

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR
ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE

DIREKTOR: PROF. DR. G. SCHMALZ

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**TOXIZITÄT VON GLUTARALDEHYD UND DEREN REDUKTION
DURCH QUERVERNETZUNG MIT BOVINEM KOLLAGEN UND
DENTIN IN CHEMISCHEN UND ZELLBIOLOGISCHEN VERFAHREN**

INAUGURAL – DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES

DER ZAHNMEDIZIN

DER

MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VORGELEGT VON
ANDREAS ZIELINSKI
AUS FREYSTADT

2010

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Gottfried Schmalz

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

Tag der mündlichen Prüfung:

03. Februar 2010

Meinen Eltern, meinem Bruder und Tobias

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Literaturübersicht | 2 |
| 2.1 | Glutaraldehyd..... | 2 |
| 2.1.1 | Allgemeines | 2 |
| 2.1.2 | Chemische und physikalische Eigenschaften..... | 2 |
| 2.1.3 | Untersuchungen zur Toxizität, Allergenität und Kanzerogenität von Glutaraldehyd..... | 3 |
| 2.2 | Kollagen..... | 4 |
| 2.2.1 | Allgemeines | 4 |
| 2.2.2 | Struktur | 5 |
| 2.2.3 | Synthese..... | 6 |
| 2.2.4 | Vorkommen des Kollagens im Dentin..... | 8 |
| 2.2.5 | Dentin – Zusammensetzung..... | 8 |
| 2.2.6 | Rinderdentin..... | 8 |
| 2.2.7 | Vorbehandlung von Dentinoberflächen..... | 9 |
| 2.3 | Kollagenquervernetzungsreaktion mit Aldehyden..... | 9 |
| 2.4 | Glutaraldehyd auf Dentin..... | 10 |
| 2.5 | Bestimmung freier Aminogruppen durch Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) –Test . | 13 |
| 2.6 | Bestimmung von Aldehyden durch Purpald [®] <i>in vitro</i> | 14 |
| 2.7 | Zellkulturverfahren – Die Agardiffusionsprüfung..... | 16 |
| 3 | Fragestellung | 18 |
| 4 | Material und Methoden | 19 |
| 4.1 | Material | 19 |
| 4.1.1 | Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)-Test | 19 |
| 4.1.1.1 | Chemikalien | 19 |
| 4.1.1.2 | Hilfsmittel und Geräte..... | 19 |
| 4.1.2 | Purpald [®] -Test..... | 20 |
| 4.1.2.1 | Chemikalien | 20 |
| 4.1.2.2 | Hilfsmittel und Geräte..... | 20 |
| 4.1.3 | Agardiffusionstest..... | 20 |
| 4.1.3.1 | Zellen | 20 |
| 4.1.3.2 | Chemikalien | 20 |
| 4.1.3.3 | Lösungen | 21 |
| 4.1.3.4 | Hilfsmittel und Geräte..... | 23 |
| 4.1.4 | In allen Tests benutzte Chemikalien und Lösungen..... | 23 |
| 4.1.5 | Testmaterial | 24 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.1.6 | Probenkörper: porkines Kollagen | 24 |
| 4.1.7 | Probenkörper: bovines Kollagen..... | 24 |
| 4.1.7.1 | Collatamp® der Firma Innocoll/ Saal a.d. Donau..... | 24 |
| 4.1.7.2 | Bovines Dentin im Originalzustand..... | 25 |
| 4.1.7.3 | Bovines Dentin im demineralisierten Zustand..... | 25 |
| 4.1.8 | Zusammenfassung der Testverfahren und Testmaterialien | 25 |
| 4.1.9 | Makroskopische Aufnahmen der drei Kollagenformen..... | 25 |
| 4.1.10 | Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der drei Kollagenformen..... | 26 |
| 4.2 | Methoden | 28 |
| 4.2.1 | Herstellung der Probenkörper | 28 |
| 4.2.1.1 | Collatamp® | 28 |
| 4.2.1.2 | Bovines Dentin, Originalzustand | 28 |
| 4.2.1.3 | Bovines Dentin, demineralisiert..... | 29 |
| 4.2.2 | TNBS- Versuche | 29 |
| 4.2.2.1 | Versuchsvorbereitung | 30 |
| 4.2.2.2 | Versuchsdurchführung | 31 |
| 4.2.3 | Purpald®- Versuche..... | 31 |
| 4.2.3.1 | Versuchsvorbereitung | 32 |
| 4.2.3.2 | Versuchsdurchführung | 32 |
| 4.2.4 | Agardiffusions-Versuche | 33 |
| 4.2.4.1 | Versuchsvorbereitung | 33 |
| 4.2.4.2 | Versuchsdurchführung | 34 |
| 4.2.5 | REM-Analyse | 35 |
| 4.2.6 | Statistik – Präsentation der Graphen..... | 36 |
| 5 | Ergebnisse..... | 37 |
| 5.1 | Charakterisierung der Kollagensubstrate nach Reaktion mit Glutaraldehyd durch den TNBS Test | 37 |
| 5.1.1 | Vorversuche..... | 37 |
| 5.1.1.1 | Festlegung der Aldehydkonzentrationen | 37 |
| 5.1.1.2 | Ermittlung des Probengewichtes | 37 |
| 5.1.1.3 | Modellversuch Dentinbestandteile..... | 38 |
| 5.1.1.4 | Zustand und Form der Dentinprobe..... | 39 |
| 5.1.2 | Bestimmung der Aminogruppen aller verwendeten Materialien | 40 |
| 5.1.3 | Individuelle Parameter des Rinderdentins | 41 |
| 5.1.3.1 | Interindividuelle Unterschiede | 42 |
| 5.1.3.2 | Unterschiede zwischen Zähnen des gleichen Individuums..... | 42 |
| 5.1.3.3 | Lokalisation der Probenentnahme..... | 42 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5.1.3.4 | Bedeutung für den Versuch..... | 42 |
| 5.1.4 | Zustand des Dentins vor der Bestimmung der Masse | 43 |
| 5.1.5 | Innocoll-Schwamm reagiert mit wässriger Glutaraldehydlösung | 44 |
| 5.1.5.1 | Bedeutung des Versuchs | 44 |
| 5.1.5.2 | Volumen der Aldehyd-Lösung: 15 µl | 46 |
| 5.1.5.3 | Volumen der Aldehyd-Lösung: 2,0 ml..... | 47 |
| 5.1.6 | Bovines Dentin reagiert mit wässriger Glutaraldehydlösung | 48 |
| 5.1.6.1 | Volumen der Aldehyd-Lösung: 15 µl | 48 |
| 5.1.6.2 | Volumen der Aldehyd-Lösung: 2,0 ml..... | 49 |
| 5.2 | Bestimmung freier Glutaraldehyd-Moleküle nach Reaktion mit Kollagen und Dentin durch den Purpald® Test..... | 50 |
| 5.2.1 | Vorversuch – Bestimmen einer Eichgeraden..... | 51 |
| 5.2.2 | Hauptversuche | 52 |
| 5.2.2.1 | Stoffmenge absolut | 53 |
| 5.2.2.2 | Prozentual zur Ausgangsstoffmenge..... | 55 |
| 5.2.2.3 | Pro Kollageneinwaage | 57 |
| 5.3 | Bestimmung der Zytotoxizität von Glutaraldehyd nach Durchtritt durch Kollagen/Dentin mit dem Agar-Overlay Test | 58 |
| 5.3.1 | Innocoll®-Kollagen als Diffusionsbarriere..... | 60 |
| 5.3.2 | Bovines Dentin im Originalzustand als Diffusionsbarriere..... | 61 |
| 5.3.3 | Demineralisiertes bovines Dentin als Diffusionsbarriere | 62 |
| 5.3.4 | Wirkung des Glutaraldehyds ohne Diffusionsbarriere | 63 |
| 5.3.5 | Vergleich der Materialien..... | 64 |
| 6 | Diskussion | 65 |
| 6.1 | Diskussion der Methodik | 65 |
| 6.1.1 | Chemische Verfahren..... | 65 |
| 6.1.1.1 | TNBS-Test..... | 65 |
| 6.1.1.2 | Purpald®-Test..... | 66 |
| 6.1.2 | Zellbiologisches Verfahren | 66 |
| 6.2 | Diskussion der verwendeten Materialien | 67 |
| 6.3 | Zytotoxizität und Mutagenität von Glutaraldehyd | 68 |
| 6.4 | Beispielhafte Übertragung der Ergebnisse auf die klinische Situation..... | 71 |
| 6.5 | Schlussfolgerung..... | 76 |
| 6.6 | Ausblicke und weitere Forschungsansätze..... | 78 |
| 7 | Zusammenfassung..... | 79 |
| 8 | Abkürzungsverzeichnis | 80 |
| 9 | Literaturverzeichnis | 81 |

| | | |
|-----------|------------------------|-----------|
| 10 | Danksagung..... | 89 |
| 11 | Lebenslauf..... | 90 |

1 Einleitung

Ein Ziel der modernen Zahnheilkunde besteht in dem ständigen Bestreben, verbesserte Restaurationsmaterialien zu finden. Die Zusammensetzung bereits bestehender Werkstoffe wird stets neu überarbeitet hinsichtlich Kriterien wie Belastbarkeit, Ästhetik oder Anwenderfreundlichkeit. Mit zu den Materialien, die mittlerweile am häufigsten Veränderungen durch ihre Hersteller erfahren, gehört die Gruppe der Komposite. Noch fehlen für diese die Langzeiterfahrungen, da sie verglichen etwa mit den Amalgamen zu den recht „jungen“ Füllungswerkstoffen gehören.

Immer wieder jedoch werden in Fachkreisen Fragen laut nach möglichen enthaltenen Allergenen oder den toxischen Wirkungen einzelner Bestandteile. Dass sich aber sogar Krankheitsbilder wie z.B. Krebs oder Unfruchtbarkeit auf unerwünschte Nebenwirkungen bei heutigen Kompositen und Versiegelungsmaterialien zurückführen lassen, konnte wissenschaftlich bis jetzt nicht erwiesen werden.

In der Regel werden heute Komposite zusammen mit sog. Dentinadhäsiven eingesetzt. Diese Haftvermittler enthalten neben Kunststoffverbindungen und Säuren auch Aldehyde. Ein Vertreter dieser Gruppe ist das Glutaraldehyd, das in einigen Zubereitungen Anwendung findet. Beim Auftragen in der Kavität kommt es in unmittelbarem Kontakt mit freigelegten Dentinoberflächen und reagiert mit diesen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass sich Kollagene mit Aldehyden quervernetzen können. Kollagen ist auch ein wesentlicher Bestandteil des Dentins. Die Klärung der Frage, ob, und wenn ja, in welchem Ausmaß hier eine Vernetzung zustande kommt, ist ein Ziel dieser *in vitro* Studie. Ferner soll dabei untersucht werden, ob durch eine Reaktion mit dem Kollagen des Dentins die toxische Wirkung von Glutaraldehyd für die umliegenden Zellen verringert werden kann.

Um dem Ausmaß der Quervernetzungsreaktion in Abhängigkeit von der Konzentration und den Auswirkungen hiervon auf die Spur zu kommen, wurden zwei chemische und eine zellbiologische Versuchsanordnung gewählt, die sich zu einem Gesamtüberblick ergänzen sollen. Verwendet wurde ferner Kollagen bovinen Ursprungs, für das eine gute Vergleichbarkeit mit humanem Dentin beschrieben ist.

2 Literaturübersicht

2.1 Glutaraldehyd

2.1.1 Allgemeines

Durch sein breites Einsatzspektrum auf dem Gebiet der kosmetischen Industrie und in der Medizin wird Glutaraldehyd seit langem zur Konservierung und Desinfektion von Geräten und Instrumenten benutzt. Hier schätzt man die antimikrobielle Wirkung, da es bakterizid, sporizid, fungizid und viruzid wirkt [39, 48, 56, 70]. Seine beiden Aldehydgruppen bedingen eine hohe Reaktivität, was u.a. auch bei chemischen Synthesen von Heterozyklen und Ringverbindungen ausgenutzt wird. In starker Verdünnung wirkt es auch gegen korrosionsverursachende Bakterien. In der Elektronen- und Lichtmikroskopie wird es als Fixativ für biologische Gewebe angewandt. Außerdem findet man es noch als Gerbmittel für Leder und als Härter für Gelatine. Letztere Anwendungen beruhen auf der Fähigkeit, mit Proteinen durch Quervernetzung zu reagieren [77].

2.1.2 Chemische und physikalische Eigenschaften

Glutaraldehyd, auch als Glutardialdehyd oder 1,5-Pentandial bezeichnet, ist eine farblose Flüssigkeit mit scharfem und unangenehmem Geruch. Seine Dämpfe reizen Augen, Atemwege und Haut; die Aufnahme in flüchtiger Form oder durch Hautkontakt führt leicht zu Vergiftungen.

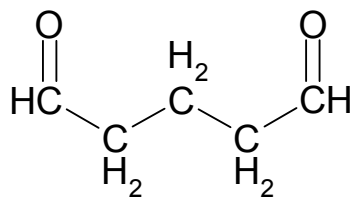


Abbildung 1: Strukturformel Glutaraldehyd

Glutaraldehyd besitzt die Eigenschaft, zu dimerisieren und polymerisieren. Das bedeutet, dass sich zwei Aldehyd-Moleküle über Aldolisation bzw. Aldolkondensation zu einem verbinden.

Ruijgrok et al. [79] untersuchten die Abhängigkeit der Konzentration von freiem Glutaraldehyd in wässrigen Lösungen abhängig von der Temperatur. Es ergab sich ein Anstieg freier Aldehydmonomere sowohl nach Erhitzen durch Mikrowellen als auch durch herkömmliches Erhitzen, weil sich durch die Wärme zyklische Polymere wieder in die Monomere aufspalten. So liegen bei 65 °C 53% freie Monomere vor, bei Raumtemperatur sind es ca. 12%.

2.1.3 Untersuchungen zur Toxizität, Allergenität und Kanzerogenität von Glutaraldehyd

Schon in den 1970er Jahren fanden *Uemitsu et al.* [102] im Tierversuch heraus, dass bei Mäusen, Ratten und Hasen Glutaraldehyd schwerwiegende Effekte auslöste; die LD50 für die untersuchten Tiere betrug 1430 mg/kg KG. *Yang et al.* [106] testeten ein Desinfektionsmittel mit 750 mg pro Liter Glutaraldehyd an Mäusen, konnten dem Desinfektionsmittel allerdings keine nennenswerte Toxizität oder Mutagenität nachweisen. In mit Glutaraldehyd behandeltem Gewebe findet man außer den Quervernetzungen auch unabhängige und adsorbierte Glutaraldehydpolymere, die bei dem physiologischen pH-Wert 7 kaum eine nennenswerte Freisetzung erfahren. Nur im sauren Milieu (pH 3 bis 4) kommt es zu einem Aldehyd-Leakage im Gewebe mit nachgewiesenen Effekten auf Zellen *in vivo* und *in vitro* [92].

Auch interdisziplinär betrachtet werden immer wieder Nebenwirkungen von glutaraldehydhaltigen Medizinprodukten und Arzneimitteln berichtet, wie z. B. kutane Nekrosen bei Warzenbehandlung mit einem 20%igen Glutaraldehydpräparat [71] oder toxische Wirkungen von einem glutaraldehydhaltigen Gewebekleber (BioGlue) auf Mausmyoblasten und menschlichen Embryofibroblasten *in vitro* und auf Lungen-, Leber- und Aortenwandgewebe bei Hasen *in vivo* [24]. In neuerer Zeit werden durch den beschriebenen weiten Einsatzbereich des Glutaraldehyds auf gesundheitlich bedenkliche, aber auch ganz klar dosisbezogene Wirkungen wie Irritationen der Haut und des Respirationstraktes, z.B. chronische Bronchitis durch Inhalation, hingewiesen. Es wurde festgestellt, dass bei Arbeitern, die gasförmigem Glutaraldehyd unter 0,2 ppm ausgesetzt waren, keine Steigerung in Mortalität und Tumoreubildung zu beobachten war. Gemäß den nationalen Bestimmungen zum Arbeitsschutz wurde die Grenzdosis in vielen Ländern in Anbetracht dessen bei 0,05 ppm im Sinne einer **Maximalen Arbeitsplatz-Konzentration (MAK)** festgelegt

[101]. Immer wieder aufmerksam gemacht wird auf die mögliche sensibilisierende Wirkung von Glutaraldehyd auf die Haut mit möglichen allergischen Folgereaktionen. So beschreibt *Takigawa* und *Endo* eine allergische Kontaktdermatitis mit Irritationen und Erythemen bis hin zu Nekrosen und Ödemen bei Exposition rasierter Hasenhaut mit 50% Glutaraldehydlösung für vier Stunden, nicht aber bei 1%. Wurden Mäuse- und Meerschweinchen mit Dosen zwischen 0,3 und 3% Glutaraldehydlösung sensibilisiert, genügte infolge eine Konzentration von nur 10% für eine Kontaktallergie [101]. Ebenso spielt der pH-Wert der Lösung eine Rolle. Ungepufferte Aldehydlösungen besitzen ein höheres Hautreizungspotenzial [96]. *Warshaw et al.* untersuchten zwischen 1998 und 2004 Arbeiter im medizinischen Dienst auf Kontaktallergien und fanden als zweithäufigste Ursache Glutaraldehyd aus Desinfektionslösungen [105].

Letztlich ist auch noch das kanzerogene Potenzial von Glutaraldehyd interessant. In diesem Zusammenhang verglichen *Hester et al.* die Wirkung von Formaldehyd und Glutaraldehyd auf das respiratorische Epithel des Nasenraums von Ratten durch nasale Instillation. Sie stellten fest, dass nach 12 Monaten Tumorbildungen nur bei Formaldehyd zu beobachten waren, bei Glutaraldehyd selbst nach 24 Monaten nicht. Beiden Substanzen gleich waren die Kurzzeitwirkungen auf das Epithel, wie Hyperplasien, schuppige Metaplasien und entzündliche Infiltrate. Sie erklärten die minderschwere kanzerogene Wirkung von Glutaraldehyd mit einer gegenüber Formaldehyd verstärkten toxischen Wirkung: weniger Reparaturen von DNA-Strangbrüchen, höherer Schaden an Mitochondrien und somit verstärkte Zellapoptose reduzieren die Gefahr von Tumorbildungen drastisch [31]. Hingegen konnten *Marczak* und *Jozwiak* nachweisen, dass Glutaraldehyd morphologisch Erythrozyten in Form und Größe verändert [54].

2.2 Kollagen

2.2.1 Allgemeines

Kollagen gehört zur Gruppe der Strukturproteine und ist mit einem Anteil von etwa einem Viertel bei Säugetieren das häufigste Protein. Als Faserbestandteil in der extrazellulären Matrix stabilisiert es Gewebe wie Haut, Sehnen, Knochen, Blutgefäße, Knorpel und Zähne. Speziell in menschlichem Gewebe existieren mehr als 25 verschiedene Arten von Kollagenen, die sich in Zahl, Art und Zusammensetzung der Aminosäureketten unterscheiden. Diese Unterschiedlichkeit der morphologischen Struktur gründet auf der Verschiedenheit der Anforderungen; je nach Funktion werden diverse Typen beobachtet, z.B. Fasern oder Netzwerke [6, 95].

2.2.2 Struktur

Eine Besonderheit des Kollagens stellt der hohe Anteil von Glycin und Prolin dar, sowie das Vorkommen von Hydroxyprolin und Hydroxylysin. Glycin, die einfachste Aminosäure, überrascht mit einem Anteil von fast einem Drittel, Prolin hat einen Anteil von ca. 20% und Hydroxyprolin von ca. 14% [77].

Tropokollagen ist die Grundstruktureinheit; es besteht aus drei Polypeptidketten gleicher Größe. Die Formation zu Tropokollagen wird erreicht durch drei umeinander gewundene α -Helices von ca. 300 nm Länge und ca. 1,5 nm Dicke. Im Innern dieser kompakten Struktur hat also nur eine so kleine Aminosäure wie Glycin Platz, was das überdurchschnittliche Vorkommen erklärt. Die starre Ringstruktur des (Hydroxy-)Prolins limitiert die Drehmöglichkeiten der Peptidkette, sodass zusätzliche Stabilität erreicht wird.

Die α -Helix ist die Sekundärstruktur; sie wird durch eine typische linksgängig gewundene Polypeptidkette mit 1056 einzelnen Aminosäuren charakterisiert. Jede Windung besteht aus drei Aminosäuren.

Die für diese Untersuchung relevante Kollagenmodifikation ist Typ I. Man findet sie ubiquitär am häufigsten, so auch im Dentin. Diese besitzt zwei identische α_1 -Ketten und eine davon verschiedene α_2 -Kette. Jede dieser Ketten hat ein Molekulargewicht von ca. 100 kD. Durch Wasserstoffbrückenbindung zwischen Amid- und Carboxylgruppen und Wechselwirkungen zwischen den Seitengruppen der Aminosäuren stabilisieren sich drei der Ketten zu einer rechtsgängig gedrehten Tripelhelix.

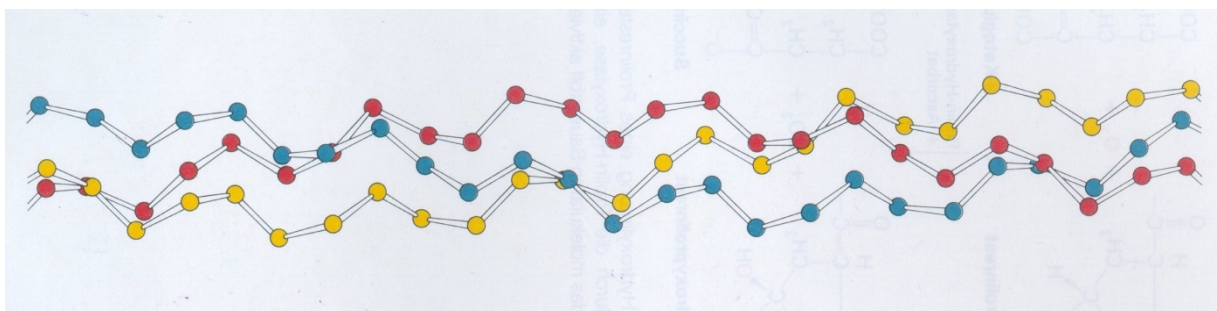


Abbildung 2: Räumliche Struktur der Kollagen-Tripelhelix (stark vereinfacht) [97]

Die übergeordnete Struktur des Kollagens ist die Kollagenfibrille; diese kann man bereits elektronenmikroskopisch erkennen. Solch eine faserartige Form entsteht durch die gestaffelte Anordnung und Quervernetzen von vielen Tropokollagenmolekülen. Dabei ist innerhalb einer Reihe jedes Molekül durch eine Lücke von ca. 40 nm vom Nachbarmolekül getrennt, und vier Reihen mit einem seitlichen Versatz von ca. 68 nm dicht

zusammengepackt. Der Versatz bedingt die typische Querstreifung in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

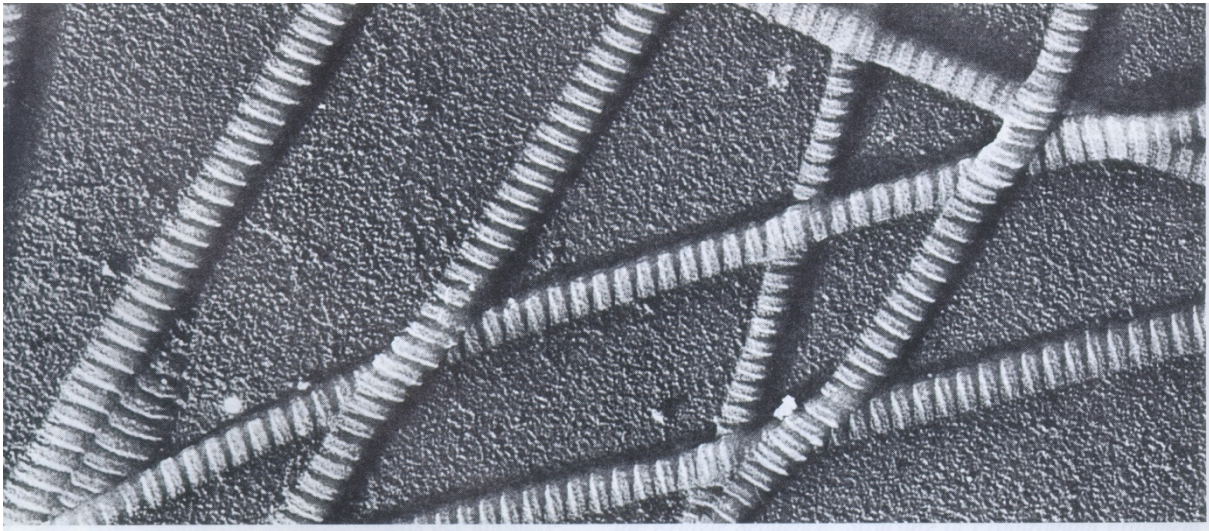


Abbildung 3: Kollagenfibrille [97]

2.2.3 Synthese

Die fertige Form des Kollagens wird wie bei vielen anderen Proteinen aus einer Vorstufe mit etwas längerer Polypeptidkette, dem Prokollagen, gebildet. Es wird in den Polysomen des Rauhen Endoplasmatischen Retikulums (RER) zusammengesetzt.

Zu Anfang entsteht eine Sequenz mit Signalpeptid, die nach Weiterschieben der Pro- α -Kette in das RER aber gleich wieder abgespalten wird.

Danach werden verschiedene Prolin- und Lysinseitenketten modifiziert im Sinne von Hydroxylierungs- und Glykosylierungsreaktionen; diese werden enzymatisch katalysiert und müssen noch vor der Bildung der Tripelhelix ablaufen. Das Prokollagen wird zur Weiterverarbeitung ins Interstitium befördert; dorthin gelangt es mittels Vesikel des Golgiapparates.

Hat es den Ort der Bestimmung erreicht, erfolgt die Prozessierung zum Tropokollagen. Hierbei werden die endständigen nicht helikalen Anteile abgetrennt, was die spontane Ausbildung der bereits beschriebenen Fibrillen nach sich zieht. Eine letzte Phase, die von Quervernetzungs-, und Oxidationsreaktionen geprägt wird, schließt den Prozess der Bildung von Fibrillen ab. Das Alter und die Art des Gewebes entscheiden über die Vorgänge bei dieser Form von „Reifung“ [6, 97]

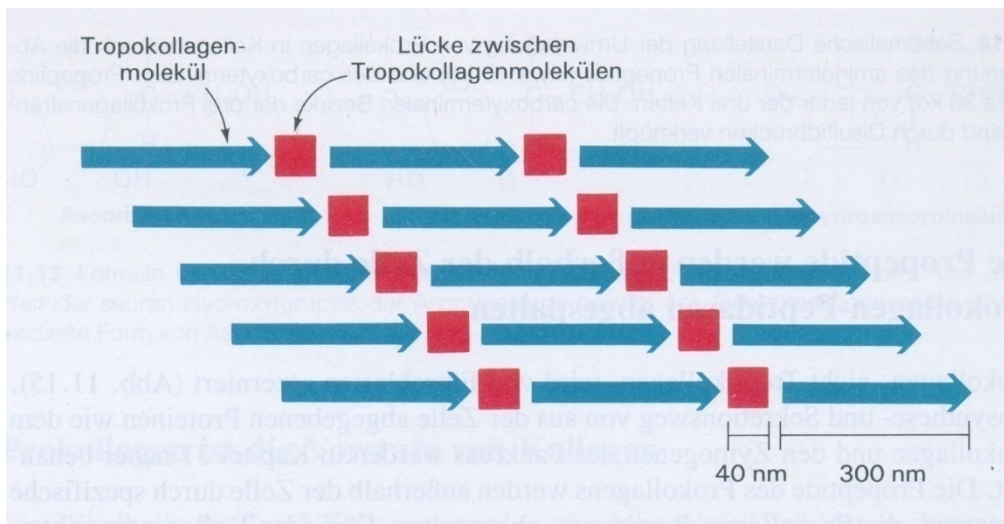
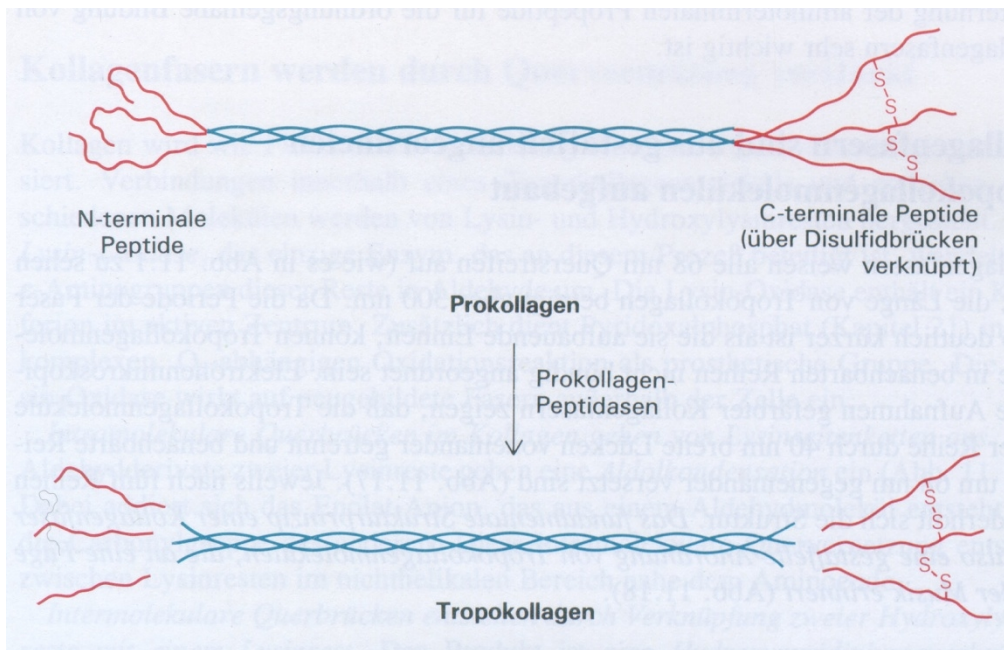


Abbildung 4: Entstehung von Tropokollagen [97]

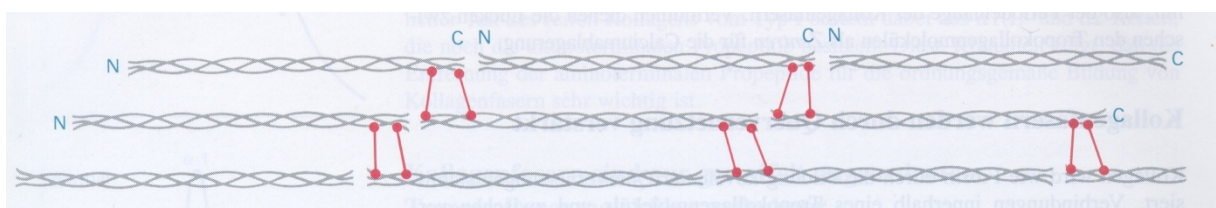


Abbildung 5: Querbrücken zwischen benachbarten Tropokollagenmolekülen [97]

2.2.4 Vorkommen des Kollagens im Dentin

Im Gegensatz zum hauptsächlich mineralischen Zahnschmelz ist das Dentin mit rund einem Drittel seines Volumens reich an Kollagen vom Typ I. Es stellt somit ein lebendiges Gewebe dar, das in seinem Aufbau dem Knochen sehr ähnlich ist [64].

2.2.5 Dentin – Zusammensetzung

Marshall et al. [55] charakterisierten das Dentin als biologische Zusammensetzung einer Kollagenmatrix mit Apatitkristalliten in Nanometergröße, reich an Carbonaten und mit vermindertem Kalziumgehalt. Es ist durchzogen von kollagenarmen Kanälen, die von peritubulärem Dentin umgeben sind. In diesen Kanälen befindet sich u.a. eine Flüssigkeit, die als Signalgeber für die Zahnpulpa fungiert: mittels Flüssigkeitsverschiebung, thermischer oder chemischer Reizung werden so Schmerzsignale generiert; man nennt sie Dentinliquor. Dentin setzt sich chemisch gesehen zusammen aus ca. 50 Vol-% mineralischem Anteil, 20 Vol-% Wasser und etwa 30 Vol-% organischer Matrix. Kollagenfibrillen sind innerhalb des intertubulären Dentins zufällig angeordnet, während sie rund um Dentinkanälchen zirkulär ausgerichtet sind. Die Festigkeit im Dentin wird zu 30% von der kollagenen Matrix bestimmt [81]. Der Kollagengehalt zwischen Kronen- und Wurzelbereich ist nahezu gleich [59].

2.2.6 Rinderdentin

Für eine Studie, die sich auf klinische Fragestellungen bezieht, würde die Verwendung von humanem Dentin nahe liegen. Jedoch benötigt man in diesem Falle viele menschliche Zähne, die karies- und abrasionsfrei sind und auch dasselbe Alter besitzen sollten, denn bei fortschreitendem Alter vermindern sich die Lumina der Tubuli. Diffusion und Permeabilität wären nicht reproduzierbar bei standardisierten Testverfahren. Aufgrund der benötigten Menge erweist es sich als geschickt, auf Rinderdentin auszuweichen. In zahlreichen Studien zeigte sich eine gute Vergleichbarkeit zwischen den Zähnen beider Spezies. *Stüssel* [98] konnte beweisen, dass sich Rinderdentin von menschlichem in Aufbau und Struktur nicht unterscheidet. Gestützt wird dies auch von *Beertsen et al.* [4], *Nakamichi et al.* [65] und *Esser et al.* [21]. Letztere betonen sogar die sehr gute chemische Vergleichbarkeit von Dentin beider Spezies.

