

***In vitro* Untersuchung**
zum Einfluß von zahnärztlichen Provisorienkunststoffen
auf die Homöostase von parodontalen Ligamentzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Lucia Sophie Altenberend
aus Bielefeld
2014

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Stark
2. Gutachter: PD Dr. J. Winter

Tag der Mündlichen Prüfung: 11.03.2014

Aus der Poliklinik für zahnärztliche Prothetik, Propädeutik und Werkstoffwissenschaften des
Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
Direktor: Prof. Dr. H. Stark

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	9
1.1 Allgemeine Einführung	9
1.2 Temporäre Kronen- und Brückenversorgung	10
1.2.1 Aufgaben und Funktionen temporärer Versorgungen	10
1.2.2 Klinische Anforderungen an temporäre Versorgungen	12
1.3 Provisorische Kronen- und Brückenkunststoffe	13
1.3.1 Anforderungen an temporäre Kronen- und Brückenmaterialien	14
1.3.2 Vergleich unterschiedlicher temporärer Kronen- und Brückenwerkstoffe	18
1.4 Biokompatibilität von Kunststoffen und ihren Bestandteilen	21
1.5 Möglichkeiten der Oberflächenpolitur	23
1.6 Ziel der Arbeit	25
2. Material und Methoden	27
2.1 Material	27
2.1.1 Geräte	27
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	27
2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Medien	28
2.2 Methoden	28
2.2.1 Gewinnung der Zellproben	28
2.2.2 Kultivierung der parodontalen Ligamentzellen	29
2.2.3 Produktion der Kunststoffproben	30
2.2.4 Konditionierung der Medien	31
2.2.5 Stimulation mit konditioniertem Medium	32
2.2.6 RNA Extraktion	32
2.2.7 cDNA Synthese	33
2.2.8 Quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	33
2.2.9 Auswertung der PCR	35
2.2.10 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	36
2.2.11 Zytotoxikologische Prüfung - <i>in vitro</i>	37
2.2.12 Statistische Analyse	37

3. Ergebnisse	38
3.1 Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	38
3.1.1 IL-1 β	38
3.1.2 IL-8	39
3.1.3 IL-10	40
3.1.4 MMP-1	41
3.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	42
3.2.1 ELISA-Test für IL-1 β nach 24 h	42
3.2.2 ELISA-Test für IL-8 nach 24 h	43
3.2.3 ELISA-Test für MMP-1 nach 24 h	44
3.3 Zytotoxikologische Prüfung	45
3.3.1 Zellvitalität nach 4 h	45
3.3.2 Zellvitalität nach 24 h	46
3.3.3 Zellvitalität nach 3 d und 7 d	47
4. Diskussion	49
4.1 Fragestellung	49
4.2 Diskussion der Methoden	50
4.3 Humane parodontale Ligamentzellen	53
4.4 Diskussion der Ergebnisse	57
4.4.1 Diskussion PCR und ELISA	57
4.4.2 Diskussion zytotoxikologischer Test	62
4.5 Schlussfolgerung	65
5. Zusammenfassung	67
6. Literaturverzeichnis	69
7. Danksagung	82

Abkürzungsverzeichnis

°C	=	Grad Celsius
1,6-HDMA	=	1,6-Hexanediol Dimethacrylat
AP	=	Alkaline Phosphatase
aqua dest.	=	destilliertes Wasser
Bis-GMA	=	Bisphenol-A-Glyzidyl-Methacrylat
BLAST	=	Basic local alignment search tool
BSP	=	Bone sialoprotein
cDNA	=	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO ₂	=	Kohlenstoffdioxid
d	=	Tage
DMEM	=	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
dNTP	=	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ELISA	=	Enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	=	und Mitarbeiter
EZM	=	Extrazelluläre Matrix
FCR	=	Fetales Kälberserum
h	=	Stunden
HEMA	=	2-Hydroxyethylmethacrylat
HGF	=	Humane Gingivafibroblasten
HPLC	=	Hochleistungsflüssigkeitschromatograph
IBMA	=	Isobatyl Methacrylat
IL	=	Interleukin
L	=	Luxatemp [®]
LDH	=	Laktatdehydrogenase
LG	=	Luxatemp [®] und gehärteterLack
LPS	=	Lipopolysaccharide
mAU	=	milli-absorbance-units
ml	=	Milliliter
mM	=	Millimol
mm	=	Millimeter
MMA	=	Methylmethacrylate
MMP	=	Matrix Metalloproteinase
mRNA	=	messenger Ribonukleinsäure
MTT	=	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
ng	=	Nanogramm
nm	=	Nanometer
OPG	=	Osteoprotegerin
OPN	=	Osteopontin
PEMA	=	Polyethylmethacrylat
pg	=	Pikogramm
PGE2	=	Prostaglandin 2
PL	=	Parodontales Ligament
PMMA	=	Polymeres Methylmethacrylate
PTH	=	Parathyroidhormon
RANK	=	Receptor Activator of Nuclearfactor Kappa B

RANKL	=	Receptor Activator of Nuclearfactor Kappa B -Ligand
REM	=	Rasterelektromikroskop
RNA	=	Ribonukleinsäure
RT-PCR	=	Realtime Polymerasekettenreaktion
T	=	Trim [®]
TEGDMA	=	Triethyleneglycoldimethacrylate
TGF	=	Transforming growth factor
TIMPs	=	Tissue inhibitors of Matrix Metalloproteinases
TNF	=	Tumornekrose Faktor
UDMA	=	Urethandimethacrylat
UG	=	Ungehärteter Lack (Luxatemp [®] Glaze & Bond)
XTT	=	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
α	=	Alpha
α -SMA	=	α smooth muscle actin
β	=	Beta
μ g	=	Mikrogramm

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung

Kronen- und Brückenprovisorien sind grundlegende Bestandteile in der prothetischen Zahnheilkunde. Sie übernehmen die Schutzfunktion gegenüber chemischen, thermischen, physikalischen und bakteriellen Noxen. Ebenso sind sie für den Erhalt von Funktion und Ästhetik verantwortlich (Burke et al., 2005; Burns et al., 2003; Wirz et al., 1992 a). Für den Erfolg und die Langlebigkeit der definitiven Restauration ist ein gesundes Parodont unumgänglich (Tjan und Grant, 1987). Um dieses zu gewährleisten, sind ein parodontal-hygienisch gestaltetes Provisorium mit einer minimalen Oberflächenrauigkeit sowie die Biokompatibilität des verwendeten Materials entscheidend. Die exakte Randgestaltung und eine möglichst glatte Oberflächenbeschaffenheit verringert die Anlagerung von Bakterien (Borchers et al., 1999; Helfgen et al., 1995), welche während der Tragezeit zu einer Entzündungsreaktion und Gingivitis führen kann (Burke et al., 2005; Wassell et al., 2002).

Mehrere Studien belegen, dass Kunststoffbestandteile nach der Polymerisation freigesetzt werden und mit den umliegenden Geweben in Reaktion treten (Al-Hiyasat et al., 2005; Fujisawa et al., 2000; Geurtsen et al., 1998a; Issa et al., 2004). Maßgebend für die Zytotoxizität der Monomere ist ihr Grad an Lipophilie (Yoshii, 1997).

Zur Herstellung von Provisorien stehen Materialien auf MMA- oder Bis-GMA-Basis zur Verfügung. Die Bis-Acryl Kunststoffe zeigen bessere mechanische Werte und eine gute Farbstabilität (Haselton et al., 2002; Wirz et al., 1992 b). Im Gegensatz dazu erhält man bei den MMA-Kunststoffen eine deutlich bessere und weniger raue Oberflächenbeschaffenheit (Haselton et al., 2004).

Die Bearbeitung der Oberfläche kann mit der multiphasen Technik erfolgen. Dabei werden in abnehmender Körnung Bimsstein, Schleifpapier und Silikonpolierer verwendet (Borchers et al., 1999; Helfgen et al., 1995). Eine andere Möglichkeit besteht in der Verwendung von oberflächenvergütenden Lacken (Basting, 1985; Mues et al., 2008).

Die Frage nach der Biokompatibilität dieser Lacke ist in der Literatur noch nicht eingehend erörtert worden. Die folgende Arbeit untersucht den Einfluss des oberflächenversiegelten Lacks Luxatemp[®] Glaze & Bond auf parodontale Ligamentzellen.

1.2 Temporäre Kronen- und Brückenversorgung

Die temporäre Versorgung von präparierten Zähnen ist ein wesentlicher Bestandteil bei der Therapie von festsitzendem Zahnersatz. Die Aufgaben und Anforderungen der provisorischen Restauration sind nicht nur vielfältig, sondern kommen denen der definitiven Restauration sehr nahe (Burke et al., 2005; Welker et al., 1999; Wirz et al., 1992 a). Hergestellt werden die Provisorien hauptsächlich aus Kunststoffen der Methacrylatgruppen (Welker, 1998). In den folgenden Kapiteln wird auf die Aufgaben, Anforderungen und Materialeigenschaften eingegangen.

1.2.1 Aufgaben und Funktionen temporärer Versorgungen

Provisorien haben therapeutische, funktionelle und diagnostische Funktionen. Neben den Aufgaben, den Zahn und die umliegenden Gewebe vor bakteriellen, chemischen, thermischen und physikalischen Noxen bzw. Einflüssen zu schützen, ist auch die funktionelle Wiederherstellung des okklusalen Gleichgewichts unerlässlich. So stabilisiert das Provisorium zum Beispiel die Zahnposition, verhindert die Kippung von Nachbarzähnen und/oder die Elongation der Antagonisten. Zusätzlich kann das Provisorium für diagnostische Fragen eine Rolle spielen. Insbesondere bei ästhetischen, phonetischen und kaufunktionellen Problemen, wie im Falle einer Bisslagenänderung, ist die temporäre Versorgung sowohl für den Zahnarzt wie auch für den Patienten ein gutes Hilfsmittel (Burke et al., 2005; Burns et al., 2003; Davis und O'Connell, 2004; Geurtsen, 1994; Wirz et al., 1992 a).

Nicht in den Hintergrund treten dürfen die psychischen Effekte für den Patienten. Vor allem bei einer länger andauernden Behandlung bewirkt die Wiederherstellung der Ästhetik und der Kaufunktion ein zunehmendes Vertrauen in die Therapie und zu dem behandelnden Arzt (Burns et al., 2003; Wirz et al., 1992 a).

Einen Überblick über die zu erfüllenden Aufgaben der temporären Versorgung gibt Tabelle 1 (Burns et al., 2003; Davis und O'Connell, 2004; Erpenstein, 1994; Gegauß und Howay, 2006; Geurtsen, 1994; Weber, 1999; Welker et al., 1999; Wirz et al., 1992 a).

Tab. 1 Wichtige Aufgaben und Funktionen der temporären Versorgung:

Aufgabe	
Schutzfunktion	<ul style="list-style-type: none"> ○ Schutz der Dentinwunde und der Pulpa vor thermischen, bakteriellen, chemischen und toxischen Einflüssen ○ Schutz vor Zahnfraktur
Ersatzfunktion	<ul style="list-style-type: none"> ○ Ersatz von fehlendem Gewebe
Stabilität der Zahnposition	<ul style="list-style-type: none"> ○ Vermeidung von Elongation, Kippung und Rotation ○ Stabilisierung und Schienung
Funktionelle Aufgaben	<ul style="list-style-type: none"> ○ Okklusoartikuläres Gleichgewicht ○ Kaufunktion ○ Herstellung einer stabilen Bisslage
Diagnostische Funktion	<ul style="list-style-type: none"> ○ Optimale Ästhetik (Farbe & Form der definitiven Arbeit) ○ Bisslageänderung ○ Phonetische Funktionsprobe
Schutz des Parodonts	<ul style="list-style-type: none"> ○ Erhaltung vorhandener Hart- und Weichgewebe ○ Verhinderung von Plaqueakkumulation ○ Abheilung von Entzündungen
Erscheinungsbild	<ul style="list-style-type: none"> ○ Wiederherstellung der Ästhetik ○ Psychische Sicherheit des Patienten

1.2.2 Klinische Anforderungen an temporäre Versorgungen

Aus den oben genannten Aufgaben an die Provisorien ergeben sich klinische Anforderungen, die erfüllt werden müssen.

Parodontal-hygienische Gestaltung

Ein wichtiges Augenmerk bei der Herstellung eines Provisoriums sollte auf der parodontal-hygienischen Gestaltung liegen. Die parodontale Gesundheit ist für den Erfolg des festsitzenden Zahnersatzes von entscheidender Bedeutung (Tjan und Grant, 1987; Wirz et al., 1992 a). Retentionsstellen für Plaque oder mechanische und chemische Reize müssen vermieden werden. Deshalb sind eine optimale marginale Randgestaltung, eine glatte Oberfläche, freigestaltete Approximalräume sowie eine physiologische Form die Basis für den Erhalt eines gesunden Parodonts (Burke et al., 2005; Windmüller, 1999; Wirz et al., 1992 a). Überextendierte Ränder führen zu mechanischer Irritation und fördern die Plaqueretention. Die daraus resultierenden Gingivitiden erschweren nicht nur die Abformung (Vahidi, 1987), sondern verhindern auch das Einsetzen der definitiven Arbeit (Gough, 1994). Ein schlecht hergestelltes Provisorium kann zu gingivaler Rezession und Entzündungsreaktion führen, ein Gutes zu gingivaler Anlagerung und Abheilung von Entzündungsgeschehen (Burns et al., 2003; Tjan und Grant, 1987; Wassell et al., 2002). Die Mitarbeit des Patienten an einer guten Mundhygiene ist für ein langfristig gesundes Parodont unerlässlich.

Kariesprophylaxe

Damit es zu keiner bakteriellen Invasion und Reinfektion kommt, ist ein exakter Randschluss anzustreben. Außerdem kann die temporäre Versorgung auch als Medikamententräger funktionieren um die Vitalität der Pulpa zu sichern (Wirz et al., 1992 a).

Stabile statische und dynamische Okklusion

Das Einschleifen einer störungsfreien Okklusion in Statik und Dynamik dient zum einem der Sicherstellung, bzw. der Wiederherstellung der Kaufunktion sowie der Bisslage (Burns et al., 2003; Erpenstein, 1994; Wirz et al., 1992 a). Zum anderen verhindert es die okklusale Überbelastung, Elongation, Kippung und Rotation der Zähne und ist somit ausschlaggebend für ein unge-

störtes okklusartikuläres Gleichgewicht (Gegauff und Howay, 2006; Weber, 1999; Welker et al., 1999; Wirz et al., 1992 a).

Anatomische Form

Nicht nur aus ästhetischen Gründen sollte bei der Herstellung eines Provisoriums auf eine physiologische Form geachtet werden. Stabile Approximalkontakte fixieren die Position des präparierten Zahnes in der Zahnreihe und schützen die Interdentalpapillen (Bral, 1989; Padbury et al., 2003).

1.3 Provisorische Kronen- und Brückenkunststoffe

Kunststoffe sind hochmolekulare Verbindungen, sogenannte Polymere. Sie entstehen während einer chemischen Reaktion aus kleinsten sich wiederholenden Bausteinen, den Monomeren. Die meisten Kunststoffe besitzen ein Kohlenstoffgerüst mit den Molekülen Wasserstoff und Sauerstoff in der Hauptkette; sie sind also organischen Ursprungs (Janda, 2005). Die Eigenschaften der Kunststoffe werden in erster Linie durch ihren strukturellen Aufbau, den Vernetzungsgrad der Moleküle und durch ihre chemische Zusammensetzung bestimmt (Gladwin und Bagby, 2009; Hohmann und Hieschler, 2005; Janda, 2005).

Zusätzlich können organische oder anorganische Füllstoffe, die in das Grundgerüst eingebaut werden, den Kunststoff charakterisieren. Mit Füllstoffen versetzte Materialien werden als Verbundkunststoffe oder Composite bezeichnet. Sie setzen sich aus verschiedenen Werkstoffen zusammen: Monomere, Initiatoren, Katalysatoren, Füllstoffe, Pigmente und Additive (Stabilisatoren und Weichmacher). Füllstoffe beeinflussen Merkmale des Kunststoffes, wie Bruch- und Abriebfestigkeit, Elastizität und Alterungsbeständigkeit (Hohmann und Hieschler, 2005). Eine Einordnung der Kronen- und Brückenkunststoffe kann nach der chemischen Zusammensetzung oder der Verarbeitungsmöglichkeit erfolgen.

Chemisch lassen sich drei Kunststoffgruppen unterscheiden (Welker, 1998):

- MMA/PMMA-Systeme: Sie bestehen aus Pulver- und Flüssigkeitskomponenten. Das Pulver (feine PMMA-Kügelchen, ca. 20µm groß) wird mit monomerer Flüssigkeit angefeuchtet und durch die Polymerisation von MMA verkittet.

- Höhere Acrylate: Selbsthärtende Pulver-Flüssigkeit-Materialien, wie zum Beispiel Mischungen aus Polyethylmethacrylat (PEMA) und i-Butylmethacrylat. Die Monomere haben ein höheres Molekulargewicht.
- Diacrylate: (Pasten) organische Basis sind Monomere wie Bisphenol-A-Glycidyl-Methacrylat (Bis-GMA), Urethandimethacrylat (UDMA), Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA). Hinzugefügt werden organische oder anorganische Füllstoffe.

Die Polymerisationsarten unterscheiden sich auf Grund ihrer Initiatoren:

- Kalthärtung/Autopolymerisation: bei Raumtemperatur nach dem Vermischen der Komponenten
- Lichthärtung/Photopolymerisation: durch Licht bestimmter Wellenlänge
- Dualhärtung (Auto- und Photopolymerisation)

Die Autopolymerisate sind Pulver-Flüssigkeitskomponenten oder Pasten. Hier werden Redoxinitiatorensysteme eingesetzt, wie zum Beispiel: N, N-Dimethyl-p-toluidin und Dibenzoylperoxid.

Bei der Photopolymerisation zerfällt der Initiator durch Bestrahlung in Radikale und löst so die Reaktion aus. Der meist gebrauchte Photoinitiator ist das Campherchinon (Janda, 2005).

1.3.1 Anforderungen an temporäre Kronen- und Brückenmaterialien

Bei der Auswahl des passenden Materials spielen mehrere Aspekte eine Rolle (siehe Tab. 2). Bedeutend für den Erfolg oder Misserfolg der Therapie sind zum Beispiel: keine irritierenden Reaktionen auf Pulpa und Gingiva, leichte Säuberung, gute marginale Adaptation, Reparatur- und Veränderungsfähigkeit sowie Polierbarkeit (Vahidi, 1987).

Wichtige Grundlage zur Verwendung von dentalen Materialien ist ihre biologische Verträglichkeit. Sie dürfen keine kanzerogene, toxische, sensibilisierende und mutagene Wirkungen zeigen (Welker, 1998).

Temporäre Kronen- und Brückenkunststoffe dürfen während der Applikation und der Gebrauchsperiode keine Schädigungen an Pulpa und Parodont hervorrufen (Lenz und Lang, 1990). Da bei der direkten Verarbeitung sich in Reaktion befindliche Kunststoffe in den Mund eingebracht werden, sind vor allem thermische Einflüsse und lokale Toxizität bestimmend (Lenz und Lang, 1990; Welker et al., 1999). Bei der exothermen Reaktion kommt es zu einem Temperaturanstieg,

der von Reaktionsgeschwindigkeit, Kunststoffmasse und Umgebungstemperatur abhängig ist. Das Pulpasystem kann Temperaturanstiege bis zu 42,5°C durch Gefäßreaktionen kompensieren, sonst kommt es zur irreversiblen Schädigung (Burns et al., 2003; Lenz und Lang, 1990; Ryzanny et al., 1996; Welker et al., 1999). Eine niedrige Polymerisationswärme ist wünschenswert. Diese wird auch maßgeblich über die verwendeten Materialien der Negativform gesteuert. Folgende Materialien beeinflussen den Temperaturanstieg in abnehmender Reihenfolge: Tiefziehfolien> Siloxan Abformmaterialien> irreversible Hydrokolloid Abformmaterialien> vorgefertigte Kunststoffhüllen. Hinzu kommt die Kunststoffmenge; große temporäre Restaurationen produzieren einen höheren Temperaturanstieg als kleine Provisorien (Moulding und Teplitsky, 1990; Pfeiffer und Schwickerath, 1988).

Kunststoffbestandteile können toxisch auf die Zellen der Pulpa, des Parodontes und auf die umliegenden Gewebe wirken. Eine Vielzahl von Studien beschäftigt sich mit den Auswirkungen der freiwerdenden Monomeren auf die orale Umgebung. Dabei spielt nicht nur die Toxizität der Stoffe eine Rolle, sondern auch ihr Potenzial Allergien auszulösen. Diese Aspekte werden ausführlich in Kapitel 1.4 besprochen.

Die äußere Oberflächenqualität der Provisorien ist mitverantwortlich für die Steuerung der Plaqueakkumulation. Eine ausreichend gleichmäßige Politur der Oberfläche ist obligatorisch. Die Oberflächenqualität ist vom formgebenden Werkstoff abhängig. Mit Tiefziehfolien hergestellte Provisorien besitzen primär eine geringe Oberflächenrauigkeit. Bei Alginat- und Silikonschlüssel weisen Diacrylate eine Inhibitionsschicht auf, die durch Politur oder Äthylalkohol beseitigt werden kann. Zusätzlich spielt die Struktur der Kunststoffe eine Rolle; diese ist von der Verarbeitung der Materialien abhängig. Pasten der Automix-Varianten können porenfrei von den Produzenten hergestellt werden. Von Hand gemischte Pasten-Systeme weisen vereinzelte Porositäten auf, wobei die Pulver-Flüssigkeits-Präparate eine erhebliche Porosität zeigen (Ryzanny et al., 1996; Welker et al., 1999).

Die Passgenauigkeit der temporären Restauration wird durch die Polymerisationskontraktion beeinflusst. Wie oben besprochen, muss das Provisorium einen passgenauen Randschluss aufweisen, es darf aber auch während der temporären Versorgung zu keinen Stellungsänderungen der Zähne kommen. Kunststoffe härten mit der Zeit nach, dadurch entstehen Dimensionsänderungen. So können bei direkt hergestellten Provisorien unerwünschte orthodontische Bewegungen resultieren. Ein spannungsfreier Sitz ist daher beim direkten Eingliedern anzustreben (Ryzanny et al., 1996).

Wie *Pfeiffer und Schwickerath* (1988) herausfanden, ist die Herstellungsmethodik für die Passgenauigkeit von größerer Wichtigkeit als die chemische Zusammensetzung. Die wiederholte Reposition auf den Stumpf bis zur Aushärtung zeigte die geringste Randspaltbildung. Im Vergleich dazu zeigte die Aushärtung in der Abformung außerhalb des Mundes nur gering schlechtere Ergebnisse. Die stärksten Abweichungen bei der Passgenauigkeit stellten sich bei einmaliger Reposition des Provisoriums und anschließender Aushärtung im Wasserbad ein (*Pfeiffer und Schwickerath*, 1988).

Thermozyklus und okklusale Druckbelastung beeinträchtigen die marginale Adaptation, sie führen zu einer Randspaltbildung des Provisoriums. Auch langzeitige Feuchtigkeitsexposition führt zu einer Zunahme der marginalen Lücke (*Ehrenberg und Weiner*, 2000; *Ehrenberg et al.*, 2006; *Hung et al.*, 1993). Für den Schutz des Parodonts, dies gilt ebenso für die Pulpa, vor chemischen, thermischen und bakteriellen Einflüssen ist ein adäquater Randschluss der temporären Versorgung wichtig (*Gegauff*, 2006; *Kaiser*, 1978).

Eine ausreichende mechanische Festigkeit gegenüber Kau- und Zugbelastung muss gegeben sein, insbesondere eine erhöhte Biegefestigkeit und Abrasionsstabilität. Vor allem weitspannige Restaurationen müssen belastbar und widerstandsfähig gegenüber Durchbiegung sein. Die mechanischen Eigenschaften werden erheblich beeinflusst von Alter und Aufbewahrungsmilieu des Materials (*Welker et al.*, 1999).

Für den Behandler spielen neben den patientenbezogenen Anforderungen auch verarbeitungstechnische Anforderungen eine Rolle. Die verwendeten Materialien sollten eine simple Handhabung in der Anwendung haben: leichte Applikation, ausreichende Verarbeitungszeit, schnelle Aushärtungszeit, gute Polierbarkeit, zügige und aufwandlose Reparatur.

Das fertige Provisorium sollte ausreichend widerstandsfähig und korrigierbar, gut zu entfernen und zu befestigen sein. Die Oberflächenpolitur muss mit praxisüblichen Materialien schnell und einfach durchzuführen sein. Die Möglichkeit der Reparatur oder Erweiterung von Provisorien ist unbedingt notwendig, einmal aus Zeitersparnisgründen und zum anderen aus finanziellen Gründen für Patient und Behandler. Die Wirtschaftlichkeit der Werkstoffe darf nicht vernachlässigt werden; dies betrifft Materialkosten ebenso wie die Lagerstabilität und Lagerungsmöglichkeiten (*Davis und O'Connell*, 2004; *Käyser et al.*, 1997; *Ryzanny et al.*, 1996; *Welker*, 1998; *Wirz et al.*, 1992 a).

