durchlässig gewordene Membran toter Zellen ins Zytoplasma gelangen kann.

Diese werden somit blau angefärbt, während Zellen mit intakter Zellmembran im Mikroskop hell erscheinen. Die durch die zugehörige Software (Cedex 2 Software, Roche Innovatis AG, Bielefeld, Deutschland) berechnete Konzentration der vitalen Zellen diente so als Bezugswert für ein Aussäen bestimmter Zellkonzentrationen in den nachfolgenden Versuchen.

3.3 Herstellung der Kunststoffeluat

Für die Gewinnung der Eluate wurden zunächst die verschiedenen Polymere, je nach der für sie vorgesehenen Verarbeitungsmethode und nach festgelegten Normen und Angaben des Herstellers, in Form von Plättchen mit einem Durchmesser von 2 cm und einer Dicke von 4 mm hergestellt.

Das injizierbare Kaltpolymerisat PalaXpress (Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland) wurde in eine Silikonform gegossen und mit einem Druckpolymerisationsgerät (Palamat Elite, Haereus Kulzer, Hanau, Deutschland) bei 55°C und 2 bar für 30 min auspolymerisiert. Zusammen mit dem gefrästen Material SHERAdisc PM20 (SDP, SHERA Werkstoff-Technologie GmbH & CoKG, Lemförde, Deutschland), das mittels einer Trennmaschine (Secotom-50, Struers, Ballerup, Dänemark) in Scheiben geschnitten wurde, diente PalaXpress (PXP) als Kontrollsubstanz.

Die Probenmaterialien SHERAprint-ortho plus (SPO, SHERA Werkstoff-Technologie GmbH & CoKG, Lemförde, Deutschland), NextDent Ortho Clear (NDO, NextDent B. V., Soesterberg, Niederlande), Dental LT Clear (FDL, Formlabs GmbH, Berlin, Deutschland) und LuxaPrint Ortho Plus (LPO, DMG, Hamburg, Deutschland) wurden mit dem Stereolithografie-Drucker Straumann P30+ (hergestellt durch die Firma Rapid Shape GmbH, Heimsheim, Deutschland) additiv gefertigt. Dieser Drucker verwendet Licht der Wellenlänge 385 nm, die native Pixelgröße beträgt circa 30 µm und die XY Auflösung liegt bei 35 µm. Die Abtropfzeit nach dem Hochfahren der Bauplattform betrug etwa 10 min, danach wurde das Druckobjekt im Reinigungsgerät (P wash, Straumann Holding AG, Basel, Schweiz) mit 99% Isopropanol gewaschen und anschließend im Belichtungsgerät P cure (Straumann Holding AG) nachbelichtet. Die Herstellung der gefrästen sowie der gedruckten Kunststoffplättchen übernahm freundlicherweise das Dentallabor Dentaltechnik Kollmuß GmbH in München. Alle Kunststoffprüfkörper wurden nach dem gleichen routinemäßigen Verfahren

einseitig mit einer Kunststofffräse, einem grünen Gummipolierer, Bimsstein und Politurpaste bearbeitet, um eine gleichartige und praxisnahe Verarbeitung zu simulieren. 24 h nach der labortechnischen Bearbeitung wurden die Kunststoffplättchen in 24 Multiwellplatten (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich) in jeweils 2,5 ml komplett supplementiertem Alpha MEM Wachstumsmedium eingelegt und über 7 Tage im Inkubator bei 5% CO₂, 37°C und 100% Luftfeuchtigkeit gelagert. Nach dieser Zeit wurde das Medium abgesaugt, gepoolt und durch einen 0,25 µm Spritzenvorsatzfilter (VWR, Radnor, PA, USA) filtriert. Je 1,5 ml der Kunststoffeluat wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) abgefüllt und bei -20°C eingefroren.

3.4 Inhaltsstoffe der verwendeten Polymere

Das in dieser Arbeit stellvertretend für die Gruppe der konventionellen Schienenkunststoffe verwendete Material ist das Kaltpolymerisat PalaXpress. Es beinhaltet nach Herstellerangaben die folgenden Inhaltsstoffe (Tabelle 2):

Produkt	Polymerisationsinitiator	Monomere	Additive/ Stabilisatoren/ Katalysatoren
PalaXpress	Trioctylmethylammoniumchlorid Kupfer-II-Chlorid-2-hydrat 1-Benzyl-5-phenylbarbitursäure Dibenzoylperoxid	Methylmethacrylat 1,4- Butandioldimethacrylat	Maleinsäure

Tabelle 2: Vom Hersteller angegebene Inhaltsstoffe des Materials PalaXpress

Bezüglich der Zusammensetzung des Produktes SHERAdisc PM20 wird vom Hersteller lediglich mitgeteilt, dass dieses ein Material auf Basis von Polymethacrylaten, Dimethacrylaten und Farbpigmenten ist.

Die Herstellerangaben zu den Inhaltsstoffen der in dieser Arbeit verwendeten Schienenmaterialien für den 3D Druck sind der folgenden Tabelle 3 zu entnehmen.

Produkt	Photoinitiator	Monomere	Additive/ Stabilisatoren/ Katalysatoren
SHERAprint-ortho plus	Diphenyl (2,4,6-trimethylbenzoyl) phosphin Oxid	Isopropylidenediphenol Peg-2 Dimethacrylat 1,12-Dodecandiol Dimethacrylat 7,7,9(oder 7,9,9)-Trimethyl-4,13-dioxo-3,14-dioxa-5,12-diazahexadecan-1,16-diylbismethacrylat Urethan Dimethacrylat Hydroxypropylmethacrylat Tetrahydrofurfuryl-2-methacrylat 2-Hydroxyethylmethacrylat	
NextDent Ortho Clear	Diphenyl (2,4,6-trimethylbenzoyl) phosphin Oxid	7,7,9(oder 7,9,9) -Trimethyl-4,13-dioxo-3,14-dioxa-5,12-diazahexadecan-1,16-diylbismethacrylat 2-Hydroxyethylacrylat 2-Hydroxyethylmethacrylat Ethylendimethacrylat	Acrylsäure Monoester mit Propan-1,2-diol Bis (1,2,2,6,6-pentamethyl-4-piperidyl) sebacat Methyl-1,2,2,6,6-pentamethyl-4-piperidylsebacat
Formlabs Dental LT Clear	Diphenyl (2,4,6-trimethylbenzoyl) phosphin Oxide	7,7,9(oder 7,9,9) -Trimethyl-4,13-dioxo-3,14-dioxa-5,12-diazahexadecan-1,16-diylbismethacrylat 2-hydroxyethyl methacrylat Ethylendimethacrylat 2-Hydroxyethylacrylat	Acrylsäure, Monoester mit Propan-1,2-diol Bis(1,2,2,6,6-pentamethyl-4-piperidyl) sebacat

			Methyl- 1,2,2,6,6- pentamethyl-4- piperidylsebacat
LuxaPrint Ortho Plus	Diphenyl (2,4,6- trimethylbenzoyl) phosphin Oxid	Dimethacrylat Kunstharz Ethoxyliertes Bisphenol A Dimethylacrylate (EBPADMA)	2,6-Ditertbutyl- p-kresol

Tabelle 3: Vom Hersteller angegebene Inhaltsstoffe der Materialien

SHERAprint-ortho plus, NextDent Ortho Clear, Formlabs Dental LT Clear und LuxaPrint Ortho Plus

3.5 Spezielle Methoden und Anwendungen

Im folgenden Abschnitt der Arbeit erfolgt eine Darstellung der durchgeführten Versuche und der zugehörigen vorbereitenden Probenherstellung.

3.5.1 Gewinnung von Zellüberständen

Die Gewinnung von Zellüberständen erfolgte in Vorbereitung auf das Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) auf das Interleukin-6 (IL-6), indem hGF-1 Zellen aus zu 80% bewachsenen Zellkulturflaschen auf 12-Well-Platten verteilt, über Nacht inkubiert und darauffolgend mit je 1 ml der Negativkontrolle, Positivkontrolle und den Eluaten versetzt wurden. Als Negativkontrolle diente voll supplementiertes Wachstumsmedium und als Positivkontrolle eine finale Konzentration von 20 ng/ml Tumornekrosefaktor Alpha (TNF- α , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), welches zusammen mit anderen proinflammatorischen Zytokinen die Produktion und Expression des Zytokins IL-6 in Fibroblasten reguliert [Palmqvist *et al.*, 2008, Kent *et al.*, 1998]. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation im Wärmeschrank konnten die Überstände über den Zellen mit einer Pipette aufgenommen und in 1,5 ml Eppendorf Behältnissen bei -20°C bis zu deren Gebrauch eingefroren werden.

3.5.2 Kolorimetrische Analyse der Zell-Viabilität

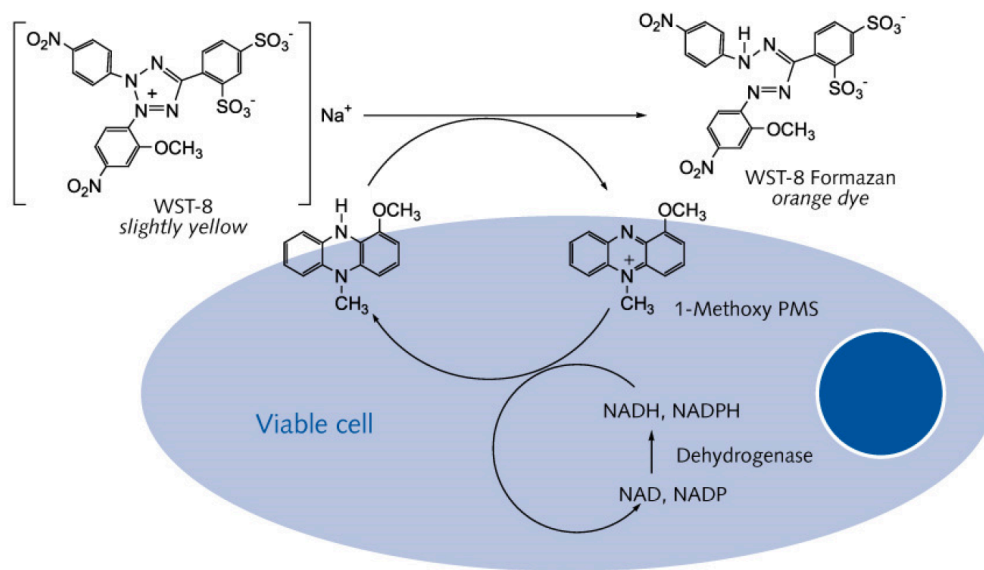


Abbildung 6: Mechanismus des Farbumschlags im WST-8 Assay (1-Methoxy PMS: 1-Methoxyphenazin Methosulfat, NADH: Nicotinamidadenindinukleotidhydrid, NADPH: Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, NAD: Nicotinamidadenindinukleotid, NADP: Nicotinsäureamidadenindinukleotidphosphat) [PromoCell GmbH, 2021]

Zur Untersuchung der Zytotoxizität wurde das wasserlösliche 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl) -3-(4-nitrophenyl) -5-(2,4-disulfophenyl) -2H-tetrazolium, monosodium Salz verwendet, das auch unter der Kurzform WST-8 (water-soluable-tetrazoliums salt-8) bekannt ist. Das Colorimetric Cell Viability Kit I (CCVK-I, PromoCell, Heidelberg, Deutschland) enthält dieses Tetrazolium-Salz, welches durch Dehydrogenasen in Mitochondrien vitaler Zellen mit intakter Zellatmung zu einem wasserlöslichen, orangefarbenen Formazan reduziert wird. Dieser Farbumschlag ist in direktem Maße proportional zur Anzahl lebender Zellen [Tominaga *et al.*, 1999]. Eine schematische Darstellung des Vorgangs ist in Abbildung 6 zu sehen.

Nach erfolgter Zellzählung wurden etwa 5000 Zellen pro Well über Nacht auf einer 96-Well Mikrotiterplatte ausgesät. Es folgte das Absaugen des Mediums mit einer einmal-Glaspipette und das anschließende Zupipettieren von jeweils 200 µl der Kontrollen und Polymereluate nach einem festgelegten Schema, in dem Triplikate derselben Zusammensetzung auf der Mikrotiterplatte verteilt

wurden. Alle Eluate wurden sowohl pur als auch in absteigenden Konzentrationen von 1:1, 1:5 und 1:10 mit Medium verdünnt verwendet, als Negativkontrolle diente pures supplementiertes Zellkulturmedium und als Positivkontrolle das Zelllysat Triton X-100 (4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)-phenyl-polyethylenglykol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 1%-iger Konzentration. Nach 48-stündiger Inkubation wurden 100 µl des 10%igen CCVK-I-Medium-Gemischs in jedes Well pipettiert und die optische Dichte (Extinktion einer Lösung, Absorption) nach 2 Stunden bei 450 nm (OD_{450}) Wellenlänge photometrisch gemessen (Varioscan LUX, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Der Farbumschlag von pink nach orange konnte beobachtet werden und ist in Abbildung 7 zu sehen. Für hGF-1 und BHY-Zellen erfolgten jeweils fünf unabhängige Versuchsdurchläufe dieser Art.

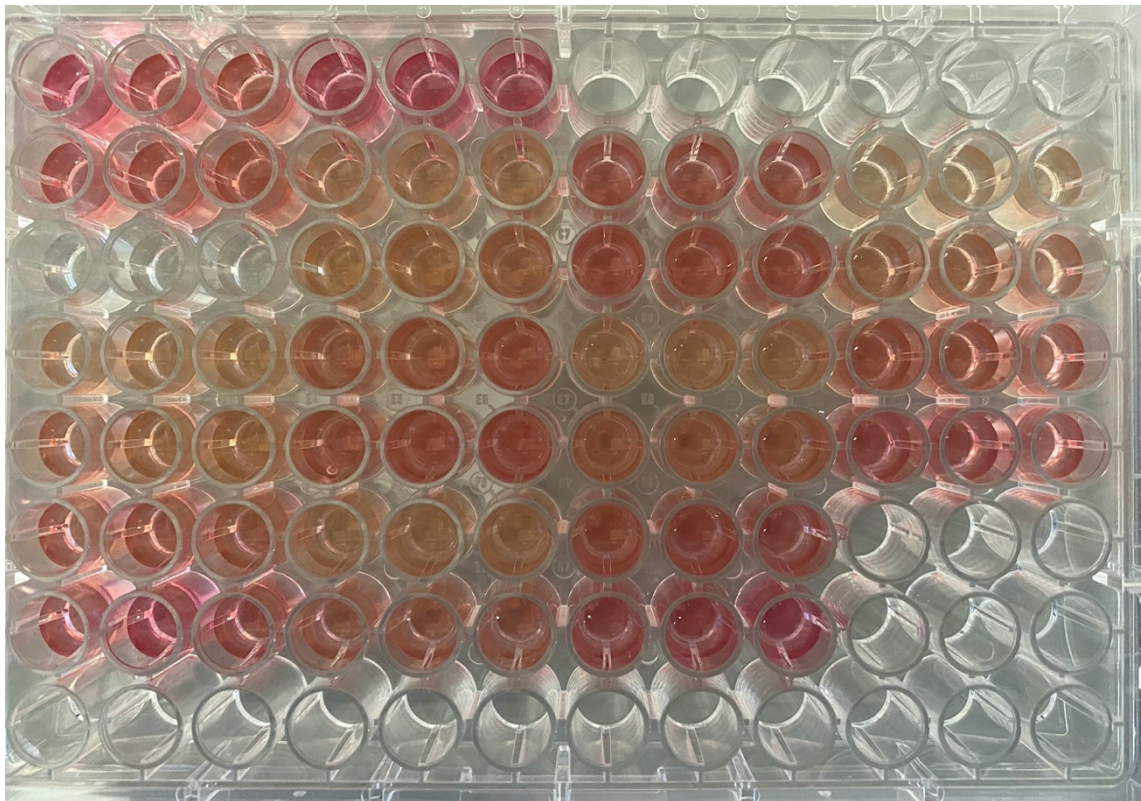


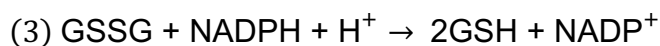
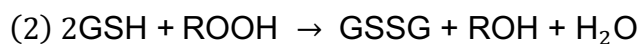
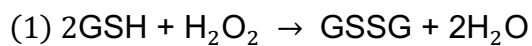
Abbildung 7: Zellviabilitätsversuch bei BHY-Zellen nach Hinzufügen des WST-8 Reagenz

3.5.3 Nachweis von oxidativem Stress durch Glutathion Messung

Als Indikator für zelluläre Gesundheit und oxidativen Stress wurde mit dem folgenden Versuch das Verhältnis von reduziertem (GSH) zu oxidiertem Glutathion (GSSG) untersucht [Owen und Butterfield, 2010], welches mit

Zellproliferation, -differenzierung und -tod korreliert. Im Hinblick auf weitere Versuche dieser Arbeit ist auch der Einfluss von GSH auf die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und die Externalisierung von Phosphatidylserin im Zuge der Einleitung der Apoptose bemerkenswert [Ballatori *et al.*, 2009, Staal *et al.*, 1990, Schreck *et al.*, 1991].

Als eines der wichtigsten Antioxidantien in eukaryotischen Zellen übt GSH eine protektive Rolle für Proteine im Zytoplasma aus, indem es mit reaktiven Sauerstoffspezies, die beispielsweise in entzündlichen Prozessen entstehen, zu GSSG und Wasser reagiert (1,2). Unter Energieverbrauch wird GSSG wieder zu GSH reduziert (3), sodass in gesunden Zellen meist über 98% des Glutathions in reduzierter Form vorliegt [Ghezzi, 2005].



Nach Zellzählung wurden je 15000 Zellen pro Well in einer schwarzen 96 Multiwell Platte (Lumox, Sarstedt AG & Co. KG) ausgesät und über Nacht bei optimalen Wachstumsbedingungen inkubiert.

Am nächsten Tag folgte die Verteilung der Probeneluate, der Negativkontrolle und der Positivkontrolle auf Wells nach festgelegtem Pipettierschema, das eine Versuchsreihe für die Messung des totalen Glutathion, eine für die des oxidierten Glutathion und eine für die der Glutathion-Verdünnungsreihe beinhaltete. Es schloss sich eine weitere Lagerung für 4 Stunden im Inkubator an. Als Positivkontrolle für oxidativen Stress diente hier 40 μM Menadione, welches Sauerstoffradikale erzeugt, die mit GSH reagieren und das Level von GSSG erhöht [Loor *et al.*, 2010, Sun *et al.*, 1997]. Die Negativkontrolle war 0,1%iges Dimethylsulfoxid (DMSO, Carl Roth GmbH & Co. KG) in Medium, welches durch zwischenmolekulare Kräfte reduziertes GSH in seiner Faltstruktur festhält [Zhang *et al.*, 2011]. Für die folgenden Schritte wurden alle Reagenzien des GSH/GSSG-Glo Assays der Firma Promega (Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA) zunächst sanft auf Raumtemperatur gebracht und maximal 30 Minuten vor Verwendung zu gebrauchsfertigen Lösungen vermischt. Als Erstes wurden die Lysereagenzien nach Herstellerangaben vorbereitet, der komplette

Zellüberstand abgesaugt, und 50 μl des Lysereagens für totales GSH in die Wells für die Messung des totalen Glutathions in die Blanks und in die für die Standardkurve vorgesehenen Wells pipettiert. Das Lysereagenz zur Messung des oxidierten Glutathions wurde nur in die dafür vorgesehenen Wells gegeben und alles schließlich 5 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Mikrotiterplattenschüttler (Polymax 1040, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) inkubiert.

Zur Umrechnung der Lumineszenz in Konzentrationen von reduziertem und oxidiertem Glutathion war als Referenz die Erstellung einer Glutathion-Standardkurve notwendig. Zu diesem Zweck wurden 32 μl des im Set enthaltenen 5 mM Glutathion in 468 μl Wasser verdünnt und auf Basis dieser Ausgangslösung eine zweifache Verdünnungsreihe mit 8 Stufen erstellt, indem je 250 μl der jeweils vorausgehenden Lösung in 250 μl Wasser für die nächste Verdünnungsstufe pipettiert wurden. 5 μl jeder Verdünnungsstufe wurden in die dafür vorgesehenen Wells pipettiert. In der nachfolgenden Darstellung wird die Verdünnungsreihe schematisch dargestellt (Abbildung 8).