Tagami et al. [100] berichteten, dass der Unterschied des Dentins von Rinderfrontzähnen bezüglich der Tubuliöffnungen anteilig an der Gesamtfläche verglichen mit menschlichen

Weisheitszähnen nur unwesentlich ist. Auch die Diffusionsrate für pulpanahes menschliches Dentin ist beinahe identisch zu bovinem. Das Rinderdentin mit der besten Vergleichbarkeit mit menschlichem koronalem Dentin stammt aus dem Bereich der Schmelz-Zementgrenze, so *Schmalz et al.* [84]. Bedingt durch ihre Größe und leichte Beschaffbarkeit sind Rinderzähne also eine ideale Alternative zu Zähnen humanen Ursprungs zur Verwendung für *in vitro* - Tests.

2.2.7 Vorbehandlung von Dentinoberflächen

Für das Erreichen eines mikroretentiven Reliefs wird die Zahnhartsubstanz angeätzt. Dies wird im Schmelz relativ unkompliziert erreicht, weil er zu 95 Gew.-% und 86 Vol.-% aus anorganischer Matrix besteht [49]. Dagegen wird man im Dentin mit „lebendem“ organischem Material konfrontiert. *Stangel et al.* [95] haben den Zustand von Dentin nach dem Ätzvorgang beschrieben. Mineralische Anteile und manche nichtkollagene Proteine werden gelöst und extrahiert, die Kollagenmatrix wird freigelegt.

Bei feuchtem demineralisiertem Dentin fällt der E-Modul auf 5 Mpa ab, was nur 1/1000 der Steifheit von unbehandeltem Dentin entspricht, so *Maciel et al.* [52]. Zusätzlich kollabieren bei Lufttrocknung die Kollagenfibrillen und verschlechtern so u.U. die Haftkraft mancher Adhäsiv-Systeme durch verminderte Aufnahme adhäsiver Monomere.

2.3 Kollagenquervernetzungsreaktion mit Aldehyden

Glutaraldehyd stellt das wichtigste und am häufigsten benutzte Quervernetzungsagens für Kollagen dar [58]; es ermöglicht die Verknüpfung von zwei freien Aminogruppen. Dies findet statt zwischen den NH₂-Resten der Seitenketten der Aminosäuren Lysin und Hydroxylysin.

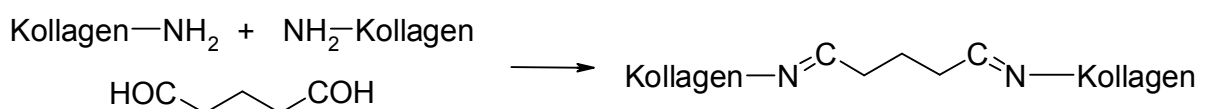


Abbildung 6: Quervernetzung von Kollagen durch Glutaraldehyd

Olde-Damink et al. [68] untersuchten die Ausbildung von Quervernetzungen bei Kollagen in der Schafshaut. 100 ml einer 0,5%igen wässrigen Lösung von Glutaraldehyd erzeugte in 1g

Schafs-Kollagen binnen fünf Minuten nach Reaktionsbeginn die Bildung von Schiff'schen Basen – die Vorstufe zur Quervernetzung – aller freien Aminogruppen. Die instabilen noch leicht hydrolysierbaren Schiff-Basen reagieren mit weiteren Molekülen von Glutaraldehyd weiter aus zu einer Vielzahl stabilerer Verbindungen, wie sekundäre und tertiäre Amine oder auch Pyridinen. Nach 24 Stunden Reaktionszeit wurde im Durchschnitt eine Aufnahme von drei Molekülen Glutaraldehyd pro freier Aminogruppe festgestellt. Dies wird durch die Polymerisations-Fähigkeit des Glutaraldehyds verursacht. Es kommt hier zur Bildung längerer Brückenmoleküle, was bei der Quervernetzung die Überbrückung auch größerer Abstände zwischen den Aminogruppen ermöglicht. So kann an der Reaktion auch mehr als ein Molekül Glutaraldehyd pro Aminogruppe beteiligt sein.

Setzt man zusätzliches Lysin zu, erhöht sich die Rate der Quervernetzungsreaktion noch. Dies beruht auf der Vorstellung, dass freie Aminogruppen, die sich zunächst nur mit Glutaraldehyd verbinden, ein „Bridging“ durch Lysin erfahren; daraus resultieren zusätzliche Cross-Links [91]. Auch eine Derivatisierung des Kollagens mit photosensitiver Zimtsäure (Trans-3-phenyl-acrylsäure, Doppelbindung) mit reaktiver Gruppe (Azid) [18] oder das Bestrahlen mit UV-Licht [45] kann die Reaktion unterstützen.

Vergleicht man Formaldehyd mit Glutaraldehyd, stellt man fest, dass man die vierfache Menge an Formaldehyd für den gleichen Vernetzungsgrad benötigen würde [103]. Somit war Glutaraldehyd in den meisten Fällen das Mittel der Wahl. Das Prinzip der Quervernetzung im Kollagen durch Aldehyde wird auch im medizinischen Bereich oft ausgenutzt, um den ursprünglichen, vitalen Charakter des Kollagengewebes zu erhalten und eine Biodegradation des Transplantats zu verlangsamen.

Besonders im Bereich implantierbarer Bioprothesen, so z.B. bei Herzklappenersatz mit porkinem Gewebe, profitiert man in dieser Hinsicht, wenn man eine geringe Konzentration Glutaraldehyd (typischerweise um die 0,5%) für 24 Stunden für eine optimale Fixierung des Gewebes einsetzt [40]. Auch bei metallischen Implantaten führt eine mit vernetztem Kollagen modifizierte Oberfläche zu einer verbesserten Gewebeintegration im Körper [1].

2.4 Glutaraldehyd auf Dentin

Einen Hinweis darauf, warum überhaupt die Anwesenheit von Glutaraldehyd in Dentinbondings notwendig sein könnte, gaben Mitte der achtziger Jahre *Munksgaard* und *Asmussen* [63]. Die grundlegende Annahme war, dass zunächst Glutaraldehyd mit dem Kollagen vernetzt, dann das Hydroxyethylmethacrylat (HEMA), eine polymerisierbare

Komponente in Dentinbondings, an freie Aldehydgruppen chemisch bindet und zuletzt dann das Komposit mit dem HEMA copolymerisiert. Gesucht wurde das optimale Mischungsverhältnis zwischen HEMA und Glutaraldehyd bezüglich der Verbesserung der Haftkraft des Bondings. Ihre statistischen Analysen ergaben ein Optimum bei einer Konzentration von maximal 35% bei HEMA und mindestens 3%, besser 5% für das Glutaraldehyd [62].

Weiterführend untersuchte *Hansen* und *Asmussen* [30] Ende der 1990er Jahre *in vitro* den Randspalt, der sich zwischen Zahn und einer lighthärtenden Kompositrestauration durch Polymerisationsschrumpfung einstellte. Eine Reihe von Dentinbondings wurde jeweils einmal mit und ohne Kombination mit GLUMA[®], ein patentiertes Bonding mit Glutaraldehyd und HEMA, als Haftvermittler getestet. Zehn Minuten nach der Polymerisation zeigte die lichtmikroskopische Auswertung bei fast allen Bondings signifikant verringerte Randspalte, wenn sie zusammen mit GLUMA[®] eingesetzt wurden. Als Ursache hierfür wurde neben anderen Mechanismen ebenfalls die durch die Quervernetzung erzielte Verstärkung der Hybridschicht zwischen Restauration und Dentin diskutiert, wie schon vorher *Chen* und *Jien* erwähnten [13].

Mizunuma und *Nakabayashi* [60] fanden, dass eine höhere Haftkraft des Bondings aus der Vorbehandlung des Dentins mit Aldehyden resultiert. Dies ist auf die Zunahme des E-Moduls zurückzuführen, weil das Kollagen durch Quervernetzung „fixiert“ werde und somit eine Stabilisierung erreicht wird. *Haller* [28] bestätigt diesen Sachverhalt. *Vaidyanathan et al.* [104] konnten sogar die energetischen Wechselwirkungen zwischen Glutaraldehyd/HEMA und Kollagen durch computergestützte Visualisierungssoftware darstellen. Sie fanden als Grund für die mikromechanische Retention zwischen Kollagen-Rezeptor und Glutaraldehyd/HEMA-Ligand sterische und elektrostatische Wechselwirkungen, die durch die optimale komplementäre Konfiguration von Rezeptor und Ligand noch verstärkt wurden. Diese Haftung halten sie für mitverantwortlich für die Ausbildung einer Hybridschicht zwischen Primer und Kollagen.

Ritter et al. [76] untersuchten die Wirkung einer wässrigen Glutaraldehyd-HEMA-Lösung auf EDTA-demineralisiertes Rinderdentin mit und ohne Vorbehandlung mit Phosphorsäure (37%, 50%). Es zeigte sich, dass ein Ätzen des Dentins die enthaltene Kollagenmatrix bezüglich ihrer Cross-Links nicht signifikant verändert, während der glutaraldehydhaltige Primer freie (Hydroxy-) Lysin-Seitenketten quervernetzte. Jedoch ruft das Ätzen Denaturierungsprozesse hervor und verändert die physikalischen Eigenschaften des Dentins [19], was *Pashley* und *Carvalho* [69] bestätigen konnten.

Maciel et al. [52] untersuchten die Einflüsse von Azeton, Ethanol, HEMA und Luft auf die Steifigkeit menschlichen demineralisierten Dentins. Durchgeführt wurden sowohl konventionelle Testungen des Spannungs-Dehnungs-Verhaltens als auch die Cantilever Technik. Letztere ist eine Art Drucktest, bei dem Kräfte auf ein einseitig befestigtes freitragendes Testobjekt treffen („Ausleger“). Als Grundwert für den nassen demineralisierten Zustand ergab sich ein sehr niedriger Wert von nur 7 mPa. Die Steifigkeit erhöht sich bei Dehydrierung mit entweder Luft oder organischen Lösungsmitteln reversibel. Nach Rehydrieren mit Wasser sinkt sie wieder ab. Glutaraldehyd verursachte eine irreversible Versteifung des demineralisierten Dentins, was wiederum ein Hinweis auf die Quervernetzung ist.

Die Erkenntnis, dass Adhäsivsysteme mit Glutaraldehyd verbesserte Haftwerte erreichen, ist heute jedoch nicht mehr in dem Maße relevant, da in neuerer Zeit Systeme gänzlich ohne Aldehydzusatz trotzdem deutlich höhere Haftkräfte aufweisen.

Außer des Phänomens der Quervernetzung müssen noch andere Auswirkungen des Glutaraldehyds auf der Dentinoberfläche untersucht werden. So diskutiert man eine veränderte Permeabilität im Dentin, wenn bestimmte Substanzen damit in Kontakt gebracht werden. Der GLUMA[®] Primer, Glutaraldehyd und Kaliumoxalat verursachten ohne Unterschied einen verringerten oder unterbundenen Liquorfluss im Dentin bis in eine Tiefe von wenigen Zehntel Millimetern [5]. An Überlegungen in Richtung derartiger hydrodynamischer Mechanismen angelehnt bestätigten *Schupbach et al.* [90] den Verschluss von Dentinkanälchen durch Glutaraldehyd und eine dadurch erzielte Desensitivierung von freiliegenden Dentinbereichen. Dazu behandelten sie nach der Entfernung der bukkalen Höcker menschlicher Molaren die freigelegten Dentinoberflächen in situ mit GLUMA[®] Dentin Bond und konnten nach Extraktion einen tubulären Verschluss bis in 200 µm Tiefe nachweisen, wenn zuvor zusätzlich die Schmierschicht entfernt wurde. Als Nachweismethode nutzten sie drei verschiedene mikroskopische Verfahren (Laserscanmikroskop, Raster- und Transmissionselektronenmikroskop). Die Kontrolle zeigte, dass HEMA allein keinen Effekt hatte und Glutaraldehyd ohne HEMA nur eine Wirkung bis 50 µm Tiefe entfaltete. Der Synergismus war offensichtlich.

Auch auf das Wachstum von Bakterien hat Glutaraldehyd großen Einfluss: wenn es Primern zugesetzt wird, zeigt es schon bei geringen Konzentrationen einen hohen antibakteriellen Effekt im Sinne einer desinfizierenden Wirkung [86].

Fixation des Gewebes, verminderte Diffusion und desinfizierende Wirkung: diese genannten Effekte werden auch für den Umstand verantwortlich gemacht, dass bei Sekundärkaries im

Dentin – nicht aber im Schmelz – durch einminütiges Einwirken einer 2%igen Glutaraldehydlösung der Mineralverlust um 30% verringert werden kann [17].

2.5 Bestimmung freier Aminogruppen durch Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) –Test

Bei dieser Quantifizierung der freien Aminogruppen färbt man selektiv nicht besetzte (Hydroxy-) Lysinreste an und kann so im Umkehrschluss den Grad der chemischen Quervernetzung ermitteln. Ist dieser also hoch, wird man nach Anfärbung nur eine geringe Anzahl freier Aminogruppen bestimmen. Im unvernetzten Kollagen liegt der Anteil dieser freien Gruppen bei $N = 31,2 \pm 0,9$ pro 1000 Seitenreste [61]. Der Farbstoff Trinitrobenzolsulfonsäure reagiert mit den freien NH_2 -Gruppen zu einem stabilen Trinitrobenzolderivat. Anschließend wird durch saure Hydrolyse des Kollagens das in der Photometrie zu untersuchende Chromophor in Lösung gebracht. Durch Ausschüttelung mit Diethylether wird das unerwünschte Nebenprodukt Pikrinsäure extrahiert, die, wenn unentfernt, das Ergebnis nachhaltig verfälschen würde; sie absorbiert im selben Wellenlängenbereich (420 nm). Durch die photometrisch bestimmte Extinktion errechnet man dann den Gehalt freier Aminogruppen [8, 11].

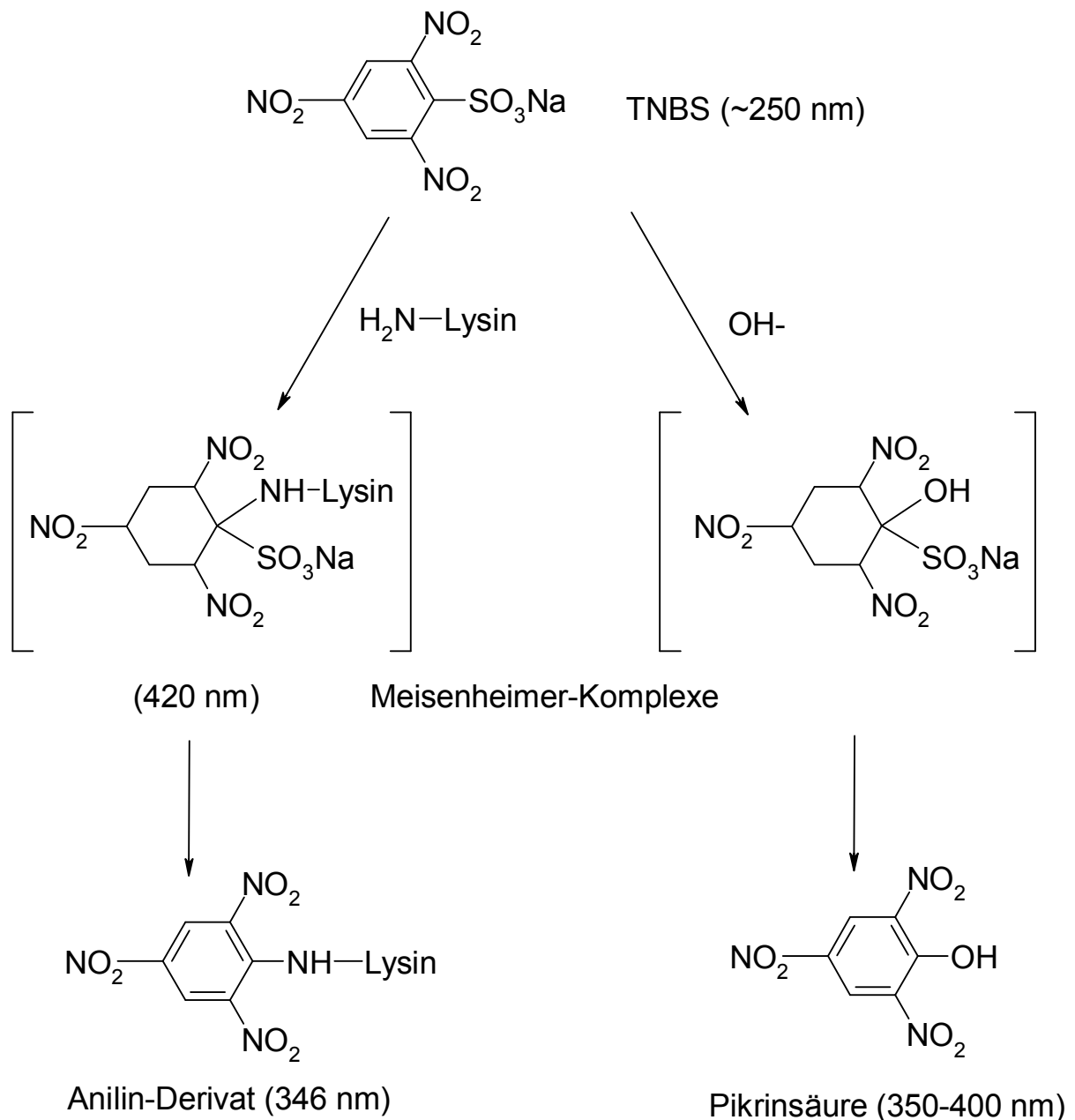


Abbildung 7: Reaktionsschema des TNBS-Assays. Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) reagiert mit den Epsilon-Aminogruppen der Lysinseitenketten (Stickstoff-Nukleophile) über eine Zwischenstufe (Meisenheimer-Komplex) zu einem Anilinderivat, welches bei 346 nm spektrophotometrisch bestimmt wird. Die in einer Nebenreaktion mit Hydroxylgruppen entstehende Pikrinsäure wird durch Ausschütteln mit Diethylether entfernt.

2.6 Bestimmung von Aldehyden durch Purpald[®] *in vitro*

1974 führten *Jacobsen* und *Dickinson* [38] eine Methode ein, Aldehyde quantitativ mit einem spezifischen Reagenz zu klassifizieren; Purpald[®] lautet die Warenbezeichnung dieses

Reagenz und ist eingetragen für die Aldrich Chemical Company. 4-Amino-3-hydrazino-mercapto-1,2,4-triazol ist die chemisch richtige Bezeichnung für Purpald[®]. Charakteristisch für diese Methode ist die spektrophotometrische Bestimmung der intensiven Purpurfärbung, die sich durch die Reaktion von Purpald[®] und dem Aldehyd einstellt. (s. Abb 8).

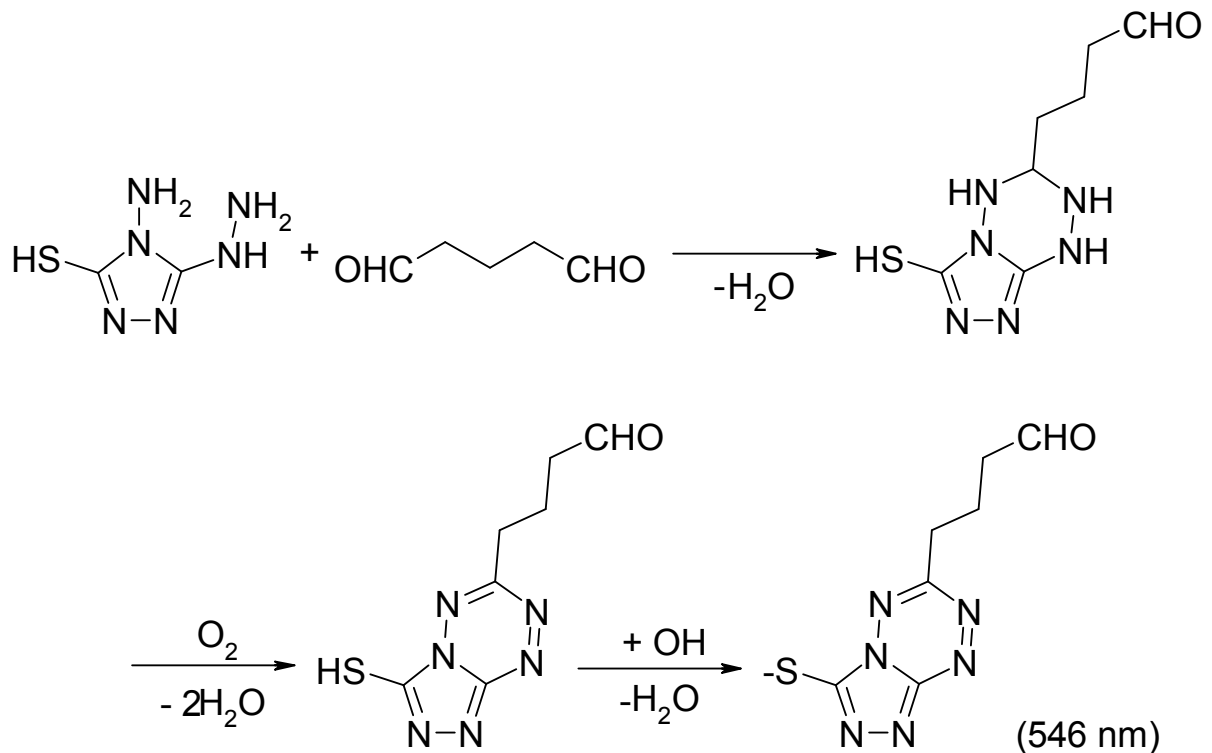


Abbildung 8: Reaktionsschema des Purpald[®]-Assays. Glutaraldehyd kondensiert mit 4-Amino-3-hydrazino-mercapto-1,2,4-triazol zu einem bicyklischen Tetrazinderivat, welches nach Oxidation durch Luftsauerstoff und Deprotonierung bei 546 nm spektrophotometrisch bestimmt wird.

Diese Methode wurde später mehrfach überprüft. *Avigad* [2] testete den Versuchsaufbau mit verschiedenen Aldehyden, darunter Formaldehyd, Glutaraldehyd, Propionaldehyd, Glykolaldehyd, Benzaldehyd und viele andere. Es bewies sich die Zuverlässigkeit des Testsystems. Später wurde die Methode auch benutzt, um beispielsweise Aldehyde in Desinfektionslösungen nachzuweisen [108].

2.7 Zellkulturverfahren – Die Agardiffusionsprüfung

Dieses Testverfahren ist eine gängige Methode für die Ermittlung der lokalen, akuten und unspezifischen Zytotoxizität von Prüfsubstanzen, sei es in fester oder flüssiger Form, wobei die Lösungen auf einen entsprechenden Filter in Plättchenform getropft werden müssen, die dann auf die Agarschicht gegeben werden. Die Probengewinnung erfolgt unter der Reinraumwerkbank. Nach Inkubation der Probenschälchen wird nach der Diffusion durch den Agar bei den Zielzellen, die zuvor mit einer Neutralrotlösung in vitalem Zustand eingefärbt wurden, ein reproduzierbares Maß an Entfärbung bedingt durch ausgelösten Zelltod verursacht. Das Entfärben dokumentiert den Zelluntergang. Das Phänomen wird durch Beschreibung des Entfärbe- und Lysisindex bewertet [51].

Vergleicht man das Versuchsdesign mit der Realität, erkennt man eine gewisse Ähnlichkeit zur *in vivo*- Situation. Die Diffusionsbarriere stellt im Agaroverlayversuch meist nur die Agarschicht selbst dar. Zusätzlich aber kann sie auch durch weitere aufgelegte Proben ergänzt werden. Die gewählten Materialien hängen von der Versuchsanordnung ab und können z.B. kollagenen Ursprungs sein, wie in vorliegender Studie. In dieser Arbeit wurde ein Schwammellet bovines aufbereiteten Kollagens aus der chirurgischen Hämostase (Firma Innocoll) verwendet, oder auch natürliches Rinderdentin. Mit letzterem wird eine Situation geschaffen, die der klinischen Gegebenheit einer Restdentinschicht bei Kavitätenpräparation gleicht; ein imitierter indirekter Kontakt der Testsubstanz zu den Zellen ist die Folge, die Zellen werden dabei mechanisch geschützt [22]. Allerdings bestehen auch Unterschiede, die sich hauptsächlich auf die klinisch nicht vorherrschende Anwesenheit des Agars beziehen. Dieser ist chemisch gesehen ein Galaktose-Polymer und somit ein Polysaccharid. Er kann Gallerte bilden und wird aus den Zellwänden einiger Algenarten gewonnen. Damit unterscheidet er sich auch von seiner Struktur deutlich von Dentin. Er wird z.B. der Gelatine vorgezogen, weil er auch bei höheren Bebrütungstemperaturen stabil bleibt (Schmelzpunkt 95 °C) und nicht wie Gelatine von bestimmten Mikroorganismen verdaut werden kann. Benutzt wird Agar schon seit dem späten 19. Jahrhundert [35]. Die dünne Agarschicht bietet auch heute noch eine einfache und preiswerte Methode zur Durchführung von Zytotoxizitätsprüfungen [26].

Die in diesem Testsystem eingesetzten Zellen stammen aus dem Bindegewebe von Mäusen. Es sind Fibroblasten des Klons L-929 ATCC CCL1, der sich aus einer Zelllinie ableitet, die bereits Anfang der Vierzigerjahre des letzten Jahrhunderts etabliert worden ist. Fibroblasten sind bewegliche, aber ortsständige Zellen mesenchymaler Herkunft. Sie weisen

eine spindelförmige oder unregelmäßige Form auf und sind oft langgestreckt und kollagenfaserbildend. Das Verhältnis von Kern zu Zytoplasma ist, anders als z.B. bei Epithelzellen, relativ klein. Die Zellen stehen in tiefgefrorenem Zustand in einem Behälter mit flüssigem Stickstoff zur Verfügung. Zur Kultivierung werden sie aufgetaut, vermehrt und passagiert.

3 Fragestellung

Glutaraldehyd gehört zu den toxischen und umweltgefährlichen Chemikalien. Dentalfirmen setzen dennoch bis zu fünf Massenprozent davon in ihren Dentinadhäsiven und ‚Desensitizern‘ ein. Der erhoffte Nutzen auf verbesserten Verbund durch zusätzliche Vernetzung mit Kollagen bei gleichzeitig synergistischem Effekt der Fixierung und Stabilisierung desselben, soll den potentiell gesundheitsgefährdenden Aspekt aufwiegen.

Wird nun in einer Kavität Glutaraldehyd appliziert und tritt u.a. die Reaktion mit dem Kollagen des Dentins ein, steht es in freier Form nicht mehr zur Verfügung. Angelehnt an diese Tatsache sollen in dieser Studie folgende Fragen beantwortet werden:

1. Erfolgt durch die Verbindung eine Art „Entgiftungsreaktion“? Kann das Dentin freies Glutaraldehyd „abfangen“ und so dessen Zytotoxizität herabsetzen?
2. Existiert für das Glutaraldehyd ein „no effect level“, unterhalb dessen keinerlei Wirkungen auftreten? Wenn ja, wo liegt dieser?
3. Hat die Vorbehandlung des Dentins mit demineralisierenden Agenzien Einfluss auf die Reaktion?
4. Gibt es Unterschiede bei der Reaktion zwischen bovinem Dentin und einem prozessierten und käuflich erwerbbaaren bovinen Kollagenschwamm?
5. Stützt die zellbiologische Versuchsreihe in ihren Ergebnissen die benutzten chemischen Messverfahren?

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)-Test

4.1.1.1 Chemikalien

| | |
|---|----------------------------------|
| - TNBS- Farbstofflösung 1M | FLUKA Chemie GmbH, Buchs |
| - NaHCO ₃ -Lösung 4% | MERCK, Darmstadt |
| - HCl 6M | MERCK, Darmstadt |
| - Diethylether | MERCK, Darmstadt |
| - PBS Puffer, Nr. 79382 | FLUKA Chemie GmbH, Buchs |
| - Chitosan | FLUKA Chemie GmbH, Buchs |
| - Heparin, Natriumsalz, Grade I-A from porcine intestinal mucosa | SIGMA- Aldrich GmbH, Deisenhofen |
| - Dinatriumhydrogenphosphat- dihydrat | MERCK, Darmstadt |

4.1.1.2 Hilfsmittel und Geräte

| | |
|--|--|
| - Reagenzgläser 30 ml mit Schraubdeckel | ROTH, Karlsruhe |
| - Küvetten P951 (PMMA) | ROTH, Karlsruhe |
| - 96-Well- Platten Nunclon Surface | NUNC BRAND PRODUCTS, Roskilde (Dänemark) |
| - 24-Well- Platten Nunclon Surface | NUNC BRAND PRODUCTS, Roskilde (Dänemark) |
| - 6 -Well- Platten Nunclon Surface | NUNC BRAND PRODUCTS, Roskilde (Dänemark) |
| - Überkopfschüttler Heidolph Reax2 | SCHÜTT Labortechnik, Göttingen |
| - Waage MT5 | METTLER, Giessen |
| - Waage SBC 31 | SCALTEC Instruments GmbH, Göttingen |
| - Sägemikrotom 1600 | LEITZ GmbH, Wetzlar |
| - UV/VIS-Spektrometer Lambda 18 | PERKIN-ELMER, Waltham (USA) |
| - Inkubator Cytperm | HERAEUS Instruments, Hanau |

4.1.2 Purpald[®]-Test

4.1.2.1 Chemikalien

- 4-Amino-3-hydrazino-5-mercapto-
1,2,4-triazol (Purpald[®])-

| | |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| Lösung 1% | FLUKA Chemie GmbH, Buchs |
| - NaOH 1M | J.T.BAKER, Phillipsburg (USA) |
| - NaBH ₄ - Lösung 0,4% | MERCK, Darmstadt |
| - PBS Puffer, Nr. 79382 | FLUKA Chemie GmbH, Buchs |

4.1.2.2 Hilfsmittel und Geräte

| | |
|------------------------------------|--|
| - Küvetten Cuvettes 67.742 (PS) | SARSTEDT, Nümbrecht |
| - 96-Well- Platten Nunclon Surface | NUNC BRAND PRODUCTS, Roskilde (Dänemark) |
| - 24-Well- Platten Nunclon Surface | NUNC BRAND PRODUCTS, Roskilde (Dänemark) |
| - 6 -Well- Platten Nunclon Surface | NUNC BRAND PRODUCTS, Roskilde (Dänemark) |
| - Waage MT5 | METTLER, Giessen |
| - Sägemikrotom 1600 | LEITZ GmbH, Wetzlar |
| - UV/VIS-Spektrometer Lambda 18 | PERKIN-ELMER, Waltham (USA) |

4.1.3 Agardiffusionstest

4.1.3.1 Zellen

Zur Bildung eines geeigneten Test-Zellrasens wurden Mausfibroblasten des Klons L-929, ATCC CCL1 verwendet, die routinemäßig mit Basal Medium Eagle mit 5% New Born Calf Serum bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und passagiert wurden. Die tiefgefrorene Primärpassage war P11 vom 09. Juli 2001, die als Subkultur weiterpassagiert wurde.

4.1.3.2 Chemikalien

| | |
|---------------------|----------------------|
| - Bacto-Agar 214010 | DIFCO, Detroit (USA) |
|---------------------|----------------------|

| | |
|--|----------------------------------|
| - Basal Medium Eagle (BME) | SIGMA- Aldrich GmbH, Deisenhofen |
| - Newborn Calf Serum (NCS), 26010-07, heat inactivated | GIBCO Laboratories, Karlsruhe |
| - Trypsin 2,5 % | GIBCO Laboratories, Karlsruhe |
| - Neutralrot 1.01369.0025 | MERCK , Darmstadt |
| - Paladur | HERAEUS KULZER GmbH, Wehrheim |
| - DMSO (Dimethylsulfoxid) | SIGMA- Aldrich GmbH, Deisenhofen |
| - HEPES | SIGMA- Aldrich GmbH, Deisenhofen |
| - PVC- Schlauch [85] innerer Durchmesser 2mm: Polyvinylchlorid, Di-2-ethylhexylphtalat, Advanced TM180 | HERAEUS KULZER GmbH, Wehrheim |

4.1.3.3 Lösungen

1. Basal Medium Eagle (BME) mit 5% Newborn Calf Serum (NCS)

| | |
|------------------------|---------|
| BME- Pulver | 9,33 g |
| NaHCO ₃ | 2,20 g |
| Hepes | 3,00 g |
| NCS | 50,00 g |
| Ad 1000 ml Aqua bidest | |

Anschließend wurde das Medium steril filtriert.