Tab. 2 Anforderungen an provisorische Materialien:

Biologische Verträglichkeit	<ul style="list-style-type: none"> ○ Nicht toxisch ○ Nicht allergisierend ○ Keine Irritation der Gewebe
Gute hygienische Eigenschaften	<ul style="list-style-type: none"> ○ Glatte Oberflächengestaltung ○ Gute Reinigungsmöglichkeiten ○ Plaqueabweisend
Mundbeständigkeit	<ul style="list-style-type: none"> ○ Keine Werkstoffalterung ○ Unlöslich gegen Nahrung, Medikamente & Zahnpflegemittel ○ Nicht abbaubar durch das Mundmilieu
Farbstabilität	<ul style="list-style-type: none"> ○ Keine endogene und exogene Verfärbung ○ Natürliche Farbgebung
Mechanische Festigkeit	<ul style="list-style-type: none"> ○ Abrasionsfest ○ Biegestabil ○ Widerstandsfähig gegenüber den Kaukräften
Physikalische Eigenschaften	<ul style="list-style-type: none"> ○ Geringe Polymerisationstemperatur ○ Dimensionsstabilität
Verarbeitbarkeit	<ul style="list-style-type: none"> ○ Gute Mischbarkeit ○ Schnelle Abbindereaktion ○ Dosierungsunempfindlich
Polierbarkeit	<ul style="list-style-type: none"> ○ Porenfreie Oberflächenstruktur ○ Beständiger Oberflächenglanz
Wirtschaftlichkeit	<ul style="list-style-type: none"> ○ Niedrige Kosten ○ Gute Lagerfähigkeit ○ Langlebigkeit
Reparationsfähigkeit	<ul style="list-style-type: none"> ○ Leichtes Antragen von Kunststoff an Fehlstellen

1.3.2 Vergleich unterschiedlicher temporären Kronen- und Brückenwerkstoffe

Entscheidend für die Charakteristik der Kunststoffe sind Struktur und Eigenschaft der Monomere. Die oben genannten Kunststofftypen lassen sich alle einer Monomerklasse zuordnen, der Methacrylate. Zu unterscheiden sind mono-, bi-, tri- oder höherfunktionelle Methacrylate (Abb. 1). Monofunktionelle Methacrylate können nur Fadenmoleküle bilden. Das Kettenwachstum findet an einer Stelle statt. Bei höherfunktionellen Methacrylaten kann das Wachstum gleichzeitig an mehreren Stellen beginnen. Dies führt zu einer chemischen Vernetzung der getrennt wachsenden Ketten, es entstehen dreidimensionale Moleküle (Janda, 2005).

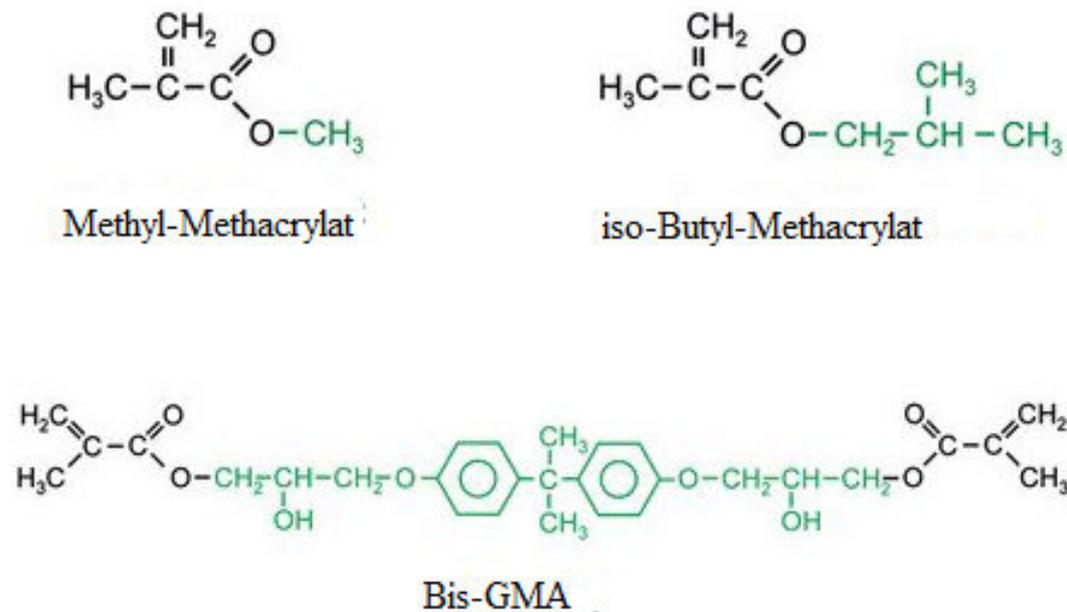


Abb. 1 Strukturformeln unterschiedlicher Methacrylatgruppen (Balkenhol et al., 2011)

Polymerisationsschrumpfung

Eine erhöhte Molmasse führt zu einer deutlich geringeren Polymerisationsschrumpfung. Durch eine organische Matrix mit Monomeren höheren Molekulargewichtes oder durch Zugabe von Füllstoffen kann die Kontraktion herabgesetzt werden. Tabelle 3 zeigt, dass die Polymerisationskontraktion von MMA/PMMA über die höheren Acrylate bis hin zu den Diacrylaten abnimmt (Burns et al., 2003; Janda, 2005; Ryzanny et al., 1996; Welker et al., 1999; Wirz et al., 1992 b).

Tab. 3 Vergleich der Polymerisationskontraktion von verschiedener Methacrylatgruppen (Janda, 2005)

Monomer	Volumenkontraktion (%)
Methylmethacrylat	21
Ethylenglycodimethacrylat	16
Bisphenol-A-Glyzidyl-Methacrylat (Bis-GMA)	5

Polymerisationstemperatur

Wie in Abschnitt 1.2.1 beschrieben, ist die Reaktionstemperatur von mehreren Faktoren abhängig. Es ist zu erkennen, dass die lichthärtenden Kunststoffe (z.B.: Triad, Dentsply York, USA) innerhalb von wenigen Sekunden einen sehr dramatischen Temperaturanstieg vollziehen. Im Gegensatz dazu stehen die chemisch aktivierten Kunststoffe (Wang et al., 1989). Die geringste Temperaturerhöhung ist bei den Bis-Acryl-Kompositen feststellbar. Es folgen in aufsteigender Reihenfolge die höheren Acrylate (PEMA) und PMMA (Anders und Welker, 1990; Burns et al., 2003; Moulding und Teplitsky, 1990; Pfeiffer und Schwickerath, 1988; Ryzanny et al., 1996; Wang et al., 1989; Welker et al., 1999).

Wasseraufnahme

Die Wasserlöslichkeit und -aufnahme wird durch die Carboxylgruppe (COOH-Gruppe) festgelegt. Das PMMA weist wenige Carboxyl- und Hydroxylgruppen auf. Es ist also weniger wasserlöslich und nimmt weniger Wasser auf als andere Polymere.

Die Wasseraufnahme macht das Material elastisch und weich. Monomere, die Wasserstoffbrücken ausbilden können, sind auch als Polymer eher anfällig für die Aufnahme von Wasser (Janda, 2005; Welker et al., 1999). Für die Wasseraufnahme sind Porosität, Homogenität und Vernetzungsgrad der Kunststoffe entscheidend. Durch ihre höhere Vernetzbarkeit sind Diacrylate, wie auch höhere Acrylate, gegenüber den MMA/PMMA-Systemen im Vorteil (Anders und Welker, 1990; Ryzanny et al., 1996). Die Wasseraufnahme ist aus mechanischen, biologischen und hygienischen Gründen nicht wünschenswert.

Zytotoxizität

Anders und Welker (1990) untersuchten die Zytotoxizität von verschiedenen provisorischen Kunststoffen an Hand eines Hämolysetests. Die Auswertung des Hämolysegrads ergab, dass die Auswirkung der Bis-Acryl-Komposite am geringsten und die des höheren Acrylatsystems am höchsten war. Der PMMA-Kunststoff nimmt eine Zwischenstellung ein.

Die durchschnittliche Monomerabgabe während der Polymerisation ist bei den höheren Acrylaten im Vergleich zu PMMA erhöht, in wässriger Lösung aber erniedrigt, auch die Gesamtmonomer-masse liegt unter der von PMMA (Pfeiffer und Schwickerath, 1988).

Issa und Mitarbeiter (2004) fanden heraus, dass die Lipophilie der Monomere ihre Zytotoxizität beeinflussen. Auch *Atsumi und Mitarbeiter* (2006) unterstützen diesen Gedanken. Bei ihren Versuchen zeigten sie, dass ein hydrophiler Charakter der Kunststoffe auch eine geringere toxische Auswirkung auf Zellen ausübt. Außerdem erkannten sie eine dosis- und hydrophobabhängige Toxizität.

Oberflächenstruktur

Anzustreben ist eine porenfreie Oberflächenstruktur. Dies ist zu einem abhängig von dem verwendeten Material und zum anderen vom formgebenden Werkstoff (Basting, 1985; Ryzanny et al., 1996). In Tiefziehfolien hergestellte Versorgungen besitzen eine geringere Rauigkeit als die in Silikon oder Alginat angefertigten (Ryzanny et al., 1996). Bei geeigneter Bearbeitung werden Mittelrauigkeitswerte von 0,5 µm erreicht. Die Innenflächenstruktur ist abhängig von der Verarbeitung und vom Mischverhältnis. Vor allem Pulver-Flüssigkeits-Systeme zeigen Porositäten; diese entstehen durch die Diffusion der monomeren Flüssigkeit durch die Polymerkügelchen (Ryzanny et al., 1996). *Haselton und Mitarbeiter* (2004) zeigten, dass Kunststoffe auf Basis von Methacrylaten nach der Politur eine glattere Oberfläche haben. Außerdem bewirkt eine feuchte Umgebung eine Erhöhung der Oberflächenrauigkeit.

Farbstabilität

Mehrere Autoren haben die Kunststoffe auf ihre Farbstabilität überprüft. Bis-GMA-Komposit wurde eine gute Farbstabilität bescheinigt (Wang et al., 1989; Wirz et al., 1992 b). PMMA-Kunststoffe sind farbstabiler als PEMA-Kunststoffe (Wirz et al., 1992 b; Yannikakis et al., 1998). *Guler und Mitarbeiter* (2005) fanden heraus, dass nach der Politur mit Bimsstein und einer Diamant-Polierpaste die Farbstabilität erhöht wurde.

Mechanische Festigkeit

Der Vernetzungsgrad und der anorganische Füllstoffgehalt sind für die Härte und die Festigkeit entscheidend. Die Biege- und Abrasionsfestigkeit wird durch das Zusammenspiel von Matrixkunststoffen und Füllstoffen bestimmt (Janda, 2005). Die Autopolymerisationskunststoffe erreichen ihre Endhärte zwischen 24 h und sieben Tagen (Ryzanny et al., 1996). Die Durchschnittshärten von Diacrylaten und PMMA-Kunststoffen sind erheblich höher als die von PEMA-Kunststoffen. Dual- und lichthärtende Systeme hingegen erreichen eine höhere Anfangshärte, der weitere Härteanstieg ist geringer. Ihr Vorteil ist die hohe Ausgangshärte und Belastbarkeit (Pfeiffer und Schwickerath, 1988; Ryzanny et al., 1996; Wang et al., 1989).

Ryzanny et al. (1996) untersuchten das Elastizitätsmodul, die Biegefestigkeit und Vickers-Härte von Kunststoffen unter zwei Bedingungen: 1. 24 h trocken, 23° C und 2. wassergesättigt, 37° C. Ergebnis war, dass Wasseraufnahme gleich Abfall der mechanischen Festigkeit bedeutet. Auch hier lagen die dual- und lichthärtenden Diacrylate vor den Autopolymerisaten (Ryzanny et al., 1996). Im Vergleich der Biegefestigkeiten von Diacrylaten auf Bis-GMA Basis und MMA Kunststoffen zeigten einige Bis-Acryl Kunststoffe signifikant höhere Werte als die Methacrylat Kunststoffe (Haselton et al., 2002).

Die Abrasionsfestigkeit von Provisorienkunststoffen ist von *Wang et al.* (1989) erforscht worden. PMMA-Kunststoffe zeigten hier den höchsten Abrieb, PEMA-Kunststoffe und Diacrylate zeigten gleich gute Ergebnisse wie das UDEMA-Komposit Triad.

1.4 Biokompatibilität von Kunststoffen und ihren Bestandteilen

Unreagierte Kunststoffbestandteile und frisch zubereiteter Kunststoff wirken toxisch auf die Zellen der Pulpa (Anders und Welker, 1990; Browne et al., 1984; Lehmann et al., 1993). Monomere können durch die offen liegenden Dentinkanälchen penetrieren und so auf die Pulpazellen Einfluss nehmen. Es ist aber nachgewiesen worden, dass die Penetration der Stoffe in die Dentintubuli geringfügig ist (Langeland, 1966). *Ferracane und Condon* (1990) untersuchten Komposite und Kunststoffe auf die Hypothese, dass die Mehrzahl der ungehärteten Monomere innerhalb weniger Stunden nach Härtung in Lösung gehen. Es stellte sich heraus, dass innerhalb von 24 Stunden alle löslichen Komponenten eluiert waren. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Komposite langfristig keine Quelle von Monomeren sind, sondern nur kurzzeitig. Die zellschädigende Wir-

kung der Kunststoffe auf die Pulpazellen lässt sich eher auf die exotherme Abbindereaktion zurückführen als auf zytotoxische Monomere (Klötzer und Langeland, 1986; Klötzer, 1989). Die Pulpairritationen resultieren initial über die entstehende Polymerisationswärme und später durch unbeständigen Schutz gegenüber mikrobieller Besiedlung (Ryzanny et al., 1996; Welker et al., 1999).

Kunststoffe polymerisieren während ihrer Zubereitung nicht vollständig aus; es verbleibt ein Restmonomergehalt in den Polymeren. Die Diffusion von Monomeren in die umliegenden Gewebe ist der ausschlaggebende Faktor für die Entstehung von Irritationen und allergisierenden Wirkungen. Der zytotoxische Effekt von Monomeren auf verschiedene Zellarten ist in der Literatur ausreichend beschrieben worden (Alanko et al., 1996; Al-Hiyasat et al., 2005; Dillingham et al., 1983; Fujisawa et al., 2000; Issa et al., 2004; Lindström et al., 2002; Taira et al., 2000). *Yoshii* (1997) fand heraus, dass die Lipophilie die Zytotoxizität der Methacrylate und Acrylate erhöhen. Es besteht eine Korrelation zwischen Zytotoxizität und Lipophilie der Monomere. Außerdem wies er nach, dass die Länge der Oxylethylen-Ketten von Dimethacrylaten verantwortlich für die Membrandurchlässigkeit ist und somit auch für ihre Zytotoxizität. Lange Ketten können die Membran wegen ihrer Größe nicht passieren und haben somit auch weniger Einfluss auf die Zelle (*Yoshii*, 1997).

Im Vergleich weisen die Monoacrylate eine höhere Toxizität auf als die Monomethacrylate (*Fujisawa et al.*, 2000; *Yoshii*, 1997). Acrylate erhöhen durch ihre lipophile Eigenschaft auffällig die Mobilität und den flüssigen Zustand der Dipalmitoylphosphatidylcholin Doppelschicht, ein Modell für Biomembranen (*Fujisawa et al.*, 2000).

Auch die Diacrylatmonomere wie zum Beispiel Bis-GMA, TEGDMA und HEMA weisen toxische Eigenschaften gegenüber verschiedenen Zellentypen auf (*Geurtsen et al.*, 1998b; *Issa et al.*, 2004). *Issa et al.* (2004) analysierten unterschiedliche Komposit-Diacrylatmonomere auf ihren Einfluss auf humane Gingivafibroblasten. Sie verwendeten hierfür zwei verschiedene Methoden. Der MTT-Test zeigt Veränderungen der mitochondrialen Dehydrogenase Aktivität. Das MTT wird von lebendigen Zellen zu farbigen Formazan-Verbindungen reduziert. Mit einer farbmetrischen Messung kann man die Aktivität der Zellen bestimmen. Substanzen, die die Dehydrogenase Aktivität stören, wirken sich auf die messbare Farbintensität aus (*Mossmann*, 1983). In der zweiten Testung wurde die Abgabe der Laktatdehydrogenase (LDH), ein zytosolisch vorkommendes Enzym, gemessen. Eine Erhöhung der LDH-Konzentration weist auf eine Schädigung der Zellmembran hin (*Thomas et al.*, 1993). Alle Monomere inhibierten die mitochondriale Akti-

vität und erhöhten die Laktatdehydrogenase-Konzentration. Bis-GMA beeinflusste die Homöostase der Zellen am meisten, es hatte 18-mal höhere Werte als HEMA. Dieses Phänomen könnte mit der größeren Lipidfreundlichkeit von Bis-GMA gegenüber HEMA erklärt werden (Issa et al., 2004).

Bei Kompositmaterialien ist die Zytotoxizität nicht nur abhängig von den Monomeren und ihrer Struktur, sondern auch von der Menge der Füllstoffe (Al-Hiyasat et al., 2005; Wataha et al., 2003) und anderen Bestandteilen (Lehmann et al., 1993). Neben den toxischen Auswirkungen der Kunststoffe auf diverse Zelltypen ist eine östrogene Aktivität ebenso nachgewiesen worden (Wada et al., 2004 a) wie die Freisetzung von Zytokinen (Schmalz et al., 2000). Zudem gilt die Annahme, dass Kunststoffe ein mutagenes Potenzial aufweisen können (Schweikl et al., 2005). Allergische Reaktionen und Atemwegserkrankungen werden immer öfter bei Patienten und insbesondere beim zahnärztlichen Personal beobachtet. Die allergische Kontaktdermatitis, ausgelöst durch Methacrylate, ist bekannt bei zahnärztlichen Mitarbeitern. *Lindström et al.* (2002) fundierten die Annahme, dass Methacrylate neben der allergischen Kontaktdermatitis auch Asthma und Rhinoconjunctivitis auslösen können. Personen mit einer respiratorischen Hypersensivität sollten das Arbeiten mit diesen Materialien vermeiden. Menschen mit einer allergischen Kontaktdermatitis dürfen nicht direkt in Kontakt mit methacrylathaltigen Substanzen kommen (Lindström et al., 2002). Die allergischen Reaktionen können als Gingivitis, periorale Ekzeme, Lichen planus und Ulzerationen auftreten (Alanko et al., 1996; Goon et al., 2006; Karneva, 2001). Grund für dieses vermehrte Auftreten von Nebenwirkungen ist der erhöhte Einsatz von Kompositen in der Zahnheilkunde. Verantwortlich gemacht werden vor allem die Methacrylate HEMA und TEGDMA (Reichl, 2011).

1.5 Möglichkeiten der Oberflächenpolitur

Die abschließende Politur der temporären Versorgung ist der Schritt, der zu einer glatten Oberflächenbeschaffenheit führt. Es werden die aus der Herstellung resultierten Unebenheiten geglättet und die Form ausgearbeitet. Diese ist neben der Biokompatibilität und einem optimalen Randschluss Voraussetzung für das Einhalten der Anforderungen an temporären Versorgung (Gegauff, 2006). In mehreren Studien ist nachgewiesen worden, dass raue Oberflächen die Plaqueakkumulation fördern (Borchers et al., 1999; Bral, 1989; Helfgen et al., 1995).

Um die Oberflächenrauigkeit zu minimieren, werden in der Literatur mehrere Möglichkeiten diskutiert. Gute Ergebnisse lassen sich mit der regulären multiphasen Politur erreichen (Helfgen et al., 1995; Paravina et al., 2004; Wang et al., 1989); hierzu verwendet man Materialien mit abnehmender Körnung. Zur Verfügung stehen Bimsstein, Sandpapierstreifen, Silikonpolierer und Polierpasten mit Wollrädchen (Basting, 1985; Borchers et al., 1999; Gegauff, 2006).

In der Regel werden die „chairside“ (direkt) gefertigten Provisorien mit einer Fräse in Form gebracht, die Okklusion eingeschliffen, der Interdentalbereich mit Sandpapierscheiben ausgearbeitet und anschließend mit Silikonpolierern unterschiedlicher Körnung bearbeitet.

Labortechniken beginnen die Politur mit einem Bims-Wasser-Gemisch und einem Filzkegel oder Ziegenhaarbürstchen; für die Hochglanzpolitur wird eine Polierpaste mit Wollrädchen benutzt (Basting, 1985; Weber, 1999).

Kuthar und Funduk (2005) verglichen vier „chairside“ Poliersets und zwei Labortechniken miteinander. Sie fanden heraus, dass das Polieren an einem Poliermotor, wie es im Labor geschieht, und das Benutzen von Polierpasten die geringsten Oberflächenrauigkeiten hervorrufen. Autopolymerisate hatten nach der Politur eine signifikant höhere Oberflächenrauigkeit als Heißpolymerisate, die gleich bearbeitet wurden (Kuthar und Funduk, 2005).

Eine weitere Möglichkeit, glatte Oberflächen zu erreichen, ist die Verwendung von Lacken. Dies sind bekannte Bonding-Materialien oder extra hergestellte „liquid polisher“. Sie werden nach der Bearbeitung mit der Fräse auf die Oberfläche appliziert und lichtpolymerisiert.

Bondingsubstanzen sind Mischungen aus ungefüllten hochmolekularen Dimethacrylaten. Sie haben eine zähflüssige Konsistenz (Janda, 2005). Liquid polisher, wie zum Beispiel Luxatemp® Glaze & Bond (DMG, Hamburg, D) sind lichterhärtende, gefüllte Oberflächenversiegler auf Basis multifunktionaler Methacrylate.

Davidi und Mitarbeiter (2007) und *Mues und Mitarbeiter* (2008) zeigten, dass die Behandlung mit Lacken eine geringere Plaqueanlagerung hervorruft als die von polierten Kunststoffprovisorien. In einer *in vivo* Studie von *Davidi et al.* (2007) wurden an polierten PMMA-Provisorien eine Biofilmdicke von bis zu 0,2 mm gemessen. Bei der Verwendung des „liquid polishers“ ist die Plaqueakkumulation nicht messbar. Die Anzahl der Bakterien nach 12 h in der Mundhöhle betrug durchschnittlich 60 Millionen auf der polierten Probe, auf der mit einem Bondingmaterial bearbeiteten Probe fanden sich ca. 45 Millionen, der „liquid polisher“ wies um die 35 Millionen Bakterien auf. In einer nachfolgenden *in vitro* Studie stellte sich heraus, dass die „liquid polisher“ die Proteinabsorption verhindern.

Mues et al. (2008) analysierten die Oberflächenrauigkeit und die damit korrelierende bakterielle Besiedlung von konventionell polierten Provisorien und mit einem Lack versiegelten Provisorien. Die Rauigkeitswerte an lackierten Provisorien betragen durchschnittlich $0,63 \mu\text{m}$, die Werte polierten Proben lagen bei durchschnittlich $1,23 \mu\text{m}$. Die angefertigte REM-Analyse zeigte bei allen Provisorien eine deutlich geringere Plaqueakkumulation der lackierten Versorgung.

Vorteile der lackierten Provisorien sind die geringe Oberflächenrauigkeit, die verminderte Plaqueakkumulation und der geringe Zeitaufwand (Basting, 1985; Mues et al., 2008). Die Verwendung von Bondingmaterialien hingegen wird nicht befürwortet (Borchers et al., 1999).

Eine glatte Oberfläche von Kunststoffrestorationen ist nicht nur abhängig von der Art und Weise des Politurvorganges, wie oben beschrieben, sondern wird ebenso beeinflusst von der Größe der Füllstoffe im Kunststoff. Je Größer die Partikel der Füller sind, desto rauer ist die Oberfläche nach der Politur (Endo et al., 2010).

Der Zusammenhang zwischen einer erhöhten Oberflächenrauigkeit und der Freisetzung von Bestandteilen aus dentalen Restaurationen ist am Beispiel von Amalgam bewiesen (Werner und Weiland, 1990). Aussagen, inwiefern sich Kunststoffrestorationen bei der Freisetzung von Monomeren in Abhängigkeit von ihrer Oberflächenbeschaffenheit verhalten, sind in der gegenwärtigen Literatur noch nicht vollständig geklärt. Einen Hinweis über die Freisetzung von Monomeren durch die Politur von Kompositen gibt die Arbeit von *Manojlovic et al.* (2011). Sie berichten von einem geringeren Level an freigesetzten Monomeren nach 1 h, im Vergleich zu der Freisetzung nach 6 h und 24 h. Ihre Vermutung ist, dass dies an der nach der Politur der Kompositproben nicht mehr vorhandenen Oxidationsschicht liegt. So wird der anfängliche Auswascheffekt der Monomere verhindert. Vergleichend mit anderen Studien, bei denen die getesteten Kunststoffe nicht poliert wurden, ist die Masse der eluierten Monomere innerhalb der ersten Periode höher als die der polierten Proben (Polydorou et al., 2007; Polydorou et al., 2009).