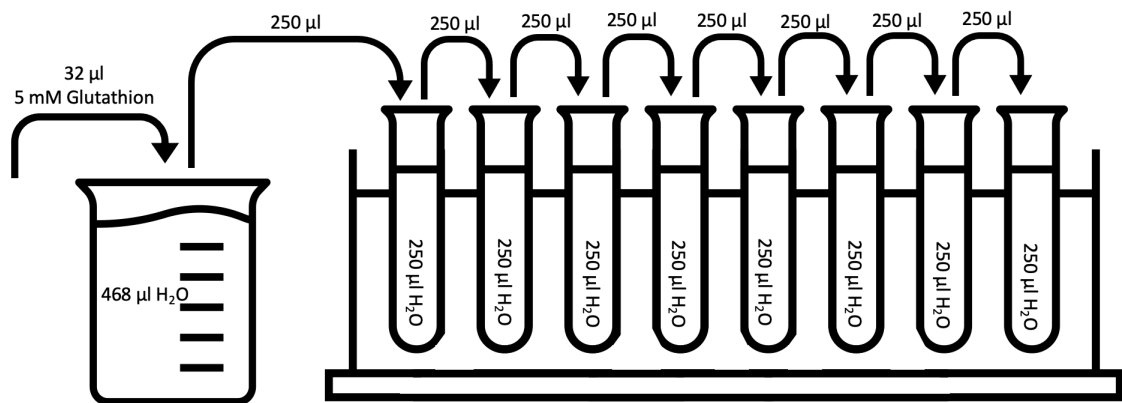


Abbildung 8: Pipettierschema Glutathion Verdünnungsreihe

Im nächsten Schritt wurde das Luziferin-Generierungs-Reagenz hergestellt, in dem neben einem Glutathion-Reaktions-Puffer auch Diethiothreitol (DTT) und Glutathion-S-Transferase in Mengenverhältnissen nach Herstellerempfehlung enthalten sind. Zu jedem zu beprobenden Well wurden 50 μl der Lösung hinzu pipettiert und kurz geschwenkt, bevor die Platte 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

Zuletzt wurden noch 100 µl des zuvor zusammen gemischten Luziferin-Nachweis-Reagenz den Wells hinzugefügt und kurz geschwenkt. Nach einer etwa 15-minütigen Inkubation erfolgte die Lumineszenzmessung im Mikrotiterplatten Luminometer (GloMax Navigator System, Promega) mit einer Integrationszeit von 0,3 s.

Die Ermittlung sowohl von GSH als auch von GSSG beruht auf dem Reaktionsschema in der nachfolgenden Abbildung 9. Die Reaktion von GSH durch eine Glutathion S-Transferase ist hier an die Luciferase-Glühwürmchen-Reaktion gekoppelt, wodurch proportional zur Konzentration von GSH Licht entsteht, welches gemessen werden kann.

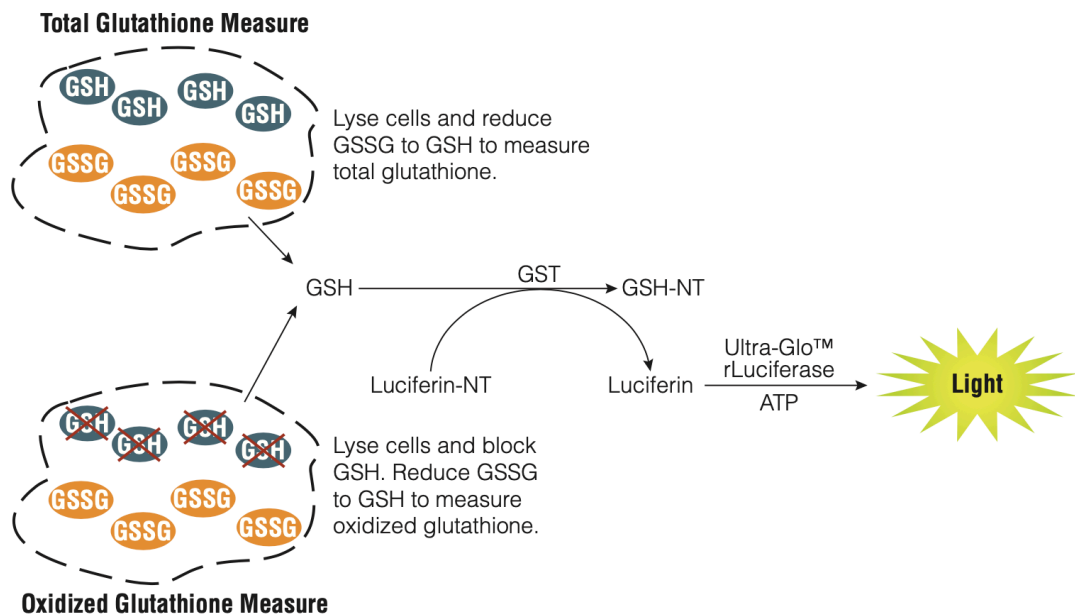


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Glutathion Assay (GSH: Glutathion, GSSG: Glutathiondisulfid, GST: Glutathion-S-Transferasen, ATP: Adenosintriphosphat) [Promega GmbH, 2021a]

3.5.4 ELISA auf IL-6

Der biochemische Signalweg über IL-6 eignet sich sehr gut für eine schnelle Entzündungsantwort des Körpers, weshalb dieser Sachverhalt nicht nur in der Therapie von entzündlichen degenerativen Erkrankungen, sondern auch im vorliegenden Versuch, einem Enzyme-linked immunosorbent Assay, genutzt und untersucht wird [Tanaka und Kishimoto, 2012]. In der nachfolgenden Darstellung (Abbildung 10) ist der Signalweg über die IL-6-Rezeptor-Familie, auch Jak/Stat

Signalweg genannt, dargestellt. Dieser zeigt, wie IL-6 unter anderem die oben genannten Zellmechanismen in Gang setzt.

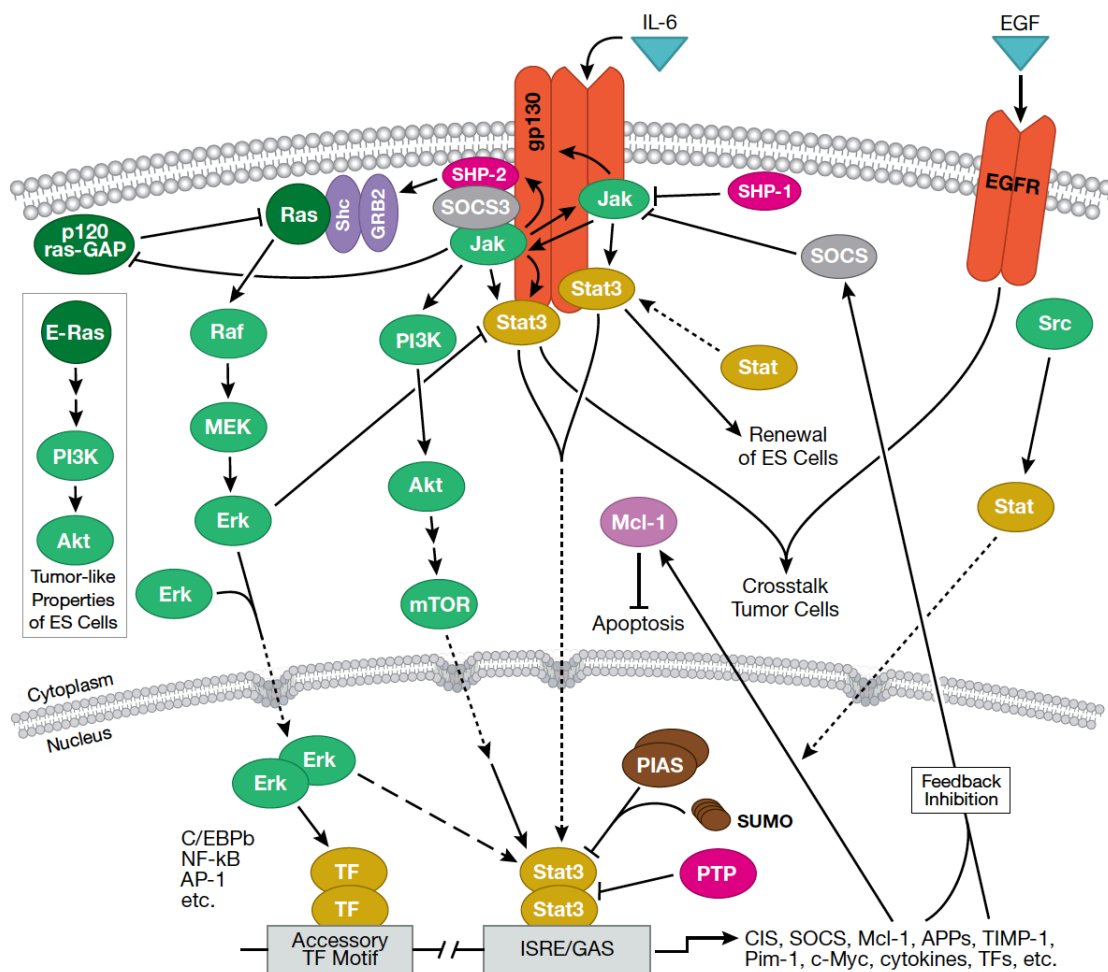


Abbildung 10: Jak/Stat-Signalweg (in embryonalen Stammzellen) [Cell Signaling Technology, 2022]

Vorbereitend wurden alle Reagenzien des human IL-6 Quantikine ELISA Kit (Research and Diagnostic Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA), wie auch die Probeneluate aus den vorher hergestellten und eingefrorenen Zellüberständen, auf Raumtemperatur erwärmt und ein Waschpuffer aus 20 ml Konzentrat und 480 ml Wasser zusammengemischt. Anschließend erfolgte die Erstellung einer Verdünnungsreihe mit 6 Verdünnungsstufen und dem Verdünnungsfaktor 2, die in der folgenden Abbildung 11 schematisch dargestellt wurde. Der Calibrator Diluent RD6F diente als Nullstandard mit einer Konzentration von 0 pg/ml, während der Hochstandard eine Konzentration von 300 pg/ml IL-6 enthielt. Für die erste Verdünnung wurden 333 µl des im Versuchssatz enthaltenen Hochstandards mit 667 µl Calibrator Diluent vermischt, sodass eine

Konzentration von 100 pg/ml IL-6 entstand. Fünf weitere Verdünnungsstufen wurden je durch Vermischen von 500 µl der vorhergehenden Verdünnung und 500 µl Nullstandard hergestellt, bis im letzten Schritt eine Verdünnung von 3,13 pg/ml vorlag.

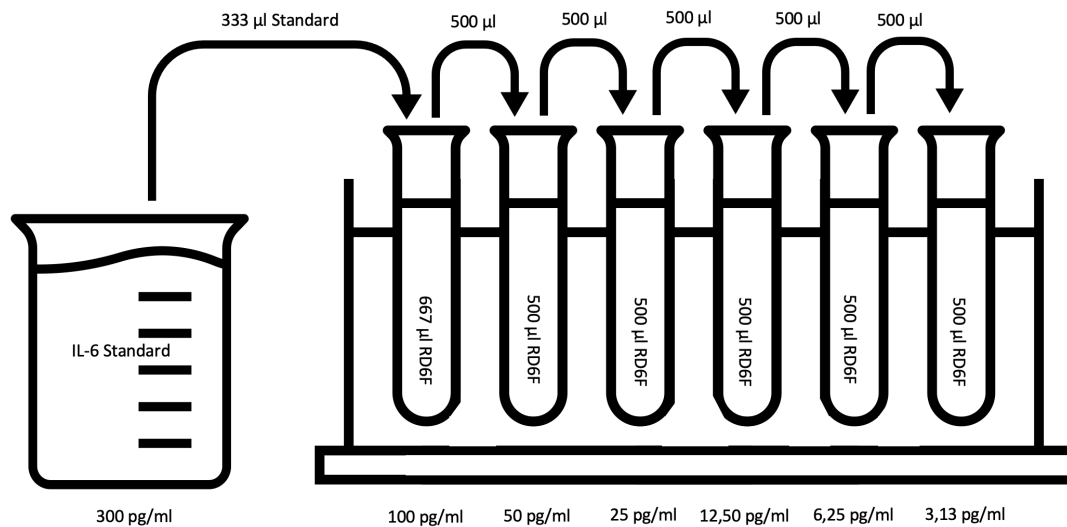


Abbildung 11: Verdünnungsreihe von IL-6

Je 100 µl des Assay Diluent RD1W wurden in alle zu beprobenden Wells pipettiert und 100 µl der Kontroll-, Standard-, und Probenlösungen hinzugefügt. Die Kammern der ELISA-Platte waren vom Hersteller mit monoklonalen spezifischen Antikörpern, die alle passenden Antigene während einer luftdichten Inkubation für zwei Stunden bei Raumtemperatur binden sollten, vorbeschichtet. Um alle überschüssigen, ungebundenen Substanzen von der Mikrotiterplatte zu entfernen, wurden anschließend alle Wells fünfmal mit je 300 µl Waschpuffer geflutet und sorgfältig entleert. Im darauffolgenden Schritt erfolgte die Hinzugabe von 200 µl des Human IL-6 Conjugate in jedes der Wells und das gleiche Vorgehen bei Inkubation und Waschung wie schon zuvor beschrieben. Beabsichtigt war dabei, das an den Boden der ELISA-Platte gebundene IL-6 spezifisch mit Enzym-gekoppelten polyklonalen Antikörpern zu markieren, die wiederum das Farbsubstrat umsetzen können. Durch die charakteristische räumliche Anordnung in diesem antikörperbasierten Nachweisverfahren hat sich der Begriff des Sandwich-ELISAs etabliert, dessen Funktionsprinzip in der folgenden Abbildung 12 schematisch dargestellt ist [Van Weemen und Schuurs, 1971, Engvall und Perlmann, 1971].

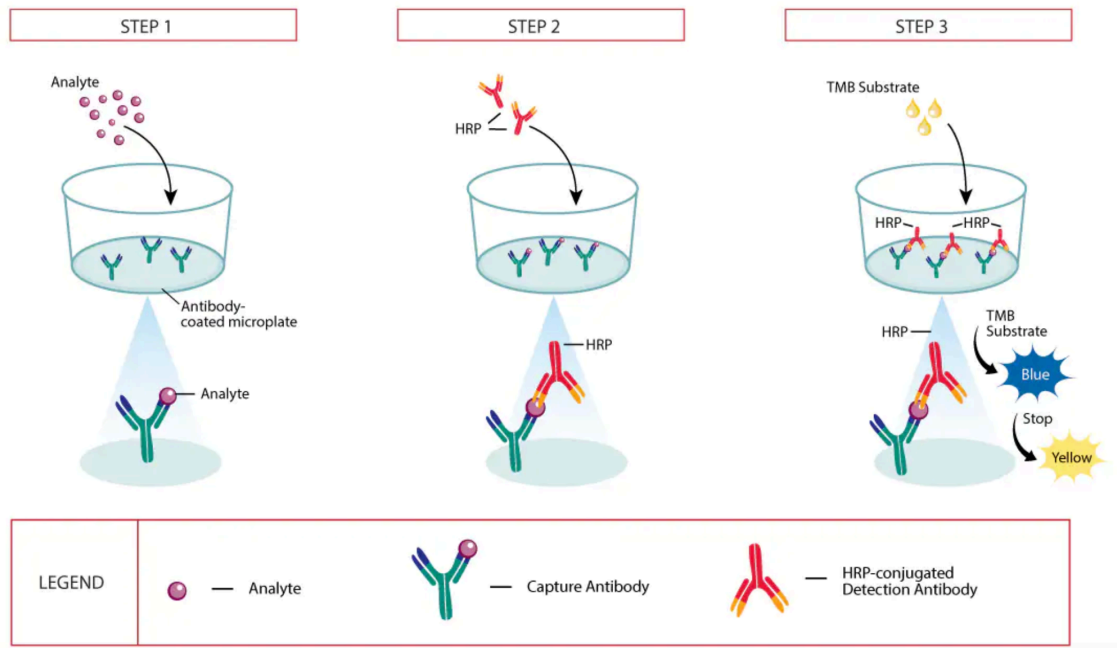


Abbildung 12: Schematische Darstellung eines Sandwich ELISA [Bio-Techne, 2022]

Die Substratlösung wurde kurz vor Gebrauch im Verhältnis 1:1 angemischt und 200 μ l in jedem Well für 20 Minuten bei Raumtemperatur und vor Licht geschützt inkubiert. Zuletzt wurde die Stop Solution auf 50 μ l pro Well abgemessen, und die Beendigung der Farbentwicklung konnte durch einen Farbumschlag von blau nach gelb beobachtet werden. Die optische Dichte wurde innerhalb von 30 Minuten bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen gemessen und der Wert für 540 nm von dem für 450 nm subtrahiert. Aus den Messwerten der Verdünnungsreihe wurde eine Standardkurve erstellt, anhand derer die Konzentration des Interleukin-6 in den Proben bestimmt werden konnte, denn hier gilt das Lambert Beer'sche Gesetz, also die direkte Proportionalität und Linearität zwischen optischer Extinktion und Konzentration des zu bestimmenden Antigens in der Probe [Spector, 1978]. Die Erstellung des Graphen und die Berechnungen erfolgten in der Software Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Der dynamische Bereich des Assays zwischen Nachweisgrenze und Sättigung des Sensors wurde berücksichtigt.

3.5.5 Untersuchung von Apoptose und Nekrose mit luziferasemarkiertem Annexin V und fluoreszierender DNA-Färbung in Echtzeit

An letzter Stelle der zellbiologischen Untersuchungen steht in dieser Arbeit der Zelltod. Untersucht wurde dieser mithilfe des Real Time Glo Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay (Promega), welches Annexin V Fusionsproteine nutzt, die mit binären Elementen einer sich ergänzenden Luziferase (LgBiT und SmBiT) gekoppelt sind. Sie besitzen nur moderate Affinität zueinander, doch nach Bindung von Annexin V an das apoptosespezifische Phosphatidylserin (PS) auf der äußeren Seite der Zellmembran und der damit einhergehenden räumlichen Annäherung, können sich die Untereinheiten der Luziferase leichter ergänzen und ein Lumineszenzsignal wird durch enzymatische Umsetzung des Substrats NanoBiT generiert [Kupcho *et al.*, 2019]. Martin *et al.*, 1995, entdeckten erstmals PS als verlässliches und valides Mittel zur Beurteilung der Apoptose, denn bei vitalen Zellen wird das Phospholipid aktiv auf der zytosolischen Seite der Membran gehalten und erst nach Eintreten in den programmierten Zelltod auf die äußere Membran umverteilt.

Es gibt verschiedene Prozesse, welche zur Nekrose einer Zelle führen können, doch sie alle haben dasselbe Ergebnis: den Verlust der Membranintegrität gefolgt vom Austritt von Zytoplasma und Zellbestandteilen [Yuan und Kroemer, 2010]. Zur Beobachtung der Nekrose ist deshalb ein fluorogenes DNA-Färbemittel, welches die intakte Zellmembran nicht passieren kann, enthalten.

Diese Prozesse sind schematisch in der nachfolgenden Abbildung 13 dargestellt.

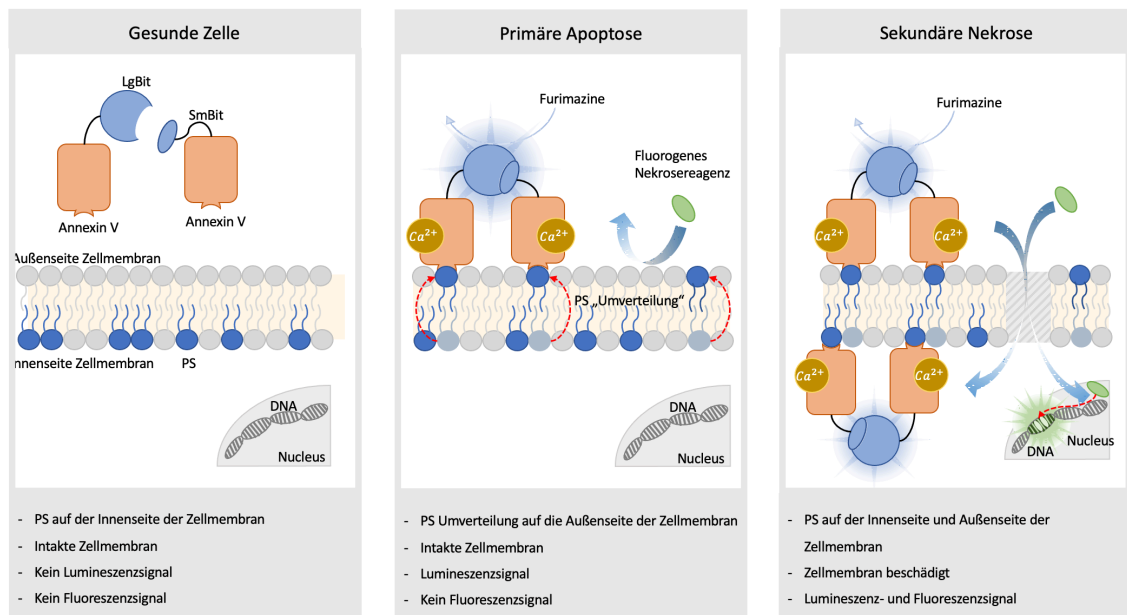


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Annexin V Apoptose und Nekrose Assay [Promega GmbH, 2021b]

Für diesen Versuch wurden etwa 10.000 Zellen, gelöst in je 200 μ l Zellkulturmedium, in alle dafür vorgesehenen Vertiefungen einer schwarzen 96 Multiwellplatte ausgesät, 200 μ l supplementierten Mediums in die Blanks pipettiert und für 24 Stunden im Brutschrank abgestellt.