2. Bacto-Agar-Lösung 3%

| | |
|------------------------|-------|
| Bacto-Agar | 3,0 g |
| Ad 1000 ml Aqua bidest | |

Sterilisation durch Autoklavieren

3. Überschichtungs- Agar

| | |
|----------------------------------|-----------|
| Bacto-Agar-Lösung | 100,00 ml |
| BME- Lösung doppelt konzentriert | 100,00 ml |

4. Ca- und Mg- freie phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (PBS)

| | |
|--|--------|
| NaCl | 8,00 g |
| KCl | 0,20 g |
| Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O | 1,15 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,20 g |
| Ad 1000 ml Aqua bidest, pH 7,2 | |

Sterilisierung des Puffers im Autoklaven

5. Trypsin-Lösung 0,25%

| | |
|-------------|-----------|
| PBS | 90,00 ml |
| Trypsin | 100,00 ml |
| Aqua bidest | 810,00 ml |

Anschließend wurde die Lösung steril filtriert.

6. Neutralrot-Stammlösung 1 %

| | |
|-----------------------|--------|
| Neutralrot | 1,00 g |
| Ad 100 ml Aqua bidest | |

Durch Faltenfilter filtrieren, anschließend sterilfiltrieren.

7. Neutralrot- Färbelösung 0,01%

| | |
|----------------------------|-----------|
| Neutralrot- Stammlösung 1% | 2,00 ml |
| PBS –Puffer | 198,00 ml |

4.1.3.4 Hilfsmittel und Geräte

| | |
|---|---|
| - Zellkulturflaschen 162 cm ² | COSTAR, Bodenheim |
| - Petrischalen 94/16 mm Qualität TC steril | GREINER, Nürtingen |
| - 24-Well- Platten | FALCON, Oxnard (USA) |
| - 96- Well- Platten | FALCON, Oxnard (USA) |
| - Einweg-Zellschaber (1,8 cm Klinge) | FALCON, Oxnard (USA) |
| - Kolbenhubpipetten | EPPENDORF, Hamburg |
| - Pipettenspitzen: 100 µ (gelb), 1000 µl (blau) | SARSTEDT, Nümbrecht |
| - Millex-GS, Spritzenvorsatzfilter 0,22 µm Poren | MILLIPORE, Eschborn |
| - Zentrifugenröhrchen | FALCON, Oxnard (USA) |
| - Locheisen, Durchmesser 6mm | WISENT, Vertrieb Baumarkt Bauhaus Regensburg |
| - Filterscheibchen Durchmesser 12,5 mm, gestanzt zu 6mm- Plättchen | SCHLEICHER & SCHÜLL, Kent (GB) |
| - Zentrifuge Rotixa/P | HETTICH, Tuttlingen |
| - Sägemikrotom 1600 | LEITZ GmbH, Wetzlar |
| - Lichtmikroskop Diavert | LEITZ GmbH, Wetzlar |
| - Inkubator (37°C, 5% CO ₂) | HERAEUS Instruments, Hanau |
| - Sterilbank HF 48 | GELAIRE FLOW Lab., Meckenheim |

4.1.4 In allen Tests benutzte Chemikalien und Lösungen

| | |
|---------------------------------------|------------------|
| -EDTA-Pulver Titriplex III Nr. 108418 | MERCK, Darmstadt |
| - NaOH-Plätzchen | MERCK, Darmstadt |
| -HCl 1M | ROTH, Karlsruhe |

1. NaOH- Lösung 5M

NaOH Plätzchen 200,00 g
Ad 1000 ml Aqua bidest

2. EDTA-Lösung, 550 mM, ca. 19 Gew.-%

Titriplex III EDTA 930,6 g

NaOH – Lösung 5M
Ad 5000 ml Aqua bidest

pH 7,4 einstellen

3. Thymol-Lösung (0,1%) in 0,9% NaCl

4.1.5 Testmaterial

Glutaraldehyd-Stammlösung
~25% in Wasser; 2,6 M

FLUKA Chemie GmbH, Buchs

Daraus entstanden verschiedene Verdünnungen der Stammlösung in PBS-Puffer, die lichtgeschützt bei 4° C gelagert wurden.

4.1.6 Probenkörper: porkines Kollagen

Im TNBS-Vorversuch „Dentinbestandteile“ (s. Kap. 5.1.1.3) wurde erprobt, wie sich tierisches demineralisiertes Dentin generell im Versuch verhält. Es handelt sich um Stücke ganzer Inzisivi von Schweinen. Demineralisiert wurde acht Wochen lang mit EDTA-Lösung. Der Einsatz von porkinem Kollagen beschränkt sich auf diesen Vorversuch.

4.1.7 Probenkörper: bovines Kollagen

4.1.7.1 Collatamp® der Firma Innocoll/ Saal a.d. Donau

Dieses schwammartige Material aus nativem bovinen Kollagen hat eine Dichte von 5,6 mg pro cm³. Der ursprüngliche Verwendungszweck des blutstillenden Präparates liegt in der intraoperativen Versorgung lokaler Blutungen bei chirurgischen Eingriffen durch Aktivierung der Hämostase und Stabilisierung des Blutkoagels. Es existieren verschiedene Größen; benutzt wurden Schwämme des Formats 10 cm x 5 cm x 0,5 cm, die zu Probenkörpern weiterverarbeitet wurden (s. Kap. 4.2.1.1)

4.1.7.2 Bovines Dentin im Originalzustand

Von durch den Schlachthof Furth im Wald freigegebenen Rinderköpfen wurden postmortal die unteren bleibenden Inzisivi entnommen und entsprechend den einzelnen Versuchen speziell präpariert.

4.1.7.3 Bovines Dentin im demineralisierten Zustand

Das ist das gleiche Material wie unter 4.1.7.2, jedoch ist es durch Lagerung in EDTA chemisch von seiner anorganischen Substanz befreit.

4.1.8 Zusammenfassung der Testverfahren und Testmaterialien

Die drei oben beschriebenen Materialien wurden drei voneinander unabhängigen Verfahren unterzogen. Daraus ergeben sich neun verschiedene Testabläufe, drei für jedes Material. Dies verdeutlicht Abbildung 9.

| | | | |
|-----------------------|------------------------------|--|--|
| 3 Verfahren: | TNBS | Purpald[®] | Agardiffusion |
| mit | | | |
| 3 Materialien: | Collatamp[®] | Bovines Dentin, Originalzustand | Bovines Dentin, demineralisiert |

Abbildung 9: Schema des Gesamtversuchs

4.1.9 Makroskopische Aufnahmen der drei Kollagenformen

Um sich die Beschaffenheit der kollagenen Materialien besser vorstellen zu können, wurde ihr makroskopisches Aussehen fotografisch dokumentiert. Dabei fällt die diskoide Form bei jeder der drei Gruppen auf. Die Probengeometrie ist also vergleichbar. Der Hauptunterschied liegt in der Dichte und somit im jeweiligen Probengewicht begründet (s. Abb. 10).



Collatamp® / Innocoll



Bovines Dentin,
Originalzustand



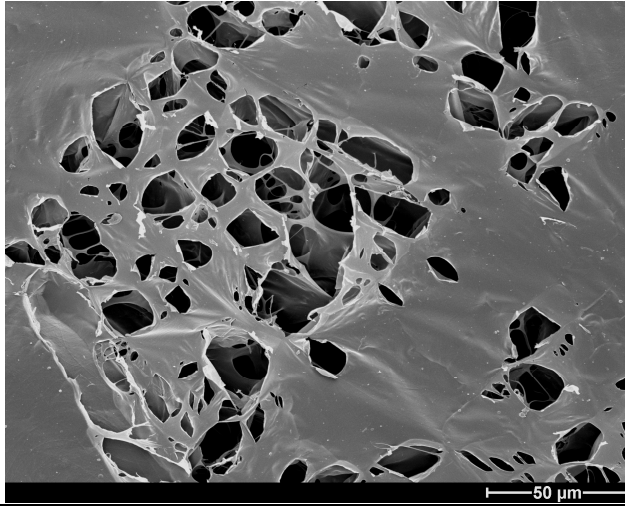
Bovines Dentin,
14 Tage in EDTA
demineralisiert

Abbildung 10: Alle drei verwendeten kollagenen Materialien

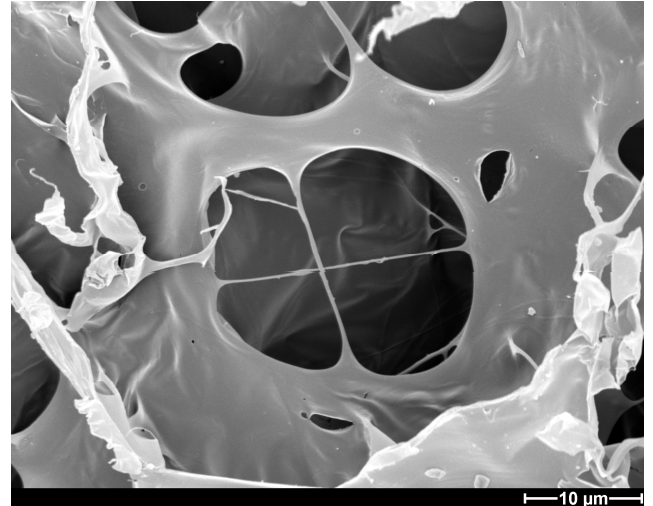
4.1.10 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der drei Kollagenformen

Unterzieht man die Proben einer rasterelektronischen Begutachtung, verdeutlicht sich dieser Dichteunterschied. Das Collatamp®-Material zeigt ein schwammartiges Aussehen, während bei den andern beiden Proben für Dentin typische tubuläre Strukturen imponieren. Beim Originalzustand erkennt man sogar noch die Smear-Layer und die Spuren des Mikrotom-Sägeblattes (s. Abb. 11).

Collatamp®

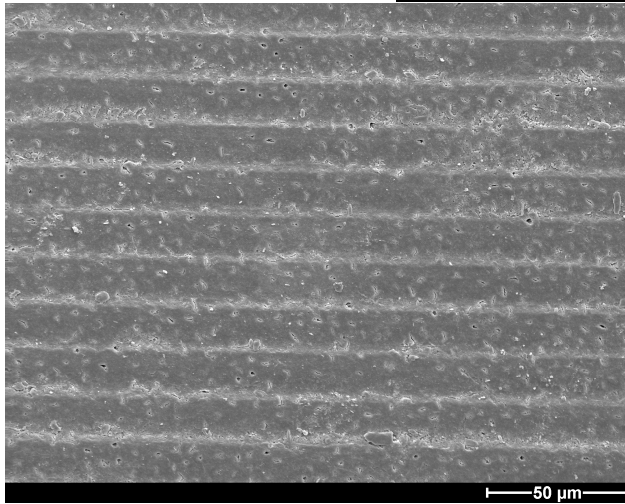


430x

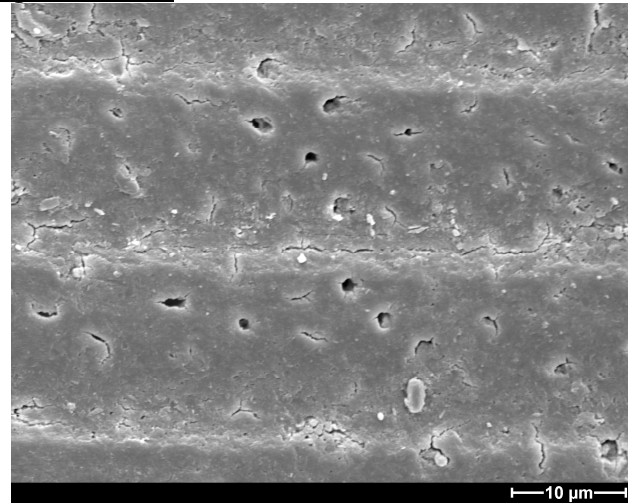


1770x

Bovines Dentin / Originalzustand

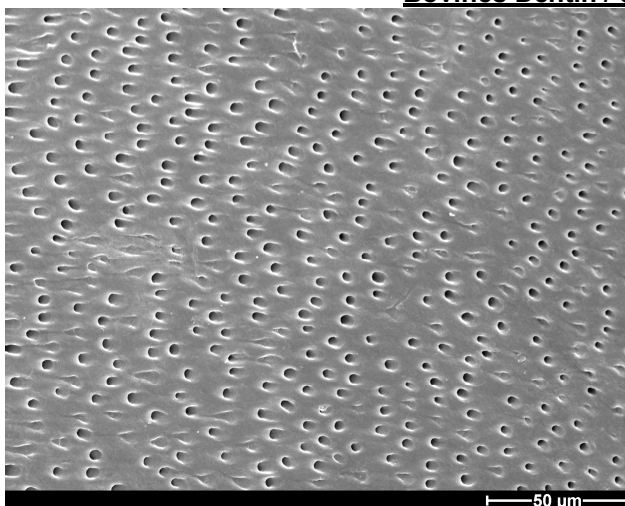


430x

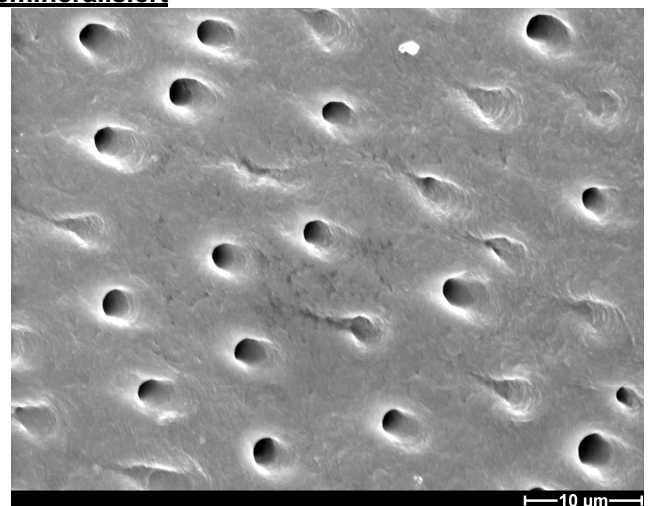


1770x

Bovines Dentin / demineralisiert



430x



1770x

Abbildung 11: Rasterelektronen-Mikroskop-Aufnahme der drei kollagenen Materialien

4.2 Methoden

4.2.1 Herstellung der Probenkörper

4.2.1.1 Collatamp[®]

Unter sterilen Kautelen entnimmt man unter der Sterilbank den Kollagenschwamm aus seiner doppelt eingeschweißten Verpackung.

Da das Material eine dichte Oberschicht besitzt, die sich eventuell versuchsstörend auswirkt, wird sie mit einem scharfen Skalpell abgehoben und verworfen.



Abbildung 12: Ablösung der Deckschicht des Collatamp[®]-Schwammes

Durch Ausstanzen mittels eines Stanzeisens mit 6 mm Durchmesser erhält man runde Probenkörper, die im Kühlschrank bei 4° C gelagert werden.

4.2.1.2 Bovines Dentin, Originalzustand

Die Rinderzähne werden mit einem Skalpell gründlich von Geweberesten gereinigt und in Thymol-Lösung (0,1%) im Kühlschrank aufbewahrt. Bei der Weiterverarbeitung bettet man die Schneidezähne mit dem Autopolymerisat Paladur so ein, dass in inziso-apikaler Richtung am Sägemikrotom geschnitten werden kann. Die Scheiben haben eine Schichtdicke von 500 µm mit einer Abweichung von 20 µm. Der Schmelz der Zahnkrone wird mechanisch entfernt und man erhält durch eine Kombination aus Vorstanzen und Abtrennen mit Skalpell annähernd runde Dentinscheiben. Das apikale Drittel der Scheiben, sowie Bereiche mit angeschnittener Pulpahöhle werden verworfen. Die Lagerung erfolgt nun in PBS-Puffer im Kühlschrank

4.2.1.3 Bovines Dentin, demineralisiert

Die Dentinschnitte aus den Rinderinzisivi werden zuerst einer Demineralisationsprozedur unterworfen. Hierbei werden sie 24 Stunden lang in EDTA-Lösung (550 mM oder ca. 19 Gew.-%) in Schraubverschluss - Reagenzgläsern mittels Überkopfschüttler gewendet und schließlich mit PBS-Puffer gewaschen. Es befinden sich immer etwa drei bis vier Scheiben in einem Reagenzglas mit einem Volumen von etwa 15 ml EDTA-Lösung. Nach Entfernung der anorganischen Matrix lassen sich leicht Scheiben im Durchmesser von 6 mm ausstanzen, die ebenfalls mit PBS - Puffer gespült werden. Die Lagerung erfolgt analog zu den unbehandelten Scheiben.

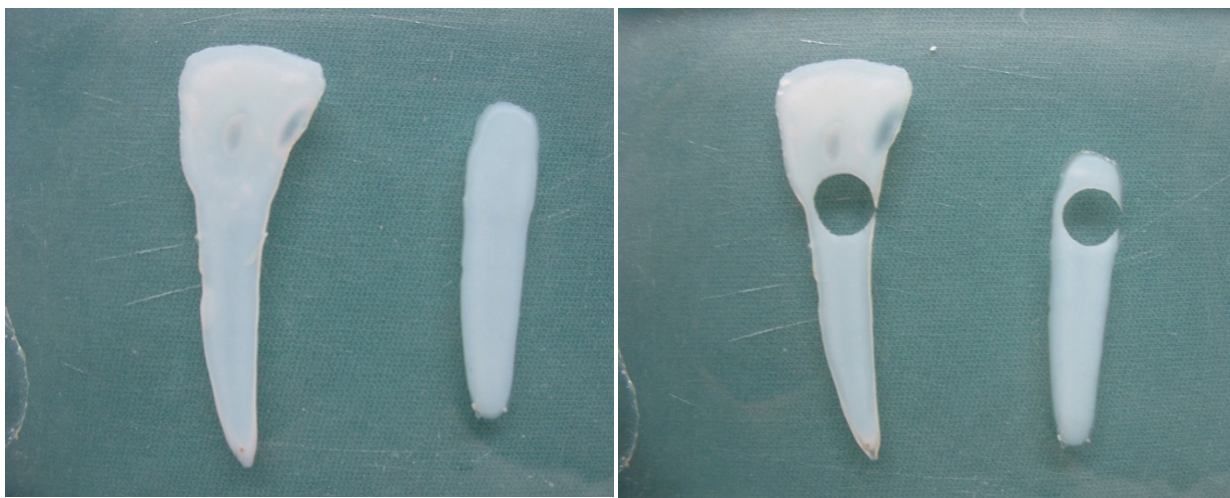


Abbildung 13: Stanzvorgang der mit EDTA behandelten Vertikalschnitte der Rinderinzisivi (500 μm)

4.2.2 TNBS- Versuche

Bei diesem Versuch interessiert man sich dafür, wie viel **Aminogruppen** im Kollagen nicht vom Aldehyd quervernetzt werden, also **frei** bleiben.

Folgende Versuche wurden durchgeführt:

1. Vorversuche zur Methodenverfeinerung (s. Kap. 5.1.1)
2. Bestimmung der Aminogruppen aller drei Materialien ohne Zusatz von Glutaraldehyd (Ausgangswerte, s. Kap. 5.1.2)
3. Quantifizierung der Aminogruppen im Vergleich zwischen zwei Individuen, Zähnen und Entnahmestellen bei den Dentinproben (s. Kap. 5.1.3)

4. Prüfung der Relevanz des Proben-Trocknungsverfahrens durch Vergleich der Zustände „trocken“ – „feucht“ (s. Kap. 5.1.4)
5. Hauptversuchsreihe, Glutaraldehyd reagiert in verschiedenen Konzentrationen und Volumina mit den Kollagenproben (s. Kap 5.1.5 – Kap. 5.1.6)

4.2.2.1 Versuchsvorbereitung

Inkubation des Kollagens mit Glutaraldehyd

In 96-Well-Platten befinden sich die Proben aus Collatamp® der Firma Innocoll, in 24-Well-Platten die des Rinderdentins. Alle Kollagenproben werden 24 Stunden im Exsikkator getrocknet und ihre genaue Trocken-Masse auf der Waage ermittelt, die Dentinscheiben (beide Arten) danach wieder für 24 Stunden bei 4°C in PBS-Puffer, der durch einen Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm) filtriert wurde, rehydriert. Zum Vergleich wurde beim Dentin auch einmal die feuchte Masse bestimmt. Man erhält diese, indem man die Scheibe vor dem Wiegen nur mit einem Zellstofftuch trockentupft. Ebenso wurde in Einzelversuchen getestet, ob regionale Unterschiede im Kollagengehalt des Zahns bestehen (zervikal-apikal) und ob unterschiedliche Individuen einen abweichenden Kollagengehalt im Zahn zeigen. Diese letztgenannten Versuche wurden ohne Aldehydzugabe durchgeführt.

Es werden, je nach Versuchsansatz, 15 µl / 2 ml wässrige Glutaraldehydlösung verschiedener Konzentrationen auf die Proben aufpipettiert, und diese werden dann für 24 Stunden bei 37°C zur Interaktion gebracht. Dann werden die Wells fünfmal mit je 200 µl PBS-Puffer gespült. So aufbereitet werden die Proben weiterverwendet.

Herstellung der benötigten Farbstofflösung

Die in jeweils 0,5 ml Chargen tiefgefrorene Farbstoffstammlösung (1M) wird aufgetaut. Auf eine Waage stellt man ein Becherglas, tariert, pipettiert die aufgetaute Farbstoffstammlösung ein und füllt mit Milliporewasser auf 29,3 g auf; man erhält eine 17 mM TNBS-Lösung.

Herstellung der Nullproben

Für die Messung im Spektrometer benötigt man eine ungefärbte Referenzlösung („Blank“), die aber alle Reagenzien enthalten muss. Dazu werden ca. 2 mg des zu untersuchenden Kollagens in ein Reagenzglas mit Schraubdeckelverschluss gegeben. Man fügt 1 ml 4%iger NaHCO₃ – Lösung, 3 ml 6 N HCl sowie 1 ml der frisch bereiteten Farbstofflösung hinzu. Da

die Säurezugabe vor dem Einbringen des TNBS-Reagenzes erfolgt, bleibt eine Färbung aus. Ab hier verfährt man mit den Blanks analog zu den Proben.

4.2.2.2 Versuchsdurchführung

Die Proben werden ebenso wie die Blanks in Reagenzgläser mit Schraubdeckelverschluss verbracht und auch mit 1 ml 4%iger NaHCO_3 – Lösung und 1 ml der frisch bereiteten Farbstofflösung versetzt. Der Verschluss wird zugezogen und man lässt für drei Stunden bei 40°C im Wasserbad reagieren. Anschließend erfolgt die Zugabe von 3 ml 6 N HCl. Im Trockenschrank wird für eine Stunde bei 120°C hydrolysiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird mit 5 ml Millipore-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 ml aufgefüllt. Es wird dreimal für 15 Minuten im Überkopfschüttler mit jeweils 15 ml Diethylether ausgeschüttelt, wobei nach jedem Schüttelvorgang die Etherphase unter dem Abzug vorsichtig abgesaugt wird. Die wässrige Lösung wird nach dem Schüttelvorgang in offene Schnappdeckelgläser gefüllt, um bei 40°C für 30 Minuten im Wasserbad den restlichen Ether abzukochen.

Der gemischte Blank wird in zwei Küvetten, die Proben jeweils in eine Küvette gefüllt. Man misst bei 346 nm im UV-VIS-Spektrometer und lässt sich die Messwerte ausdrucken. Um die Absorptionen in Stoffmengen von NH_2 umrechnen zu können, bedient man sich des molaren Absorptionskoeffizienten bestehender Eichkurven aus früher durchgeführten Versuchen mit BSA. Die benutzten Werte werden auch von der Literatur bestätigt [8].

4.2.3 Purpald[®]- Versuche

In dieser Versuchsreihe erhält man Hinweise darauf, wie viel vom eingesetzten Glutaraldehyd vom Kollagen nicht abgefangen werden konnte, man weist also **freies Aldehyd direkt** nach.

Folgende Versuche wurden durchgeführt:

1. Aufnehmen einer Eichgeraden aus einer Verdünnungsreihe von wässrigen Glutaraldehydlösungen zur zukünftigen Bestimmung von Konzentrationen aus Extinktionswerten (s. Kap. 5.2.1)
2. Hauptversuchsreihe, Reaktion der Kollagenproben mit Glutaraldehyd und Quantifizierung des freien Aldehyds (s. Kap. 5.2.2)

4.2.3.1 Versuchsvorbereitung

Aufnehmen einer Eichgeraden

Zur Errechnung von Konzentrationen aus Absorptions-Messwerten, die das Spektrometer liefert, wurde empirisch aus Verdünnungsreihen von Glutaraldehyd eine Eichgerade etabliert. Aldehydlösungen mit Konzentrationen zwischen 0,02 mmol/l und 3,0 mmol/l wurden mit PBS - Puffer aus der Stammlösung (2,6 M) hergestellt und dem Versuch zugeführt.

Inkubation des Kollagens mit Glutaraldehyd

Alle Proben befinden sich in 24-Well-Platten und werden analog zum TNBS - Versuch mit dem Aldehyd beschickt (15 µl / 2 ml) und inkubiert (24 Stunden, 37° C). Es erfolgt eine Spülung mit 300 µl Waschpuffer (PBS), der dann im Versuch vermessen wird. Man geht dabei davon aus, dass nicht gebundenes Aldehyd sich im Puffer löst.

Herstellung der benötigten Farbstofflösung

Aus dem Purpald[®]-Pulver wird durch Einwaage und Auffüllen mit 1 N NaOH die Lösung gemischt.

Herstellung der Nullproben

Als Referenz verwendet man Glutaraldehyd der Konzentration „0 mM“ und setzt diese Probe als Blank ein.

4.2.3.2 Versuchsdurchführung

200 µl einer aldehydhaltigen Testlösung werden mit 300 µl einer 1%igen Purpald[®]-Lösung in 1 N NaOH versetzt und 30 Minuten stehen gelassen. Relativ zum Gehalt an Aldehyd färbt sich die Lösung violett. Die Reaktion wird dann mit 500 µl einer 0,4%igen NaBH₄ – Lösung in 1 N NaOH abgestoppt. Somit ergibt sich ein Gesamtvolumen von 1 ml, das im Spektrometer bei 546 nm gegen einen Blank vermessen wird.

4.2.4 Agardiffusions-Versuche

Mit diesem Versuch wird die Toxizität von Substanzen auf Zellen getestet [51, 82]. Der Testansatz beruht auf der Vorstellung, dass toxische Substanzen nach Passage durch Agar lebende Zellen zum Absterben bringen. Es besteht die Möglichkeit, dass bei dieser Passage die Konzentration der Testsubstanz beeinflusst wird. Hauptaufgabe des Versuchs ist, herauszufinden, ob und in welcher Größenordnung dies abläuft. Man definiert den Grad der Toxizität dann über das **Ausmaß des Zelluntergangs**.

4.2.4.1 Versuchsvorbereitung

Kultivierung der Zellen

In 162 cm²- Zellkulturflaschen werden die Zellen mit je 35 ml Medium überschichtet und im Brutschrank bei 37° C, einem CO₂ Gehalt von 5% und 100% Luftfeuchte kultiviert. Nach Zeitintervallen von jeweils zwei Tagen tauscht man verbrauchtes Medium gegen neues aus und überprüft das Zellwachstum unter dem Lichtmikroskop hinsichtlich Fortschritt und eventueller mikrobieller Verunreinigung. Hat man so eine Konfluenz der Zellen von ca. 90% erzielt, nimmt man sie ab und passagiert sie. Zuerst wird hierzu das verbrauchte Medium abgesaugt und in jeder Flasche 6 ml PBS- Puffer über den Rasen geschwenkt, um verbliebene Rückstände zu entfernen. Der Puffer wird wieder aufgenommen und verworfen. Dann löst man die Zell-zu-Zell- und Zell-zu-Flasche-Verbindungen, indem man 8 ml des 0,25% Trypsins für drei Minuten bei Raumtemperatur auf den Zellrasen einwirken lässt. Das Trypsin wird wieder entfernt. Nach weiteren fünf Minuten Lagerung bei 37° C spült man die Flaschen mit jeweils 20 ml Medium und erhält so eine Zellsuspension, die man in einem Erlenmeyerkolben sammelt. Bei diesem Vorgang hilft ein Zellschaber. Nun zählt man die Zellen unter dem Lichtmikroskop mithilfe einer Neubauer- Zählkammer (Faktor 10⁴) und verdünnt die Suspension mit Medium auf 2,5 · 10⁵ Zellen pro ml. Diese Konzentration wird im Versuch eingesetzt.

Vorbereitung der Probenkörper

Wie unter 4.2.1 beschrieben, jedoch wurden beim bovinen Dentin diesmal nur selektiv die Scheiben aus dem zervikalen Bereich des Schneidezahns verwendet.

4.2.4.2 Versuchsdurchführung

Erster Versuchstag

Je 10 ml der gesammelten Zellsuspension aus dem Erlenmeyerkolben werden unter der sterilen Werkbank in 94/16 mm - Petrischalen eingebracht, um gleichmäßige Benetzung der Oberfläche zu erzielen, geschwenkt und 24 Stunden bei 37° C, 5% CO₂ und 100% relativer Luftfeuchte gelagert.

Zweiter Versuchstag

Nach mikroskopischer Kontrolle der Zellanheftung am Schalenboden kann nun, nach Verwerfen des verbrauchten Nährmediums, auf den Zellrasen je 10 ml Überschichtungsagar gegeben werden. Letzteren stellt man zusammen aus in der Mikrowelle erhitzten geschmolzenen Agar (3%) und auf 37° C im Wasserbad temperierten zweifach konzentrierten BME – Nährmedium. Die beiden Komponenten mischt man im Wasserbad bei 48° C in einer Schraubflasche.

Man lässt den Überschichtungsagar 30 Minuten waagrecht bei Raumtemperatur erstarren und beschriftet die Schalendeckel mit wasserfestem Stift. Unter der nahezu komplett verdunkelten Werkbank wird die lichtempfindliche Neutralrot- Färbelösung aus der Stammlösung hergestellt und jeweils 10 ml pro Petrischale aufgebracht. Anschließend werden die Schalen in einer lichtdichten Edelstahlbox mit Deckel 30 Minuten bei 37° C, 5% CO₂ aufbewahrt, um die Färbereaktion zu vollziehen.

Danach wird die Färbelösung abgenommen und verworfen; die Schalen sind nun bereit zur Aufnahme der Proben. Diese werden in Vierergruppen aufgelegt, bestehend aus einer Positivkontrolle (PVC-Schlauch [85]) mit garantierter Zelltod-Wirkung, einer Negativkontrolle (NaCl-Lösung) ohne Beeinflussung der Zellen und zwei Proben mit zu messender Zelltoxizität. Dabei wurden je nach Versuch entweder gleichartige Proben unterschiedlichen Konzentrationen des Testmaterials Glutaraldehyd ausgesetzt, oder eine konstante Konzentration des Aldehyds auf unterschiedlichen Probesubstraten getestet.

Als Trägermaterial für das Glutaraldehyd dienen zu 6 mm Durchmesser gestanzte Filterpapierplättchen, auf die jeweils 15 µl des Aldehyds aufpipettiert werden. Diese wurden begleitend auch vollkommen ohne Kollagen oder Dentin direkt auf dem Agar aufgebracht vermessen.

Unter Lichtausschluss werden die Schalen im Brutschrank für 24 Stunden bei 37° C, 5% CO₂ und 100% relativer Luftfeuchte inkubiert.

Dritter Versuchstag

Die Auswertung der nun teilweise entfärbten Zellkulturen erfolgt mikroskopisch und makroskopisch. Die Ausdehnung der Entfärbung wird durch Ausmessen in vier Richtungen mit untergelegtem Millimeterpapier vom Rand des Filters bis zum Ende der Entfärbungszone erfasst. Anschließend wird der Mittelwert errechnet und eine Einteilung nach Entfärbeindex und Lysisindex (mikroskopisch) vorgenommen (s. Tab.1). Es wurden insgesamt sieben unabhängige Versuche durchgeführt.

Entfärbeindex

| | |
|---|---|
| 0 | Keinerlei Zone der Entfärbung erkennbar |
| 1 | Entfärbung nur unter der Prüfsubstanz |
| 2 | Zone nicht größer als 0,5 cm von der Prüfsubstanz |
| 3 | Zone nicht größer als 1,0 cm von der Prüfsubstanz |
| 4 | Zone größer als 1,0 cm von der Prüfsubstanz |
| 5 | Die gesamte Kultur ist entfärbt. |

Lysisindex

| | |
|---|---|
| 0 | Gesunder Zellrasen, Zellen gefärbt, aber nicht abgerundet |
| 1 | Zellen entfärbt, einzelne Zellen abgerundet |
| 2 | Zellen entfärbt, mehrere Zellen abgerundet |
| 3 | Zellen entfärbt, alle Zellen abgerundet |
| 4 | Zellen entfärbt, alle Zellen abgerundet, größere Abstände zwischen den Zellen |
| 5 | Zellen zerstört |

Tabelle 1: Definition der Indizes zur Beurteilung der Messergebnisse im Agar-Overlay-Versuch

4.2.5 REM-Analyse

Die drei unterschiedlichen Versuchsmaterialien wurden im Rasterelektronenmikroskop bei 430facher und 1770facher Vergrößerung untersucht, um auch mikroskopisch materialbezogene Spezifikationen unterscheiden zu können. Dazu wurden die Proben auf spezielle Halterungen (REM-Probenteller, Bdl-TEC, D-Walluf) montiert und mit einer

leitfähigen Goldschicht überzogen (Sputtergerät Balzers SCD 040, Fa. Balzers Union, Lichtenstein). Benutzt wurde das Rasterelektronenmikroskop Stereoscan 240, Fa. Cambridge Instruments, D-Nußloch.