1.6 Zielsetzung

Es gibt eine große Auswahl an unterschiedlichen Systemen für das Herstellen von Kunststoffprovisorien. Viele der Dentalfirmen bieten zu ihren langbewährten Provisorienkunststoffen einen sogenannten Versieglerlack an. Dieser soll dem Provisorium eine glatte und glänzende Oberfläche geben, so dass ein zusätzliches Polieren nicht mehr notwendig ist.

In einer vorhergehenden Studie unserer Arbeitsgruppe Bonn wurden unterschiedliche Provisorien-Kunststoffe und die dazugehörigen „liquid polisher“ werkstoffkundlich untersucht. Dabei erlangte das Luxatemp-System die besten Werte in Oberflächenrauigkeit und -beschaffenheit (Weiß, 2008).

Im Jahr 2008 veröffentlichte *Mues et al.* eine *in vivo* Studie über die Testung mikrobieller Besiedlung von provisorischen Kronen und Brücken. Es wurden Provisorien aus dem Bis-Acryl-Kunststoff Luxatemp[®] hergestellt, herkömmlich mit Gummipolieren und Polierpasten finiert oder mit dem oberflächenvergütenden Lack, Luxatemp[®] Glaze & Bond, versiegelt. Die Tragedauer betrug 10 Tage, danach wurde mit Hilfe eines Rasterelektromikroskops quantitativ die Plaqueakkumulation ausgewertet. Ergebnis dieser Studie war, dass lackierte Provisorien, im Vergleich zu den herkömmlich polierten Provisorien, eine verminderte Plaquebesiedlung aufweisen (Mues et al., 2008). Im Hinblick der oben genannten Ergebnisse bedarf es einer weitergehenden Untersuchung des Lacks auf zellulärer Ebene. Diese Arbeit untersucht, *in vitro*, den Einfluss des Lacks auf humane parodontale Ligamentzellen. Als Vergleichsproben wurden zusätzlich ein Bis-Acryl-Kunststoff und ein Kunststoff auf Methylmethacrylat-Basis getestet.

Ziel dieser Studie soll es sein, konkrete Aussagen über die Zytotoxizität der Materialien, insbesondere des Lacks, und ihren Einfluss auf die Homöostase der parodontalen Ligamentzellen zu treffen. Untersucht wird die Ausschüttung inflammatorisch wirkender Zytokine und einer Kollagenase aus der Familie der Matrix Metalloproteinasen. Zytokine wie auch Matrix Metalloproteinasen spielen im Rahmen parodontaler Destruktion eine entscheidende Rolle.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gefrierschränke	(-20°C; Fa. Liebherr Premium GmbH, Ochsenhausen, D)
iCycler Thermal Cycler	(-80°C; Fa. Thermo Fisher Scientific GmbH, Bonn, D)
Kühlschrank	(Fa. BioRad, München, D)
Pinzette	(4°C; Fa. Liebherr Premium GmbH, Ochsenhausen, D)
Pipetten	(Fa. Hammacher, Solingen, D)
Spektrophotometer	(Fa. Eppendorf, Hamburg, D)
Zentrifugen	(Nanodrop ND-1000; Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D)
	(Fa. Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn, D)
	(Fa. Eppendorf, Hamburg, D)
Brutschrank	(Fa. Qualitron Systems, Michigan, USA)
Ultraviolette Lampe	(Fa. Thermo, Dreieich, D)
	(Translux CL [®] ; Fa. Heraeus Kulzer, Hanau, D)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Einfrierröhrchen	(Cryogenic Vials; Fa. Nalgene Nunc International, Hereford, UK)
Handschuhe	(Fa. Ansell GmbH, München, D)
Kulturflaschen	(250 ml, 75 cm ² Wachstumsfläche; Fa. Greiner Bio-One GmbH Solingen, D)
Kulturschalen	(60 x 15 mm; 20,4 cm ² Wachstumsfläche; Fa. Greiner Bio-One GmbH Solingen, D)
Pasteurpipetten	(230 mm lang; Fa. Brand, Wertheim, D)
PCR-Reaktionsgefäße	(0,2 ml, domed lid; Fa. BioRad, München, D)
Pipettenspitzen	(Fa. Starlab GmbH, Ahrensburg, D)
Reaktionsgefäße	(Falcon 50 ml; Fa. Greiner, Nütringen, D)
	(1,5 ml; Fa. Eppendorf, Hamburg, D)
Skalpelle	(Fa. Aesculap AG, Tuttlingen, D)
Sterilfilter	(Porengröße 0,2 µl; Fa. Santorius Stedim, Aubagne, F)
Well-Platten	(6-Well-Platten, 96-Well-Platten; Fa. Greiner Bio-One GmbH, Solingen, D)
Zellschaber	(Fa. Labomedic GmbH, Bonn, D)

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Medien

Antibiotika/ Antimykotikalösung	(Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D)
Aqua dest.	(Fa. Braun, Melsungen AG, D)
cDNA-Synthese Kit	(iScript™ cDNA Synthesis Kit; Fa. BioRad, München, D)
CO ₂	(Fa. Linde; Höllriegelskreuth, D)
Fetales Kälberserum	(engl. Fetal calf serum, FCS; Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D)
Kunststoffe	(Trim®; Fa. Harry J. Bosworth® Company, Skokie, IL, USA) (Luxatemp®; Fa. Dental Milestones Guaranteed, DMG, Hamburg, D)
Lack	(Luxatemp® Glaze & Bond; Fa. Dental Milestones Guaranteed, DMG, Hamburg, D)
Nährmedium	(Dulbecco´s Modified Eagle Medium, DMEM; Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D)
PCR-Kit	(IQ™ SYBR® Green Supermix; Fa. Biorad, München, D)
Primer	(Selbst erzeugt bei Fa. Metabion; siehe Tbl.4)
RNA Extraktionskit	(Rneasy® Mini Kit; Fa. Qiagen, Hilden, D)
Trypsin	(Rneasy® Mini Kit; Fa. Qiagen, Hilden, D)
Trypsininhibitor	(Fa. Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, D)
Zelltoxikologisches Kit	(PromoKine Colorimetric Cell Viability Kit III; Fa. Promo Cell; Heidelberg, D)
ELISA-Kit	(ELISA-Kits für humane IL-1β, IL-8 und MMP-1 von RayBiotech; Fa. Hoelzel Diagnostika GmbH; Köln, D)

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung der Zellproben

Die parodontal Ligamentzellen wurden von Prämolaren sechs gesunder Spender zwischen 12 und 14 Jahren entnommen. Es lagen keine klinischen Zeichen von parodontalen Schäden vor. Die Zähne wurden aus kieferorthopädischen Gründen extrahiert. Mit dem Einverständnis der Eltern und unter Anleitung eines anerkannten Protokolls der Ethikkommission der Universität Bonn (Referenznummer 091/13) sind die Zellen entnommen worden.

Um eine Kontamination des parodontalen Gewebes mit epithelialen Fibroblasten und Pulpazellen zu vermeiden, sind die Zellen aus dem mittleren Drittel der Zahnwurzel mit einem Skalpell entfernt worden (Abb. 2).



Abb. 2 Zellgewinnung der parodontalen Ligamentzellen mit einem Skalpell aus dem mittleren Drittel der Zahnwurzel.

2.2.2 Kultivierung der parodontal Ligamentzellen

Das Explantat wurde in eine Zellkulturschale gegeben und mit DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), 10 % fetalen Kälberserum (FCS) und 1 % Antibiotika-Lösung bei 37° C, in einer Atmosphäre von 100 % Feuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert.

Nach ca. drei Wochen waren die Zellen (Abb. 3) aus dem Explantat ausgewachsen. Nachdem sie eine Konfluenz von 90 % gezeigt hatten, wurden die Zellen passagiert. Das Medium ist jeden zweiten Tag gewechselt worden.

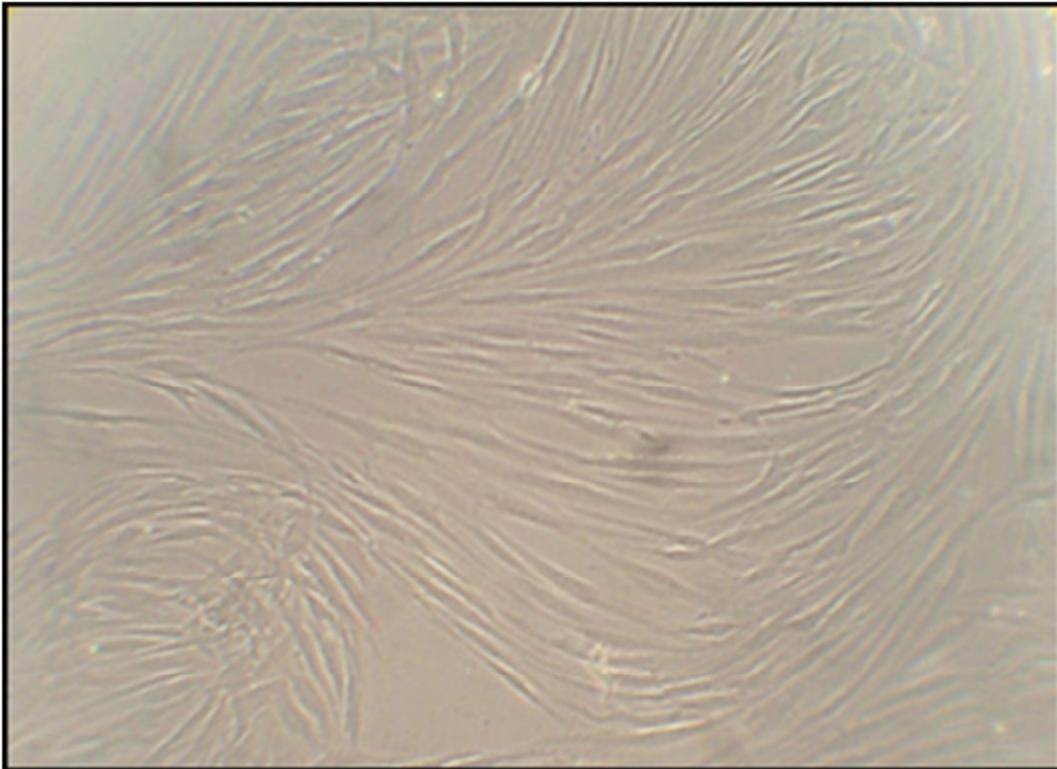


Abb. 3 Durchlichtmikroskopbild der gewonnenen Zellen. Sie zeigen eine längliche, spindelförmige Zellmorphologie.

2.2.3 Produktion der Kunststoffproben

Als Material sind die Kronen- und Brückenprovisorien-Kunststoffe Luxatemp[®] (Bis-Acryl Basis) und Trim[®] (Methylmethacrylat Basis) verwendet worden. Die Kunststoffproben wurden nach den Herstellerangaben angefertigt.

Zum Erreichen einer gleichen Oberflächengröße und Oberflächenstruktur der Proben wurden Formvorlagen genutzt. Durch diese Herstellungstechnik entstand eine klinisch akzeptable Oberflächenbeschaffenheit der Provisorienkunststoffe. Eine glättende und polierende Bearbeitung wurde nicht angeschlossen, um die Resultate durch Reste von Polierpasten und Gummipolierern nicht zu beeinflussen (Abb. 4).

Für das Bis-Acryl-Material, Luxatemp[®] stellt der Hersteller einen kompatiblen Lack, Luxatemp[®] Glaze & Bond, für eine anschließende Oberflächenversiegelung zur Verfügung. Dieser wurde in einer zusätzlichen Gruppe getestet. Der Lack wurde, der Herstellerangabe folgend, nach Applika-

tion auf den Luxatempprobe mit einer ultravioletten Lampe, der Wellenlänge 450 nm und einer Lichtintensität $> 1000 \text{ mW/cm}^2$, für 20 Sekunden pro cm^2 ausgehärtet.

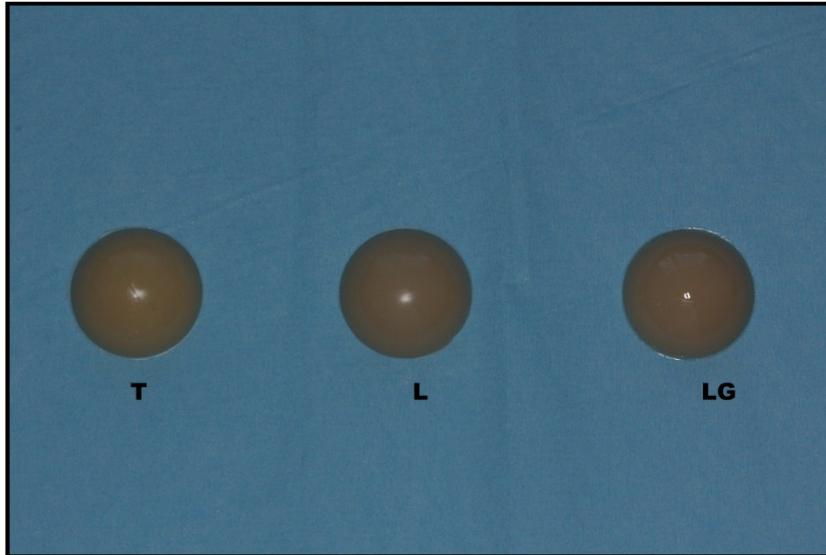


Abb. 4 Verwendete Kunststoffproben. Von rechts nach links: Trim[®] (T), Luxatemp[®] (L), Luxatemp[®] mit Luxatemp[®] Glaze & Bond (LG).

2.2.4 Konditionierung der Medien

Für die Produktion des konditionierten Test-Mediums wurden je 6 Probenkörper pro Gruppe, auf eine 6-Well-Platte gesetzt. Jede Platte wurde mit 3 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 1 % antibiotischer/antimykotischer Lösung, jedoch ohne fetalem Kälberserum gefüllt, so dass die Kunststoffproben von Medium bedeckt waren. Als Kontrollmedium wurde eine 6 Loch-Platte mit Medium, ohne Probe bestückt. Als zusätzliche Kontrolle für den Lack wurde dieser ungehärtet in einer Konzentration von 1 μl pro ml Zellkulturmedium auf seinen Effekt getestet.

Somit resultierten fünf zu untersuchende Gruppen: C – Kontrolle; T – Trim[®]; L – Luxatemp[®]; LG – Luxatemp[®] mit gehärtetem Luxatemp[®] Glaze & Bond; UG – ungehärtet Luxatemp[®] Glaze & Bond. Die Zellkulturplatten mit den so vorbereiteten Proben bzw. der Kontrolle wurden unter standardisierten Bedingungen im Inkubator bei 37° C und 100 % Luftfeuchtigkeit für sieben Tage gehalten. Ein zweimal tägliches Hin- und Herbewegen der Kulturschalen gewährleistete eine gleichmäßige Durchmischung der Proben.

Nach sieben Tagen wurden die Medien einer Gruppe zusammengefügt und direkt zur Stimulation genutzt. Die Zeitspanne von sieben Tagen wurde gewählt, da sie etwa der Tragedauer eines Provisoriums bei den Patienten entspricht.

2.2.5 Stimulation mit konditioniertem Medium

PDL-Zellen der vierten Passage wurden für die Stimulation genutzt. Für die Genexpression- und Proteinanalyse sind die Zellen in einer Konzentration von 100.000 Zellen/Well in einer 6-Well-Platte ausgesät worden. Nach Erreichen von ca. 90 % Konfluenz sind die Zellen 16 h vor der Stimulation unter serumfreie Bedingungen gesetzt worden. Stimuliert wurden die Zellen für 4 h und 24 h mit den konditionierten Testmedien.

2.2.6 RNA Extraktion

Für die quantitative Genexpressionsanalyse der stimulierten parodontalen Ligamentzellen wurde die Isolierung der Gesamt-RNA mit dem Rneasy Mini Kit (Quiagen, Hilden, D) durchgeführt. Die Extraktion folgte nach dem Herstellerprotokoll für humane Zellkulturen. Nach der Stimulation wurde das Medium komplett abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 350 µl des RLT-Puffers, bestehend aus 1% β-Mercaptoethanol und Guanidin-Isothiocyant, zu den Zellen gegeben. Dieser Lysispuffer führt auf Grund seines hohen Salzgehaltes zu einer Ruptur der Zellmembran. Durch das enthaltene Guanidin-Isothiocyant können die bei der Zelllyse freigesetzten RNAsen inhibiert werden, um eine Zerstörung der RNA zu verhindern. Danach wurde das Zell-Lysis-Puffergemisch mit einem sterilen Zellschaber weiter homogenisiert, in ein nukleasefreies Eppendorf-Gefäß überführt und bei -80°C gelagert.

Zur Weiterverarbeitung wurde das Zelllysats auf Eis aufgetaut und mit 350 µl 70 % Ethanol versetzt. Nach Auf- und Abpipettieren, zum Vermischen der Lösung, wurden die Proben auf jeweils eine RNeasy mini spin Säule gegeben und 15 sec bei 8000 g zentrifugiert. Das Ethanol vermag, dass die RNA an der Kieselerde-Membran in der Säule bindet. Das aufgefangene, nicht gebundene Material am Boden des Gefäßes wurde verworfen. Um eine Verunreinigung der an der Membran gebundenen RNA zu vermeiden, folgten drei Waschgänge, einmal mit 700 µl RW1-Puffer und Zentrifugation 15 sec bei 8000 g und zweimal hintereinander mit 500 µl RPE-Puffer, das erste Mal 15 sec bei 8000 g, das zweite Mal 2 min bei 8000 g. Nach dem dritten Waschgang

wurde das Filtrat mitsamt dem Auffanggefäß verworfen und die Säule mit der gebundenen RNA in ein neues, steriles und RNase-freies Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Im letzten Schritt ist die an der Säule gebundene RNA mit insgesamt 60 µl RNase-freiem Wasser eluiert worden. Hierbei erfolgte die Eluation in zwei Schritten mit je 30 µl Wasser für 1 min bei 8000 g in der Zentrifuge. Die Konzentration der so gewonnenen RNA ist photospektrometrisch mit dem Nano Drop[®] ND-1000 bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt worden. Anschließend erfolgte die Aufbewahrung der RNA bei -80°C.

2.2.7 cDNA Synthese

Die Erststrangsynthese wurde mit Hilfe des “iScript™ cDNA Synthesis Kit” (Bio-Rad, München, D) durchgeführt. Für die Umschreibung in cDNA konnte insgesamt je Ansatz 1 µg RNA verwendet werden. Für den Reaktionsansatz ergab sich (20 µl):

- 4 µl 5x iScript Selection Mix
- 1 µl iScript Reverse Transcriptase
- X µl RNA Template (1 µg)
- Y µl Nuklease-freies Wasser

= 20 µl Gesamtvolumen

Im MyCycler Thermal Cycler erfolgte die Reverse Transkription; folgender Ablauf wurde eingehalten:

- 5 min 25°C
- 30 min 42°C
- 5 min 85°C
- 4° C bis zur weiteren Verarbeitung

Anschließend wurde die cDNA-Probe bei -20°C aufbewahrt.

2.2.8 Quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion

Die quantitative Amplifizierung der cDNA für IL-1β, IL-8, IL-10 und MMP-1 erfolgte mit Hilfe der Real-Time PCR. Auf Grund der Anzahl der Proben für den PCR-Lauf (+ zusätzlicher Pufferung) wurde ein Mastermix aus Nuklease-freiem Wasser, den Forward- und Reverse-Primern und

dem iQTM SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad, München, D) nach Herstellerangaben eingesetzt. Für jede einzelne Reaktion, wurde 1 µl der jeweiligen cDNA und 24 µl des Mastermix angesetzt. Der Biorad Supermix enthält den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green. Dieser bindet an der doppelsträngigen DNA und emittiert Licht bei einer Wellenlänge von 490 nm und detektiert somit die entstandenen PCR-Produkte. Eine dauerhafte Fluoreszenzmessung der PCR-Produkte erfolgt über die gesamte Zyklusperiode. Außerdem enthält der Mix die Taq DNA Polymerase, dNTPs und einen für optimale Reaktionsbedingungen schaffenden Puffer.

Folgende Zusammensetzung pro Reaktionsansatz ergab sich:

- 12,5 µl iQTM SYBR[®] Green Supermix
- 0,125 µl Primer-Mischung (Forward + Reverse. 250 nM pro Primer)
- 1 µl cDNA
- 11,375 µl Nuklease-freies H₂O

Die für die PCR benötigten Primer wurden in der Arbeitsgruppe PD Dr. Winter und Dr. Kraus designt und die optimalen Laufbedingungen mittels Temperaturgradienten, die Spezifität durch BLAST-Analyse und die Größenbestimmung der PCR-Produkte durch Aggarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung verifiziert. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der Effizienz der verwendeten Primer durch die Erstellung von Steigungsgraden mit Hilfe von Verdünnungsreihen klonierter PCR-Produkte. Die Effizienz kann über die Steigung errechnet werden ($E = 10^{(-1/\text{Steigung der Standardkurve})}$). Idealerweise liegt diese bei 100 % ($E=2$), dann wird das PCR-Produkt in jedem Zyklus verdoppelt. Die Primersequenzen, optimale Annealingtemperatur und Effizienz sind in Tabelle 4 angegeben. Die cDNA-Amplifikation erfolgte im iCycler iQ detection system (Bio-Rad, München, D). Als Negativkontrolle ist anstelle von cDNA Wasser zum Mastermix zugefügt worden. Folgendes PCR-Protokoll wurde verwendet:

- 5 min Denaturierung bei 95°C
- 50 Zyklen: 15 sec bei 95°C Denaturierung
 - 30 sec bei der Primer spezifischen Annealingtemperatur
 - 30 sec bei 72°C Elongation

Nach Beendigung der Real-Time PCR wurde ein Dissoziationsprogramm gestartet, welches durch Erhitzung der PCR-Produkte deren Schmelzpunkt ermittelte. Jedes Produkt besitzt einen

spezifischen Schmelzpunkt, abhängig von Länge und Sequenz. Über dieses lässt sich leicht eine Verunreinigung der Proben beweisen.

Tab. 4 Primersequenz, Effizienz und Annealingtemperatur der Gene, Interleukin-1beta (IL-1 β), Interleukin-8 (IL-8), Interleukin-10 (IL-10) und Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1)

Gen		Primersequenz	Effizienz	Annealingtemperatur
IL-1 β	Vorwärts	5'-ATGGCAGAAGTACCTGAGCTCGC-3'	1.83	68°C
	Rückwärts	5'-TTAGGAAGACACAAATTGCATGGTG-3'		
IL-8	Vorwärts	5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGG-3'	2.02	68°C
	Rückwärts	5'-TGAATTCTCAGCCCTCTTCAAAAAC-3'		
IL-10	Vorwärts	5'-TTAAGGGTTACCTGGGTTGC-3'	1.94	65°C
	Rückwärts	5'-GCCTTGCTCTTGTTTTTCCACA-3'		
MMP-1	Vorwärts	5'-ATGCACAGCTTTCCTCCACTGC-3'	2.05	69°C
	Rückwärts	5'-CACTGGGCCACTATTTCTCCGC-3'		

2.2.9 Auswertung der PCR

Die Proben sind alle mit Hilfe der unstimulierten Kontrolle und des Referenzgens β -Aktin ausgewertet worden. β -Aktin ist eine mRNA, die in allen Zellen in einem fast gleichen Verhältnis konstant gebildet wird. Um eine einheitliche Aussage zur Genexpression treffen zu können, wurde die Auswertung der quantitativen Real-Time-PCR unter Zuhilfenahme der Genexpression von β -Aktin normalisiert (Bustin, 2002 und 2000; Ke et al., 2000; Thellin et al., 1999; Vandesompele et al., 2002).

Die Berechnung der relativen Genexpression von IL-1 β , IL-8, IL-10 und MMP-1 erfolgte nach der Methode von Pfaffel (2001). Zuerst wurde der Unterschied der Cq-Werte vom Referenzgen

und dem jeweiligen Gen von Interesse bestimmt ($\Delta Cq = Cq_{\text{Referenzgen}} - Cq_{\text{zu untersuchendes Gen}}$). Der Cq-Wert steht für den PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz des PCR-Produktes die Hintergrundfluoreszenz (Threshold) überschreitet. Die relative mRNA-Expression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle errechnet sich nach folgender Formel:

$$2^{-(\Delta Cq_{\text{Kontrolle}} - \Delta Cq_{\text{Stimulation}})} = 2^{-\Delta\Delta Cq}$$

2.2.10 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Der ELISA ist ein System, das die notwendige Spezifität und Empfindlichkeit aufweist, um eine Konzentrationsbestimmung für Proteine, Hormone, Antikörper, Viren in Körperflüssigkeiten oder Zellkulturen durchzuführen. Grundlage dieser Methode ist die Kombination von einer Antigen-Antikörper-Reaktion mit einer spezifischen Enzymreaktion.