Während das Luziferasesubstrat, Calciumchlorid und das Nekrose Detections Reagens im warmen Wasserbad auf Raumtemperatur erwärmt wurden, lagerten die komplementären Annexin V Luziferase Einheiten auf Eis. Die drei erstgenannten wurden eines nach dem anderen in einer Verdünnung von 1:500 mit einem mit fetalem Kälberserum supplementierten, vorgewärmten Medium (Alpha-MEM) ohne Antibiotikumzusatz verwirbelt. Erst anschließend erfolgte die Zugabe von Annexin V-SmBiT und -LgBiT der gleichen Konzentration und ein sanftes Schwenken der Lösung.

Anschließend wurde der Zellüberstand in der Multititerplatte abgesaugt und Duplikate von 100 μ l der Kunststoffproben - sowohl pur als auch in Verdünnung (1:1, 1:5, 1:10) - und der Kontrollsubstanzen in die Wells pipettiert. Negativkontrolle stellte Zellkulturmedium, Positivkontrolle Staurosporin (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) in den Konzentrationen 1, 0,5 und 0,2 $\frac{\mu\text{mol}}{\text{l}}$ dar. Der Proteinkinaseinhibitor Staurosporin induziert die Apoptose unter anderem über den Weg der Caspase-3 ähnlichen Proteasen und über eine

erhöhte Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B [Chae *et al.*, 2000]. Direkt im Anschluss wurden 100 μ l der vorbereiteten Detektionslösung hinzugefügt und für 30 Sekunden geschwenkt, bevor die erste Inkubation für eine Stunde in 5% CO₂ und bei 37°C eingeleitet wurde. Nach 1-, 2-, 4-, 8-, 12- und 24-stündiger Inkubation erfolgten die Messungen der Lumineszenz (GloMax Navigator System) bei einer Belichtungszeit von 0,3 Sekunden und der Fluoreszenz (Varioskan LUX) bei einer Wellenlänge von 485 $\pm$ 20 nm und 525 $\pm$ 30 nm. So konnten die Kinetik und das Ausmaß der Apoptose und sekundären Nekrose in Echtzeit aufgezeichnet und anhand dieser Auswertungen eine Aussage über die Art des Zelltods und die Auswirkungen der verschiedenen Materialien getroffen werden.

3.6 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Messergebnisse wurde Python als Programmiersprache in Jupyter Notebook verwendet. Die Überprüfung der Daten auf Normalverteilung erfolgte mittels des Shapiro-Wilk-Tests. Die Homoskedastizität, also die Gleichheit der Varianzen, wurde durch den Levene-Test überprüft. Anschließend erfolgte eine Untersuchung auf statistisch signifikante Unterschiede der zentralen Tendenz durch eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) und nachfolgend der Post-Hoc-Tukey-Test zur Ermittlung der Ergebnisse, zwischen denen ein signifikanter Unterschied besteht. Bei Ungleichheit der Varianzen wurde Welch's ANOVA und anschließend der Games-Howell post-hoc-Test durchgeführt. Bestand ein Zusammenhang zwischen den Messergebnissen bzw. bei verbundenen Stichproben (Messwiederholungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Annexin-V Versuch), wurde zunächst die Homoskedastizität durch Mauchly's Sphärizitätstest überprüft, um dann die einfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung beziehungsweise den Friedman-Test mit anschließendem post-hoc Nemenyi-Test anzuwenden. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,05$ gewählt und die Grafiken wurden in Excel erstellt.

4. Ergebnisse

4.1 Kolorimetrische Analyse der Zellviabilität mittels WST-8

Die Zellviabilität von Plattenepithelkarzinomzellen (BHY) und humanen Gingivafibroblasten nach Stimulation mit Kunststoffeluaten wurde im WST-8 untersucht. Die Ergebnisse sollen im Folgenden dargestellt werden.

Durch Mittelung der Ergebnisse von technischen und biologischen Replikaten und nach Berechnung der jeweiligen Zellviabilität wurden diese samt Standardabweichungen in Abhängigkeit von der Art und Verdünnung des verwendeten Kunststoffeluats im nachfolgenden Balkendiagramm aufgetragen. Diejenigen Mittelwerte, die einen statistisch signifikanten Unterschied zueinander zeigten, wurden durch Klammern gekennzeichnet.

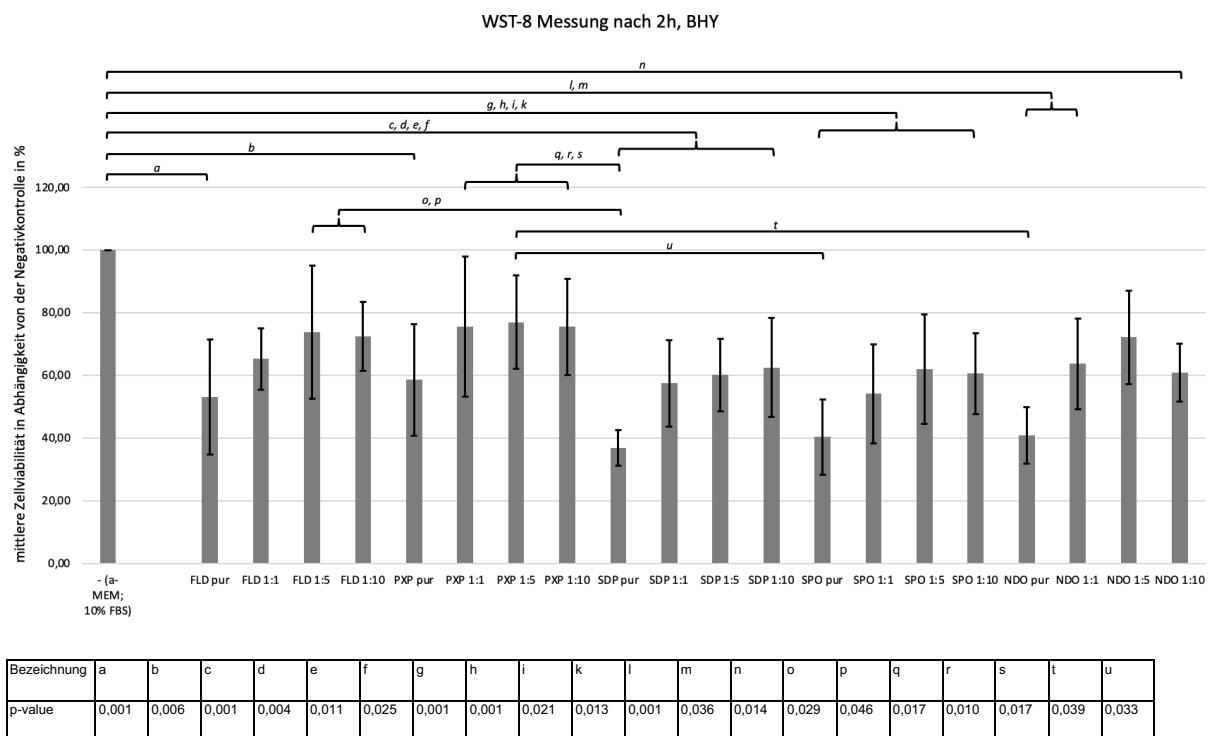


Abbildung 14: Ergebnisse des „WST-8“ nach 48 h Inkubation bei BHY-Zellen (Messung 2 Stunden nach Versuchsbeginn)

In der Versuchsreihe mit BHY-Zellen (Abbildung 14) wurde für alle pur verwendeten Eluate eine statistisch signifikante Verminderung der Zellviabilität gegenüber der Negativkontrolle gefunden. Diese betrug bei Formlabs Dental LT Clear 53,17%, bei PalaXpress 58,59%, bei SHERAdisc PM20 36,92%, bei SHERAprint-ortho plus 40,40% und bei NextDent Ortho Clear 40,91%. was auf

eine zytotoxische Wirkung aller Eluate auf diese Zellreihe schließen lässt. Im Falle von SHERAdisc PM20 und SHERAprint-ortho plus wiesen alle, bei NextDent Ortho Clear drei von vier Verdünnungen eine signifikant gestörte Atmungskette verglichen mit derjenigen der Negativkontrolle auf. Kunststoffeluat gleicher Verdünnung wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf.

Sowohl im Falle der BHY-Zellen als auch bei den hGF-1 Zellen zeigten ohne Verdünnung verwendete Kunststoffeluat untereinander keine statistisch signifikanten Unterschiede. Auffallend, wenn auch nicht statistisch signifikant ist jedoch, dass innerhalb eines Materials eine größere Verdünnung tendenziell mit einer höheren Überlebensrate der Zellen einherzugehen scheint.

Der nachfolgende Graph (Abbildung 15) zeigt die Zellviabilität in Abhängigkeit von Material und Verdünnung bei Verwendung von humanen Gingivafibroblasten.

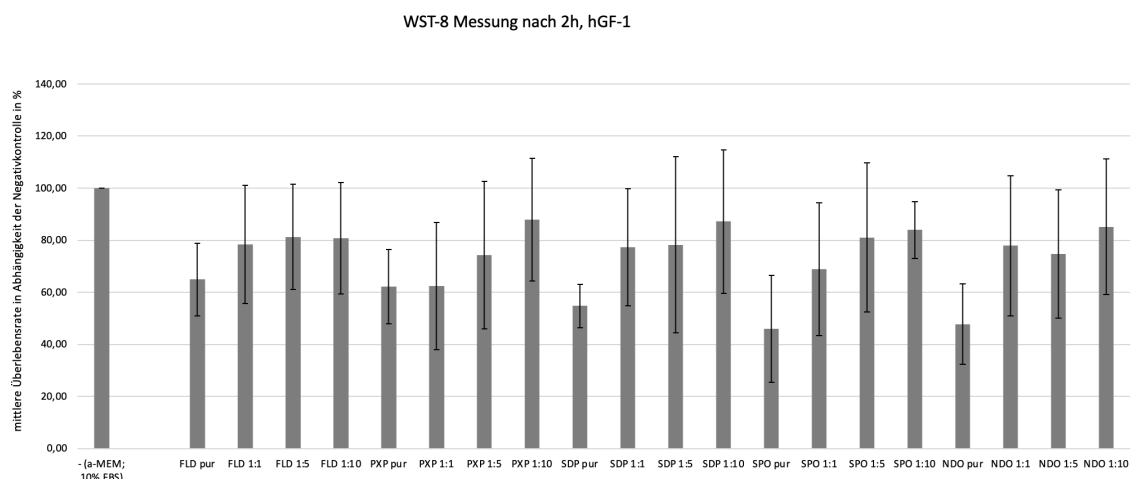


Abbildung 15: Ergebnisse des „WST-8“ nach 48h Inkubation bei hGF-1-Zellen (Messung 2 Stunden nach Versuchsbeginn)

Hier konnte zwischen der mittleren Zellviabilität bei Verwendung von Eluaten und der Negativkontrolle kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Es wird jedoch ersichtlich, dass auch in diesem Falle die pur verwendeten Lösungen die größte Schädigung der Atmungskette der Fibroblasten bewirkten, wobei die Viabilität zwischen maximal 64,91% für FL und minimal 45,97% im Falle von SPO liegt.

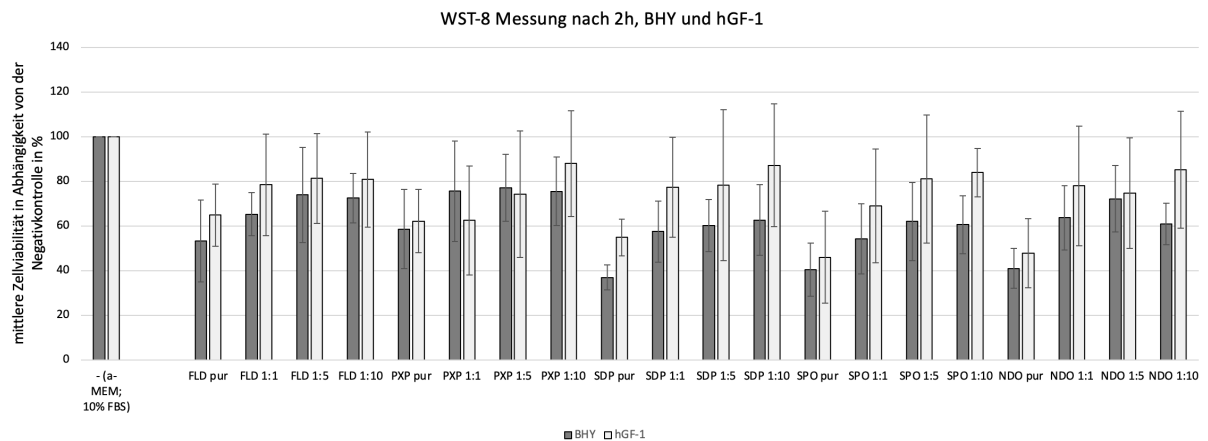


Abbildung 16: Ergebnisse des „WST-8“ nach 48h Inkubation, Vergleich von BHY- und hGF-Zellen (Messung 2 Stunden nach Versuchsbeginn)

Im direkten Vergleich (Abbildung 16) ist gut zu erkennen, dass in 18 der 20 beprobten Substanzen und Verdünnungen prozentual mehr BHY- als hGF-1-Zellen mit einer Schädigung der Atmungskette reagierten.

4.2 Messung von intrazellulärem GSH/GSSG zur Beurteilung von oxidativem Stress

Reduziertes Glutathion (L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycin, GSH) ist ein ubiquitär vorkommendes Thiol und gilt als einer der wichtigsten Scavenger von reaktiven Sauerstoffverbindungen. Das Verhältnis zu seinem Redoxpartner, dem oxidierten Glutathion, kann als Marker für oxidativen Stress von Zellen verwendet werden und ist unter physiologischen Bedingungen >10 [Gressner und Gressner, 2019].

Die Messergebnisse dieses Versuches wurden zunächst durch Abzug des Blank-Wertes bereinigt. Da durch Reduktion von einem Mol oxidiertem Glutathion zwei Mol GSH entstehen, muss zur Berechnung der Konzentration von GSSG die bekannte totale Glutathionkonzentration halbiert werden. Nach Auftragen der Konzentrationen von totalem Glutathion und GSSG gegen den jeweils gemessenen Lumineszenzwert in einem Graph konnten Standardkurven erstellt und deren Steigung im linearen Bereich ermittelt werden (Abbildung 17).

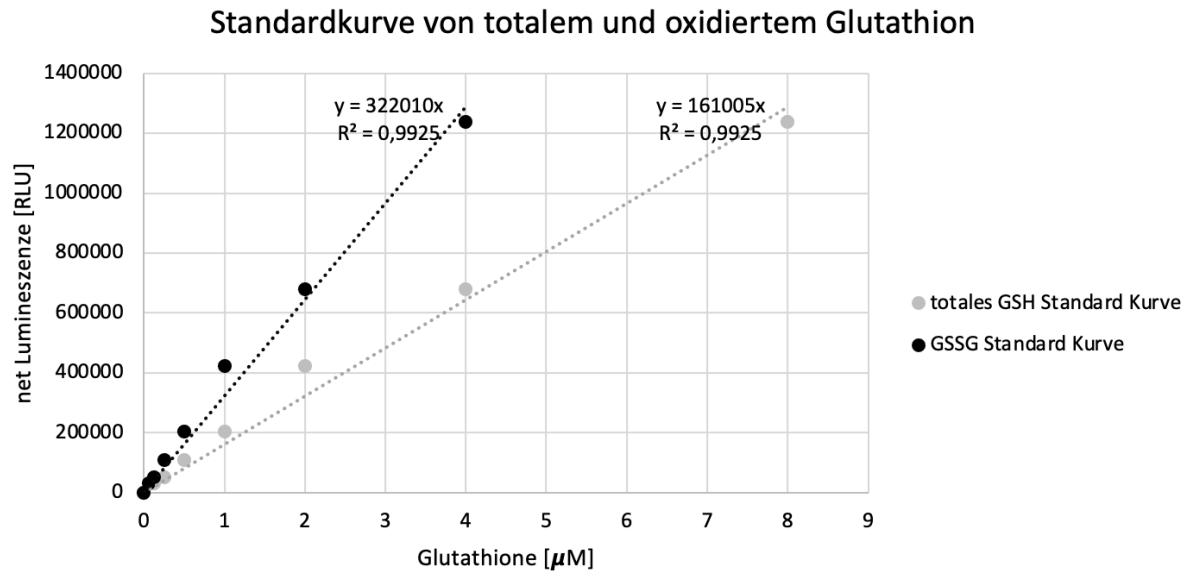


Abbildung 17: Standardkurve von totalem und oxidiertem Glutathion

Diese Steigung dividiert durch die ermittelten Messwerte für die Proben, sowie Positiv- und Negativkontrolle ergeben Konzentrationen von totalem und oxidiertem Glutathion. Zuletzt liefert die doppelte oxidierte Glutathionkonzentration subtrahiert von der totalen Glutathionkonzentration die gesuchte Konzentration reduzierten Glutathions (Abbildung 18).

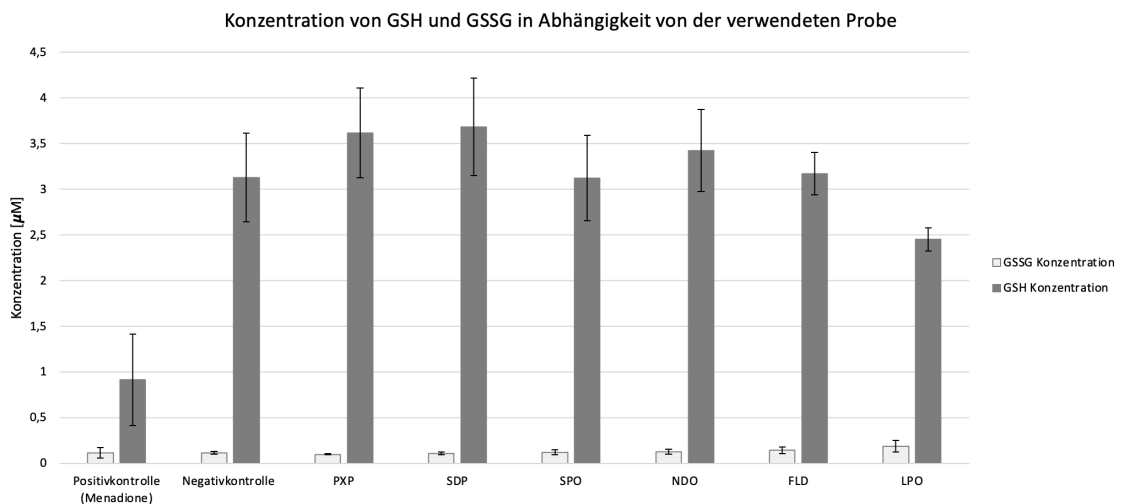


Abbildung 18: Konzentrationen von GSH und GSSG

Das Verhältnis von GSH zu GSSG aus drei unabhängigen Versuchsdurchläufen wurde gemittelt und samt der Standardabweichung in einem Graphen (Abbildung 19) aufgetragen.