4.2.6 Statistik – Präsentation der Graphen

Die statistische Auswertung aller Messergebnisse erfolgten in SPSS/PC+, Version 13.0 von SPSS, Chicago IL, USA. Die grafische Aufbereitung geschah mit Sigma Plot[®] Version 8.0 (SPSS). Die Darstellung der Balken in den Graphen beruht auf den zu Medianwerten prozessierten Messergebnissen mit den Fehlerbalken in Form von Perzentilen (25% / 75%).

Den Signifikanzanalysen liegt für alle Versuche der Mann-Whitney-U-Test zugrunde, mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$.

In Kapitel 6.4, einer modellhaften Implementierung der Ergebnisse, wurde mit dem Programm Table Curve 2D, Version 5.01 von Systat Software Inc. eine sigmoidale logistische Dosis-Reaktions-Kurve gefittet.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der Kollagensubstrate nach Reaktion mit Glutaraldehyd durch den TNBS Test

Mithilfe dieses Tests werden primäre Aminogruppen bestimmt, an welche sich Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) als gelber Farbstoff addiert. Werden diese aufgrund einer Reaktion mit Glutaraldehyd „besetzt“ und gegenseitig vernetzt, fällt die Farbreaktion dadurch geringer aus. Durch diesen Test ist eine Proteinquantifizierung, die im Falle des Dentins mit dem Kollagengehalt korreliert, aber auch eine Aussage über das Maß der Quervernetzung möglich. In Vorversuchen und aus der Literatur ist ein linearer Zusammenhang zwischen NH_2 – Gruppen und Absorption bekannt.

5.1.1 Vorversuche

Um zu einer verlässlichen Hauptversuchsreihe zu gelangen, kommt den Vorversuchen zur Etablierung einer einheitlichen Methode große Bedeutung zu.

5.1.1.1 Festlegung der Aldehydkonzentrationen

Verschiedene Verdünnungen von Glutaraldehyd wurden auf gereinigtes Kollagen (Vliese von Innocoll) aufgebracht und vermessen. Es stellte sich der später verwendete Bereich zwischen 0 mM und 10 mM als günstig heraus, weil hier veritable Messergebnisse produziert werden konnten und sich bei dieser Grenze die maximale Aufnahmekapazität des Kollagenschwamms abzeichnete. Eine fünfprozentige Glutaraldehydlösung, wie in Bondingsystemen verwendet, entspräche 500 mM und würde bei weitem die Bindungskapazität des Kollagens übersteigen.

5.1.1.2 Ermittlung des Probengewichtes

Mechanisch zerkleinerte Dentinstücke von je ca. 3 mg wurden vermessen. Es zeigte sich, dass diese Masse zu gering angesetzt war, da nur 20% davon Kollagen darstellt. Ein guter Wert für die Einwaage pendelte sich ein bei ca. 1 mg für Proben des Innocoll-

Kollagenschwamms, ca. 5 mg für die Proben demineralisierten Dentins, und ca. 25 mg für die Rinderdentinproben im Originalzustand.

5.1.1.3 Modellversuch Dentinbestandteile

Zunächst zeigten sich Schwierigkeiten bei der Vermessung von Dentinproben im Originalzustand. Diese waren zurückzuführen auf das stete Auftreten einer relevanten Farbstoffreaktion in den Referenzproben, den sog. Blanks. Weil aber die Farbreaktion in jeder Probe relativ zu den Blanks bestimmt wird, mussten so die Messergebnisse als falsch verworfen werden. Um nachzuweisen, was diese Anomalie verursacht, wurden vier Materialien, die beispielhaft für einzelne Komponenten im Dentin stehen, dem Standard TNBS- Test unterzogen:

| Material | Bedeutung |
|------------------------------------|---|
| Demineralisierter Schweinezahn | Das Material steht stellvertretend für die Kollagenanteile im Dentin. Im Versuch konnte eine sehr gute und reproduzierbare Messbarkeit der freien Aminogruppen festgestellt werden. |
| Chitosan | Dieses Polysaccharid wurde auf seine Reaktivität mit dem Farbstoff TNBS getestet. Dabei kommt Chitosan zwar nicht im Dentin vor, bietet aber wie Kollagen messbare freie Aminogruppen und steht als Modell für Glykosaminoglykane. Chitosan verursachte eine deutliche Farbreaktion. |
| Heparin | Diese Substanz enthält Carbonsäure- ($-\text{CO}_2\text{H}$), Schwefelsäure- ($-\text{OSO}_3\text{H}$) und N – Sulfonsäuregruppen ($-\text{NH-SO}_3\text{H}$); sie diente als Beispiel für ein Glykosaminglykan aus dem bindegewebigen Anteil des Dentins. Keine Farbreaktion war feststellbar. |
| di-Natriumhydrogenphosphatdihydrat | Dieses Phosphat entsteht bei der sauren Hydrolyse der anorganischen Dentinmatrix aus dem Apatit. Es verhielt sich innerhalb des TNBS-Test neutral und erzeugte keine Farbreaktion. |

Als Rückschluss aus diesem Vorversuch kann festgehalten werden, dass demineralisiertes Dentin hervorragend im Versuch funktioniert. Ferner scheinen die untersuchten, im Dentin vorhandenen Substanzen den Ablauf des Versuchs überhaupt nicht zu stören (Heparin und Phosphat) oder das Vorkommen eigener NH_2 -Reste bewirkt eine Steigerung der Werte, weil jene in die Bewertung freier Aminogruppen miteinfließen (Chitosan stellvertretend für „Amino-Zucker“ im Bindegewebe).

5.1.1.4 Zustand und Form der Dentinprobe

Dieser Vorversuch beruht auf der Überlegung, ob nicht die Farbreaktion der freien Aminogruppen mit dem Farbstoff TNBS verbessert werden könnte, wenn das Rinderdentin fein vermahlen wird. Bewirkt eine drastisch vergrößerte Oberfläche eine Änderung der Messwerte?

Dentinstücke, von einem Hammer grob zerkleinert, werden von einer Kugelmühle über 24 Stunden homogen gemahlen und 24 Stunden im Exsikkator getrocknet.

Es zeigte sich, dass diese Form des Dentins nicht im Versuch einsetzbar war. Es konnte während des Versuchs keine vollständige Hydrolyse des zerkleinerten Pulvers erzielt werden. Säureunlösliche Reste blieben zurück, das Material klebte an den Reagenzglaswänden und das Ergebnis der Messung war unzufriedenstellend.

Die Form der Proben blieb so die ausgestanzte Scheibe.

5.1.2 Bestimmung der Aminogruppen aller verwendeten Materialien

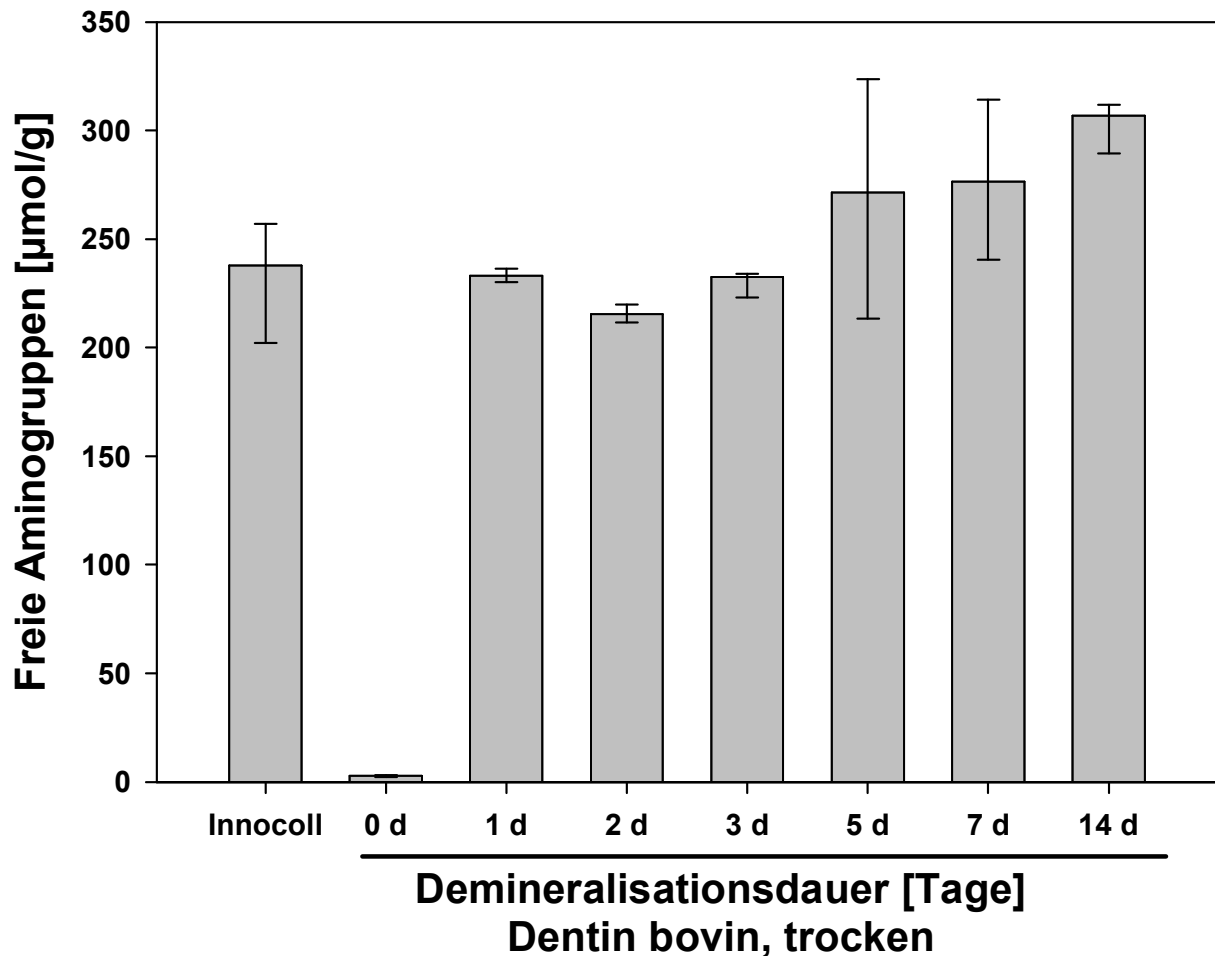


Abbildung 14: Darstellung der Stoffmenge an freien Aminogruppen von allen eingesetzten Materialien in Abhängigkeit der Demineralisationszeit in EDTA- Lösung (550 mM oder ca. 19 Gew.-%), TNBS-Test; (n=5 Stichproben pro Zustand; Median, 25/75% Perzentile)

Bei der Bestimmung der freien Aminogruppen der verschiedenen Materialien erhält man unterschiedliche Ergebnisse (Abb. 14). Betrachtet man die Gruppe des bovinen Dentins, erkennt man eine Abweichung beim Rinderdentin im Originalzustand in Form von wesentlich geringerer Anzahl gemessener freier Aminogruppen (Medianwert 2,7 µmol/g).

Die Proben, die einen Tag und länger zur Entfernung des anorganischen Kalziumphosphat-Anteils aus dem Dentin in der EDTA-Lösung gelagert waren, setzen sich deutlich ab und erreichen Werte vergleichbar mit denen des Innocoll-Kollagens mit 237,7 µmol/g. Ein Tag Demineralisationszeit erhöht den Wert bereits auf 233,1. 215,4 bzw. 232,6 µmol/g erhält man bei Tag zwei und drei. Bei Tag fünf und sieben ergeben sich die Werte 271,3 und 276,4 µmol/g. Bei zwei Wochen Demineralisationsdauer kommt man auf 306,7 µmol/g.

Der Zusatz „trocken“ bedeutet, dass alle Proben für 24 Stunden im Exsikkator gelagert wurden, ehe die Bestimmung der Masse erfolgte. Somit beziehen sich die Werte netto auf die tatsächliche Kollagenmasse ohne Verfälschung durch überschüssiges Wasser.

5.1.3 Individuelle Parameter des Rinderdentins

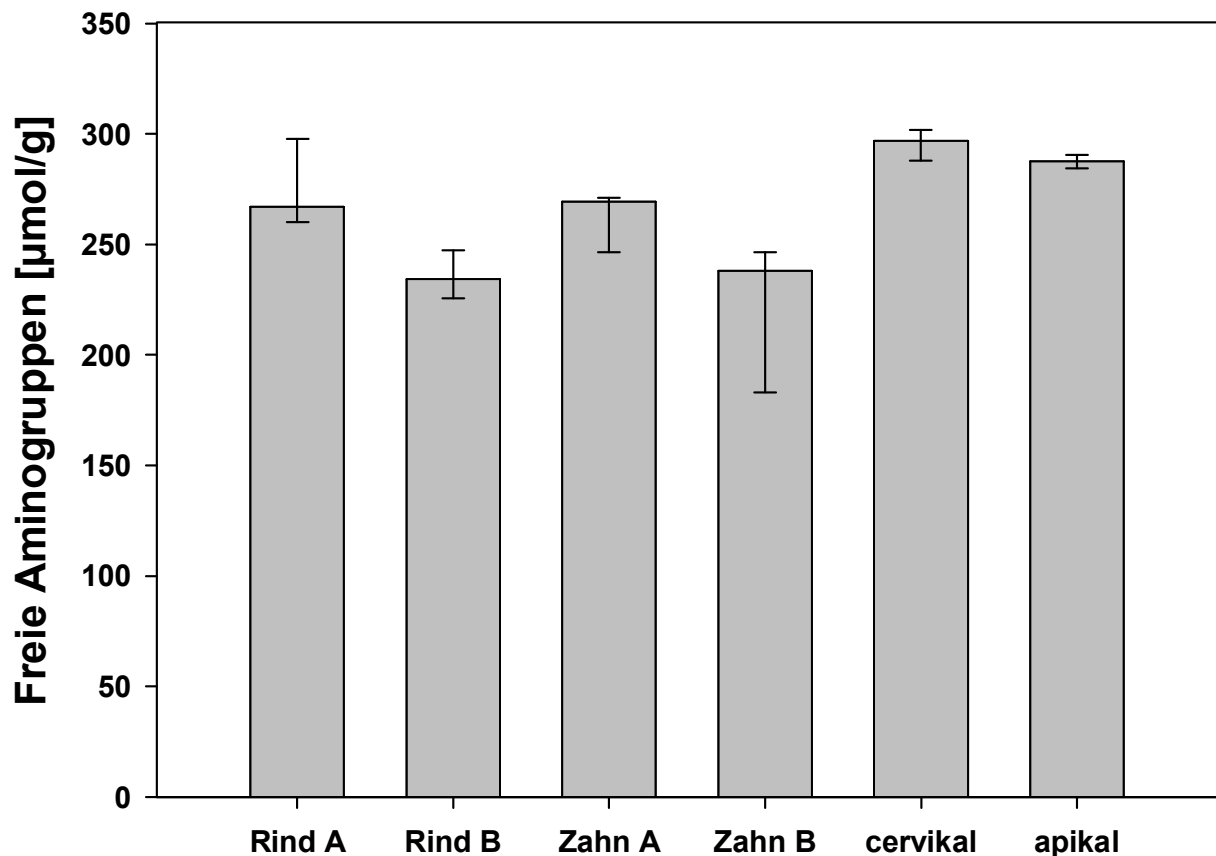


Abbildung 15: Darstellung freier Aminogruppen bei unterschiedlichen Tieren und Zähnen, sowie variabler Probenlokalisierung innerhalb eines Zahnes, TNBS-Test; (Stichproben pro Zustand n=4 bei Rind A/B, n=5 bei Zahn A/B, n=10 bei cervikal/apikal; Median, 25/75% Perzentile)

Abbildung 15 zeigt das Ergebnis der Untersuchung von grundlegenden Variablen, die sich bei der Gewinnung der Dentinproben ergaben. Drei Vergleiche wurden angestellt.

5.1.3.1 Interindividuelle Unterschiede

Besteht hinsichtlich des Kollagengehalts der Zähne von Tier zu Tier ein Unterschied?

In dieser Frage gelangte man zur Erkenntnis, dass die Abweichung zwischen Rind A und Rind B, zwei zufällig ausgewählter Individuen, trotz des statistisch signifikanten Unterschieds der Werte von $p=0,029$ zu vernachlässigen ist (Medianwerte 266,9 bzw. 234,3 $\mu\text{mol/g}$). Hier spielt die nur geringe Probenzahl von $n=4$ eine entscheidende Rolle. Bei höherer Stichprobenzahl würde sich sehr wahrscheinlich kein signifikanter Unterschied mehr finden lassen.

5.1.3.2 Unterschiede zwischen Zähnen des gleichen Individuums

Ergeben sich unterschiedliche Werte, wenn man Proben eines Tieres verarbeitet, jedoch dabei verschiedene Zähne?

Die Analyse zeigte keine bedeutenden Differenzen zwischen Zahn A und Zahn B (Werte 269,3 und 238,1 $\mu\text{mol/g}$); diese wurden ebenfalls zufällig ausgewählt. Auch hier ergeben sich zwar signifikante Unterschiede ($p=0,032$), jedoch ist die Probenzahl von $n=5$ wiederum klein.

5.1.3.3 Lokalisation der Probenentnahme

Muss man auf die Entnahmestelle der Probe achten, d.h. erhält man mit einer Probe aus der zervikalen Region des Rinderzahns andere Werte, als mit einer apikal entnommenen?

Auch hier zeigte sich, dass es keine Rolle spielt, woher die Probe stammt. Als Werte wurden 296,8 und 287,5 $\mu\text{mol/g}$ ermittelt, der Unterschied war statistisch nicht signifikant.

5.1.3.4 Bedeutung für den Versuch

Die gewonnenen Erkenntnisse ermöglichten die Herstellung der Proben in großer Zahl, da weder auf das Tier, noch auf den Zahn, noch auf die Entnahmestelle Rücksicht genommen werden muss und standardisierter vorgegangen werden kann.

5.1.4 Zustand des Dentins vor der Bestimmung der Masse

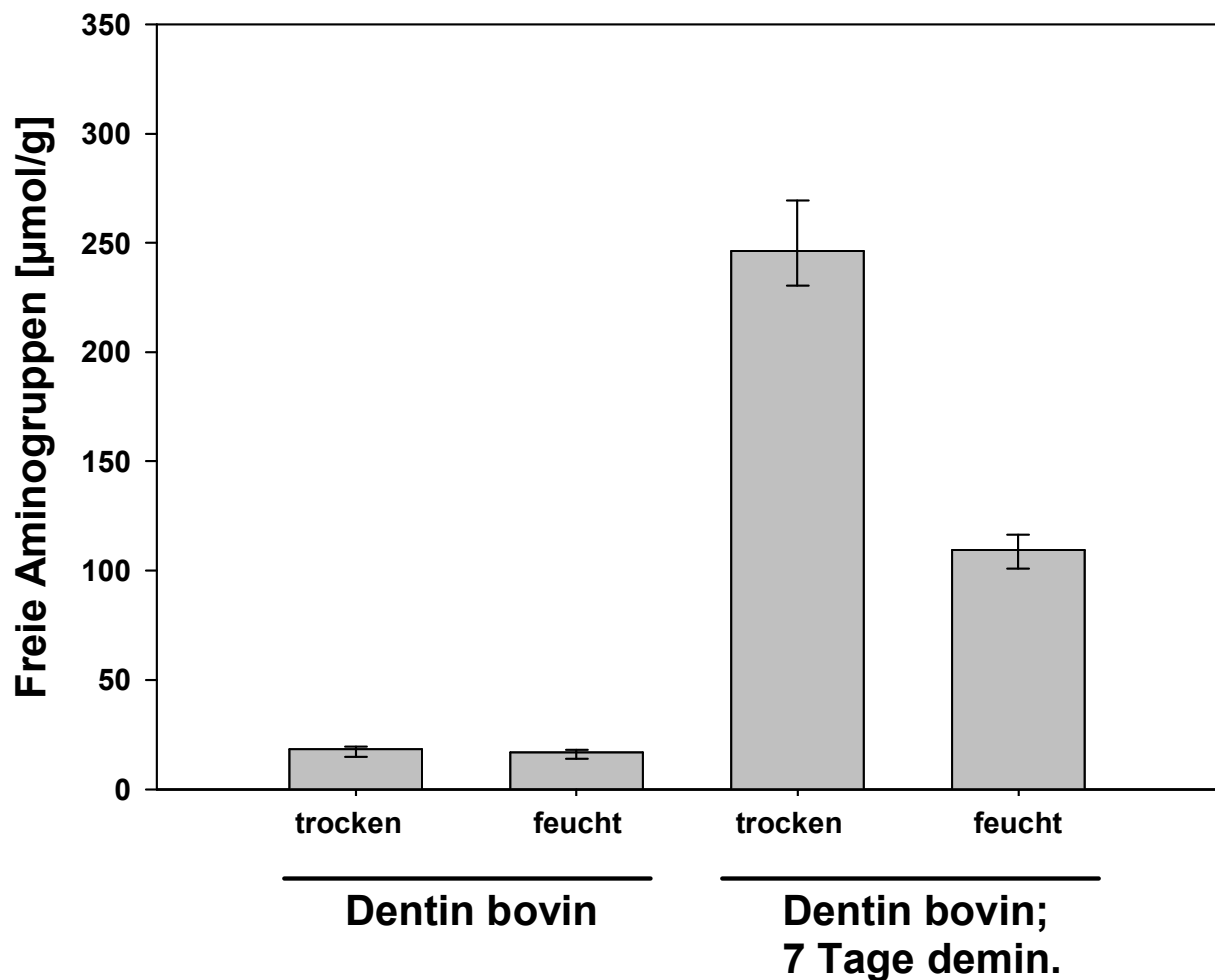


Abbildung 16: Darstellung freier Aminogruppen bei den Dentinproben in Abhängigkeit ihrer Feuchte, TNBS-Test; (n=5 Stichproben pro Zustand; Median, 25/75% Perzentile)

Bei der Bestimmung des Kollagengehaltes, den man auf die Anzahl freier Aminogruppen stützt, bezieht man sich auf die Masse der Probe. Diese wird durch eine Präzisionswaage ermittelt. Möchte man die reine Masse des Kollagens wissen, muss vorher aber getrocknet werden. Dies geschah für alle Proben „trocken“ im Exsikkator für 24 Stunden. Mit diesen Proben vergleicht man solche, denen nur oberflächlich die Feuchtigkeit entzogen wurde, die also lediglich „trockengetupft“ wurden. Sie erhielten die Bezeichnung „feucht“. Das Ergebnis klärt die Frage, ob das aufwändige Trocknen zwingend indiziert ist. Gleichzeitig beobachtet man die Auswirkung dieser Maßnahmen sowohl für den Originalzustand, als auch für den mit EDTA behandelten Zustand.

Keinen Unterschied erkennt man bei den Proben im Originalzustand. Die Trocknung liefert hier pro Masseinheit kaum höhere Werte (trocken 18,3, feucht 16,8 $\mu\text{mol/g}$).

Einen deutlichen Anstieg erhält man beim demineralisierten Dentin. Mehr als doppelt so hoch fällt das Ergebnis für die Kollagenkonzentration aus, wenn man störende und verfälschende Feuchtigkeit im Exsikkator entzieht. Die genauen Werte betragen hier 246,4 $\mu\text{mol/g}$ für den Zustand „trocken“ und 109,3 $\mu\text{mol/g}$ für „feucht“. Der Versuch führt zu der Erkenntnis, dass auf die Trocknungsmaßnahme nicht verzichtet werden kann.

5.1.5 Innocoll-Schwamm reagiert mit wässriger Glutaraldehydlösung

5.1.5.1 Bedeutung des Versuchs

Bei den mit Aldehyd inkubierten Proben vollzieht sich, je nach Konzentration und Volumen, eine Quervernetzungsreaktion, wobei freie Aminogruppen des Kollagens „verbraucht“ werden, so dass diese für den Farbstoff TNBS nicht mehr als Reaktionspartner zur Verfügung stehen. Deshalb ist mit erhöhtem Zusatz von Glutaraldehyd eine Abnahme der ermittelten freien Gruppen zu erwarten.

Es wurden zwei Testreihen durchgeführt, die sich im angebotenen Volumen des Aldehyds unterscheiden: 15 μl und 2,0 ml. Dabei ergeben sich jeweils auch unterschiedliche Stoffmengen an Aldehyd (s. Tab. 2). Beim Anbieten eines kleinen Volumens (15 μl), was einer geringen Stoffmenge entspricht, werden selektiv durch das Aldehyd Bindungsplätze besetzt. Dieses Versuchsdesign gleicht klinisch einer Desensitivierungsbehandlung an freiliegendem Dentin.

Verbringt man das Material aber in ein höheres Volumen (2,0 ml), gleichbedeutend mit einer etwa 133 mal höheren Stoffmenge, werden durch das stoffmengenbezogene Überangebot mehr Bindungsplätze bereits bei niedrigeren Aldehydkonzentrationen besetzt. Das Material sättigt sich sozusagen mit Aldehydmolekülen aus der Lösung bis zur vollständigen Erschöpfung der Kapazität.

| | | | | | | | |
|----------------------------------|---|-------|------|------|------|-------|-------|
| Konzentration [mmol/l] | 0 | 0,5 | 1 | 2 | 3 | 5 | 6 |
| Konzentration [Massen-%] | 0 | 0,005 | 0,01 | 0,02 | 0,03 | 0,05 | 0,06 |
| Stoffmenge n bei 15 µl [nmol] | 0 | 7,5 | 15 | 30 | 45 | 75 | 90 |
| Stoffmenge n bei 2 ml [nmol] | 0 | 1000 | 2000 | 4000 | 6000 | 10000 | 12000 |

| | | | | | | | |
|----------------------------------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
| Konzentration [mmol/l] | 10 | 20 | 30 | 50 | 100 | 200 | 250 |
| Konzentration [Massen-%] | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,5 | 1 | 2 | 2,5 |
| Stoffmenge n bei 15 µl [nmol] | 150 | 300 | 450 | 750 | 1500 | 3000 | 3750 |
| Stoffmenge n bei 2 ml [nmol] | 20000 | 40000 | 60000 | 100000 | 200000 | 400000 | 500000 |

Tabelle 2: Umrechnung zwischen Konzentration und Stoffmenge bei verschiedenen Volumina

5.1.5.2 Volumen der Aldehyd-Lösung: 15 μ l

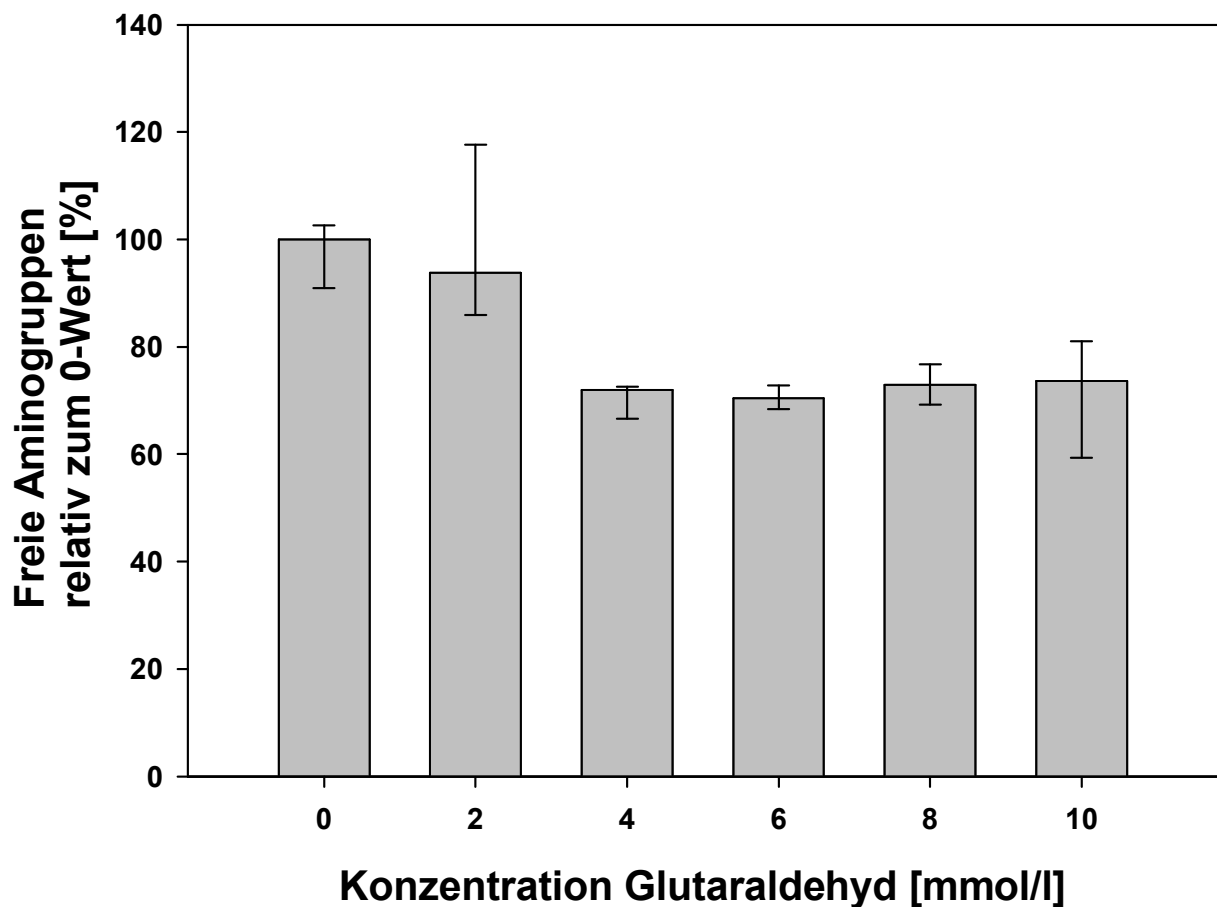


Abbildung 17: Darstellung freier Aminogruppen der Innocollproben in Abhängigkeit der zugesetzten Aldehydkonzentration, Volumen 15 μ l, TNBS-Test; relative Darstellung mit 0-Wert= 100% (n=5 Stichproben pro Zustand; Median, 25/75% Perzentile)

Verglichen mit der aldehydfreien 0-Wert- Lösung zeigen sich bei 2 mM (93,8 %) noch keine echten Effekte. Erst ab 4 mM (72,0 %) kommt es zu einer signifikanten Erniedrigung der Werte und gleichsam zu einer Blockbildung zusammen mit 6 mM (70,4%), 8 mM (72,9%) und 10 mM (73,6%). Dieser Block unterscheidet sich vom 0-Wert mit $p=0,003$ bzw. $p=0,006$ und von 2mM mit $p=0,029$.

5.1.5.3 Volumen der Aldehyd-Lösung: 2,0 ml

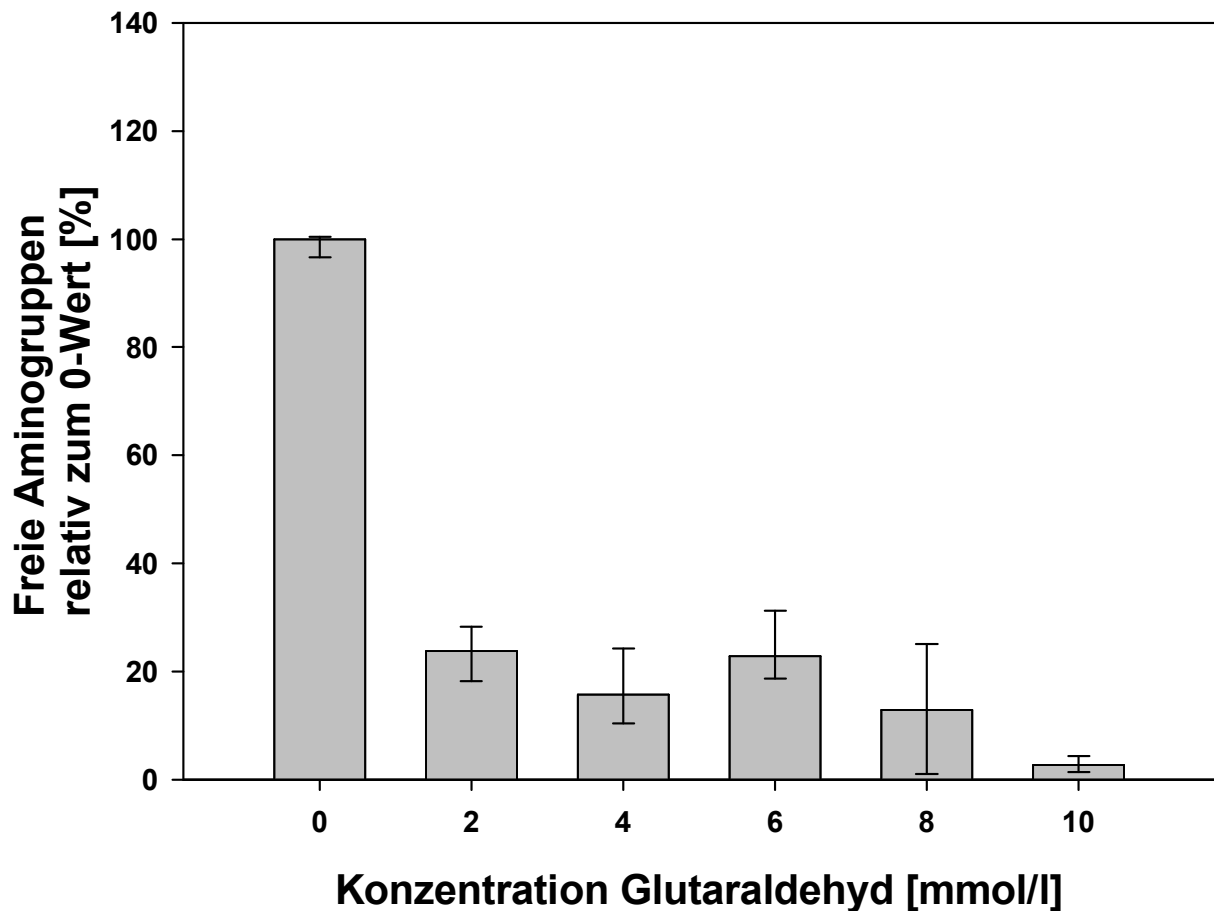


Abbildung 18: Darstellung freier Aminogruppen der Innocollproben in Abhängigkeit der zugesetzten Aldehydkonzentration, Volumen 2,0 ml, TNBS-Test; relative Darstellung mit 0-Wert= 100% (n=5 Stichproben pro Zustand; Median, 25/75% Perzentile)

Schon ab der ersten Konzentration von 2 mM sinkt die Anzahl freier Gruppen ab auf 23,8% und fällt weiter ab in der Reihe über 4 mM (15,7%), 6 mM (22,8%) bis 8 mM (12,9%). Bei 10 mM werden mit 2,7% kaum noch freie Gruppen gemessen. Hier scheint das Material in seiner Aufnahmekapazität nahezu erschöpft zu sein. Alle Konzentrationen unterscheiden sich signifikant vom 0-Wert mit $p=0,029$ und zusätzlich – mit Ausnahme von 8 mM – von 10 mM mit ebenfalls $p=0,029$.