In der Praxis wird an dem Boden einer 96-Well Mikrotiter-Platte ein Antikörper gebunden, der gegen das Epitop des zu untersuchenden Proteins gerichtet ist. Anschließend erfolgt die Zugabe der Probe. Wenn sich das gesuchte Protein in der Probe befindet, kann sich ein Antigen-Antikörper-Komplex bilden. Nach anschließendem Waschen der Platten, um nicht gebundene Bestandteile zu entfernen, wird ein zweiter Antikörper, ebenfalls gegen das Protein gerichtet, hinzugefügt. An diesem zweiten, sogenannten Detektionsantikörper, ist zusätzlich ein Enzym (in den meisten Fällen Meerrettichperoxidase (HRP)) gekoppelt. Nach Zufügen einer Substratlösung kann über die Bildung eines Farbstoffes und anschließender Absorptionsmessung im Mikrotiter-Platten-Lesegerät eine Quantifizierung des gesuchten Proteins durchgeführt werden. Hierfür ist zusätzlich die Erstellung einer Standardkurve von Nöten. Dieses wird durch Ansetzen einer Standardreihe möglich, bei der verschiedene bekannte Konzentrationen des zu untersuchenden Proteins eingesetzt und im weiteren Verlauf genauso wie die Untersuchungsproben behandelt werden. Um die Sekretionsrate von IL-1 β , IL-8 und MMP-1 zu bestimmen, wurden ELISAKits für die Detektion humaner Proteine von RayBiotech, Inc. (Hoelzel Diagnostika GmbH, Köln, D) genutzt und nach den Vorgaben des Herstellers verwendet.

Für den ELISA-Test wurden die Zellkultur-Überstände nach 24 h nach Stimulation mit den konditionierten Medien herangezogen. Nach Messung der optischen Dichte bei 450 nm Wellenlänge sowie einer Korrektur bei 570 nm konnten die im Überstand enthaltenen Proteinkonzentrationen, unter Berücksichtigung von Standardkurven, errechnet werden.

2.2.11 Zytotoxikologische Prüfung – *in vitro*

Die zytotoxikologische Prüfung wurde mit dem “Colorimetric Cell Viability Kit III” (Promo Cell, Heidelberg, D) durchgeführt. Es gibt mehrere Wege, die Lebensfähigkeit und Proliferationsfähigkeit von Zellen zu prüfen. Hier wurde das Tetrazolium Salz XTT eingesetzt. Dieses farbmimetrische Verfahren basiert darauf, dass lebendige Zellen Tetrazolium-Salze zu orangefarbenen Formazan-Verbindungen reduzieren können. Dieser Mechanismus beruht auf der Aktivität von Mitochondrienenzyme. 1950 wurde diese Methode zum ersten Mal mit MTT beschrieben, Scudiero optimierte 1988 die Methode, welche jetzt als XTT-Test bekannt ist (Scudiero, 1988). Der Vorteil des XTT-Tests besteht darin, dass der gebildete Farbstoff sofort löslich ist und seine Intensität direkt mit einem Photospektrometer gelesen werden kann. Die Intensität der Farbe ist proportional zu der Zahl der metabolisch aktiven Zellen. Je höher die Zahl an aktiven Zellen ist, desto größer ist die mitochondriale Enzymaktivität und umso höher ist die Konzentration des Farbstoffs. PDL-Zellen (10.000 pro Well) sind in 96-Well-Platten (Greiner Bio-One, Solingen, D) ausgesät worden. Am nächsten Tag erfolgte die Stimulation mit 100 µl Testmedium pro Well (je Gruppe N=12) für 4 h, 24 h, 3 d und 7 d. Zur Vermeidung von Verdunstungseffekten wurden nur die inneren Wells der Zellkultur-Platten verwendet, hingegen die äußeren Wells mit sterilem PBS gefüllt. Nach den angegebenen Zeitintervallen wurde 50 µl des angesetzten XTT-Reagenz pro Well für 3 h zu den Testmedien gegeben. Es erfolgte eine Absorptionmessung im Microplate Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Korrekturwellenlänge von 650 nm. Die Zellvitalität wurde kalkuliert, indem die optische Dichte der Kontrollgruppe auf 100 % gesetzt wurde.

2.2.12 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der erzielten Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Alle Balkendiagramme stellen den mittleren Standardfehler (\pm SEM) dar. Die Bestimmung eines signifikanten Unterschieds der Gruppen zur Kontrolle (* $p < 0,05$) und der Gruppen untereinander (# $p < 0,05$) wurde mittels einfaktorieller Varianz Analyse (One-Way ANOVA) und dem Tukey Post Test durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Real-Time-Polymerasekettenreaktion

Bei der Real-Time-Polymerasekettenreaktion wurden die mit den Kunststoffen stimulierten parodontalen Ligamentzellen auf ihre mRNA Expression von IL-1 β , IL-8, IL-10 und MMP-1 nach 4- und 24stündiger Stimulation untersucht.

Die Real-Time-Polymerasekettenreaktion liefert eine quantitative Aussage.

3.1.1 IL-1 β

Die IL-1 β Expression ist zu beiden Messzeitpunkten bei allen vier getesteten Kunststoffprodukten, zwischen dem 3- bis 500-fachen, signifikant zur Kontrolle erhöht.

Bei Betrachtung der unterschiedlichen Stimulationsgruppen fällt auf, dass die Expressionsrate der Gruppe UG während beider Testpunkte die höchsten Werte einnimmt und signifikant gegenüber den Gruppen T, L und LG ist. Hierbei zeigt UG zur Kontrolle zum Teil eine 500-fache höhere Expressionsrate von IL-1 β .

Des Weiteren kommt es bei der Gruppe T an beiden Zeitpunkten zu einer leichten, allerdings nicht signifikanten Erhöhung gegenüber der L-Gruppe.

Für den Vergleich von L und LG ergibt sich nach 4 h kein Unterschied in der IL-1 β -Expression. Hingegen erfolgt nach 24 h bei der Gruppe LG eine deutliche Zunahme um das 3-fache der mRNA-Expression gegenüber L. Jedoch ergab sich auch hier keine Signifikanz in der verwendeten ANOVA-Testung (siehe Abbildung 5).

mRNA IL-1 β

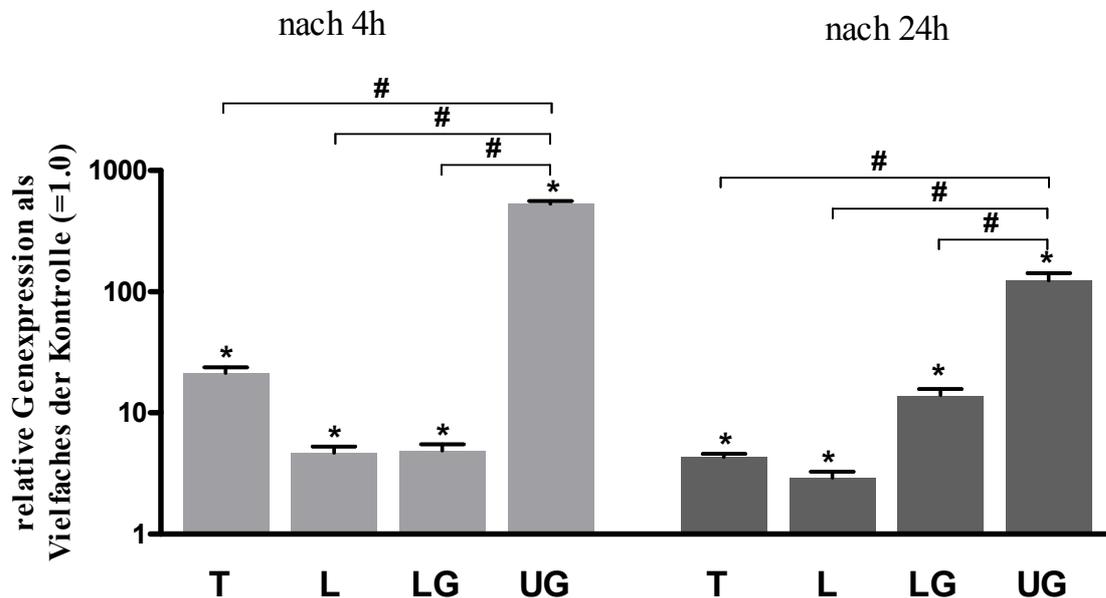


Abb. 5 Relative Genexpression der messenger Ribonukleinsäure (mRNA) von Interleukin-1beta (IL-1 β) nach 4 und 24 Stunden
 # = Signifikanz der Testgruppen untereinander
 * = Signifikanz der Testgruppen zur Kontrolle

3.1.2 IL-8

Bei allen Kunststoffen kommt es zu einer signifikanten Erhöhung der Genexpression von IL-8 gegenüber der Kontrolle (Abb. 6). Wie auch bei der Expressionsauswertung von IL-1 β weist die Gruppe UG zu allen Messpunkten ein signifikant höheres Expressionsniveau gegenüber den anderen drei Testgruppen auf. Innerhalb von 20 h kommt es zu einer 5-fachen Steigerung des Ausgangswerts.

Das mRNA-Level der Gruppe LG verändert sich im Vergleich der vier Kunststoffproben innerhalb der ersten 24 h am radikalsten. Es kommt während der Stimulationszeit von 24 h zu einer 18-fachen Steigerung des anfänglichen Werts. Vergleichend mit den Gruppen T und L nach 24 h, ist das Expressionsmaß von LG signifikant höher. Das Expressionsniveau von T und L weist, nach anfänglicher signifikanter Erhöhung von L gegen T, am zweiten Messpunkt fast den gleichen Wert auf. Die T-Gruppe legt um das 2-fache zu, L verringert sich.

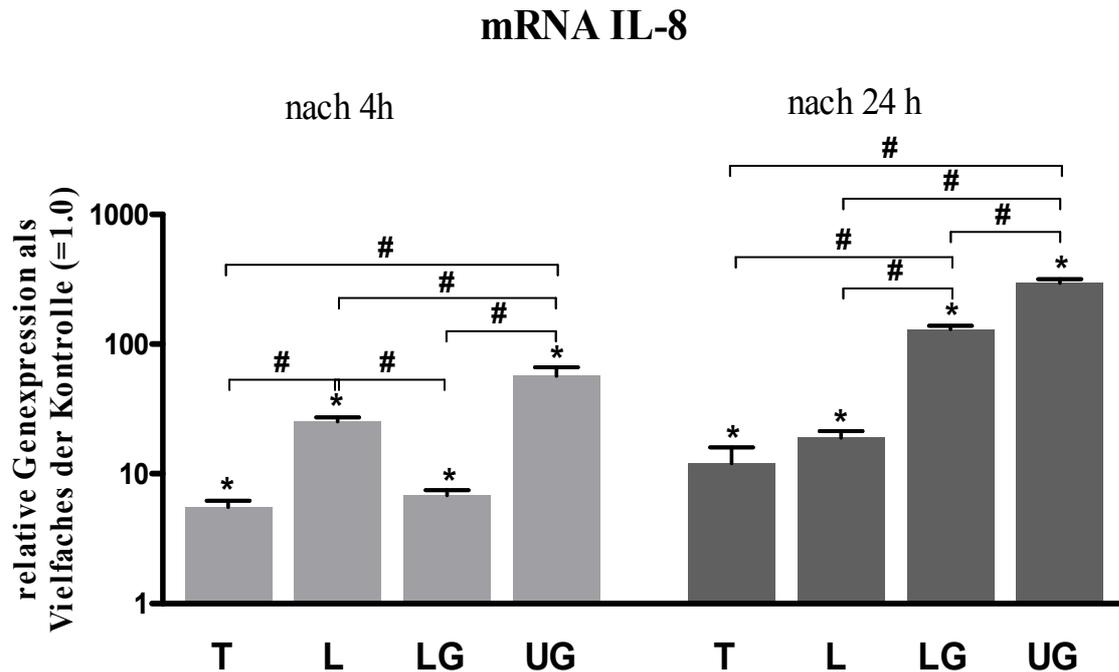


Abb. 6 Relative Genexpression der messenger Ribonukleinsäure (mRNA) von Interleukin-8 (IL-8) nach 4 und 24 Stunden
 # = Signifikanz der Testgruppen untereinander
 * = Signifikanz der Testgruppen zur Kontrolle

3.1.3 IL-10

Alle Testproben zeigen gegenüber der Kontrolle eine signifikante erhöhte Bildung von IL-10.

Im Vergleich mit den anderen beiden untersuchten Interleukinen IL-1 β und IL-8, zeigt IL-10 in die geringsten Veränderungen der Expressionsraten (Abb. 7).

Auch die Werte der Kunststoffgruppen untereinander liegen relativ dicht beieinander. Wobei UG, wie auch in den schon vorgestellten Ergebnissen von IL-1 β und IL-8 die höchste mRNA-Expression aufweist und signifikant gegenüber den anderen drei Kunststoffproben ist.

Unter T, L und LG besteht zu keinem Zeitpunkt eine Signifikanz. Trim[®] erreicht nach 24 h das geringste gemessene Expressionsniveau (1,2-fache zur Kontrolle).

Die Gruppe LG erhöht ihre Expressionsstärke innerhalb von 20 h, dieses Verhalten lässt sich auch bei ihren Expressionsraten von IL-1 β und IL-8 beobachten.

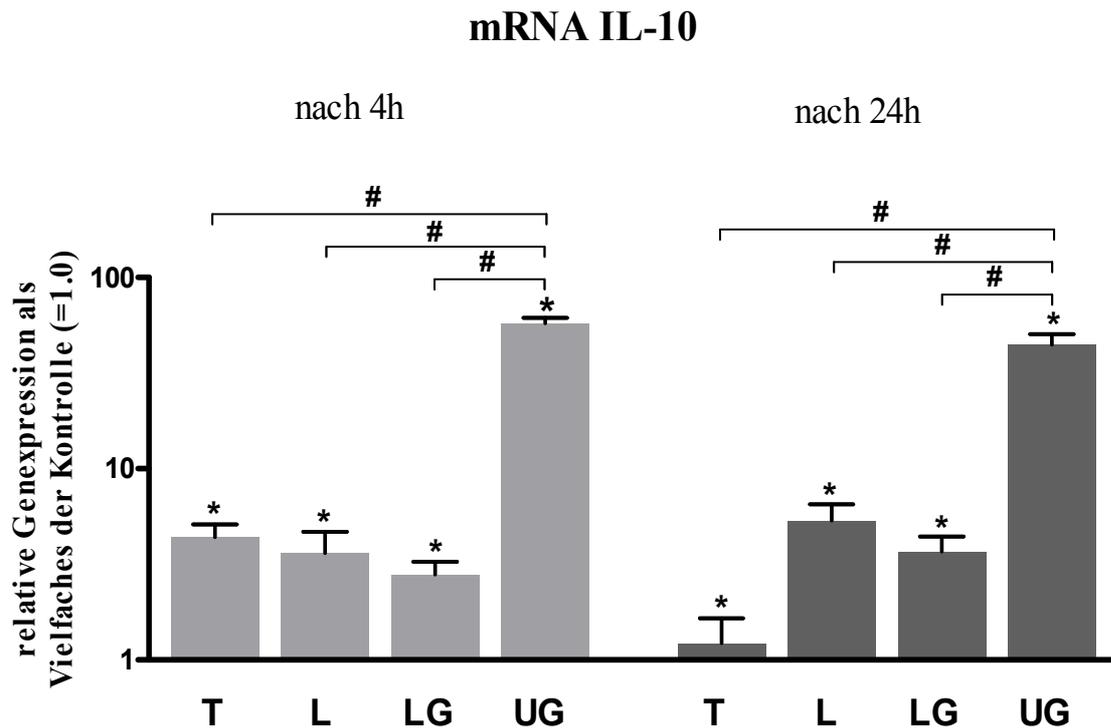


Abb. 7 Relative Genexpression der messenger Ribonukleinsäure (mRNA) von Interleukin-10 (IL-10) nach 4 und 24 Stunden
 # = Signifikanz der Testgruppen untereinander
 * = Signifikanz der Testgruppen zur Kontrolle

3.1.4 MMP-1

Vergleichend mit den PCR-Ergebnissen der Interleukine ist das Expressionveränderungen von MMP-1 deutlich geringer. Keine Kunststoffprobe erreicht eine Expressionsrate, die über das 10-fache der Kontrolle geht.

Die Gruppe UG erreicht zu beiden Zeitpunkten eine signifikant erhöhte MMP-1 Expression gegenüber der Kontrolle und den Gruppen L und T.

Abbildung 8 stellt dar, dass die Gruppe LG erst nach 24 h ihre Expression hochreguliert und sich somit signifikant zur Kontrolle unterscheidet. Nach einem anfänglichen Wert von 0,8 kommt es zu einer Steigerung auf das 6-fache. Gegenüber UG besteht keine Signifikanz mehr, dafür ist die mRNA-Expression gegenüber L und T signifikant höher.

Die Gruppen T und L hingegen zeigen keine Veränderungen gegenüber der Kontrolle.

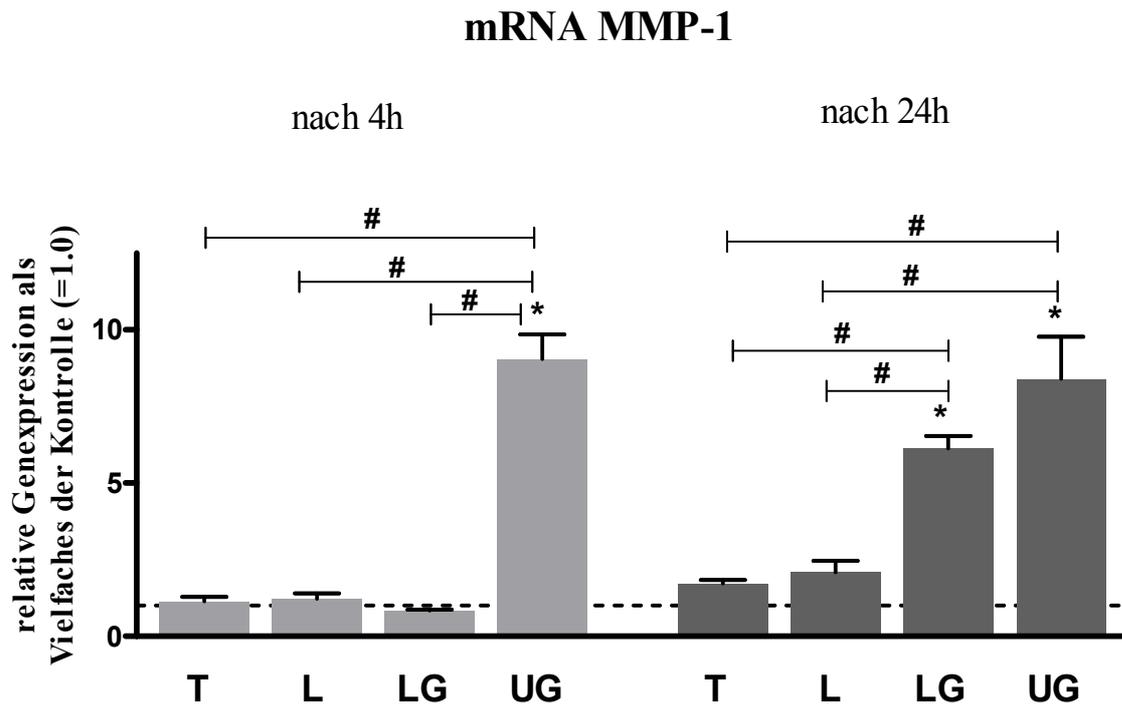


Abb. 8 Relative Genexpression der messenger Ribonukleinsäure (mRNA) von der Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) nach 4 und 24 Stunden
 -----= 1, Kontrolllinie,
 # = Signifikanz der Testgruppen untereinander
 * = Signifikanz der Testgruppen zur Kontrolle

3.2 ELISA-Test

Der ELISA-Test lässt eine quantitative Aussage über die Ausschüttung bzw. die Produktion der Zytokine IL-1 β und IL-8 sowie der Matrix Metalloproteinase MMP-1 nach 24 h zu.

3.2.1 ELISA-Test für IL-1 β nach 24 h

Die Sekretion von IL-1 β der unstimulierten parodontalen Ligamentzellen liegt bei ca. 10 pg/ml. Im Vergleich zur Kontrolle zeigen die mit den Kunststoffen stimulierten PDL-Zellen eine signifikant erhöhte Produktion von IL-1 β (Abb. 9).

Die Ergebnisse der IL-1 β Produktion unter Stimulation von Luxatemp[®] Glaze & Bond (UG = 201 pg/ml) zeigen gegenüber der Kontrolle eine 20-fache Erhöhung. Die Gruppe UG

weist auch im Vergleich mit den anderen Gruppen eine deutliche signifikante Erhöhung der IL-1 β Produktion auf.

Die mit Trim[®] stimulierten Zellen erreichen eine signifikante höhere IL-1 β Produktion gegenüber der Gruppe L und LG. Auch die IL-1 β Abgabe von LG ist signifikant zu L erhöht. Dabei liegen die Signifikanzen zwischen L, T und LG bei einem 1,2 bis 1,6-fachen Wert.

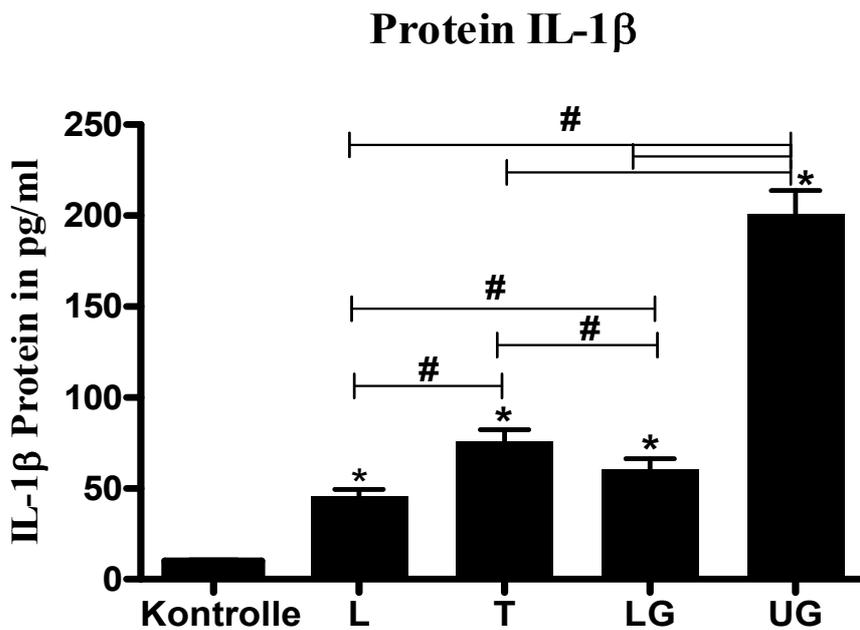


Abb. 9 Quantitative Interleukin-1 β (IL-1 β) Proteinproduktion nach 24 Stunden der Kontrollgruppe und der Kunststoffgruppen
 # = Signifikanz der Testgruppen untereinander
 * = Signifikanz der Testgruppen zur Kontrolle

3.2.2 ELISA-Test für IL-8 nach 24 h

Die Ausschüttung von IL-8 der Kontrollgruppe liegt bei 8,6 pg/ml. Die Expression von IL-8 der mit Kunststoff stimulierten Zellen ist signifikant erhöht.

Im Vergleich mit den Gruppen L und T ist der Auswurf von IL-8 bei der Gruppe LG signifikant erhöht. Bei der Gruppe UG kommt es auch bei der Betrachtung von IL-8 zu der höchsten Produktion. UG ist gegenüber der Kontrolle sowie auch gegenüber den anderen getesteten Kunststoffen signifikant erhöht, wobei Werte um 170 pg/ml festgestellt werden konnten (Abb. 10).

Protein IL-8

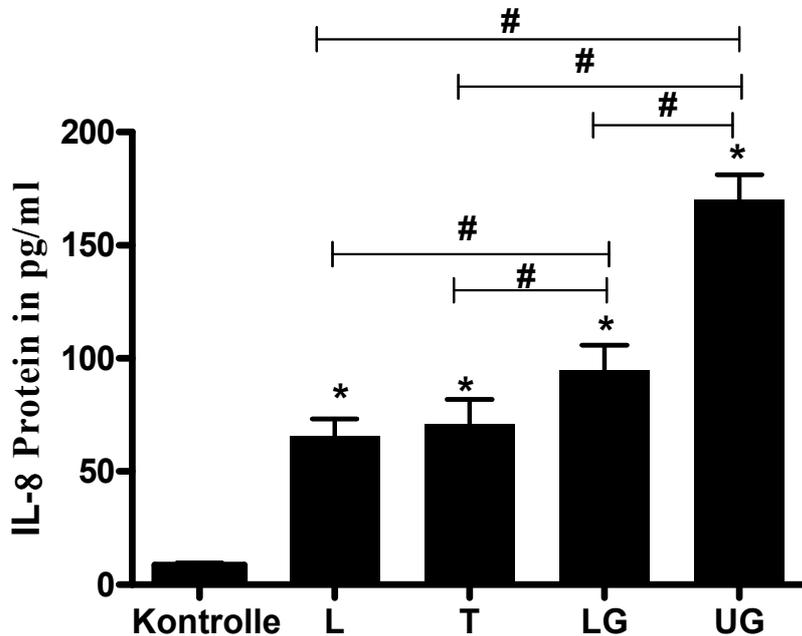


Abb. 10 Quantitative Interleukin-8 (IL-8) Proteinproduktion nach 24 Stunden der Kontrollgruppe und der Kunststoffgruppen
 # = Signifikanz der Testgruppen untereinander
 * = Signifikanz der Testgruppen zur Kontrolle

3.2.3 ELISA-Test für MMP-1 nach 24 h

Die Kontrolle erreichte eine Proteinproduktion von 1,6 ng/ml nach 24 h. Wie auch schon in den anderen ELISA-Testungen liegt der Proteinauswurf der mit Kunststoff stimulierten Zellen signifikant über dem der Kontrollgruppe.