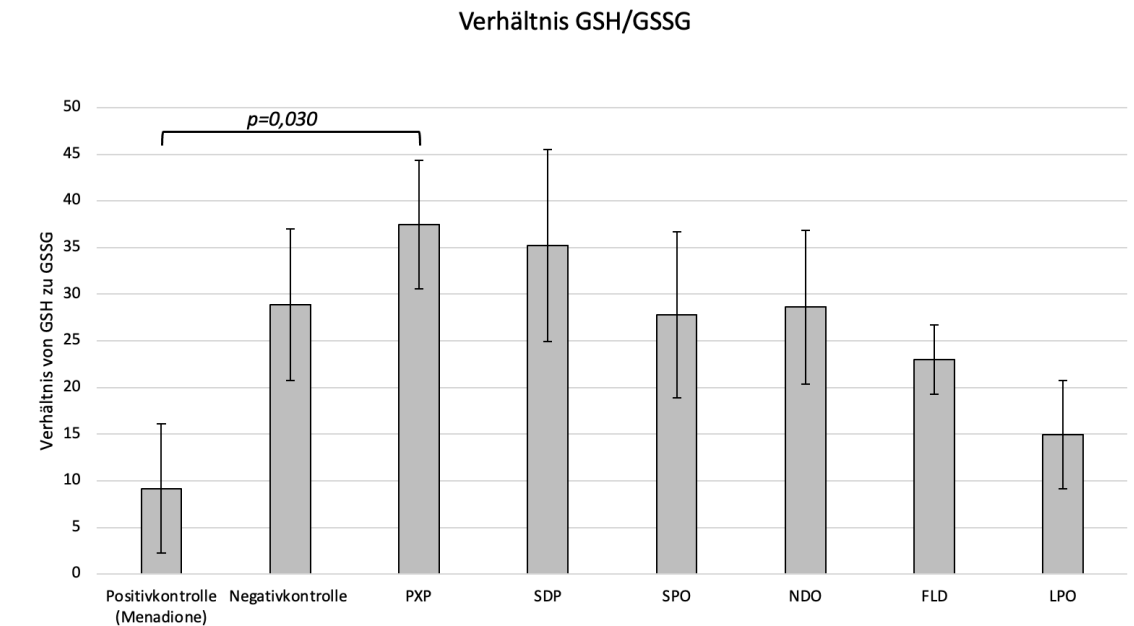


Abbildung 19: Ergebnisse des „Glutathion Assays“

Die Mittelwerte ergaben für die Positivkontrolle mit Menadione den geringsten Wert von $9,17 \pm 6,91$, womit dieser unterhalb der vermerkten Grenze von 10 liegt, und für die Negativkontrolle $28,89 \pm 8,10$. Über dem Wert für die Negativkontrolle lagen PXP ($37,48 \pm 6,89$) und SDP ($35,22 \pm 10,27$), darunter befanden sich alle additiven Kunststoffe mit Werten zwischen $14,93 \pm 5,79$ und $28,63 \pm 8,23$.

Für das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den arithmetischen Mittelwerten der Positivkontrolle und PXP gefunden werden. Die Eluate der 3D gedruckten Materialien riefen eine leichte Reduktion von GSH/GSSG hervor, doch auch der niedrigste Wert im Falle von LPO blieb größer als der Wert für die Positivkontrolle. Außerdem zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der PXP und SDP-Proben im Vergleich zu LPO.

4.3 ELISA auf IL-6

Die Konzentration von IL-6 in ruhenden, unstimulierten Gingivafibroblasten ist (mit ca 0,5 ng/ml) normalerweise gering. Werden diese jedoch beispielsweise mit dem Zytokin $\text{TNF-}\alpha$ stimuliert, kann die Konzentration bis auf das 30-fache des Ausgangswertes steigen [Kent *et al.*, 1998].

Auch in diesem Versuch wurde eine Standardkurve (Abbildung 20) erstellt: dazu mussten zuerst die Differenzen aus den Mittelwerten der bei 450 nm und bei

540nm gemessenen Duplikate berechnet werden. Diese wurden in einem Graphen gegen die bekannte Konzentration von Interleukin-6 aufgetragen und eine lineare Funktionsgleichung aufgestellt.

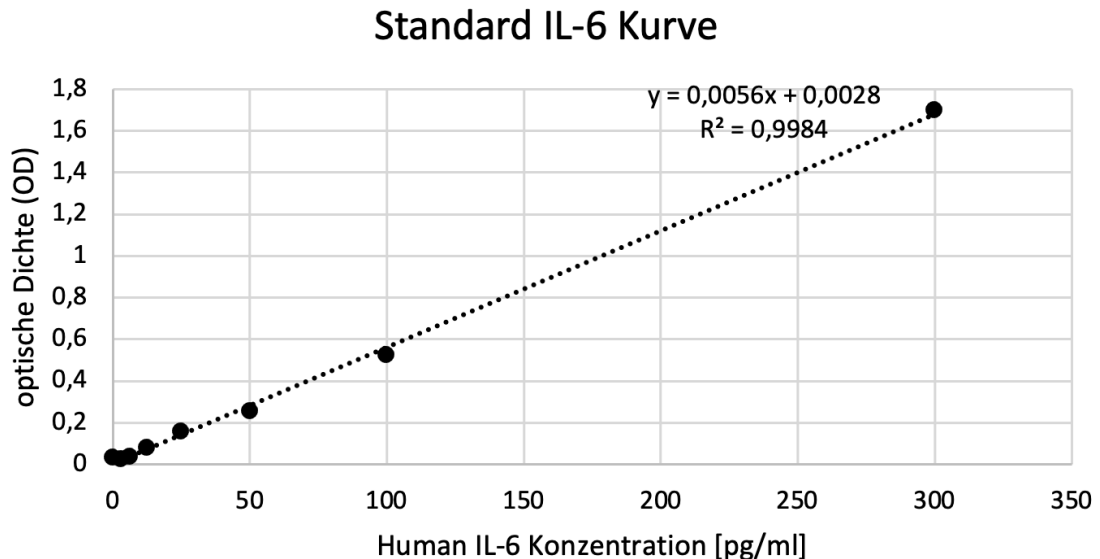


Abbildung 20: Standardkurve von IL-6

Auch für die Proben unbekannter IL-6 Konzentrationen wurden die Differenzen aus den Mittelwerten der bei 450 nm und bei 540 nm gemessenen Duplikate berechnet. Die Konzentrationen konnten nun durch Auflösen der linearen Funktion der Standardkurve nach x für jeden Messwert berechnet werden. Dies geschah in gleicher Weise für 4 unabhängige Versuchsdurchläufe und das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichungen für die biologischen Replikate wurden im nachfolgenden Graphen (Abbildung 21) dargestellt:

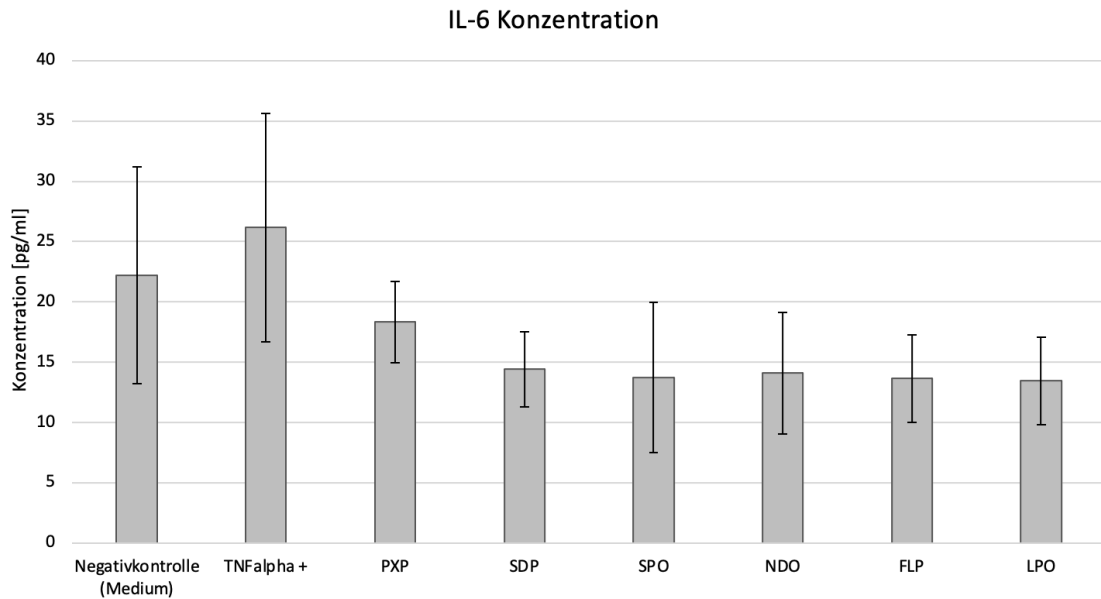


Abbildung 21: Ergebnisse des „IL-6 ELISAs“

Die Negativkontrolle wies mit 22,21 pg/ml $\pm$ 9,00 nach der Positivkontrolle mit TNF α die höchste Konzentration auf, während alle anderen Proben im Bereich zwischen 18,33 pg/ml $\pm$ 3,40 und 13,48 pg/ml $\pm$ 3,63 lagen.

Zwar zeigten die beprobten Substanzen leicht verminderte Konzentrationen von IL-6 im Zellüberstand, was grundsätzlich für eine verminderte Expression des Entzündungsmediators IL-6 der Zellen durch die Kunststoffe spricht, doch waren die Ergebnisse nicht signifikant unterschiedlich zueinander oder zur Negativkontrolle.

4.4 Annexin V Nachweis zur Untersuchung von Apoptose- und Nekroseverhalten

Aus den Rohdaten dieses Versuchs wurden zunächst die Mittelwerte der technischen Replikate gebildet und der ermittelte Blankwert subtrahiert. Die Messungen von Lumineszenz und Fluoreszenz wurden jeweils nach 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h und 24 h wiederholt. Zum Zwecke der Normalisierung und Vergleichbarkeit der Daten wurde für jedes biologische Replikat und zu jedem Zeitpunkt der Messung die Negativkontrolle als Referenzwert angenommen, und dieser mit 0% Apoptose beziehungsweise Nekrose gleichgesetzt. In Abhängigkeit davon errechneten sich die normalisierten Daten für jeden Versuchsdurchlauf und jedes Eluat. Diese normalisierten Messwerte der vier biologischen Replikate wiederum wurden zu einem arithmetischen Mittel

zusammengefasst und mit deren Standardabweichungen in den folgenden Graphen 22, 27 und 28 versehen.

Als Positivkontrolle diente das apoptoseinduzierende Staurosporin in einer Konzentration von 0,2 μM , 0,5 μM und 1 μM . Nach Auftragen der normalisierten Lumineszenz- und Fluoreszenzmessungen in Abhängigkeit von der Zeit in einem Graphen (Abbildung 22) zeigte sich für Staurosporin das typische Bild einer primären Apoptose mit sekundärer Nekrose: der Zeitabstand zwischen dem Beginn zunehmender Annexin V Lumineszenz und zunehmender Fluoreszenz deutet darauf hin, dass zunächst Zellen in den programmierten Zelltod eingetreten sind, woraufhin die sekundäre Nekrose als passiver Prozess ohne eigene Signalkaskade folgte [Green und Llambi, 2015].

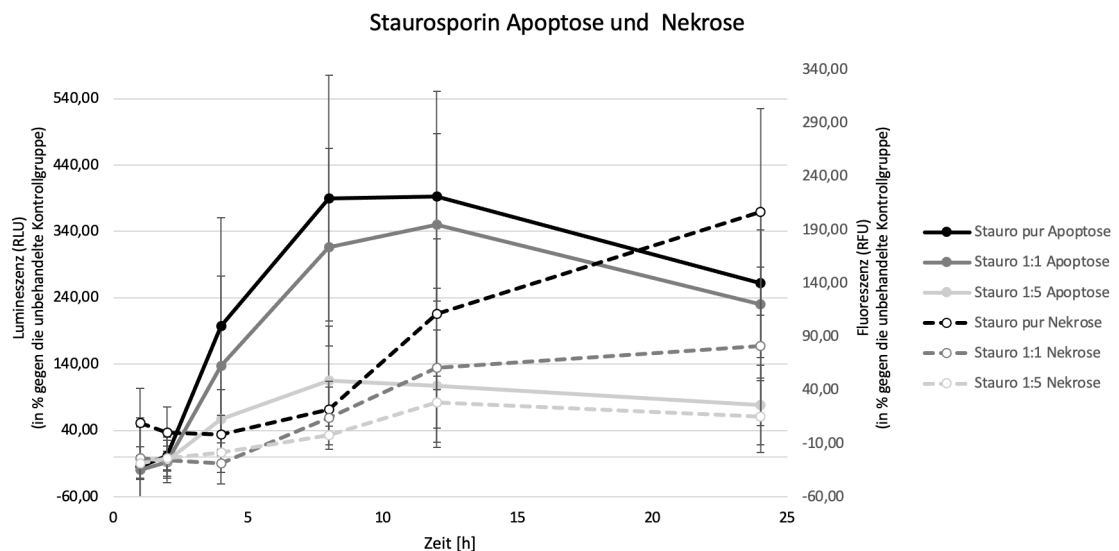


Abbildung 22: Ergebnisse des „Apoptose-/ Nekrose-Assays“ bei Verwendung von Staurosporin in verschiedenen Konzentrationen

In den nachfolgenden Balkendiagrammen von Abbildung 23 bis Abbildung 26 wurde die Negativkontrolle mit dem Wert 1 gleichgesetzt und in Abhängigkeit hiervon für jeden Versuchsdurchlauf die Werte aller Eluate normalisiert. Aus diesen Ergebnissen wurde wiederum der Mittelwert gebildet.

In Abbildung 23 ist die normalisierte Lumineszenz gegen die untersuchten Kunststoffeluat zum Zeitpunkt acht Stunden nach Versuchsbeginn aufgetragen und mit den jeweiligen Standardabweichungen versehen. Nur zwei Wertepaare zeigten einen signifikanten statistischen Unterschied zueinander. Dies sind die jeweils unverdünnten Proben von SPO und FLD, verglichen mit der

Negativkontrolle, was im nachfolgenden Diagramm durch Klammern und den entsprechenden p-Wert gekennzeichnet wurde. Erkennbar ist, dass innerhalb eines Eluats die unverdünnte Probe die geringsten Werte lieferte. Die höchsten Lumineszenzwerte ergaben sich für die Staurosporin Lösungen bei einer Konzentration von 1 μM .

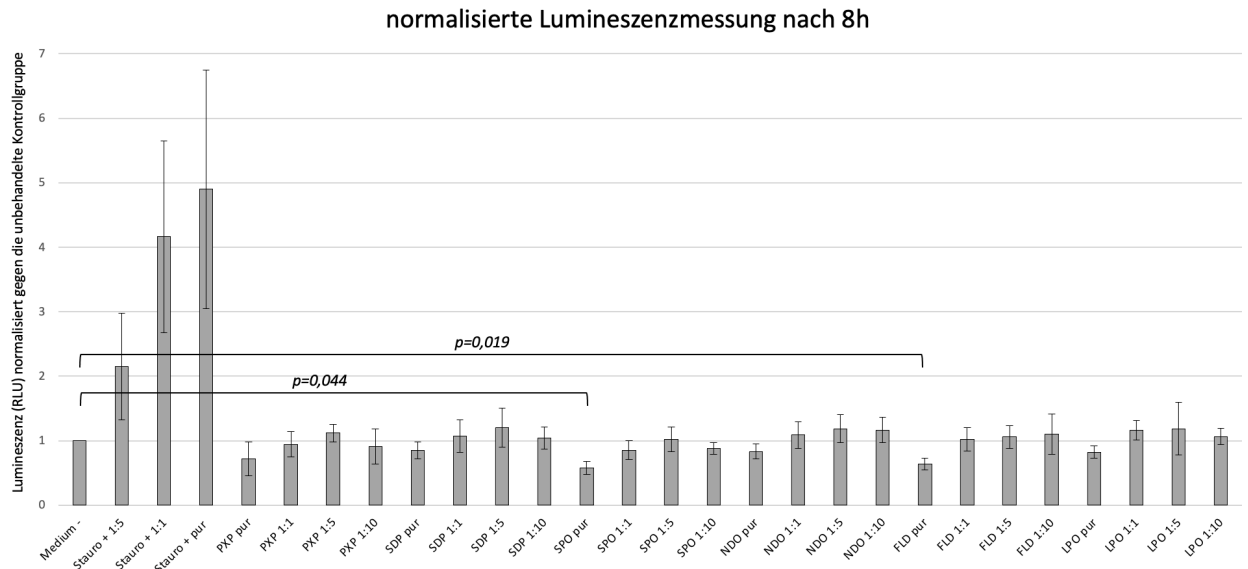


Abbildung 23: Ergebnisse der Lumineszenzmessung nach 8 h Inkubation

Ebenso wurde ein Balkendiagramm (Abbildung 24) für die Fluoreszenzmessungen nach 24 h erstellt. Es zeigten sich statistisch signifikante Mittelwertunterschiede zwischen der Positivkontrolle mit 1 μM Staurosporin und allen Kunststoffeluaten, mit einem errechneten p-Wert von 0,001. Diese wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht im nachfolgenden Diagramm gekennzeichnet. Darüber hinaus zeigten einige Eluate auch einen statistisch signifikanten Unterschied zu 0,5 μM Staurosporin. Dazu gehörten PXP pur, PXP 1:1, SDP pur, SPO pur, NDO pur sowie FLD pur. Wie schon bei der Lumineszenzmessung zeigten sich also vornehmlich für pur verwendete Proben die größten Unterschiede und eine Reduktion der Nekrosetendenz der Zellen. Diese Werte unterscheiden sich jedoch nicht signifikant voneinander. Ebenfalls analog zur Lumineszenzmessung wiesen auch hier die Staurosporinproben die höchsten Werte auf.

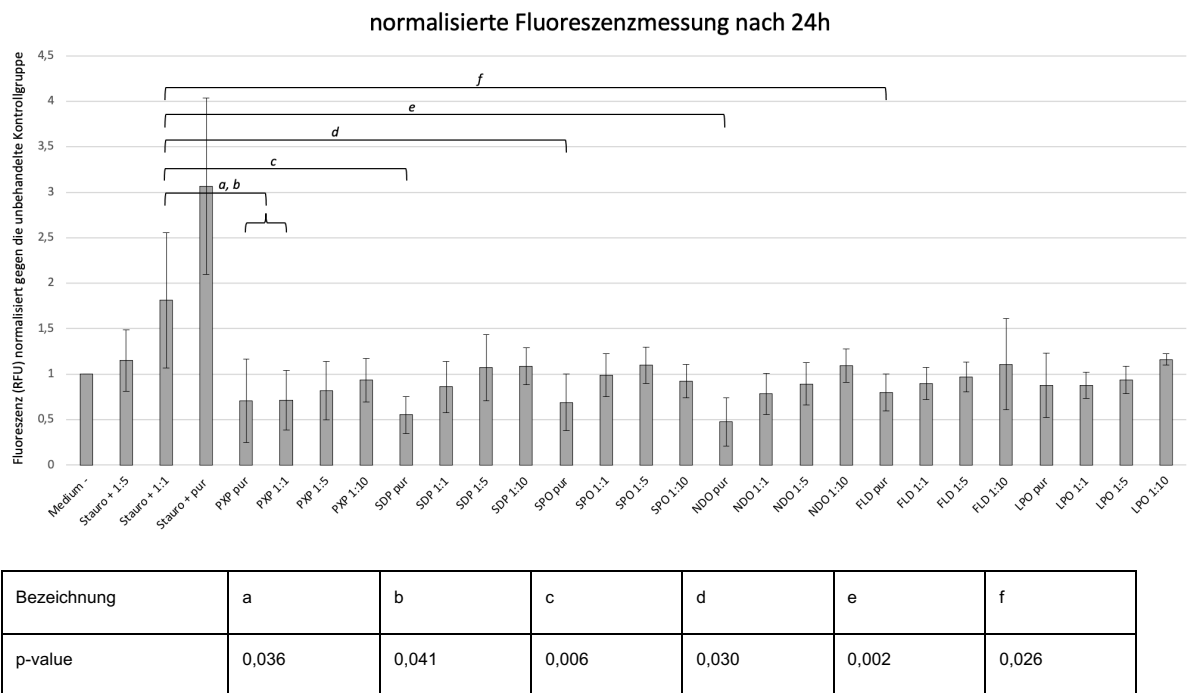


Abbildung 24: Ergebnisse der Fluoreszenzmessung nach 24 h Inkubation

Betrachtet man die Lumineszenzmessungen eines Eluats über die unterschiedlichen Messzeitpunkte hinweg (Abbildung 25), so ist erkennbar, dass im Falle von Staurosporin die Apoptose der Zellen um Stunde 8 bzw. 12 einen Höhepunkt erreicht, bevor sie anschließend wieder sinkt. Im Falle der Kunststoffeluats scheint die Apoptose verringernde Wirkung mit der Zeit nachzulassen. Statistisch signifikante Unterschiede in der multiplen Messung wurden wiederum im nachfolgenden Diagramm wie gehabt gekennzeichnet.