5.1.6 Bovines Dentin reagiert mit wässriger Glutaraldehydlösung

Es wurde die Glutaraldehyd-Reaktion mit Originaldentin und nach dessen Demineralisierung untersucht. Auf diese Weise sollte der Einfluss der nativen Struktur und Zusammensetzung des Dentins auf die Reaktion mit Glutaraldehyd bestimmt werden. Wieder wurden die Untersuchungen mit zwei verschiedenen Volumina an Glutaraldehyd durchgeführt.

Versuche, Dentin im Originalzustand mit TNBS reagieren zu lassen, zeigten sich erfolglos: Ohne Demineralisierung funktioniert die Nachweismethode auf freie NH_2 -Gruppen nicht. Somit wurde ausschließlich demineralisiertes Dentin für den Nachweis benutzt.

5.1.6.1 Volumen der Aldehyd-Lösung: 15 μl

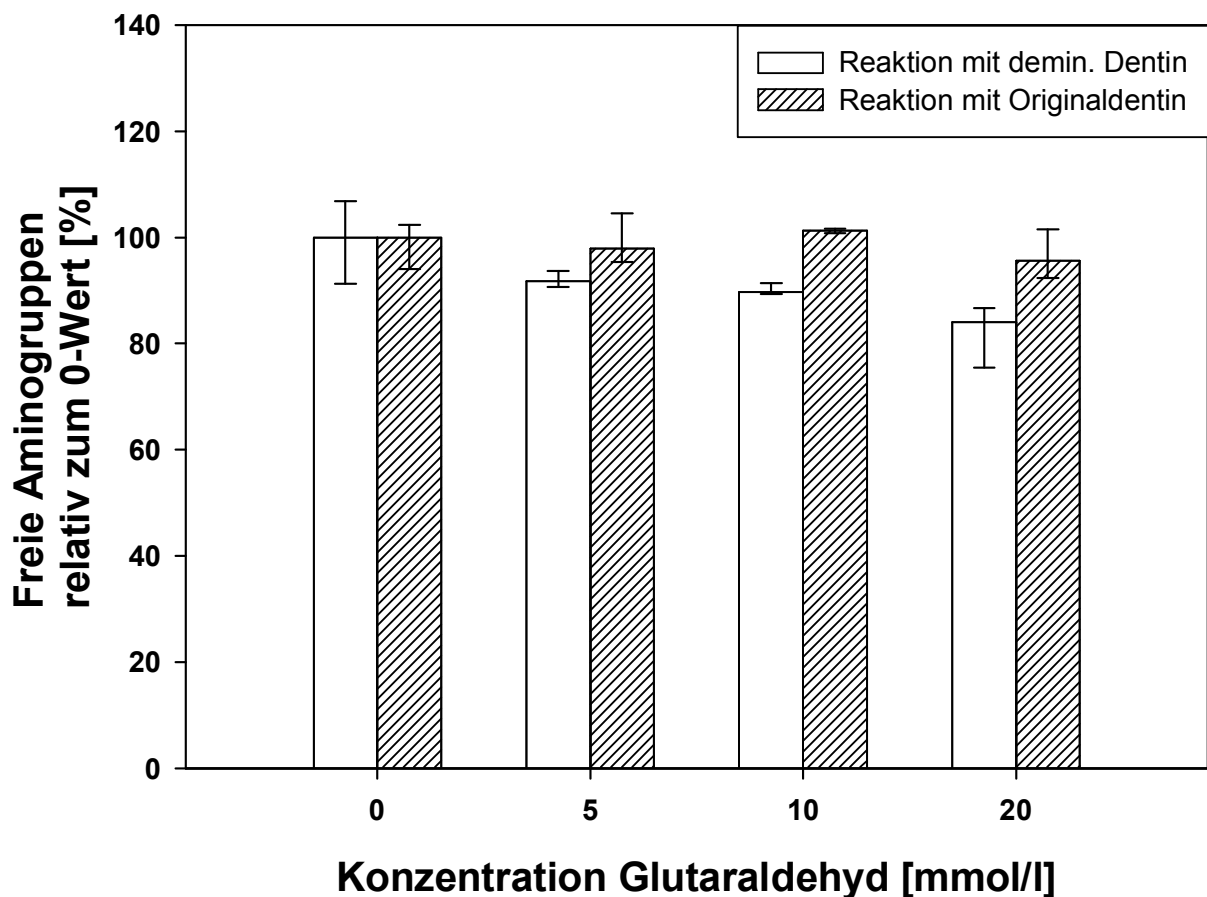


Abbildung 19: Darstellung freier Aminogruppen der Rinderdentinproben in Abhängigkeit der zugesetzten Aldehydkonzentration, TNBS-Test; relative Darstellung mit 0-Wert= 100% (n=5 Stichproben pro Zustand; Median, 25/75% Perzentile)

Über die Konzentrationen 5 mM (91,8%), 10 mM (89,7%) und 20 mM (84,0%) sieht man bei der Reaktion mit demineralisiertem Dentin eine leichte Degression der Werte, ausgehend vom 0-Wert. Signifikant unterscheiden sich 10 mM vom 0-Wert mit $p=0,028$ und 20 mM von allen Werten mit $p=0,001$ im Vergleich zum 0-Wert und $p=0,008$ verglichen zu 5 mM und 10 mM. Kaum eine Veränderung stellt sich ein bei der Reaktion mit Originaldentin. Hier ergeben sich keine signifikant unterschiedlichen Werte angefangen vom 0-Wert über 5 mM (97,9%), 10 mM (101,3%) bis 20 mM (95,6%). In diesem Fall scheinen die Aldehydmoleküle schlechter – durch die anorganische Matrix in der Diffusion behindert – in Kontakt mit dem Kollagennetzwerk zu kommen.

5.1.6.2 Volumen der Aldehyd-Lösung: 2,0 ml

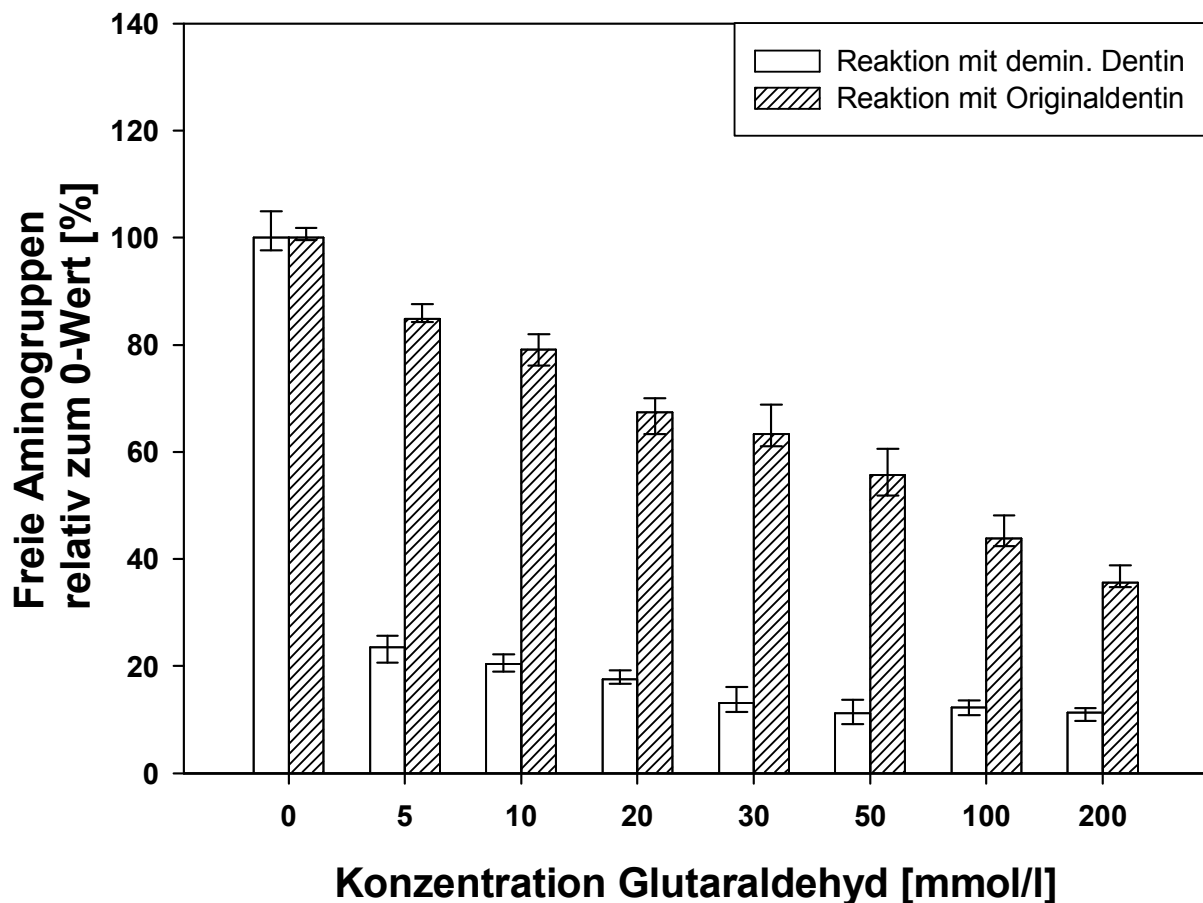


Abbildung 20: Darstellung freier Aminogruppen der Rinderdentinproben in Abhängigkeit der zugesetzten Aldehydkonzentration, Volumen 2,0 ml, TNBS-Test; relative Darstellung mit 0-Wert= 100% (n=5 Stichproben pro Zustand; Median, 25/75% Perzentile)

Dagegen zeigte sich ein deutlicher Effekt, wenn den beiden Dentinmodifikationen ein Überangebot an Aldehyd verabreicht wird (2,0 ml Volumen). Nach einer vorherigen Demineralisation des Dentins fallen die Werte für freie Aminogruppen bereits bei einer Konzentration von 5 mM deutlich ab (23,5%) und dann über 10 mM (20,4%), 20 mM (17,5%), 30 mM (13,1%), 50 mM (11,2%), 100 mM (12,2%) und 200 mM (11,4%) nur noch leicht. In der Gruppe von 0 mM bis 20 mM unterscheiden sich alle Werte voneinander mit einer Signifikanz von stets $p=0,029$ mit Ausnahme von 5 mM zu 10 mM, und 10 mM zu 20 mM. Ab 30 mM gibt es keinen signifikanten Unterschied mehr zwischen den Werten.

Nahezu linear stellt sich die Verminderung bei der Gruppe dar, in der Originaldentin für die Reaktion mit dem Aldehyd eingesetzt wurde. Begonnen vom 0-Wert ergeben sich Werte bei 5 mM von 84,8%, bei 10 mM von 79,2%, bei 20 mM von 67,4%, bei 30 mM von 63,3%, bei 50 mM von 55,7%, bei 100 mM von 43,8% und bei 200 mM von 35,6%. Alle Werte sind untereinander signifikant unterschiedlich mit $p=0,029$, außer 20 mM zu 30 mM und 30 mM zu 50 mM.

Wiederum scheint die anorganische Matrix das Kollagen abzuschirmen, aber aufgrund der höheren Stoffmenge an angebotenerem Glutaraldehyd im Vergleich zur 15 μ l-Applikation werden deutlich mehr Aminogruppen gebunden. Mit Ausnahme des 0-Wertes unterscheiden sich bei gegebener Konzentration die Ergebnisse für die Zustände „Demineralisiertes Dentin“ und „Originaldentin“ alle mit einer Signifikanz von $p=0,029$.

5.2 Bestimmung freier Glutaraldehyd-Moleküle nach Reaktion mit Kollagen und Dentin durch den Purpald[®] Test

Die Purpald[®]-Reagenz färbt Aldehyde in Lösungen violett an. Im Vergleich zum indirekten Nachweis im TNBS-Test, der Aminogruppen bestimmt, stellt der Purpald[®]-Test ein sehr direktes Verfahren zur Messung vorhandenen Glutaraldehyds dar. Man misst die Konzentration, die nach dem Kontakt mit den Kollagenproben bestehen bleibt; was von den Proben nicht gebunden werden konnte, also der physiologischen Umgebung zugeführt wird, ist das Messergebnis. So kann man diese Versuchsreihe auch mit der später noch folgenden Agardiffusionstestreihe in unmittelbaren Zusammenhang bringen, denn auch dort spielt die Wirkung des nicht mit dem Dentin reagierten Aldehyds eine zentrale Rolle.

5.2.1 Vorversuch – Bestimmen einer Eichgeraden

Für zehn Glutaraldehyd-Konzentrationen zwischen 0,02 mM und 3,0 mM wurde die Absorption bestimmt, um in späteren Versuchen einer gemessenen Absorption wiederum eine Konzentration zuordnen zu können. Berechnungsgrundlage hierfür stellt die Steigung der Eichgeraden dar, die Formel lautet $y=0,73427x$.

Eichgerade für die Purpaldversuche

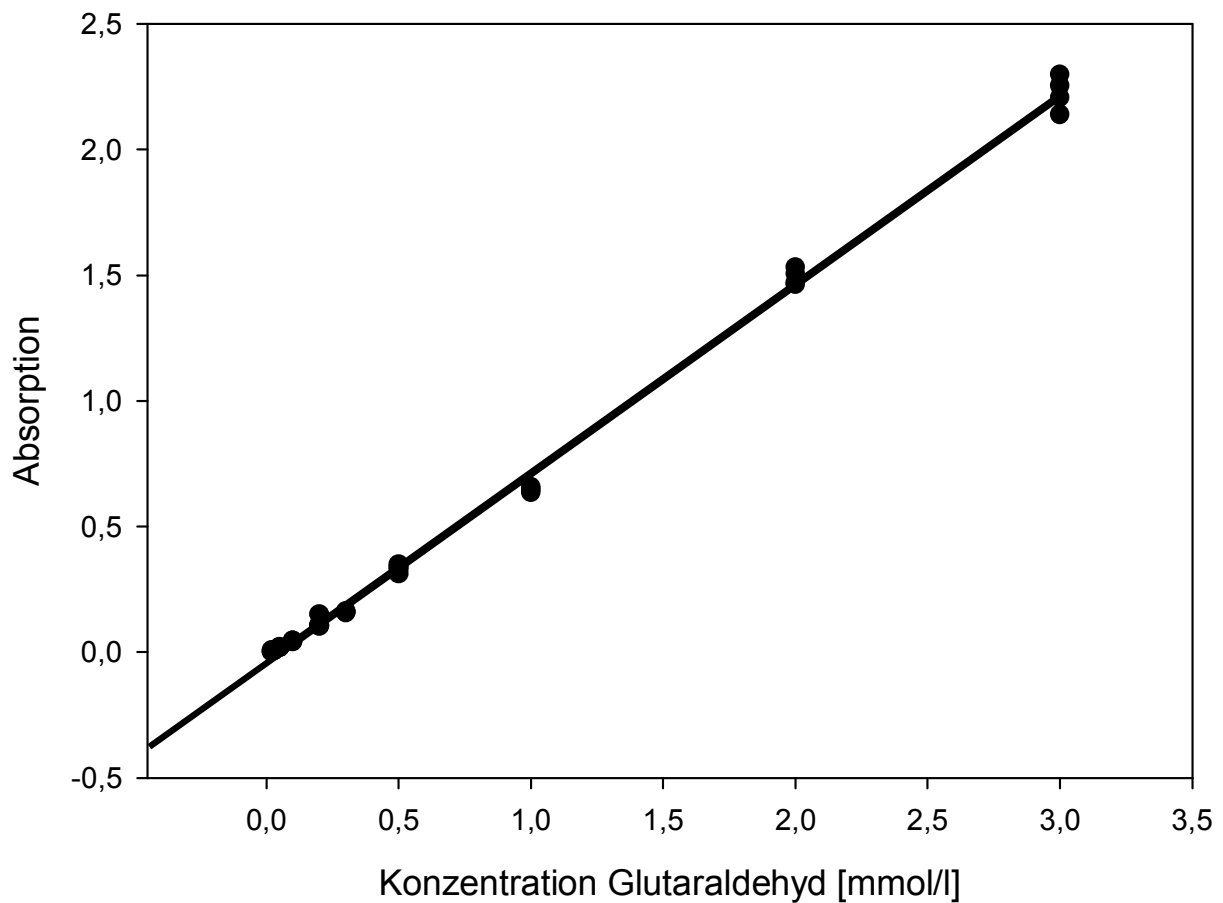


Abbildung 21: Eichgerade für die Purpald[®]-Versuche

5.2.2 Hauptversuche

Die Ergebnisse werden auf drei verschiedene Weisen dargestellt. Dies ist nötig, um gemessene Phänomene von verschiedenen Seiten zu beleuchten. Das dient somit zum besseren Verständnis. Auf der Abszisse findet sich dabei stets die eingesetzte Konzentration des Aldehyds, auf der Ordinate immer eine Darstellungsform des nicht gebundenen, frei vorkommenden Glutaraldehyds.

Als erstes wurde auf der Ordinate die Stoffmenge als absolute Zahl dargestellt. Dadurch erhält man eine Vorstellung, welche absolute Menge an Glutaraldehyd nach der Reaktion mit Kollagen bzw. Dentin noch vorhanden ist.

Als Zweites wurde aus der eingesetzten Konzentration und dem Volumen eine Ausgangsstoffmenge ermittelt mit der wiederum die nach der Reaktion frei vorliegende Stoffmenge prozentual errechnet wurde. Dies gibt Auskunft über den Anteil des freien Aldehyds relativ zum eingesetzten und beurteilt die verschiedenen Materialien in ihren Unterschieden hinsichtlich ihres Retentionsverhaltens.

Zuletzt gibt die Korrelation des freien Aldehyds zur genauen Masse der Kollagenproben Aufschluss darüber, wie viel Aldehyd pro Masseinheit Kollagen nicht abgefangen werden konnte, im Sinne einer Einschätzung zur „Kapazität“ des Kollagens.

5.2.2.1 Stoffmenge absolut

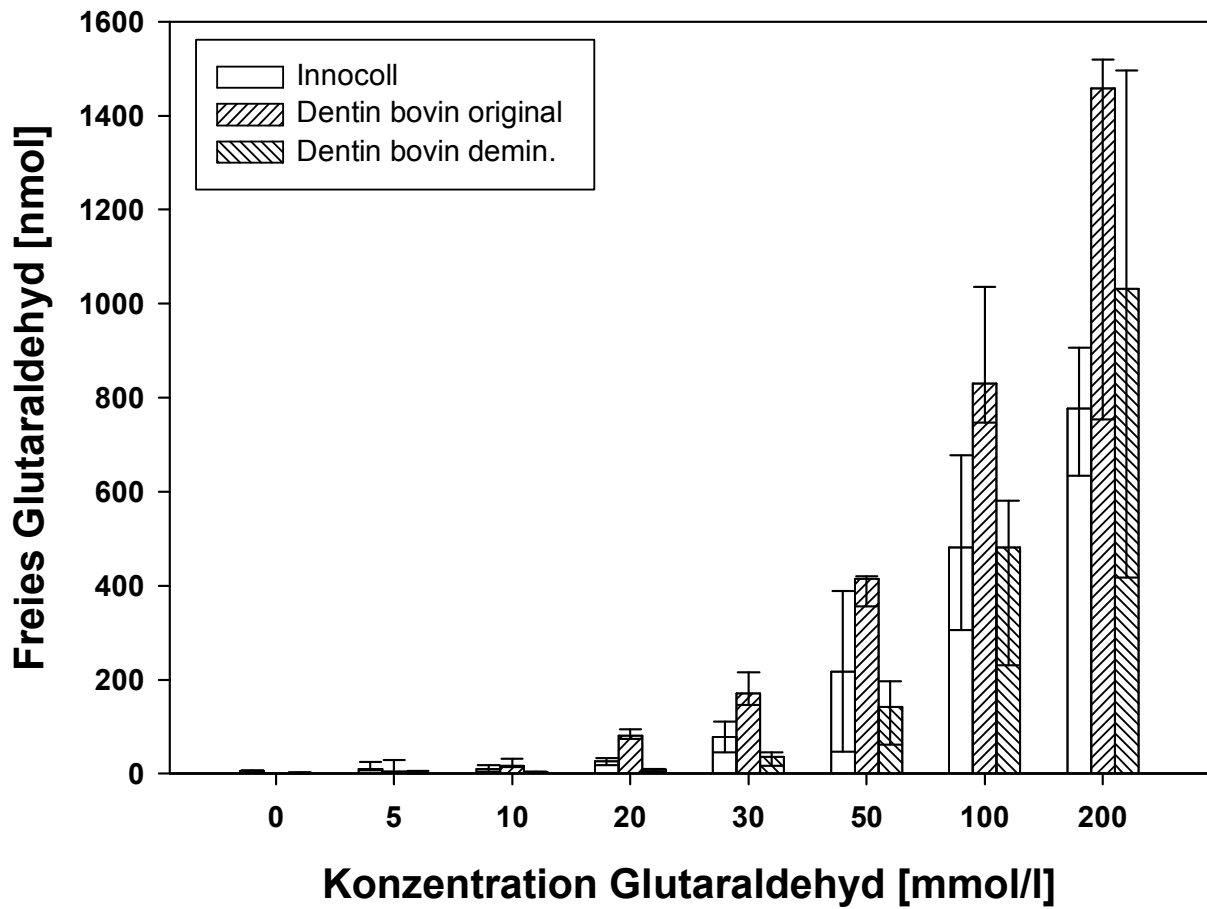


Abbildung 22: Darstellung der absoluten Stoffmenge freien Glutaraldehyds bei allen drei Materialien in Abhängigkeit der zugesetzten Aldehydkonzentration, Volumen 15 μ l, Purpald[®]-Test; (n=5 Stichproben pro Zustand; Median, 25/75% Perzentile)

Die genauen Einzelwerte zeigt die Tabelle 3.

Innocoll**Dentin bovin Orig.****Dentin bovin demin.**

| | | | |
|---------------|-------|--------|--------|
| 5 mM | 9,7 | 4,7 | 1,5 |
| 10 mM | 9,1 | 16,9 | 2,9 |
| 20 mM | 26,5 | 81,1 | 8,9 |
| 30 mM | 77,3 | 170,2 | 35,0 |
| 50 mM | 217,2 | 414,3 | 141,8 |
| 100 mM | 481,7 | 829,9 | 481,7 |
| 200 mM | 776,8 | 1458,0 | 1031,6 |

Tabelle 3: genaue Werte der Stoffmengenangaben [nmol] für das freie Glutaraldehyd im Versuch

Die Stoffmenge des nach der Reaktion noch vorhandenen Aldehyds ist konzentrationsabhängig und steigt für alle drei Materialien stetig an. Ab 10 mM ist es stets das Dentin im Originalzustand, das die größte Stoffmenge an Glutaraldehyd nicht binden kann.

Signifikante Unterschiede mit $p=0,029$ ergeben sich zwischen dem reinen Kollagen von Innocoll und Dentin bovin Original bei 0 mM, 20 mM, 30 mM und 100 mM. Zwischen Innocoll und Dentin bovin demin. besteht mit gleichem p-Wert nur bei 20 mM Signifikanz. Stets signifikant verschieden bei allen Konzentrationen, außer 0 mM, 5 mM und 200 mM, zeigt sich das Rinderdentin in seinen beiden Modifikationen.

5.2.2.2 Prozentual zur Ausgangsstoffmenge

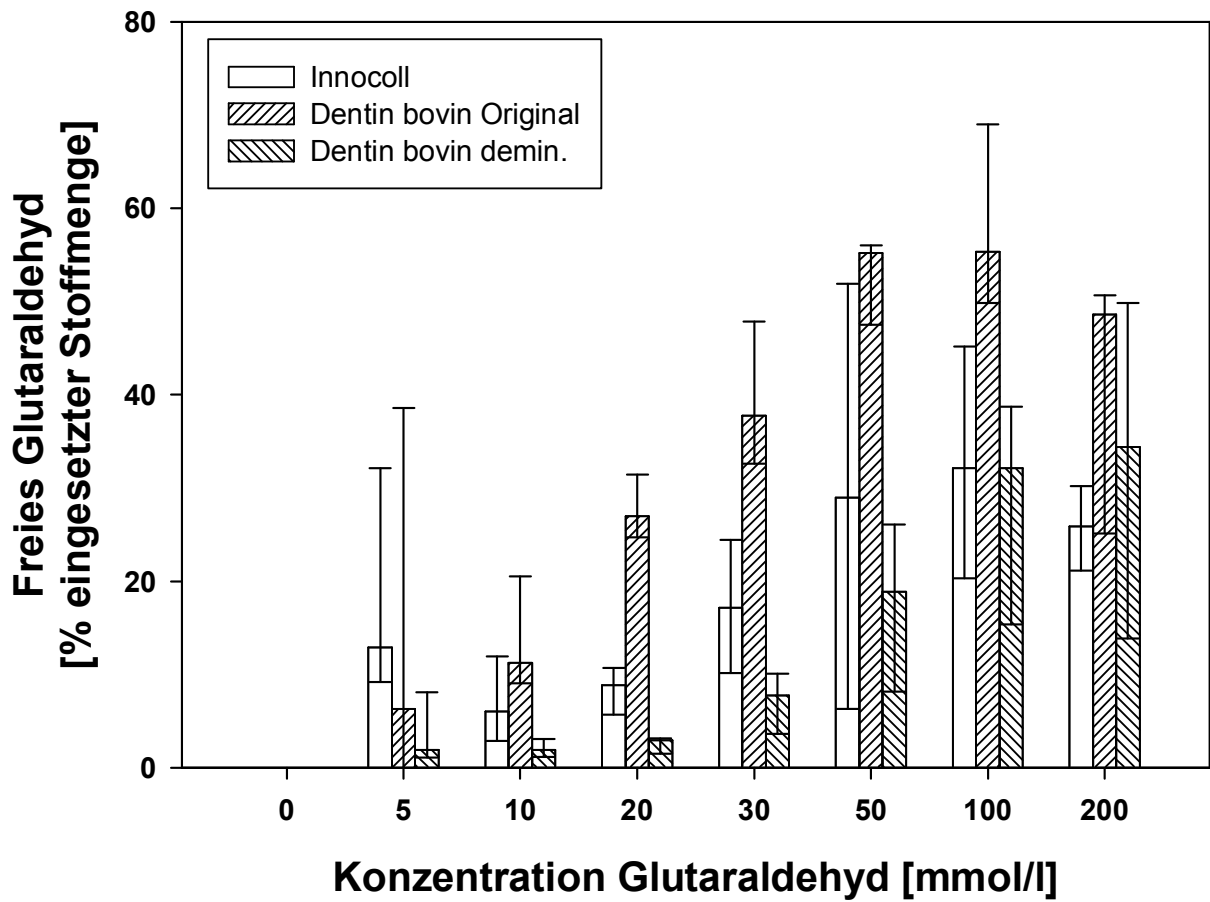


Abbildung 23: Darstellung der Stoffmenge an freiem Glutaraldehyd relativ zur eingesetzten Stoffmenge bei allen drei Materialien in Abhängigkeit der zugesetzten Aldehydkonzentration, Volumen 15 μ l, Purpald[®]-Test; (n=5 Stichproben pro Zustand; Median, 25/75% Perzentile)

Die genauen Einzelwerte zeigt die Tabelle 4.

Innocoll**Dentin bovin Orig.****Dentin bovin demin.**

| | | | |
|---------------|------|------|------|
| 5 mM | 12,9 | 6,3 | 1,9 |
| 10 mM | 6,0 | 11,3 | 1,9 |
| 20 mM | 8,8 | 27,0 | 3,0 |
| 30 mM | 17,2 | 37,8 | 7,8 |
| 50 mM | 29,0 | 55,2 | 18,9 |
| 100 mM | 32,1 | 55,3 | 32,1 |
| 200 mM | 25,9 | 48,6 | 34,4 |

Tabelle 4: relative Werte der Stoffmengenangaben [%] für das freie Glutaraldehyd im Versuch

Prozentual gesehen steigt bei allen drei Materialien mit zunehmender Konzentration im Allgemeinen der Anteil des nicht gebundenen Glutaraldehyds. Das Kollagen der Firma Innocoll liegt bezüglich der Aufnahmefähigkeit für Glutaraldehyd zwischen den beiden Zuständen des Rinderdentins. Es unterscheidet sich signifikant bei allen Konzentrationen, außer 50 mM und 100 mM, mit $p=0,029$ vom Dentin im Originalzustand; hingegen kein signifikanter Unterschied jedoch ist hier zum demineralisierten Dentin festzustellen. Dieses bindet außer bei 200 mM stets mehr Aldehyd, als die anderen beiden Substanzen und weist so jeweils den geringsten Prozent-Wert auf. Das Rinderdentin im Originalzustand zeigt, mit Ausnahme der Konzentration 5 mM, generell die höchsten Werte, was ihm gegenüber den beiden anderen Materialien eine schlechtere Aufnahmefähigkeit bescheinigt. Hinsichtlich seines demineralisierten Zustands bestehen außer bei 100 mM, in allen Konzentrationen signifikante Unterschiede mit ebenfalls $p=0,029$.

5.2.2.3 Pro Kollageneinwaage

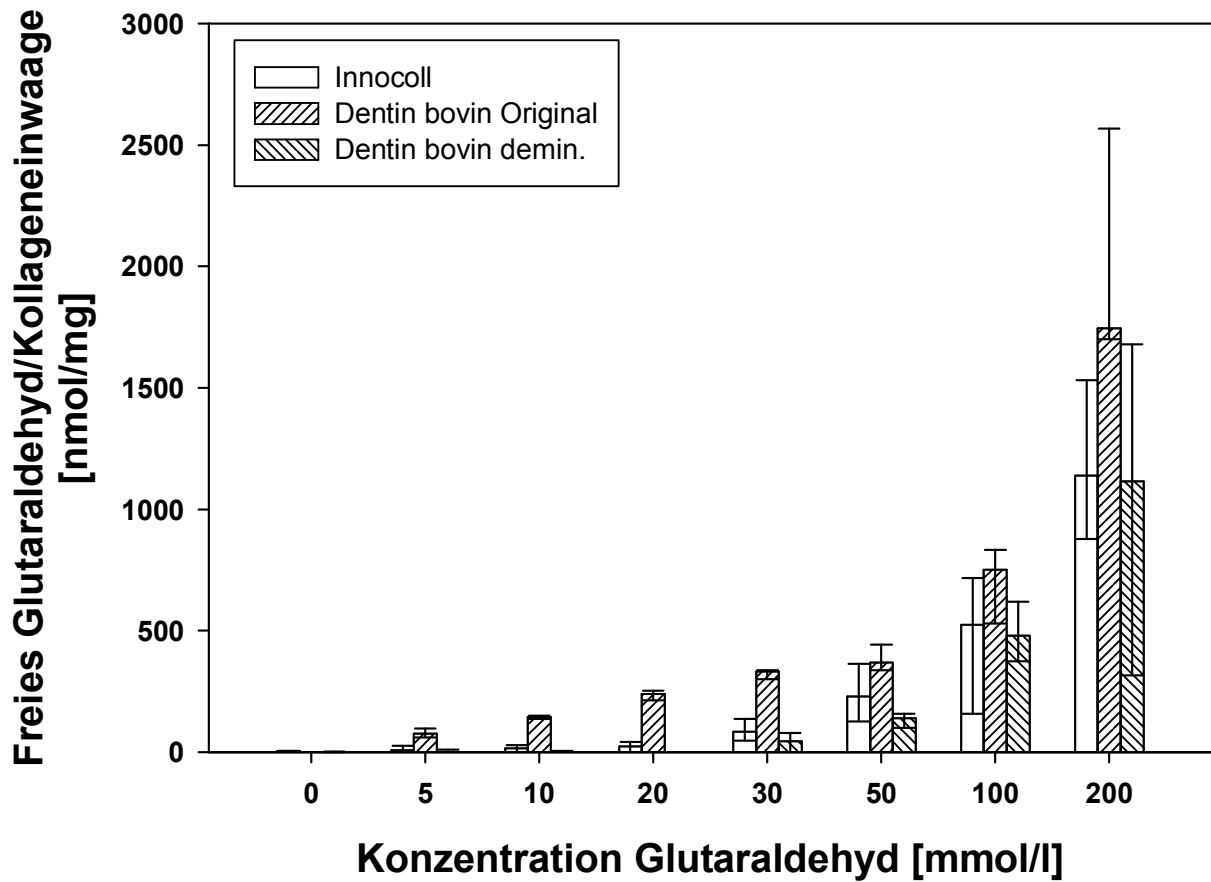


Abbildung 24: Darstellung der Stoffmenge an freiem Glutaraldehyd pro mg eingesetztes Kollagen bei allen drei Materialien in Abhängigkeit der zugesetzten Aldehydkonzentration, Volumen 15 μ l, Purpald[®]-Test; (n=5 Stichproben pro Zustand; Median, 25/75% Perzentile)

Die genauen Einzelwerte zeigt die Tabelle 5.