Bei Betrachtung der Gruppen L, T und LG in Abbildung 11 zeigt sich eine signifikante Erhöhung der MMP-1 Sekretion bei T gegenüber L und LG. Wiederum zeigt UG die höchste Produktion von MMP-1 mit gemessenen Werten von ca. 19 pg/ml mit einer Signifikanz gegenüber der vergleichenden Gruppen T, L und LG.

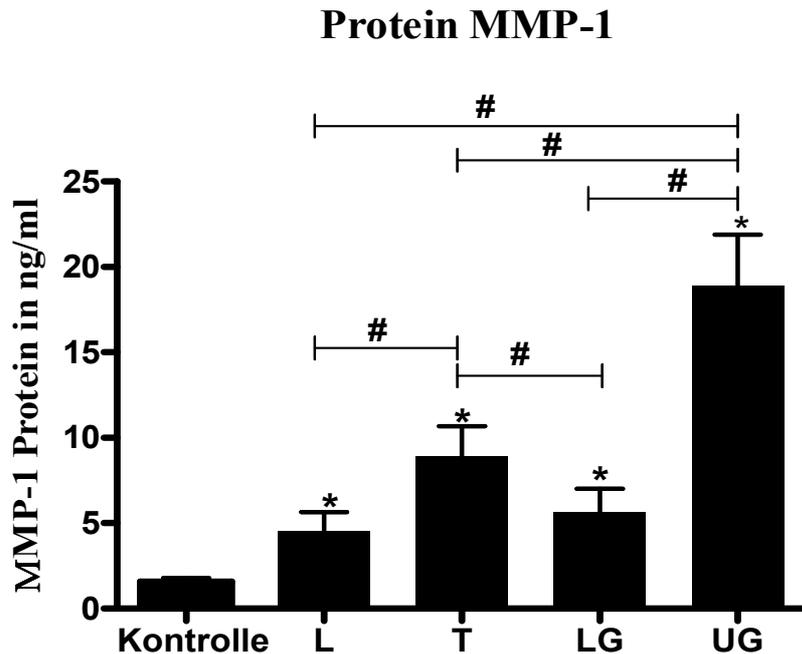


Abb. 11 Quantitative Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) Proteinproduktion nach 24 Stunden der Kontrollgruppe und der Kunststoffgruppen
 # = Signifikanz der Testgruppen untereinander
 * = Signifikanz der Testgruppen zur Kontrolle

3.3 Zytotoxikologische Prüfung

Die zytotoxikologische Prüfung fanden nach einer Inkubation von 4 h, 24 h, 3 d und 7 d mit Hilfe eines XTT-Tests statt.

3.3.1 Zellvitalität nach 4 h

Die Zellen zeigen nach einer Stimulation von 4 h zum Teil deutliche Veränderungen in ihrer Zellvitalität (Abb. 12).

Die PDL-Zellen der Gruppe UG zeigen nach 4 h eine Zellvitalität von ca. 10 %. Es kommt zu einer signifikanten Verminderung gegenüber der Kontrolle (Kontrolle = 100 %). Auch die Zellen der LG-Testgruppe zeigen eine signifikante Verminderung in ihrer Vitalität, es sind nur noch 70 % der Zellen vital. Im Gegensatz dazu stehen die Gruppen T und L. Beide Gruppen erreichen eine über die Kontrolle gehende Proliferationsrate von 115 % für T sowie 125 % für L, wobei die Werte von L signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht sind.

Im Vergleich der Proben miteinander zeigen beide Lackproben eine signifikant reduzierte Proliferationsrate gegenüber den anderen Proben.

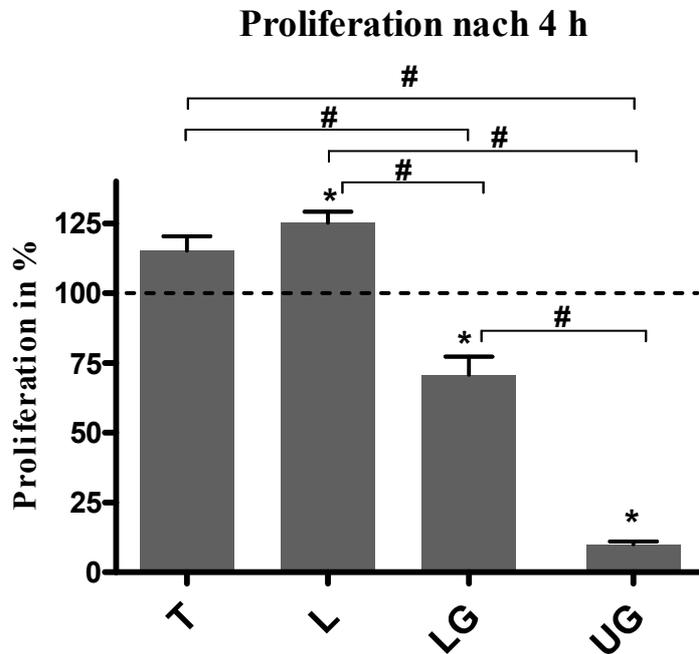


Abb. 12 Prozentuale Proliferation nach 4 Stunden Stimulation der parodontalen Ligamentzellen, bezogen auf die Kontrolle
 # = Signifikanz der Testgruppen untereinander
 * = Signifikanz der Testgruppen zur Kontrolle

3.3.2 Zellvitalität nach 24 h

Nach einer Inkubationszeit von 24 h fällt auf, dass bei den Gruppen T, LG und UG die Zellvitalität der PDL-Zellen stark negativ beeinflusst wird und gegenüber der Kontrolle signifikant erniedrigt ist. Die L-Gruppe hingegen zeigt, wie auch schon nach 4 h, eine erhöhte Proliferationsrate der Zellen, die jedoch nicht signifikant ist.

Wie in Abbildung 13 zu sehen, weist die Gruppe T die deutlichste Veränderung der Zellvitalität auf. Sie ist, verglichen mit dem Zellwachstum nach 4 h, um 80 % reduziert und mit 32 % Zellvitalität signifikant zur Kontrolle erniedrigt. Eine signifikante Erniedrigung besteht ebenfalls gegenüber den Proben L und LG, während UG wie auch schon nach 4 h die signifikant geringste Zellvitalität aufweist (7 %).

LG zeigt eine Reduzierung der Zellvitalität um 50 % gegenüber der Kontrolle und folgt somit der Tendenz aus der ersten Stimulationsphase. Verändert hat sich in Hinsicht auf die erste Messung

nach 4 h das Verhältnis zwischen LG und T. T weist ein 1,7-fach geringere Vitalität nach 24 h als LG auf, zum Messpunkt nach 4 h lag diese um das 11,5-fache höher.

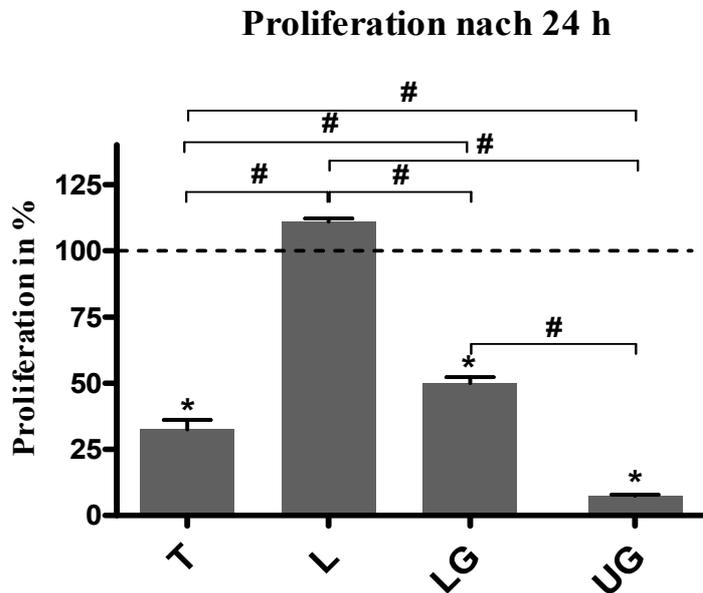


Abb. 13 Prozentuale Proliferation nach 24 Stunden Stimulation der parodontalen Ligamentzellen, bezogen auf die Kontrolle
 # = Signifikanz der Testgruppen untereinander
 * = Signifikanz der Testgruppen zur Kontrolle

3.3.3 Zellvitalität nach 3 d und 7 d

Die Ergebnisse nach Tag drei (Abb. 14) und Tag sieben (Abb. 15) differieren nicht wesentlich voneinander. Hinsichtlich der Werte nach 24 Stunden zeigen die Zellvitalitätsraten der Kunststoffproben nur geringe Veränderungen.

Die Gruppe L zeigt nunmehr keine Veränderung der Wachstumsrate gegenüber der Kontrolle, jedoch eine signifikante Erhöhung gegenüber allen anderen Kunststoffen. Bei der Gruppe UG lässt sich zu beiden Zeitpunkten fast keine Zellvitalität mehr nachweisen. Die Zellen der Gruppen T und LG zeigen eine signifikante Erniedrigung der Proliferationsraten gegenüber der Kontrolle sowie L und erreichen Werte von ca. 40 % Zellvitalität. Hierbei zeigen die Zellen der Gruppe LG etwas erhöhte, allerdings nicht signifikante Werte im Vergleich zu T.

Proliferation nach 3 d

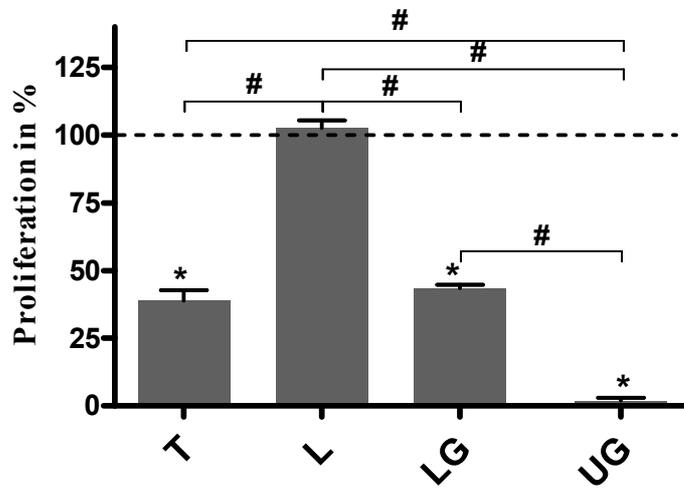


Abb. 14 Prozentuale Proliferation nach 3 Tagen Stimulation der parodontalen Ligamentzellen, bezogen auf die Kontrolle
 # = Signifikanz der Testgruppen untereinander
 * = Signifikanz der Testgruppen zur Kontrolle

Proliferation nach 7 d

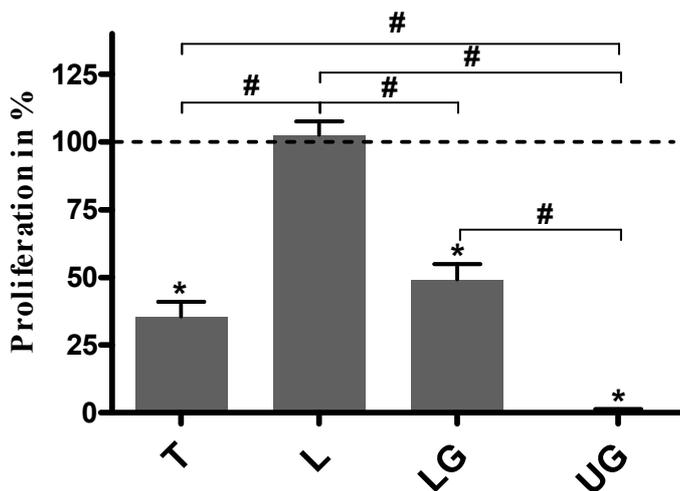


Abb. 15 Prozentuale Proliferation nach 7 Tagen Stimulation der parodontalen Ligamentzellen, bezogen auf die Kontrolle
 # = Signifikanz der Testgruppen untereinander
 * = Signifikanz der Testgruppen zur Kontrolle

4. Diskussion

4.1 Fragestellung

Für die Herstellung eines qualitativ guten Zahnersatzes sind bestimmte Parameter für den Zahnarzt unerlässlich. Neben kariesfreien Zähnen, steht auch die parodontale Gesundheit des Gebisses im Vordergrund. Das Provisorium trägt in diesem Zusammenhang eine nicht unwichtige Rolle; es hat therapeutische, diagnostische und funktionelle Aufgaben zu erfüllen (Burke et al., 2005; Burns et al., 2003; Davis und O'Connell, 2004; Geurtsen, 1994; Wirz et al., 1992 a). Für die Erhaltung eines gesunden Parodonts sind zum einen eine perfekte Randgestaltung und zum anderen eine geringe Oberflächenrauigkeit immens wichtig. Beides reduziert die Tendenz einer mikrobiellen Belagerung der Provisorien. Zusätzlich muss die Biokompatibilität der verwendeten Materialien auf die oralen Gewebe unauffällig sein.

Als Vorlagen für diese Arbeit dienen zwei, ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe der Universität Bonn veröffentlichte Studien. *Ute Weiß* (2008) befasste sich im Rahmen ihrer Dissertation mit Oberflächenrauigkeiten von gängigen Kronen- und Brückenprovisorienkunststoffen. Sie stellt die herkömmliche mechanische Politur oberflächenvergütenden Lacken, basierend auf Monomeren, entgegen. Die verwendeten Lacke in Kombination mit den dazugehörigen Bis-Acryl Kunststoffen zeigen gegenüber herkömmlich polierten Methacrylatkunststoffen eine signifikant verbesserte Oberflächenbeschaffenheit. Trim[®] hat in dieser die Studie die schlechteste, Luxatemp[®] und Luxatemp[®] in Verbindung mit dem Lack Luxatemp[®] Glaze & Bond die besten Oberflächenwerte (Weiß, 2008).

Die zweite Arbeit untersuchte die Plaqueakkumulation *in vivo* an Provisorien nach vorherigem Auftragen von Luxatemp[®] Glaze & Bond. Die lackierten Provisorien weisen im Vergleich zu den herkömmlich polierten Provisorien eine verminderte Plaquebesiedlung und eine deutlich geringere Oberflächenrauigkeit auf. (Mues et al., 2008).

Diese Arbeit soll die Frage klären, ob in der Zahnmedizin verwendete provisorische Kunststoffe das Wachstumsverhalten der parodontalen Ligamentzellen beeinflussen und zu dem eine Entzündungsreaktion auslösen können. Zum einen wurde die zytotoxische Auswirkung von zwei verschiedenen Provisorienkunststoffen sowie eines Versieglerlackes getestet. Zum anderen ist untersucht worden, welchen Effekt sie auf die Ausschüttung von bestimmten Zytokinen und MMPs

haben. Besonders interessiert das Verhalten von Luxatemp[®] Glaze & Bond. Ein Lack, der nach Herstellerangaben (DMG, Hamburg, D) das Polieren von Kunststoffprovisorien erübrigt, indem man ihn nach dem groben Bearbeiten des Provisoriums dünn aufträgt und aushärtet. Es wurden die Kunststoffe Trim[®], ein PEMA-Kunststoff, und Luxatemp[®], ein Bis-Acryl, für die Versuche verwendet. Außerdem ist der Lack Luxatemp[®] Glaze & Bond in ungehärteter Form und in Kombination mit Luxatemp[®] getestet worden. Die Untersuchung soll Aufschluss geben, ob im Hinblick auf die Biokompatibilität der angewandte Lack in Kombination mit seinem Bis-Acryl Kunststoff eine Alternative zu den bisher verwendeten Kunststoffen sein kann.

4.2. Kritik der Methodik

Es gibt eine Vielzahl von Möglichkeiten die Biokompatibilität von dentalen Kunststoffen gegenüber Gewebe, bzw. Zelltypen zu testen. Neben der Frage, ob Substanzen toxisch auf Zellen wirken, ist in den letzten Jahrzehnten die Klärung von initialen Entzündungsreaktionen und Immunreaktionen dentaler Gewebe in den Vordergrund gerückt. In dieser Studie untersuchten wir die Testsubstanzen einerseits auf ihre Fähigkeit, das Proliferationsverhalten von parodontalen Zellen zu beeinflussen. Andererseits wird ihr Einfluss zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren beurteilt.

Nach *Fujisawa et al.* (2000) werden die freiwerdenden Monomere für Irritationen der umliegenden Gewebe und allergisierende Wirkungen verantwortlich gemacht. *Ferracane* (1994) hebt heraus, dass verschiedene Faktoren bei dem Austritt von Kunststoffmonomeren eine Rolle spielen:

1. die Umwandlungsreaktion determiniert die Menge der in Lösung gehenden Monomere;
2. die chemische Zusammensetzung der Lösung übt einen erheblichen Einfluss auf die Aufgabe aus
3. Größe und chemische Charakteristik der Monomere sind entscheidend.

In dieser Studie wurden die vorbereiteten Kunststoffproben sieben Tage in physiologischen Medium (DMEM) gehalten. Nach den sieben Tagen wurde das gesamte Eluat zur Stimulation der Zellproben verwendet. So wurden die Zellen unter physiologischen Bedingungen mit der Gesamtmenge von frei werdenden Substanzen stimuliert. Mit diesem Verfahren wird das Gesamtpolymer auf seine toxische Fähigkeit und initiierende Wirkung von Entzündungs- und Immunre-

aktionen getestet. Um eine genauere Aussage über die beteiligten frei werdenden Monomere zu tätigen, wurden die stimulierten Medienüberstände mit einem Hochleistungsflüssigkeitschromatographen (HPLC) zur Detektion von Monomeren untersucht. Die HPLC-Analysen wurden durch Diplom-Chemiker Markus Reinartz in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Engeser am Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn durchgeführt. Es konnten in den einzelnen Gruppen unterschiedliche Metaboliten nachgewiesen werden. Doch eine Aussage über Quantität, Qualität und Art der eluierten Monomere konnte bisher noch nicht getroffen werden (Abb. 16). Hier liegen die Probleme in erster Linie in der Verwendung des Eluats (Zellkulturmediums), so dass es zu einer Überlagerung kommt.

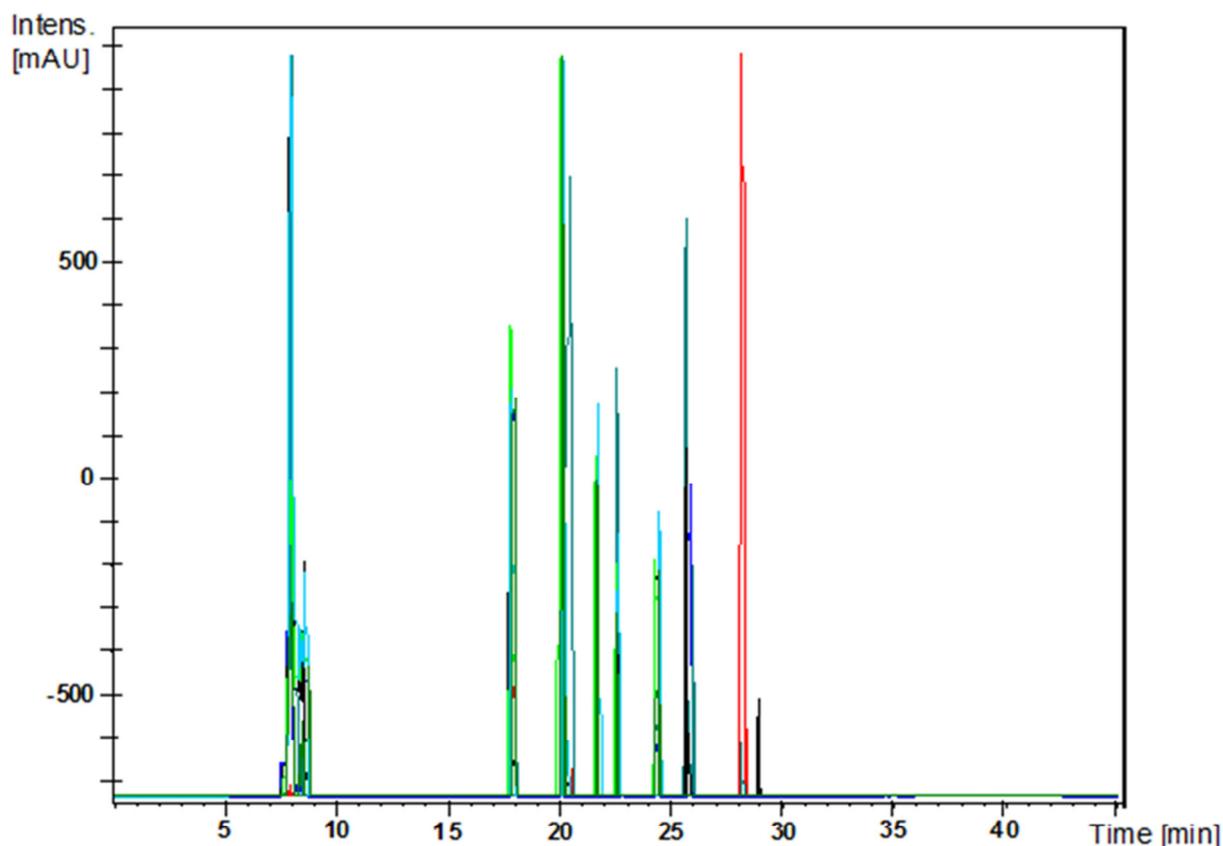


Abb. 16 HPLC-Chromatogram (UV Messung von 205 nm). Darstellung der gemessenen Intensität über eine Dauer von 45 min von dem unkonditioniertem Medium DMEM rot), Trim® (blau), Luxatemp® (hellblau), Luxatemp® mit Luxatemp® Glaze & Bond (schwarz) und Luxatemp® Glaze & Bond ungehärtet (türkis) und gehärtet (grün).

In Ethanol oder Methanol hingegen werden die Monomere in messbaren, hohen Mengen abgegeben (Ferracane & Condon, 1990; Lee et al., 1995; Michelsen et al., 2003; Polydorou et al., 2009; Spahl et al., 1998). Eine 75 % Ethanol-Wasser Lösung gilt als Speisen stimulierende Flüssigkeit (Geurtsen, 1998 b) und wird in zahlreichen Studien zur Detektion von Kunststoffmonomeren herangezogen (Ferracane & Condon, 1990; Manojlovic et al., 2011; Polydorou et al., 2009). Die Vermutung, dass organische Lösungsmittel, wie Ethanol, Komponenten aus dem Kunststoffpolymer herauslösen können, wird durch die oben genannten Studien unterstützt. Grund für dieses Verhalten könnte die Fähigkeit des Ethanols sein, in die Matrix des Polymers zu penetrieren und die Zwischenräume der Polymerketten zu expandieren. So können lösliche Moleküle und nicht gebundene Monomere heraus diffundieren (Geurtsen, 1998 b). Nachteil dieses Verfahrens ist, dass Ethanol kein physiologisches Medium darstellt. Die Zellen überleben in diesem Medium nicht, sodass keine Stimulation der Zellen erfolgen kann. Dies muss in einem gesonderten Schritt mit den einzelnen herausgefilterten Monomeren geschehen. Der Gesamteinfluss der Kunststoffe kann so nicht in Gänze untersucht werden, sondern nur der einzelnen Monomere oder ihren Kombinationen.

Ein weiterer Ansatz besteht darin, anstatt eines Ethanol-Wasser Gemisches künstlichen Speichel als Medium zu verwenden. Im Vergleich zu den Versuchen mit einer 75 % Ethanol-Wasser Lösung, werden bei gleicher Testzeit und Vorgehen weniger bis keine Monomere in künstlichem Speichel abgegeben (Ferracane & Condon, 1990; Lee et al., 1995; Spahl et al., 1998; Tanaka et al., 1991). Ursache hierfür könnte eine deutlich geringere Penetration von Speichel in die Polymermatrix sein (Geurtsen, 1998 b).

Die für diese Arbeit genutzten Zellen sind Primärzellen, die aus dem parodontalen Ligament der Zähne entstammen. Der Einsatz der Primärkultur wurde ausgewählt, um die physiologischen Bedingungen des Organismus nachzuahmen. Primärzellen behalten *in vitro* zum einen die Mehrzahl von Charakteristika bei, die sie *in vivo* kennzeichnen. Zum anderen unterscheidet sich ihr Genexpressionsprofil gegenüber Zelllinien, weshalb sie für die Analyse der Genexpression bevorzugt verwendet werden. Nachteil einer Primärzellkultur ist, dass sie nicht unbegrenzt kultivierbar ist. Innerhalb des Kulturverlaufs kann sich das Differenzierungsmuster und die Zellteilungsrate je nach Zelltyp stark verändern (Schmitz, 2011). Deshalb wurden die parodontalen Ligamentzellen nach der vierten Zellkulturpassage für die Versuche verwendet.