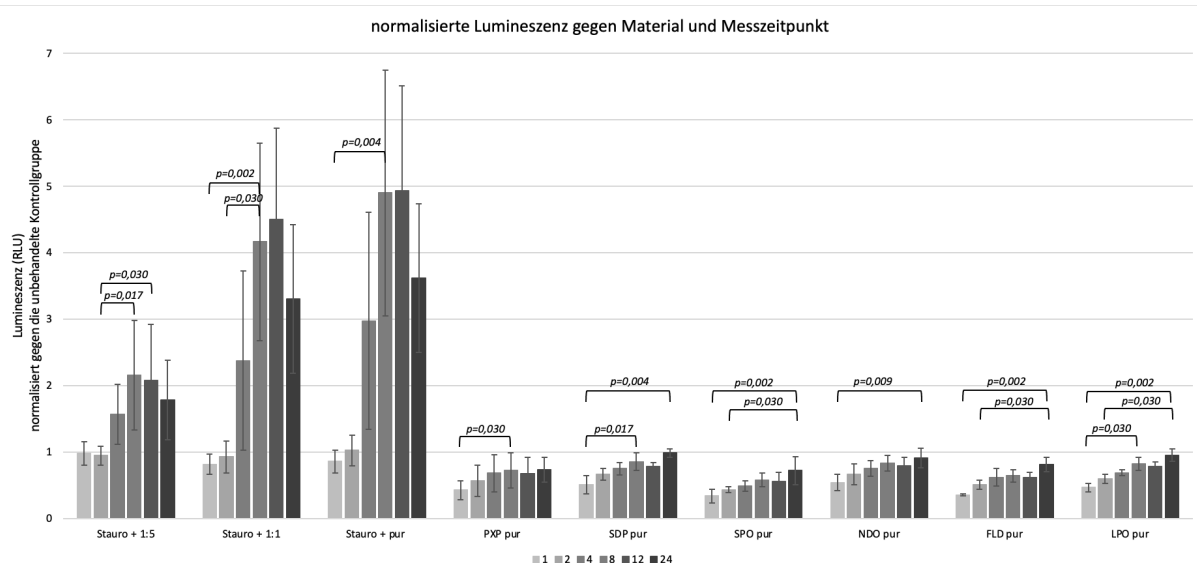


Abbildung 25: Ergebnisse der Lumineszenzmessung purer Kunststoffproben über den Zeitraum von 24 h

Auch das Nekroseverhalten der Zellen über die Zeit hinweg wurde beobachtet und untersucht (Abbildung 26). Beim Vergleich von Mittelwerten gleicher Eluate zu unterschiedlichen Messzeitpunkten zeigten sich nur im Falle von purem Staurosporin und NDO signifikante Unterschiede. Staurosporin zeigte zum spätesten Messzeitpunkt die höchsten Nekrosemessungen, während PXP, SDP, SPO und NDO über die gesamte Dauer der Messungen geringere Mittelwerte gegenüber der Negativkontrolle lieferten. FLD und LPO in purer Form ergaben auch Werte, die gegenüber der Negativkontrolle höher lagen.

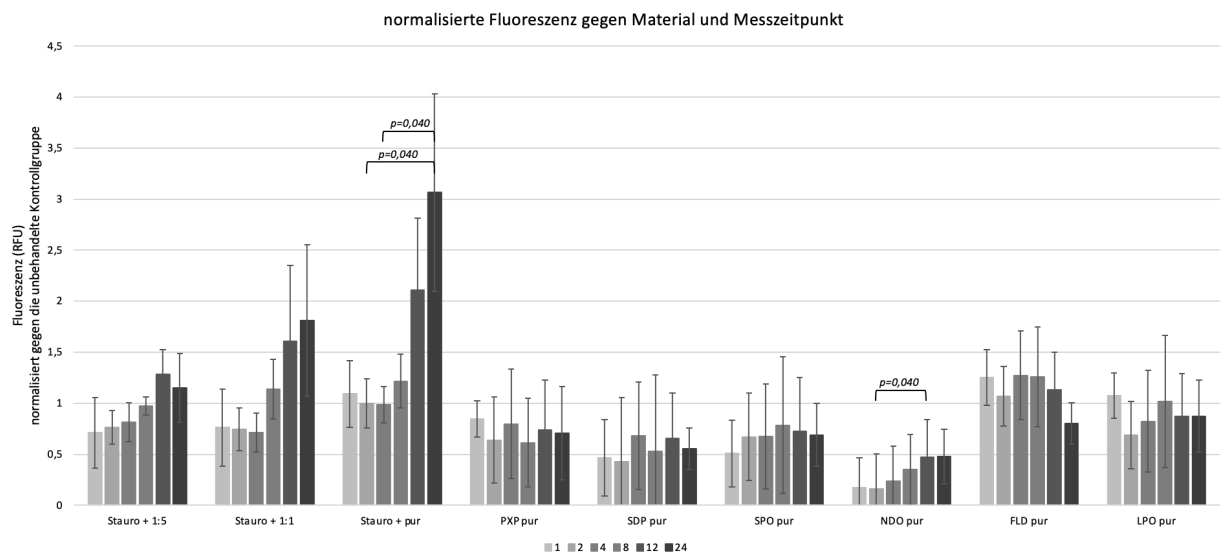


Abbildung 26: Ergebnisse der Fluoreszenzmessung purer Kunststoffproben über den Zeitraum von 24 h

Das nachfolgende Liniendiagramm (Abbildung 27) veranschaulicht noch einmal eindrücklich, welch starken primär apoptotischen Effekt das Staurosporin auf die Zellen hat. Dagegen haben alle pur verwendeten Eluate einen geringen antiapoptotischen Effekt, der sich über die 24h hinweg immer mehr der x-Achse und somit der Negativkontrolle annähert.

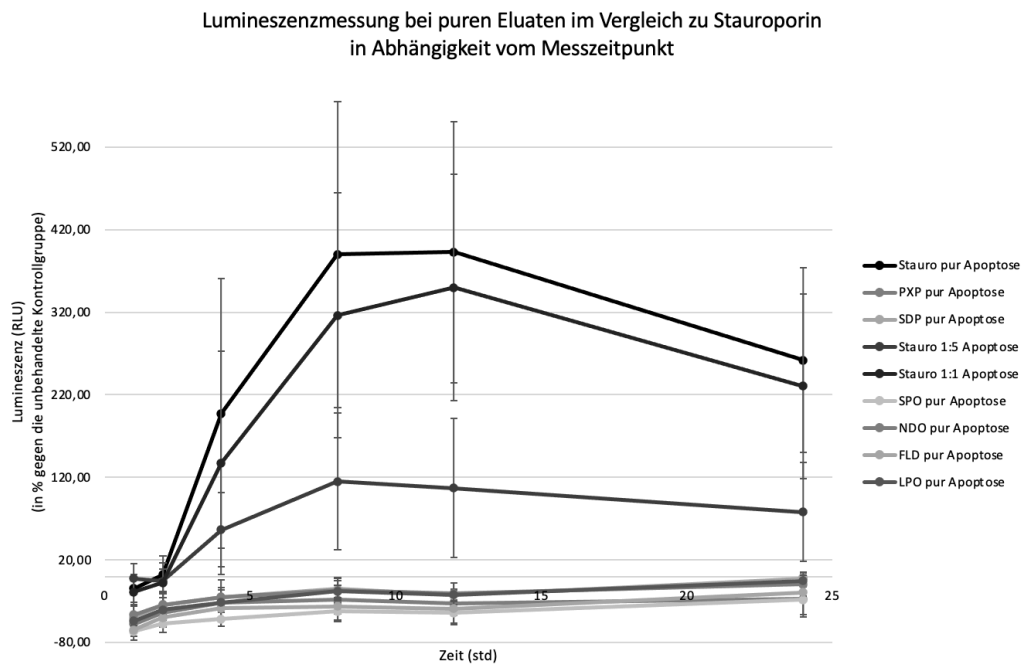


Abbildung 27: Ergebnisse der Lumineszenzmessung purer Kunststoffproben über den Zeitraum von 24 h im Vergleich zu Staurosporin

Aufschlussreich ist bei der Betrachtung der Liniendiagramme (Abbildung 28) im Falle der Fluoreszenz, dass die verwendeten Kunststoffeluatate auch nach 24 h keine steigende Nekrose der Zellen auslösen, wohingegen Staurosporin deutlich höhere Werte liefert. Auch hier näherten sich die Werte für die Probensubstanzen nach anfänglich starken Schwankungen immer weiter der Nulllinie an. Die signifikanten Mittelwertunterschiede hierzu wurden schon weiter oben angesprochen und markiert.

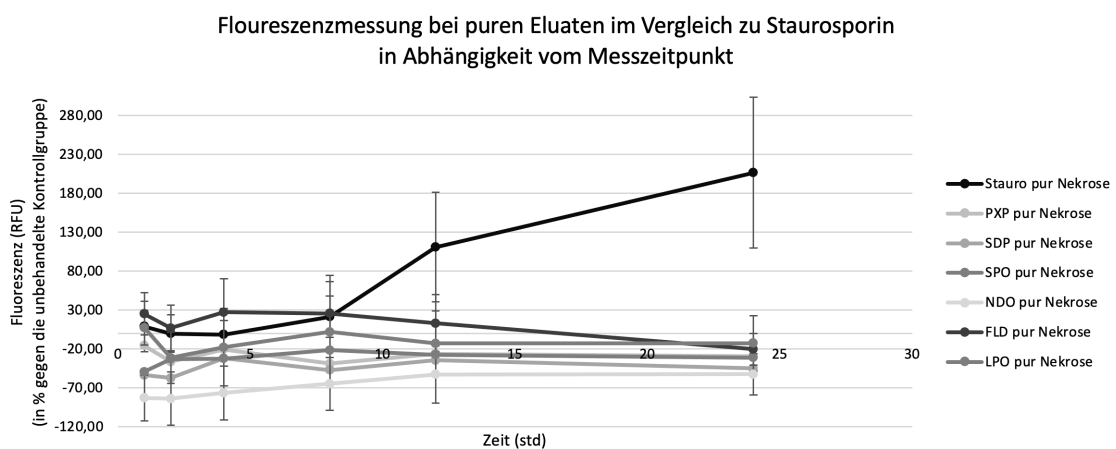


Abbildung 28: Ergebnisse der Fluoreszenzmessung purer Kunststoffproben über den Zeitraum von 24 h im Vergleich zu Staurosporin

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen verschiedener neuartiger Kunststoffe für den 3D Druck in der Zahnmedizin auf Zellen der Mundschleimhaut zu untersuchen. In vielen vorangegangenen Studien wurde die Biokompatibilität von Kunststoffen und deren Bestandteilen aus der Dentalbranche erforscht. Im Folgenden werden Zusammenhänge und Unterschiede herausgearbeitet, aufgezeigt und Erklärungsansätze vorgestellt.

Vorweg kann gesagt werden, dass die Ergebnisse in dieser Arbeit sich teilweise von den Beobachtungen und Schlussfolgerungen anderer Studien unterscheiden.

Durch die Auswahl der verwendeten Zelllinie sollte eine klinisch relevante Situation widerspiegelt werden, da Gingiva Fibroblasten in der Mundschleimhaut in großer Zahl vorkommen und in der praktischen Anwendung von okklusalen Aufbissbehelfen eine enge Lagebeziehung aufweisen. Außerdem reagieren sie gleichzeitig sensibel genug in Zytotoxizitätsversuchen und sind leicht kultivierbar in herkömmlichem Kulturmedium [Hensten-Pettersen und Helgeland, 1981]. HGFs, aber auch BHY-Zellen werden häufig für die biologische Bewertung von dentalen Materialien in der Zellbiologie verwendet, unter anderem auch in Untersuchungen von 3D gedruckten Schienen und Alignern [Francisco *et al.*, 2022].

In diesem Studiendesign wurden die Versuche so gewählt, dass viele Aspekte der Zellreaktion auf die Proben untersucht werden konnten: Durch die Wahl des WST-8 konnte zunächst die Intaktheit der Atmungskette analysiert werden, um dann zu untersuchen, ob mit einer eventuellen Schädigung auch ein erhöhtes oxidatives Stresslevel im Glutathion-Assay und schließlich sogar der Zelltod erfolgt. Durch die Wahl des real-time Annexin V Assays sollte es möglich sein, die Art des Zelltodes genauer zu bestimmen. Weiterhin ermöglicht die Messung der IL-6 Konzentration in Überständen einen Einblick in die Aktivierung oder Unterdrückung der Entzündungskaskade, da sich IL-6 als eines der wichtigsten Zytokine hierfür gut eignet und eine mögliche Verbindung zu klinischen Symptomen wie Entzündungen der Mundschleimhaut herstellt.

Chemisch gesehen gehören die neuartigen Kunststoffe zur additiven Fertigung, deren Untersuchung sich die vorliegende Arbeit zum Ziel gemacht hat, zu den Acrylharzen. Synthetisiert werden Acrylharze im Allgemeinen durch die Polymerisation von Methacrylaten (MMA) oder deren Derivaten zu Polymethacrylaten. Sicher und vorhersagbar gelang dies erstmalig Crawford in den frühen 30er Jahren [Brydson, 1999]. Neben den Monomeren und Polymeren sind oftmals folgende Zusätze in unterschiedlichen Konzentrationen und Zusammensetzungen enthalten: Dibenzoylperoxid, Ethylen Glycol Dimethacrylate und tertiäre Amine als Polymerisationskatalysatoren, Dimethacrylate zur Verringerung von Sorption und Löslichkeit sowie für eine verbesserte Härte, Polymerisationsinhibitoren wie Hydroquinone (Campherquinone) um eine spontane Polymerisation zu verhindern und freie Radikale einzufangen [Raszewski *et al.*, 2021]. Alle oben genannten Stoffe können sich potenziell in mehr oder weniger geringen Konzentrationen aus einem fertigen Werkstoff lösen.

Wie schon in vorangegangenen Kapiteln erwähnt, widmen sich im Bereich der dentalen Kunststoffe einige wissenschaftliche Publikationen der Frage nach der Konversionsrate, dem Restmonomergehalt und schließlich der sogenannten Leakage, dem Austreten von unpolymerisierten Monomeren und anderen löslichen Stoffen aus dentalen Materialien. Zahlreiche dieser Studien konnten nachweisen, dass die Konzentration von Monomeren im Speichel im Zusammenhang mit klinischen Folgen wie Allergien, Schleimhautirritationen und einer Sensibilisierung des Gewebes steht [Austin und Basker, 1980]. Auf zellbiologischer Ebene gelten die unpolymerisierten Monomere als einer der Hauptfaktoren für Zytotoxizität [Lefebvre *et al.*, 1996], Genotoxizität [Schweikl *et al.*, 2001], oxidativen Stress, Entzündungsreaktionen und Zelltod [Krifka *et al.*, 2013].

Nach ISO 20795-2 darf der Restmonomergehalt der Kunststoffe höchstens 5% (w/w) betragen. Von den Herstellern werden für PalaXpress unter 1% Restmonomergehalt nach etwa 12 Tagen, für SHERAdisc PM20 ebenfalls weniger als 1% und für NextDent Ortho Clear sogar unter 0,1% angegeben. Für SHERAprint-ortho plus, LuxaPrint Ortho Plus und Formlabs Dental LT Clear konnten keine Angaben der Hersteller gefunden werden.

Der EC50 Wert gibt an, wie stark zytotoxisch die freigesetzten (Co-)Monomere oder andere lösliche Bestandteile der Kunststoffe auf die Zellen wirken. Er entspricht der Konzentration, bei der die Viabilität der Zellen 50% erreicht und kann durch unterschiedliche Versuche bestimmt werden. Je nach verwendetem Zellviabilitäts-Assay (beispielsweise WST-1, WST-8, MTT, XTT und LDH) kann der Wert einer gewissen Schwankung unterliegen. Der EC50 Wert für einige der gängigsten Methacrylate in der Dentalbranche liegt zwischen 0,32 mM für Bis-GMA und 5,8 mM im Falle von HEMA [Issa *et al.*, 2004].

Neben Monomeren sind vor allem Polymerisationsinitiatoren wichtige Einflussfaktoren der Biokompatibilität. Das Kaltpolymerisat PalaXpress enthält als Polymerisationsinitiatoren organisches Peroxid (Dibenzoylperoxid) und tertiäres aromatisches Amin (Trioctylmethyllammoniumchlorid), sowie Trimethylbarbitursäure (1-Benzyl-5-phenylbarbitursäure), Sauerstoff und Kupferionen (Kupfer-II-Chlorid-2-hydrat). Über den Polymerisationsinitiator in SHERAdisc PM20 macht der Hersteller keine Angaben. Der Photoinitiator aller 3D gedruckter Materialien ist ein Bisacrylphosphin Oxid (Diphenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl) phosphinoxide). Die chemischen Strukturformeln von Dibenzoylperoxid und Bisphenylphosphin Oxid und ihr Zerfall in reaktionsfreudige Radikale sind in den nachfolgenden Abbildungen 29 und 30 dargestellt.

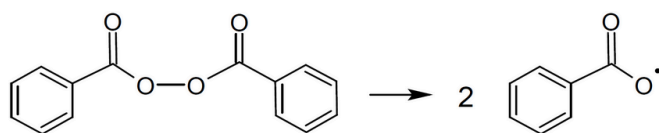


Abbildung 29: Zerfall von Dibenzoylperoxid in zwei Radikale [Ravve, 2013]

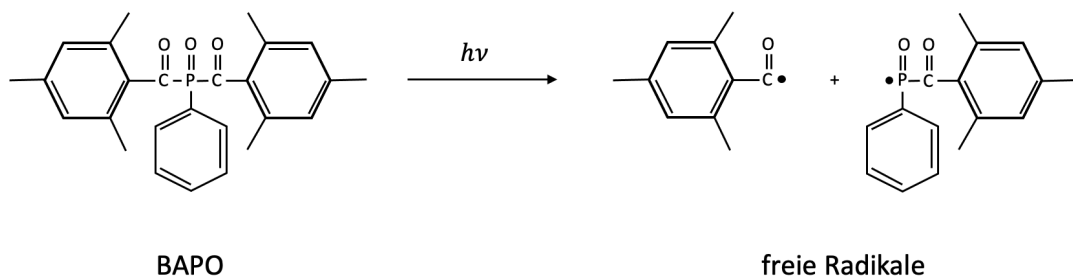


Abbildung 30: Mechanismus der Spaltung von Bisacrylphosphineoxiden (BAPO) durch Photoinitiation ($h\nu$: Photonenenergie) [Ikemura *et al.*, 2017]

Die Ergebnisse des in dieser Arbeit durchgeführten WST-8 Versuchs sind grundsätzlich vereinbar mit dem aus zahlreichen vorangegangenen Untersuchungen bekannten Einfluss von Methacrylaten auf Zellen. Sie lassen durch die signifikant verminderten Viabilitätswerte auf eine Schädigung der Atmungskette von Fibroblasten und in noch höherem Maße auf Plattenepithelkarzinomzellen durch alle unverdünnten Kunststoffeluate schließen.

In den Regelungen nach ISO-Standard 10993-5 werden alle Materialien als nichttoxisch eingestuft, bei denen die relative Viabilität nach MTT Assay über 70% der Negativkontrolle liegen. Die mittelwertige Viabilität aller unverdünnt verwendeten Eluate befindet sich in dieser Ausarbeitung unterhalb dieser Grenze. Somit kann aufgrund dieser Ergebnisse die Wirkung der verwendeten Proben als zytotoxisch bezeichnet werden, was beispielsweise auch bei Zellen der menschlichen Pulpa für einige vergleichbare Kunststoffextrakte festgestellt werden konnte [Lee *et al.*, 2017].

Auch Lai *et al.*, 2004, konnten nachweisen, dass verschiedene Methacrylate konzentrationsabhängig und abhängig von ihrer Art eine Verringerung der Viabilität und Zelltod vorwiegend durch Nekrose bei Gingivafibroblasten verursachten. Die zytotoxische Wirkung von Bestandteilen dentaler Kunststoffe konnte aber auch in vielen weiteren Studien festgestellt werden. Bei einem direkten Vergleich der Ergebnisse muss jedoch bedacht werden, dass nicht nur verschiedene Zellarten, sondern auch unterschiedliche Kulturen derselben Zellart unterschiedlich sensibel auf die Kunststoffe reagieren, weshalb eine Rangfolge der relativen Zytotoxizitätsergebnisse aussagekräftiger ist als der Vergleich absoluter Werte aus unterschiedlichen Studien [Moharamzadeh *et al.*, 2007].

Die Zytotoxizität war im Falle von SHERAdisc PM20 und SHERAprint-ortho plus gegenüber Plattenepithelkarzinomzellen am höchsten. Dies entspricht dem Vergleichsmaterial aus der Gruppe der gefrästen Schienenkunststoffe und einem 3D Druckmaterial vom gleichen Hersteller. Die Fibroblasten reagierten am empfindlichsten auf die unverdünnten Proben von SHERAprint-ortho plus und NextDent Ortho Clear und somit auf Vertreter der 3D-Druck-Klasse. Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, als von Rohlingen zur subtraktiven Fertigung

als Hochleistungspolymere herausragende Eigenschaften erwartet werden [Kraemer Fernandez *et al.*, 2020 ,Engler *et al.*, 2020] und der Hersteller NextDent für seinen Kunststoff einen besonders geringen Restmonomergehalt propagiert. Begründet werden könnten diese auf den ersten Blick widersprüchlichen Ergebnisse damit, dass diese Materialien möglicherweise einen Inhaltsstoff enthalten, der besonders stark zytotoxisch wirkt.