InnocollDentin bovin Orig.Dentin bovin demin.

| | | | |
|---------------|--------|--------|--------|
| 5 mM | 7,3 | 77,9 | 0,6 |
| 10 mM | 16,9 | 146,1 | -8,2 |
| 20 mM | 22,6 | 239,0 | -22,7 |
| 30 mM | 83,7 | 333,2 | 45,4 |
| 50 mM | 227,8 | 369,5 | 140,1 |
| 100 mM | 524,9 | 751,5 | 478,5 |
| 200 mM | 1138,1 | 1744,6 | 1115,7 |

Tabelle 5: relative Werte der Stoffmengenangaben [nmol/mg Kollagen] für das freie Glutaraldehyd im Versuch

Diese Grafik ähnelt stark der ersten der Purpald[®]- Versuchsreihe (s. 5.2.2.1). Miteinbezogen wurde hier die jeweilige Masse der verwendeten Kollagenproben, sodass, wie oben bereits erwähnt, die materialeigene Bindungskapazität beurteilt werden kann.

Wiederum unterscheidet sich die Glutaraldehydaufnahme des Innocoll-Schwamms vom demineralisierten Rinderdentin eigentlich kaum. Vom Dentin im Originalzustand unterscheidet sich das gereinigte Kollagen signifikant bei 20 mM, 30 mM und 100 mM, vom demineralisierten Dentin nur bei 20 mM mit $p=0,029$. Erneut überragen die Werte des unbehandelten Dentins stets diejenigen der anderen beiden Materialien. In seiner ursprünglichen Form ist die angesprochene Kapazität des Dentins, Glutaraldehyd zu binden, also geringer als nach der Demineralisation.

5.3 Bestimmung der Zytotoxizität von Glutaraldehyd nach Durchtritt durch Kollagen/Dentin mit dem Agar-Overlay Test

Die Ermittlung der Zytotoxizität des Glutaraldehyds erfolgte durch die Beurteilung der entfärbten Zone des Zellrasens um die Probe herum im Sinne einer Vermessung des Abstandes vom Probenrand zum äußeren Rand der Entfärbezone.

Es wurden Aldehyd-Lösungen aufgetragen von jeweils 15 μ l Volumen.

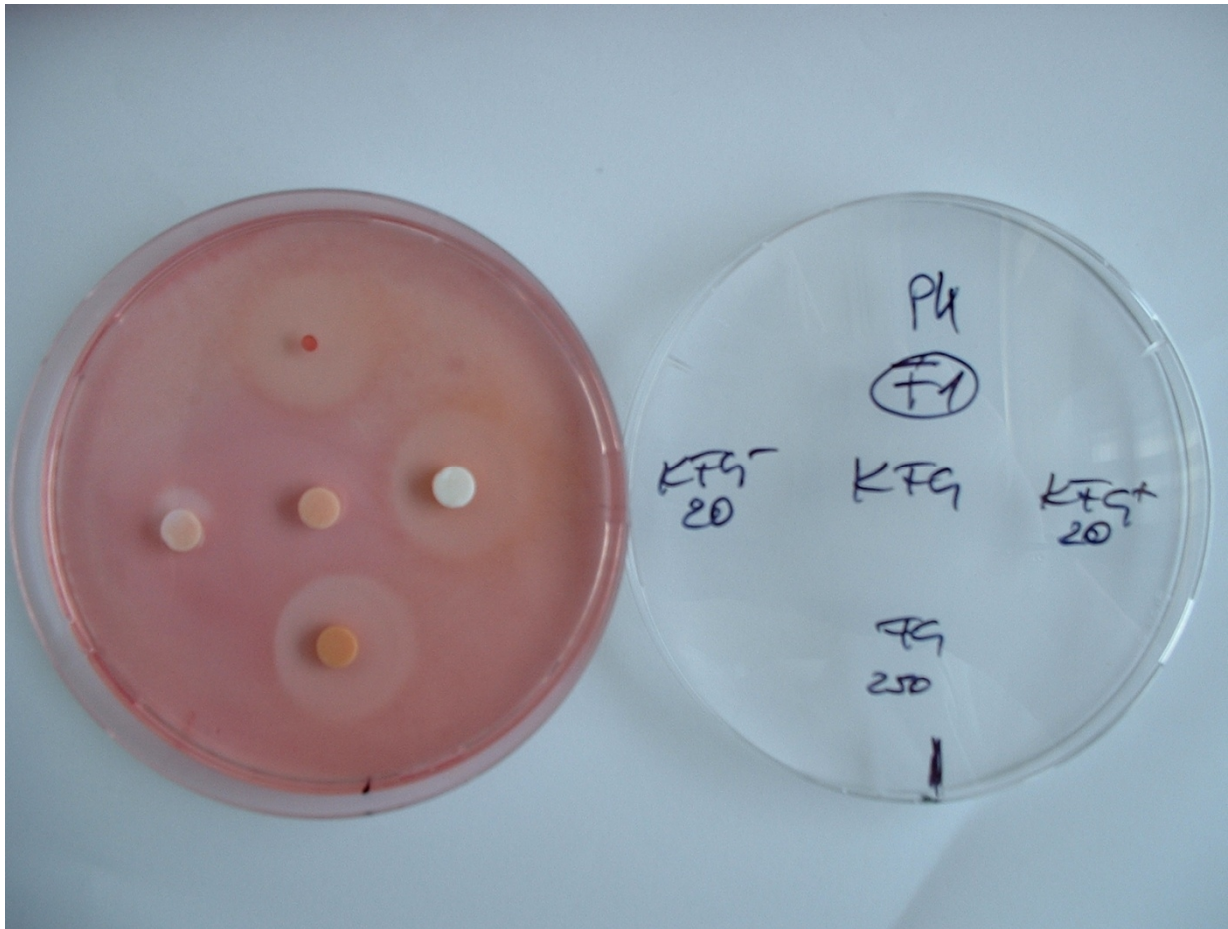


Abbildung 25: Typische Versuchsanordnung; Legende: PK= PVC-Schlauch (Positivkontrolle); KFG^- = deminer. Dentin mit aldehydgetränktem Filter; KFG^+ = Original-Dentin mit aldehydgetränktem Filter; KFN= Originaldentin mit Filter und NaCl (Negativkontrolle); FG= nur Filter mit Glutaraldehyd; die Zahlen stellen Konzentrationen dar [mM]

5.3.1 Innocoll®-Kollagen als Diffusionsbarriere

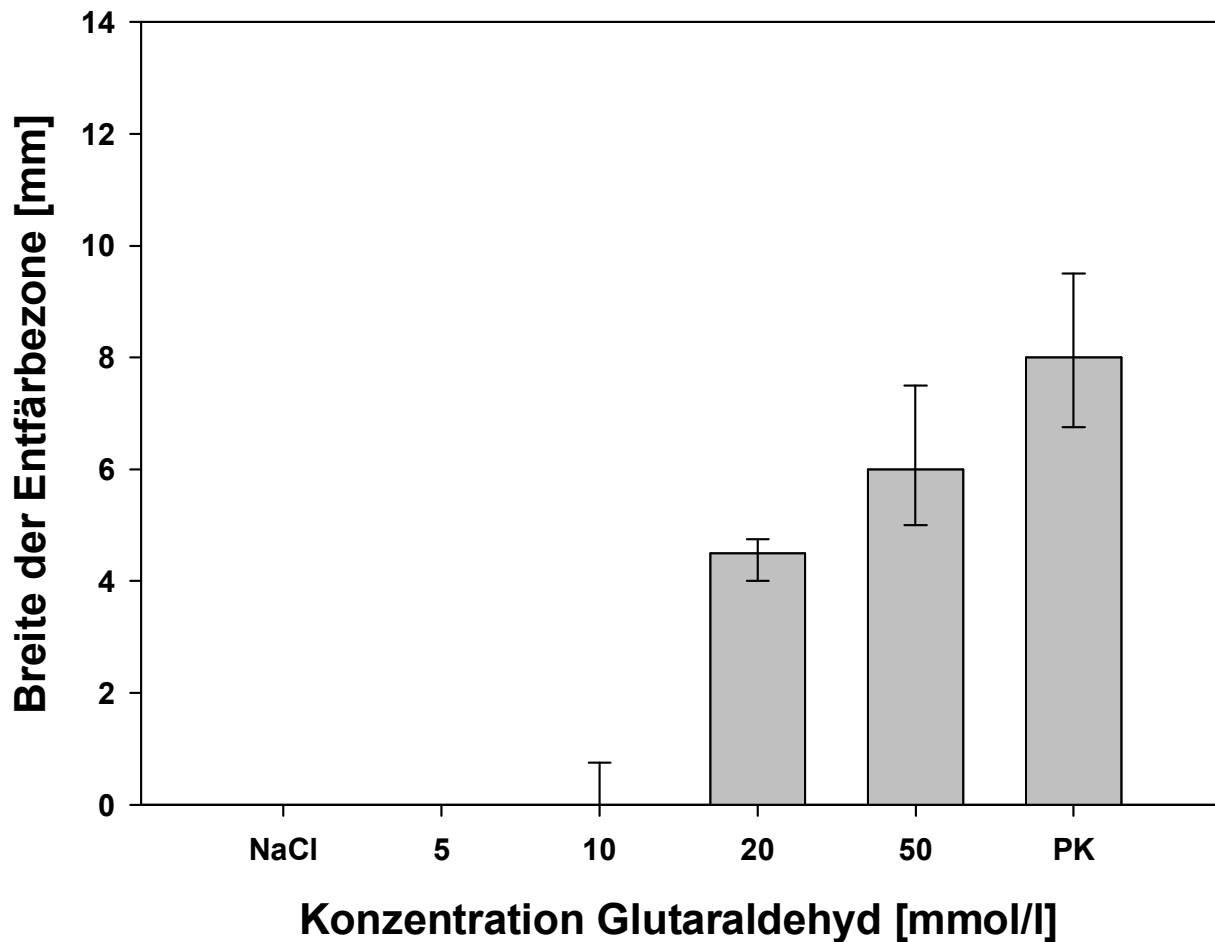


Abbildung 26: Darstellung der Breite der entfärbten Zone bei den Innocollproben in Abhängigkeit der zugesetzten Aldehydkonzentration, Volumen 15 µl, Agar-Overlay-Test; (n=5 Stichproben pro Zustand; Median, 25/75% Perzentile); PK=Positivkontrolle, NaCl=Negativkontrolle.

Während bei 5 mM keinerlei Entfärbung hervorgerufen wurde, erwies sich bei diesem Material 10 mM als erste Konzentration, die messbare Effekte zeigte. Der Medianwert ergibt zwar null, doch in den Perzentilen erscheint als Wert 0,75 mm. Für die Konzentration 20 mM steigt der Wert auf 4,5 mm. Bei 50 mM steigert sich die Breite der Entfärbezone auf median 6,0 mm. Erwartungsgemäß zeigte die Probe mit der Negativkontrolle, die eine physiologische Kochsalzlösung trug, keinen Hemmhof auf dem Zellrasen; ebenso verhielt sich die Positivkontrolle in Form des Polyvinylchlorid-Körpers wie erwartet und erzeugte median 8,0 mm Zonenbreite.

Die Werte der beiden Kontrollen gelten für alle Versuche unter 5.3 und werden nicht mehr gesondert angeführt.

In diesem Versuch ist ein stetig anwachsender Wert zu beobachten, mit 10 mM als Schwellenkonzentration.

5.3.2 Bovines Dentin im Originalzustand als Diffusionsbarriere

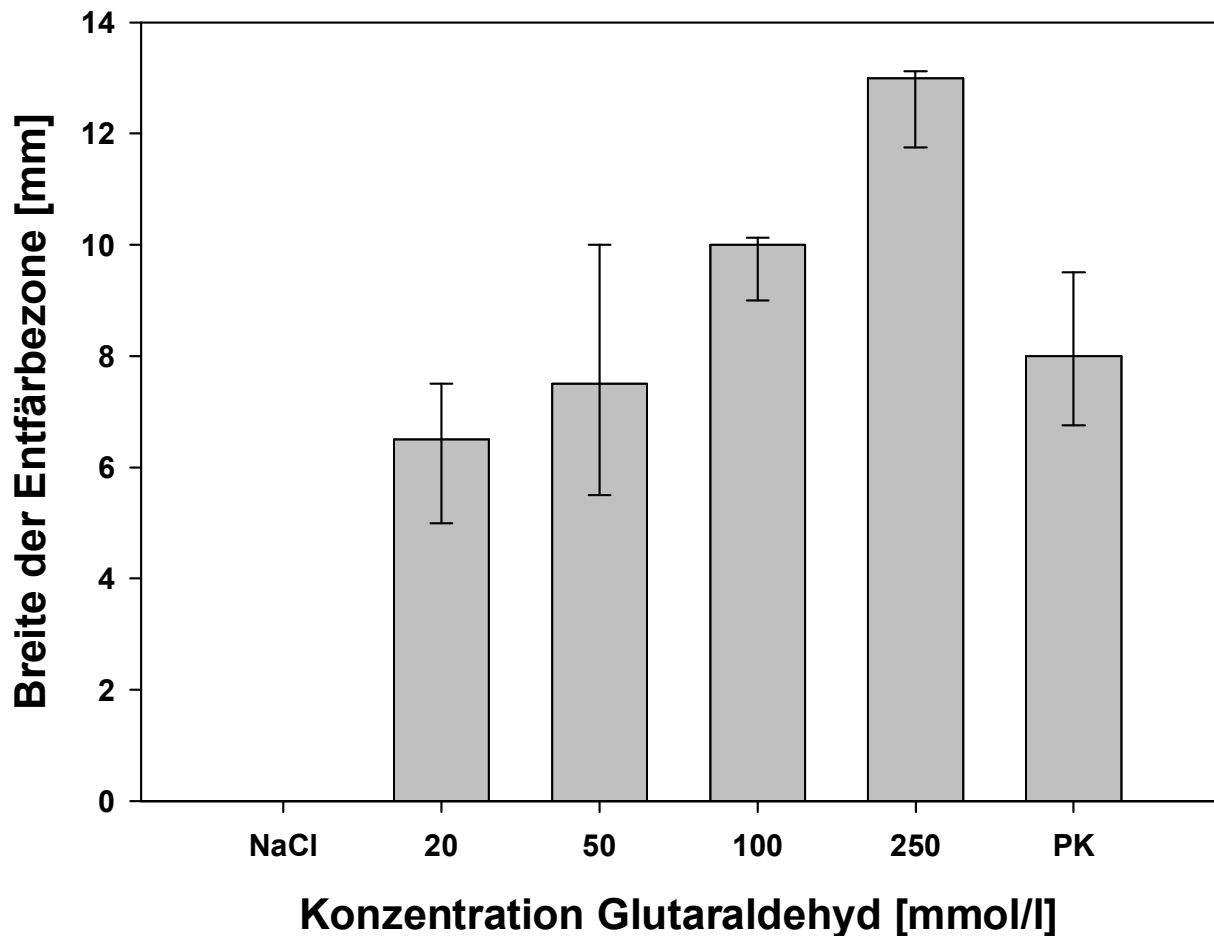


Abbildung 27: Darstellung der Breite der entfärbten Zone bei bovinem Dentin im Originalzustand in Abhängigkeit der zugesetzten Aldehydkonzentration, Volumen 15 μ l, Agar-Overlay-Test; (n=5 Stichproben pro Zustand; Median, 25/75% Perzentile)

Da die Probenkörper des Rinderdentin aufgrund spezifischer Dichte-Charakteristika in derselben Probengeometrie eine etwa fünffach höhere Masse besitzen als das Material der Firma Innocoll wurden sie entsprechend höheren Konzentrationen an Glutaraldehyd ausgesetzt. Somit bleibt die Vergleichbarkeit bestehen.

Bei 20 mM ergibt sich bereits ein medianer Abstand zur Probe von 6,5 mm. Es werden median 7,5 mm Abstand zur Probe bei 50 mM ermittelt. Die Konzentration 100 mM erzeugt Werte von 10,0 mm median. Letztlich bleibt bei 250 mM Glutaraldehydlösung noch der Medianwert 13,0 mm zu nennen übrig.

Auch hier tritt eine stetige Steigerung in den Werten auf, messbar bereits ab der geringsten Konzentration.

5.3.3 Demineralisiertes bovines Dentin als Diffusionsbarriere

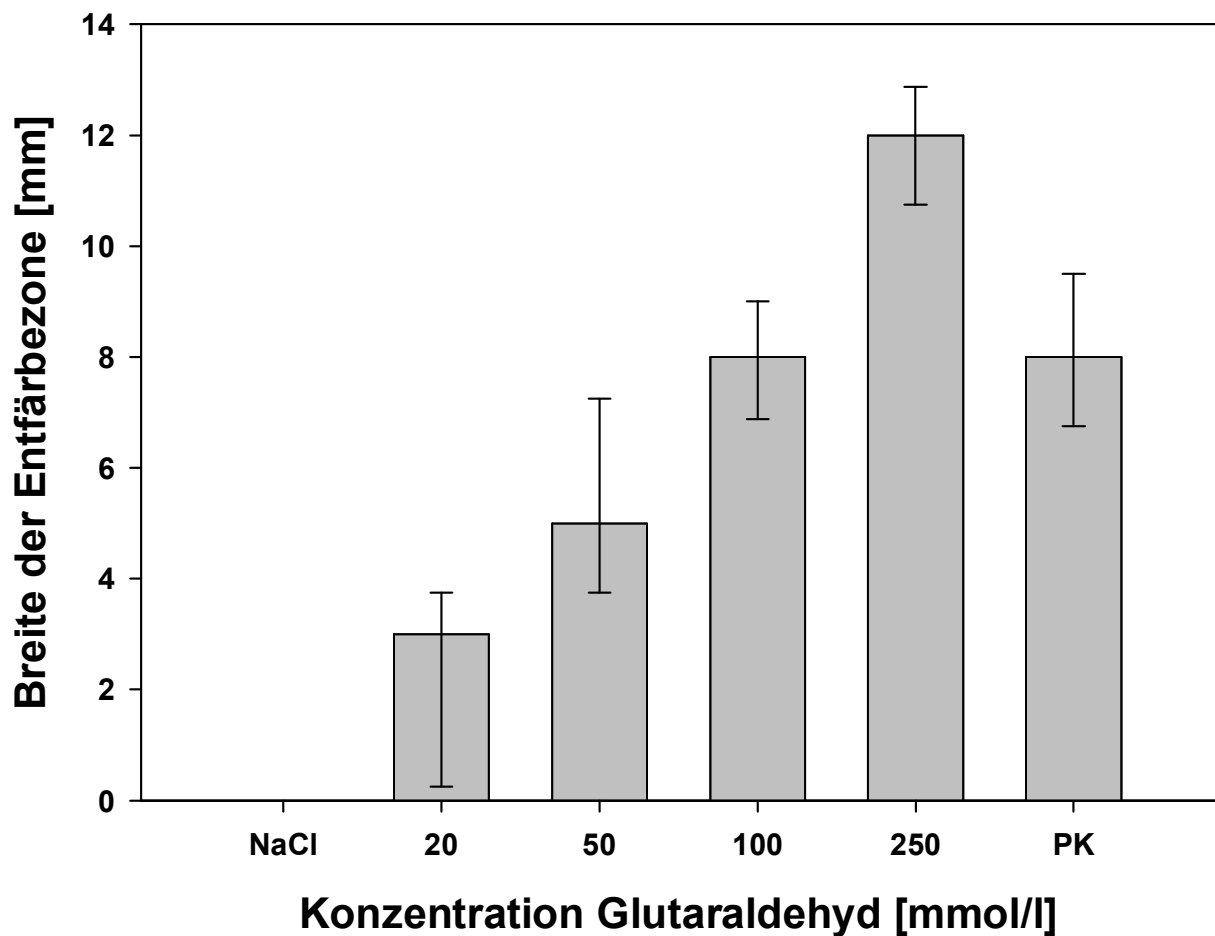


Abbildung 28: Darstellung der Breite der entfärbten Zone bei demineralisiertem bovinem Dentin in Abhängigkeit der zugesetzten Aldehydkonzentration, Volumen 15 μ l, Agar-Overlay-Test; (n=5 Stichproben pro Zustand; Median der Maxima, 25/75% Perzentile)

Von ihrer anorganischen Matrix befreit, bleibt den demineralisierten Proben ihrerseits wieder nur ein Fünftel der Masse des Rinderdentins im Originalzustand, wobei man von einem gleichen Kollagengehalt ausgehen kann.

20 mM Glutaraldehyd erreichen hier median den Wert 3,0 mm. Bei 50 mM findet man 5,0 mm median. 8,0 mm Abstand median von der Probe wird gemessen bei 100 mM Glutaraldehydlösung. Den Medianwert auf 12,0 mm ansteigen lässt die Konzentration 250 mM.

Die Werte steigen konstant an, schon ab 20 mM.

5.3.4 Wirkung des Glutaraldehyds ohne Diffusionsbarriere

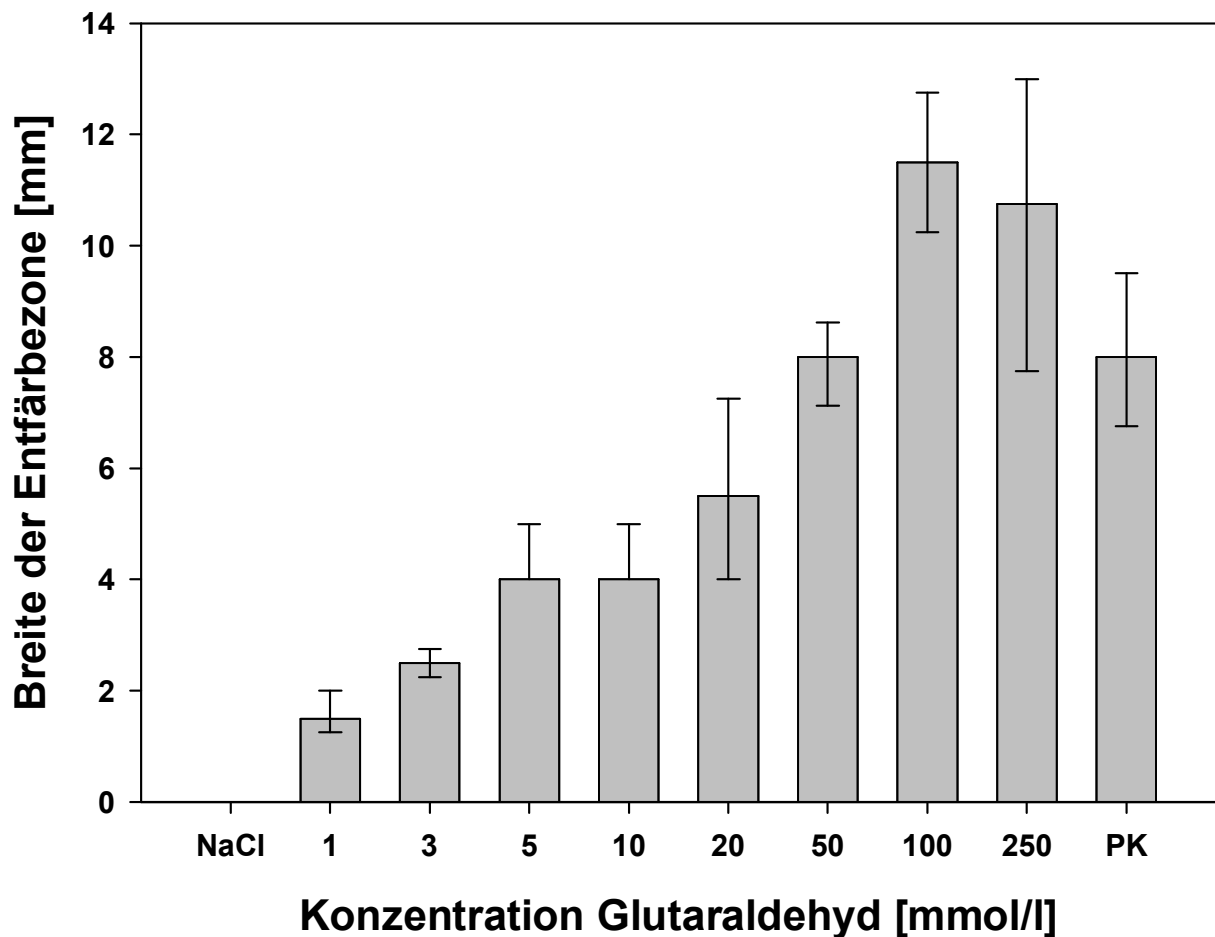


Abbildung 29: Darstellung der Breite der entfärbten Zone ohne Kollagen in Abhängigkeit der zugesetzten Aldehydkonzentration, Volumen 15 μ l, Agar-Overlay-Test; (n=5 Stichproben pro Zustand; Median der Maxima, 25/75% Perzentile)

Dieser Versuch wurde ganz ohne Substrat gefahren; nur das Zellulose-Filterpapier als Träger des Aldehyds wurde eingesetzt .

Bei 1 mM beträgt die Entfärbezone 1,5 mm, was sich bei 3 mM auf 2,5 mm steigert. Auf das Doppelte springt der Wert bei 5 mM mit 5,0 mm. 4,0 mm ermittelt man sowohl bei 6 mM, als auch bei 10 mM. Auf 5,5 mm klettert der Wert bei 20 mM, auf 8,0 mm bei 50 mM. 100 mM erzeugt einen Hemmhof von 11,5 mm und 200 mM 10,75 mm.

Die Erhöhung der Werte bei steigenden Konzentrationen ist tendenziell gegeben.

5.3.5 Vergleich der Materialien

Bei der Glutaraldehydkonzentration von 20 mM unterschieden sich die Ergebnisse bei Versuchen mit dem Kollagen-Schwamm und mit Rinderdentin (original/demineralisiert) jeweils signifikant voneinander ($p=0,042$ für Dentin im Originalzustand und $p= 0,029$ für demineralisiertes Dentin), während der Unterschied der Werte ohne Diffusionsbarriere nur hinsichtlich der EDTA – behandelten Rinderdentinproben signifikant war ($p=0,005$). Mit $p=0,016$ ist der Unterschied der Werte zwischen Dentin in demineralisiertem und unbehandeltem Zustand zu nennen.

Auf 50 mM erhöht, besteht Signifikanz nur noch zwischen den Werten ohne Diffusionsbarriere und dem Innocoll-Material ($p= 0,022$) bzw. dem EDTA - behandelten Dentin ($p= 0,013$).

Bei 100 mM unterscheiden sich die Ergebnisse der Versuche mit Dentin im Originalzustand von denen des demineralisierten Dentins signifikant ($p=0,009$) und selbige von den Werten mit Filterpapier allein mit $p= 0,001$. Hingegen besteht ein signifikanter Unterschied der Ergebnisse bei 250 mM nur im Vergleich von Filterpapier mit unbehandeltem Dentin ($p=0,034$).

6 Diskussion

Bei der Applikation von Dentinadhäsiven und Desensibilisierungsagenzien wird das zugesetzte Glutaraldehyd mit Dentinoberflächen in Kontakt gebracht, wobei in heutiger Zeit infolge aldehydfreier Alternativen allerdings weniger der Verbund im Mittelpunkt steht, sondern eher die Behandlung überempfindlicher Zahnflächen. Als lokale Wirkung verspricht man sich eine Stabilisierung des Kollagengewebes und auch eine gewisse desinfizierende Eigenschaft [23, 34]. Gerade letztere wird im Verbund mit Dentin deutlich gesteigert [20].

Wie gezeigt, führt Glutaraldehyd jedoch zu konzentrationsabhängigen Zelluntergängen *in vitro*. Ob intermittiertes Kollagen das Agens in klinischen Konzentrationen binden und „entgiften“ kann und ob es eine Konzentration gibt, unterhalb der keine Toxizität zu beobachten ist („no effect level“) war Ziel der vorliegenden Studie.

6.1 Diskussion der Methodik

6.1.1 Chemische Verfahren

6.1.1.1 TNBS-Test

Im TNBS-Test wurde die Anzahl freier, nicht gebundener Aminoseitengruppen als Maß für die Bindung des toxischen Glutaraldehyds photometrisch gemessen. Je höher die Anzahl freier Aminogruppen, desto weniger Glutaraldehyd wurde gebunden und desto mehr freies Glutaraldehyd befindet sich im System und kann potentiell auf z.B. Pulpazellen toxisch wirken.

Die Methodik wurde nach den Maßgaben der Literatur durchgeführt, dann aber modifiziert und verfeinert. Experimentell untermauert wurde die Forderung nach Trocknung der Dentinproben, ohne die sich ein verfälschender Einfluss auf die Messung gezeigt hat. Vermutbare individuelle Unterschiede bezüglich der Dentinproben wurden als eher bedeutungslos nachgewiesen. Ein Zwang zur Demineralisierung des Dentins wurde erkannt, ohne die die Nachweismethode nicht funktioniert, da die vorhandene anorganische Matrix kollagene Anteile, die zur Reaktion gebracht werden sollen, abschirmt.

Das Hauptergebnis zeigt für das Innocoll-Material genauso wie für das demineralisierte Dentin einen nur geringen Grad der Quervernetzung im Kollagen bei Applikation eines kleinen Volumens an Glutaraldehyd-Lösung, und eine rasche Sättigbarkeit bei höherem

Volumen, bei jeweils gleicher Konzentration. Das Dentin im Originalzustand reagierte aufgrund des oben angesprochenen Phänomens der Abschirmung bei Einwirkung geringer Stoffmengen nicht mit dem Aldehyd, bei höheren Stoffmengen viel träger, als die beiden anderen Materialien. Die Glutaraldehydmoleküle konnten im Falle des nicht demineralisierten Dentins die reaktiven Gruppen des Kollagens nur sehr langsam erreichen.

6.1.1.2 Purpald[®]-Test

Im Purpald[®]-Test wurde freies Glutaraldehyd im System nach Reaktion mit den kollagenen Proben direkt nachgewiesen. Es ergibt sich hinsichtlich der im System freien Aldehydmenge absolut und bezogen auf die eingesetzte Stoffmenge und die genaue Kollagenmasse der Proben, diese Reihenfolge: Das Innocoll-Material hat stets eine mittlere Glutaraldehydretention, das demineralisierte Dentin die beste und das Dentin im Originalzustand schneidet stets am schlechtesten ab; es zeigt die größte freie Aldehydmenge.

6.1.2 Zellbiologisches Verfahren

Im Agar-Overlay-Test wurde bei steigender Konzentration eine erhöhte Fibroblasten-Sterblichkeit in der eingesetzten Zellkultur beobachtet. Bei der Versuchsreihe mit niedrigen Konzentrationen des Glutaraldehyds zwischen 5 mM und 50 mM (0,05% und 0,5%) findet man unterhalb von 10 mM (entspricht 0,1%) keine toxische Wirkung nach Penetration durch das Innocoll-Material. Hier ist ein sog. "no-effect-level" zu beobachten. Nur besteht hinsichtlich des Materials keine große klinische Ähnlichkeit. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denjenigen aus den chemischen Analysen, wie aus Abb. 17 für den TNBS- und aus Abb. 22 für den Purpaldversuch ersichtlich ist.

Der klinischen Situation näher kommt der Versuchsansatz, wonach das nach den gefundenen Vorgaben demineralisierte Dentin eingesetzt wird. Die dem höheren Kollagengehalt (ca. fünffach) entsprechend angepasste höhere Konzentration an Glutaraldehyd verursacht stets umfangreiche Zelluntergänge. Hier kommt es augenscheinlich niemals zu einem kompletten Binden des Aldehyds, aber doch zu einer deutlichen Herabsetzung der Zelluntergangsrate verglichen mit den Versuchen ohne Dentin. Jedoch ist auch hier die klinische Relevanz reduziert, denn obwohl klinisch oberflächlich und kurzzeitig geätzt und somit auch in gewisser Weise demineralisiert wird, erfolgt zu keiner Zeit ein vollständiges Entfernen der stützenden anorganischen Matrix.

Der klinischen Situation, bei der ja *in vivo* Dentinoberflächen zunächst nur freigelegt werden, kommt der Versuchsansatz am nächsten, welcher das Rinderdentin im Originalzustand als

Probenkörper zugrundelegt. Dieses unbehandelte Dentin allerdings zeigt keinen nennenswerten Unterschied zu den Versuchen ganz ohne Dentin; offenbar verhält es sich – ähnlich wie in den chemischen Verfahren – gegenüber dem Glutaraldehyd weitgehend inert. Die getestete Maximalkonzentration von 250 mM verursachte bereits enorme Hemmhöfe auf dem Zellrasen, die beinahe schon die Grenzen des Versuches sprengten. Wir sprechen aber dabei erst von einer halb so hohen Konzentration, wie in Dentinadhäsiven und ‚Desensitizern‘, bei denen 5% Glutaraldehyd keine Seltenheit darstellt. Somit muss hier von einer recht hohen lokalen Toxizität ausgegangen werden.