Die Eluationsphase der Materialien betrug sieben Tage. Diese Zeitspanne wurde ausgewählt, da die durchschnittliche Tragedauer eines Kronen- bzw. Brückenprovisoriums in der Praxis sieben

Tage beträgt. Somit wurden die Zellen mit einer akkumulierten Menge von eluierten Kunststoffsubstanzen stimuliert. Bei der alltäglichen Verwendung von Kunststoffprovisorien kommt es im Mund des Patienten durch den Speichelfluss zu keiner so hohen Wirkung der Substanzen. In den meisten anderen Studien werden die Kunststoffe oder die Monomere direkt zur Stimulation der Zellen verwendet. *Fujisawa et al.* (2000) machen die freiwerdenden Monomere für Irritationen der umliegenden Gewebe und allergisierende Wirkungen verantwortlich.

Ferracane und Condon (1990) zeigten, dass innerhalb der ersten drei Stunden 50-75 % der löslichen Kunststoffmoleküle in Lösung gegangen sind. Nach 24 Stunden waren alle löslichen Kunststoffkomponenten eluiert. Ein ähnliches Verhalten beobachteten auch *Polydorou et al.* (2007) für das Monomer TEGDMA. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über 28 Tage, wobei 50 % der gesamten, freigewordenen Menge an TEGDMA innerhalb der ersten 24 Stunden detektiert wurde. Dennoch zeigt sich über den gesamten Zeitraum von 28 Tagen eine Abgabe der Monomere. Das Monomer Bis-GMA stieg nach Beendigung sogar noch einmal an (*Polydorou et al.*, 2007). Eine kontinuierliche Freigabe von bestimmten Kunststoffmolekülen (UDMA, Bis-GMA, TEGDMA und HEMA) über 28 Tage stellten auch *Manojlovic und Mitarbeiter* (2011) fest. Sie sehen dentale Kunststoffe als „chronische Quelle von Monomeren“ (*Manojlovic et al.*, 2011). Ähnliche Beobachtungen beschreiben auch *Sideridou und Achilias* (2005); sie wiesen nach, dass zum Beispiel die Bis-GMA Abgabe innerhalb von drei Tagen kontinuierlich stieg, die Menge des Monomers sich nach 30 Tagen nicht signifikant von der nach drei Tagen unterschied. Außerdem beobachteten sie, dass die Menge der freigesetzten Monomere mit einer höheren Aushärtezeit sank (*Sideridou und Achilias*, 2005).

4.3 Humane parodontale Ligamentzellen

Die in dieser Studie untersuchten Zellen, stammen von der Wurzeloberfläche jugendlicher Zähne, die aus kieferorthopädischen Gründen entfernt werden mussten. Die Zellen wurden aus dem mittleren Drittel der Zahnwurzel mit einem Skalpell abgeschabt. So wurde sichergestellt, dass eine Verunreinigung der Gewebeproben durch Fibroblasten der Gingiva und Pulpa auf ein Minimum reduziert wird. Die humanen parodontalen Zellen sind aus einem entzündungsfreien und nicht beschädigten Gewebe entnommen worden, um eine möglichst physiologische Reaktion der Zellen zu erhalten. Es wurden parodontale Ligamentzellen für diese Versuchsreihe verwendet, da sie

für den parodontalen Halteapparat eine wichtige Rolle spielen und so für die Integrität des Parodonts verantwortlich sind. Eine Zerstörung dieser Zellen führt somit zur parodontaler Destruktion und langfristig zum Zahnverlust. Das Parodont ist eine Einheit aus vier Hart- und Weichgeweben: das Wurzelzement, der Alveolarknochen, das Desmodont und die Gingiva (Schroeder, 2000). Diese vier Bauelemente verankern die Zähne in ihrer Alveole und bilden aus den Zähnen der Kiefer eine Zahnreihe. Die Gewebe bilden eine funktionelle Einheit während physiologischer Beanspruchung, der Eruption und Knochenumbauvorgängen; sie können traumatische Schädigungen reparieren sowie Zahnstellungsänderungen zulassen. Sie besitzen eine schützende Funktion, indem sie Knochen und Bindegewebe gegenüber der Mundhöhle abschirmen und die epitheliale Kontinuität aufrechterhalten. Die Gingiva ist in der Lage, Abwehrmechanismen gegenüber Infektionen bereitzustellen (Basdra und Komposch, 1997; Lekic und McCulloch, 1996; Schroeder, 2000). Das Wurzelzement und der Alveolarknochen sind für die Verankerung der desmodontalen Fasern verantwortlich. Das parodontale Ligament (Desmodont) ist ein hoch spezialisiertes, gut vaskularisiertes, zellreiches Gewebe, welches zwischen dem Alveolarknochen und der Wurzeloberfläche der Zähne liegt. Zusammen mit den Hartgeweben stellt es eine gelenkartige Verbindung zwischen Zahn und Alveolarknochen dar (Schroeder, 2000).

Das gesunde Parodont enthält eine Vielzahl von unterschiedlichen Zellarten: Fibroblasten, Endothelzellen, Malassez'sche Epithelreste, sensorischer Zellen, Knochenassoziierte Zellen und Zementoblasten (Beertsen et al., 1997). Dominierender Zelltyp ist, wie in der Gingiva, der Fibroblast (Beertsen et al., 1997; Lekic und McCulloch, 1996). Fibroblasten sind für die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (EZM) verantwortlich. Ihre Aufgabe besteht darin, Kollagen und andere Komponenten zu synthetisieren und zu phagozytieren (Kühnel, 2002).

Die Gingiva- und Parodontfibroblasten zeigen ein ähnliches morphologisches Erscheinungsbild: eine spindelartige, verlängerte, abgeflachte Form (Kuru et al., 1998). Die in dieser Studie genutzten Zellen weisen die gleichen morphologischen Kennzeichen auf (Abb. 3). Dieses histologische Bild ist typisch für die Zellart der Fibroblasten (Kühnel, 2002). Im direkten Vergleich von Gingivafibroblasten und Parodontalfibroblasten erscheinen die Fibroblasten der Gingiva kleiner und weniger granuliert als die des Parodonts (Kuru et al., 1998). *Geurtsen und Mitarbeiter* (1998) testeten den zytotoxischen Effekt von Kunststoffmonomerem auf drei primär humane Fibroblastenarten (PDL-Zellen, Pulpafibroblasten und Gingivafibroblasten) und permanente 3T3 Zellen. Die parodontalen Ligamentzellen und humane Pulpafibroblasten reagierten sensitiver auf die

Monomere als die Gingivafibroblasten und die permanente Zelllinie. Das ist ein Hinweis auf funktionelle Unterschiede der beiden Fibroblastentypen.

Das parodontale Ligament besitzt eine heterogene Zellpopulation, die aus Zellen mit Fibroblasten- und Osteoblasteneigenschaften gebildet wird (Basdra und Komposch, 1997; Isaka et al., 2001; Jönsson et al., 2011; Lekic et al., 2001). Nagatomo und Mitarbeiter (2006) erforschten die parodontalen Ligamentzellen auf Stammzeleigenschaften. Die Zellen zeigten Potenzial zur Selbsterneuerung und produzierten Einzelzellkolonien, sie exprimierten Stammzellmarker und differenzierten sich zu Adipodizyten wie auch zu Osteoblasten weiter. Zudem besitzen PDL-Zellen entscheidende Stammzeleigenschaften wie Selbsterneuerung und Pluripotenz (Nagatomo et al., 2006).

Aus der Untersuchung von PDL-Zellen *in vitro* und *in vivo* auf Markerproteine, die fibroblastogenetische oder osteogenetische Charaktere von Zellen beschreiben, geht deutlich hervor, dass es kaum Unterschiede der Expressionsraten der Marker gibt. Weiterhin scheinen die Marker in allen Bereichen des parodontalen Ligaments prozentual gleich hoch exprimiert zu werden. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die phänotypische Konstanz der Zellpopulationen zur Stabilität des Parodonts beiträgt. Geprüft wurden die Zellen auf die Marker α -SMA, als Hinweis auf Fibroblastenphänotypische Eigenschaften, sowie auf AP, OPN und BSP, als Hinweis auf den Osteoblastenphänotyp (Lekic et al., 2001). Ein erhöhter BSP-Wert im Parodont kann als Indiz dienen, dass sich die PDL-Zellen zu Osteoblasten bzw. Zementoblasten differenziert haben könnten (Lekic et al., 1996; Lekic et al., 2001). Die Stimulation von PDL-Zellen mit dem Wachstumsfaktor TGF- β 1 führten zu einer Proliferationssteigerung, nicht aber zur erhöhten Expression von α -SMA, Kollagentyp 1 oder Fibrillin-1 (Fujii et al., 2010). Alle drei Proteine sind Marker für ein gesundes parodontales Ligament (Arora und McCulloch, 1994; Beertsen et al., 1997; Narayanan und Page, 1983).

Entgegengesetzt reagieren parodontale Stammzellen. Bei ihnen führt die TGF-1 β Stimulation zu keiner Proliferationssteigerung, aber zu einer Erhöhung der α -SMA-, Kollagentyp 1- und Fibrillin-1-Expression. TGF-1 β scheint ein wichtiger Faktor für die Differenzierung von parodontalen Vorläuferzellen zu Fibroblasten zu sein (Fujii et al., 2010). Weitere Hinweise auf einen fibroblastären Charakter der PDL-Zellen geben Kuru et al. (1998). Sie wiesen nach, dass die Hauptproteine der Extrazellulären Matrix, Fibronectin und Kollagen Typ 1, von den Parodontalfibroblasten in einem höheren Ausmaß produziert wurden als bei den Gingivafibroblasten. Des Weiteren zeigten Teile der parodontalen Zellen eine Produktion der Proteine auf zwei verschie-

den hohen Levels an. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Zellen im parodontalen Ligament eine funktionelle Heterogenität aufweisen (Kuru et al., 1998). Die Morphologie und Kollagenproduktion ähnelt, wie oben beschrieben, den Eigenschaften eines Fibroblasten (Jönsson et al., 2005; Kuru et al., 1998; Somerman et al., 1988).

Eigenschaften, die auf einen osteoblastischen Phänotyp der parodontalen Ligamentzellen hinweisen, ist die Expression von osteogenetischen Markern wie Alkalische Phosphatase und Osteocalcin. Die Bildung dieser Marker deutet daraufhin, dass die PDL-Zellen Einfluss auf die Regulation der Gewebsregeneration des Parodonts nehmen (Basdra und Komposch, 1997; Isaka et al., 2001; Groenveld et al., 1995, Somerman et al., 1988). *Uchiyama et al.* (2009) beschreiben, dass mit parodontalen Zellen inkubierte Osteoklasten-Vorläuferzellen spontan zu Osteoklasten differenzieren. PDL-Zellen sind in der Lage, in Differenzierung und Regulation von Osteoklasten einzugreifen (Uchiyama et al., 2009). Außerdem wurde den PDL-Zellen die Expression von osteotropen Zytokinen, wie z.B. OPG und RANKL, nachgewiesen (Kraus et al., 2012; Lossdörfer et al., 2011; Pinkerton et al., 2008). Dieser Nachweis ist insofern von Bedeutung, da das RANK/RANKL/OPG-System eine entscheidende Rolle für den alveolären Knochenverlust während parodontalen Destruktionen spielt. Die Osteoklasten, welche für die Knochenresorption verantwortlich sind (Kühnel, 2002), exprimieren den Rezeptor RANK (Nakagawa et al., 1998). Durch die Interaktion von RANK und seinem Liganden RANKL wird die Aktivität der Osteoklasten stimuliert. RANKL wird von den Osteoblasten freigesetzt (Jimi et al., 1999; Lacey et al., 1998). OPG, ebenfalls von Osteoblasten gebildet, agiert als sogenannter Köderrezeptor zur Bindung von RANKL. So wird die biologische Aktivität des Liganden eingeschränkt und führt zur Inhibition der Knochenresorption. Die Osteoklastenaktivität wird nachweislich durch OPG und RANKL beeinflusst (Lossdörfer et al., 2011; Simonet et al., 1997).

Pinkerton et al. (2008) untersuchten parodontale Ligamentzellen auf ihre Fähigkeit, Zytokine und Wachstumsfaktoren zu bilden. Zytokine, wie IL-1, IL-6 und IL-8, sowie der Wachstumsfaktor OPG konnten detektiert werden. Immunregulierende Lymphokine, anti-inflammatorische Zytokine (z.B. IL-10) oder Wachstumsfaktoren wie TNF oder RANKL, sind nicht exprimiert worden. Osteotrope Zytokine und Wachstumsfaktoren werden regulär von PDL-Zellen ausgeworfen (Pinkerton et al., 2008). Im unstimulierten Zustand liegt die Expressionsrate von Entzündungsmarkern auf einem niedrigen bis kaum zu detektierenden Level. Nach Stimulation von Entzündungspromotern, wie zum Beispiel bakterielle LPS (Lipopolysaccharide), steigt die Expression um ein Vielfaches an (Jönsson et al., 2011). Etliche Studien beweisen, dass eine bakteriell pro-

inflammatorische Stimulation von parodontalen Ligamentzellen zum Auswurf von Zytokinen und Chemokinen führt. Vor allem pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF α werden auf Stimulation gebildet (Agarwal et al., 1998; Jönsson et al., 2008; Okada et al., 1997; Wada et al., 2004 b).

Die oben genannten Merkmale der parodontalen Ligament Zellen bescheinigen ihnen eine einzigartige Funktion. Obwohl man davon ausgeht, dass die *in vitro* untersuchten Zellen einen homogenen Zellursprung haben, sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass die Möglichkeit von multiplen Zellarten in Kultur besteht.

4.4 Diskussion der Versuche

4.4.1 Diskussion PCR und ELISA

Zytokine

Zytokine sind hormonähnliche Signalstoffe und werden von fast allen Zellen des Körpers, insbesondere von aktivierten T-Zellen, zur Steuerung der humoralen und zellulären Immunantwort produziert (Pichler und Peter, 2006). Im Gegenzug reagieren Zellen auf Zytokine (Dinarello, 2000). Sie werden auf Reiz *de novo* gebildet, sezerniert und entfalten ihre Wirkung autokrin oder parakrin. (Löffler und Schölmerich, 2008). Als auslösender Reize sind bakterielle Lipopolysaccharide und andere Bakterienprodukte nachgewiesen worden (Darveau et al., 1997; Yamazaki et al., 1997). Über die Zytokine antwortet der menschliche Körper auf Infektionen, Entzündungen, Traumata und Immunantworten (Dinarello, 2000). Zytokine spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von parodontalen Destruktionen. Es besteht eine Koinzidenz zwischen Attachmentverlust, Knochenresorption und der Tätigkeit von Zytokinen während der Parodontitis-erkrankung (Graves und Cochran, 2003).

Auf Grund ihrer vielfältigen biologischen Funktionen lassen sie sich in vier Kategorien einteilen: Wachstumsfaktoren, Interferone, Interleukine und Chemokine. Eine andere Systematik nimmt Bezug auf ihr Verhalten während einer Entzündung, es werden pro-inflammatorische und anti-inflammatorische Zytokine unterschieden (Löffler und Schölmerich, 2008).

Zu den pro-inflammatorischen Zytokinen gehören auch die in dieser Studie nachgewiesenen Interleukine IL-1 β und IL-8. Interleukin-1 β ist das pro-inflammatorische, multifunktionelle Zytokin

im humanen Organismus. Es stimuliert im Gegensatz zu anderen Zytokinen fast jeden Zelltypus und wird von fast jedem Zelltypus freigesetzt, hauptsächlich aber von Monozyten (Ibelgaufts, 2002). Stimuliert wird die Synthese von IL-1 β über bakterielle Endotoxine, Viren oder über die Zytokine TNF α oder IL-1 α (Dinarello, 1990; Ibelgaufts, 2002). IL-1 β wirkt systemisch über eine Signalkaskade, die die Immunabwehr des Organismus unterstützt, aber auch zu Gewebeerstörungen führt (O'Neill und Dinarello, 2000). Durch die Induktion von IL-1 β kommt es zu Fieber, Entzündungen, Gewebedestruktion und Verlust von Funktion, z.B. bei Parodontalerkrankungen, bei rheumatologischen Geschehen und anderen entzündlichen Krankheitsbildern. Außerdem werden eine Anzahl von Genen, z.B. für Zytokine, Wachstumsfaktoren, Akute-Phase-Protein und zahlreiche inflammatorische Proteine (Matrix Metalloproteinasen) aktiviert (Dinarello, 2005; Graves und Cochran, 2003; Loos et al., 2005; O'Neill, 2001).

IL-8 wird von Phagozyten und Mesenchymzellen auf entzündliche Stimuli gebildet (Baggiolini et al., 1989; Baggiolini und Clark-Lewis, 1992). IL-1 und TNF stellen den wichtigsten Reiz zur Expression und Sekretion von IL-8 dar. Somit spielt es eine essentielle Rolle während einer Entzündung und der Immunantwort des Organismus. Neben den Aufgaben, Entzündungsreaktionen des Wirtes zu unterhalten, zeigt IL-8 auch anti-inflammatorische Eigenschaften (Ibelgaufts, 2002).

IL-10 gehört zu der Gruppe der anti-inflammatorischen Zytokinen. Es wird vor allem von Monozyten und T-Zellen produziert und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von proinflammatorischen Zytokinen (Grütz, 2005; Loos et al., 2005). Es reguliert die entzündliche Immunantwort der Monozyten herunter und stimuliert die Expression von Antikörpern (Loos et al., 2005). IL-10 inhibiert die Synthese von IL-1, IL-6, IL-8 und TNF α (Wang et al., 1995) und verhindert die Gewebedestruktion über die Hemmung von MMPs und RANKL (Garlet et al., 2006). Einen Zusammenhang zwischen Polymorphismen im IL-10 Gen und parodontaler Destruktion wird in der Literatur diskutiert, ist aber noch nicht endgültig gesichert (Loos et al., 2005). *Morandini et al.* (2011) konnten PDL-Zellen und Gingivafibroblasten zu keiner IL-10 Ausschüttung nach Stimulation mit *Porphyromonas gingivalis* animieren. Hingegen zeigen Parodontitispatienten einen erhöhten IL-10 Wert in der gingivalen Sulkusflüssigkeit.

Matrix Metalloproteinasen

Matrix Metalloproteinasen (MMP) sind eine multigene Familie zinkabhängiger Endopeptidasen (Sorsa et al., 2006). Sie werden von Entzündungszellen, Fibroblasten, Endothelzellen und ande-

ren Zellen gebildet (Birkedal-Hansen, 1993; Hannas et al., 2007). Entsprechend ihrer Spezifität sind sie in sechs Kategorien eingeteilt: Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine, Membran-MMPs und andere (Hannas et al., 2007; Sorsa et al., 2006). Die Transkription der MMP-Gene wird über pro-inflammatorische Zytokine, Hormone und Wachstumsfaktoren stimuliert (Sorsa et al., 2006). Die physiologischen Funktionen der MMPs sind unter anderem: Wundheilung; Gewebeumbau während der Organogenese und des Wachstums; Angiogenese; Antigenentwicklung und Präsentation (Birkedal-Hansen, 1993; Hannas et al., 2007; Nagase und Woessner, 1999; Visse und Nagase, 2003). Bei vielen Erkrankungen, die mit der Fehlregulation von MMPs in Verbindung gebracht werden, ist ein exzessiver Gewebeabbau erkennbar (Chakraborti et al., 2003). Auch in den oralen Geweben spielen die MMPs eine entscheidende Rolle. So greifen sie in die Entwicklung des Schmelzes, der Schmelzfluorose und des Dentins ein (Bartlett et al., 2004; Den Besten et al., 2002; Sulkala et al., 2002) und beteiligen sich an Pulpitiden und periapikalen Entzündungen (Gusman et al., 2002; Wahlgren et al., 2002). Eine Schlüsselrolle spielen die MMPs bei der Erkrankung des parodontalen Halteapparates, der Parodontitis und der Periimplantitis (Hannas et al., 2007; Sorsa et al., 2006).

MMP-1 wird zu den Kollagenasen gezählt und ist auch unter dem Namen Kollagenase-1 bekannt (Ibelgaufts, 2002). Es ist als einzige Kollagenase in der Lage, den Zusammenbruch des interstitiellen Kollagens zu initiieren (Saffarian et al., 2004). MMP-1 wird von zahlreichen Zellen exprimiert: z.B. Endothelzellen, Fibroblasten, Chondrozyten, Monozyten, Odontoblasten und Osteoblasten. Das Enzym spielt eine wichtige Rolle in physiologischen Prozessen der Wundheilung, Gewebemorphologie und Entwicklung. Neben physiologischen Aufgaben ist MMP-1 auch in pathologische Vorgänge wie Arthritis, Krebs, Arteriosklerose und parodontalen Destruktionen involviert (Ibelgaufts, 2002; McCulloch et al., 1994; Nikkari et al., 1995). Die Ausschüttung von MMP-1 aus den Zellen wird in der Parodontitis initial durch bakterielle Produkte und in bestehenden Läsionen durch Zytokine hervorgerufen (Reynolds und Meikle, 1997; Uitto et al., 2003). Pro-inflammatorische Eigenschaften von dentalen Restaurationsmaterialien sind in vorhergehenden Studien gezeigt worden (Hansasuta et al., 1993). Für die Bewertung der Biokompatibilität von dentalen Materialien kann eine Veränderung bei der Regulation und Induktion von Entzündungsmediatoren einen entscheidenden Hinweis auf toxische Vorgänge geben. Auf Grund dieser Zusammenhänge wurde auch in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob provisorische Kunststoffe die Sekretion von bestimmten Entzündungsmediatoren beeinflussen können.

Die unstimulierten parodontalen Ligamentzellen zeigten im ELISA-Test dieser Studie eine basale Proteinexpression von IL-1 β , IL-8 und MMP-1. Die Beobachtung, dass unstimulierte Zellen *in vitro* eine Expression von Zytokinen und Matrix Metalloproteinasen aufweisen, ist in der Literatur belegt (Eckhart et al., 2009; Xiang et al., 2009). Unter Stimulation aller Kunststoffproben kommt es zu einer signifikant erhöhten Produktion der Proteine. Der Auswurf bei der Probe UG ist bei allen drei Proteinen am stärksten und ist gegenüber den anderen Kunststoffproben signifikant. Die Gruppe L zeigt einheitlich den geringsten Einfluss auf die Produktion von IL-1 β , IL-8 und MMP-1. Diese Untersuchung zeigt, dass humane parodontale Ligamentzellen in der Lage sind, *in vitro*, auf den Stimulus von Kunststoffen pro-inflammatorische Zytokine und Matrix Metalloproteasen zu bilden, ohne dass bakterielle Nebenprodukte als Co-Stimulans verwendet wurden. Gestützt wird die Aussage ebenfalls durch den Ausfall der PCR Ergebnisse. Auch hier kommt es zur einer erhöhten relativen mRNA-Expression von IL-1 β , IL-8 und MMP-1 nach Stimulation mit den Kunststoffproben. Der Stimulus durch UG ist auch hier bei allen Versuchen am Stärksten. Die mRNA Expression von MMP-1 ist im Vergleich zu den beiden Zytokinen nicht so stark. Eine Signifikanz zur Kontrolle erreichen die Proben UG und LG. Zusammengefasst kommt es bei der Polymerasekettenreaktion zu einer deutlichen Expression von inflammatorischen Zytokinen, insbesondere IL- β . Alle verwendeten Provisorienkunststoffe sind in der Lage, humane parodontale Ligamentzellen zu einer Entzündungsreaktion zu animieren. Wobei im besonderen Maße die PDL-Zellen auf den ungehärteten Lack reagierten und hier die höchste Entzündungsreaktion provoziert wurde.

Ob dentale Restaurationsmaterialien, wie Metalle, Metalllegierungen, Keramiken und insbesondere Kunststoffe, die Expression von Zytokinen beeinflussen bzw. induzieren können, wird in der Literatur diskutiert. *Ozen et al.* (2005) zeigte in seiner Untersuchung, das einzig Kupfer humane Gingivafibroblasten zum Auswurf von IL-1 β animierte. *Schmalz und Mitarbeiter* (2000) verglichen Nickelchlorid (NiCl₂), Kobaltchlorid (CoCl₂), Palladiumchlorid (PdCl₂) und TEGDMA miteinander, indem sie die PGE₂, IL-6- und IL-8 -Expression von Plattenepithelkarzinomzellen der bukkalen Mukosa beobachteten. TEGDMA verursachte keine Produktion von PGE₂, IL-6 und IL-8 hingegen wurden, bei subtoxischen TEGDMA-Dosen, von den Zellen exprimiert. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen *Lui und Mitarbeiter* (1999), die Stimulation von humanen Blutzellen mit MMA erzielte die Produktion von IL-6, Interferon- γ und TNF α . Diese Beobachtungen stimmen mit denen aus dieser Studie über ein.