Die geringste Zytotoxizität (jedoch in der puren Darreichungsform signifikant höher als im Falle des Wachstumsmediums) wiesen Formlabs Dental LT Clear und der konventionell gegossene Schienenkunststoff PalaXpress auf. Auf Grundlage dieser Ergebnisse lassen sich keine Aussagen darüber treffen, ob ein bestimmtes Material oder eine Materialgruppe einer anderen im Hinblick auf ihre Zytotoxizität unterlegen ist, da zwischen ihnen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten.

Im Gegensatz dazu untersuchte eine ähnliche Studie sowohl die Konzentration von unpolymerisierten (Co-) Monomeren in Lösung als auch deren Zytotoxizitätswirkung auf Gingivafibroblasten. Im Falle von gefrästen und konventionell hergestellten Schienenmaterialien wurden keine gelösten Stoffe gefunden, wohingegen Tetrahydrofurfuryl Methacrylat aus dem gedruckten Material (SHERAprint-ortho plus) in Lösung nachgewiesen werden konnte. Die Konzentration in Wasser war unterhalb der Zytotoxizitätsgrenze dieses Stoffes [Wedekind *et al.*, 2021].

Eine Übereinstimmung der Ergebnisse findet sich also in der Monomerfreisetzung im Falle des additiven Werkstoffes und somit dessen Wirkung auf die Zellen. Die festgestellten Zytotoxizitätsunterschiede können so erklärt werden, dass in der oben erwähnten Studie nur ganz bestimmte Monomere untersucht und ein XTT basiertes Zell-Viabilitäts-Assay durchgeführt wurde. Es ist also möglich, dass andere Leakables aus den hergestellten Probenkörpern ausgetreten sind, die nicht gemessen und somit auch nicht gefunden werden konnten. Außerdem wurden die Eluate nicht im selben Verhältnis von Kunststoff und Lösungsmittel zueinander hergestellt, so dass zwangsläufig eine andere Konzentration gelöster Bestandteile resultieren muss.

Borelli *et al.*, 2017, beschreiben den Zusammenhang, dass bei einer Konzentration von Monomeren von 0,01 mM oder weniger eine Viabilität von

hGFs von über 80% resultiert, was der Autor als realistische Größenordnung in der zahnmedizinischen Praxis ansieht.

Wie schon erwähnt ist es auch denkbar, dass andere Bestandteile als unpolymerisierte Monomere aus den Kunststoffen in Lösung gehen und die Biokompatibilität eines Materials beeinflussen. Hierzu gehören unter anderem die Polymerisationsinitiatoren oder auch Radikalstarter: Beispielsweise konnte in der Studie von Manojlovic *et al.*, 2017, eine hohe Zytotoxizität für Photoinitiatoren aus der Gruppe der Bisacrylphosphine Oxide, die in allen hier untersuchten, gedruckten Schienenkunststoffen enthaltenen sind, festgestellt werden. Auch Dibenzoyl Peroxide weisen eine hohe Zytotoxizität auf, während Campherquinon als einer der weniger zytotoxischen Polymerisationsinitiatoren gilt [Gautam *et al.*, 2012].

Auch der Einsatz von Kunststoffen gleicher Gruppenzugehörigkeit, jedoch anderer Hersteller beeinflusst das Ergebnis [Engler *et al.*, 2020]. So konnte für Kaltpolymerisate beispielsweise eine Zellviabilität bei Maus-Fibroblasten von 87% festgestellt werden [Ata und Yavuzylmaz, 2009], während eine andere Studie eine Viabilität von Fibroblasten nach MTT Assay von min. 87% und max. 119% bei gedruckten Kunststoffen ergab, wobei TEGDMA ein wesentlicher Faktor für niedrigere Viabilität von Zellen zu sein schien [Lin *et al.*, 2020]. Dieselbe Studie zeigte auch, dass verschiedene Zusammensetzungen 3D gedruckter Probekörper die gemessene Konversionsrate mit höchstens 49% (vor Nachhärtung und Waschung) nicht signifikant verändern konnten [Lin *et al.*, 2020].

Ebenfalls untersucht wurde die Konversionsrate, unter anderem von Formlabs Dental LT Clear und NextDent Ortho Clear, und es konnte für diese Kunststoffe eine zeit- und temperaturabhängige Änderung im Post-Curing Prozess festgestellt werden (nach 60 min bei 60°C 82% bzw. 75%). Die Studie kam zu dem Schluss, dass für Acrylharze im 3D Druck die Mindestanforderungen für die Nachhärtung 60 min bei 60 °C sein sollten [Dantagnan *et al.*, 2022]. In einer anderen Untersuchung bewegte sich die Konversionsrate von 3D gedruckten Polymeren je nach verwendetem Gerät für die Nachpolymerisation zwischen 58% und 95% [Reymus *et al.*, 2019]. Doch die Menge freigesetzten Monomers, und somit indirekt auch die Konversionsrate, ist nicht der einzige Faktor, der die

Biokompatibilität bestimmt, sondern vor allem die chemische Zusammensetzung. So ist es zu erklären, dass unter Umständen Materialien mit hoher Konversionsrate und geringerer Monomerfreisetzung durch stärker toxische Bestandteile wie z. B. Bisphenol A auch niedrigere Viabilitätsdaten liefern können.

Es gibt jedoch auch Studien, die in Bezug auf 3D gedruckte Kunststoffe im Widerspruch dazu stehen und teilweise überlegene Zytokompatibilität bei Fibroblasten gefunden haben. Verglichen wurde dies mit einer Kontrollgruppe aus herkömmlichen Kunststoffen, hergestellt durch Vermischen von Pulver und Flüssigkeit [Park *et al.*, 2020].

Eine weitere Studie kam zu folgendem Schluss: Neben zufriedenstellenden mechanischen Eigenschaften besteht auch eine ausreichende Biokompatibilität, um die Anforderungen einer klinischen Anwendung zu erfüllen [Lin *et al.*, 2019].

Insgesamt führen die Erkenntnisse aus oben genannten Untersuchungen zusammen mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit zu dem Ergebnis, dass zwar hohe Konzentrationen von Eluaten sehr wohl einen zytotoxischen Effekt auf Zellen der Mundschleimhaut haben und somit lokale Veränderungen und Reaktionen auf die Schienenmaterialien in Einzelfällen auftreten können. Jedoch kann die klinische Relevanz und Häufigkeit von Nebenwirkungen beispielsweise durch höhere Verdünnung und das ständige Schlucken des Speichels nicht endgültig vorhergesagt oder abgeschätzt werden.

Verbesserungen im Versuchsdesign lehnen sich an ähnlichen Experimenten an: Der Untersuchung der Biokompatibilität mittels Bild-basierter Lebendzell-Analyse wird eine Überlegenheit im Outcome zugesprochen [Siller *et al.*, 2019]. Darüber hinaus werden in vergleichbaren Studien die Probenstoffe vielfach in DMSO eingelegt, um die Eluate herzustellen. Des Weiteren lösen sich freie Monomere besser in Methanol als in Wasser und überschritten dadurch die Grenze der zytotoxisch wirkenden Konzentration auf HGFs in Versuchsdurchführungen und Auswertungen von Wedekind *et al.*, 2021. Somit ist vorstellbar, dass eine Inkubation der Probenkunststoffe in unterschiedlichen Lösungsmitteln wie Methanol oder Speichel andere Ergebnisse liefert als bei einer Verwendung von Zellmedium.

Im Hinblick auf eine Entzündungsreaktion der Gingiva durch dentale Werkstoffe ist es von großem Interesse, das Zytokin Interleukin-6 und seine Expression zu untersuchen, da es der wichtigste Regulator in der Akute Phase Reaktion durch direkten Einfluss auf die Synthese von C reaktivem Protein und Serum Amyloid ist [Thorn *et al.*, 2004]. Die Genexpression von IL-6 wird von Substanzen reguliert, die eine Entzündungsreaktion hervorrufen können [Sehgal *et al.*, 1988]. Zu ihnen gehören auch inflammatorische Zytokine wie der Tumor-Nekrose-Faktor- α [Zhang *et al.*, 1988, Akira *et al.*, 1992], der wiederum über die Aktivierung der NF- κ B Signalkaskade zu einer Expression des IL-6 codierenden DNA-Fragments im Zellkern führt [Libermann und Baltimore, 1990]. IL-6 selbst wird von einer Vielzahl von Zellarten in unterschiedlichem Maße sezerniert und spielt eine wichtige Rolle in einer Reihe von – teilweise gegensätzlichen – Zellreaktionen. Allen voran lenkt es, wie oben schon beschrieben, die akute inflammatorische Reaktion, Fieber und die unspezifische Immunantwort in der Leber, hat aber auch Einfluss auf Hämatopoese, Knochenmetabolismus und auf die Tumorentstehung [Kishimoto, 2010].

Auf Grundlage der Ergebnisse des hier durchgeführten ELISA auf IL-6 kann angenommen werden, dass die betreffenden Kunststoffeluate keinen oder einen sehr geringen antiinflammatorischen Effekt auf die verwendeten Gingivafibroblasten haben, da die Konzentrationen (13 pg/ml bis 18 pg/ml) sich im Bereich der Negativkontrolle (22 pg/ml) bewegten und keine signifikanten Unterschiede gefunden werden konnten. Eine ähnliche Studie, bei der Zellen der menschlichen Pulpa nach Beprobung mit Kunststoffeluat untersucht wurden, konnte ebenfalls keine erhöhte IL-6 Produktion aufzeigen [Lee *et al.*, 2017].

Jedoch gibt es auch widersprüchliche Ergebnisse in der Literatur, die eine Sekretion von Entzündungsmediatoren bei unterschiedlichen Zellarten feststellen konnten. Beispielsweise entdeckten Campaner *et al.*, 2020, dass bestimmte Acrylharze die Freisetzung von IL-6 bei Gingivafibroblasten von Mäusen erhöhen können. Hierbei handelte es sich um Auto-Polymerisate und Bisacryl-Harze, während beispielsweise vorgefertigte Polymerblöcke zur subtraktiven Verarbeitung keine signifikant erhöhten IL-6 Konzentrationen ergaben. Nichttoxische Konzentrationen von TEGDMA induzierten die Hochregulation von IL-6 bei TR146 Zellen (humane Plattenepithelkarzinom Zellen) in Suspensionskultur um das 5-Fache [Schmalz *et al.*, 2000].

Auch eine Hochregulation der Genexpression von IL-6 in hGFs durch MMA, PMMA und Bis-Acryl-Composite unterstreicht die zuletzt aufgeführten Ergebnisse [Borelli *et al.*, 2017].

Die in dieser Arbeit verwendeten Probenkörper wurden entsprechend der Nachbearbeitung einer Schiene in der Zahnmedizin nur von einer Seite poliert. Eine weitere Abhandlung zeigt auf, dass polierte Kunststoffe eine geringere Interleukin Produktion induzieren als unpolierte. Die IL-6 Expression lag hier in etwa zwischen 2 pg/ml und 7 pg/ml [Trubiani *et al.*, 2012].

Bisher gibt es keine vergleichbaren Nachforschungen bezüglich der Auswirkung speziell von Polymeren aus der additiven Fertigung, jedoch können zur Interpretation der hier beschriebenen Ergebnisse zwei Ansätze verfolgt werden: Zum einen ist seitens der Zellen eine geringe Reaktion bestimmter Zellarten bei einer Stimulation mit den Eluaten und Freisetzung von Interleukinen in höheren Konzentrationen denkbar, wobei dies unter anderem auch mit der Passage, in der sich die Zellen befinden, zu tun haben könnte. Zum anderen wäre es möglich, dass in den Eluaten zu geringe Mengen der Bestandteile enthalten waren, die eine Entzündungsreaktion verursachen könnten. Auch die Verarbeitungsmethode und Art der Nachbehandlung, die Art und Komposition der Inhaltsstoffe, speziell bei additiv gefertigten Probenkörpern, und die Lösungsherstellung und Lagerung müssen als Faktoren mit Einfluss auf das Versuchsergebnis bedacht werden.

Um herauszufinden, was der wirkliche Grund für sich unterscheidende Ergebnisse sein könnte, ist eine weitere Erforschung der Einflussfaktoren auf die Zytokinfreisetzung durch unterschiedliche Zellarten und mit unterschiedlichen Substanzen notwendig.

Der Glutathion Versuch konnte zeigen, dass das Verhältnis von GSH zu GSSG im Falle der Positivkontrolle mit 40 μ M Menadione mit $9,17 \pm 6,91$ unter der Marke von 10 liegt und somit von oxidativem Stress für die untersuchten Zellen ausgegangen werden kann. Eine Abnahme oder Störung des Verhältnisses resultiert in einer erhöhten Anfälligkeit der Zellen gegenüber schädlichen Entwicklungen. Erkrankungen wie Krebs, Parkinson und Alzheimer können häufiger vorkommen, aber auch die Alterung von Zellen und eine verminderte Funktion des Immunsystems können die Folge sein [Rebrin und Sohal, 2008].

Mit $28,89 \pm 8,10$ im Normbereich befand sich das Ergebnis für das GSH/GSSG Verhältnis im Falle der Negativkontrolle. Die Probensubstanzen PXP und SDP wiesen einen etwas größeren Wert auf, weshalb darauf geschlossen werden kann, dass der oxidative Stress der Zellen möglicherweise sogar etwas reduziert wurde. Hier bestand jedoch keine statistische Signifikanz. Die errechneten Mittelwerte der Eluate der 3D gedruckten Materialien befanden sich im Bereich zwischen der Positiv- und der Negativkontrolle, hatten also einen geringeren oxidativen Stress zur Folge als Menadione und einen höheren als das Zellkulturmedium. LPO als ein Vertreter aus der 3D-Druck-Gruppe verursachte verglichen mit dem herkömmlichen Material PXP und dem vorgefertigten Polymer SDP ein signifikant höheres Stresslevel.

Mehrere zellbiologische Mechanismen sind Grundlage für die Stressreaktion der Zellen auf die Kunststoffeluate, jedoch waren keine vergleichbaren Versuche in Bezug auf die neuartigen Materialien verfügbar, sodass sicherlich noch einige wichtige Erkenntnisse durch weiterführende Forschung gesammelt werden müssen.

Es konnten allerdings Studien gefunden werden, die untermauern, dass Restmonomere, insbesondere TEGDMA, verschiedene Gene aktivieren, die verantwortlich sind für eine oxidative Stressantwort und eine Reduktion des intrazellulären GSH [Schweikl *et al.*, 2008, Engelmann *et al.*, 2005]. Dies geschieht auf der Stufe der Transkription durch die Ansammlung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die im Übrigen auch eine Entzündungsreaktion verursachen [Chang *et al.*, 2005]. Es ist also auch vorstellbar, dass neben diesem speziellen Monomer auch andere eine solche Reaktion auslösen können. Dies konnte eine andere Untersuchung zeigen, die herausfand, dass konzentrations- und stoffabhängig eine Reduktion von zellulärem GSH in hGFs erfolgt [Volk *et al.*, 2006]. Beobachtbar wurden Anzeichen für erhöhten oxidativen Stress schon bei geringen Konzentrationen innerhalb einer kurzen Zeitspanne.

Zum anderen kann GSH Methacrylate auch direkt durch Konjugation und Michael-Addition entgiften, wobei die Thiol-Gruppe mit deren ungesättigten Kohlenstoff-Kohlenstoff Verbindungen reagiert. So werden die intrazellulären Reserven von reduziertem Glutathion erschöpft, was schließlich zur Apoptose der Zelle führt [Gallorini *et al.*, 2014]. Die monomerinduzierte Apoptose wird von

der Zelle aktiv eingeleitet, sobald die Menge von ROS die Fähigkeit der Zelle, die Redox-Homöostase aufrecht zu erhalten, überschreitet [Krifka *et al.*, 2013].

Ein weiterer Aspekt der Erschöpfung von reduziertem Glutathion ist, dass TEGDMA als kompetitiver Antagonist die Glutathion Transferase P1 inhibiert, wodurch diese die Bindung von Glutathion an toxische Metabolite bzw. Xenobiotika nicht mehr katalysieren kann [Lefevre *et al.*, 2004].

Auf Grundlage der Untersuchung von Lee *et al.*, 2006, bei der der zytotoxische Effekt von Monomeren durch das Antioxidans N-Acetylcystein erfolgreich antagonisiert werden konnte, lässt sich auch der direkte Zusammenhang zwischen Zytotoxizität und oxidativem Stress im Falle der 3D-Druck-Materialien in den beiden entsprechenden Versuchen dieser Arbeit erkennen. Weshalb allerdings die Zytotoxizität auch im Falle der herkömmlichen Schienenmaterialien nachgewiesen werden konnte, diese jedoch kein reduziertes Verhältnis von GSH zu GSSG ergab, ist nicht abschließend erklärbar und sollte in weiteren Versuchen erforscht werden.

Die untersuchten Sachverhalte der vorangegangenen Versuche gehen der letztendlichen Konsequenz, einem möglichen Zelltod, voraus. Im Hinblick auf die Biokompatibilität kann es von Bedeutung sein, welche Art von Zelltod induziert wird, da hiervon die Schwere der Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe abhängt. Deshalb wurde ein neuartiges Assay gewählt, in dem eine simultane Messung von Apoptose und Nekrose über eine Zeitspanne von 24h vorgenommen werden konnte.

Das Assay zur Untersuchung von Apoptose- und Nekroserverhalten der Zellen in Echtzeit zeigte für Staurosporin, die Positivkontrolle, den typischen Verlauf eines Graphen, der eine programmierte Apoptose mit anschließender sekundärer Nekrose durch das Fehlen von Phagozytose widerspiegelt. Die pur verwendeten Lösungen der Probenkunststoffe dagegen zeigten keine Apoptose, die Werte waren geringer als diejenigen, die die Negativkontrolle ergab. Alle reinen Kunststoffeluate verringerten die Apoptose der Zellen etwas, im Falle von SPO und FLD sogar signifikant gegenüber der Negativkontrolle. Tendenziell kann eine Erhöhung der Werte mit geringer werdender Konzentration und fortschreitender Zeit erkannt werden. Die Apoptose reduzierende Wirkung verschiebt sich also

mit geringer werdender Konzentration und mit fortschreitender Zeit eher in Richtung einer Apoptose induzierenden Wirkung.

Die Fluoreszenzmessungen bewegten sich ebenfalls im Bereich der Negativkontrolle und zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Negativkontrolle und einem der Kunststoffeluate oder den Kunststoffeluat untereinander. PXP, SDP, SPO und NDO lieferten über die gesamte Dauer der Messungen Mittelwerte unterhalb der Negativkontrolle, sodass darauf geschlossen werden kann, dass durchschnittlich weniger Zellen nekrotisch wurden als im Falle des reinen supplementierten Mediums. Wie schon bei der Apoptose lässt sich auch hier der Zusammenhang vermuten, dass mit geringer werdender Konzentration die Nekrose reduzierende Wirkung sich in Richtung einer Nekrose induzierenden Wirkung verschiebt. Ein zeitlicher Zusammenhang konnte in diesem Fall nicht erkannt werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Eluate in höheren Konzentrationen einen leichten antiapoptotischen und - die meisten auch einen - antinekrotischen Effekt hervorriefen, der im Falle der Apoptose mit der Zeit geringer wurde.

Diese hier gefundenen Ergebnisse stehen entgegen der bekannten und vielfach untersuchten Wirkung von Monomeren, konzentrationsabhängig und abhängig von ihrer Art Apoptose und Nekrose zu induzieren [Cimpan *et al.*, 2000, Batarseh *et al.*, 2014]. Jedoch wird etwa bei Reichl *et al.*, 2006, relativierend eingewendet, dass es sehr unwahrscheinlich ist, dass freigesetzte Substanzen aus dentalen Arbeiten allein Konzentrationen erreichen, die in physiologischen Situationen beim Patienten eine Nekrose verursachen.

Eine Studie mit HEMA und TEGDMA zeigt, dass die Anzahl apoptotischer Zellen bei hohen Monomerkonzentration schon ein Maximum erreicht, während die Anzahl nekrotischer Zellen weiter deutlich in die Höhe schießt. Es gibt allerdings viele Substanzen, die die Apoptose-Antwort von Zellen modifizieren und verringern können. Hierzu gehört beispielsweise das Vitamin C, ein Antioxidans, das die Bildung von ROS inhibiert, sowie auch das N-acetylcystein (NAC) [Samuelsen *et al.*, 2007, Gallorini *et al.*, 2014].

Eine interessante Erkenntnis zeigte sich auch in der Studie von Becher *et al.*, 2006, die hier postulieren, dass ein umgekehrter Zusammenhang zwischen der

Zytotoxizität vieler untersuchter Konzentrationen von Monomeren und dem Ausmaß der Apoptose besteht.