6.2 Diskussion der verwendeten Materialien

Der Innocoll-Kollagenschwamm ist ein Referenzmaterial, der sich durch seine native fibrilläre Struktur vom demineralisierten Dentin z.B in seiner Dichte unterscheidet. Diskutiert werden soll hier nun, warum die Demineralisation als einziger Unterschied zwischen den beiden bovinen Materialien so große Bedeutung hat. Wie gezeigt, scheint in den chemischen Verfahren weder das Aldehyd, noch der Farbstoff TNBS nennenswerten Kontakt zu Kollagen im unbehandelten Dentin zu erlangen. *Kinney et al.* [41] formulierten dazu die Vermutung, Kollagen werde von den mineralischen Anteilen im Dentin regelrecht „umbaut“ und so abgeschirmt. Zu dieser Hypothese gelangten Sie, indem sie die E-module und die Härte zweier verschieden mineralisierter Dentinarten feucht und trocken miteinander verglichen. Eine Art stellte reguläres Dentin aus menschlichen Weisheitszähnen dar (zur Pulpa hin abnehmender mineralischer Gehalt), die andere Sorte stammte von einer Patientin mit Dentinogenesis imperfecta (überall gleich geringer Mineralisationsgrad, noch ca. 4 Vol.-% unterhalb des geringsten Wertes bei normalem Dentin). Letztendlich bewiesen sie, dass in trockenem Zustand der E-modul linear vom Mineralisationsgrad abhängt, feucht jedoch auch bei hohen Mineralisationsgraden ein niedriger E-modul möglich ist. Ausgehend von diesem Phänomen stellen sie die bisherige Annahme, die extrafibrilläre mineralische Phase im Dentin sei linear elastisch, infrage und stellten die Hypothese auf, dass durch einen besonderen körnig – kristallinen Aufbau dieser extrafibrillären mineralischen Phase eine Stützung durch feuchtes Milieu und den kollagenen Anteilen im Dentin erreicht wird. Dies geschieht durch die Anordnung rings um die Kollagenfibrillen. Die stützende Durchsetzung der Kollagenfibrillen durch die intrafibrilläre mineralische Phase konnte bestätigt werden, ferner auch durch spezielle Röntgenanalysen, bei der Dentin als mineralisiertes Kollagen charakterisiert wurde [42]

6.3 Zytotoxizität und Mutagenität von Glutaraldehyd

Außer der Fragestellung, ob auch *in vivo* durch Quervernetzung des Kollagens im Dentin eine Reduktion des freien Aldehyds möglich ist, müssen noch andere Möglichkeiten der Beseitigung einer Gefahr durch toxische Wirkung in Betracht gezogen werden.

Relevant ist diesbezüglich die Barriere-Hypothese. Hohe Glutaraldehydkonzentrationen, wie in Dentinbondings vorhanden, ließen dabei eine so rasche Quervernetzung an der Kontaktfläche ablaufen, dass das Eindringen weiteren Aldehyds in die Tiefe des Gewebes verzögert oder gar verhindert wird [14].

Chen et al. [13] testeten verschiedene Bondingsysteme im Agar-Overlay-Versuch, darunter auch GLUMA[®], auf zellschädigende Wirkungen und fanden nur eine geringe Zytotoxizität; bestätigt wird dies von *Camps et al.* [9], die u.a. den GLUMA[®] Desensitizer im MTT-assay ebenfalls auf Dentinscheiben über L929 Mausfibroblasten testeten. Hier wird dem Verschluss der Dentintubuli durch die HEMA/Glutaraldehydmischung große Bedeutung zugeschrieben, so auch bei *Kispelyi et al.* [44] (Vitalmikroskopie) und *Quin et al.* [73] (FTIR – Spektroskopie). Ein weiteres MTT-assay mit L929 Mausfibroblasten *in vitro* führten *Cao et al.* [10] durch; sie benutzten durch Glutaraldehyd quervernetztes Hydroxylapatit/Kollagen und bescheinigten diesem Zusammenspiel gute Zytokompatibilität, so dass es sogar als Knochenersatzmaterial vorgeschlagen wurde.

Nilsson et al. [67] prüfte die Wirkung von Formaldehyd (0,1 - 100 mM) auf menschliche Fibroblasten und Zellen des Epithels, beides gewonnen aus der Mundschleimhaut, in MTT und CFE-Assays. Getestet wurde die Fähigkeit der Zellen, nach der Aldehydapplikation weiterhin Zellkolonien zu bilden. Es zeigte sich verminderte Toxizität bei Anwesenheit von Serum und Cystein für die Fibroblasten und Cystein und eine Mischung aus Aminosäuren und Ethanolaminen für die Epithelzellen. Denn schon in früheren zellfreien Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass Formaldehyd sehr leicht mit Serumproteinen quervernetzt, was die Interaktion mit den Aminen erklärt; ferner wurde bereits erkannt, dass Glutathion und Cystein, beides Thiole, involviert sind bei der Metabolisierung und Entgiftung von Formaldehyd. Hier spielen antioxidative Auswirkungen der Disulfidbrücken eine Rolle. Die Epithelzellen erwiesen sich letztlich resistenter gegen das Aldehyd verglichen mit den Fibroblasten, da sie einen grundsätzlich höheren Thiol-Status aufwiesen. Die Anwesenheit einer wachstumsfördernden Matrix aus Fibronectin und Kollagen beeinflusste die Toxizität des Formaldehyds allerdings nicht; zytoprotektiv wirkten hier nur die extra- und intrazellulären Thiole. Als Grund vermutet man hier eine hohe Spezifität der ablaufenden Reaktionen mit Aminen bezogen darauf, ob sie endogen oder extrazellulär vorkommen.

Khor [40] setzte kollagenes Gewebe Glutaraldehyd aus, um die Ursprünglichkeit des Gewebes zum Einsatz für Bioprothesen zu gewährleisten. Er nutzte die fixierende Eigenschaft des Glutaraldehyds, beobachtete aber, dass in situ dadurch eine Kalzifizierung des Gewebes eintritt, die oft zur Abstoßung der Prothesen führte. Er macht die Entstehung von Hydroxylapatit an durch Fremdpartikel getriggerte Kalziumphosphateinlagerungen dafür verantwortlich, nicht jedoch potentiell zytotoxische Wirkungen des Aldehyds. Von *Huang-Lee et al.* [37] wurde ebenfalls eine problematische Langzeitabstoßung von Bioprothesen mit durch Glutaraldehyd quervernetzten Kollagen-Oberflächen erkannt, die hier allerdings schon auf kleine freigesetzte, zelltoxische Dosen von Glutaraldehyd zurückgeführt werden. Diese bilden sich vermutlich aus potentiell instabilen Polymeren im Inneren des quervernetzten Gewebes.

Hanks et al. [29] stufen das Glutaraldehyd an sich als zytotoxisch ein, finden aber auch nach Diffusion durch Dentinprobenkörper eine Verminderung der Toxizität um beinahe das fünfzehnfache. *Galler et al.* [25] ließen drei verschiedene Adhäsivsystemkomponenten durch Dentinscheiben unterschiedlicher Dicke diffundieren und fanden ebenso eine Herabsetzung der Toxizität mit zunehmender Schichtstärke, allerdings mit Ausnahme des Materials, das Glutaraldehyd enthielt. In Verbindung mit Acrylat-Monomeren scheint das Glutaraldehyd tiefer eindringen zu können.

Bei einem Vergleich zwischen Formaldehyd und Glutaraldehyd hinsichtlich ihrer Toxizität müssen als Faktoren die Applikationszeit und die Konzentration berücksichtigt werden. *Sun et al.* [99] fanden, dass für Glutaraldehyd zwischen „nicht toxisch“ und „maximal toxisch“ ein größerer Konzentrationsunterschied zwischen diesen beiden Extrema besteht und eine längere Einwirkzeit notwendig ist, als beim Formaldehyd. Dazu wurden menschliche Fibroblasten aus der embryonalen Lunge (WI-38) verschiedenen Konzentrationen beider Aldehyde zwischen 4 und 24 Stunden ausgesetzt. Die Zytotoxizität wurde biochemisch anhand der mitochondrialen Dehydrogenase-Aktivität in einem MTT-Assay bestimmt. Bei Formaldehyd war der Bereich der Konzentration von nicht-toxisch zu maximal toxisch geringer, ohne große Abhängigkeit von der Einwirkzeit. Umgekehrt lagen bei Glutaraldehyd die Grenzen vom „no-effect-level“ bis zur maximalen toxischen Wirkung weiter auseinander, bei stets längeren Einwirkzeiten gegenüber dem Formaldehyd. Die zytotoxischen Auswirkungen einer 19%igen Formaldehyd-Konzentration (0,091 µl/ml) überstiegen zwar jene einer 2,5%igen Glutaraldehyd-Konzentration (3,40 µl/ml) in molaren Konzentrationen gerechnet war ihre Zytotoxizität aber vergleichbar (0,58 mM zu 0,85 mM).

Rud et al. [78] schlagen Dentinadhäsive sogar für die retrograde Wurzelfüllung vor, da trotz lokaltoxischer Phänomene ein besseres Ausheilungsergebnis im Knochen zustande kommt.

Sie benutzten GLUMA® zusammen mit dem Komposit Retroplast® und zogen dieses System dem Amalgam vor.

Auch *Rusmah* [80] betont die positiven Wirkungen des Glutaraldehyds (Desinfektion, Gewebefixierung, geringe Eindringtiefe in Gewebe) und schlägt es gar für die Wurzelkanalspülung in der Endodontie vor. Die geringen systemisch aufgenommenen Mengen werden demnach auch sehr schnell metabolisiert und im Urin oder durch die Atmung wieder ausgeschieden. Dies untermauert auch die Studien von *Ranly et al.* [74, 75]. Hier wurden *in vivo* Ratten mit Glutaraldehydinfusionen (¹⁴C-radiomarkiert) behandelt, getötet und ihre Leberzellen daraufhin untersucht, wohin sich das Aldehyd verteilt hatte. Zytosol und Membran, jedoch nicht die Zellkernfraktion, wiesen Radioaktivität auf. Daraus schlossen sie auf geringen mutagenen Einfluss auf die Zelle. Eine *in vitro* Gegenprobe, in der wieder Rattenleberzellen mit ¹⁴C-Glutaraldehyd inkubiert wurden, zeigte wieder keine Akkumulation in den Nukleinsäuren, während das Aldehyd zu ¹⁴C-CO₂ umgewandelt wurde. *Yang et al.* [106] untermauern die Hypothese, dass die toxische und mutagene Wirkung von Glutaraldehyd gering sei. Sie testeten ein Desinfektionsmittel, das u.a. 750 mg/L (7,5 mM, ca. 0,75%) Glutaraldehyd enthielt und bescheinigten diesem eine sehr gute antibakterielle Wirkung auf der einen Seite und auf der anderen Seite keine Effekte auf Erythrozytenzellkerne und Spermien von Mäusen. *Hill et al.* [34], die Pulpafibroblasten mit Glutaraldehyd in flüssiger aber auch flüchtiger Form konfrontierten, gaben zwar eine Fixierung der Zellen und damit den Zelltod für die Aldehydlösung an, jedoch mit Erhalt der ursprünglichen Zellform und des Gewebemusters. Bei dem gasförmigen Glutaraldehyd beobachteten sie gar eine Fortsetzung der Proliferation. Deshalb favorisieren sie den Einsatz des Aldehyds bei der Pulpotomie.

Bei *Ballantyne et al.* [3] findet man für eine perorale Gabe einer 5%igen Glutaraldehydlösung bei Ratten eine LD₅₀ von 3,25 ml/kg Körpergewicht (KG), beschrieben als „moderate Toxizität“ und eine LD₅₀ von 3,34 bzw. 12,3 ml/kg KG für 2 bzw. 1%ige Lösungen, beschrieben als „gering toxisch“. Den „no-effect-level“ für die Verletzung der Augenhornhaut geben sie bei 0,5% Glutaraldehyd, für die Bindehaut bei 0,1% Glutaraldehyd an.

Kuroki et al. [46, 47] beschicken Zellkulturen-Monolayer aus Fibroblasten mit Glutaraldehydlösungen verschiedener Konzentrationen und ließen sie inkubieren; sie fanden als „no effect level“ 1 µg/ml (ca. 0,01 mM oder 0,0001 Gew.-%).

Neben diesen Hinweisen auf reduzierte oder gar fehlende Toxizität finden sich jedoch auch andere Hinweise, die in eine entgegengesetzte Richtung weisen. So warnt *Geurtsen* [27] vor den noch nicht ausreichend untersuchten Auswirkungen der einzelnen Bestandteile moderner Füllungsmaterialien und Bondingsystemen bezüglich Biokompatibilität, Allergenität und Toxizität mit der Forderung nach Klärung offener Fragen.

Manabe et al. [53] testeten Dentinprimer auf Hasenhaut und stellten fest, dass nur das enthaltene Glutaraldehyd, nicht aber der Gehalt an Methacrylat-Monomeren signifikante Irritationen hervorruft.

Kinomoto et al. [43] bescheinigen 100 µl des Gluma® Primers (5% Glutaraldehyd) unverdünnt eine bis zu 100%ige zellschädigende Wirkung auf menschliche Zellen aus dem parodontalen Ligament und erst ab einer 1:1000 Verdünnung mildere Zytotoxizität (ca. 27%). Dies entspräche der Konzentration 0,5 mM aus den hier durchgeführten Versuchen.

In einem weiteren Agar-Overlay-Versuch mit VERO-Zell-Linien, jedoch ohne Dentinscheiben konnten auch *Bruce et al.* [7] große Hemmhöfe mit GLUMA® erzeugen, so etwa 13 mm im Durchschnitt, und so die bestehende Zytotoxizität nachweisen; zu diesem Ergebnis kommen auch *Neroni et al.* [66] mit ihren *in vitro* Versuchen mit Pulpazellen und *Meryon et al.* [57] mit ihren Diffusionsversuchen durch Dentinscheiben. Letztere schätzten das GLUMA® – Präparat bei Einsatz von nur 100 µm dicken Dentinscheiben als das im Versuch toxischste ein und warnten vor Benutzung *in vivo* bei tiefen Kavitäten ohne Pulpaschutz. Allerdings reduzierten dickere Scheiben (500 µm) den toxischen Effekt um mehr als die Hälfte. *Hørsted-Bindslev* [36] bestätigt die Problematik der zu geringen Restdentinstärke. Er legte bei Affenfrontzähnen tiefe bukkale Kavitäten an, versorgte diese und beobachtete eine toxische Wirkung des eingesetzten GLUMA®- Bondings nur in Kavitäten mit extrem dünner pulpaler Wand.

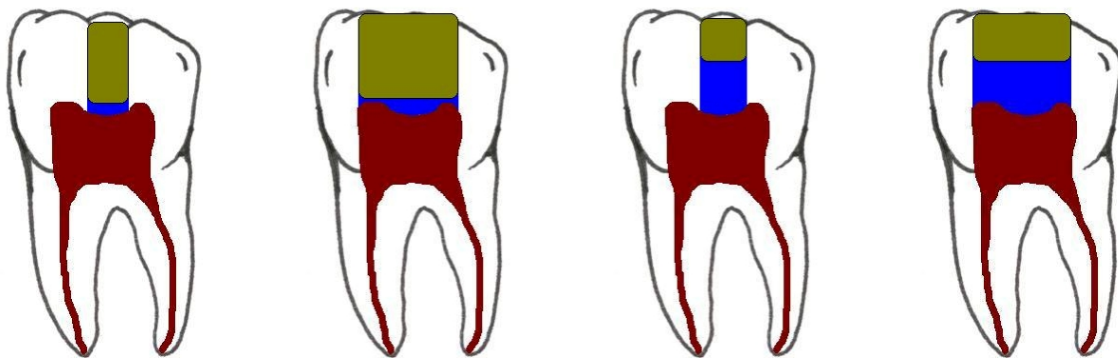
Auch die schon erwähnte biokompatible Darstellung quervernetzten Kollagens [10] schränken *Cooke et al.* [15] wiederum ein; sie beobachteten eine ausgeprägte Fibroblastenproliferation und -migration nur auf nicht vernetztem Gewebe, auf mit Glutaraldehyd quervernetztem Kollagen fand sich nur eine beschränkte Anzahl überlebender Zellen; auch *Speer et al.* [92] teilen diese Beobachtung.

Li et al. [50] konnten mit dem Ames-Test gar mutagene Wirkungen des GLUMA® nachweisen, was später auch *Schweikl* und *Schmalz* [87, 88, 89] allgemein für Glutaraldehyd enthaltende Dentinadhäsivsysteme in mehreren Studien bestätigten. Auch *St.Clair et al.* [96] fanden genotoxische Wirkungen des Glutaraldehyds *in vitro* und fordern weitere *in vivo* Forschung. Dass diesbezüglich sehr unterschiedliche Auffassungen in den verschiedenen Studien bestehen, bekräftigen auch *Zeiger et al.* [107].

6.4 Beispielhafte Übertragung der Ergebnisse auf die klinische Situation

Wählt man nun stellvertretend für die vielen klinischen Anwendungsmöglichkeiten glutaraldehydhaltiger Präparate eine konkrete Behandlungssituation, kann man an diesem

Beispiel die gefundenen Ergebnisse dieser Arbeit sehr anschaulich darstellen. Hier sei die Kavitätenpräparation für die Füllungstherapie mit anschließender Behandlung der freigelegten Dentinoberflächen mit einem glutaraldehydhaltigem Primer (5%, ca. 500 mM) angenommen. Das gewählte Volumen von 15 µl entspricht der klinisch verwendeten Menge auf den Dentinoberflächen; es ergibt sich eine Stoffmenge von 7,5 µmol. Ferner wird noch unterschieden, ob die Kavität groß oder klein, bzw. flach oder tief ausfällt, mit entsprechend davon abhängigen Restdentinschichtstärken über der Pulpa. Für die jeweils kleine Kavität gilt eine angenommene Ausdehnung von 15 mm², für die große von 50 mm². Bei tiefer Präparation verbleibt über der Pulpa eine Schichtstärke von 0,1 mm, bei flacher von 2 mm. Aus den Flächen und der Tiefe errechnen sich unterschiedliche „Dentinblöcke“ oberhalb der Pulpa. Abbildung 30 zeigt die Übersicht über die verschiedenen Kavitäten.



Klein-Tief: 1,5 mm³ Groß-Tief: 5,0 mm³ Klein-Flach: 30,0 mm³ Groß-Flach: 100 mm³

Abbildung 30: Darstellung der Kavitäten (gelb) über der Pulpa (rot) mit verbleibenden Restdentinstärken (blau) und deren Rauminhalt

Nun betrachtet man die Situation noch unter der Annahme, dass das behandelte Dentin entweder zuvor vollständig demineralisiert wird, oder aber im Originalzustand verbleibt. Zu beantworten ist nun die Frage:

Wie viel von der klinisch eingesetzten Stoffmenge aus 15µl/5%iger Glutaraldehydlösung wird jeweils gebunden, was gelangt durch die Restdentinschicht hindurch?

Aus eigenen Gewichtsbestimmungen ergab sich, dass der in den Versuchen eingesetzte runde Dentinprobenkörper bei demineralisiertem Dentin in feuchtem Zustand ca. 12 mg und in getrocknetem Zustand ca. 5 mg wiegt. Die Dentinscheibe hat einen Durchmesser von 6mm (Stanzvorgang) und bei 500µm Dicke ein Volumen von ca. 14,1 mm³. Daraus errechnet

sich eine Dichte für feuchtes Kollagen von 0,85 mg/ mm³, für trockenes - und darauf beziehen sich die Messwerte - von 0,35 mg/ mm³, aus der wiederum der Kollagengehalt in den Dentinblöcken über der Pulpa ermittelt werden kann. Tabelle 6 zeigt die Zusammenstellung des Kollagengehaltes für die einzelnen Kavitätenformen.

| Kavitätedesign | Klein-Tief | Groß-Tief | Klein-Flach | Groß-Flach |
|--------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
| Raummaß | 1,5 mm ³ | 5,0 mm ³ | 30,0 mm ³ | 100,0 mm ³ |
| Restdentinblock | | | | |
| Kollagengehalt (trocken) | 0,53 mg | 1,75 mg | 10,5 mg | 35,0 mg |

Tabelle 6: Kollagengehalt für die angenommenen Restdentinschichtstärken

Dentin im Originalzustand, welches nicht entkalkt wurde, sollte verglichen mit dem entkalkten einen ähnlichen Kollagenanteil zeigen, da durch die Demineralisation durch EDTA-Lösung vornehmlich die anorganische Matrix entfernt wurde. Nun kennt man die Stoffmenge (7,5 µmol), die auf eine Kollagenmasse trifft.

Aus dem Purpald[®]-Test (5.2.2.3), bei dem freies Glutaraldehyd pro Kollageneinwaage bestimmt wurde, lässt sich nun die Frage nach der gebundenen Aldehydmenge in diesem Beispiel beantworten. Zunächst müssen die pro Konzentration angebotenen Stoffmengen errechnet werden und dann aus der angebotenen und freien Stoffmenge durch Subtraktion die gebundene pro Kollageneinwaage. Dies zeigt Tabelle 7.

| „Was wurde angeboten?“ | | „Was wurde pro mg Kollagen gebunden?“ | | |
|------------------------|--|---------------------------------------|---|-------------------------------------|
| Konzentration [mmol/L] | Angebotene Stoffmenge bei 15 µl [nmol] | Konzentration [mmol/L] | Gebundene Stoffmenge Original [nmol/mg] | Gebundene Stoffmenge EDTA [nmol/mg] |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 75 | 5 | 0 | 74 |
| 10 | 150 | 10 | 4 | 150 |
| 20 | 300 | 20 | 61 | 300 |
| 30 | 450 | 30 | 117 | 405 |
| 50 | 750 | 50 | 380 | 610 |
| 100 | 1500 | 100 | 748 | 1022 |
| 200 | 3000 | 200 | 1255 | 1884 |

Tabelle 7: Berechnung der pro mg Kollagen gebundenen Stoffmengen

Da der Messbereich bei 200 mM endet ist eine Extrapolation (s. Abb. 31 und 32) bis auf 500 mM notwendig, wenngleich dies über einen so weiten Bereich eigentlich unzulässig ist. Als sinnvollste Variante der Hochrechnung erweist sich eine sigmoide, logistische Dosis-Reaktionskurve mit logarithmischer Auftragung auf der Abszisse, da bei denkbarer linearer Extrapolation eine unbegrenzte Bindungsfähigkeit des Kollagens angenommen werden müsste.

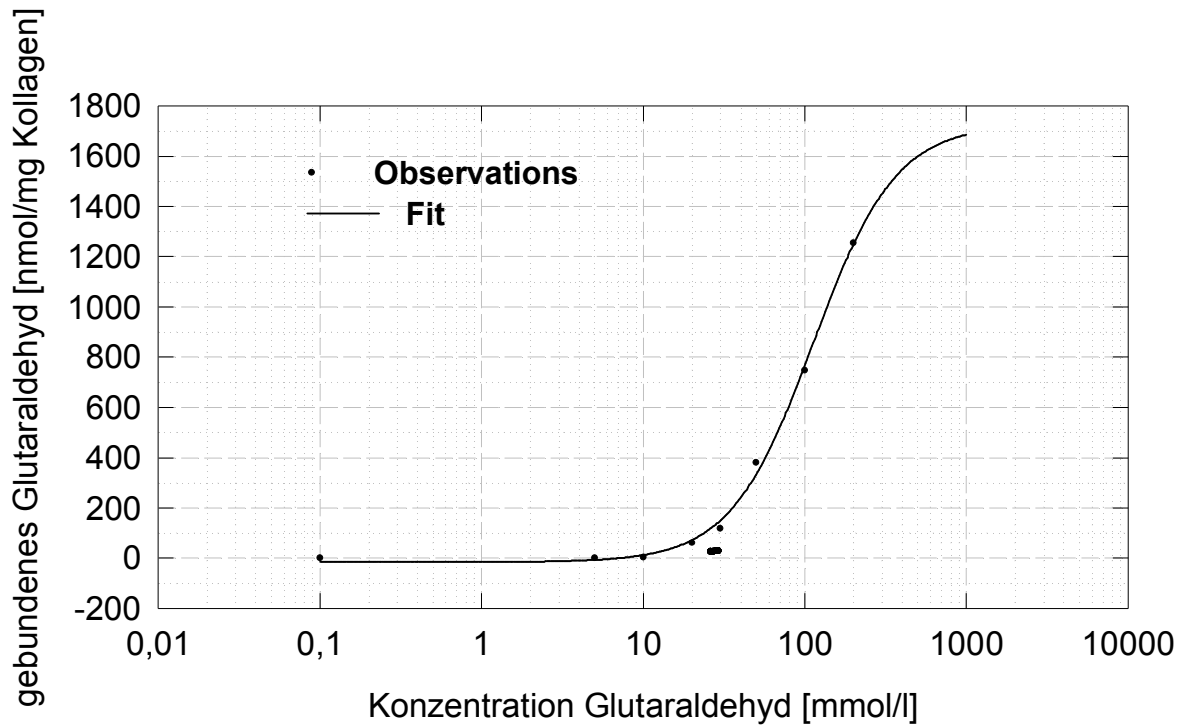


Abbildung 31: Extrapolation der Werte des Dentins im Originalzustand

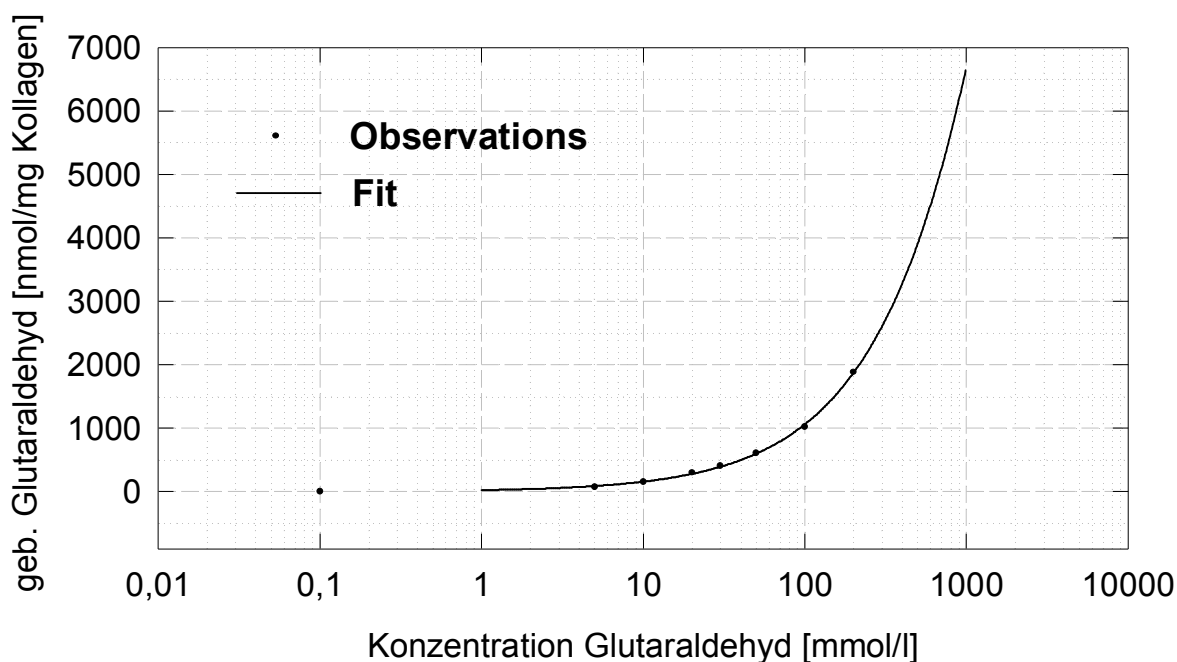


Abbildung 32: Extrapolation der Werte des EDTA-behandelten Dentins

Aus den Gleichungen der Fit-Kurven errechnen sich die Werte für 500mM: 1599,3 nmol/mg gebundener Stoffmenge bei Dentin im Originalzustand, und 3912,7 nmol/mg bei demineralisiertem Dentin. Wenn man die ermittelten Kollagenmassen in den Kavitäten heranzieht, errechnen sich folgende Werte gebundenen Glutaraldehyds absolut und in Prozent der eingesetzten Stoffmenge (7,5 µmol) (Tabelle 8):

Gebundenes Glutaraldehyd [nmol]

Gebundenes Glutaraldehyd [%]

| Kavitätenart | Original | EDTA | Kavitätenart | Original | EDTA |
|-----------------------------------|----------|-----------|-----------------------------------|----------|------|
| Klein-Tief: 1,5 mm ³ | 847,6 | 2073,7 | Klein-Tief: 1,5 mm ³ | 11,3 | 27,6 |
| Groß-Tief: 5,0 mm ³ | 2798,8 | 6847,2 | Groß-Tief: 5,0 mm ³ | 37,3 | 91,3 |
| Klein-Flach: 30,0 mm ³ | 16792,7* | 41083,4* | Klein-Flach: 30,0 mm ³ | 100* | 100* |
| Groß-Flach: 100,0 mm ³ | 55975,5* | 136944,5* | Groß-Flach: 100,0 mm ³ | 100* | 100* |

Tabelle 8: Glutaraldehyd, das gebunden wird: Stoffmenge absolut und in Prozent; die mit „*“ gekennzeichneten Werte erreichen durch Übersteigen der eingesetzten Stoffmenge automatisch 100% Bindung.

Aus dem Ergebnis könnte man schlussfolgern, dass in den flachen Kavitäten kein Aldehydkontakt mit der Pulpa stattfindet, unabhängig davon, ob das Dentin entkalkt wurde

oder nicht, oder ob es eine große oder eine kleine Kavität ist. Bei tiefen Kavitäten mit wenig Restdentinstärke scheint es deutlich auf die Größe (ca. dreifache Bindungskapazität bei großen Kavitäten) und die demineralisierende Vorbehandlung (Verdreifachung der Bindungskapazität) anzukommen.

Natürlich stehen dieser Berechnung mehrere Vorbehalte entgegen, darum bleibt sie in ihrem Charakter eher theoretisch. Die Extrapolation über weite Strecken, hier über mehr als das doppelte des größten eingesetzten Messwertes hinaus, ist z.B. nicht zulässig. Man kann nur vermuten, wie sich die Kurve bei der hohen Konzentration von 500 mM entwickeln wird. Die Rechnung stützt sich hier auf Daten einer Methode, die nicht in dem tatsächlichen Messbereich durchgeführt wurde. Mit den ermittelten Messwerten kann jedoch auf andere Weise keine Aussage über Bindungskapazitäten bei 500mM gemacht werden. Zudem ist die Annahme einer vollständigen Entkalkung bis zur Pulpa mit der klinischen Situation nicht vereinbar. Wenn Präparate zur Demineralisation eingesetzt werden, z.B. Phosphorsäure, dann beträgt die Einwirkzeit nur wenige Sekunden mit einer eher geringen Wirtktiefe im μm - Bereich. Es bleibt ein modellhafter Versuch, eine ungefähre Vorstellung zu bekommen, wie sich bei klinischer Anwendung von Glutaraldehyd vorhandenes Kollagen im Dentin hinsichtlich seiner Bindungskapazität verhalten könnte.

6.5 Schlussfolgerung

Nach dem Vergleich der Ergebnisse dieser Studie mit den in der Literatur beobachteten Phänomenen und Auswirkungen bezüglich der Reaktion von Glutaraldehyd mit kollagenen Proteinen gelangt man immer wieder zu der Erkenntnis, dass jeglicher beobachtete toxische Effekt des Aldehyds in seinem Ausmaß starke Abhängigkeit zeigt von der Konzentration, der Einwirkzeit, der Messmethode, den verwendeten Testmaterialien und sogar von den eingesetzten Zell-Linien. Auffällig ist auch die große Uneinigkeit in der Literatur, die auf die extreme Komplexität der Reaktion des Glutaraldehyds mit biologischen Geweben zurückzuführen ist.

Wendet man sich wieder der Fragestellung dieser Arbeit zu und betrachtet die potentiell denkbare lokale „Entgiftung“ des Glutaraldehyds durch das Kollagen, muss man einschränken: Bei Konzentrationen von 5%, wie in vielen Produkten enthalten, lassen sich in applizierter Menge lokal zwar Entgiftungseffekte beobachten, diese hängen aber sehr stark vom Ort der Anwendung und der Vorbehandlung ab.

Zudem gibt es keinen allgemeingültigen „No-Effect-Level“; er variiert je nach Material und Test und konnte in dieser Studie nur für den Kollagenschwamm gefunden werden; hier lag er im Agar-Overlay-Versuch bei 10 mM, was 0,1% entspricht. Gleichfalls konnte durch den Vergleich der Materialien gezeigt werden, dass demineralisiertes Dentin dem kollagenen Referenzmaterial der Firma Innocoll in seiner Bindungsfähigkeit gegenüber Glutaraldehyd ähnlicher ist, als seinem unbehandelten Originalzustand, sodass die Notwendigkeit der Vorbehandlung mit EDTA *in vitro* zur Erzeugung einer reaktionsfähigen Schichtdicke von 500 µm postuliert wurde. Leider ist klinisch eine EDTA-Vorbehandlung für die geforderte Mindestzeitspanne von 24 Stunden nicht möglich und auch nicht erwünscht.