Der Versuch, Gingivafibroblasten nach einer dreitägigen Stimulation mit vier unterschiedlichen Kunststofftypen zur Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren anzuregen, ergab signifikante, jedoch variierende Ergebnisse (Labban et al., 2008). Hingegen erreichten *Moharamzadeh et al.* (2007) keine IL-1 β Expression bei einer 24 stündigen Stimulierung von humanen Gingivafibroblasten und immortalisierten humanen Keratinozyten mit den Kunststoffmonomeren Bis-GMA, TEGDMA und UDMA. Dass es zu so kontroversen Ergebnissen, auch im Vergleich zu dieser Arbeit kommt, kann im Zusammenhang mit den verschiedenen Versuchsaufbauten, getesteten Materialien und Zellen stehen. In dieser Arbeit wurden nicht Gingivafibroblasten, sondern parodontale Ligamentzellen zur Stimulation gebracht. Wie in Kapitel 4.3 beschrieben, zeigen PDL-Zellen deutliche Unterschiede in Funktion und Charakter gegenüber Gingivafibroblasten.

Auch der Stimulationsprozess ist ein anderer, *Moharamzadeh et al.* (2007) verwendeten zur direkten Stimulation einzelne Monomere. In dieser Studie, wie auch bei *Labban et al.* (2008) wurden die Kunststoffproben vor der Stimulation sieben Tage in physiologischem Medium inkubiert. Das Gesamtluat wurde zur Stimulation der Zellen verwendet, so dass durch eine Akkumulation der Substanzen eine erhöhte Reaktion der Zellen hervorgerufen werden konnte.

Dass es bei *Moharamzadeh et al.* (2007) zu keiner Expression von IL-1 β gekommen ist, kann daran liegen, dass nur einzelne Monomere getestet worden sind und nicht ein Gesamtpolymer, bei dem die Kombination von mehreren herausgelösten Bestandteilen Einfluss auf die untersuchten Zellen nehmen können.

Neben IL-1 β , IL-8 und MMP-1, die für eine inflammatorische, destruktive Gewebereaktion stehen, ist auch das anti-inflammatorische Interleukin-10 detektiert worden. IL-10 ist verantwortlich für die Hemmung von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 und IL-8 (Wang et al., 1995). Aber auch bei der Verhinderung von Gewebedestruktion spielt es über die Hemmung von MMP's eine regulatorische Rolle (Garlet et al., 2006). Die Ergebnisse der Polymerasekettenreaktion zeigen eine signifikante Erhöhung der mRNA von IL-10 gegenüber der Kontrolle bei allen Versuchsgruppen. Es scheint, dass die parodontalen Ligamentzellen neben einer entzündlichen Reaktion auf den Stimulus auch mit einer gegenregulatorischen Maßnahme reagieren.

Interessant ist vor allem der Vergleich der pro-inflammatorischen Zytokine mit ihrem Gegenregulator IL-10. Insgesamt liegt die relative Genexpression von IL-10 deutlich unter der von IL-1 β . Es zeigen sich in dieser *in vitro* Studie keine ganz eindeutigen Parallelen zwischen den beiden Genexpressionen. Doch eine Tendenz ist sichtbar. Bei den Gruppen T, LG und UG gibt es eine

Gemeinsamkeit in der Entwicklung über den Testzeitraum. Das Expressionsniveau von T und UG reduziert sich innerhalb der 24 h bei beiden Zytokinen. Demgegenüber steigert sich das Expressionsverhalten bei LG. IL-1 β weist eine verhältnismäßig höhere Veränderung in seiner mRNA Produktion auf. IL-10 hingegen divergiert nur geringfügig.

4.4.2 Diskussion zytotoxikologischer Test

Es gibt mehrere Möglichkeiten, die Lebensfähigkeit und Proliferationsfähigkeit von Zellen zu prüfen. In dieser Studie wurde das Tetrazolium Salz XTT eingesetzt. Lebendige Zellen können Tetrazolium-Salze zu orangefarbenen Formazan-Verbindungen reduzieren. Dieser Mechanismus beruht auf der Aktivität von Mitochondrienenzymen. 1950 wurde diese Methode zum ersten Mal mit MTT beschrieben, Scudiero optimierte 1988 die Methode, welcher jetzt als XTT-Test bekannt ist (Scudiero, 1988). Der Vorteil dieses farbmtrischen Verfahrens ist, dass der gebildete Farbstoff sofort löslich ist und seine Intensität direkt mit einem Photospektrometer gelesen werden kann. Die Intensität der Farbe ist proportional zu der Zahl der metabolisch aktiven Zellen. Die Anzahl der lebensfähigen Zellen kann somit sofort, ohne Umwege und weitere Verfahren ermittelt werden. Der XTT-Test wurde in dieser Studie für die zytotoxische Testung der Provisorienkunststoffe Trim[®] und Luxatemp[®], so wie Luxatemp[®] Glaze & Bond, auf ihre Wirkung auf parodontalen Ligamentzellen verwendet.

Die Auswertung der zytotoxischen Untersuchung zeigt, dass alle Testgruppen, bis auf die der Luxatempprobe, erheblichen Einfluss auf die Überlebensrate der PDL-Zellen nehmen. Sie zeigen eine signifikante Toxizität gegenüber den Zellen. Etliche Studien befassen sich mit dem Thema der Zytotoxizität von dentalen Kunststoffen. Vor allem die Monomere Bis-GMA, UDMA, TEGDMA werden auf ihren Einfluss auf die unterschiedlichsten Zelltypen untersucht. *Reichl et al.* (2006) verglichen Bis-GMA, UDMA, TEGDMA und HEMA mit dem Amalgambestandteil HgCl₂. Die Kunststoffbestandteile haben eine deutlich geringere Toxizität auf humane Gingivafibroblasten als HgCl₂. Es ist aber dennoch nachgewiesen, dass auch die Kunststoffbestandteile toxisch auf die humanen Gingivafibroblasten (HGF) wirken (Reichl et al., 2006). Bekräftigt wird diese These durch *Moharamzadeh und Mitarbeiter* (2007). Sie wendeten zur Zytotoxizitätsbestimmung den Almar Blue assay an, um die Zellvitalität von Gingivafibroblasten und Keratinozyten nach Stimulation mit Monomeren beurteilen zu können. Wie auch bei *Reichl et al.* (2006), *Lai et al.* (2004) oder *Geurtsen et al.* (1998 a) zeigten die Monomere einen zytotoxischen

Einfluss auf beide Zelltypen. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die von verschiedenen Spendern abstammenden Fibroblasten unterschiedlich sensibel auf die Monomere reagierten. Das ist eine wichtige Erkenntnis, um variierende Ergebnisse von verschiedenen Studien erklären zu können (Moharamzadeh et al., 2007).

Kontrovers hingegen sind die Beobachtungen bei dem Vergleich von chemisch aktivierten Bis-GMA-, PEMA-, PMMA- und Hitze-aktivierten PMMA-Kunststoffe auf deren toxische Wirkung unter Verwendung von humanen Gingivafibroblasten. Innerhalb der 72 stündigen Stimulationszeit wurde keine signifikante Zelltoxizität erreicht (Labban et al., 2008). Ihre Ergebnisse korrelieren mit der Auswertung der Luxatempproben in unserer Studie. Die Proben erreichten keine toxische Wirkung auf die PDL Zellen. Einen Zusammenhang oder direkten Vergleich der beiden Studien ist aber schwierig, da erstens nicht die gleichen Zelltypen stimuliert (HGF- vs. PDL- Zellen) und zweitens unterschiedliche zytotoxische Versuchsverfahren angewendet wurden.

Die Gruppe der mit reinem Luxatempmaterial (L) stimulierten Zellen lassen über die gesamte Zeit keinen Einfluss auf die Zellaktivität erkennen. Die Proliferationsrate liegt sogar über der 100 %-Marke der Kontrolle. Eine mögliche Ursache für dieses Ergebnis könnte eine nicht ausreichend toxische Menge an in Lösung gegangenen Monomeren sein. Studien beschreiben eine dosisabhängige Toxizität von Kunststoffen; dies beobachteten zum Beispiel *Lai et al.* (2004). Sie untersuchten an Hand von Kunststoffflüssigkeiten verschiedene Monomere. MMA zeigte im Vergleich zu IBMA und 1,6- HDMA toxische Werte bei einer höheren Konzentration. Auch *Tsuchiya et al.* (1994) entdeckten eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität von MMA. Bei der zelltoxischen Untersuchung von *Moharamzadeh und Mitarbeitern* (2007) wurden so hohe Konzentrationen der reinen Kunststoffmonomere Bis-GMA, TEGDMA und UDMA erreicht, die nach *Spahl et al.* (1998) und *Ortengren et al.* (2001) aus den Kunststoffen nicht herausgelöst werden. Ein Beleg dieser Hypothese muss noch in weiterführenden Studien gefunden werden. Innerhalb der ersten 24 h zeigen die Gruppen LG, T und UG den größten toxischen Einfluss. Die Probe LG erfährt eine Minderung um 50 %, bei der Gruppe T kommt es zu einem Verlust von 70 % und bei UG zu 90 % weniger Proliferation.

In dieser Arbeit wurden nicht die einzelnen Monomere untersucht, sondern die Kunststoffe als Einheit. Vergleichend mit den Ergebnissen nach vier und 24 Stunden, ist die Einflussnahme der Gruppen LG, T und UG nach drei und sieben Tagen nicht so stark. Dennoch erreichen die Kunststoffe auch bei einer Stimulationszeit von drei Tagen eine weitere Verminderung der Proliferation. Zwischen den beiden letzten Messpunkten erfahren die Werte nur geringfügige Änderungen.

Der ungehärtete Lack, Luxatemp[®] Glaze & Bond, zeigt im Vergleich zu allen anderen getesteten Proben das zytotoxischste Potenzial. Der Grund für dieses Verhalten liegt in der Tatsache, dass Luxatemp[®] Glaze & Bond in ungehärteter Form ein reines Monomergemisch ist. Somit können die für die Toxizität verantwortlichen Monomere ungehindert auf die PDL-Zellen wirken. Weshalb Monomere Einfluss auf menschliche Zellen nehmen können, liegt an ihrer Lipidfreundlichkeit. Durch ihre Lipophilie können sie die Zellmembran passieren und beschädigen. Der Grad der Lipophilie bestimmt die zelltoxische Wirkung der Monomere (Issa et al., 2004). Aber nicht nur die Monomere allein werden für die zytotoxische Wirkung verantwortlich gemacht, immer mehr werden auch ihre Degradationsprodukte in Bezug auf ihr toxisches Potential untersucht (Emmler et al., 2008).

Nachgewiesen ist, dass Kunststoffmonomere eine Vielzahl von mutagenen Effekten auf humane Zellen ausüben können. Sie induzieren Doppelstrangbrüche, können intrazelluläres Ca²⁺ mobilisieren, führen über die Inhibition von bestimmten Enzymen zur Apoptose von Zellen und erreichen chromosomale Abnormalitäten durch eine Erhöhung der Mikrokernbildung (Atsumi et al., 2006; Schweikl et al., 2005; Spagnuolo et al., 2004; Urcan et al., 2010).

Die Gruppe LG (Kombination von Luxatemp[®] und Luxatemp[®] Glaze & Bond, gehärtet) weist gegenüber UG einen moderaten Einfluss auf die parodontalen Ligamentzellen auf. Im Gegensatz zur Probe L kommt es gleich zu Beginn der Inkubationszeit zu einer signifikanten Verminderung der Proliferation, was vergleichend zu UG jedoch nicht so rasant verläuft. Dennoch ist der negative Einfluss des Lacks auch in gehärteter Form auf die Biokompatibilität des Provisorienkunststoffs nicht zu übersehen. Nach einer Stimulationszeit von sieben Tagen kommt es bei den LG-Proben zu einer 40 %-igen Überlebensrate der Zellen. Bei der reinen Luxatemp[®]-Probe liegt eine 100 %-ige Überlebensrate der Zellen vor. In diesem direkten Vergleich der *in vitro* Untersuchung scheint die Verwendung des Lacks kontraindiziert.

Die Gegenüberstellung der Ergebnisse von Trim[®] und Luxatemp[®] mit Luxatemp[®] Glaze & Bond, relativiert jedoch die oben genannte Aussage. Trim[®] ist ein seit Jahrzehnten gängiger Provisorienkunststoff. Im Vergleich der beiden Kunststoffe kommt es zu einem fast gleichen Ergebnis der Proliferationsraten nach sieben Tage. Die Zellvitalität nach Stimulation mit konditioniertem Trim[®]-Medium ist nach 24 Stunden sogar signifikant zur Gruppe LG vermindert. Nach drei sowie sieben Tagen Inkubation liegen allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen LG und T vor.

4.5 Schlussfolgerung

Die *in vitro* Studie zeigt, dass alle getesteten Kunststoffe Einfluss auf die parodontalen Zellen nehmen. Der ungehärtete Lack zeigte die größte zytotoxische Wirkung auf die PDL-Zellen. Die Vitalität nahm schon innerhalb der ersten 4 h um 90 % ab. Keine der Proben beeinflusste das Überleben der Zellen so stark. Luxatemp[®] ohne Versiegelung führte zu keiner Veränderung der Zellvitalität, wobei die Kombination von Luxatemp[®] mit dem oberflächenvergütenden Lack sowie der gängige Provisorienkunststoff Trim[®] einen zytotoxischen Effekt von ca. 50-70 % während des Beobachtungszeitraums zeigten.

Alle konditionierten Medien waren in der Lage die PDL-Zellen zu einer verstärkten Expression und Sekretion von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen sowie MMP-1 anzuregen. Der ungehärtete Lack zeigte auch hier den höchsten Einfluss auf die Zellen, den geringsten hatten die Kunststoffe ohne Versiegelung. Die verstärkte Bildung und die Ausschüttung des anti-inflammatorische Zytokins IL-10 können hierbei als Gegenregulation der Zellen zur Verminderung der Entzündungsreaktion gedeutet werden.

Im Hinblick auf die oben genannten Ergebnisse und unter der Berücksichtigung der Beobachtungen von *Mues et al.* (2008), die den mit Luxatemp[®] Glaze & Bond bearbeiteten Provisorien *in vivo* eine geringe Oberflächenrauigkeit und Plaqueanlagerung bescheinigen, stellt aus unserer Sicht die Verwendung des Lacks eine sinnvolle Alternative für die Oberflächenvergütung von Provisorien dar. Vor allem im Vergleich des auch heute noch oft in der Praxis verwendeten provisorischen Kronen- und Brückenmaterials Trim[®] mit dem Luxatemp[®] Glaze & Bond bearbeiteten Provisorien sind bei der Betrachtung der Bioverträglichkeit in unserer Studie kaum Unterschiede nennbar. Hier muss vielmehr der Aspekt der deutlich geringeren Oberflächenrauigkeit nach Lackversiegelung gegenüber Trim[®] und der damit verbundenen geringeren Biofilmbildung gewertet werden. Jedoch sollte beachtet werden, dass mit der Anwendung des Lacks gegenüber dem reinen Luxatemp[®]-Kunststoff eine erhebliche Verschlechterung der Biokompatibilität in Kauf genommen werden muss. Kompensiert werden kann dies jedoch durch die deutlich geringere Plaqueakkumulation *in vivo* und die daraus resultierende geringere bakterielle Besiedlung. Zudem sollte bei der täglichen Anwendung in der Praxis die benötigte Zeit zur Oberflächenvergütung der Provisorien berücksichtigt werden. Auch unter diesem Gesichtspunkt scheint die Anwendung solcher Versiegler gegenüber der herkömmlichen Politur überlegen und somit empfehlenswert zu sein. Da aber der ungehärtete Lack die mit Abstand geringste Biokompatibilität in

unserer Studie aufweist, ist es allerdings unerlässlich, bei der Verwendung des Lacks darauf zu achten, dass dieser nur außerhalb des Mundes benutzt und vollständig nach Herstellerangaben auspolymerisiert wird.

5. Zusammenfassung

Der provisorischen Versorgung kommt in der Zahnmedizin eine große therapeutische Aufgabe zu. Deshalb ist darauf zu achten, dass das Provisorium Schutz gegenüber thermischen, chemischen und physikalischen Einflüssen bietet und die physiologische Situation erhält. Die Biokompatibilität der verwendeten Materialien sollte günstig gegenüber den oralen Geweben sein. Eine geringe Oberflächenrauigkeit ist anzustreben, um eine vermehrte Plaqueakkumulation während der Tragezeit zu vermeiden.

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von zwei verschiedenen Provisorienkunststoffen und von einem Versieglerlack auf die Homöostase von parodontalen Ligamentzellen zu untersuchen. Hierbei wurde evaluiert, ob die Kunststoffe die Expression und Ausschüttung von Zytokinen und MMPs induzieren können und inwieweit die Provisorienmaterialien bzw. der Lack zytotoxisch wirken.

Die auspolymerisierten Kunststoffproben sowie der ungehärtete Lack wurden für sieben Tage in physiologischem Medium bei 37° C inkubiert. Danach wurden die parodontalen Ligamentzellen mit dem Gesamteluat von Trim[®] (T), Luxatemp[®] (L), Luxatemp[®] Glaze & Bond (ungehärtet, UG) und Luxatemp[®] Glaze & Bond (gehärtet) in Verbindung mit Luxatemp[®] (LG) einzeln stimuliert. Für die zytotoxische Testung wurde der XTT-Test nach einer Stimulationsphase von 4 h, 24 h, 3 d und 7 d durchgeführt. Die Real-Time-Polymerasekettenreaktion quantifizierte die mRNA-Expression der Interleukine IL-1 β , IL-8 und IL-10 sowie der Matrix Metalloproteinase MMP-1 nach 4 h und 24 h. Durch Verwendung von ELISA-Analysen konnte die sekretierte Proteinmenge von IL-1 β , IL-8 und MMP-1 im Zellkulturüberstand nach 24 h Inkubation mit den konditionierten Medien quantifiziert werden.

Die Ergebnisse der PCR und der ELISA-Tests zeigen, dass alle durch Kunststoff- bzw. Lackproben konditionierten Medien zu einer signifikant gesteigerten Expression und Sekretion der untersuchten Zytokine und von MMP-1 in PDL-Zellen führen. Die höchste Produktion von pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren und MMP-1 zeigten die Zellen, die mit dem ungehärteten Lack stimuliert wurden. Die beiden nicht versiegelten Kunststoffproben hingegen zeigten den geringsten Einfluss auf Sekretion und Expression der Entzündungsmediatoren. Bei der Auswertung des zytotoxikologischen Tests kam es unter Stimulation der PDL-Zellen der reinen Luxatempprobe zu keinen Veränderungen der Überlebensrate. Alle anderen Proben führten zu einem Verlust der Zellvitalität. Hierbei erreichten T und LG einen Verlust von ca. 60 % nach 7 d, UG

von ca. 99 %. Im Vergleich der beiden Luxatemp[®]-Gruppen zeigte sich durch die Behandlung des Provisorienkunststoffes mit dem Versieglerlack eine signifikant verringerte Biokompatibilität, welche sich in der deutlich erniedrigten Zellvitalität widerspiegelte. Diese erniedrigte Zellverträglichkeit konnte jedoch im gleichen Maße bei der Gruppe Trim[®] festgestellt werden. Aufgrund der in Vorstudien evaluierten geringeren Oberflächenrauigkeit und Plaqueakkumulation, sowie der im Vergleich zur herkömmlichen Politur reduzierten Bearbeitungszeit, kann somit die Verwendung von Luxatemp[®] Glaze & Bond zur Oberflächenversiegelung und –vergütung empfohlen werden. Jedoch ist bei Verwendung des Lackes darauf zu achten, dass dieser nach Herstellerangaben außerhalb des Mundes benutzt wird, um eine vollständige Polymerisation der in dieser Studie festgestellten zytotoxischen Monomere zu gewährleisten.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten wurden im Rahmen der 60. Jahrestagung der DGPro im Mai 2011 in Hamburg als Poster präsentiert.

6. Literaturverzeichnis

- Agarwal S, Chandra CS, Piesco NP, Langkamp HH, Bowen L, Baran C. Regulation of periodotal ligament cell functions by interleukin-1 β . *Infect Immun* 1998; 66: 932-937
- Alanko K, Kanerva L, Jolanki R, Knnas L, Estlander T. Oral mucosal diseases investigate by patch testing with dental screening series. *Contact Dermatitis* 1996; 34: 263-267
- Al-Hiyasat AS, Darmani H, Milhem MM. Cytotoxicity evaluation of dental resin composite and and their flowable derivatives. *Clin Oral Investig* 2005; 9: 21-25
- Anders A, Welker D. Untersuchung von Kronen- und Brückenplasten für die Interimsversorgung. *Dtsch Zahnärztl Z* 1990; 45: 149-153
- Arora PD, McCulloch CA. Dependence of collagen remodelling on alpha-smooth muscle actin expression by fibroblasts. *J Cell Physiol* 1994; 159: 161-175
- Atsumi T, Fujisawa S, Tonosaki K. (Meth)acrylate monomer-induced cytotoxicity and intracellular Ca²⁺ mobilization in human salivary gland carcinoma cells and human gingival fibroblast cells related to monomer hydrophobicity. *Biomaterials* 2006; 27: 5794-5800
- Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating Peptide-1/Interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 1989; 84: 1045-1049
- Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* 1992; 307: 97-101
- Balkenhol M, Hannig M, Rupf S, 2011: Materialeigenschaften temporärer K&B-Werkstoffe: Was ist wichtig für die tägliche Praxis? Teil 1. www.zmk-aktuell.de/dynamic/zahnheilkunde/prothetik/story/materialeigenschaften-temporaerer-kb-werkstoffe-was-ist-wichtig-fuer-die-taegliche-praxis-tei.html (Zugriffsdatum: 23/12/2012)
- Bartlett JD, Beniash E, Lee DH, Smith CE. Decreased mineral content in MMP-20 null mouse enamel is prominent during the maturation stage. *J Dent Res* 2004; 83: 909-913
- Basdra E, Komposch G. Osteoblast-like properties of human periodontal ligament cells: an in vitro analysis. *Eur J Orthod* 1997; 19: 615-62
- Basting G. Die Oberflächenbeschaffenheit verschiedener provisorischer Kronen- und Brückenmaterialien vor und nach glättender Bearbeitung. *ZWR* 1985; 94: 402-407
- Beertsen W, McCulloch CAG, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontology* 2000 1997; 13: 20-40

- Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol* 1993; 64: 474-484
- Borchers L, Tavassol F, Tschernitschek H. Surface quality achieved by polishing and varnishing of temporary crown and fixed denture resins. *J Prosthet Dent* 1999; 82: 550-556
- Bral M. Periodontal considerations for provisional restorations. *Dent Clin North Am* 1989; 33: 457-477
- Browne RM, Tobias RS, Plant CG. A method of testing the toxicity of temporary crown and bridge materials. *Biomaterials* 1984; 5: 149-152
- Burke FJ, Murray MC, Shortall AC. Trends in indirect dentistry: 6. Provisional restorations, more than just a temporary. *Dent Update* 2005; 32: 443-452
- Burns DR, Beck DA, Nelson SK. A review of selected dental literature on contemporary provisional fixed prosthodontic treatment: Report of the Committee on Research in Fixed Prosthodontics of the Academy of Fixed Prosthodontics. *J Prosthet Dent* 2003; 90: 474-497
- Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25: 169-193
- Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 2002; 29: 23-39
- Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: An overview. *Mol Cell Biochem* 2003; 253: 269-285
- Darveau KD, Van Dyke TE. The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontol* 1997; 14: 54-78
- Davidi MP, Beyth N, Sterer N, Feuerstein O, Weiss EI. Effect of liquid-polish coating on in vivo biofilm accumulation on provisional restorations: Part 1. *Quintessence Int* 2007; 38: 591-596
- Davidi MP, Beyth N, Weiss EI, Eilat Y, Feuerstein O, Sterer N. Effect of liquid-polish coating on in vitro biofilm accumulation on provisional restorations: Part 2. *Quintessence Int* 2008; 39: 45-49
- Davis S, O'Connell B. The provisional crown. *J Ir Dent Assoc* 2004; 50: 167-72
- Den Besten PK, Yan Y, Featherstone JDB, Hilton JF, Smith CE, Li W. Effects of fluoride on rat dental enamel matrix proteinases. *Archives of Oral Biology* 2002; 47: 763-770
- Dillingham EO, Lawrence WH, Autian J, Schmalz G. Acrylate and methacrylate esters: Relationship of hemolytic activity and in vivo toxicity. *J Biomed Mater Res* 1983; 17: 945-957

- Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 1990; 77: 1627-1652
- Dinarello CA. Proinflammatory Cytokines. *Chest* 2000; 118: 503-508
- Dinarello CA. Interleukin-1 [beta]. *Crit Care Med* 2005; 33: 460-463
- Eckhardt A, Harorli T, Limtanyakul J, Hiller KA, Bosl C, Bolay C, Reichl FX, Schmalz G, Schweikl H. Inhibition of cytokine and surface antigen expression in LPS-stimulated murine macrophages by triethylene glycol dimethacrylate. *Biomaterials* 2009; 30: 1665-1674
- Ehrenberg DS, Weiner S. Changes in marginal gap size of provisional resin crowns after occlusal loading and thermal cycling. *J Prosthet Dent* 2000; 84: 139-148
- Ehrenberg DS, Weiner GI, Weiner S. Long-term effects of storage and thermal cycling on the marginal adaptation of provisional resin crowns: A pilot study. *J Prosthet Dent* 2006; 95: 230-236
- Emmler J, Seiss M, Kreppel H, Reichl FX, Hickel R, Kehe K. Cytotoxicity of the dental composite component TEGDMA and selected metabolic by-products in human pulmonary cells. *Dent Mater* 2008; 24: 1670-1675
- Endo T, Finger WJ, Kanehira M, Utterodt A, Komatsu M. Surface texture and roughness of polished nanofill and nanohybrid resin composites. *Dent mat* 2010; 29: 213-223
- Erpenstein H. Laborgefertigte Interimskronen und -brücken unter parodontalen Gesichtspunkten. *Dtsch Zahnärztl Z* 1994; 49: 222-229
- Ferracane JL, Condon JR. Rate of elution of leachable components from composite. *Dent Mater* 1990; 6: 282-287
- Ferracane JL. Elution of leachable components from composites. *J Oral Rehabil* 1994; 21: 441-452
- Fujii S, Maeda H, Tomokoiyo A, Monnouchi S, Hori K, Wada N, Akamine A. Effects of TGF- β 1 on the proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells and a human periodontal ligament stem/progenitor cell line. *Cell Tissue Res* 2010; 342: 233-242
- Fujisawa S, Atsumi T, Kadoma Y. Cytotoxicity of methyl methacrylate (MMA) and related compounds and their interaction with dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) liposomes as a model for biomembranes. *Oral Diseases* 2000; 6: 215-221
- Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin- 1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol* 2000; 71: 1535-1545

- Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, Silva JS. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21: 12-20
- Gegauff AG, Howay JA. Interim Fixed Restorations. In: Rosenstiel S, Land MF, Fujimoto J, Hrsg. Contemporary fixed prosthodontics. St. Louis: Mosby Elsevier, 2006: 380-416
- Gemmell E, Kjeldsen M, Yamazaki K, Nakajima T, Aldred MJ, Seymour GJ. Cytokine profiles of *Porphyromonas gingivalis*-reactive T lymphocyte line and clones derived from *P. gingivalis* infected subjects. *Oral Dis* 1995; 1: 139-146
- Geurtsen W. Das Einzelzahnprovisorium. *Dtsch Zahnärztl Z* 1994; 49: 217-221
- Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/ additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res* 1998; 41: 474-480 a
- Geurtsen W. Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements. *Eur J Oral Sci* 1998; 106: 687-695 b
- Gladwin M, Bagby M. Direct Polymeric Restorative Materials. In: Gladwin M., Bagby M., Hrsg. Clinical aspects of dental materials: Theory, Practice and Cases. Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott, Williams & Wilkins, 2009: 55-73
- Goon AT, Isaksson M, Zimerson E, Goh CL, Bruze M. Contact allergy to (meth)acrylates in the dental series in southern Sweden: simultaneous positive patch test reaction patterns and possible screening allergens. *Contact Dermatitis* 2006; 55: 219-226
- Gough M. A Review of Temporary Crowns and Bridges. *Dental Update* 1994; 21: 203-207
- Graves DT, Cochran D. The contribution of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2003; 74: 391-401
- Groeneveld MC, Everts V, Beertsen W. Alkaline Phosphatase activity in the periodontal ligament and gingiva of the rat molar: Its relation to cementum formation. *J Dent Res* 1995; 74: 1374-1381
- Grütz G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 3-15
- Guler AU, Kurt S, Kulunk T. Effects of various finishing procedures on the staining of provisional restorative materials. *J Prosthet Dent* 2005; 93: 453-458

- Gusman H, Santana RB, Zehnder M. Matrix-Metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically health and inflamed human dental pulps. *Eur J Oral Sci* 2002; 110: 353-357
- Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontologica Scandinavica*, 2007; 65: 1-13
- Hansasuta C, Neiders NE, Aguirre A, Cohen RE. Cellulare inflammatory response to direct restorative composite resins. *J Prosthet Dent* 1993; 69: 611-616
- Haselton DR, Diaz-Arnold AM, Vargas MA. Flexural strength of provisional crown and fixed partial denture resins. *J Prosthet Dent* 2002; 87: 225-228
- Haselton DR, Diaz-Arnold AM, Dawson DV. Effect of storage solution on surface roughness of provisional crowns and fixed partial denture materials. *J Prosthodont* 2004; 13: 227-232
- Helfgen EH, Helfgen L, Koeck B, Schoenen D, Wiedemann B. Intraorale Bakterienbesiedlung von temporären Kunststoffen. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 1995; 105: 629-632
- Hohmann A, Hieschler W. Kunststoffe. In: Hohmann A, Hieschler W, Hrsg. *Lehrbuch der Zahn-technik Band 3*. Berlin: Quintessenz-Verlag GmbH, 2005: 230-269
- Hung CM, Weiner S, Dastane A, Vaidyanathan TK. Effects of thermocycling and occlusal force on the margins of provisional acrylic resin crowns. *J Prosthet Dent* 1993; 69: 573-577
- Ibelgaufts H, 2002: Horst Ibelgaufts Cope: cytokine online pathfinder encyclopaedia. www.copewithcytokines.de (Zugriffsdatum: 17/11/2012)
- Isaka J, Ohazama A, Kobayashi M, Nagashima C, Takiguchi T, Kawasaki H, Tachikawa T, Hasegawa K. Participation of Periodontal Ligament Cells with regeneration of alveolar bone. *J Periodontol* 2001; 72: 314-323
- Issa Y, Watts DC, Brunton PA, Waters CM, Duxbury AJ. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. *Dental Mater* 2004; 20: 12-20
- Janda R. Chemie und Physik der Zahnärztlichen Kunststoffe. In: Eichner K, Kappert HF, Hrsg. *Zahnärztliche Werkstoffkunde und ihre Verarbeitung – Band 1 Grundlagen und Verarbeitung*. Stuttgart: Thieme, 2005: 173-210
- Jimi E, Akiyama S, Tsurukai T, Okahashi N, Kobayashi K, Udagawa N, Nishihara T, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *J Immunol* 1999; 163: 434-442
- Jönsson D, Wahlin A, Idvall I, Johnsson I, Bratthall G, Nilsson BO. Differential effects of estrogen on DNA synthesis in human periodontal ligament and breast cancer cells. *J Periodontal Res* 2005, 40: 401-406

- Jönsson D, Nebel D, Bratthall G, Nilsson BO. LPS-induced MCP-1 and IL-6 production is not reversed by oestrogen in human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol* 2008; 53: 896-902
- Jönsson D, Nebel D, Bratthall G, Nilsson BO. The human periodontal ligament cell: a fibroblast-like cell acting like an immune cell. *J Periodont Res* 2011; 46: 153-157
- Kaiser DA. Accurate acrylic resin temporary restorations. *J Prosthet Dent* 1978; 39: 158-161
- Karneva L. Cross-reactions of multifunctional methacrylates and acrylates. *Acta odontol Scand* 2001; 59: 320-329
- Käyser AF, Creugers NH, Plamans PJ, Postema N, Snoek PA. Die Provisorische Versorgung. In: Käyser AF, Creugers NH, Plamans PJ, Postema N, Snoek PA, Hrsg. Kronen- und Brückenprothetik. Behandlungsplanung, Indikation, Ausführung, Langzeitbewahrung. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag 1997: 159-172
- Ke LD, Chen Z, Yung WK. A reliability test of standard-based quantitative PCR-exogenous vs endogenous standards. *Mol Cell Probes* 2000; 14: 127-135
- Klötzer WT. Biokompatibilität zahnärztlicher Materialien. *Dtsch Zahnärztl Z* 1989; 44: 822-825
- Klötzer WT, Langeland K. Vitalerhaltung der Pulpa bei Überkronungen. *Zahnärztl Mitt* 1986; 76: 2272-2278
- Kraus D, Jäger A, Abuduwali N, Deschner J, Lossdörfer S. Intermittent PTH(1-34) signals through protein kinase a to regulate osteoprotegerin production in human periodontal ligament cells in vitro. *Clin Oral Invest* 2012; 16: 611-618
- Kühnel W. Binde- und Stützgewebe. In: Kühnel W, Hrsg. Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischer Anatomie. Stuttgart, New York: Thieme 2002: 100-157
- Kuru L, Parkar MH, Griffiths GS, Newman HN, Olsen I. Flow cytometry analysis of gingival and periodontal ligament cells. *J Dent Res* 1998; 77: 555-564
- Kuthar M, Funduk N. Effects of polishing techniques on the surface roughness of acrylic denture base resins. *J Prosthet Dent* 2005; 93: 76-85
- Labban N, Song F, Al-Shibany N, Windsor LJ. Effects of provisional acrylic resins on gingival fibroblast cytokine/ growth factor expression. *J Prosthet Dent* 2008; 100: 390-397
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliot G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93: 165-176

- 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. *J Oral Rehabil* 2004; 31: 1165-1172
- Langeland, K. Penetration of silver nitrate and H3-tagged monomers through dentinal tubules. *Am Inst Oral Biol* 1966; 23: 91-94
- Lee SY, Freener EH, Menis DL. Detection of leached moieties from dental composites in fluids stimulating food and saliva. *Dent Mater* 1995; 11: 348-353
- Lehman F, Leyhausen G, Spahl W, Geurtsen W. Vergleichende Zellkultur-Untersuchungen von Kompositbestandteilen auf Zytotoxizität. *Dtsch Zahnärztl Z* 1993; 48: 651-653
- Lekic P, McCulloch CAG. Periodontal ligament cell populations: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec* 1996; 245: 327-341
- Lekic P, Sodek J, McCulloch CAG. Relationship of cellular proliferation to expression of osteopontin and bone sialoprotein in regenerating rat periodontium. *Cell Tissue Res* 1996; 258: 491-500
- Lekic P, Rojas J, Birek C, Tenebaum H, McCulloch CAG. Phenotypic comparison of periodontal ligament cells in vivo and in vitro. *J Periodont Res* 2001; 36: 71-79
- Lenz E, Lang V. Vergleichende Untersuchungen biologischer Eigenschaften von Kunststoffen zur temporären Versorgung mit Kronen und Brücken. *Stomatol DDR* 1990; 40: 100-102
- Lindström M, Alanko K, Keskinen H, Kanerva L. Dentist's occupational asthma, rhinoconjunctivitis, and allergy contact dermatitis from methacrylates. *Allergy* 2002; 57: 543-545
- Löffler G, Schölmerich J. Hormone und Zytokine. In: Löffler G, Schölmerich J, Hrsg. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. Heidelberg: Springer, 2008: 321-364
- Loos BG, John RP, Laine ML. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 159-179
- Lossdörfer S, Götz W, Jäger A. PTH (1-34)-induced changes in RANKL and OPG expression by human PDL cells modify osteoclast biology in a co-culture model with RAW 264.7 cells. *Clin Oral Invest* 2011; 15: 941-952
- Lui Y, Loftenius A, ELGhazali G, Troye-Blomberg M, Ma S, Ekstrand J. Differential regulation of in vitro cytokine production by human blood cells in response to methylmethacrylate. *J Toxicol Environ Health A* 1999; 56: 165-182
- Manojlovic D, Radisic M, Vasiljevic T, Zikovic S. Monomer elution from nanohybrid and ormocer-based composites cured with different light sources. *Dent Mater* 2011; 27: 371-378

- McCulloch CAG. Host enzymes in gingival crevicular fluid as diagnostic indicators of periodontitis. *J Clin Periodontol* 1994; 21: 497-506
- Michelsen VB, Lygre H, Skalevik R, Tveit AB, Solheim E. Identification of organic eluates from four polymer-based dental filling materials. *Eur J Oral Sci* 2003; 111: 263-271
- Moharamzadeh K, Van Noort R, Brook IM, Scutt AM. Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *Dent Mat* 2007; 23: 40-44
- Morandini ACF, Sipert CR, Ramos-Junior ES, Brozoski DT, Santos CF. Periodontal ligament and gingival fibroblasts participate in the production of TGF- β , interleukin (IL)-8 and IL-10. *Braz Oral Res* 2011; 25: 157-162
- Mossmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983; 65: 55-63
- Moulding MB, Teplitsky PE. Intrapulpal temperature during direct fabrication of provisional restorations. *Int J Prosthodont* 1990; 3: 299-304
- Mues S, Helfgen EH, Stark H, Bayer S. Bakterielle Besiedlung der Oberfläche von provisorischen Kronen und Brücken. *Dtsch Zahnärztl Z* 2008; 63: 201-205
- Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, Morinaga T, Higashio K. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253: 395-400
- Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 21491-21494
- Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, Muneta T, Ishikawa I. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J Periodont Res* 2006; 41: 303-310
- Narayanan AS, Page RC. Connective tissues of the periodontium: a summary of current work. *Coll Relat Res* 1983; 3: 33-64
- Nikkari ST, O'Brian KD, Ferguson M, Hatsukami T, Welgus HG, Alpers CE, Clowes AW. Interstitial Collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis. *Circulation* 1995; 92: 1392-1398
- Okada N, Kobayashi M, Mugikura K, Okamoto Y, Hanazawa S, Kitano S, Hasegawa K. Interleukin-6 production in human fibroblasts derived from periodontal tissues is differentially regulated by cytokines and a glucocorticoid. *J Periodont Res* 1997; 32: 559-569
- O'Neill LAJ. IL-1 versus TNF in arthritis?. *Trends Immunol* 2001; 22: 353-354
- O'Neill LAJ, Dinarello CA. The IL-1 receptor/ toll -like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol Today* 2000; 21: 206-209

- Ortengren U, Wellendorf H, Karlsson S, Ruyter IE. Water sorption and solubility of dental composites and identification of monomers released in an aqueous environment. *J Oral Rehabil* 2001; 28: 1106-1115
- Ozen J, Atay A, Beydemir B, Serdar MA, Ural AU, Dalkiz M, Soysal Y. In vitro IL 1 β release from gingival fibroblasts in response to pure metals, dental alloys and ceramic. *J oral Rehabil* 2005; 32: 511-517
- Padbury A, Eber R, Wang HL. Inreactions between the gingiva and the margins of restorations. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 379-385
- Paravina RD, Roeder L, Lu H, Vogel K, Powers JM. Effect of finishing and polishing procedures on surface roughness, gloss and color of resin-based composites. *Am J Dent* 2004; 17: 262-266
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl Acids Res* 2001; 29: 2002-2007
- Pfeiffer P, Schwickerath H. Provisorische Kronen- und Brückenmaterialien. *Dtsch Zahnärztl Z* 1988; 43: 552-557
- Pichler WJ, Peter HH. Zytokine. In: Siegenthaler W, Blum HE, Hrsg. *Klinische Pathophysiologie*. Stuttgart: Thieme, 2006; 530-537
- Pinkerton MN, Wescott DC, Gaffey BJ, Beggs KT, Milne TJ. Cultured human periodontal ligament cells constitutively express multiple osteotropic cytokines and growth factors, several of which are responsive to mechanical deformation. *J Periodont Res* 2008; 43: 343-351
- Polydorou O, Trittler R, Hellwig E, Kümmerer K. Elution of monomers from two conventional dental composite materials. *Dent Mater* 2007; 23: 1535-1541
- Polydorou O, Hammad M, König A, Hellwig E, Kümmerer K. Release of monomers from different core build-up materials. *Dent Mater* 2009; 25: 1090-1095
- Reichl FX, Esters M, Simon S, Seiss M, Kehe K, Kleinsasser N, Folwaczny M, Glas J, Hickel R. Cell death effects of resin-based material compounds and mercurial in human gingival fibroblasts. *Arch Toxicol* 2006; 80: 370-377
- Reichl FX. Neue Forschung zur Komposit-Toxikologie. *ZM* 2011; 101: 1426-1430
- Reynolds JJ, Meikle MC. Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontol* 2000 1997; 14: 144-157
- Ryzanny A, Welker D, Göbel R. Werkstoffkundlicher Vergleich temporärer K&B- Kunststoffe. *Phillip Journal* 1996; 13: 357-366

- Saffarian S, Collier IE, Marmer BL, Elson EL, Goldberg G. Interstitial Collagenase is a Brownian ratchet driven by proteolysis of collagen. *Science* 2004; 306: 108-111.
- Saunders WB, Bayless KJ, Davis GE. MMP-1 activation by serine proteases and MMP-10 induces human capillary tubular network collapse and regression in 3D collagen matrices. *J Cell Sci* 2005; 118: 2325-2340
- Schmalz G, Schweikl H, Hiller KA. Release of prostaglandin E₂, IL-6 and IL-8 from human oralepithelial culture models after exposure to compounds of dental materials. *Eur J Oral Sci* 2000; 108: 442-448
- Schmitz S. Zellkulturen, Zelllinien und deren Einsatzmöglichkeiten. In: Schmitz S, Hrsg. *Der Experimentator – Zellkultur*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 2011: 71-86
- Schroeder HE. Entwicklung und Struktur des Zahnhalteapparates. In: Schroeder HE, Hrsg. *Orale Strukturbiologie - Entwicklungsgeschichte, Struktur und Funktion normaler Hart- und Weichgewebe der Mundhöhle und des Kiefergelenks*. Stuttgart: Thieme, 2000: 187-292
- Schweikl H, Hiller KA, Bolay C, Kreissl M, Kreismann W, Nusser A, Steinhäuser S, Wiczorek J, Vasold R, Schmalz G. Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. *Biomaterials* 2005; 26: 1713-1719
- Schytte Blix IJ, Helgeland K, Hvattum E, Lyberg T. Lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* stimulates production of interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in human whole blood. *J Periodont Res* 1999; 34: 34-40
- Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. Evaluation of a soluble Tetrazolium/Formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 1988; 48: 4827-4833
- Sideridou ID, Achilias DS. Elution study of unreacted Bis-GMA, TEGDMA, UDMA, and Bis-EMA from light-cured dental resins and resin composites using HPLC. *Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2005; 74B: 617-627
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89: 309-319

- Somermann MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA. A comparative Study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res* 1988; 67: 66-70
- Sorsa T, Tjäderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, Golub LM, Brown DL, Mäntylä P. Matrix metalloproteinases: Contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Annals of Medicine* 2006; 38: 306-321
- Spagnuolo G, Galler K, Schmalz G, Cosentino C, Rengo S, Schweikel H. Inhibition of Phosphatidylinositol 3-Kinase Amplifies TEGDMA-induced Apoptosis in Primary Human Pulp Cells. *J Dent Res* 2004; 83: 703-707
- Spahl W, Budzikiewicz H, Geurtsen W. Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry. *J Dent* 1998; 26: 137-145
- Sulkala M, Lamas M, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L. The localization of matrix-metalloproteinase-20 (MMP-20, Enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res* 2002; 81: 603-607
- Taira M, Nakao H, Matsumoto T, Takahashi J. Cytotoxic effect of methyl methacrylate on 4 cultured fibroblasts. In *J Prosthodont* 2000; 13: 311-315
- Tanaka K, Taira M, Shintaki H, Wakasa K, Yamaki M. Residual monomers (TEGDMA and Bis-GMA) of a set visible-light-cures dental composite resin when immersed in water. *J Oral Rehabil* 1991; 18: 353-362
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 1999; 75: 291-295
- Thomas JP, Geiger PG, Girotti AW. Lethal damage to endothelial cells by oxidized low density lipoprotein: role of selenoperoxidases in cytoprotection against lipid hydroperoxide- and ionmediated reactions. *J Lipid Res* 1993; 34: 479-490
- Tjan AH, Grant BE. Marginal accuracy of temporary composite crowns. *J Prosthet Dent* 1987; 58: 417-421
- Tsuchiya H, Hoshino Y, Tajima K, Takagi N. Leaching and cytotoxicity of formaldehyde and methyl methacrylate from acrylic resin denture base materials. *J Prosthet Dent* 1994; 71: 618-624
- Uchiyama M, Nakamichi Y, Nakamura M, Kinugawa S, Yamada H. Dental pulp and periodontal ligament cells support osteoclastic differentiation. *J Dent* 2009; 88: 609-614

- Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontol* 2000 2003; 31: 77-104
- Urcan E, Scherthan H, Stylo M, Haertel U, Hickel R, Reichl FX. Induction of DNA double-strand breaks in primary gingival fibroblasts by exposure to dental resin composites. *Biomaterials* 2010; 31: 2010-2014
- Vahidi E. The provisional restoration. *Dent Clin North Am* 1987; 31: 363-381
- Vandesompele J, De Preter K, Paltyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by genomic averaging of multiple internal control genes. www.genomebiology.com/2002/3/7/research/0034 (Zugriffsdatum: 02/02/2012)
- Visse R, Nagase H. Matrix Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. Structure, Function and Biochemistry. *Circ Res* 2003; 92: 827-839
- Wada H, Tarumi H, Imazato S, Narimatsu M, Ebisu S. In vitro estrogenicity of resin composites. *J Dent Res* 2004; 83: 222-226 a
- Wada N, Maeda H, Yoshimine Y, Akamine A. Lipopolysaccharide stimulates expression of osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappa B ligand in periodontal-ligament fibroblasts through the induction of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *Bone* 2004; 35: 629-635 b
- Wahlgren J, Salo T, Teronen O, Luoto H, Sorsa T, Tjäderhane L. Matrix-Metalloproteinase-8 (MMP-8) in pulpa and periapical inflammation and periapical root-canal exudates, *Int Endod J* 2002; 35: 897-904
- Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem* 1995; 16: 9558-9563
- Wang RL, Moore BK, Goodacre CJ, Swartz ML, Andres CJ. A comparison of resins for fabricating provisional fixed restorations. *Int J Prosthodont* 1989; 2: 173-184
- Wassell RW, George GS, Ingledew RP, Steele JG. Crowns and other extracoronary restorations: provisional restorations. *British Dent J* 2002; 192: 619-630
- Wataha JC, Lockwood PE, Bouillaguet S, Noda M. In vitro biological response to core and flowable dental restorative materials. *Dent Mater* 2003; 19: 25-31
- Weber H. Präparation und temporäre Versorgung. In: Koek B, Hrsg. Kronen- und Brückenprothetik. München: Urban & Fischer Verlag, 1999: 93-134

- Weiß U. Untersuchung zur Oberflächenrauigkeit von Kunststoffen zur Herstellung von provisorischen Kronen und Brücken. Inaugural-Dissertation, Medizinisches Dekanat, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2008
- Welker D. Kunststoffe für die temporäre Versorgung. In: Meiners H, Lehmann KM, Hrsg. Klinische Materialkunde für Zahnärzte. München, Wien: Hanser 1998: 325-336
- Welker D, Rzanny A, Göbel R. Interimsversorgung bei Kronen- und Brückenersatz – Indikation, Werkstoffe, biologische Aspekte, Methodik. Quintessenz Zahntech 1999; 25: 1133-1144
- Werner H, Weiland M. Zum Einfluss der Oberflächenbearbeitung und der chemischen Zusammensetzung auf die Korrosion von Dental-Amalgamen. Mater Corros 1990, 41: 210-214
- Windmüller B. Direkte provisorische Versorgung – ein kurzer Überblick. Quintessenz Zahntech 1999; 25: 1145-1154
- Wirz J, Bangert R, Jäger K. Kronen- und Brückenprovisorien Teil 1: Anforderungen. Quintessenz 1992; 43: 1297-1305 a
- Wirz J, Bangert R, Jäger K. Kronen- und Brückenprovisorien Teil 3: Provisorienkunststoffe und ihre Eigenschaften. Quintessenz 1992; 43: 1647-1661 b
- Xiang J, Li C, Dong W, Cao Z, Liu L. Expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-2 and extracellular metalloproteinase inducer in human periodontal ligament cells stimulated with interleukin-1beta. J Periodont Res 2009: 44: 784-793
- Yamazaki K, Nakajima T, Kubota Y, Gemmell E, Seymour GJ, Hara K. Cytokine messenger RNA expression in chronic inflammatory periodontal disease. Oral Microbiol Immunol 1997; 12: 281-287
- Yannikakis SA, Zissis AJ, Polyzois GL, Caroni C. Color stability of provisional resin restorative materials. J Prosthet Dent 1998; 80: 533-539
- Yoshii E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: Relationships of monomer structures and cytotoxicity. J Biomed Mater Res 1997; 37: 517-524

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Stark, Direktor der Poliklinik für zahnärztliche Prothetik, Propädeutik und Werkstoffwissenschaften des Zentrums für Mund-, Kiefer- und Zahnheilkunde der Universität Bonn, danke ich herzlich für die Bereitstellung des Themas.

Herrn Dr. J. Winter, Diplombiologe und Leiter des zell- und molekularbiologischen Labors der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und präventive Zahnheilkunde des Zentrums für Mund-, Kiefer- und Zahnheilkunde der Universität Bonn, und seinem Team danke ich für die Bereitstellung der Primer und die Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. D. Kraus bedanken. Durch seine kompetente Anleitung und Erfahrungen im Labor, sowie im Verfassen wissenschaftlicher Arbeiten, war er mir eine große Hilfe bei allen Fragen. Danke für die qualifizierten und kritischen Ratschläge, für die unermüdlichen Korrekturen und den großen persönlichen Einsatz.

Meinen Eltern, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, danke ich von ganzem Herzen. Ihre Unterstützung und Förderung stärken mich in allem was ich tue. Nicht ungenannt sollen Lena und Justus bleiben, danke für die Geduld und Ablenkung.