Als Resümee kann gesagt werden: Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse des Apoptose- und Nekrose-Assays sind möglicherweise zu erklären durch für das Assay zu geringe Konzentrationen Zelltod induzierender Substanzen oder eine zu geringe Laufzeit. Dafür sprechen würde eine Untersuchung von Janke *et al.*, 2003, bei der Apoptose nach Zugabe von TEGDMA erst ab einer Konzentration von 5 mM nach 24h nachgewiesen werden konnte. Auch möglicherweise enthaltene antiapoptotisch oder antinekrotisch wirkende Inhaltsstoffe oder eine inverse Auswirkung höherer Konzentrationen von Monomeren können eine Rolle spielen. Mögliche antiapoptotische Substanzen aus den Schienenkunststoffen müssen noch identifiziert werden.

In der Literatur findet sich ein mehrheitlicher Konsens zu den herausragenden chemisch-mechanischen Eigenschaften CAD/CAM gefertigter Polymere gegenüber solchen, die manuell gefertigt wurden [Alt *et al.*, 2011, Göncü Başaran *et al.*, 2011, Stawarczyk *et al.*, 2012]. Begründung ist hier, dass diese unter kontrollierten und standardisierten industriellen Bedingungen, unter optimaler Einstellung der Temperatur und des Drucks hergestellt werden [Güth *et al.*, 2013].

In der vorliegenden experimentellen Studie konnten keine Hinweise auf die Überlegenheit eines Materials oder einer Materialgruppe gefunden werden. Ausgehend von diesen Ergebnissen kann auch keine abschließende Empfehlung für die Anwendung aller hier untersuchter Materialien aus Gesichtspunkten der Biokompatibilität ausgesprochen werden.

Selten auftretende klinische Nebenwirkungen von Kunststoffen aus der Zahnmedizin auf sind hauptsächlich allergischer Natur. Auch wenn diese und andere Nebenwirkungen selten vorkommen, muss eine Risikoanalyse erfolgen, besonders da additiv gefertigte Therapiemittel immer weiter verbreitet eingesetzt werden. Bekannte Sensitivitäten der Patienten auf das verwendete Material sollten erfragt und ggf. ausgeschlossen werden.

Demzufolge müssen Kunststoffe in der Dentalbranche stetig weiterentwickelt werden, mit dem Ziel, von einer akzeptablen Biokompatibilität zu einer Inertheit

oder sogar zu einer Bioaktivität zu gelangen. In der Literatur lassen sich bereits einige Lösungsansätze finden:

Beispielsweise fanden Kreß *et al.*, 2020, dass Parylene als biokompatibles, inertes, chemisch resistentes und hydrophobisches Material Zellen in Kulturschalen vor zytotoxischen Leakables (ausgetretene unpolymersierte Monomere oder andere Stoffe) aus gedruckten Laborutensilien schützt, wenn es hier als Coating verwendet wird. Eine ähnliche Anwendung bei dentalen Polymerwerkstoffen müsste auf seine Realisierbarkeit überprüft werden.

In klinischen Simulationen treten Methacrylate besonders in den ersten zwei Tagen nach Produktion aus dem Therapiemittel aus, bis nach dem siebten Tag in wässriger Lösung kaum noch Monomerfreisetzung nachweisbar ist [Bural *et al.*, 2011]. Deshalb ist ein Ansatzpunkt für eine bessere Biokompatibilität die Lagerung der entsprechenden Arbeit für zwei Tage in einem Wasserbad, bevor sie dem Patienten eingesetzt wird.

Durch das Layer Interface entsteht eine Heterogenität in der Polymerisation des 3D gedruckten Objekts (schematisch dargestellt in Abbildung 31), die nicht nur mechanische Nachteile, sondern auch potenziell Problematiken im Bereich der Biokompatibilität mit sich bringt [Gojzewski *et al.*, 2020]. So weisen Druckobjekte, die in Schichtstärken von 50 µm gedruckt wurden bessere Konversionswerte auf, als solche, bei denen die Schichtdicke auf 100 µm erhöht wurde [Reymus *et al.*, 2019]. Eine weitere Verbesserung der technischen Möglichkeiten zur Reduktion der Schichtstärke könnte die Homogenität und damit die Biokompatibilität weiter verbessern.

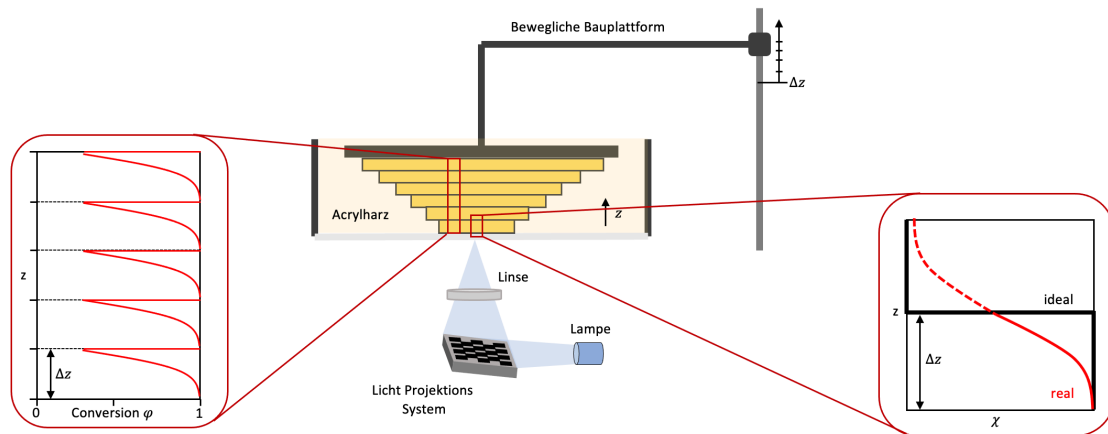


Abbildung 31: Schematische Darstellung eines 3D Druckers und Grafik über die Konversion im Polymer [Vitale und Cabral, 2016]

Ein weiterer Fokus sollte auf der post-Produktions-Behandlung der Kunststoffe aus dem 3-D Druck liegen: durch Temperatur, Initiator, reaktives Co-Monomer, chemische Entfernung, Bestrahlung, Devolatilisation beziehungsweise Polymerentgasung und Ionenaustausch wird der Restmonomergehalt im Werkstück weiter verringert [Wulff *et al.*, 2022]. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Ethanol sowohl positive Auswirkungen auf die Konversionsrate als auch damit einhergehend auf die Biokompatibilität hat [Alifui-Segbaya *et al.*, 2018].

Einige Schlüsse können aufgrund der hier erläuterten Ergebnisse und aufgrund vorangegangener Untersuchungen gezogen werden, dennoch muss weiter geforscht und die Grundlagenforschung um mehr *in vitro* und *in vivo* Studien ergänzt werden, um den zytotoxischen, inflammatorischen, oxidativen und apoptoseinduzierenden Effekt der neuartigen Kunststoffe vollumfänglich und gesichert festzustellen und einen einheitlichen Konsens zu formulieren. Besonders im Hinblick auf eine immer jüngere Patientengruppe fehlen auch noch eindeutige Antworten auf die Frage nach einer eventuell kompromittierten Fruchtbarkeit durch Erhöhung des Östrogenspiegels [Francisco *et al.*, 2022].

Spannend bleibt ebenfalls, ob sich die Kunststoffe auch aus Gesichtspunkten ihrer mechanischen Eigenschaften mit den herkömmlich hergestellten Kunststoffen messen können und so insgesamt in der Praxis eine dauerhafte Alternative darstellen und eine führende Position in der zukünftigen Herstellung von Schienen in der Dentalbranche etablieren können. Da sich diese Arbeit mit

den lokalen Auswirkungen auf Zellen in der Mundschleimhaut befasste, sollten auch ergänzende Studien durchgeführt werden, um herauszufinden welche Auswirkungen Schienen aus 3D gedrucktem Kunststoff auf den gesamten Organismus haben können.

Abschließend erscheint mir der bis heute gültigen Satz von Paracelsus aus dem sechzehnten Jahrhundert passend: „Alle Dinge sind Gift und nichts ist ohne Gift. Allein die Dosis macht, dass ein Ding kein Gift ist.“

Literaturverzeichnis

1. Ajay R, Suma K, Ali SA. Monomer Modifications of Denture Base Acrylic Resin: A Systematic Review and Meta-analysis (2019). *J Pharm Bioallied Sci* **11**: S112-s125.
2. Akira S, Isshiki H, Nakajima T, Kinoshita S, Nishio Y, Natsuka S, Kishimoto T. Regulation of expression of the interleukin 6 gene: structure and function of the transcription factor NF-IL6 (1992). *Ciba Found Symp* **167**: 47-62; discussion 62-47.
3. Al-Khotani A, Naimi-Akbar A, Gjerset M, Albadawi E, Bello L, Hedenberg-Magnusson B, Christidis N. The associations between psychosocial aspects and TMD-pain related aspects in children and adolescents (2016). *J Headache Pain* **17**: 30.
4. Al-Moraissi EA, Conti PCR, Alyahya A, Alkebsi K, Elsharkawy A, Christidis N. The hierarchy of different treatments for myogenous temporomandibular disorders: a systematic review and network meta-analysis of randomized clinical trials (2021). *Oral Maxillofac Surg* **26**: 519-533
5. Al-Moraissi EA, Farea R, Qasem KA, Al-Wadeai MS, Al-Sabahi ME, Al-Iryani GM. Effectiveness of occlusal splint therapy in the management of temporomandibular disorders: network meta-analysis of randomized controlled trials (2020). *Int J Oral Maxillofac Surg* **49**: 1042-1056.
6. Alajbeg IZ, Vrbanić E, Lapić I, Alajbeg I, Vuletić L. Effect of occlusal splint on oxidative stress markers and psychological aspects of chronic temporomandibular pain: a randomized controlled trial (2020). *Sci Rep* **10**: 10981.
7. Alghazzawi TF. Advancements in CAD/CAM technology: Options for practical implementation (2016). *J Prosthodont Res* **60**: 72-84.
8. Ali IL, Yunus N, Abu-Hassan MI. Hardness, flexural strength, and flexural modulus comparisons of three differently cured denture base systems (2008). *J Prosthodont* **17**: 545-549.
9. Alifui-Segbaya F, Bowman J, White AR, Varma S, Lieschke GJ, George R. Toxicological assessment of additively manufactured methacrylates for medical devices in dentistry (2018). *Acta Biomater* **78**: 64-77.

10. Alt V, Hannig M, Wöstmann B, Balkenhol M. Fracture strength of temporary fixed partial dentures: CAD/CAM versus directly fabricated restorations (2011). *Dent Mater* **27**: 339-347.
11. Ata SO, Yavuzylmaz H. In vitro comparison of the cytotoxicity of acetal resin, heat-polymerized resin, and auto-polymerized resin as denture base materials (2009). *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **91**: 905-909.
12. Austin AT, Basker RM. The level of residual monomer in acrylic denture base materials with particular reference to a modified method of analysis (1980). *Br Dent J* **149**: 281-286.
13. Ayman AD. The residual monomer content and mechanical properties of CAD\CAM resins used in the fabrication of complete dentures as compared to heat cured resins (2017). *Electron Physician* **9**: 4766-4772.
14. Bacali C, Baldea I, Moldovan M, Carpa R, Olteanu DE, Filip GA, Nastase V, Lascu L, Badea M, Constantiniuc M, Badea F. Flexural strength, biocompatibility, and antimicrobial activity of a polymethyl methacrylate denture resin enhanced with graphene and silver nanoparticles (2020). *Clin Oral Investig* **24**: 2713-2725.
15. Bae S-U, Kim B-J. Effects of Cellulose Nanocrystal and Inorganic Nanofillers on the Morphological and Mechanical Properties of Digital Light Processing (DLP) 3D-Printed Photopolymer Composites (2021). *Applied Sciences* **11**: 6835.
16. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases (2009). *Biol Chem* **390**: 191-214.
17. Barmer (2016). Barmer GEK Zahnreport 2016. [online] <https://www.barmer.de/blob/36826/cddcefefb6701f748e4868cac949ee40/data/pdf-zahnreport-2016.pdf> [06.12.2021].
18. Batarseh G, Windsor LJ, Labban NY, Liu Y, Gregson K. Triethylene glycol dimethacrylate induction of apoptotic proteins in pulp fibroblasts (2014). *Oper Dent* **39**: E1-8.
19. Batch GL, Macosko CW. Oxygen inhibition in differential scanning calorimetry of free radical polymerization (1990). *Thermochimica acta* **166**: 185-198.

20. Becher R, Kopperud HM, Al RH, Samuelsen JT, Morisbak E, Dahlman HJ, Lilleaas EM, Dahl JE. Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts (2006). *Dent Mater* **22**: 630-640.
21. Berger U, Hartmann A, Schmid D. 3D-Druck-additive Fertigungsverfahren: Rapid Prototyping, Rapid Tooling, Rapid Manufacturing. 2019: Verlag Europa-Lehrmittel Nourney, Vollmer GmbH & Company KG,
22. Beuer F, Schweiger J, Edelhoff D. Digital dentistry: an overview of recent developments for CAD/CAM generated restorations (2008). *Br Dent J* **204**: 505-511.
23. Bio-Techne (2022). Quantikine ELISAs. [online] <https://www.biotechne.com/reagents/elisa-kits/quantikine> [20.06.2022].
24. Borelli B, Zarone F, Riviaccio V, Riccitiello F, Simeone M, Sorrentino R, Rengo S, Spagnuolo G, Procino A. Polyacrylic resins regulate transcriptional control of interleukin-6, gp80, and gp130 genes in human gingival fibroblasts (2017). *J Oral Sci* **59**: 87-91.
25. Brancher JA, Spada PP, Meger MN, Fatturri AL, Dalledone M, de Paiva Bertoli FM, Deeley K, Scariot R, Vieira AR, Küchler EC, de Souza JF. The association of genetic polymorphisms in serotonin transporter and catechol-O-methyltransferase on temporomandibular disorders and anxiety in adolescents (2019). *J Oral Rehabil* **46**: 597-604.
26. Brydson JA. *Plastics materials*. 1999: Elsevier: 76-97
27. Bural C, Aktaş E, Deniz G, Ünlügerçi Y, Bayraktar G. Effect of leaching residual methyl methacrylate concentrations on in vitro cytotoxicity of heat polymerized denture base acrylic resin processed with different polymerization cycles (2011). *J Appl Oral Sci* **19**: 306-312.
28. Calamita M, Coachman C, Sesma N, Kois J. Occlusal vertical dimension: treatment planning decisions and management considerations (2019). *Int J Esthet Dent* **14**: 166-181.
29. Campaner M, Takamiya AS, Bitencourt SB, Mazza LC, de Oliveira SHP, Shibayama R, Barão VAR, Sukotjo C, Pesqueira AA. Cytotoxicity and inflammatory response of different types of provisional restorative materials (2020). *Arch Oral Biol* **111**: 104643.

30. Cell Signaling Technology (2022). Jak/Stat: IL-6 Receptor Signaling. [online] <https://www.cellsignal.com/pathways/jak-stat-il6-receptor-signaling> [20.06.22].
31. 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.
32. Chang HH, Guo MK, Kasten FH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, Wang RS, Jeng JH. Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA (2005). *Biomaterials* **26**: 745-753.
33. Chen SY, Liang WM, Yen PS. Reinforcement of acrylic denture base resin by incorporation of various fibers (2001). *J Biomed Mater Res* **58**: 203-208.
34. Cimpan MR, Cressey LI, Skaug N, Halstensen A, Lie SA, Gjertsen BT, Matre R. Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells (2000). *Eur J Oral Sci* **108**: 59-69.
35. Dantagnan C-A, FRANÇOIS P, Stéphane L, ATTAL J-P, DURSUN E. Degree of conversion of 3D printing resins used for splints and orthodontic appliances under different post-polymerization conditions (2022). *Clin Oral Investig* **27**: 2935-2942
36. Dayan C, Guven MC, Gencel B, Bural C. A Comparison of the Color Stability of Conventional and CAD/CAM Polymethyl Methacrylate Denture Base Materials (2019). *Acta Stomatol Croat* **53**: 158-167.
37. de Paiva Bertoli FM, Bruzamolin CD, de Almeida Kranz GO, Losso EM, Brancher JA, de Souza JF. Anxiety and malocclusion are associated with temporomandibular disorders in adolescents diagnosed by RDC/TMD. A cross-sectional study (2018). *J Oral Rehabil* **45**: 747-755.
38. Deutsche Gesellschaft für Funktionsdiagnostik- und therapie (DGFDt) (2015). Zur Therapie der funktionellen Erkrankung des kranio-mandibulären Systems [online] [17.02.2022].
39. Deutsche Gesellschaft für Zahn- Mund- und Kieferheilkunde e. V. (DGZMK) (2022). [online] https://www.dgfdt.de/richtlinien_formulare [13.02.2022].

40. Duray SJ, Gilbert JL, Lautenschlager EP. Comparison of chemical analysis of residual monomer in a chemical-cured dental acrylic material to an FTIR method (1997). *Dent Mater* **13**: 240-245.
41. Engel GL. The biopsychosocial model and the education of health professionals (1978). *Ann N Y Acad Sci* **310**: 169-187.
42. Engelmann J, Volk J, Leyhausen G, Geurtsen W. ROS formation and glutathione levels in human oral fibroblasts exposed to TEGDMA and camphorquinone (2005). *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **75**: 272-276.
43. Engler M, Güth JF, Keul C, Erdelt K, Edelhoff D, Liebermann A. Residual monomer elution from different conventional and CAD/CAM dental polymers during artificial aging (2020). *Clin Oral Investig* **24**: 277-284.
44. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G (1971). *Immunochemistry* **8**: 871-874.
45. Ettlin DG, Luigi M. Das Kiefergelenk in Funktion und Dysfunktion. 2019: Thieme: 219-235
46. Francisco I, Paula AB, Ribeiro M, Marques F, Travassos R, Nunes C, Pereira F, Marto CM, Carrilho E, Vale F. The Biological Effects of 3D Resins Used in Orthodontics: A Systematic Review (2022). *Bioengineering (Basel)* **9**:
47. Gallorini M, Cataldi A, di Giacomo V. HEMA-induced cytotoxicity: oxidative stress, genotoxicity and apoptosis (2014). *Int Endod J* **47**: 813-818.
48. Gautam R, Singh RD, Sharma VP, Siddhartha R, Chand P, Kumar R. Biocompatibility of polymethylmethacrylate resins used in dentistry (2012). *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **100**: 1444-1450.
49. Gesch D, Bernhardt O, Alte D, Schwahn C, Kocher T, John U, Hensel E. Prevalence of signs and symptoms of temporomandibular disorders in an urban and rural German population: results of a population-based Study of Health in Pomerania (2004). *Quintessence Int* **35**: 143-150.
50. Ghezzi P. Regulation of protein function by glutathionylation (2005). *Free Radic Res* **39**: 573-580.