Zuletzt konnte aber auch nachgewiesen werden, dass die durchgeführten chemischen Versuche die Ergebnisse des zellbiologischen Versuchs untermauern: es zeigte sich ein durchgehend konstantes „Ranking“ der Materialien von sehr schlechter Reaktion mit Glutaraldehyd bis guter; dies ist Dentin im Originalzustand – Innocollschwamm – demineralisiertes Rinderdentin.

Auf Basis dieser Erkenntnisse formulieren neben der aktuellen Fachliteratur zum Thema Füllungstherapie [16, 83] auch die Gremien für zeitgemäße und evidenzbasierte Behandlungsrichtlinien, wie z. B. die DGZMK, ihre Empfehlungen zum Einsatz aldehydhaltiger zahnärztlicher Materialien: die Verwendung von Aldehyden in großen Konzentrationen und langen Liegezeiten, wie etwa für das Devitalisieren bei Pulpitiden oder bei der Milchzahnendodontie, sollte vermieden werden. Die Applikation auf die Schleimhaut bei Blutungen und Aphthen ist wegen möglicher lokaler Nekrosen und mittlerweile besserer Alternativen obsolet [32, 93]. „Alle zahnärztlichen Restaurationsmaterialien müssen hinsichtlich bestimmter unerwünschter Eigenschaften wie z. B. toxische, mutagene, kanzerogene und allergene Wirkung Sicherheitsstandards erfüllen, die durch nationale und internationale Normen sowie durch entsprechende gesetzliche Regelungen definiert sind. Diese Anforderungen können von heute gebräuchlichen Kompositen und Haftvermittlern erfüllt werden [94].“ Der geringe Gehalt an Aldehyden in Kompositen (0,2 ppm) wird als tolerabel erachtet und hinsichtlich einer vernünftigen Nutzen-Risiko-Abwägung in Kauf genommen: „In Übereinstimmung mit der ADA sind nach heutigem Kenntnisstand Komposite hinreichend biokompatibel und weisen – wie alle anderen Restaurationsmaterialien – kein unvertretbares Risiko auf [33].“ Generell aber besteht für Patient und zahnärztliches Personal ein Maximum an Sicherheit; denn durch die zahlreichen, strengen und gründlichen werkstoffkundlichen und klinischen Testungen von dentalen Produkten besteht – wie auch im Medizinproduktegesetz gefordert – eine gute wissenschaftliche Dokumentation.

6.6 Ausblicke und weitere Forschungsansätze

Um die noch offenen Fragestellungen bezüglich der Toxizität des Glutaraldehyds zu klären, bieten sich als Ausblick weitere Studien an. Diese könnten nochmals eine quantitative Verifizierung der Daten im hier gefundenen Konzentrationsbereich beinhalten, weitere kollagene Materialien, z.B. Dentin vom Menschen, in die Versuchsanordnungen einbringen oder weitere klinisch relevante Variablen berücksichtigen, wie z. B. andere Demineralisationsmittel, wie Phosphor- oder Zitronensäure, andere Zell-Linien, so etwa Pulpazellen, oder abweichend vom Dentin gänzlich andere Puffersysteme untersuchen, wie z.B. Speichel und dessen Proteine.

Zuletzt zeigt sich auch noch ein gewisses Defizit bezüglich der *in vivo* Studien zu dieser Thematik. *In vitro* gefundene Konzentrationen und Parameter ließen sich hier leicht übertragen und so überprüfen. So könnte z.B. die Inkubation von Kollagenproben mit Glutaraldehyd im Tierversuch nachgestellt werden. Hier kämen dann, wie in der vorliegenden Studie, z.B. bovine Zähne infrage, bei denen *in situ* freiliegende Dentinflächen präpariert würden, die dann mit Glutaraldehyd in Kontakt gebracht und nach Extraktion vermessen werden könnten. So blieben z.B. Phänomene, wie die Dentinliquorflussrate, welche lokal verdünnende Effekte haben könnte, nicht weiter außen vor. Ebenfalls könnte die Desensibilisierungsbehandlung beim Tier durchgeführt und auf gleiche Art und Weise nach Zahnentfernung freies Aldehyd im kollagenhaltigen Zahnhartgewebe quantifiziert werden. Interessant wären in diesem Zusammenhang auch mögliche messbare systemische Auswirkungen, die mit radioaktivmarkiertem Glutaraldehyd (^{14}C -Isotop) bestimmbar wären: Dies könnte z.B. mithilfe einer Ausatemluft-Untersuchung des CO_2 , zu dem Glutaraldehyd hauptsächlich metabolisiert wird, realisiert werden, oder auch durch Urinuntersuchungen.

Denkbar wären Variationen in der Spezies. Bei Schweinen z.B. wird in der Transplantationsmedizin seit langem die gute Verträglichkeit zu humanem Gewebe genutzt (z.B. Herzklappenersatz). Vor diesem Hintergrund kämen also auch Zähne porkinen Ursprungs infrage. Auch die Spezies kann variiert werden. Gemäß der Erkenntnisse der Genforschung, die für die Übereinstimmung der DNS zwischen Menschen und Menschenaffen einen Wert von 80-95% angibt, gelänge eine Annäherung an die Situation beim Menschen durch Verwendung von Affenzähnen auf ethisch unbedenklichere Weise.

7 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Toxizität des Glutaraldehyds aus Bondingsystemen und Desensitizern nach Reaktion mit Kollagenanteilen des Dentins, mit dem es klinisch bei der Füllungstherapie in Kontakt kommt.

Zum Einsatz kamen zwei chemische und ein zellbiologisches Verfahren. Die chemischen Tests waren Farbreaktionsversuche mit Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) und Purpald[®], die die erfolgte Reaktion von Glutaraldehyd mit den Aminogruppen des Kollagens einerseits und freies nicht gebundenes Aldehyd andererseits photometrisch nachweisbar machten. Hier wurden jeweils gestanzte Proben von drei verschiedenen kollagenhaltigen Materialien (Schwamm, Rinderdentin, demineralisiertes Rinderdentin) mit verschiedenen Konzentrationen des Glutaraldehyds inkubiert und nach Reaktion mit den Farbstoffen der Grad der Quervernetzung bzw. die Menge des ungebundenen Aldehyds quantitativ bestimmt.

Als Ergebnis zeigte sich eine Unabhängigkeit von der Herkunft des Dentins bezüglich des Individuums, des Zahnes innerhalb eines Individuums und sogar der Lokalisation innerhalb eines Zahnes. Jedoch ergab sich die Forderung nach Demineralisation, die mit EDTA erreicht wurde, um einen korrekten Versuchsablauf zu garantieren. Außerdem zeigte sich eine durchgehend konzentrationsabhängige Wirkung des Glutaraldehyds am Kollagen: Höhere Konzentrationen führten zu höherer Quervernetzung - und somit Bindung - und einer größeren Menge an freiem, ungebundenem Aldehyd. Außerdem reagierten die Kollagenproben einmal mit einem kleinen Volumen des Aldehyds (15 µl) und einem größeren Volumen (2 ml), um zu zeigen, dass ein Überangebot des Aldehyds die Bindungskapazität des Kollagens bereits bei niedrigeren Konzentrationen erschöpft.

Im Agar-Overlay-Test konnte gezeigt werden, dass nach Durchdringung des Versuchsaufbaus durch unterschiedliche Konzentrationen von Glutaraldehyd die gefärbten Mausfibroblasten der Linie L-929 einem Zelltod in erwartetem Ausmaß unterlagen.

Die Ergebnisse des biologischen Versuchs stehen somit im Einklang mit denjenigen aus den chemischen Analysen. Dentin ohne Demineralisation hat bei 15 µl und 5% keinen entgiftenden Effekt, demineralisiertes Dentin zeigte zwar die im Versuch beste Aldehydretention, konnte aber in diesem Konzentrationsbereich ebenfalls keine Entgiftungseffekte erzielen. Allenfalls in der Hochrechnung bei größeren Schichtstärken ergibt sich eine – allerdings eher theoretische – Totalbindung des Glutaraldehyds, sogar für beide Dentinmaterialien.

8 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------|--|
| BME | Basal Medium Eagle – Nährmedium |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| GA | Glutaraldehyd |
| HEMA | 2-Hydroxyethylmethacrylat |
| NCS | Newborn Calf Serum |
| PBS | Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung |
| PVC | Polyvinylchlorid |
| TNBS | Trinitrobenzolsulfonsäure |

| | |
|-----|--------------------|
| kD | Kilodalton |
| KG | Körpergewicht |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mM | Millimol pro Liter |
| mPa | Millipascal |
| ppm | parts per million |

9 Literaturverzeichnis

- [1] Angele, P., Abke J., Kujat. R., Faltermeier, H., Schumann D., Nerlich, M., Kinner, B., Englert, C., Ruszczak, Z., Mehrl, R., Mueller, R.: Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. *Biomaterials* 25, 2831-2841 (2004)
- [2] Avigad, G.: A simple spectrophotometric determination of formaldehyde and other aldehydes: application to periodate-oxidized glycol systems. *Anal Biochem* 134, 499-504 (1983)
- [3] Ballantyne, B., Myers, R.C.: The acute toxicity and primary irritancy of glutaraldehyde solutions. *Vet Hum Toxicol* 43 (4), 193-202 (2001)
- [4] Beertsen, W., Van den Bos, T.: Alkaline phosphatase induces the deposition of calcified layers in relation to dentin; an *in vitro* study to mimic the formation of afibrillar acellular cementum. *J Dent Res* 70, 176 (1991)
- [5] Bergenholtz, G., Jontell, M., Tuttle, A., Knutsson, G.: Inhibition of serum albumin flux across exposed dentine following conditioning with GLUMA primer, glutaraldehyd or potassium oxalates. *J Dent* 21, 220-227 (1993)
- [6] Brown, J.C., Timpl, R.: The Collagen Superfamily. *Int Arch Allergy Immunol* 107, 484-490 (1995)
- [7] Bruce, G.R, McDonald, N.J., Sydiskis, R.J.: Cytotoxicity of retrofill materials. *J Endod* 19 (6), 288-292 (1993)
- [8] Bubnis, W.A., Ofner, C.M., III.: The determination of ϵ -amino groups in soluble and poorly soluble proteinaceous materials by a spectrophotometric method using trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal Biochem* 207,129-133 (1992)
- [9] Camps, J., About, I., Van Meerbeek, B., Franquin, J.C.: Efficiency and cytotoxicity of resin-based desensitising agents. *Am J Dent* 15 (5), 300-304 (2002)
- [10] Cao, H.D., Tan, Y.F., Lin, X.Y, Fan, H.S., Zhang, X.: Cytocompatibility testing of hydroxyapatite/collagen composite cross-linked with glutaraldehyde. *Key Engin Mater*, 288-289 (2005)
- [11] Cayot, P., Tainturier, G.: The quantification of protein amino groups by the trinitrobenzenesulfonic acid method: a reexamination. *Anal Biochem* 249, 184-200 (1997)
- [12] Chen, M.H., Chen, R.S.: Evaluation of the cytotoxicity of recently produced dentin bonding agents. *Taiwan Yixuehui Zazhi* 87 (3), 352-357 (1988)
- [13] Chen, R.S., Jien, S.S.: The sealing ability of 5 dentin adhesive agents in composite resin fillings. *Taiwan Yixuehui Zazhi*, 85 (1), 74-79 (1986)

- [14] Cheung, D.T., Nimni, M.E.: Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde, II: Reaction with monomeric and polymeric collagen. *Connect Tissue Res* 10, 201-216 (1982)
- [15] Cooke, A., Oliver, R.F., Edward, M.: An *in vitro* cytotoxicity study of aldehyde-treated pig dermal collagen. *Br J Exp Pathol* 64 (2), 172-176 (1983)
- [16] Diedrich, P., Heidemann, D., Horch, H.-H., Koeck, B.: *Praxis der Zahnheilkunde, Band 2 – Kariologie und Füllungstherapie*. Urban und Schwarzenberg, 4. Aufl., 194 (1999)
- [17] Dijkman, G.E.H.M., De Vries, J., Arends, J.: Effects of glutardialdehyde on secondary caries in situ. *Caries Res* 26 (4), 293-298 (1992)
- [18] Dong, C.M., Wu, X., Caves, J., Rele, S.S., Thomas, B.S., Chaikof, E.L.: Photomediated crosslinking of C6-cinnamate derivatized type I collagen. *Biomaterials* 26 (18), 4041-4049 (2005)
- [19] Eliades, G., Palaghias, G., Vougiouklakis G. : Effect of acidic conditioners on dentin morphology, molecular composition and collagen conformation in situ. *Dent Mater* 13 (1), 24-33 (1997)
- [20] Ergucu, Z., Hiller, K.A., Schmalz, G.: Influence of dentin on the effectiveness of antibacterial agents. *J Endod* 31(2), 124-129 (2005)
- [21] Esser, M., Tinschert, J., Marx, R.: Material characteristics of the hard tissue of bovine versus human teeth. *Dtsch Zahnärztl Z* 53 (10), 713-717 (1998)
- [22] Esterbauer, S.: *Wachstumskinetik einer neu etablierten Kalbspulpazell-Linie auf Rinderdentin*. Zahnmed Diss Universität Regensburg (1993)
- [23] Felton, D. Bergenholtz, G., Cox, C.F.: Inhibition of bacterial growth under composite restorations following GLUMA pretreatment. *J Dent* 68 (3), 491-495 (1989)
- [24] Fürst, W., Banerjee, A.: Release of glutaraldehyde from an albumin-glutaraldehyde tissue adhesive causes significant in vitro and in vivo toxicity. *Ann Thorac Surg* 80 (3), 1522-1529 (2005)
- [25] Galler, K., Hiller, K.A., Ettl, T., Schmalz, G.: Selective influence of dentin thickness upon cytotoxicity of dentin contacting materials. *J Endod* 31 (5), 396-399 (2005)
- [26] Garhammer, P.: *Zytotoxizitätstests zahnärztlicher Füllungsmaterialien in einer kommerziell erhältlichen Zellkulturkammer*. Zahnmed Diss Universität Regensburg (1993)
- [27] Geurtsen, W.: Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Critical reviews in oral biology and medicine: an official publication of the American Association of Oral Biologists* 11(3), 333-355 (2000)
- [28] Haller, B.: Mechanismen und Wirksamkeit von Dentinhaftvermittlern. *Dtsch Zahnärztl Z* 49, 750 (1994)

- [29] Hanks, C.T., Wataha, J.C, Parsell, R.R., Strawn, S.E.: Delineation of cytotoxic concentrations of two dentin bonding agents *in vitro*. J Endod 18 (2), 589-596 (1992)
- [30] Hansen, E.K., Asmussen, E.: Improved efficacy of dentin bonding agents. Eur J Oral Sci 105 (5, Pt.1), 434-439 (1997)
- [31] Hester, S.D, Barry, W.T., Zou, F., Wolf, D.C. : Transcriptomic analysis of F344 rat nasal epithelium suggests that the lack of carcinogenic response to glutaraldehyde is due to its greater toxicity compared to formaldehyde. Toxicol Pathol 33 (4), 415-424 (2005)
- [32] Hickel, R.: Moderne Füllungsmaterialien, Stellungnahme der DGZMK. Dtsch Zahnärztl Z 52 (9), 572-585 (1997)
- [33] Hickel, R., Ernst, H.P, Haller, B., Hugo, B., Kunzelmann, K.H, Merte, K., Ott, K., Schmalz, G., Staehle, H.J.: Direkte Kompositrestaurationen im Seitenzahnbereich – Indikation und Lebensdauer. Stellungnahme der DGZMK. www.dgzmk.de/index.php?site=std164&backlink=m0129X (2005)
- [34] Hill, S.D., Berry, C.W., Seale. N.S., Kaga, M.: Comparison of antimicrobial and cytotoxic effects of glutaraldehyde and formocresol. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 71 (1), 89-95 (1991)
- [35] Hitchens, A.P., Leikind, M.C.: The introduction of Agar-Agar into bacteriology. J Bacteriol 37 (5), 485-493 (1939)
- [36] Hörsted-Bindslev, P.: Monkey pulp reactions to cavities treated with Gluma Dentin Bond and restored with a microfilled composite. Scand J Dent Res 95 (4), 347-355 (1987)
- [37] Huang-Lee, L.L.H., Cheung, D.T, Nimni, M.E.: Biochemical changes and cytotoxicity associated with the degradation of polymeric glutaraldehyde derived crosslinks. J Biomed Mater Res 24, 1185-1201 (1990)
- [38] Jacobsen, N.W., Dickinson, R.G.: Spectrometric Assay of Aldehydes as 6-mercapto-3-substituted-s-triazolo(4,3-b)-s-tetrazines. Anal Chem 46 (2), 298-299 (1974)
- [39] Janik, D., Hall, C.S., DeNavarre, M.G.: Glutaraldehyde – a sanitizing agent for the equipment used in the manufacture of cosmetics. Cosmet toilet 92 (3), 99-100 (1977)
- [40] Khor, E. : Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprotheses. Biomaterials 18, 95-105 (1997)
- [41] Kinney, J.H., Habelitz S., Marshall, S.J., Marshall, G.W.: The importance of intrafibrillar mineralization of collagen on the mechanical properties of dentin. J Dent Res 82 (12), 957-961 (2001)
- [42] Kinney, J.H., Pople, J.A., Marshall, G.W., Marshall, S.J. : Collagen orientation and crystallite size in human dentin : a small angle X-ray scattering study. Calcif Tissue Int 69 (1), 31-7 (2001)

- [43] Kinomoto, Y., Carnes, D.L., Ebisu, S.: Cytotoxicity of dentin conditioners and primers on human periodontal ligament cells *in vitro*. *Am J Dent* 16 (2), 125-128 (2003)
- [44] Kispelyi, B., Feijerdy, L., Ivanyi, I., Rosival, L., Nyrasdy, I.: Dentin sealers' effect on the diameter of pulpal microvessels: a comparative vitalmicroscopic study. *Oper Dent* 27 (6), 587-592 (2002)
- [45] Koide, T., Daito, M.: Effects of various collagen crosslinking techniques on mechanical properties of collagen film. *Dent Mater* 16 (1), 1-9 (1997)
- [46] Kuroki, K., Oshumi, T.: Morphological observations of cultured L cells exposed to formaldehyde or glutaraldehyde. *Kyushu Shika Gakkai Zasshi* 39 (5), 663-671 (1985)
- [47] Kuroki, K., Oshumi, T., Murakami, Y.: Effect of glutaraldehyde on cultured cells – restraining effect on multiplication of L cells. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 88 (2), 65-70 (1986)
- [48] Lawlor, R.R. : Does the ideal dental sterilizer exist ? *J Dent Que* 26, 385-392 (1989)
- [49] Lehmann, K.M., Hellwig, E. : Einführung in die restaurative Zahnheilkunde. Urban & Schwarzenberg, 8.Aufl., 31 (1998)
- [50] Li, Y., Noblitt, T.W., Dunipace, A.J., Stookey, G.K. : Evaluation of mutagenicity of restorative dental materials using the Ames salmonella/microsome test. *J Dent Res* 69 (5), 1188-1192 (1990)
- [51] Lindl, T.: Zell- und Gewebekultur. Spektrum Akademischer Verlag, 5. Aufl., 220ff (2002)
- [52] Maciel, K.T., Carvalho, R.M, Ringle, R.D., Preston, C.D., Russel, C.M., Pashley, D.H. : The effects of acetone, ethanol, HEMA, and air on the stiffness of human decalcified dentin matrix. *J Dent Res* 75 (11), 1851-1858 (1996)
- [53] Manabe, A., Hasegawa, T., Chigira, H., Itoh, K., Wakumoto, S., Nakayama, S., Tachikawa, T.: Morphological changes of rabbit skin by application of dentin primer. *Dent Mater* 9 (2), 147-152 (1990)
- [54] Marczak, A., Jozwiak, Z.: The interaction of DNR and glutaraldehyde with cell membrane proteins leads to morphological changes in erythrocytes. *Cancer Lett* 260 (1-2), 118-126 (2008)
- [55] Marshall, G.W., Marshall S.J, Kinney, J.H., Balooch, M.: The dentin substrate structure and properties related to bonding. *J Dent* 25, 441-458 (1997a)
- [56] Meltzer, N., Henkin, H.: Glutaraldehyde – a preservative for cosmetics. *Cosmet toilet* 92 (3), 95-98 (1977)
- [57] Meryon, S.D., Brook, A.M.: *In vitro* cytotoxicity of three dentine bonding agents. *J Dent* 17 (6), 279-83 (1989)

- [58] Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M.J., Waldron, K.C. : Glutaraldehyde: behaviour in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques* 37(5), 790-796, 798-802 (2004)
- [59] Miguez, P.A., Pereira, P.N., Atsawasuwan, P., Yamauchi, M. : Collagen cross-linking and ultimate tensile strength in dentin. *J Dent Res* 83 (10), 807-810 (2004)
- [60] Mizunuma, T., Nakabayashi, N.: Adhesion of 4-META/MMA-TBB resin to dentin modified with formaldehyde and glutaraldehyde. *Jpn J Conserv Dent* 27, 675-679 (1984)
- [61] Mueller, R., Abke, J., Schnell, E., Macionczyk, F., Gbureck, U., Mehrl, R., Ruszczak, Z., Kujat, R., Englert, C., Nerlich, M., Angele, P.: Surface engineering of stainless steel materials by covalent collagen immobilization to improve implant biocompatibility. *Biomaterials* 26, 6962-6972 (2005)
- [62] Munksgaard, E.C.: Amine-induced polymerisation of aqueous HEMA/aldehyde during action as a dentin bonding agent. *J Dent Res* 69(6), 1236-1239 (1990)
- [63] Munksgaard, E.C., Asmussen, E.: Bond strength between dentin and restorative resins mediated by mixtures of HEMA and glutaraldehyde. *J Dent Res* 63, 1087-1089 (1984)
- [64] Nakabayashi, N., Pashley, D.H.: *Hybridization of dental hard tissues*. Quintessence Publishing Co, Ltd, 1. Aufl., 21-35; 103-107 (1998)
- [65] Nakamichi, I., Iwaku, M., Fusayama, T.: Bovine teeth as possible substitutes in the adhesion test. *J Dent Res* 62, 1076-1081 (1983)
- [66] Neroni, M., Regad, C., Christen, O., Thoenen, S., Holz, J.: 6 dentin adhesive products subjected to controls *in vitro*. *J Biol Buccale* 18 (4), 271-285 (1990)
- [67] Nilsson, J.A., Zheng, X., Sundqvist, K., Liu, Y., Atzori, L., Elfving, A., Arvidson, K., Graftstrom R.C.: Toxicity of formaldehyde to human oral fibroblasts and epithel cells: influences of culture conditions and role of thiol status. *J Dent Res* 77 (11), 1896-1903 (1998)
- [68] Olde-Damink, L.H.H., Dijkstra P.J., Van Luyn, M.J.A., Van Wachem, P.B., Nieuwenhuis, P., Feijen, J. : Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials. *J Mater Sci /Mater Med* 6, 460-472 (1995)
- [69] Pashley, D.H., Carvalho, R.M.: Dentine permeability and dentine adhesion. *J Dent* 25 (5), 355-372 (1997)
- [70] Power, E.G.M.: Aldehydes as biocides. *Progress in Medicinical Chemistry* 34, 149-201 (1997)
- [71] Prigent, F., Iborra, C., Meslay, C. : Cutaneous necrosis secondary to topical treatment of wart with 20 p. 100 glutaraldehyde solution. *Ann Dermatol Venereol* 123 (10), 644-666 (1996)

- [72] Prockop, D.J.: What holds us together? Why do some of us fall apart? What can we do about it? *Matrix Biol* 16, 519-528 (1997/98)
- [73] Quin, C., Xu, J., Zhang, Y. : Spectroscopic investigation of the function of aqueous 2-hydroxyethylmethacrylate/glutaraldehyde solution as a dentin desensitizer. *Eur J Oral Sci* 114, 354-359 (2006)
- [74] Ranly, D.M., Amstutz, L., Horn, D.: Subcellular localization of glutaraldehyde. *Endod Dent Traumatol* 6 (6), 251-254 (1990)
- [75] Ranly, D.M., Horn, D. : Distribution, metabolism, and excretion of [14C] glutaraldehyde. *J Endod* 16 (3), 135-139 (1990)
- [76] Ritter, A.V., Swift, E., Yamauchi, M.: Effects of phosphoric acid and glutaraldehyde-HEMA on dentin collagen. *Eur J Oral Sci* 109, 348-353 (2001)
- [77] Römpp Chemie CD Lexikon – Version 1.0, Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag 1995
- [78] Rud, J., Andreasen, J.O., Rud, V.: Retrograde root filling utilizing resin and a dentin bonding agent: frequency of healing when compared to retrograde amalgam. *Tandlaegebladet* 93 (8), 267-273 (1989)
- [79] Ruijgrok, J.M., Boon, M.E., De Wijn, J.R.: The effect of heating by microwave irradiation and by conventional heating on the aldehyde concentration in aqueous glutaraldehyde solutions. *Histochem J* 22, 389-393 (1990)
- [80] Rusmah, M.: Glutaraldehyde in dentistry – a review. *Singapore Dent J* 18 (1), 17-21 (1993)
- [81] Sano, H., Ciucchi, B., Matthews W.G., Pashley, D.H.: Tensile properties of mineralized and demineralized human and bovine dentin. *J Dent Res* 73 (6), 1205-1211 (1994)
- [82] Schmalz, G.: Agar Overlay Method. *Int Endod J* 21 (2), 59-66 (1988)
- [83] Schmalz, G., Geurtsen, W., Arenholt-Bindslev, D.: Die Biokompatibilität von Komposit-Kunststoffen. *Dtsch Zahnärztl Z* 60 (10), 563-570 (2005)
- [84] Schmalz, G., Hiller, K.A., Nunez, L.J., Stoll, J., Weis, K.: Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions.. *J Endod* 27 (1) 23-30 (2001)
- [85] Schmalz, G., Thonemann, B., Riedel, M., Elderton, R.J.: Biological and clinical investigations of a glass ionomer base material. *Dent Mater* 10, 303-313 (1994)
- [86] Schmidlin, P.R., Zehnder, M., Goehring, T.N., Waltimo, T.M.: Glutaraldehyde in bonding systems disinfects dentin *in vitro*. *J Adhes Dent* 6 (1), 61-64 (2004)
- [87] Schweikl, H., Schmalz, G.: Glutaraldehyde-containing dentin bonding agents are mutagens in mammalian cells *in vitro*. *J Biomed Mater Res* 36(3), 284-288 (1997)

- [88] Schweikl, H., Schmalz, G.: Mutagenic activity of various dentin bonding agents. *Biomaterials* 17 (14), 1451-1456 (1996)
- [89] Schweikl, H., Schmalz, G., Bey, B.: Mutagenicity of dentin bonding agents. *J Biomed Mater Res* 28 (9), 1061-1067 (1994)
- [90] Schupbach, P., Lutz, F., Finger, W.J.: Closing of dentinal tubules by Gluma desensitizer. *Eur J Oral Sci* 105 (5 Pt 1), 414-421 (1997)
- [91] Simionescu, A., Simionescu, D., Deac, R.: Lysine-enhanced glutaraldehyde crosslinking of collagenous biomaterials. *J Biomed Mater Res* 25, 1495-1505 (1991)
- [92] Speer, D.P., Chvapil, M., Eskelson, C.D., Ulreich, J.: Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. *J Biomed Mater Res* 14, 753-764 (1980)
- [93] Staehle, H.J., Koch, M.J.: Anwendung aldehydfreisetzender zahnärztlicher Materialien, Stellungnahme der DGZMK. *Dtsch Zahnärztl Z* 52 (12), 778-782 (1997)
- [94] Staehle, H.J.: Pulpaschutz unter Kompositrestaurationen. Stellungnahme der DGZMK. www.dgzmk.de/index.php?site=std98&backlink=m0129X (1999)
- [95] Stangel, I., Dickens, S.H., Antonucci, J.M.: Dentin protein loss after acid conditioning: An FTIR study. *J Dent Res* 74, 88 (1995)
- [96] St. Clair, M.B.G., Bermudez, E., Gross, E.A., Butterworth, B.E., Recio, L.: Evaluation of the genotoxic potential of glutaraldehyde. *Environ Mol Mutagen* 18 (2), 113-119 (1991)
- [97] Stryer, L.: *Biochemie*. Spektrum, Heidelberg, 4. Auflage, 273-286 (1990)
- [98] Stuessel, K.W.: Elektronenmikroskopische Oberflächenuntersuchung an Dentin von Menschen und Rind sowie Haftfestigkeitsmessungen von zahnärztlichen Kunststoffen an Rinderdentin. *Zahnmed Diss FU Berlin* (1979)
- [99] Sun, H.W., Feigal, R.J., Messer, H.H.: Cytotoxicity of glutaraldehyde and formaldehyde in relation to time of exposure and concentration. *Pediatr Dent* 12 (5), 303-307 (1990)
- [100] Tagami, J., Tao, L., Pashley, D.H., Horner, J.A.: The permeability of dentin from bovine incisors *in vitro*. *Arch Oral Biol* 34, 773 (1989)
- [101] Takigawa, T., Endo, Y.: Effects of glutaraldehyde exposure on human teeth. *J Occup Health* 48 (2), 75-87 (2006)
- [102] Uemitsu, N., Kawasaki, H., Furuhashi, T., Miyoshi, K., Othaka, T., Nomura, A., Hasegawa, T., Shimizu, Y., Nakazawa, M.: Acute and subacute toxicity studies and local irritation study of glutaraldehyde. *Oyo Jakuri* 12 (1), 11-32 (1976)
- [103] Usha, R., Ramasami, T.: Structure and conformation of intramolecularly cross-linked collagen. *Colloids Surf B Biointerfaces* 10 (1), 21-24 (2005)

- [104] Vaidyanathan, J., Vaidyanathan, T.K., Yadav, P., Linaras, C. E. : Collagen-ligand interaction in dentinal adhesion : computer visualization and analysis. *Biomaterials* 22, 2911-2920 (2001)
- [105] Warshaw, EM, Schram, SE, Maibach, HI, Belsito, DV, Marks, JG Jr, Fowler, JF Jr, Rietschel, RL, Taylor, JS, Mathias, CG, DeLeo, VA, Zug, KA, Sasseville, D, Storrs, FJ, Pratt, MD: Occupation-related contact dermatitis in North American health care workers referred for patch testing: cross-sectional data, 1998 to 2004. *Dermatitis* 19 (5), 261-274 (2004)
- [106] Yang, H., Jiao, Y., Wang, C.: Biological effect of a new compound glutaraldehyde disinfectant. *Junshi Yixue Kexueyuan Yuankan* 27 (5), 370-372 (2003)
- [107] Zeiger, E., Gollapudi, B., Spencer, P.: Genetic toxicity and carcinogenicity studies of glutaraldehyde – a review. *Mutat Res* 589 (2), 136-151 (2005)
- [108] Zurek, G., Karst, U.: Microplate photometric determination of aldehydes in disinfectant solutions. *Anal Chim Acta* 351, 247-257 (1997)

10 Danksagung

Herrn Professor Dr. Gottfried Schmalz danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, für seine hilfreiche Unterstützung und stets fruchtbaren Rat, für die Anleitung zu wissenschaftlichem Arbeiten und dafür, dass er die hierzu benötigten Mittel großzügig zur Verfügung stellte.

Besonders möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Rainer Müller bedanken, der mir in allen Phasen der Arbeit stets hilfreich zur Seite stand und mich mit großer Kompetenz in die chemische Methodik einführte. Auch für die zahlreichen Anregungen bei der Erstellung des Manuskripts gilt ihm Dank.

Herrn Professor Dr. Helmut Schweikl aus dem Forschungsbereich der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie danke ich für die immer freundliche und engagierte Unterstützung bei der Einführung und Durchführung der zellbiologischen Versuche, ferner allen MitarbeiterInnen, insbesondere Frau Claudia Waha für ihren fachlichen Rat und persönlichen Einsatz bei Fragen und Problemen.

Herrn Dr. Karl-Anton Hiller schulde ich großen Dank für die statistische Auswertung der Ergebnisse.

11 Lebenslauf

Name: Andreas Reinhold Zielinski
Geburtsdatum: 30. September 1978
Geburtsort: Erlangen
Eltern: Roswitha Zielinski, geb. Englmann
Dr. Reinhold Zielinski
Geschwister: Thomas Zielinski
Religion: römisch-katholisch
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung:

9/1985 – 7/1989 Grundschule Freystadt
9/1989 – 6/1998 Ostendorfer Gymnasium Neumarkt /i.d.OPf.
6/1998 Allgemeine Hochschulreife
9/1998 – 6/1999 allg. Wehrpflicht bei 2./ Gebirgsbeobachtungsartilleriebataillon 83

Studium:

11/1999 Immatrikulation für das Studienfach Zahnmedizin an der Universität
Regensburg
9/2000 Naturwissenschaftliche Vorprüfung (Vorphysikum)
4/2002 Zahnärztliche Vorprüfung (Physikum)
7 – 11/2004 Zahnärztliche Prüfung (Staatsexamen)

Beruflicher Werdegang:

1/2005 - 12/2006 Assistenz Zahnarzt in freier Praxis
seit 2/2007 Niedergelassener Zahnarzt in freier Praxis