51. Gojzewski H, Guo Z, Grzelachowska W, Ridwan MG, Hempenius MA, Grijpma DW, Vancso GJ. Layer-by-Layer Printing of Photopolymers in 3D: How Weak is the Interface? (2020). *ACS Appl Mater Interfaces* **12**: 8908-8914.
52. Golbidi F, Asghari G. The level of residual monomer in acrylic denture base materials (2009). *Research Journal of Biological Sciences* **4**: 244-249.
53. Göncü Başaran E, Ayna E, Vallittu PK, Lassila LV. Load-bearing capacity of handmade and computer-aided design--computer-aided manufacturing-fabricated three-unit fixed dental prostheses of particulate filler composite (2011). *Acta Odontol Scand* **69**: 144-150.
54. Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling (2015). *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**:
55. Greene CS. "The Ball on the Hill": A new perspective on TMJ functional anatomy (2018). *Orthod Craniofac Res* **21**: 170-174.
56. Gressner AM, Gressner OA. Glutathion S-Transferasen. (2019). Springer Berlin Heidelberg: 996-997.
57. Groß A. Kunststoffe in der Zahnmedizin (1979). *Chemie in unserer Zeit* **13**: 142-146.
58. Güth JF, Zuch T, Zwinge S, Engels J, Stimmelmayer M, Edelhoff D. Optical properties of manually and CAD/CAM-fabricated polymers (2013). *Dent Mater J* **32**: 865-871.
59. Hada T, Kanazawa M, Iwaki M, Katheng A, Minakuchi S. Comparison of Mechanical Properties of PMMA Disks for Digitally Designed Dentures (2021). *Polymers (Basel)* **13**: 1745.
60. Hensten-Pettersen A, Helgeland K. Sensitivity of different human cell line in the biologic evaluation of dental resin-based restorative materials (1981). *Scand J Dent Res* **89**: 102-107.
61. Huang GJ, LeResche L, Critchlow CW, Martin MD, Drangsholt MT. Risk factors for diagnostic subgroups of painful temporomandibular disorders (TMD) (2002). *J Dent Res* **81**: 284-288.
62. Hull CW. Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography (1984). *United States Patent, Appl., No. 638905, Filed*

63. Ikemura K, Ichizawa K, Yoshida M. UV-VIS spectra and photoinitiation bisacylphosphine oxide derivatives behaviors in unfilled , of acylphosphine oxide and light-cured entat resins (2017). *Dent Mater J.* **27**: 765-774.
64. ISO.org (2022). ISO 10993-1. [online] <https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:10993:-1:ed-5:v2:en> [17.06.2022].
65. Issa Y, Watts DC, Brunton PA, Waters CM, Duxbury AJ. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro (2004). *Dent Mater* **20**: 12-20.
66. Janda R. Der Stand der Entwicklung auf dem Gebiet der Zahnfüllungskunststoffe (i-III) (1988). *Quintessenz* **39**: 1067-1073.
67. Janda R. Kunststoffverbundsysteme: Grundlagen, Anwendung, Verarbeitung, Prüfung. 1990: VCH Verlagsgesellschaft: 1542-1542.
68. Janke V, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Leyhausen G, Geurtsen W. TEGDMA causes apoptosis in primary human gingival fibroblasts (2003). *J Dent Res* **82**: 814-818.
69. Kappert HF, Eichner K. Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung. 1. Grundlagen und Verarbeitung. 2005: Georg Thieme Verlag
70. Kent LW, Rahemtulla F, Hockett RD, Jr., Gilleland RC, Michalek SM. Effect of lipopolysaccharide and inflammatory cytokines on interleukin-6 production by healthy human gingival fibroblasts (1998). *Infect Immun* **66**: 608-614.
71. Kim LU, Kim JW, Kim CK. Effects of molecular structure of the resins on the volumetric shrinkage and the mechanical strength of dental restorative composites (2006). *Biomacromolecules* **7**: 2680-2687.
72. Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications (2010). *Int Immunol* **22**: 347-352.
73. Kraemer Fernandez P, Unkovskiy A, Benkendorff V, Klink A, Spintzyk S. Surface Characteristics of Milled and 3D Printed Denture Base Materials Following Polishing and Coating: An In-Vitro Study (2020). *Materials (Basel)* **13**: 3305.
74. Kreß S, Schaller-Ammann R, Feiel J, Friedl J, Kasper C, Egger D. 3D Printing of Cell Culture Devices: Assessment and Prevention of the

- Cytotoxicity of Photopolymers for Stereolithography (2020). *Materials (Basel)* **13**: 3011.
75. Krifka S, Spagnuolo G, Schmalz G, Schweikl H. A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers (2013). *Biomaterials* **34**: 4555-4563.
76. Kulzer GmbH (2022). Die Geschichte von Kulzer Technik. [online] https://www.kulzer-technik.de/de_kt/kt/ueber_division_technik/geschichte/division_technik_historie.aspx [24.02.2022].
77. Kupcho K, Shultz J, Hurst R, Hartnett J, Zhou W, Machleidt T, Grailer J, Worzella T, Riss T, Lazar D, Cali JJ, Niles A. A real-time, bioluminescent annexin V assay for the assessment of apoptosis (2019). *Apoptosis* **24**: 184-197.
78. Lai YL, Chen YT, Lee SY, Shieh TM, Hung SL. Cytotoxic effects of dental resin liquids on primary gingival fibroblasts and periodontal ligament cells in vitro (2004). *J Oral Rehabil* **31**: 1165-1172.
79. Lee DH, Lim BS, Lee YK, Ahn SJ, Yang HC. Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures (2006). *Dent Mater* **22**: 1086-1092.
80. Lee HH, Lee CJ, Asaoka K. Correlation in the mechanical properties of acrylic denture base resins (2012). *Dent Mater J* **31**: 157-164.
81. Lee JH, Jun SK, Moon HJ, Lee HH. Cytotoxicity and proinflammatory cytokine expression induced by interim resin materials in primary cultured human dental pulp cells (2017). *J Prosthet Dent* **118**: 524-534.
82. Lefebvre CA, Schuster GS, Rueggeberg FA, Tamaresely K, Knoernschild KL. Responses of oral epithelial cells to dental resin components (1996). *J Biomater Sci Polym Ed* **7**: 965-976.
83. Lefeuvre M, Bourd K, Lorient MA, Goldberg M, Beaune P, Périanin A, Stanislawski L. TEGDMA modulates glutathione transferase P1 activity in gingival fibroblasts (2004). *J Dent Res* **83**: 914-919.
84. Leppard DG, Kohler M, Misev L. Photopolymerizable compositions containing an alkylbisacylphosphine oxide (1995). Journal

85. Libermann TA, Baltimore D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor (1990). *Mol Cell Biol* **10**: 2327-2334.
86. Ligon SC, Liska R, Stampfl J, Gurr M, Mülhaupt R. Polymers for 3D Printing and Customized Additive Manufacturing (2017). *Chem Rev* **117**: 10212-10290.
87. Lin CH, Lin YM, Lai YL, Lee SY. Mechanical properties, accuracy, and cytotoxicity of UV-polymerized 3D printing resins composed of Bis-EMA, UDMA, and TEGDMA (2020). *J Prosthet Dent* **123**: 349-354.
88. Lin R, Yu CH, Sun J. [Mechanical properties and cytotoxicity of three-dimensional printing polycarbonate for occlusal splints] (2019). *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* **28**: 467-471.
89. Loor G, Kondapalli J, Schriewer JM, Chandel NS, Vanden Hoek TL, Schumacker PT. Menadione triggers cell death through ROS-dependent mechanisms involving PARP activation without requiring apoptosis (2010). *Free Radic Biol Med* **49**: 1925-1936.
90. Manojlovic D, Dramićanin MD, Miletic V, Mitić-Ćulafić D, Jovanović B, Nikolić B. Cytotoxicity and genotoxicity of a low-shrinkage monomer and monoacylphosphine oxide photoinitiator: Comparative analyses of individual toxicity and combination effects in mixtures (2017). *Dent Mater* **33**: 454-466.
91. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl (1995). *J Exp Med* **182**: 1545-1556.
92. Medeiros RA, Vieira DL, Silva E, Rezende L, Santos RWD, Tabata LF. Prevalence of symptoms of temporomandibular disorders, oral behaviors, anxiety, and depression in Dentistry students during the period of social isolation due to COVID-19 (2020). *J Appl Oral Sci* **28**: e20200445.
93. Moharamzadeh K, Van Noort R, Brook IM, Scutt AM. Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes (2007). *Dent Mater* **23**: 40-44.
94. Moraes RR, Garcia JW, Barros MD, Lewis SH, Pfeifer CS, Liu J, Stansbury JW. Control of polymerization shrinkage and stress in nanogel-modified monomer and composite materials (2011). *Dent Mater* **27**: 509-519.

95. Owen JB, Butterfield DA. Measurement of oxidized/reduced glutathione ratio (2010). *Methods Mol Biol* **648**: 269-277.
96. Palmqvist P, Lundberg P, Lundgren I, Hånström L, Lerner UH. IL-1beta and TNF-alpha regulate IL-6-type cytokines in gingival fibroblasts (2008). *J Dent Res* **87**: 558-563.
97. Park JH, Lee H, Kim JW, Kim JH. Cytocompatibility of 3D printed dental materials for temporary restorations on fibroblasts (2020). *BMC Oral Health* **20**: 157.
98. Parvizi A, Lindquist T, Schneider R, Williamson D, Boyer D, Dawson DV. Comparison of the dimensional accuracy of injection-molded denture base materials to that of conventional pressure-pack acrylic resin (2004). *J Prosthodont* **13**: 83-89.
99. Promega GmbH (2021a). GSH/GSSG-Glo Assay. [online] https://www.promega.de/products/cell-health-assays/oxidative-stress-assays/gsh_gssg_glo-assay/?catNum=V6611 [24.01.2021].
100. Promega GmbH (2021b). RealTime-Glo Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay. [online] <https://www.promega.de/en/products/cell-health-assays/apoptosis-assays/realtime-glo-annexin-v-apoptosis-assay/?catNum=JA1011>, <https://www.promega.de/en/resources/pubhub/features/introduction-to-luminescent-annexin-v-apoptosis-detection/>, <https://www.promega.de/en/resources/pubhub/2019/understanding-cellular-biology-in-real-time/> [06.02.2021].
101. PromoCell GmbH (2021). Colorimetric Cell Viability Kit I (WST-8). [online] <https://www.promocell.com/product/colorimetric-cell-viability-kit-i-wst-8/> [22.01.2021].
102. Raszewski Z, Nowakowska-Toporowska A, Nowakowska D, Więckiewicz W. Update on Acrylic Resins Used in Dentistry (2021). *Mini Rev Med Chem* **21**: 2130-2137.
103. Ravve A. Principles of polymer chemistry. 2013: Springer Science & Business Media, 427-450.
104. Rebrin I, Sohal RS. Pro-oxidant shift in glutathione redox state during aging (2008). *Adv Drug Deliv Rev* **60**: 1545-1552.

105. Reichl FX, Durner J, Hickel R, Spahl W, Kehe K, Walther U, Gempel K, Liebl B, Kunzelmann KH, Hume W. Uptake, clearance and metabolism of TEGDMA in guinea pigs (2002). *Dent Mater* **18**: 581-589.
106. Reichl FX, Esters M, Simon S, Seiss M, Kehe K, Kleinsasser N, Folwaczny M, Glas J, Hickel R. Cell death effects of resin-based dental material compounds and mercurials in human gingival fibroblasts (2006). *Arch Toxicol* **80**: 370-377.
107. Reymus M, Lümekemann N, Stawarczyk B. 3D-printed material for temporary restorations: impact of print layer thickness and post-curing method on degree of conversion (2019). *Int J Comput Dent* **22**: 231-237.
108. Rose EC, Bumann J, Jonas IE, Kappert HF. Contribution to the biological assessment of orthodontic acrylic materials. Measurement of their residual monomer output and cytotoxicity (2000). *J Orofac Orthop* **61**: 246-257.
109. Saha FJ, Pulla A, Ostermann T, Miller T, Dobos G, Cramer H. Effects of occlusal splint therapy in patients with migraine or tension-type headache and comorbid temporomandibular disorder: A randomized controlled trial (2019). *Medicine (Baltimore)* **98**: e16805.
110. Samuelsen JT, Dahl JE, Karlsson S, Morisbak E, Becher R. Apoptosis induced by the monomers HEMA and TEGDMA involves formation of ROS and differential activation of the MAP-kinases p38, JNK and ERK (2007). *Dent Mater* **23**: 34-39.
111. Schiffman E, Ohrbach R. Executive summary of the Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders for clinical and research applications (2016). *J Am Dent Assoc* **147**: 438-445.
112. Schmalz G, Schweikl H, Hiller KA. Release of prostaglandin E2, IL-6 and IL-8 from human oral epithelial culture models after exposure to compounds of dental materials (2000). *Eur J Oral Sci* **108**: 442-448.
113. Schmitz S. Der Experimentator: Zellkultur. 2020: Springer Berlin Heidelberg
114. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
115. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1 (1991). *Embo j* **10**: 2247-2258.

116. Schweiger J, Edelhoff D, Güth JF. 3D Printing in Digital Prosthetic Dentistry: An Overview of Recent Developments in Additive Manufacturing (2021). *J Clin Med* **10**: 2010.
117. Schweikl H, Hiller KA, Eckhardt A, Bolay C, Spagnuolo G, Stempf T, Schmalz G. Differential gene expression involved in oxidative stress response caused by triethylene glycol dimethacrylate (2008). *Biomaterials* **29**: 1377-1387.
118. Schweikl H, Schmalz G, Spruss T. The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers (2001). *J Dent Res* **80**: 1615-1620.
119. Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers (2006). *J Dent Res* **85**: 870-877.
120. Sehgal PB, Helfgott DC, Santhanam U, Tatter SB, Clarick RH, Ghrayeb J, May LT. Regulation of the acute phase and immune responses in viral disease. Enhanced expression of the beta 2-interferon/hepatocyte-stimulating factor/interleukin 6 gene in virus-infected human fibroblasts (1988). *J Exp Med* **167**: 1951-1956.
121. Shin SH, Doh RM, Lim JH, Kwon JS, Shim JS, Kim JE. Evaluation of Dimensional Changes According to Aging Period and Postcuring Time of 3D-Printed Denture Base Prostheses: An In Vitro Study (2021). *Materials (Basel)* **14**: 6185.
122. Siller IG, Enders A, Steinwedel T, Epping NM, Kirsch M, Lavrentieva A, Scheper T, Bahnemann J. Real-Time Live-Cell Imaging Technology Enables High-Throughput Screening to Verify in Vitro Biocompatibility of 3D Printed Materials (2019). *Materials (Basel)* **12**: 2125.
123. Spahl W, Budzikiewicz H, Geurtsen W. Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry (1998). *J Dent* **26**: 137-145.
124. Spector T. Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for less than or equal to 0.5 to 50 microgram of protein (1978). *Anal Biochem* **86**: 142-146.
125. Staal FJ, Roederer M, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor kappa B and transcription of human immunodeficiency virus (1990). *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 9943-9947.

126. Stawarczyk B, Ender A, Trottmann A, Özcan M, Fischer J, Hämmerle CH. Load-bearing capacity of CAD/CAM milled polymeric three-unit fixed dental prostheses: effect of aging regimens (2012). *Clin Oral Investig* **16**: 1669-1677.
127. Steinmassl O, Offermanns V, Stöckl W, Dumfahrt H, Grunert I, Steinmassl PA. In Vitro Analysis of the Fracture Resistance of CAD/CAM Denture Base Resins (2018). *Materials (Basel)* **11**: 401.
128. Sun JS, Tsuang YH, Huang WC, Chen LT, Hang YS, Lu FJ. Menadione-induced cytotoxicity to rat osteoblasts (1997). *Cell Mol Life Sci* **53**: 967-976.
129. Tanaka T, Kishimoto T. Targeting interleukin-6: all the way to treat autoimmune and inflammatory diseases (2012). *Int J Biol Sci* **8**: 1227-1236.
130. Tegethoff M, Stalujanis E, Belardi A, Meinlschmidt G. Chronology of Onset of Mental Disorders and Physical Diseases in Mental-Physical Comorbidity - A National Representative Survey of Adolescents (2016). *PLoS One* **11**: e0165196.
131. Theroux J, Stomski N, Cope V, Mortimer-Jones S, Maurice L. A cross-sectional study of the association between anxiety and temporomandibular disorder in Australian chiropractic students (2019). *J Chiropr Educ* **33**: 111-117.
132. Thorn CF, Lu ZY, Whitehead AS. Regulation of the human acute phase serum amyloid A genes by tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6 and glucocorticoids in hepatic and epithelial cell lines (2004). *Scand J Immunol* **59**: 152-158.
133. Trubiani O, Toniato E, Di Iorio D, Diomedede F, Merciaro I, C DA, Caputi S. Morphological analysis and interleukin release in human gingival fibroblasts seeded on different denture base acrylic resins (2012). *Int J Immunopathol Pharmacol* **25**: 637-643.
134. Tumbleston JR, Shirvanyants D, Ermoshkin N, Januszewicz R, Johnson AR, Kelly D, Chen K, Pinschmidt R, Rolland JP, Ermoshkin A. Continuous liquid interface production of 3D objects (2015). *Science* **347**: 1349-1352.
135. Türp J, Nilges P. Diagnostik von Patienten mit chronischen orofazialen Schmerzen. Die deutsche Version des „Graded Chronic Pain Status “ (2000). *Quintessenz* **51**: 721-727.

136. Urban VM, Cass QB, Oliveira RV, Giampaolo ET, Machado AL. Development and application of methods for determination of residual monomer in dental acrylic resins using high performance liquid chromatography (2006). *Biomed Chromatogr* **20**: 369-376.
137. Van Weemen BK, Schuurs AHW. Immunoassay using antigen—enzyme conjugates (1971). *FEBS Letters* **15**: 232-236.
138. Vavrina J, Vavrina J. [Bruxism: Classification, Diagnostics and Treatment] (2020). *Praxis (Bern 1994)* **109**: 973-978.
139. Vitale A, Cabral JT. Frontal Conversion and Uniformity in 3D Printing by Photopolymerisation (2016). *Materials* **9**: 760.
140. Volk J, Engelmann J, Leyhausen G, Geurtsen W. Effects of three resin monomers on the cellular glutathione concentration of cultured human gingival fibroblasts (2006). *Dent Mater* **22**: 499-505.
141. Wedekind L, Güth JF, Schweiger J, Kollmuss M, Reichl FX, Edelhoff D, Högg C. Elution behavior of a 3D-printed, milled and conventional resin-based occlusal splint material (2021). *Dent Mater* **37**: 701-710.
142. Wulff J, Schweikl H, Rosentritt M. Cytotoxicity of printed resin-based splint materials (2022). *J Dent* **120**: 104097.
143. Yuan J, Kroemer G. Alternative cell death mechanisms in development and beyond (2010). *Genes Dev* **24**: 2592-2602.
144. Zhang C, Wu JY, Deng DL, He BY, Tao Y, Niu YM, Deng MH. Efficacy of splint therapy for the management of temporomandibular disorders: a meta-analysis (2016). *Oncotarget* **7**: 84043-84053.
145. Zhang R, Wu W, Luo S. Different Behaviors of Glutathione in Aqueous and DMSO Solutions: Molecular Dynamics Simulation and NMR Experimental Study (2011). *Journal of Solution Chemistry* **40**: 1784-1795.
146. Zhang SH, He KX, Lin CJ, Liu XD, Wu L, Chen J, Rausch-Fan X. Efficacy of occlusal splints in the treatment of temporomandibular disorders: a systematic review of randomized controlled trials (2020). *Acta Odontol Scand* **78**: 580-589.
147. Zhang YH, Lin JX, Yip YK, Vilcek J. Enhancement of cAMP levels and of protein kinase activity by tumor necrosis factor and interleukin 1 in human

fibroblasts: role in the induction of interleukin 6 (1988). *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 6802-6805.

148. Zonnenberg AJJ, Türp JC, Greene CS. Centric relation critically revisited—What are the clinical implications? (2021). *Journal of Oral Rehabilitation* **48**: 1050-1055.

Appendix

Lambert-Beersches Gesetz: $E_\lambda = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I_1} \right) = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d$

E_λ : Extinktion (Absorbanz des Materials für Licht der Wellenlänge λ)

I_0 : Intensität des einfallenden Lichtes (Einheit: $[W \cdot m^{-2}]$)

I_1 : Intensität des transmittierten Lichtes (Einheit: $[W \cdot m^{-2}]$)

c : Stoffmengenkonzentration der absorbierten Substanz in der Flüssigkeit
(Einheit $[mol \cdot m^{-3}]$)

ε_λ : dekadischer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ

d : Schichtdicke des durchstrahlten Körpers (Einheit: $[m]$)

Abschwächung der Intensität einer Strahlung in Bezug zu deren Anfangsintensität beim Durchgang durch ein Medium mit einer absorbierenden Substanz in Abhängigkeit von der Konzentration der absorbierenden Substanz und der Schichtdicke.

Danksagung

Am Ende dieser Niederschrift ist es mir ein besonderes Anliegen, mich bei allen zu bedanken, die diese Arbeit möglich gemacht und unterstützt haben.

Zuallererst gilt mein besonderer Dank meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. med. dent. Karin Huth, sowie den Doktorvätern Herrn Prof. Dr. med. dent. Daniel Edelhoff und Herrn Prof. Dr. med. dent. Jan-Frederik Güth, die mir die Möglichkeit der Dissertation baten und alle benötigten Ressourcen zur Verfügung stellten.

Herzliches Dankeschön außerdem an Herrn Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel und Herrn Prof. Dr. med. dent. Falk Schwendicke, in deren Abteilung, der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, ich diese Doktorarbeit durchführen durfte.

Ein aufrichtiges Dankeschön insbesondere auch meinem Betreuer, Herrn PD Dr. med. dent. Maximilian Kollmuß, der mir mit Rat und Tat bei allen Fragen zur Seite stand und seine Expertise, besonders auf dem Gebiet der Zellbiologie, mit viel Einsatz zu vermitteln wusste.

Dankeschön auch an meine Familie, Manfred, Margot, Christel, Günther, Kirstin, Nicolas, Laura und Vivien, und an meine engsten Freunde, die mich während dieser Zeit durch alle Lebenslagen hinweg begleitet und mir beigestanden haben.

Widmen möchte ich diese Arbeit meinem Vater, der nie müde wird, mir unterstützend zur Seite zu stehen und an mich zu glauben.

Affidavit**Eidesstattliche Versicherung**

Weishaupt, Michelle Christine

Name, Vorname

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

In vitro Untersuchungen zur Biokompatibilität dentaler Schienenmaterialien für die additive Fertigung

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.

Landsberg am Lech, 23.09.2025

Michelle Christine Weishaupt

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand