

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE
DIREKTOR: PROF. DR. G. SCHMALZ
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**DIE BILDUNG VON 8-OXOGUANIN DURCH EINEN EPOXYESTER UND EIN
DIMETHACRYLAT IN SÄUGETIERZELLEN**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Sabine Pongratz

2010

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE
DIREKTOR: PROF. DR. G. SCHMALZ
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**DIE BILDUNG VON 8-OXOGUANIN DURCH EINEN EPOXYESTER UND EIN
DIMETHACRYLAT IN SÄUGETIERZELLEN**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Sabine Pongratz

2010

Dekan:

Prof. Dr. B. Weber

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Helmut Schweikl

2. Berichterstatter:

PD Dr. Carola Kolbeck

Tag der mündlichen Prüfung:

5. Mai 2010

Für meine Eltern

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	8
1 EINLEITUNG	9
1.1 Komposite in der Zahnmedizin	9
1.1.1 Methacrylate.....	9
1.1.2 Silorane	11
1.1.3 Freisetzung von Kompositbestandteilen.....	13
1.1.4 Biokompatibilität	15
1.1.5 Genotoxizität von TEGDMA und einem Epoxyester.....	15
1.2 Oxidativer Stress.....	17
1.2.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS).....	17
1.2.2 8-Hydroxydesoxyguanin als Hauptprodukt oxidativer DNA-Schäden..	18
1.2.3 N-Acetylcystein und andere Antioxidantien	19
2 MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 Material.....	22
2.1.1 Chemikalien	22
2.1.2 Oxy-DNA Kit.....	22
2.1.3 Verbrauchsmaterial und Geräte	23
2.1.4 Lösungen, Medien und Puffer für die Zellkultivierung.....	24
2.2 Methoden	26
2.2.1 Zellkultur.....	26
2.2.2 Herstellung der TEGDMA-, Epoxyester- und der N-Acetylcystein- Expositionslösung	26
2.2.3 Ablauf, Zeitplan und Versuchsdesign des Oxy-DNA Tests	27
2.2.4 Fixierung der Zellkulturen	28
2.2.5 Vorbereitung der Zellen zur Oxy-DNA Bestimmung	28
2.2.6 Durchflusszytometrie.....	29
3 FRAGESTELLUNG	35
4 ERGEBNISSE	36
4.1 Bildung von 8-OxoG in V79B-Fibroblasten.....	36
4.1.1 Exposition gegen TEGDMA	37

4.1.2	Exposition gegen den Epoxyester K126.....	38
4.1.3	Die Bildung von 8-OxoG durch TEGDMA und K126	41
4.2	Zytotoxizität von TEGDMA und K126 in V79B-Fibroblasten	44
5	DISKUSSION	48
5.1	TEGDMA induziert die Bildung von 8-OxoG in V79B-Zellen	49
5.2	Die Bildung von 8-OxoG durch den Epoxyester K126	53
5.3	Wirkung von N-Acetylcystein auf die 8-OxoG-Bildung.....	55
6	ZUSAMMENFASSUNG	58
7	ANHANG	60
7.1.1	Literaturverzeichnis	60
7.1.2	Danksagung	66
7.1.3	Lebenslauf.....	67

Abkürzungsverzeichnis

Bis-GMA	Bisphenol A-Diglycidylmethacrylat
CMF-PBS	Calcium- und Magnesiumfreie phosphatgepufferte Kochsalzlösung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMS	Ethylmethansulfonat
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBS	foetal bovine serum
FL 1-3	Fluoreszenz 1-3
FSC	forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
GSH	Gluthation
HEMA	2-Hydroxyethylmethacrylat
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
MEM	minimum essential medium
MKT	Mikrokerntest
NAC	N-Acetylcystein
8-OxoG	Hydroxydesoxyguanin
PBS	phosphate buffered saline (= phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PBS-EDTA	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit EDTA
ROS	reactive oxygen species
SSC	side scatter (Seitwärtsstreulicht)
TEGDMA	Triethylenglycoldimethacrylat

1 Einleitung

1.1 Komposite in der Zahnmedizin

1.1.1 Methacrylate

Komposite auf der Basis von Methacrylaten sind heutzutage aus der ästhetischen Zahnmedizin nicht mehr wegzudenken. Gerade durch die Einführung der Säure-Ätz-Technik durch Buncore im Jahre 1955 ist ein retentiver Verbund zwischen Zahn und Füllung möglich geworden. Die modernen zahnärztlichen Kompositmaterialien bestehen aus einer organischen und einer anorganischen Komponente, die durch eine dritte, in der Regel ein trifunktionales Alkoxysilan, verbunden werden (Peutzfeldt, 1997).

Die organische Matrix eines Komposites besteht aus Monomeren, Komonomeren und unterschiedlichen Additiven. Die niedermolekularen Komonomere, wie beispielsweise das Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA), fungieren als Verdüner, um eine größere Menge anorganischer Füllstoffe in die sonst sehr visköse Matrix einbetten zu können. Unter den Additiven befinden sich eine Vielzahl von Substanzen wie Initiatoren, Koinitiatoren, Inhibitoren und Photostabilisatoren (Peutzfeldt, 1997).

Hauptbestandteile der organischen Matrix sind die Basismonomere Bisphenol-A-Diglycidylmethacrylat (Bis-GMA) und Urethandimethacrylat (UDMA) (Abb.1) (Bowen, 1963). Das bifunktionelle TEGDMA ist in Kompositen mit einem Anteil von 15-25% an der organischen Matrix vertreten (Stanislawski *et al.*, 2003). Dieses Monomer ist ein kleineres Molekül als Bis-GMA, reduziert die Viskosität, erhöht den Polymerisationsgrad und schafft Quervernetzungen in Kompositen (Peutzfeldt, 1997). Deshalb wird TEGDMA in höheren Mengen dünn fließenden Kompositen, wie Fissurenversieglern, Kompositzementen und Adhäsivsystemen zugesetzt, die eine gute Benetzbarkeit der Zahnhartsubstanz erreichen müssen.

Die Füllkörper, die anorganische Komponente der Komposite, wie Bariumglas und Siliziumdioxid, die meist mit mehr als 50% Gewichtsprozent in einem Kunststoff enthalten sind, verbessern die mechanischen Eigenschaften wie Abrasions- und Standfestigkeit und verringern innere Spannungen sowie die Polymerisations-schrumpfung (Munksgaard *et al.*, 1987; Silikas *et al.*, 2000). Ein fester Verbund

zwischen Matrix und Füllkörpern wird durch die kovalente Bindung über trifunktionale Alkoxysilane, meistens 3-Methacryloxypropyl-trimethoxysilan (MPS) hergestellt. An die Füllkörper binden diese Silane über Si-O-Gruppen, wogegen die Bindung an das Polymernetz über Methacrylatgruppen geschieht (Peutzfeldt, 1997; Lim *et al.*, 2002). Initiatoren, Inhibitoren (butyliertes Hydroxytoluol) und Katalysatoren steuern die Polymerisation der Monomere der organischen Matrix (Ferracane, 1995; Atsumi *et al.*, 2001). Die Polymerisation der Komposite wird meistens mit sichtbarem Licht initiiert. Dabei bildet das Initiator-molekül Campherchinon bei Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 470 nm Radikale, die über eine radikalische Kettenreaktion die Polymerisation der Monomere der organischen Matrix auslösen (Atsumi *et al.*, 2001). Ist, wie bei Kompositzementen, eine Lichthärtung nur begrenzt möglich, werden dualhärtende Systeme verwendet. Hierbei werden neben Campherchinon auch Katalysatorsysteme zur Initiation der Polymerisation eingesetzt. Ein klassisches System besteht aus den Redoxpartnern Benzoylperoxid und dem tertiären Amin N,N-Dimethyl-p-Toluidin (DMT) (Dneboský *et al.*, 1975).

Interessant ist, dass im Laufe der Jahre die Polymerisationsschrumpfung, die im Durchschnitt bei circa 2-3 Volumenprozent liegt, zwar teilweise reduziert werden konnte, aber weiterhin ein Nachteil bei der klinischen Verwendung von Kompositmaterialien bleibt. Der bei der Aushärtung auftretende Schrumpf führt zu Spannungen, die die Integrität des Verbundes von Zahn zu Komposit gefährden. Bei Unterbrechung des Verbundes entstehen Randspalten, in die leicht Bakterien diffundieren können und somit Sekundärkaries verursachen, welche eine der häufigsten Ursachen der Erneuerung zahnärztlicher Restaurationen darstellt (Dauvillier *et al.*, 2000; Forss und Widström, 2004). Bisher bestand die Hauptstrategie zur Reduzierung der Polymerisationsschrumpfung darin, den Füllergehalt zu erhöhen (Oberholzer *et al.*, 2004). Doch nach wie vor bleibt der Schrumpf eine intrinsische Eigenschaft der radikalischen Polymerisation der Methacrylate.

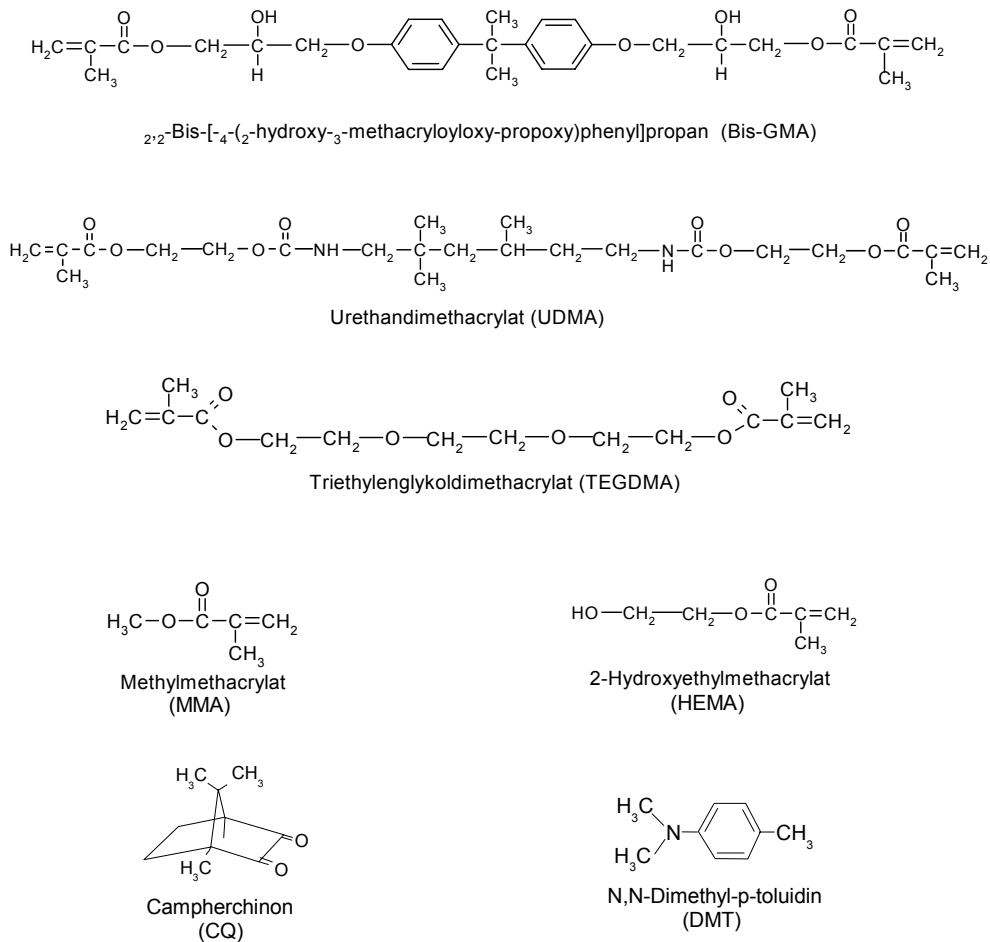


Abb. 1: Bestandteile der organischen Matrix von Kompositen auf Methacrylatbasis

1.1.2 Silorane

In einem neuen Ansatz wurde versucht, den Nachteil der Komposite auf Methacrylatbasis in der klinischen Anwendung zu beseitigen, etwa durch die Verwendung ringöffnender Moleküle in der organischen Matrix von Kompositen. Substanzen wie Spiroorthocarbonate und Epoxide (Oxirane) erschienen unter chemischen Aspekten für dieses Vorhaben geeignet (Eick *et al.*, 2002; Kostoryz *et al.*, 2000). Jedoch leidet die Biokompatibilität dieser Werkstoffe unter der meist hohen Reaktivität der Epoxide (Ehrenberg und Hussain, 1981). Erst ein weiterer Ansatz, die chemische Verbindung reaktiver Epoxide mit biokompatiblen Siloxanen, führte zur Einführung von Siloranen als Basis für neue Kompositwerkstoffe mit reduziertem Polymerisationsschrumpfung (Guggenberger und Weinmann, 2000). Silorane verbinden nun die vorteilhaften Eigenschaften von Epoxiden, wie beispielsweise die hohe Reaktivität und geringe Schrumpfung, und Siloxanen mit

einer hohen Hydrophobizität und guter Biokompatibilität für die Entwicklung eines neuen zahnärztlichen Füllungswerkstoffes (Weinmann *et al.*, 2005) (Abb. 2).

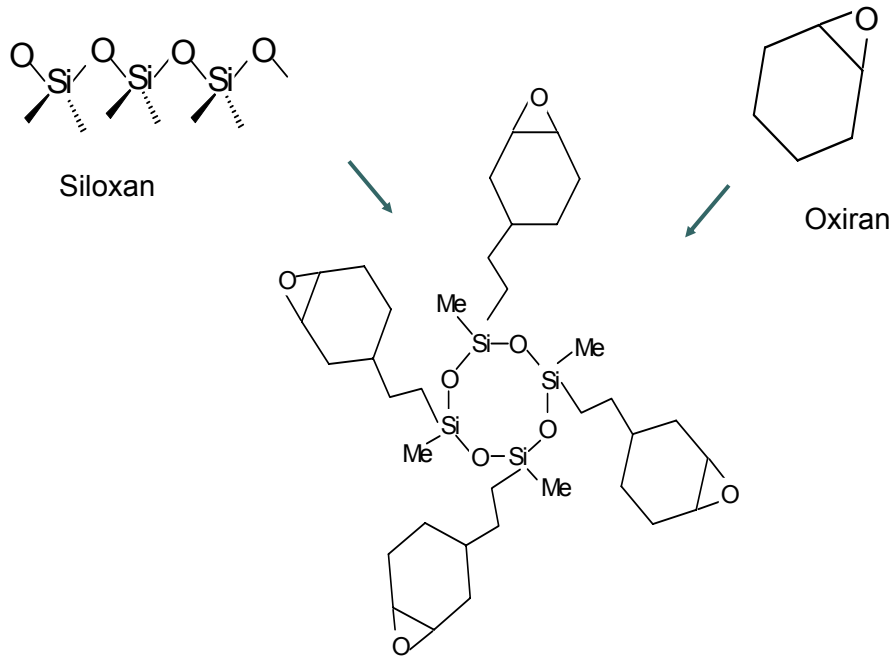


Abb. 2: Aufbau eines Silorans (Bild entnommen und modifiziert aus Weinmann *et al.*, 2005)

Verglichen mit den Kompositen auf Methacrylatbasis haben Komposite auf Basis der Oxirane einige werkstoffkundliche Vorteile wie eine geringere Polymerisations-schrumpfung und eine hohe Hydrophobizität (Guggenberger und Weinmann, 2000). Ein Silorankomposit besteht aus einer organischen Matrix, anorganischen Füllern und einem Haftsilan, bei dem eine Seite so modifiziert ist, dass sie an die Epoxidgruppe der Silorane binden kann. Das Polymer entsteht bei den Siloranen durch eine kationische Ringöffnungs-Polymerisation, im Gegensatz zu der radikalischen Polymerisation der Methacrylate (Weinmann *et al.*, 2005). Das Initiatorsystem besteht bei den Siloranen aus drei Komponenten, Campherchinon, Iodonium-Salz und einem Elektronendonator. Die anorganische Phase beinhaltet wie auch bei den Methacrylaten Mikrofüller aus Quarzpartikeln mit einer durchschnittlichen Größe von 0,5 μm . Durch die verminderte Polymerisations-schrumpfung und den Einsatz vom Mikrofüllern war es nun möglich einen Kunststoff herzustellen, der eine durchschnittliche Schrumpfung von weniger als 1% aufwies (Weinmann *et al.*, 2005).

In der Entwicklungsphase der neuen Werkstoffklasse Silorane wurden verschiedenste Oxirane auf ihre Biokompatibilität getestet, wie auch der Epoxyester (*Epoxy-cyclohexyl-methyl-epoxy-cyclo-hexan-carboxylat* oder K126) (Schweikl *et al.*, 2002). Der Epoxyester ist eine Esterverbindung mit zwei Epoxidringen (Abb. 3) und besitzt somit dieselben reaktiven Gruppen wie die Silorane (Abb. 2). Dieses Molekül wurde in der vorliegenden Arbeit aufgrund der höheren Reaktivität, als Modellsubstanz zur Analyse der Wirkungsweise von Epoxiden oder Siloranen in Säugetierzellen verwendet.

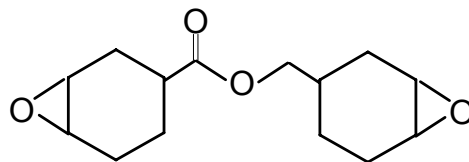


Abb. 3: Die Strukturformel des Epoxyesters (*Epoxy-cyclohexyl-methyl-epoxy-cyclo-hexan-carboxylat* oder K126)

1.1.3 Freisetzung von Kompositbestandteilen

Funktionelle Kompositwerkstoffe entstehen erst nach der vollständigen Polymerisation, die entweder chemisch oder durch Belichtung gestartet wird. Jedoch verbleibt ein Rest nicht vollständig polymerisierter Monomere in dem klinisch verwendeten Komposit. Abhängig vom Lösungsmittel wurden experimentell mehr als dreißig verschiedene Komponenten in Extrakten polymerisierter Komposite auf Methacrylatbasis nachgewiesen (Lygre *et al.*, 1999; Pelka *et al.*, 1999; Michelsen *et al.*, 2003).

In der Mundhöhle können starke Temperaturschwankungen, mechanische und chemische Einflüsse (Säure in Lebensmitteln und Genussmitteln), die Extraktion von Restmonomeren und die Biodegradation dentaler Komposite begünstigen (Göpferich, 1996; Santerre *et al.*, 2001; Finer und Santerre, 2004). Gerade das Herauslösen von Bestandteilen hat einen großen Einfluss auf die Stabilität, aber auch auf die Biokompatibilität der Komposits. Die Einwirkung von Esterasen auf Komposite zeigte zusätzlich eine Reduktion der Härte und eine Zunahme von

Abnutzungserscheinungen (Freund und Munksgaard, 1990; Munksgaard, 2005). Die im Speichel enthaltenen Esterasen, wie die von inflammatorischen Zellen abstammende Cholesterinesterase und Pseudocholinesterase können synergistisch die Degradation fördern (Finer und Santerre, 2004; Khalichi *et al.*, 2004). So wurde berichtet, dass TEGDMA und seine Derivate von der Pseudocholinesterase degradiert werden können. Die Esterasen werden nicht nur von körpereigenen Geweben (Speicheldrüsen) oder Leukozyten und Makrophagen gebildet, sondern auch von oralen Mikroorganismen wie *Porphyromonas gingivalis* freigesetzt (Santerre *et al.*, 2001; Finer und Santerre, 2004).

Bekannt ist aus früheren Untersuchungen, dass Kompositbestandteile durch Enzym induzierte Biodegradation im Speichel aufzufinden sind und somit Kontakt mit der Mundschleimhaut aufnehmen können (Santerre *et al.*, 1999; Jaffer *et al.*, 2002). Genauso kann nach Diffusion über Dentinkanälchen die Zahnpulpa von Monomeren zahnärztlicher Komposite oder Adhäsive erreicht werden. Die Diffusion von Monomeren über die Kanälchen des Dentins in die Pulpa wird durch mehrere Parameter bestimmt. Dazu gehören vor allem die Stärke der Dentinschicht sowie die Permeabilitäts-Eigenschaften des Dentins (Gerzina und Hume, 1996). Insbesondere die Stärke des Dentins zwischen einer präparierten Kavität und dem restaurativen Werkstoff sowie der Zahnpulpa, bestimmt den schützenden Effekt des Dentins vor toxischen Substanzen (Mjör und Ferrari, 2002; Pashley *et al.*, 2002a; Pashley *et al.*, 2002b).

Für TEGDMA wurden lokale Konzentrationen bis zu 4 mmol/l nach der Diffusion über Dentin mit einer Dicke von unter 0,5 mm errechnet (Hanks *et al.*, 1994; Noda *et al.*, 2002). Die Gefahr einer direkten akuten toxischen Schädigung von Pulpagewebe durch Monomere vor allem in Gegenwart einer dicken Dentinschicht (größer als 1mm) erschien als gering (Hume und Gerzina, 1996; Lee *et al.*, 2005). Jedoch sollte man bedenken, dass die Konzentrationen von TEGDMA und anderen Monomeren, die möglicherweise Pulpagewebe erreichen können, die unten beschriebenen biologischen Effekte *in vitro* induzierten.

Die Verstoffwechslung von aus Kompositen in geringen Mengen in den Organismus freigegebenen Bestandteilen ist noch nicht vollständig geklärt. Aus *in vivo* Versuchen ist bekannt, dass der erste Schritt der Degradation von TEGDMA die Spaltung einer oder beider Esterbindungen durch die Cholesterinesterase mit dem Ergebnis eines Methacrylats (MA) ist (Santerre *et al.*, 1999; Yourtee *et al.*, 2001b). Diskutiert werden

momentan zwei verschiedene Stoffwechselwege für von MA. Einmal ist der Abbau von MA – analog zu Valin und Malat – via Krebszyklus zu CO₂ (Crout *et al.*, 1982) beschrieben, welcher über radioaktiv markiertes TEGDMA auch nachgewiesen wurde (Reichl *et al.*, 2002). Oder aber durch die Oxidation des Enzyms Cytochrom P450 wird ein Epoxidmetabolit, 2,3-Epoxymethacrylat, gebildet, welches ebenso detektiert werden konnte (Seiss *et al.*, 2007). Da beide Stoffwechselwege in unterschiedlichen Zellkompartimenten ablaufen, können beide Wege auch gleichzeitig stattfinden und schließen sich somit nicht gegenseitig aus. Über die Freisetzung aus Komposite und die Biodegradation von Siloranen ist bis zum heutigen Zeitpunkt nichts in der verfügbaren Literatur bekannt beziehungsweise erforscht worden.

1.1.4 Biokompatibilität

Der Begriff Biokompatibilität beschreibt den Grad der Gewebeverträglichkeit eines in den Körper eingesetzten oder mit seiner Oberfläche in Kontakt kommenden Werkstoffes oder Medizinproduktes. Die zahnärztlichen Füllungswerkstoffe, etwa die Komposite, zählen zu den Medizinprodukten und müssen, um therapeutisch Anwendung finden zu können, biologisch verträglich sein (Arenholt-Bindslev und Schmalz, 2005). Um die Eignung eines Materials für dessen Einsatz in einem biologischen System zu untersuchen, sind umfangreiche und aufeinander aufbauende Testreihen erforderlich. Die In-vitro-Prüfmethoden auf Zytotoxizität und Genotoxizität werden in der ISO 10993-3 (ISO 10993-3:2003) zusammengefasst. In einem weiteren Schritt können *in vivo* Versuche und klinische Versuchsreihen folgen (Arenholt-Bindslev und Schmalz, 2005).

1.1.5 Genotoxizität von TEGDMA und einem Epoxyester

Genotoxische Effekte in Säugetierzellen werden durch endogene Reize (z.B. Wachstumsfaktoren und reaktive Sauerstoffspezies (ROS)) oder exogene Agenzien (Chemikalien, Chemotherapeutika, alkylierende Substanzen, ionisierende Strahlen und ultraviolettes Licht) ausgelöst (Kaina, 2003; Schweikl *et al.*, 2006). Bekannt ist, dass das bifunktionelle Comonomer TEGDMA genotoxische Effekte in

Säugetierzellen zeigt. So stieg die Häufigkeit von Genmutationen um mehr als das zehnfache (Schweikl *et al.*, 1998). TEGDMA induzierte außerdem einen dosisabhängigen Anstieg der Zahl an Mikrokernen (ein Hinweis auf Chromosomenaberrationen) (Schweikl *et al.*, 2001). Zudem zeigte TEGDMA im Comet-Assay zum Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen seine Wirkung (Kleinsasser *et al.*, 2004; Kleinsasser *et al.*, 2006). TEGDMA bewirkte ein charakteristisches Mutationsspektrum in Säugetierzellen. Die meisten TEGDMA-induzierten und mutierten V79B-Zellen wiesen große Deletionen von Exonsequenzen des HPRT-Gens, der Selektionsmarker zur Isolierung von Mutanten, auf. Ähnlich wie physikalische Strahlung und chemische Agenzien verursacht TEGDMA einen Zellzyklusarrest (Schweikl *et al.*, 2006). Zusätzlich wurden nach langer Expositionszeit auch eine erhöhte Menge an 8-Hydroxydesoxyguanin (8-OxoG) (Kapitel 1.2.2) gemessen, das Hauptaddukt oxidativer DNA-Schäden (Fortini *et al.*, 2003; Eckhardt *et al.*, 2009).

Epoxide wie der Epoxyester K126 können mit nukleophilen Zentren von Makromolekülen reagieren und gelten daher auch als DNA-alkylierende Substanzen. Tests zur Mutagenität zeigten, dass der Epoxyester K126 sowohl Punktmutationen (Ames-Test), als auch chromosomale Aberrationen (Mikrokern-Test) verursachte (Schweikl *et al.*, 2002). Interessant ist, dass ohne den Zusatz einer metabolisch aktiven S9-Leberfraktion im Ames-Test kaum ein mutagener Effekt nachgewiesen werden konnte (Yourtee *et al.*, 2001a). Hingegen wurde in Anwesenheit von S9 eine eindeutige Mutagenität in *Salmonella thyphimurium* dargestellt (Schweikl *et al.*, 2002). In diesem Fall hat S9 möglicherweise Esterasen beinhaltet, wodurch die Esterbindungen im K126 gespalten wurden und zwei reaktive monofunktionelle Metaboliten entstanden sind, die Punktmutationen erzeugen. Bei den Mikrokerntests wirkt vermutlich vor allem das ungespaltene bifunktionelle Molekül, das keine Punktmutationen, wohl aber Chromosomenaberrationen induziert (siehe Abb. 4). Die Metabolite des Epoxyesters K126 wurden inzwischen experimentell nachgewiesen (Yourtee *et al.*, 2001).

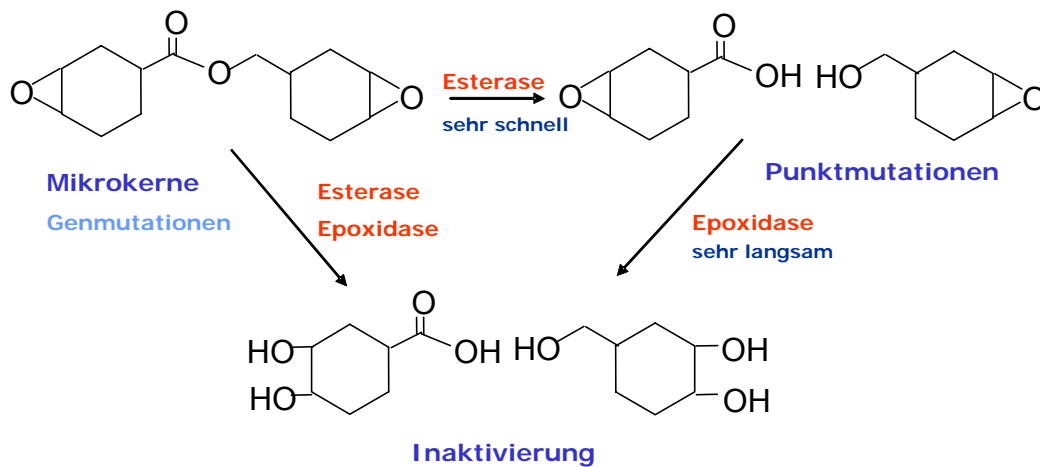


Abb.4: Enzymatische Aktivierung des Epoxyesters K126 durch Esterasen und Inaktivierung durch Epoxidasen

1.2 Oxidativer Stress

1.2.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Oxidativer Stress bedeutet eine Störung des zellulären Redoxzustandes durch eine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und wird als Ursache für Apoptose sowie für pathologische Prozesse wie Altern, Entzündung, Karzinogenese, Neurodegeneration und Arthritis angesehen (Chandra *et al.*, 2000; Zecca *et al.*, 2004; Brüne und Wu, 2005; Bubici *et al.*, 2006).

ROS sind molekulare Sauerstoffderivate mit den typischen Eigenschaften, der sehr hohen Reaktionsfreudigkeit und Kurzlebigkeit. Beispiele für ROS sind das Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxylradikal ($OH\cdot$) so wie das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$). Sie entstehen in Zellen entweder endogen oder als Folge der Wirkung exogener physikalischer und chemischer Noxen wie Chemikalien, Chemotherapeutika, alkylierende Karzinogene, ionisierende Strahlen oder ultraviolettem Licht (UV-Licht) (Kaina, 2003). Eine geringe Menge an endogenen ROS wird physiologisch während des normalen Zellmetabolismus beispielsweise in den Mitochondrien in der Atmungskette erzeugt und wird durch das antioxidative

System der Zelle reguliert (vgl. Kapitel 1.2.3.). Geringe Mengen an ROS haben auch wichtige Funktionen im Zellmetabolismus, wie der Signaltransduktion und Steuerung der Genexpression durch die Redoxbalance der Zelle (Dröge, 2002).

1.2.2 8-Hydroxydesoxyguanin als Hauptprodukt oxidativer DNA-Schäden

Oxidative DNA-Modifikationen sind die Produkte der Reaktionen reaktiver Sauerstoffspezies mit Bausteinen der DNA. ROS können Basen oxidieren und in der Folge entstehen DNA-Schäden wie Einzel- oder Doppelstrangbrüche, DNA-Quervernetzungen oder DNA-Protein-Quervernetzungen. (Epe und Hegler, 1994; Wallace, 2002; Halliwell und Aruoma, 1991). Das häufigste Produkt oxidativer DNA-Schäden ist das 8-Hydroxydesoxyguanin (8-OxoG) und entsteht durch den Angriff von Hydroxylradikalen an Position 8 des Guanins (Fortini *et al.*, 2003). Wegen des niedrigen Oxidationspotentials des Guanins verglichen mit den anderen Basen, ist 8-OxoG in vielen Fällen die dominierende oxidative Basenmodifikation (Cooke *et al.*, 2003).

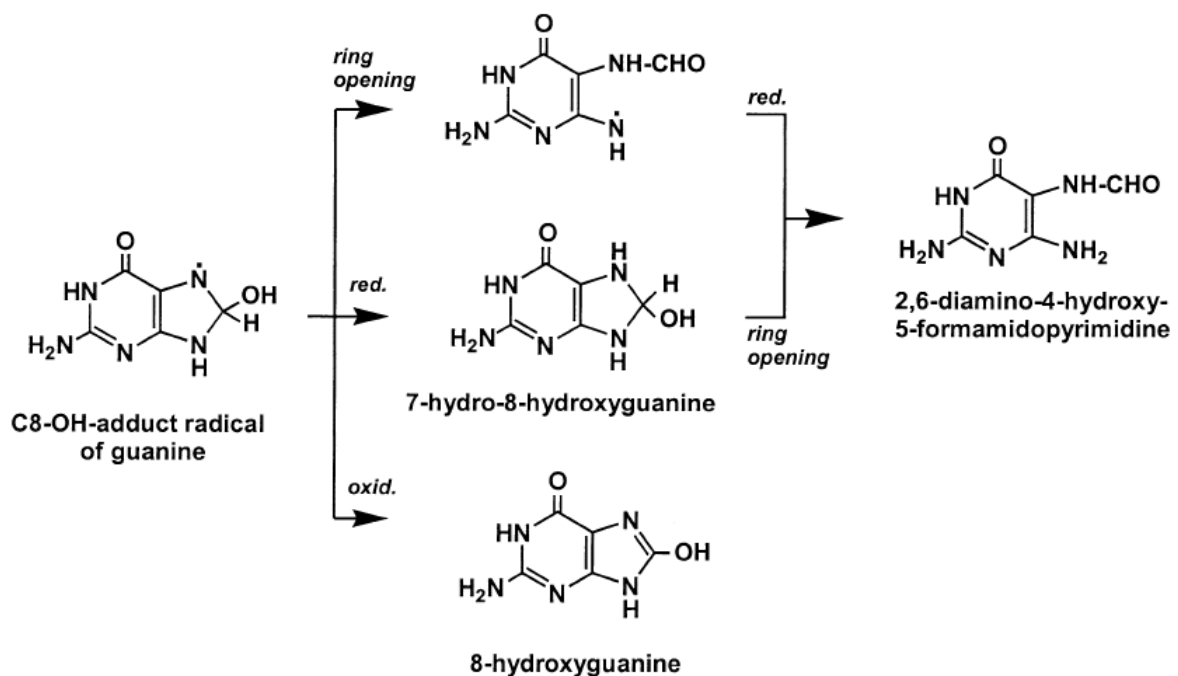


Abb. 5: Mechanismen der Bildung von Guaninaddukten die aus dem C8-OH-Radikal, welches seinerseits aus dem Angriff von Hydroxylionen an der C8-Position gebildet wird (entnommen aus Dizdaroglu *et al.*, 2002)

Bei der enzymatischen Reparatur dieser DNA-Defekte sind verschiedene Mechanismen möglich. Einerseits kann die oxidierte Base nach einem Basenexzisionsvorgang ersetzt werden (Barzilai und Yamamoto, 2004) oder aber Reparaturenzyme wie Glykosylasen können die Oxidation der DNA rückgängig machen (Malins *et al.*, 2002b). Allerdings können bei der Reparatur oxidativ geschädigter DNA können auch DNA-Einzelstrangbrüche entstehen, die DNA-während der Replikation in Doppelstrangbrüche umgesetzt werden und zu DNA-Deletionen führen (Reliene *et al.*, 2004).

8-OxoG wirkt bei Belassen mutagen und kann schlussendlich zu einer Punktmutation führen. Aufgrund der Konformationsänderung bei der Oxidation von Guanin kann die Base nun auch eine Basenpaarung mit Adenin eingehen, und es erfolgt während der DNA-Replikation eine G:C/A:T-Transversion (Cooke *et al.*, 2003).

Gerade 8-OxoG ist eine der am meisten untersuchten oxidativen Basenmodifikation und mittlerweile ein wichtiger Biomarker für oxidativen Stress (Chiou *et al.*, 2003; Dizdaroglu *et al.*, 2002; Proteggente *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005). Zur Bestimmung von DNA-Schäden sind die gaschromatografische oder aber flüssigchromatografische Massenspektroskopie, HPLC mit elektrochemischer Erkennung, immunologische Techniken oder die Bestimmung durch quantitative Polymerasekettenreaktion bekannte Methoden (Dizdaroglu *et al.*, 2002). Ein neueres Verfahren ist die Bestimmung von 8-OxoG im Durchflusszytometer über einen Anti-8-OxoG-Antikörper, an dem der Farbstoff FITC gebunden ist. Diese Methode wurde aus Gründen der Praktikabilität in dieser Arbeit verwendet (vgl. Kapitel 3.2.6.3).

1.2.3 N-Acetylcystein und andere Antioxidantien

Säugetierzellen haben ein sehr komplexes System entwickelt, das sie gegen oxidative Zellschäden schützt. Dazu gehören nicht-enzymatische Antioxidantien wie das Tripeptid Glutathion aber auch Enzymaktivitäten wie Thioredoxin, Superoxiddismutase (SOD), Glutathionperoxidase 1 (GPx), und Katalase (CAT) (Ames, 1983; Cerutti, 1985). Sobald die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies die zelluläre Kapazität der Entgiftung übersteigt, können zelluläre Makromoleküle wie Lipide, Proteine und DNA oxidativ geschädigt werden. Dies kann den Zelltod durch Apoptose oder Nekrose zur Folge haben (Behrend *et al.*, 2003; Boonstra und Post,

2004). Antioxidantien wie N-Acetylcystein (NAC), Ascorbat und vor allem Trolox (Vitamin E) schienen die Erzeugung von Zellschäden via ROS nach der Exposition von Zellen gegen Monomere wie TEGDMA und HEMA zu verhindern (Stanislawski *et al.*, 2003; Walther *et al.*, 2004). Auch die Verarmung des intrazellulären Glutathions in Zellen, die Extrakten dentaler Komposite exponiert waren, wurde durch NAC inhibiert (Soheili Majd *et al.*, 2003).

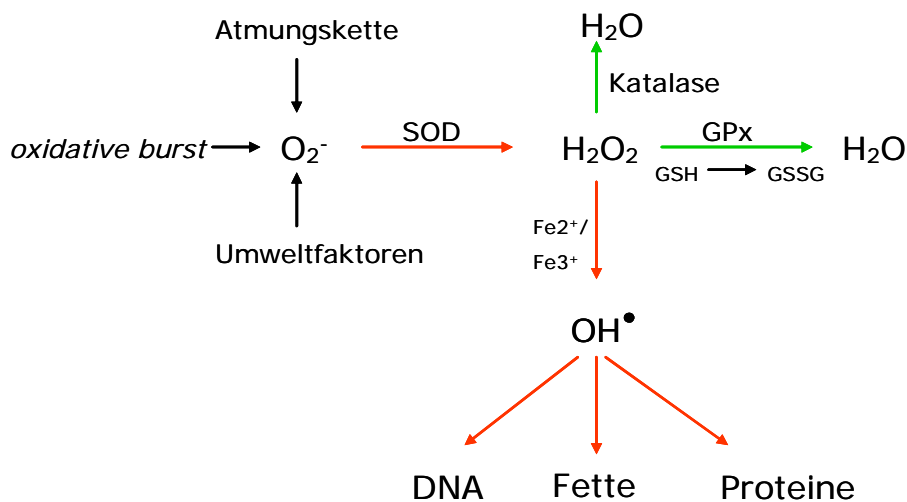


Abb. 6: Die Entstehung von ROS und ihre Zielmoleküle

NAC ist die acetylierte Form der schwefelhaltigen Aminosäure Cystein (Abb.7). Die Acetylgruppe erhöht die Reaktivität des Cysteins und verbessert die Aufnahme in die Zelle. Die Substanz ist eine Vorstufe des Glutathions, dem Hauptantioxidans der Zelle (Soheili Majd *et al.*, 2003).

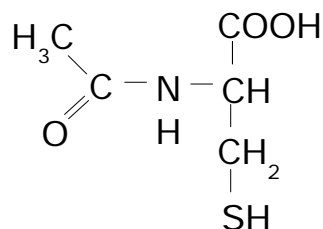


Abb. 7: Strukturformel des Antioxidans N-Acetylcystein, eine Vorstufe von Glutathion.

NAC wird auch therapeutisch verwendet. Bei parenteraler Gabe wird NAC besser absorbiert und metabolisiert als Cystein und Glutathion und ist daher wirkungsvoller (Stanislowski *et al.*, 2000; Zafarullah *et al.*, 2003). NAC ist zur Behandlung von Mukoviszidose, Bronchitis und anderen Erkrankungen, die mit Verschleimung der Atemwege und des Gastrointestinaltraktes einhergehen, geeignet (Ardite *et al.*, 2000; Reichenberger und Tamm, 2002; Rochat *et al.*, 2004). Bekannt ist, dass NAC auch als Antidot bei Überdosis von Xenobiotika wie Paracetamol oder chlorierten Kohlenwasserstoffen und bei Alkoholismus zum Schutz der Leber eingesetzt wird (Zafarullah *et al.*, 2003).

Die Wirkung von NAC wird zurzeit auf verschiedenen Ebenen der Zellbiochemie vermutet. Modifizierungen von Lipiden, Proteinen wie Enzyme, DNA und des Redox-Status der Zelle durch NAC sind denkbar. Auch direkte Interaktionen mit toxischen Substanzen werden diskutiert (Zafarullah *et al.*, 2003). Für HEMA wurde kürzlich ein Addukt mit NAC nachgewiesen (Nocca *et al.*, 2010).

NAC interagiert nun auf verschiedene Weise im zellulären ROS-Haushalt. Es dient als eine Quelle von Sulfhydryl-Gruppen in Zellen und fungiert so als ein Sauerstoffradikalfänger (Zafarullah *et al.*, 2003).

Verschiedene Studien belegen, dass in Anwesenheit von NAC die Menge des durch oxidativen Stress entstandenen 8-OxoG um die Hälfte reduziert sein kann (Yusof *et al.*, 1999; de Flora *et al.*, 2001; Malins *et al.*, 2002a). Die Tatsache, dass in Mäusen mit defekten Zellzykluskontrollpunkten nach NAC-Supplementation der Pegel von 8-OxoG und die Häufigkeit von DNA-Deletionen dramatisch reduziert waren verstärkt diese These (Reliene *et al.*, 2004; Malins *et al.*, 2002a).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Dimethylsulfoxid (DMSO) (20684), CAS 67-68-5	Pierce, Rockford
EDTA-Natrium-Salz (11280) Titriplex III	Serva, Heidelberg
Ethanol (8006)	J.T. Baker, Deventer
foetal bovine serum (FBS) (10108-165)	Gibco (Invitrogen Inc.), Eggenstein
3,4-Epoxycyclohexylmethyl-3,4- Epoxycyclohexancarboxylat (K126) CAS 2386-87-0	Sigma-Aldrich Co., Steinheim
Kaliumchlorid (4933)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (4873)	Merck, Darmstadt
minimum essential medium (MEM) (M-0643)	Sigma, Deisenhofen
Methanol (UN1230)	Merck, Darmstadt
N-Acetylcystein (NAC) (A9125-25G), CAS 616-91-1	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid (6404)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (6406)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat (6586)	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin (15140-122)	Gibco (Invitrogen Inc.), Eggenstein
Paraformaldehyd (4005)	Merck, Darmstadt
Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) (109-16-0)	Sigma-Aldrich Co., Steinheim
Trypsin 2,5% (15090)	Gibco (Invitrogen Inc.), Eggenstein

2.1.2 Oxy-DNA Kit

Waschkonzentrat	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
-----------------	--

FITC-Konjugat	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
Blocking-Lösung-Konzentrat	BD Biosciences Clontech, Heidelberg

2.1.3 Verbrauchsmaterial und Geräte

Verbrauchsmaterial:

bio-one Cellstar tube 15ml (212-09)	Greiner, Frickenhausen
Falcon Tubes 50 ml (2070)	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
FACS-Röhrchen (352052)	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
bio-one Cellstar 145/20 mm Art.Nr.639160	Greiner, Frickenhausen
Kulturflaschen T162 (162 cm ²) (3151)	Corning Incorporation, Corning
BD 10ml Spritze Luer-Lok TM (2011-03)	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
Spritzenvasalzfilter Minisart 0,2 µm (16534)	Sartorius, Göttingen

Geräte:

Inkubatorschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Durchflusszytometer FACSCalibur TM IC-Nr 32242, Serien-Nr VO 150	BD Biosciences, Irland
Hämozytometer optik labor (0,1 mm Tiefe) 0,0025 mm ²	Braun, Melsungen
Milli-QUF plus	Millipore U.S.A.
Mikroskop Diavert Ser.Nr. 896460	Leitz, Wetzlar
Sartorius Analysenwaage ML 210P	Sartorius, Göttingen
Sartorius Waage 1404 MP 8; No.3310033	Sartorius, Göttingen

Sterile Werkbank Laminar Flow Gelaire, BSB4	Flow Laboratories, Merckenheim
Zentrifuge Eppendorf 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Rotana 460 R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Rotixa/P Typ 4202 Nr.2181	Hettich, Tuttlingen

2.1.4 Lösungen, Medien und Puffer für die Zellkultivierung

Alle Medien, Lösungen und Puffer wurden steril filtriert. Jedem Liter Medium wurden Antibiotika in Form von 10 ml Penicillin-Streptomycin-Stammlösung (100 U/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin) vor Gebrauch zugegeben. Alle Medien, Lösungen und Puffer wurden für die Kultivierung der Zellen vor Gebrauch stets vorgewärmt, ansonsten im Kühlschrank gelagert.

MINIMUM ESSENTIAL MEDIUM EAGLE (MEM) mit 5 % FBS

9,59 g MEM, 1000 mg Glucose/l
2,2 g NaHCO₃
50 ml FBS
add 1000 ml Aqua demin.(18 MOhm)

10 x PBS-EDTA (PHOSPHATGEPUFFERTE KOCHSALZLÖSUNG), pH: 7,34 :

80 g Natriumchlorid
2 g Kaliumchlorid
9,1 g Natriumhydrogenphosphat
2 g Kaliumdihydrogenphosphat
2 g EDTA-Natrium-Salz, Titriplex III (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈)x2H₂O
add 1000 ml Aqua demin. (18 MOhm)

1 x PBS-EDTA (PHOSPHATGEPUFFERTE KOCHSALZLÖSUNG):

100 ml 10 x PBS-EDTA
add 1000 ml Aqua demin. (18 MOhm)

10 x CMF-PBS (CALCIUM- UND MAGNESIUMFREIE, PHOSPHATGEPUFFERTE KOCHSALZLÖSUNG):

80 g Natriumchlorid
2 g Kaliumchlorid
9,1 g Natriumhydrogenphosphat
2 g Kaliumdihydrogenphosphat
add 1000 ml Aqua demin. (18 MOhm)

TRYPsin 0,25% in CMF-PBS:

100 ml Trypsin 2,5 %
100 ml 10 x CMF-PBS
add 1000 ml Aqua demin. (18 MOhm)

PFA-LÖSUNG 2% in CMF-PBS:

2 g Paraformaldehyd
10 ml 10 x CMF-PBS
add 100 ml Aqua demin. (18 MOhm)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden mit V79B-Zellen durchgeführt, die von einer Zelllinie transformierter Lungenfibroblasten eines männlichen Chinesischen Hamsters stammen (Bradley *et al.*, 1981). Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an Zellkulturbänken mit laminarer Strömung durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Medien und Flüssigkeiten vor Verwendung im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

2.2.1.1 Zellkultivierung der V79B-Zellen

Die adhärent wachsenden V79B-Zellen wurden als Monolayer in Minimum Essential Medium (MEM, 5% fötales Rinderserum) in T162-Flaschen in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂-Anteil bei 37°C im Inkubator kultiviert. Sobald ein subkonfluenten Monolayer gewachsen war, wurden die Zellen subkultiviert. Hierfür wurde das Medium entfernt und der Zellrasen zuerst mit 10 ml 1xPBS-EDTA gewaschen. Um die Zellen abzulösen, exponierte man sie dann mit 5 ml 0,25% Trypsin in CMF-PBS und inkubierte sie für 10 Minuten im Inkubator. Mit 15 ml Medium wurde dieser Vorgang gestoppt und die Zellen durch kräftiges Abspülen des Flaschengrundes in ein 50 ml Falcon Tube überführt. Nach einer Zentrifugation (5 min, 600 RPM) erfolgte die Zellzählung mit dem Hämozytometer, nachdem die Zellsuspension erneut in 50 ml Falcon Tube überführt und resuspendiert wurde. Die für die Aussaat bestimmte Zellmenge pro T162 Flasche betrug $0,25 \times 10^6$ Zellen, um nach 3-4 Tagen einen subkonfluenten Monolayer zu erreichen.

2.2.2 Herstellung der TEGDMA-, Epoxyester- und der N-Acetylcystein-Expositionslösung

Die Herstellung der TEGDMA-Expositionslösungen von 1 mM und 3 mM erfolgte direkt in einem 50 ml Falcon Tube, in dem bereits das benötigte Volumen Zellkulturmedium vorgelegt war. Die Lösungen wurden sofort nach der TEGDMA-Applikation auf dem Vortex gut gemischt. Bei dem Epoxyester hingegen wurde zuerst

eine 1M Stammlösung in einem sterilen Schnappdeckelglas hergestellt. Dafür wurden 295,5 mg abgewogen und in 909 µl DMSO gelöst. Die 1M Lösung wurden wiederum in einem 15 ml bio-one Tube mit Zellkulturmedium auf 10 mM verdünnt. Die Expositionslösungen wurden schlussendlich in einem 50 ml Falcon Tube daraus mit Zellkulturmedium hergestellt.

Die 250 mM N-Acetylcystein-Stammlösung wurde aus der Einwaage von 163,2 mg NAC auf 4 ml Medium hergestellt. NAC musste im Gegensatz zu TEGDMA nicht in DMSO gelöst werden, da es sehr gut wasserlöslich ist. NAC in Medium gelöst zeigte konzentrationsabhängig durch den gelben Farbumschlag des im Medium enthaltenen Phenolrots eine visuell deutlich erkennbare Erniedrigung des pH-Werts. Der pH-Wert sank in der 10 mmol/L NAC-Lösung von 7,41 mit Medium auf 6,61. Um eine mögliche Beeinflussung des Ergebnisses durch einen niedrigen PH-Wert zu vermeiden, wurde jeweils eine 10 mM/l NAC-Lösung in T162-Gewebekulturflaschen für eine Stunde im Inkubator bis zur Farbangleichung inkubiert. Da alle Proben gleich behandelt werden mussten, wurde auch das Medium für die Vorinkubation der Versuchsreihe ohne NAC auf die gleiche Weise vorbereitet. Im nächsten Schritt wurden dann die Zellen mit pH-adaptierter NAC-Lösung für eine Stunde vorinkubiert. Dadurch wurde sichergestellt, dass TEGDMA oder K126 NAC gesättigten Zellen exponiert wurde. Nach dieser Vorinkubation wurde das Medium mit der NAC-Lösung entfernt und durch die Expositionslösungen, die ebenfalls einen pH-Angleich von einer Stunden durchliefen, ersetzt.

2.2.3 Ablauf, Zeitplan und Versuchsdesign des Oxy-DNA Tests

Die Bildung von 8-Hydroxydesoxyguanin (8-OxoG) wurde mit einem Oxy-DNA-Kit (Biotrin Ltd, Dublin, Irland) bestimmt. Zum Nachweis der Bildung von 8-OxoG durch den Epoxyester K126 wurden die Zellen jeweils 2, 24 und 48 Stunden mit Konzentrationen von je 0,03 – 0,1 – 0,3 – 1 und 3mM stimuliert. Für jede Inkubationszeit wurde dieselbe Konzentrationsreihe des Epoxyesters auch in Anwesenheit von 10 mM NAC geprüft.

Aus der laufenden Routinekultur wurden auf 145 mm-Gewebekulturschalen jeweils $0,25 \times 10^6$ Zellen in 10 ml Medium (5% FBS) pipettiert. Nach der Aussaat folgte eine Anwachsphase von 24 Stunden im Inkubator. Nach visueller Kontrolle auf gleichmäßige Zelldichte wurden die Zellen eine Stunde mit der entsprechenden NAC-

MEM-Lösung, welche zuvor einen pH-Angleich von einer Stunde durchlaufen hatte, vorinkubiert (vgl. Kapitel 3.2.1.2). Nach Vorinkubation wurden diese Lösungen gegen die pH-adaptierten Expositionslösungen ausgetauscht.

Als Negativkontrolle dienten eine Probe mit Medium, eine zweite mit Medium und NAC und eine dritte mit Medium und DMSO. Zusätzlich wurden zwei TEGDMA-Konzentrationen, 1 und 3 mM, mit in die Versuchsreihe genommen. Jede TEGDMA-Konzentration wurde wiederum in Anwesenheit von 10 mM/I NAC getestet.

2.2.4 Fixierung der Zellkulturen

Nach definierter Expositionszeit (2-24-48 Stunden) wurden die Zellen geerntet. Hierfür wurde die Zellen nach dem Entfernen des Mediums mit 5 ml 1xPBS-EDTA gewaschen. Um die Zellen abzulösen, wurde diesen 1 ml 0,25% Trypsin in CMF-PBS 10 min lang bei 37° inkubiert. Mit 5 ml Medium wurde danach der Vorgang gestoppt und alle Zellen einer Platte durch mehrmaliges Abspülen des Plattengrundes in ein 15 ml bio-one Tube überführt.

Nach der Zentrifugation (5 min, 600 RPM) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1ml Oxy-DNA-Waschpuffer resuspendiert. Danach wurde erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Fixiert wurden die Zellen mit 1 ml 2% PFA-Lösung für 15 min bei 37°C. Nach einer erneuten Zentrifugation und dem Verwerfen des Überstands erfolgt die Perforation der Zellen durch die Zugabe von 1 ml 90% Methanol. Dafür wurden die Proben für 30 min auf Eis gestellt.

2.2.5 Vorbereitung der Zellen zur Oxy-DNA Bestimmung

Die Proben wurden erneut zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml Oxy-DNA-Waschpuffer resuspendiert. Nach einem weiteren Waschvorgang erfolgte anschließend das so genannte Blocken. Hierfür wird jede Probe mit 50 µl Blocking-Lösung resuspendiert und für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach einem erneuten zweimaligen Waschvorgang mit dem Oxy-DNA-Waschpuffer, wurden die Zellen nun mit 10 µl FITC-Konjugat, welches FITC-markierte Antikörpern gegen 8-OxoG beinhaltet, gemischt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Analyse der Proben im FACSCalibur™ Durchflusszytometer wurden die

Proben noch zweimalig mit dem Oxy-DNA-Waschpuffer gewaschen und schließlich in einem FACS Tube mit 150 µl Oxy-DNA-Waschpuffer resuspendiert.

2.2.6 Durchflusszytometrie

Eine Definition von Durchflusszytometrie (auch als FACS bezeichnet für *fluorescence-activated cell sorting*) ist die Detektion, Messung und Analyse von Signalen, die von einzelnen Zellen (oder anderen Partikeln) erhalten werden, wenn sie in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Lichtstrahl treten. Diese Technologie erlaubt es gleichzeitig mehrere physikalische Parameter einer einzelnen Zelle in einer größeren Zellpopulation quantitativ zu bestimmen (Robinson, 1993).

2.2.6.1 Funktionsweise des Durchflusszytometers

Bei dem verwendeten Durchflusszytometer FACSCalibur™ werden die vereinzelt und gefärbten Zellen in einer Suspension vorgelegt, die durch Pressluft in eine Kapillare geleitet und mit der Probenflüssigkeit (isotonische Kochsalzlösung) vermengt wird. Da jede Zelle nur einzeln vermessen werden kann, muss zur Analyse auch jede Zelle einzeln in der Probenkammer an dem gebündelten Laserstrahl vorbeigeleitet werden. Dies geschieht über das von Van Dilla entdeckte Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung. In der Messzelle treffen sich zwei Flüssigkeitsströme, der Probenstrom und der aus entgastem Wasser bestehende Hüllstrom. Durch den höheren Druck des äußeren Hüllstroms wird der innere Probenstrom zu einem dünnen Faden ausgezogen, es entsteht eine laminare Strömung, mit der die Partikel zentriert und mit hoher Geschwindigkeit auf die Messstelle zugeführt werden. Auf diese Weise werden die Zellen, wie in einer Perlenkette aufgereiht, im rechten Winkel zum Laserstrahl durch die optimale Fokussierungsebene des Laserstrahls geführt. In der Regel kommen in der Durchflusszytometrie zwei Anregungsquellen zur Anwendung, nämlich die Quecksilber- oder die Xenon-Hochdrucklampe und ein Argonionen-Laser. Der beim hier verwendeten FACSCalibur™ durch einen luftgekühlten 15 mW Argonionen-Laser erzeugte monochromatische Laserstrahl der Wellenlänge 488 nm ermöglicht die gleichzeitige Analyse mit bis zu drei Fluoreszenzfarbstoffen. Der Strahl zeigt in

seinem Querschnitt eine Gauss'sche Energieverteilung mit dem Maximum in der Mitte. Durch Linsensysteme wird er in eine elliptische Form gebracht. Damit die Fluorochrome maximal angeregt und das gebeugte Licht (Streulicht) nur partikelabhängig ist, muss der Durchmesser größer als die Zelle sein. Die Zellen sollen durch die Mitte des Strahls fließen sowie vollständig und gleichmäßig beleuchtet werden (FACS and array core facility der Uni Mainz).

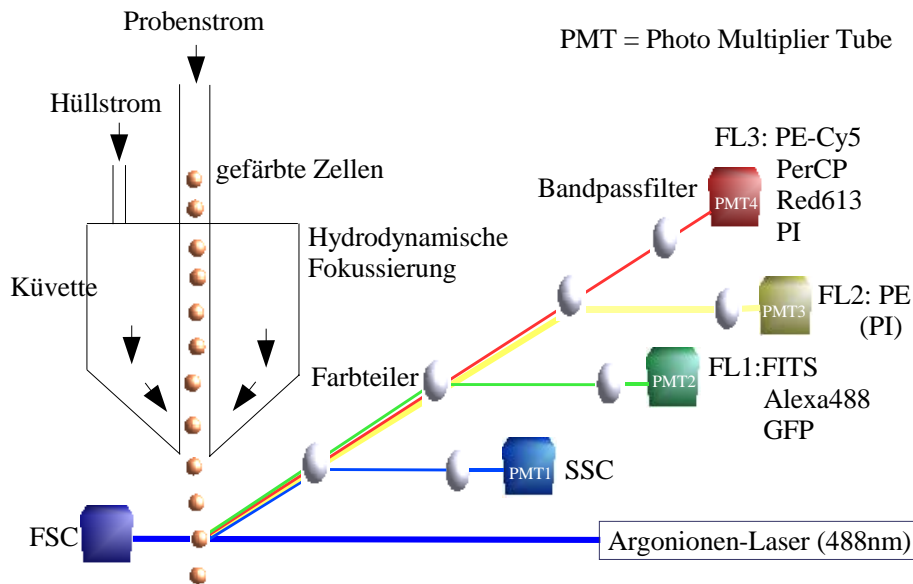


Abb. 8: Messaufbau eines Durchflusszytometers (entnommen aus FACS and array core facility der Uni Mainz)

Der Effekt der Fluoreszenz besteht darin, dass die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Darauf fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie, in Form von Photonen, auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die Wellenlänge des emittierten Lichts ist hierbei immer geringer als die Wellenlänge des absorbierten Lichts. Die Signalverarbeitung erfolgt über Photomultiplier, die über ein System aus optischen Linsen als Farbteiler, dichroitischen Spiegeln, Langpass- und Bandpassfilter das gestreute Licht und die Fluoreszenz erfassen. Es werden die Parameter Vorwärtstreulicht (FSC), Seitwärtstreulicht (SSC) und die drei Fluoreszenzen (FL1, FL2 und FL3) gemessen. Das FACSCalibur™ verarbeitet 1024 Kanäle. Die Messgeschwindigkeit hängt von der räumlichen Dichte der Zellen und von der Verarbeitungsgeschwindigkeit der Elektronik ab und kann unter Umständen

mit Zusatzausstattung auf 20.000 Partikel pro Sekunde und mehr gesteigert werden (Robinson, 1993; Genzlinger, 1999).

2.2.6.2 Auswertung der Lichtsignale

Die Zelle streut das Licht in verschiedene Richtungen. Abhängig von welchem Winkel des gemessenen Streulichts, erhält man unterschiedliche Informationen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) oder Engwinkelstreulicht (*forward light scatter* oder *low angle scatter*) ist der nicht abgelenkte Laserstrahl. Er hängt vor allem von der Größe und dem Brechungsindex der Zelle ab. Kleine Zellen verursachen ein kleines, große Zellen ein großes Vorwärtsstreulichtsignal. Somit kann mit dem Vorwärtsstreulicht, neben der Fluoreszenzintensität, die Vitalität der Zellen einer Probe ermittelt werden, da tote Zellen kleiner erscheinen. Im rechten Winkel zum Laserstrahl werden Seitwärtsstreulicht und Fluoreszenz gemessen: Das Seitwärtsstreulicht (SSC) oder 90°-Streulicht (*side scatter*, *orthogonal scatter* oder *right angle scatter*) hängt neben der Größe auch sehr stark vom Inhalt einer Zelle ab. Findet sich in einer Zelle eine hohe Granularität beispielsweise viele Lysosomen, dann hat sie ein hohes Seitwärtsstreulicht. Die Fluoreszenz-Höhe (FL-H) entspricht der Intensität des emittierten Lichts, welches nach Anregung durch den Laser freigesetzt wird. Bei Eintritt einer Zelle in den Laserstrahl nimmt die Fluoreszenz-Höhe zu und erreicht ein Maximum, wenn die Zelle sich komplett im Laserstrahl befindet. Beim Austritt der Zelle aus dem Laserstrahl fällt die Fluoreszenz auf das Grundniveau zurück. Die Fluoreszenz-Fläche (FL-A) berechnet sich aus der Integration des Signals über die Zeit. Infolgedessen erreicht diese Fluoreszenz, die der Gesamtmenge an emittiertem Licht entspricht, erst nach Durchtritt der Zelle durch den Laserstrahl sein Maximum (FACS and array core facility der Uni Mainz).

Bei der Auswertung der Signale besteht dann die Möglichkeit durch Festlegung von Grenzen oder Bereichen nur solche Zellen zur Darstellung kommen zu lassen, die beispielsweise als gesunde Zellpopulation eine definierte Größe und Granularität besitzen. Dieses „Filtern“ bezeichnet man auch als „Gating“. In der späteren Analyse werden diese beiden Parameter, Größe und Granularität, in einem zweidimensionalen Koordinatensystem (*dotplot*) miteinander korreliert, das heißt es wird jeweils dort ein Punkt eingezeichnet, an dem sich die Intensitätswerte von

Größe und Granularität einer Zelle schneiden. Abbildung 9 zeigt zwei Beispiele für *dotplots* in denen *FSC-A* und *SSC-A* für Zellen unbehandelter Kontrollen und exponierter Kulturen und exponierter Kulturen dargestellt sind (Genzlinger, 1999).

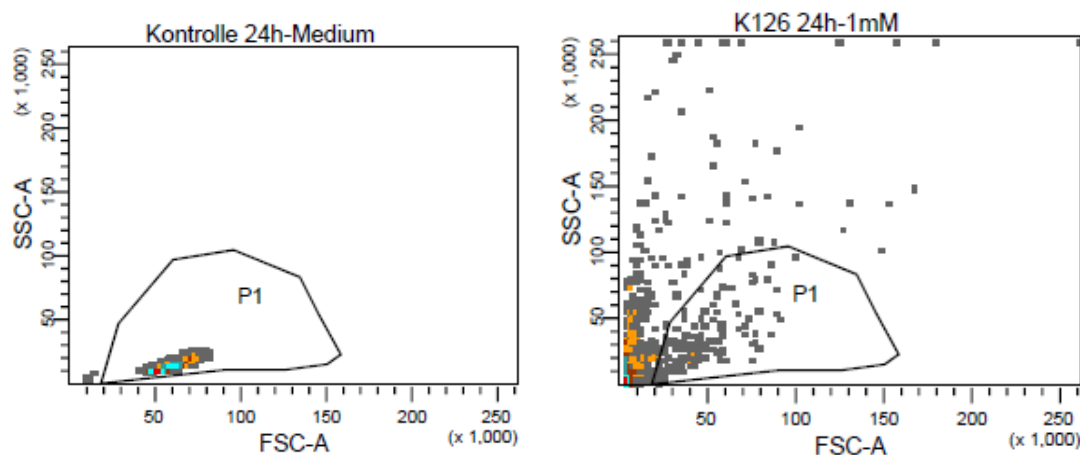


Abb. 9: Häufigkeitsdichteverteilungen (*density plots*) von V79B-Zellkulturen. Die Diagramme zeigen Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) und Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) zur Beschreibung der Zellmorphologie unbehandelter Kulturen und solcher nach Exposition gegen den Epoxyester K126. Zusätzlich zur Darstellung morphologischer Veränderungen der Zellen wurde eine Region festgelegt (Gating), innerhalb derer die Zahl der Zellen erfasst wurde.

Jede Zelle, die mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wird, zeigt auch ohne spezifische Fluoreszenzfärbung aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften eine gewisse Autofluoreszenz in allen Kanälen. Aus diesem Grund wird immer eine ungefärbte Probe als negative Kontrolle mitgeführt und der höchste Wert bestimmt, in den die Autofluoreszenz einer negativen Zelle fallen kann. Dieser Wert wird für alle folgenden Messungen beibehalten, so dass jede fluoreszenzgefärbte Zelle mit einem höheren Wert als positiv betrachtet werden kann (Robinson, 1993; Genzlinger, 1999).

2.2.6.3 Fluoreszenzfarbstoff

Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, da die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge angeregt werden, aber unterschiedliche charakteristische Emissionsspektren besitzen (siehe Tabelle 1).

Fluorochrome	Absorptionsmaxima [nm]	Emmissionsmaxima [nm]	Abkürzungen
APC-Cy7	743	767	PharRed
Fluoreszeinisothiozyanat	495	519	FITC
PE-Cy5	480; 565; 649	670	CyChrome, Red670
PerCP	490	675	Peridin Chlorophyll
Phycoerythrin	480; 565	578	PE
Propidiumjodid	536	617	PI
Red613	480; 565	613	PE-TexasRed

Tabelle 1: Fluoreszenzfarbstoffe in der Durchflusszytometrie

Die statische Fluoreszenzanalyse dieser Arbeit beruht auf einer einparametrischen DNA-Färbung mit Fluoreszeinisothiozyanat (FITC), dessen Absorptionsmaximum bei 490 nm und Emissionsmaximum bei 520 nm liegt. FITC ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der zur Gruppe der Xanthen Farbstoffe gehört. Es ist in dem hier verwendeten Oxy-DNA-Kit an einen monoklonalen Antikörper gebunden, der spezifisch 8-OxoG detektiert. Somit kann quantitativ die Bildung von 8-OxoG in jeder Zelle bestimmt werden (Persinger *et al.*, 2001).

2.2.6.4 Auswertung und Statistik

Die FITC-Fluoreszenz (FL-3) wurde in 20000 Ereignissen mit der FACSDiva™ Software erfasst und gespeichert und der jeweilige Mean-Wert der Probe errechnet und als Histogramm dargestellt. Zusätzlich zur Fluoreszenz wurden auch die Zellen, die im vorher bestimmten Gate zu liegen kommen, gemessen. Die Bildung von 8-Oxoguanin wurde in fünf unabhängigen Experimenten bestimmt. Durchschnittliche Fluoreszenzintensitäten in unbehandelten und behandelten Zellkulturen wurden auf Messungen ungefärbter Proben bezogen. Die Fluoreszenzintensitäten behandelte Zellkulturen wurden dann auf diejenigen unbehandelter Kontrollkulturen (100%) normiert.

Die Messergebnisse aus einzelnen Zellkulturen wurden zu Medianen mit 25- und 75-Perzentilen zusammengefasst. Unterschiede zwischen den Medianen der Kontrollkulturen und derjenigen TEGDMA-behandelter Kulturen wurden mit Hilfe des

Mann-Whitney U-Tests (SPSS 15.0) durch paarweises Vergleichen von Werten auf der 0,05 Signifikanzebene untersucht.

3 Fragestellung

Die organische Matrix klassischer zahnärztlicher Komposite besteht aus verschiedenen bifunktionellen Methacrylaten. Das sehr häufig verwendete Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) fungiert als Comonomer, das in Säugetierzellen genotoxisch wirkt. So verursacht TEGDMA Punktmutationen und Chromosomenaberrationen (Mikrokerne) *in vitro*. Diese mutagene Wirkung ist wahrscheinlich die Folge oxidativer DNA-Schäden aufgrund einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in TEGDMA-exponierten Zellkulturen. In Anwesenheit der Antioxidans N-Acetylcystein (NAC), sinkt die Menge an ROS in den mit TEGDMA behandelten Zellen und parallel dazu sind die Stärke oxidativer DNA-Schäden und mutagener Effekte reduziert.

Die organische Matrix einer neuen Generation von Kompositen enthält überwiegend Silorane. Diese Stoffklasse vereint die vorteilhafte Biokompatibilität von Siloxanen mit der für die Polymerisationsreaktion wünschenswerten Reaktivität von Epoxiden (Oxirane). Der bifunktionelle Epoxyester K126 fungiert in der vorliegenden Arbeit als Modellsubstanz für die Analyse des Mechanismus genotoxischer Effekte der funktionellen Epoxidgruppe der Silorane. Es ist bekannt, dass neben anderen Oxirane der Epoxyester K126 Punktmutationen und eine erhöhte Anzahl von Mikrokernen *in vitro* erzeugt. Anders als für TEGDMA beschrieben, gibt es jedoch für diese Substanzen keine weiteren Hinweise auf den Mechanismus der Schädigung. Möglich wäre es, dass der elektrophile Epoxidring mit nukleophilen Zentren der DNA reagiert und so direkt genotoxisch wirkt. Andererseits ist auch ein indirekter Mechanismus der Erzeugung genotoxischer Effekte über eine erhöhte Produktion von ROS nicht auszuschließen.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher folgende Fragen experimentell bearbeitet:

1. Erzeugt der Epoxyester K126 oxidativer DNA-Schäden in Form von 8-OxoG?
2. Wie beeinflusst die Anwesenheit des Antioxidans NAC die Bildung von 8-OxoG durch K126?
3. Wie unterscheiden sich K126 und TEGDMA in der Bildung von 8-OxoG?

4 Ergebnisse

4.1 Bildung von 8-OxoG in V79B-Fibroblasten

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kinetik der Bildung von 8-Hydroxydesoxyguanin (8-OxoG) in V79B-Zellen des Chinesischen Hamsters unter dem Einfluss des Epoxyesters K126 nach Expositionszeiten von 2, 24 und 48 Stunden analysiert. Die Wirkung dieses Epoxyesters wurde mit derjenigen des Dimethacrylats TEGDMA verglichen (Eckhardt *et al.*, 2009).

Die Zellen exponierter Kulturen wurden mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen 8-OxoG inkubiert und anschließend nach FACS-Analysen mit der FACSDiva™-Software dargestellt. Die resultierenden Histogramme zeigen auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität und auf der Ordinate die entsprechende Zahl der Zellen (Ereignisse). Die Fluoreszenzintensität einer Zellpopulation ist ein Maß für die Erzeugung von 8-OxoG. Die Unterschiede der Fluoreszenzintensitäten exponierter Zellpopulationen verglichen mit der Position von Histogrammen unbehandelter Kulturen zeigen, in welchem Maß 8-OxoG durch eine Testsubstanz erzeugt wurde. Die Wirkung der Testsubstanzen sowie das Messprinzip selbst werden im Folgenden zunächst beispielhaft vorgestellt. Danach wird die Reproduzierbarkeit dieser einzelnen Ergebnisse anhand der in Grafiken zusammengefassten Messwerte aus wiederholten Experimenten dargestellt.

In Vorversuchen wurde zunächst die Bildung von 8-OxoG in V79B-Zellen durch Wasserstoffperoxid, (H_2O_2), eine der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), nach kurzer Expositionszeit (2h) geprüft (Abb. 10). Wasserstoffperoxid induzierte über einen großen Konzentrationsbereich (0,0017–0,5%) eine Steigerung der Fluoreszenzintensitäten in behandelten Zellkulturen, und dies zeigte, daß eine entsprechende Menge an 8-OxoG gebildet wurde. So stieg beispielsweise die Menge an 8-OxoG in Kulturen, die 0,125% H_2O_2 exponiert waren etwa um den Faktor 14. Damit durfte man annehmen, dass die hier verwendete Methode der Detektion von 8-OxoG auch zuverlässig die Wirkung des Epoxyesters K126 sowie des Dimethacrylats TEGDMA anzeigen würde.

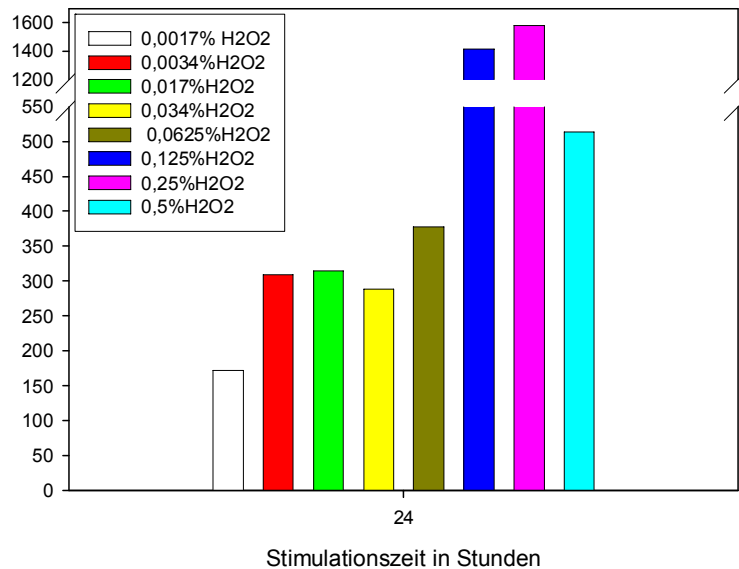


Abb. 10: Bildung von 8-OxoG in V79B-Zellen. Die Bildung von 8-OxoG ist als relative Fluoreszenzintensität nach FACS-Analysen beispielhaft in einem Experiment dargestellt. Die Zellkulturen wurden H₂O₂ in verschiedenen Konzentrationen für 2 Stunden exponiert. Die Fluoreszenzintensität unbehandelter Kulturen entspricht 100%.

4.1.1 Exposition gegen TEGDMA

Die für die Analyse der Induktion von 8-OxoG verwendeten V79B-Zellen binden den spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörper und erzeugen Fluoreszenzsignale einer bestimmten Höhe. Die Anwesenheit des Monomers TEGDMA (1mM) verschiebt diese Signale zu höheren Fluoreszenzintensitäten. Diese Zunahme der Fluoreszenzintensität zeigt, dass TEGDMA eine erhöhte Menge an 8-OxoG erzielt (Abb. 11).

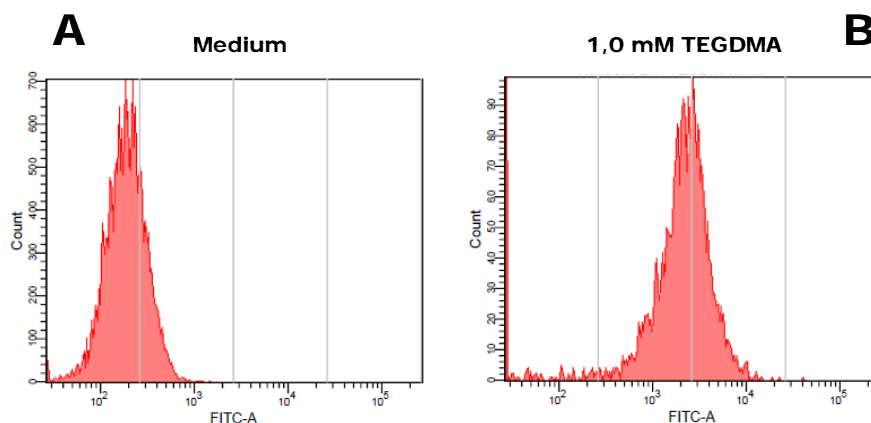


Abb. 11: Bildung von 8-OxoG in V79B-Zellen nach Exposition gegen TEGDMA. Die Grafiken zeigen Fluoreszenzhistogramme unbehandelter Kulturen (A) sowie von Kulturen, die 1 mM TEGDMA für 24h exponiert waren (B). Die Verschiebung zu höheren Fluoreszenzwerten in den TEGDMA-exponierten Kulturen verweist auf die erhöhte Bildung von 8-OxoG. Die Histogramme wurden nach FACS-Analysen mit dem Programm FACS-DIVA erstellt.

Die Bildung 8-OxoG durch TEGDMA wurde auch in Anwesenheit des Antioxidans N-Acetylcystein (NAC, 10 mM) geprüft. In den Zellkulturen, die gegenüber 1 mM TEGDMA und NAC exponiert wurden, war die Bildung von 8-OxoG geringer als in den Ansätzen mit TEGDMA alleine (Abb. 12 C, D). NAC selbst veränderte die Bildung von 8-OxoG in ansonsten unbehandelten Zellkulturen nicht (Abb. 12 A, B).

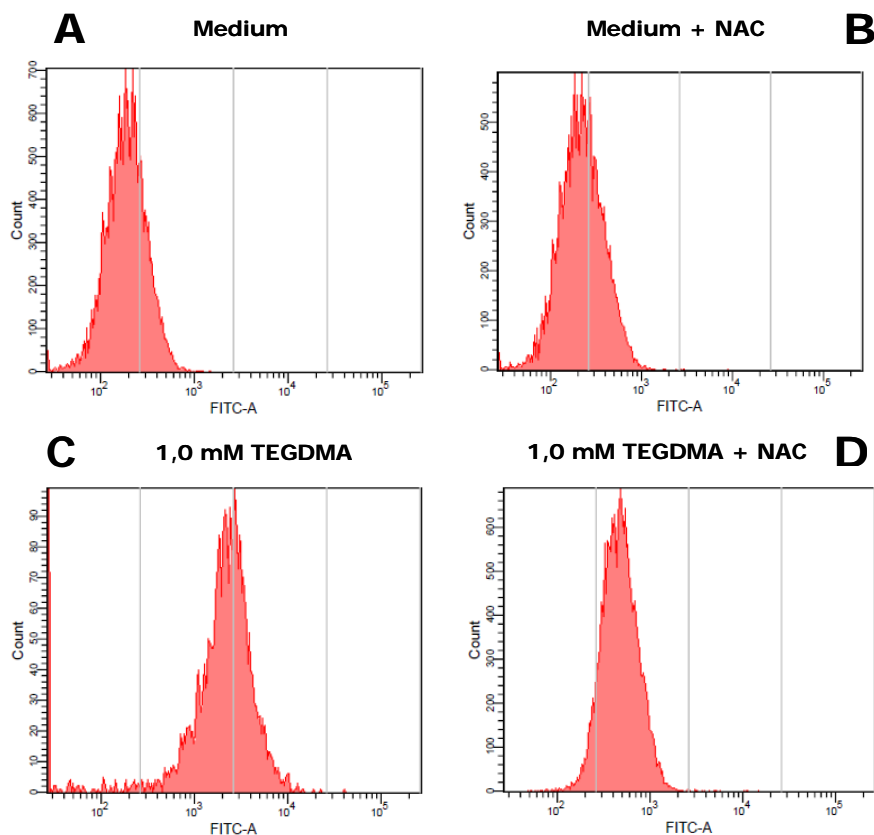


Abb. 12: Bildung von 8-OxoG in V79B-Zellen nach Exposition gegen TEGDMA und NAC. Die Grafiken zeigen Fluoreszenzhistogramme unbehandelter Kulturen (A), von Kulturen, die nur mit 10 mM NAC behandelt wurden (B) sowie von Kulturen, die 1 mM TEGDMA (C) oder 1 mM TEGDMA plus 10 mM NAC für 24h exponiert waren (D). Die Verschiebung zu höheren Fluoreszenzwerten in den TEGDMA-exponierten Kulturen verweist auf die erhöhte Bildung von 8-OxoG. Die Histogramme wurden nach FACS-Analysen mit dem Programm FACS-DIVA erstellt.

4.1.2 Exposition gegen den Epoxyester K126

Die Fähigkeit des Epoxyesters K126, eine Modellsubstanz für die reaktive Gruppe der Silorane, zur Bildung von 8-OxoG wurde ebenfalls konzentrationsabhängig

analysiert. In bekannter Weise wurde dazu die Änderung der Fluoreszenzintensität in unbehandelten Kontrollen und exponierten Zellkulturen gemessen. Die Beispiele dazu sind in Abbildung 13 dargestellt. Die geringe Konzentration von 0,03 mM K126 verursacht kaum einen Unterschied in der Intensität der Fluoreszenz verglichen mit den Signalen unbehandelter Kontrollen. Jedoch erzeugten bereits 0,3 mM K126 eine deutliche Steigerung der Fluoreszenzintensität (Abb. 13C). Eine weitere Verschiebung der Fluoreszenzintensität zu höheren Werten wurde in Kulturen beobachtet, die mit 1 mM K126 behandelt wurden (Abb. 13D). Allerdings sind die separierten Signale in diesen Kulturen ein Hinweis auf die hohe Zytotoxizität dieser Konzentration.

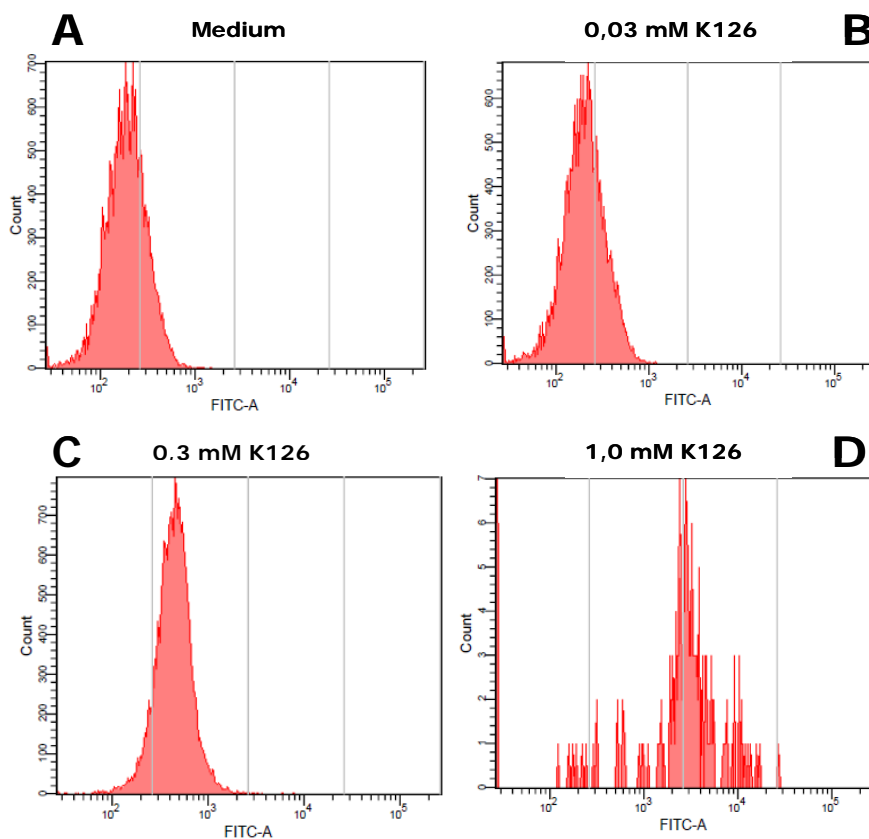


Abb. 13: Bildung von 8-OxoG in V79B-Zellen nach Exposition gegen den Epoxyester K126. Die Grafiken zeigen Fluoreszenzhistogramme unbehandelter Kulturen (A) und von Kulturen, die 0,03 (B), 0,3 (C) und 1 mM K126 (D) für 24h exponiert waren. Die Verschiebung zu höheren Fluoreszenzwerten in den K126-exponierten Kulturen verweist auf die erhöhte Bildung von 8-OxoG. Die separierten Signale in den mit 1 mM K126 behandelten Kulturen sind ein Hinweis auf die hohe Zytotoxizität dieser Konzentration. Die Histogramme wurden nach FACS-Analysen mit dem Programm FACS-Diva erstellt.

Die Wirkung des Epoxyester auf die Bildung von 8-OxoG wurde ebenfalls in Anwesenheit von 10 mM NAC geprüft. In Kombination mit 0,3 mM K126 war in den Ansätzen mit NAC keine Veränderung der Fluoreszenzintensität verglichen mit den nur mit dem Monomer behandelten Kulturen erkennbar (Abb. 14 A, B). Es fällt jedoch auf, dass NAC anscheinend einen protektiven Effekt hatte, wenn die noch höhere Konzentration von 1 mM K126 verwendet wurde, weil in Anwesenheit von NAC ein homogenes Fluoreszenzsignal erkennbar wurde (Abb. 14 C, D).

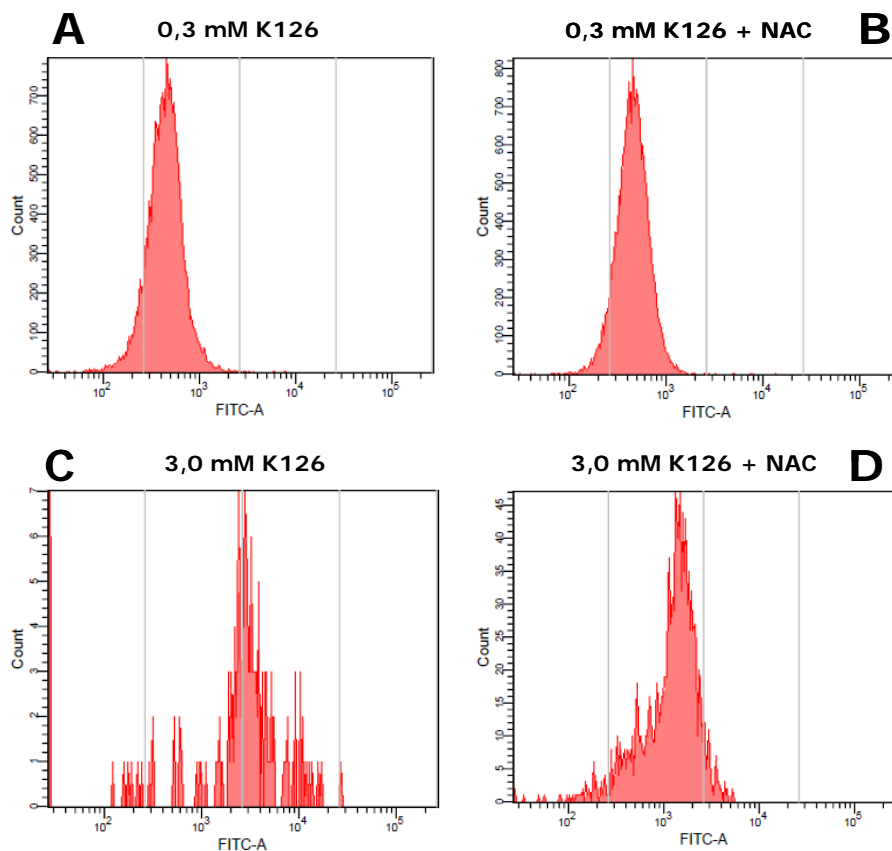


Abb. 14: Bildung von 8-OxoG in V79B-Zellen nach Exposition gegen den Epoxyester K126 und NAC. Die Grafiken zeigen Fluoreszenzhistogramme von Kulturen, die nur 0,03 mM K126 (A), mit 0,03 mM K126 plus 10mM NAC (B), mit 1 mM K126 (C) oder mit 1 mM K126 plus 10 mM NAC für 24h behandelt wurden. Die Histogramme wurden nach FACS-Analysen mit dem Programm FACS-DIVA erstellt.

4.1.3 Die Bildung von 8-OxoG durch TEGDMA und K126

Nach zwei Stunden Exposition gegen TEGDMA alleine wurde mit keiner der hier getesteten Konzentrationen (1 und 3 mM) ein signifikanter Anstieg der Menge an 8-OxoG verglichen mit unbehandelten Zellkulturen nachgewiesen (Abb. 15). Jedoch stieg die Menge an 8-OxoG nach Behandlung mit 1 mM TEGDMA in Anwesenheit von 10 mM NAC etwa um den Faktor 1,5 relativ zu unbehandelten Kontrollen. Dieser Anstieg war genau wie die etwas geringere Erhöhung mit 3 mM TEGDMA und NAC nicht statistisch signifikant (Abb. 15).

Der Epoxyester K126 verursachte mit Konzentrationen zwischen 0,03 und 1 mM keine Veränderung der Menge an 8-OxoG in den V79B-Zellen (Abb. 15). Lediglich nach Exposition gegen 3 mM K126 stieg sowohl mit als auch ohne 10 mM NAC die Menge an 8-OxoG signifikant ($p=0,001$) etwa um den Faktor 3-3,5 verglichen mit unbehandelten Kontrollen. Die breite Streuung der Wert von 8-OxoG in den Ansätzen ohne NAC verweist auf die sehr starke zytotoxische Wirkung dieser Konzentration (vgl. dazu Abb. 19). Man darf daher annehmen, dass die hier gemessenen Werte physiologisch nicht relevant sind.

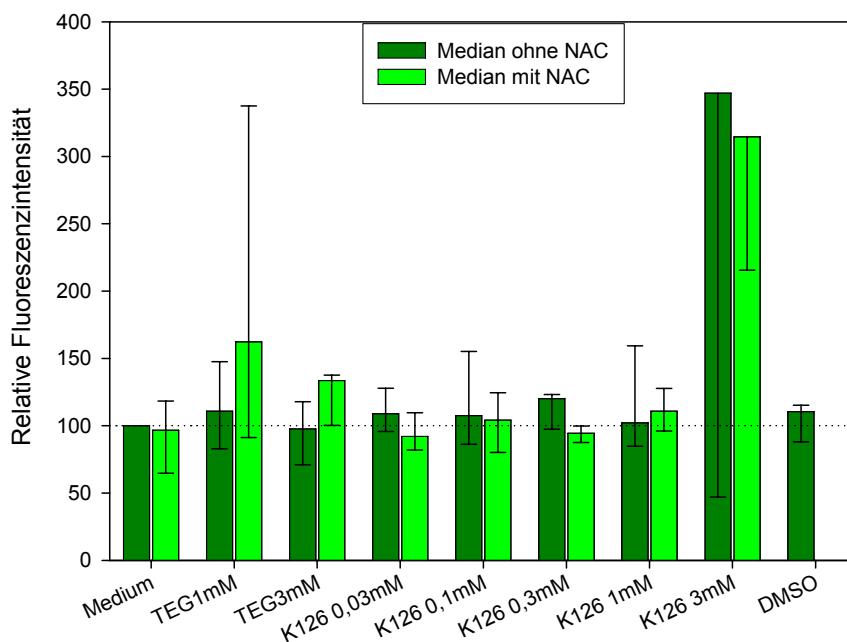


Abb. 15: Bildung von 8-OxoG in V79B-Zellen. Die relative 8-OxoG-Bildung ist als relative Fluoreszenzintensität nach FACS-Analysen dargestellt. Die Zellkulturen wurden TEGDMA und dem Epoxyester K126 mit und ohne 10 mM NAC 2 Stunden exponiert. DMSO (=Dimethylsulfoxid) diente als Lösungsmittel für K126 und wurde in der adäquaten Konzentration geprüft. Die Balken repräsentieren Medianen (mit 25% und 75% Percentilen) aus fünf Einzelwerten in unabhängigen Versuchen ($n=5$).

Nach einer Expositionsdauer von 24 Stunden nahm die Menge an 8-OxoG in den mit TEGDMA behandelten Kulturen etwa um den Faktor 2 zu (Abb. 16). In Anwesenheit von 10mM NAC war die Menge an 8-OxoG etwas geringer, allerdings war dieser Unterschied zu den Ansätzen ohne NAC nicht signifikant (Abb. 16). Der Grad der DNA-Schädigung war auch in den Ansätzen mit NAC höher im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 16).

Der Epoxyester K126 bewirkte in den V79B-Zellen einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Menge an 8-OxoG nach 24 Stunden Exposition (Abb. 16). Bereits 0,1 und 0,3 mM K126 erhöhten die 8-OxoG-Menge etwa um das 1,5-2-fache. Mit 1mM K126 stieg die Menge an 8-OxoG sogar um den Faktor 5-10. Die höchste hier verwendete Konzentration von K126 (3mM) war anscheinend so zytotoxisch, so dass die Fluoreszenzintensität wieder sank, weil nur noch wenige Zellen überlebten (vgl. dazu Abb. 19). Bei dem Zusatz von NAC bei höchsten K126-Konzentration waren sogar keine Werte messbar.

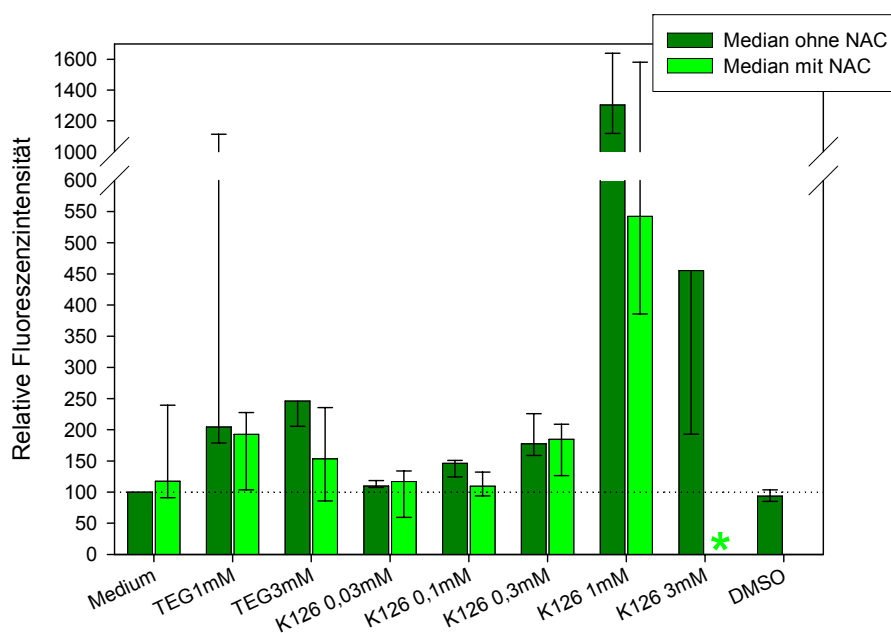


Abb. 16: Bildung von 8-OxoG in V79B-Zellen. Die relative 8-OxoG-Bildung ist als relative Fluoreszenzintensität nach FACS-Analysen dargestellt. Die Zellkulturen wurden TEGDMA und dem Epoxyester K126 mit und ohne 10 mM NAC 24 Stunden exponiert. DMSO (=Dimethylsulfoxid) diente als Lösungsmittel für K126 und wurde in der adäquaten Konzentration geprüft. Die Balken repräsentieren Medianen (mit 25% und 75% Perzentilen) aus fünf Einzelwerten in unabhängigen Versuchen (n=5). Der mit einem Sternchen (*) markierte Balken enthält keine Messwerte aufgrund der hohen Zytotoxizität dieser Konzentration.

Die sehr lange Expositionszeit (48h) gegen 1 und 3 mM TEGDMA führte zu einem signifikanten Anstieg der Menge an 8-OxoG etwa um das 6-fach verglichen mit unbehandelten Zellkulturen (Abb. 17). Die Anwesenheit von NAC reduzierte jedoch diese Bildung an 8-OxoG signifikant (Abb. 17).

Auch der Epoxyester K126 verursachte einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Menge an 8-OxoG. Mit 0,3 mM K126 stieg diese Menge signifikant ($p=0,001$) etwa um den Faktor 3. Die Anwesenheit von NAC bewirkte keine signifikanten Veränderungen der Mengen an 8-OxoG. Überraschend wurde aber nach Exposition der Zellen gegen 1 mM K126 eine etwa 2,5-3-fach höhere Menge an 8-OxoG verglichen mit unbehandelten Kulturen in Anwesenheit von NAC gefunden. Möglicherweise schützte NAC die Zellen gegen die starke Zytotoxizität von K126 (vgl. dazu Abb. 19). Nach Exposition gegen 3 mM K126 wurde zwar eine sehr große Menge an 8-OxoG gemessen, allerdings wirkte diese Konzentration so stark toxisch, dass nur sehr wenige Zellen überlebten (Abb. 17).

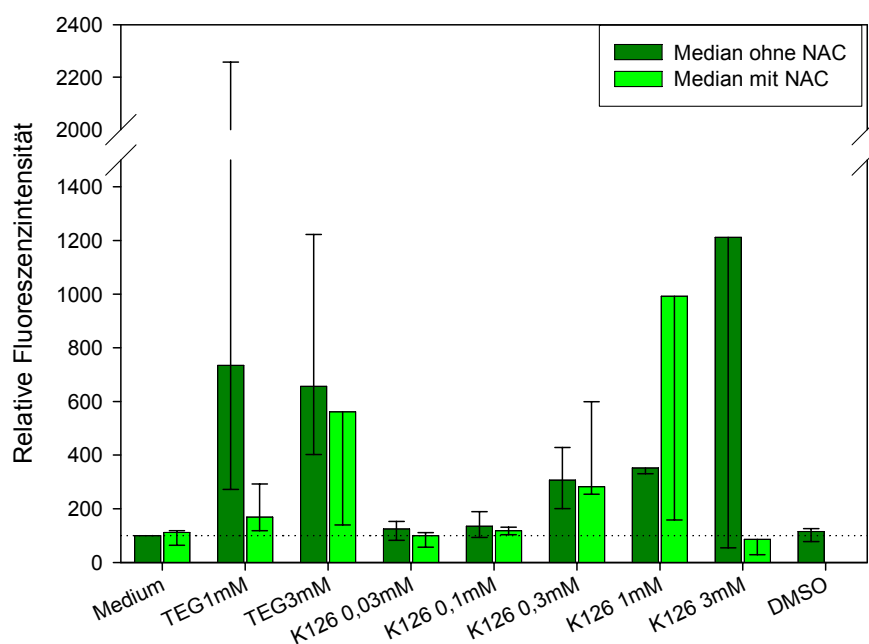


Abb. 17: Bildung von 8-OxoG in V79B-Zellen. Die relative 8-OxoG-Bildung ist als relative Fluoreszenzintensität nach FACS-Analysen dargestellt. Die Zellkulturen wurden TEGDMA und dem Epoxyester K126 mit und ohne 10 mM NAC 48 Stunden exponiert. DMSO (=Dimethylsulfoxid) diente als Lösungsmittel für K126 und wurde in der adäquaten Konzentration geprüft. Die Balken repräsentieren Medianen (mit 25% und 75% Perzentilen) aus fünf Einzelwerten in unabhängigen Versuchen ($n=5$).

4.2 Zytotoxizität von TEGDMA und K126 in V79B-Fibroblasten

In den Analysen der Bildung von 8-OxoG mit Durchflusszytometrie wurden zusätzlich zu den Messungen der Fluoreszenzintensität die physikalischen Parameter Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) und Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) zur Beschreibung der Zellmorphologie bestimmt. Die Zellen unbehandelter Kulturen und solcher, die gegen TEGDMA und K126 exponiert waren, werden nach ihrem Vorwärtsstreulicht und ihrem Seitwärtsstreulicht im Diagramm als Häufigkeitsdichteverteilungen (*density plots*) dargestellt. Die Abszisse dieses Diagramms zeigt das Vorwärtsstreulicht, das Auskunft über die Größe der Zellen gibt. Auf der Ordinate ist das Seitwärtsstreulicht aufgetragen, das etwa im rechten Winkel zum Laserstrahl entsteht, und das sehr stark von der Granularität ("Körnigkeit") der Zellen bestimmt wird (Radcliff und Jaroszeski, 1998). Die Parameter FSC und SSC zeigen morphologische Veränderungen von Zellen, die mit dem Zelltod verbunden sein können. Es ist bekannt, dass Zellen in Apoptose schrumpfen und dass ihre Granularität zunimmt, Zellen in Nekrose hingegen werden größer, so dass die Werte für FSC steigen (Kroemer *et al.*, 1995). FSC und SSC und schließlich die Veränderung der Zahl der Zellen in der für die Zellpopulation unbehandelter Kontrollen festgelegten Region P1 (Gate) wurden hier als Parameter für die Zytotoxizität von TEGDMA und K126 verwendet.

Für den Nachweis der Veränderung von FSC und SSC der Zellen exponierter Kulturen wurde zunächst für die Hauptpopulation von Zellen unbehandelter Kontrollen eine Region P1 (Gate) definiert. Dieser Bereich wurde für die Beobachtung von Veränderungen von FSC und SSC der Zellen exponierter Kulturen beibehalten.

Unbehandelte V79B-Zellkultur stellte sich hier als eine kompakte begrenzte Population in der definierten Region dar (Abb. 18A). Im Vergleich dazu erschienen die Zellen einer Kultur, die 24h gegen 1 mM TEGDMA exponiert war, heterogen, gestreut und mit kleinen Zellen sehr hoher Granularität (Abb. 18B). In Anwesenheit von NAC erschienen die Zellen so homogen wie diejenigen unbehandelter Kontrollen (Abb. 18C). Zellen in Kulturen, die 0,3 mM K126 exponiert waren, erschienen etwas größer als diejenigen unbehandelter Kontrollen und die Granularität nahm zu. Die relative hohe Konzentration von 1mM K126 ist bereits stark zytotoxisch, so dass der

größte Teil der stark granulierten Zellen bereits außerhalb der definierten Region liegt.

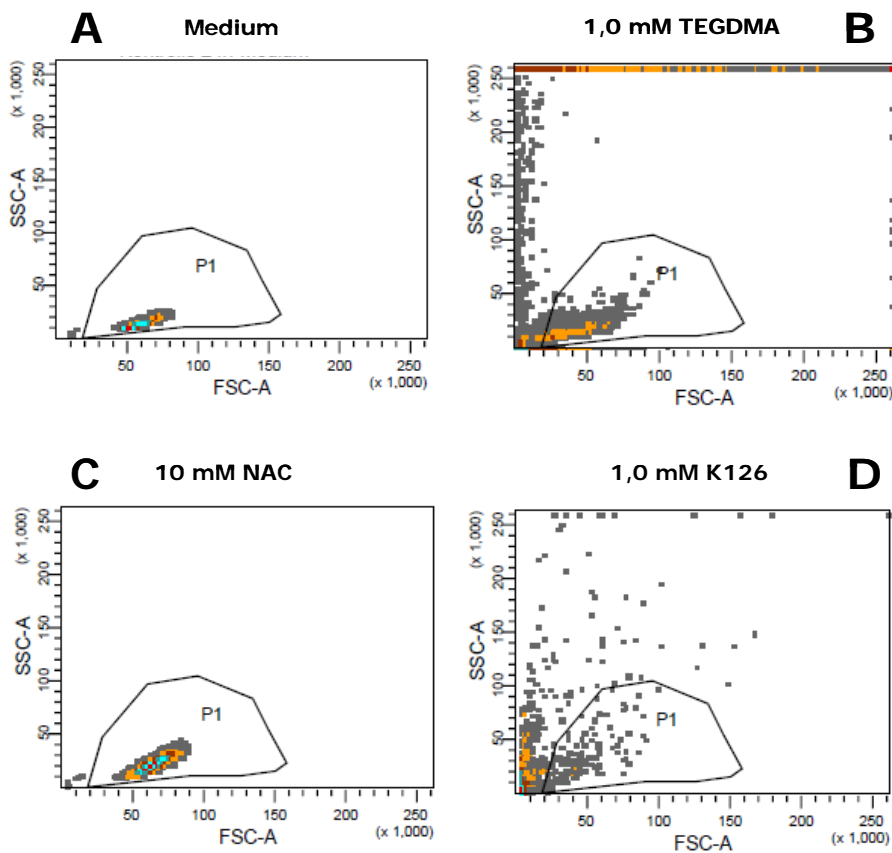


Abb. 18: Häufigkeitsdichteverteilungen (*density plots*) von V79B-Zellkulturen. Die Diagramme zeigen Vorwärtstreuung (*forward scatter*, FSC) und Seitwärtstreuung (*side scatter*, SSC) zur Beschreibung der Zellmorphologie unbehandelter Kulturen (A) und solcher nach Exposition gegen TEGDMA (B), NAC (C) und den Epoxyester K126 (D). Zusätzlich zur Darstellung morphologischer Veränderungen der Zellen wurde eine Region (P1) festgelegt, innerhalb derer die Zahl der Zellen erfasst wurde.

Zusätzlich zur Beobachtung morphologischer Veränderungen anhand von FSC und SSC wurde der Anteil der Zellen mit normaler homogener Morphologie in der definierten Region bestimmt. Die Zahl der Zellen darin wurde für jede experimentelle Kultur mit derjenigen unbehandelter Kulturen verglichen und als Maß für die Zytotoxizität von TEGDMA und K126 verwendet.

Für diese quantitativen Analysen wurden in jeder Probe mindestens 20.000 Zellen in der definierten Region vermessen. Nach 2 Stunden Exposition wurden in den mit TEGDMA behandelten Kulturen mit und ohne NAC keine Unterschiede zur Zahl der Zellen im Gate unbehandelter Kontrollen gefunden (Abb. 19A). Erst mit 3 mM K126

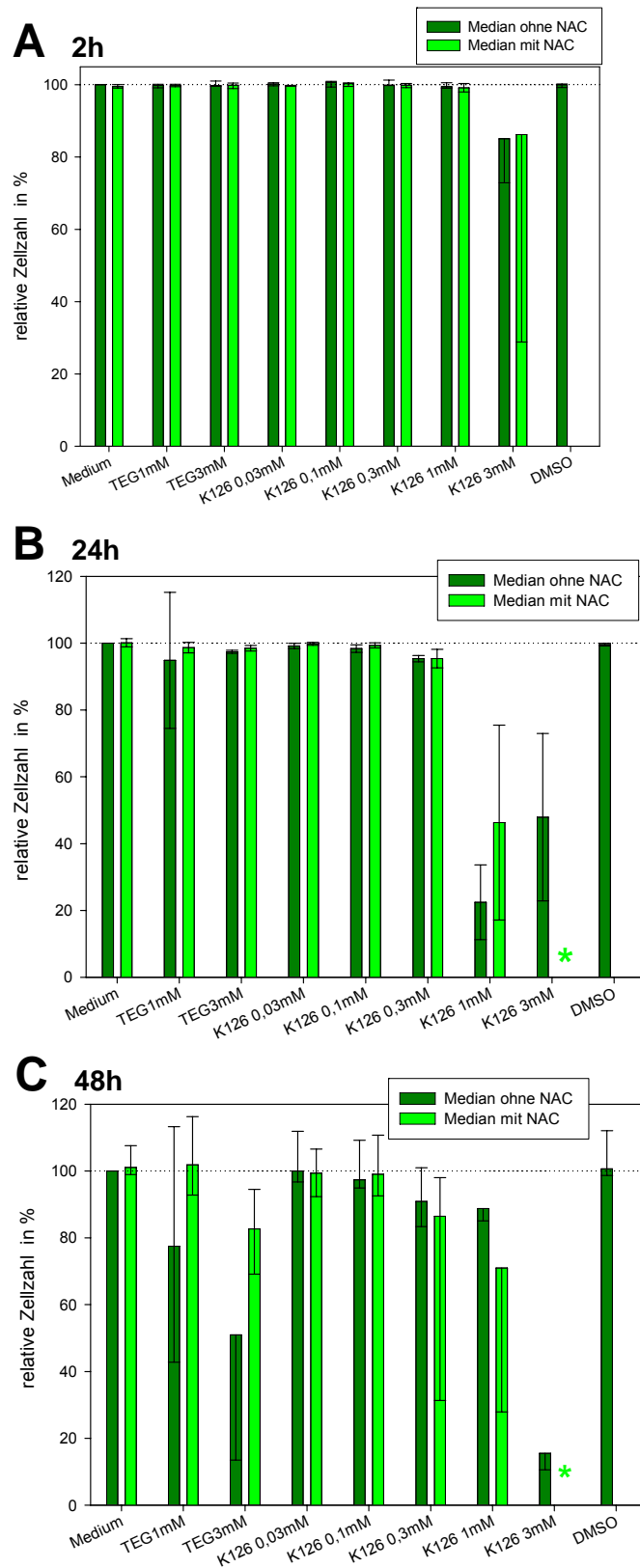


Abb. 19: Relative Zellzahl von V79B Zellen nach(A) 2-, (B) 24-, (C) 48-stündiger Exposition gegen TEGDMA (1 mM und 3 mM) und K126 (0,03 mM, 0,1 mM, 0,3 mM, 1 mM und 3 mM). Die Balken stellen die Medianen (mit 25% und 75% Percentilen) aus 5 unabhängigen Versuchen dar. Die mit einem Sternchen (*) markierten Balken enthalten keine Messwerte aufgrund der hohen Zytotoxizität dieser Konzentration.

mit und ohne NAC sank die Zahl der Zellen im Gate im Mittel auf etwa 85-90% (Abb. 19A). In diesen Kulturen waren zum größten Teil nur noch Zellfragmente nachzuweisen. Auch nach 24 Stunden war die Zahl der Zellen im Gate für die experimentellen Kulturen mit TEGDMA so hoch wie in unbehandelten Kontrollen (Abb. 19B). Im Unterschied dazu reduzierte der Epoxyester K126 nun nicht nur mit 3 mM, sondern auch in den Kulturen, die mit 1 mM behandelt wurden, die Zahl der Zellen im Gate auf etwa 25-50% (Abb. 19B). Diese starke Verringerung der Zahl der Zellen im Gate ist ein Hinweis auf die hohe Zytotoxizität der Substanz. Nach 48 Stunden Exposition sank nun auch die Zahl der Zellen, die gegen 1 mM und 3 mM TEGDMA exponiert wurden auf etwa 80% und 50% verglichen mit unbehandelten Kontrollen (Abb. 19C) Interessant ist, dass in Anwesenheit von 10 mM NAC die Zahl der Zellen im Gate durch TEGDMA weniger stark reduziert wurde (Abb. 19C). Für K126 genügten nun 0,3 mM, um die Zellzahl im Gate auf etwa 90% zu reduzieren. Ähnlich wie nach 24 Stunden verringerten auch 1 mM und 3 mM die Zellzahl im Gate. Jedoch war der Stichprobenumfang für K126 wegen der hohen Zytotoxizität von 1 und 3 mM Konzentrationen sehr gering, so dass diese Zahlen keine reproduzierbaren Ergebnisse repräsentieren (Abb. 19C). Der Zusatz von 10 mM NAC hatte mit K126 keinen protektiven Effekt auf die Zellzahl im Gate, denn sämtliche Zellen oder Zellfragmente befanden sich außerhalb des Gates (Abb. 19C).

5 Diskussion

Dentale Kunststoffe auf der Basis von Methacrylaten haben sich seit langem als Werkstoffe in der Füllungstherapie bewährt. Eine für die klinische Anwendung jedoch nachteilige Eigenschaft dieser Stoffgruppe, die bis heute nicht geändert werden konnte, ist jedoch die Polymerisationsschrumpfung (Braga *et al.*, 2005; Atai und Watts, 2006; Musanje *et al.*, 2006; Condon und Ferracane, 2002). Neben dem Versuch, werkstoffkundlich durch die Erhöhung des Fülleranteils oder die Einbindung von Nanopartikeln den Schrumpf zu senken, wurde auch nach einem neuen Grundwerkstoff gesucht, der bei der Polymerisation deutlich weniger schrumpft. Die Entwicklung dentaler Komposite auf der Basis ringöffnender Monomere wie der Silorane ist in dieser Hinsicht eine viel versprechende positive Entwicklung, weil der Volumenverlust weniger als 1 % beträgt (Weinmann *et al.*, 2005; Palin und Fleming, 2003; Palin *et al.*, 2005). Die in der Zahnmedizin verwendeten Komposite setzen bekannter weise auch nach der Polymerisationsreaktion reaktive Komponenten der organischen Matrix frei (Michelsen *et al.*, 2008; Durner *et al.*, 2010). Die Biokompatibilität der dentalen Werkstoffe muss geprüft werden, weil diese Bestandteile möglicherweise lokal in Zellen der Mundhöhle, unter Umständen aber auch systemisch unerwünschte biologische Reaktionen hervorrufen könnten. Für diese Prüfung wurden zum einen nationale und internationale Richtlinien in Form von ISO- und DIN-Normen erarbeitet, zum anderen liegen zahlreiche Analysen aus Originalarbeiten in der wissenschaftlichen Fachliteratur vor (DIN EN ISO 7405, Deutsche Fassung EN ISO 7405:2008; Schweikl *et al.*, 2006). Es ist bekannt, dass Personen, die an der Entwicklung der Werkstoffe arbeiten sowie zahnärztliches Personal oft und über eine lange Zeit relevanten Mengen von Monomeren exponiert sein können. Nicht zuletzt deswegen werden allergische Hautreaktionen häufig bei zahnärztlichem Personal beobachtet (Kanerva, 2001; Marquardt *et al.*, 2009).

Die genomische DNA eukaryontischer Zellen ist ein Zielmolekül von Monomeren dentaler Komposite *in vitro*. Manche Monomere (Dimethacrylate) sind (Kleinsasser *et al.*, 2006; Kleinsasser *et al.*, 2004) und können oxidative DNA-Schäden und Genmutationen induzieren oder gar große Deletionen von DNA-Sequenzen erzeugen und klastogen wirken (Schweikl *et al.*, 1998; Schweikl und Schmalz, 1999;

Schweikl *et al.*, 2001). Ähnlich wie physikalische Strahlung und chemische Agenzien verursacht TEGDMA einen Zellzyklusarrest (Schweikl *et al.*, 2006).

Man darf daher vermuten, dass Monomere wie TEGDMA oder HEMA entweder direkt oder indirekt, etwa über die erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), DNA-Schäden in Form von Strangbrüchen erzeugen (Urcan *et al.*, 2010).

Die organische Matrix einer neuen Generation von Kompositen auf der Basis ringöffnender Monomere wie der Silorane. Oxirane wie der bifunktionelle Epoxyester K126 enthalten funktionelle Gruppe der Silorane. Für diese Oxirane war die genotoxische Aktivität im Ames-Test (bakterielles Testsystem) und im V79B/HPRT-Genmutationstest gering (Schweikl *et al.*, 2002; Schweikl *et al.*, 2004). Eine Reihe von Oxiranen einschließlich Epoxyesters K126 erzeugten jedoch sehr wirksam Mikrokerne (Schweikl *et al.*, 2004; Schweikl *et al.*, 2001; Schweikl und Schmalz, 1999).

Für diese Oxirane ist der Mechanismus der Induktion von DNA-Schädigung unbekannt. Man darf vermuten, dass der elektrophile Epoxidring mit nukleophilen Gruppen der DNA reagieren kann, andererseits wäre aber auch ein indirekter Mechanismus durch eine gesteigerte Produktion von ROS möglich. Allerdings gibt es bislang in der verfügbaren Literatur keine Hinweise auf die Induktion oxidativer DNA-Schäden durch Oxirane. In der hier vorliegenden Arbeit soll der bifunktionelle Epoxyester K126 als Modellsubstanz für die Analyse des Mechanismus genotoxischer Effekte der funktionellen Gruppe der Silorane analysiert werden. Im Vergleich wurde TEGDMA als Modellsubstanz und Vertreter der Komposite auf der Basis von Methacrylaten geprüft.

5.1 TEGDMA induziert die Bildung von 8-OxoG in V79B-Zellen

Durch oxidativen Stress in der Zelle werden Makromoleküle wie Lipide, Proteine oder genomische DNA oxidiert und Zellfunktionen gestört. Dies kann dazu führen, dass endogene Signalwege verändert werden oder oxidative DNA-Schäden erzeugt werden (Hwang und Kim, 2007). Bekannt ist, dass die Induktion oxidativer DNA-Schäden mit einer Vielzahl degenerativer Erkrankungen zusammenhängt, wie kanzerogene oder neurologische Erkrankungen (Cooke *et al.*, 2003). Auch für dentale Komposite (Dentinadhäsive) ist die differenziell erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in humanen Pulpazellen beschrieben (Demirci *et al.*, 2008).

Obwohl die Art der Entstehung von ROS noch unklar ist, bewirkten Monomere wie HEMA und TEGDMA - wie in Abbildung 21 beispielhaft gezeigt - eine Zunahme in unterschiedlichen Zelllinien (Walther *et al.*, 2004; Schweikl *et al.*, 2008; Schweikl, 2009).

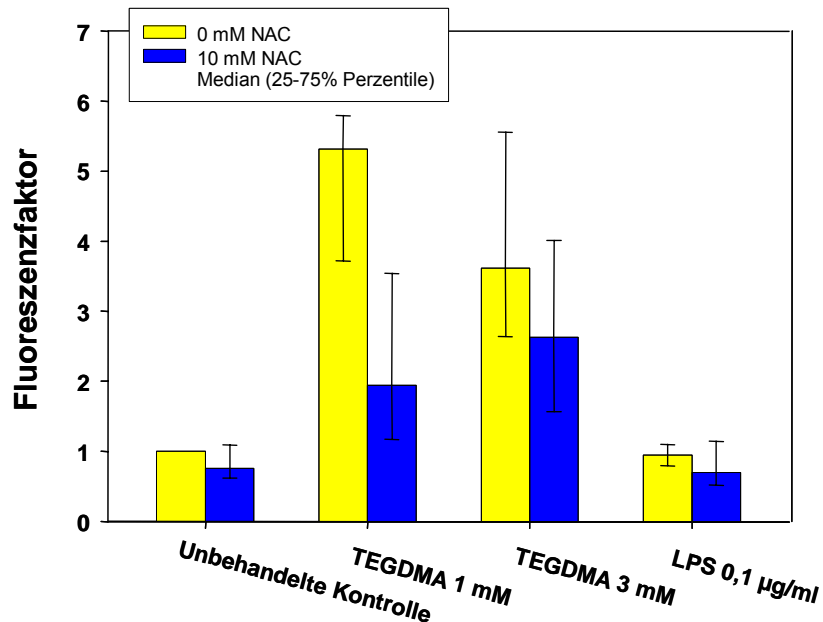


Abb. 21: Die Bildung von ROS in transformierten humanen Pulpafibroblasten. Zellkulturen wurden TEGDMA für 1h exponiert. Es sind Mediane sowie 25 und 75% Perzentile gezeigt (n=4). Diese Ergebnisse sind in einem Projektbericht publiziert (Schweikl, 2009)

Die wegen ihres stark mutagenen Potentials und der Häufigkeit des Vorkommens wohl wichtigste oxidative Basen-Modifikation ist das 8-OxoG (Cooke *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit verursachte TEGDMA zeit- und konzentrationsabhängige Steigerung der Bildung von 8-OxoG. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen, die mit THP-1 Monozyten erzielt wurden überein. Allerdings war in den THP-1 erst nach Ablauf von 24 und 48 Stunden eine 8-OxoG-Bildung erkennbar, wahrscheinlich aufgrund einer langsamen Kinetik (Eckhardt *et al.*, 2009). Der genaue Mechanismus der oxidativen DNA-Schädigung nach einer Exposition gegen TEGDMA ist nicht bekannt. Momentan darf man lediglich festhalten, dass TEGDMA über die Bildung von ROS die DNA schädigt, weil auch durch die Menge an 8-OxoG in Anwesenheit von NAC reduziert ist.

Grundsätzlich haben ROS wie etwa das Hydroxylradikal eine kurze Halbwertszeit. Deswegen kann man annehmen, dass DNA-Schäden von Radikalen erzeugt werden, die lokal über DNA-assoziierte Fe^{2+} -Ionen entstehen, beispielsweise durch die Fenton-Reaktion (Jia *et al.*, 2008). Eine andere Möglichkeit auf das oxidative

System einzuwirken, ist die Reaktion von ROS mit einem antioxidativ wirkenden Stoff im Körper, etwa dem nicht-enzymatischen Antioxidans Gluthation. Einige Studien haben gezeigt, dass es bei TEGDMA-Exposition zu einer fast vollständigen Verarmung an intrazellulärem Gluthation (GSH) kommt (Engelmann *et al.*, 2002; Stanislawski *et al.*, 2003; Volk *et al.*, 2006). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass diese Verarmung wahrscheinlich nicht durch einen oxidativen Prozess oder eine reduzierte GSH-Synthese zustande kommt. Es wurde vielmehr die direkte Reaktion von TEGDMA mit GSH über den Mechanismus einer Michael-Addition diskutiert (Stanislawski *et al.*, 2003; Engelmann *et al.*, 2002; Engelmann *et al.*, 2005; Geurtsen und Leyhausen, 2001). TEGDMA ist eine Ester-Verbindung einer α,β -ungesättigten Carbonsäure, die mit nukleophilen Zentren reagieren kann wie es die Thiol-Gruppe des Gluthations darstellt (Witz, 1989). Für diese Annahme spricht auch die Beobachtung, dass zwar die Menge des reduzierten GSH abnimmt, die Menge an oxidiertem GSH (GSSG) jedoch nicht zunimmt (Walther *et al.*, 2004). Zusätzlich gibt es Untersuchungen die auf die Bildung eines GSH-TEGDMA-Moleküls hinweisen, als Ergebnis einer Massenspektroskopie Analyse. Allerdings wurden bisher dazu keine experimentelle Daten gezeigt (Lefevre *et al.*, 2004). Gluthation spielt im Körper eine wichtige Rolle als Schutz vor ROS. Daher kann man darauf schließen, dass bei einer Abnahme von reduziertem Gluthation konsequent auch die Menge an ROS steigt und so oxidativer Stress in der Zelle entsteht (Stanislawski *et al.*, 2003). Eine weitere interessante Erkenntnis neuester Studien ist, dass TEGDMA möglicherweise auch als nicht-kompetitiver Antagonist der Gluthation-Transferase P1 wirken könnte. Diese Transferase spielt eine wichtige Rolle bei der Zellentgiftung von Xenobiotika, möglicherweise auch von TEGDMA (Lefevre *et al.*, 2004).

Diskutiert wird auch eine direkte Interaktion von TEGDMA mit nukleophilen Zentren der DNA, etwa der N7-Position am Guanin, über die Methacrylatgruppe, die als ein Akzeptor vom Michael-Typ fungiert. Da TEGDMA ein bifunktionales Monomer ist und zwei mögliche Bindungsstellen aufweist, könnte es in der Folge auch Quervernetzungen zwischen den komplementären DNA-Strängen bilden, die schlussendlich in DNA-Doppelstrangbrüchen resultieren könnten (Marnett, 1994; Schweikl und Schmalz, 1999; Besaratinia und Pfeifer, 2005).

Ein Überschuss an ROS vor allem an Hydroxylradikalen, kann DNA-Schäden wie Einzelstrang- oder Doppelstrangbrüche verursachen oder abasische und basische

Oxidationen erzeugen. 8-OxoG zeigt seine prämutagene Wirkung anhand der möglichen Bildung von Punktmutationen. Dies wird dadurch erreicht, dass die oxidierte Guaninbase sowohl mit Adenin als auch mit Cytosin eine Bindung eingehen kann, mit der Folge einer G:C zu A:T-Transversion (Cooke *et al.*, 2003; Cheadle und Sampson, 2007). Darüber hinaus könnte eine DNA-Reparatur über die Entfernung einer oxidierten Base (Basenexzisionsreparatur) zu DNA-Einzelstrangbrüchen führen und der daraus folgenden Verzögerung der Replikationsgabel. Die Bildung von DNA-Einzelstrangbrüchen durch ROS wurde mit nackter DNA bereits nachgewiesen (Imlay *et al.*, 1988; Lloyd und Phillips, 1999). Quervernetzungen der DNA, verzögerte Öffnung des DNA-Doppelstrangs oder die Erzeugung von DNA-Einzelstrangbrüchen, welche während der Replikation zu DNA-Doppelstrangbrüchen werden können, führen zu entsprechenden Fehlern in der Rekombinationen und zur Induktion von DNA-Schäden (Reliene *et al.*, 2004). Demnach könnte die Bildung von Mikrokernen und der Verlust großer DNA-Sequenzen, die in V79B-Zellen nach Exposition gegen TEGDMA nachgewiesen wurden, eine Folge der Umwandlung von DNA-Einzelstrangbrüchen in klastogene DNA-Doppelstrangbrüche sein (Schweikl *et al.*, 1998; Schweikl und Schmalz, 1999; Schweikl *et al.*, 2001; Dudás und Chovanec, 2004).

Neben der Bildung von 8-OxoG wurden zusätzlich die physikalischen Parameter Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) bestimmt, die die Zellmorphologie beschreiben. Veränderungen von FSC und SSC in einer festgelegten Region (Gate) unbehandelter Kontrollen verweisen auf pathophysiologische intrazelluläre Vorgänge. Die Veränderung der Zellzahl in dieser definierten Region in Populationen behandelter Kontrollen diente hier den quantitativen Analysen der Zytotoxizität von TEGDMA und des Epoxyesters K126. Die Zellzahl in der definierten Region nahm in den Kulturen, die TEGDMA (1mM und 3mM) exponiert waren nach 24 Stunden Exposition ab, und nach 48 Stunden reduzierte 3mM TEGDMA diese Population auf die Hälfte. Da Partikel außerhalb des Gates nur noch Zellfragmente darstellen, kann man von einer starken Zytotoxizität des TEGDMA ausgehen. Ähnliche Beobachtungen eines zytotoxischen Effekts des Comonomers TEGDMA sind in der Literatur mit Hilfe anderer Nachweisverfahren desöfteren beschrieben (Hanks *et al.*, 1991; Wataha *et al.*, 1994; Ratanasathien *et al.*, 1995; Jontell *et al.*, 1995).

5.2 Die Bildung von 8-OxoG durch den Epoxyester K126

Epoxide sind eine Stoffklasse, deren chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften allgemein gut charakterisiert sind (Ehrenberg und Hussain, 1981). Unterschiedliche Kunststoffe auf der Basis von Epoxiden werden bereits seit langem industriell, aber auch im medizinischen Bereich verwendet (Ehrenberg und Hussain, 1981). Der neue Füllungswerkstoff in der Zahnmedizin auf der Basis von Siloranen mit reaktiven funktionellen Epoxidgruppen ist wohl vor allem aufgrund der deutlich geringeren Schrumpfung und der dadurch erhofften längeren Haltbarkeit von hohem klinischem Interesse (Weinmann *et al.*, 2005). Einige hoch reaktive Epoxide sind aufgrund der biologischen Wirksamkeit in verschiedensten Organismen sehr interessant. Man weiß, dass Epoxide mit nukleophilen Zentren von Makromolekülen reagieren können und sind daher auch DNA alkylierende Substanzen (Hemminki und Vainio, 1984). Der Epoxyester K126 dient in der vorliegenden Arbeit wegen seiner funktionellen Gruppen als Modellsubstanz für Silorane zur Analyse ihrer biologischen Wirkung. Bisher war bekannt, dass die Aktivitäten von Epoxiden, die auch für die Entwicklung eines Komposits in Betracht gezogen wurden im Ames-Test (bakterielles Testsystem) eher gering waren. Lediglich der Epoxyester K126 (Epoxy-cyclohexyl-methyl-epoxy-cyclo-hexancarboxylat), eine Epoxyether (Di(cyclohexen-epoxidmethyl)-ether und Epoxysilan (1,4-Bis(2,3-epoxypropyloxypropyl-dimethylsilyl)-benzol verursachten in den *Salmonella typhimurium*-Stämmen TA100 und TA102 mutagene Effekte (Schweikl *et al.*, 2002). Der Epoxyester K126 und der Epoxyether waren auch im V79B/HPRT-Genmutationstest wirksam (Schweikl *et al.*, 2004).

Möglicherweise basiert die starke Induktion von Punktmutationen durch K126 in *S. typhimurium* vor allem in Anwesenheit einer metabolisch aktiven Zellfraktion sowie in V79B-Zellen darauf, dass aufgrund einer hydrolytischen Spaltung der Esterbindung durch eine Esteraseaktivität zwei sehr reaktive monofunktionale cycloaliphatische Epoxymoleküle entstehen (Schweikl *et al.*, 2002; Kostoryz *et al.*, 2004). Zusätzlich induzierten diese Substanzen schon bei geringen Konzentrationen eine verglichen mit der Wirkung von TEGDMA hohe Zahl an Mikrokernen in V79B-Zellen (Schweikl *et al.*, 2004). Der Mechanismus hinter diesen genotoxischen Effekten der Epoxide war jedoch vollkommen unbekannt. Neben der Möglichkeit der direkten Reaktion des Epoxidrings mit nukleophilen Zentren der DNA war ein indirekter Mechanismus über die Erzeugung von ROS nicht auszuschließen.

Bisher wurde die Bildung von oxidativen DNA-Schäden in Zellkulturen durch den Epoxyester K126 nicht gezeigt. In der vorliegenden Untersuchung induzierte K126 eine konzentrationsabhängige Bildung von 8-OxoG. Wie für TEGDMA oben diskutiert, scheint auch hier die Bildung von oxidativen DNA-Schäden einer langsamen Kinetik zu folgen, da 8-OxoG nach einer kurzen Expositionsdauer nicht detektiert wurde, sondern erst nach 24 und 48 Stunden. Nach diesen langen Expositionszeiten scheint mit 3mM K126 aufgrund der starken zytotoxischen Wirkung eine Interpretation der Bildung von 8-OxoG physiologisch irrelevant zu sein. Bereits nach einer Exposition von 2 Stunden war die Zahl der Zellen in der zu betrachtenden Region (Gate) auf etwa 80 % reduziert und nach 24 Stunden sank auch die Zellzahl in den Kulturen, die 1mM K126 exponiert waren auf etwa 40%.

Vergleicht man die Wirkung von 1mM TEGDMA mit derjenigen von 1 mM K126 direkt, kann man feststellen, dass K126 sowohl nach 2 und nach 24 Stunden mehr 8-OxoG induzierte. Nach 48 Stunden ist aufgrund der hohen Toxizität von K126 ein Vergleich der Wirkung beider Substanzen physiologisch nicht mehr sinnvoll.

Die Bildung oxidativer DNA-Schäden durch Epoxide ist in der verfügbaren Literatur auch für andere Modellsubstanzen wie Aflatoxin B(1), Benzo[a]pyren (BaP), ein polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff, oder auch Styrol beschrieben. Es ist bekannt, dass das Mykotoxin Aflatoxin B(1) physiologisch zu einem AFB(1)-8,9-exo-Epoxid aktiviert wird, das direkt an die DNA bindet und schließlich ein AFB(1)-N(7)-Guanine-Addukt bildet. Andererseits wurde aber nach Exposition gegen AFB(1) auch die Bildung von 8-OxoG in Zellkulturen nachgewiesen. Die Anwesenheit des antioxidativ wirkenden Enzyms Katalase wiederum schien einen Anstieg der AFB(1)-induzierten Menge an 8-OxoG zu inhibieren. Man durfte also annehmen, dass möglicherweise auch ein oxidativer DNA-Schaden zur Toxizität von AFB(1) beiträgt (Guindon *et al.*, 2007).

Auch die Oxidation von trans-Dihydrodiolen polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAH) zu Katecholen, die dann durch eine Dihydrodioldehydrogenase sehr schnell zu o-Quinonen umgewandelt werden, führt zur Bildung von H₂O₂, oxidativem Stress und schließlich zu einem charakteristischen Muster von Mutationen (Penning *et al.*; Shen *et al.*, 2006).

Es wurde aber auch berichtet, dass Benzo[a]pyren und Metaboliten davon nach kovalenter Bindung an die DNA in Verbindung mit ultravioletter Strahlung (UVA) oxidative DNA-Schäden in Form von 8-OxoG erzeugen kann. Wahrscheinlich ist dies

die Folge der Bildung von ROS in Form von Singletsauerstoff und Superoxidanionen durch mikrosomal erzeugte BaP-Metaboliten (Kim *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2005).

Auch für Styroloxid (1,2-Epoxyethylbenzol), das durch Epoxidierung aus Styrol entsteht, wurde berichtet, dass es oxidative DNA-Schäden in Form von 8-OxoG erzeugte. Oxidativer Stress durch Styroloxid wurde überdies durch eine Reduktion an reduziertem Glutathion (GSH), durch die Aktivität der Glutathion-S-Transferase (GST) und eine erhöhte Expression der induzierbaren Hämoxygenase-1 (HO-1) nachgewiesen (Vettori *et al.*, 2005).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass der Epoxyester K126 über die Erzeugung von ROS auch DNA-Schäden in Form von 8-OxoG induzieren kann. Allerdings bleibt die Produktion von ROS durch K126 ebenso nachzuweisen, vor allem, welche Spezies von ROS bevorzugt entsteht und wie diese auf das enzymatische und nicht-enzymatische (Glutathion) antioxidative System der Zellen wirken könnten.

5.3 Wirkung von N-Acetylcystein auf die 8-OxoG-Bildung

Das intrazelluläre Ungleichgewicht von oxidativen und antioxidativen Stoffen wird als oxidativer Stress bezeichnet (Oktyabrsky und Smirnova, 2007). Um die Rolle von ROS für die Zytotoxizität und Genotoxizität der Monomere (Methacrylate) aufzuklären, wurde eine Reihe von Antioxidationsmittel wie NAC, aber auch Ascorbinsäure und Trolox verwendet (Stanislawski *et al.*, 2003; Walther *et al.*, 2004; Lefeuvre *et al.*, 2005; Schweikl *et al.*, 2006). NAC wirkt als Radikalfänger und stellt eine Vorstufe des körpereigenen Glutathions dar (Bounous und Molson, 2003). Zur Prüfung der Frage, ob die Genotoxizität von TEGDMA und des Epoxyesters K126 durch oxidativen Stress und die Bildung von ROS ausgelöst wird, wurde die Induktion von 8-OxoG durch beide Substanzen auch in Anwesenheit von NAC getestet. Während für TEGDMA bereits Hinweise auf einen schützenden Effekt von NAC vorlagen (Schweikl *et al.*, 2007), fehlten allerdings bisher Daten für die Wirkung des Oxirans K126.

Vergleicht man die Bildung von 8-OxoG nach einer kurzen Exposition von zwei Stunden gegen TEGDMA, so war mit NAC keine Veränderung erkennbar. Allerdings wurde nach 24 Stunden eine leichte Verringerung der Menge an 8-OxoG vor allem nach Exposition gegen 3mM TEGDMA erkennbar. Dennoch war auch in den

Ansätzen mit NAC der Grad der DNA-Schädigung höher als in unbehandelten Kulturen. Nach der langen Expositionszeit von 48 Stunden wurde der schützende Effekt von NAC vor allem mit 1mM TEGDMA noch deutlicher. Derselbe inhibitorische Effekt von NAC auf die Bildung von 8-OxoG durch TEGDMA wurde kürzlich auch in THP-1 Monozyten gefunden (Eckhardt *et al.*, 2009).

Für sämtliche K126-Konzentrationen war im Unterschied zu den Beobachtungen mit TEGDMA ein eindeutig zeit- und konzentrationsabhängiger Effekt von NAC auf die Bildung von 8-OxoG nicht erkennbar. Ein etwa dreifacher Anstieg der Menge an 8-OxoG nach einer kurzen Expositionsdauer von 2h lediglich durch 3mM K126 blieb auch in Anwesenheit von NAC unverändert. Ein ganz ähnlicher Effekt wurde nach 24h Exposition mit der geringeren Konzentration von 1mM K126 gefunden. Nach 48h verursachte die noch geringere Konzentration von 0,3mM K126 eine etwa dreifache Erhöhung der Menge an 8-OxoG, allerdings war auch hier eine schützende Wirkung von NAC nicht erkennbar. Im Gegenteil, in Anwesenheit von NAC stieg die Menge an 8-OxoG sogar, die durch 1 mM K126 erzeugt wurde. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Bildung von 8-OxoG an die steigende Toxizität von K126 gebunden zu sein scheint und damit wohl kein primärer Effekt von K126 ist.

Damit darf man auch annehmen, dass NAC keinen deutlichen Einfluss auf die Genotoxizität von K126 hat, wenn man die Bildung von 8-OxoG als Kriterium wählt. Im Unterschied dazu war mit TEGDMA eine tendenzielle Senkung der 8-OxoG-Bildung in Anwesenheit von NAC verglichen mit Ansätzen ohne NAC erkennbar. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass der Zusatz von 10 mM/L NAC auch die Zytotoxizität in TEGDMA-exponierte Zellen reduzierte, während dieser Effekt mit K126 nicht zu beobachten war. Somit hat NAC einen schützenden Einfluss gegen die TEGDMA-induzierte Zytotoxizität und Genotoxizität, nicht jedoch auf die Wirkung von K126. Diese Beobachtung gilt des Weiteren für die Fähigkeit beider Substanzen zur Induktion chromosomaler Mutationen in Form von Mikrokernen (Abb. 22) . Im Unterschied zur Wirkung von TEGDMA, hatte die Anwesenheit von NAC keinen Einfluss auf die Bildung von Mikrokernen durch K126 (Schweikl, 2009).

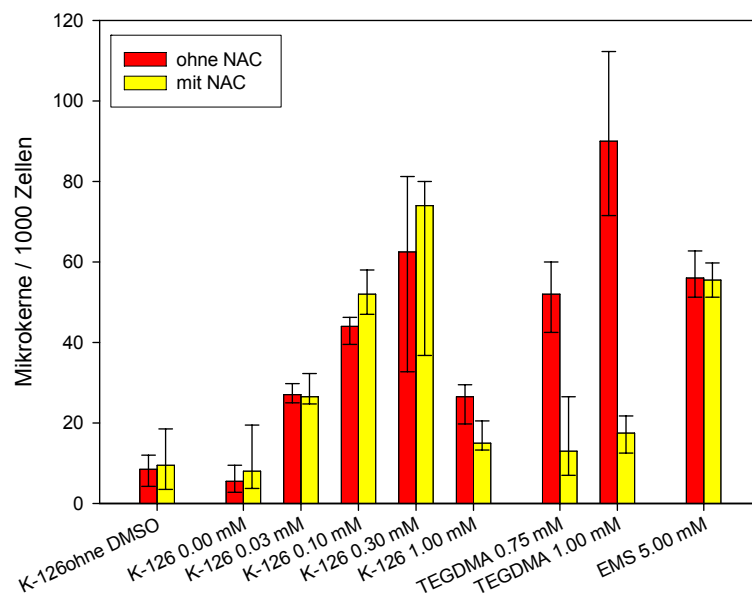


Abb. 22: Die Bildung von Mikrokernen in V79B-Zellen. Zellkulturen wurden mit dem Dimethacrylat TEGDMA und dem Oxiran K-126 mit und ohne N-Acetylcystein (NAC) für 24h exponiert. EMS (Ethylmethansulfonat) wurde als Positivkontrollen verwendet. Es sind Mediane sowie 25 und 75% Perzentile gezeigt (n=4-6).

Man darf daher annehmen, dass die Vertreter der Acrylate, das TEGDMA, und der Oxirane, der Epoxyester K126, über verschiedene Mechanismen genotoxisch wirken. Während TEGDMA anscheinend indirekt durch die Produktion von ROS oxidative DNA-Schäden erzeugt, bewirkt das Oxiran wahrscheinlich nicht über ROS und oxidative DNA-Schäden sondern direkt genotoxische Effekte.

6 Zusammenfassung

Kompositwerkstoffe setzen bekannter weise aufgrund unvollständiger Polymerisation, aber auch durch Biodegradation oder Erosion unter klinischen Bedingungen einzelne Bestandteile frei. Weil diese reaktiven Komponenten unerwünschte biologische Reaktionen in Zellen der Mundhöhle auslösen könnten, wird empfohlen, die Biokompatibilität zahnärztlicher Werkstoffe zu prüfen.

Monomere zahnärztlicher Komposite auf der Basis von Methacrylaten wie das Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) sind in Zellkulturen zytotoxisch und genotoxisch. Diese Schädigung von Funktionen eukaryontischer Zellen durch Methacrylate ist wahrscheinlich die Folge der Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Die Verwendung von Siloranen als Komponenten der organischen Matrix kennzeichnet eine neue Generation von Kompositen. Silorane verknüpfen die gute Biokompatibilität von Siloxanen mit der für die Polymerisationsreaktion dentaler Komposite wünschenswerten Reaktivität von Epoxiden (Oxirane), die auch den Polymerisationsschrumpf reduzieren sollten. Epoxide wie der Epoxyester K126 erzeugten ähnlich wie das Dimethacrylat TEGDMA Punktmutationen und eine erhöhte Anzahl an Mikrokernen *in vitro*. Ein Mechanismus der Genotoxizität dieser Substanzen möglicherweise über die Produktion von ROS und oxidativer DNA-Schäden in Form von 8-OxoG ist nicht bekannt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Bildung von 8-OxoG durch den Epoxyester K126 vergleichend mit der Wirkung von TEGDMA untersucht. Die Bedeutung von ROS für die Genotoxizität von TEGDMA und K126 wurde außerdem mit Hilfe des Antioxidationsmittels N-Acetylcystein (NAC) analysiert. Die Bildung von 8-OxoG, das Hauptaddukt oxidativer DNA Schäden, wurde nach Exposition von V79B-Zellen gegen TEGDMA oder K126 mit einem spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörper detektiert und mittels Durchflusszytometrie (FACS) nach unterschiedlich langen Expositionszeiten (2-48 Stunden) quantifiziert.

Das Comonomer TEGDMA (1mM und 3mM) erhöhte nach einer Expositionszeit von 24 Stunden die Menge an 8-OxoG etwa um den Faktor 2 und nach 48 Stunden etwa um den Faktor 7. Die Anwesenheit von NAC reduzierte die Menge an 8-OxoG, in TEGDMA-exponierten Zellkulturen. Auch der Epoxyester K126 förderte die Bildung von 8-OxoG. Die Menge an 8-OxoG stieg bereits nach 2h Exposition gegen 3mM K126 etwa um das Dreifache, und mit steigenden Expositionszeiten wurde eine

ähnliche Wirkung mit geringeren Konzentrationen an K126 gefunden. Interessant ist, dass NAC in Anwesenheit des Epoxyesters K126 im Unterschied zu TEGDMA keinen schützenden Effekt hatte. Weil auch die Zytotoxizität sowie die Fähigkeit zur Bildung von Mikrokernen durch den Epoxyester durch NAC nicht beeinflusst wurden, darf man daraus schließen, dass die Genotoxizität des K126 einem anderen molekularen Mechanismus folgt als diejenige des TEGDMA. Vermutlich ist K126 eine DNA-alkylierende Substanz, möglicherweise über eine Michael-Addition, und erzeugt DNA-Schäden nicht indirekt über die Bildung von ROS. Allerdings sind die genauen molekularen Vorgänge der genetischen Toxizität von K126 bisher noch unbekannt. Dennoch tragen auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dazu bei, die Mechanismen der Toxizität zahnärztlicher Werkstoffe auf zellbiologischer Ebene besser zu verstehen. Damit ermöglichen sie die Entwicklung effektiver Strategien zum Schutz von Zielgeweben, denn das Verständnis von Einzelheiten dieser Mechanismen sollte zu einer besseren Einschätzung der mit restaurativen Zahnbehandlungen verbundenen Risiken führen.

7 Anhang

7.1.1 Literaturverzeichnis

- Ames RP (1983). Metabolic disturbances increasing the risk of coronary heart disease during diuretic-based antihypertensive therapy: lipid alterations und glucose intolerance. *Am. Heart J.* 106:1207–1214.
- Ardite E, Sans M, Panés J, Romero FJ, Piqué JM, Fernández-Checa JC (2000). Replenishment of glutathione levels improves mucosal function in experimental acute colitis. *Lab. Invest.* 80:735–744.
- Arenholt-Bindslev D, Schmalz-Arenholt-Bindslev (2005). Biokompatibilität zahnärztlicher Werkstoffe. Mit 55 Tabellen. München: Elsevier [u.a.].
- Atai M, Watts DC (2006). A new kinetic model for the photopolymerization shrinkage-strain of dental composites and resin-monomers. *Dent Mater* 22:785–791.
- Atsumi T, Iwakura I, Fujisawa S, Ueha T (2001). The production of reactive oxygen species by irradiated camphorquinone-related photosensitizers und their effect on cytotoxicity. *Arch. Oral Biol.* 46:391–401.
- Barzilai A, Yamamoto K. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst.)* 3:1109–1115.
- Behrend L, Henderson G, Zwacka RM (2003). Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem. Soc. Trans.* 31:1441–1444.
- Besaratinia A, Pfeifer GP (2005). DNA adduction und mutagenic properties of acrylamide. *Mutat. Res.* 580:31–40.
- Boonstra J, Post JA (2004). Molecular events associated with reactive oxygen species und cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 337:1–13.
- Bounous G, Molson JH. The antioxidant system. *Anticancer Res.* 23:1411–1415.
- Bowen RL (1963). Properties of a silica-reinforced polymer for dental restorations. *Journal of the American Dental Association (1939)* 66:57–64.
- Bradley MO, Bhuyan B, Francis MC, Langenbach R, Peterson A, Huberman E (1981). Mutagenesis by chemical agents in V79 chinese hamster cells: a review und analysis of the literature. A report of the Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 87:81–142.
- Braga RR, Ballester RY, Ferracane JL (2005). Factors involved in the development of polymerization shrinkage stress in resin-composites: a systematic review. *Dent Mater* 21:962–970.
- Brüne B. The intimate relation between nitric oxide und superoxide in apoptosis und cell survival. *Antioxid. Redox Signal.* 7:497–507.
- Bubici C, Papa S, Pham CG, Zazzeroni F, Franzoso G (2006). The NF-kappaB-mediated control of ROS und JNK signaling. *Histol. Histopathol.* 21:69–80.
- Cerutti PA (1985). Prooxidant states und tumor promotion. *Science* 227:375–381.
- Chandra J, Samali A, Orrenius S (2000). Triggering und modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 29:323–333.
- Cheadle JP, Sampson JR (2007). MUTYH-associated polyposis--from defect in base excision repair to clinical genetic testing. *DNA Repair (Amst.)* 6:274–279.
- Chiou CC, Chang PY, Chan EC, Wu TL, Tsao KC, Wu JT (2003). Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine und its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA und measurement in both bladder und prostate cancers. *Clin. Chim. Acta* 334:87–94.
- Condon JR, Ferracane JL (2002). Reduced polymerization stress through non-bonded nanofiller particles. *Biomaterials* 23:3807–3815.
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, und disease. *FASEB J.* 17:1195–1214.
- Crout DH, Lloyd EJ, Singh J (1982). Metabolism of methyl methacrylate: evidence for metabolism by the valine pathway of catabolism in rat und in man. *Xenobiotica* 12:821–829.
- Dauvillier BS, Aarnts MP, Feilzer AJ (2000). Developments in shrinkage control of adhesive restoratives. *Journal of esthetic dentistry* 12:291–299.
- Demirci M, Hiller K, Bosl C, Galler K, Schmalz G, Schweikl H (2008). The induction of oxidative stress, cytotoxicity, und genotoxicity by dental adhesives. *Dent Mater* 24:362–371.
- DIN EN ISO 7405, Ausgabe: 2009-06, Zahnheilkunde - Beurteilung der Biokompatibilität von in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukten (ISO 7405:2008); Deutsche Fassung

- EN ISO 7405:2008. <http://www.beuth.de/langanzeige/DIN+EN+ISO+7405/110198015.html> (Feb 14, 2010).
- Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms und measurement. *Free Radic. Biol. Med.* 32:1102–1115.
- Dneboský J, Hynková V, Hrabák F (1975). Polymerizable amines as promoters of cold-curing resins und composites. *J. Dent. Res.* 54:772–776.
- Dröge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82:47–95.
- Dudás A, Chovanec M (2004). DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Mutat. Res.* 566:131–167.
- Durner J, Spahl W, Zaspel J, Schweikl H, Hickel R, Reichl F (2010). Eluted substances from unpolymerized and polymerized dental restorative materials and their Nernst partition coefficient. *Dent Mater* 26:91–99.
- Eckhardt A, Gerstmayr N, Hiller K, Bolay C, Waha C, Spagnuolo G et al. (2009). TEGDMA-induced oxidative DNA damage und activation of ATM und MAP kinases. *Biomaterials* 30:2006–2014.
- Ehrenberg L, Hussain S (1981). Genetic toxicity of some important epoxides. *Mutat. Res.* 86:1–113.
- Eick JD, Kostoryz EL, Rozzi SM, Jacobs DW, Oxman JD, Chappelow CC et al. (2002). In vitro biocompatibility of oxirane/polyol dental composites with promising physical properties. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 18:413–421.
- Engelmann J, Leyhausen G, Leibfritz D, Geurtsen W (2002). Effect of TEGDMA on the intracellular glutathione concentration of human gingival fibroblasts. *J. Biomed. Mater. Res.* 63:746–751.
- Engelmann J, Volk J, Leyhausen G, Geurtsen W (2005). ROS formation und glutathione levels in human oral fibroblasts exposed to TEGDMA und camphorquinone. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 75:272–276.
- Epe B, Hegler J (1994). Oxidative DNA damage: endonuclease fingerprinting. *Meth. Enzymol.* 234:122–131.
- FACS and array core facility der Uni Mainz. Was ist Durchflußzytometrie? <http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp> (Sep 15, 2009).
- Ferracane JL (1995). Current trends in dental composites. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 6:302–318.
- Finer Y, Santerre JP (2004). Salivary esterase activity und its association with the biodegradation of dental composites. *J. Dent. Res.* 83:22–26.
- Flora S de, Izzotti A, D'Agostini F, Balansky RM (2001). Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage und cancer, with special reference to smoking-related end-points. *Carcinogenesis* 22:999–1013.
- Forss H, Widström E (2004). Reasons for restorative therapy und the longevity of restorations in adults. *Acta Odontol. Scand.* 62:82–86.
- Fortini P, Pascucci B, Parlanti E, D'Errico M, Simonelli V, Dogliotti E (2003). 8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways. *Mutat. Res.* 531:127–139.
- Freund M, Munksgaard EC (1990). Enzymatic degradation of BISGMA/TEGDMA-polymers causing decreased microhardness und greater wear in vitro. *Scandinavian journal of dental research* 98:351–355.
- Gao D, Luo Y, Guevara D, Wang Y, Rui M, Goldwyn B et al. (2005). Benzo[a]pyrene und its metabolites combined with ultraviolet A synergistically induce 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine via reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 39:1177–1183.
- Genzlinger (1999). Genzlinger, Anja- Apoptosebestimmung mittels 2-Parameter-Durchflußzytometrie, Agarose-Gelelektrophorese und Fluoreszenzmikroskopie nach Induktion durch alpha,beta-ungesättigte Aldehyde und Ketone. <http://kluedo.ub.uni-kl.de/volltexte/2000/9/> (Sep 15, 2009).
- Gerzina TM, Hume WR. Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine in vitro. *Journal of dentistry* 24:125–128.
- Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G (1998). Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 und three human primary fibroblast cultures. *J. Biomed. Mater. Res.* 41:474–480.
- Geurtsen W, Leyhausen G (2001). Chemical-Biological Interactions of the resin monomer triethyleneglycol-dimethacrylate (TEGDMA). *J. Dent. Res.* 80:2046–2050.
- Göpferich A (1996). Mechanisms of polymer degradation und erosion. *Biomaterials* 17:103–114.
- Guggenberger R, Weinmann W (2000). Exploring beyond methacrylates. *American journal of dentistry* 13:82D-84D.
- Guindon KA, Bedard LL, Massey TE (2007). Elevation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA from isolated mouse lung cells following in vivo treatment with aflatoxin B(1). *Toxicol. Sci.* 98:57–62.
- Halliwell B, Aruoma OI (1991). DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism und measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 281:9–19.

- Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG (1991). Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J. Dent. Res.* 70:1450–1455.
- Hanks CT, Wataha JC, Parsell RR, Strawn SE, Fat JC (1994). Permeability of biological und synthetic molecules through dentine. *Journal of oral rehabilitation* 21:475–487.
- Hemminki K, Vainio H (1984). Genotoxicity of epoxides and epoxy compounds. *Prog. Clin. Biol. Res.* 141:373–384.
- Hume WR, Gerzina TM (1996). Bioavailability of components of resin-based materials which are applied to teeth. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 7:172–179.
- Hwang E, Kim G (2007). Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. *Toxicology* 229:1–10.
- Imlay JA, Chin SM, Linn S (1988). Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo und in vitro. *Science* 240:640–642.
- ISO 10993-3:2003. <http://www.iso.org/iso/rss.xml?csnumber=32162&rss=detail> (Sep 28, 2009).
- Jaffer F, Finer Y, Santerre JP (2002). Interactions between resin monomers und commercial composite resins with human saliva derived esterases. *Biomaterials* 23:1707–1719.
- Jia S, Liang M, Guo L (2008). Photoelectrochemical detection of oxidative DNA damage induced by Fenton reaction with low concentration und DNA-associated Fe²⁺. *The journal of physical chemistry. B* 112:4461–4464.
- Jontell M, Hanks CT, Bratel J, Bergenholtz G (1995). Effects of unpolymerized resin components on the function of accessory cells derived from the rat incisor pulp. *J. Dent. Res.* 74:1162–1167.
- Kaina B (2003). DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation und signaling. *Biochem. Pharmacol.* 66:1547–1554.
- Kanerva L (2001). Cross-reactions of multifunctional methacrylates and acrylates. *Acta Odontol. Scand.* 59:320–329.
- Khalichi P, Cvitkovitch DG, Santerre JP (2004). Effect of composite resin biodegradation products on oral streptococcal growth. *Biomaterials* 25:5467–5472.
- Kim S, Kokubo K, Matsui K, Yamada N, Kanke Y, Fukuoka M et al. (2005). Light-dependent mutagenesis by benzo[a]pyrene is mediated via oxidative DNA damage. *Environ. Mol. Mutagen.* 46:141–149.
- Kleinsasser NH, Schmid K, Sassen AW, Harréus UA, Staudenmaier R, Folwaczny M et al. (2006). Cytotoxic und genotoxic effects of resin monomers in human salivary gland tissue und lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (Comet) assay. *Biomaterials* 27:1762–1770.
- Kleinsasser NH, Wallner BC, Harréus UA, Kleinjung T, Folwaczny M, Hickel R et al. (2004). Genotoxicity und cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *Journal of dentistry* 32:229–234.
- Kostoryz EL, Tong PY, Chappelow CC, Glaros AG, Eick JD, Yourtee DM (2000). In vitro toxicity of spiroorthocarbonate monomers designed for non-shrinking dental restoratives. *Journal of biomaterials science. Polymer edition* 11:187–196.
- Kostoryz EL, Zhu Q, Zhao H, Glaros AG, Eick JD (2007). Assessment of cytotoxicity und DNA damage exhibited by siloranes und oxiranes in cultured mammalian cells. *Mutat. Res.* 634:156–162.
- Kostoryz EL, Wetmore LA, Brockmann WG, Yourtee DM, Eick JD (2004). Genotoxicity assessment of oxirane-based dental monomers in mammalian cells. *Journal of biomedical materials research. Part A* 68:660–667.
- Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssière JL, Mignotte B (1995). The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.* 9:1277–1287.
- Lee B, Chang C, Chen W, Lan W, Lin C (2005). In vitro study of dentin hypersensitivity treated by Nd:YAP laser und bioglass. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 21:511–519.
- Lefevre M, Bourd K, Lorient M, Goldberg M, Beaune P, Périanin A et al. (2004). TEGDMA modulates glutathione transferase P1 activity in gingival fibroblasts. *J. Dent. Res.* 83:914–919.
- Lefevre M, Amjaad W, Goldberg M, Stanislawski L (2005). TEGDMA induces mitochondrial damage und oxidative stress in human gingival fibroblasts. *Biomaterials* 26:5130–5137.
- Lim BS, Ferracane JL, Condon JR, Adey JD (2002). Effect of filler fraction und filler surface treatment on wear of microfilled composites. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 18:1–11.
- Lloyd DR, Phillips DH (1999). Oxidative DNA damage mediated by copper(II), iron(II) und nickel(II) fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine und putative intrastrand cross-links. *Mutat. Res.* 424:23–36.

- Lygre H, Høl PJ, Solheim E, Moe G (1999). Organic leachables from polymer-based dental filling materials. *Eur. J. Oral Sci.* 107:378–383.
- Malins DC, Hellstrom KE, Anderson KM, Johnson PM, Vinson MA (2002a). Antioxidant-induced changes in oxidized DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:5937–5941.
- Malins DC, Hellstrom KE, Anderson KM, Johnson PM, Vinson MA (2002b). Antioxidant-induced changes in oxidized DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:5937–5941.
- Marnett LJ (1994). DNA adducts of alpha,beta-unsaturated aldehydes und dicarbonyl compounds. *IARC Sci. Publ.* (125):151–163.
- Marquardt W, Seiss M, Hickel R, Reichl FX (2009). Volatile methacrylates in dental practices. *The journal of adhesive dentistry* 11:101–107.
- Michelsen VB, Moe G, Strøm MB, Jensen E, Lygre H (2008). Quantitative analysis of TEGDMA and HEMA eluted into saliva from two dental composites by use of GC/MS and tailor-made internal standards. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 24:724–731.
- Michelsen VB, Lygre H, Skålevik R, Tveit AB, Solheim E (2003). Identification of organic eluates from four polymer-based dental filling materials. *Eur. J. Oral Sci.* 111:263–271.
- Mjör IA, Ferrari M (2002). Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 6: Reactions to restorative materials, tooth-restoration interfaces, and adhesive techniques. *Quintessence international (Berlin, Germany : 1985)* 33:35–63.
- Munksgaard EC, Hansen EK, Kato H (1987). Wall-to-wall polymerization contraction of composite resins versus filler content. *Scandinavian journal of dental research* 95:526–531.
- Munksgaard EC (2005). Plasticizers in denture soft-lining materials: leaching und biodegradation. *Eur. J. Oral Sci.* 113:166–169.
- Musanje L, Ferracane JL, Ferracane LL (2006). Effects of resin formulation and nanofiller surface treatment on in vitro wear of experimental hybrid resin composite. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 77:120–125.
- Nocca G, D'Antò V, Desiderio C, Rossetti DV, Valletta R, Baquala AM et al. (2010). N-acetyl cysteine directed detoxification of 2-hydroxyethyl methacrylate by adduct formation. *Biomaterials* 31:2508–2516.
- Noda M, Wataha JC, Kaga M, Lockwood PE, Volkmann KR, Sano H (2002). Components of dentinal adhesives modulate heat shock protein 72 expression in heat-stressed THP-1 human monocytes at sublethal concentrations. *J. Dent. Res.* 81:265–269.
- Oberholzer TG, Pameijer CH, Grobler SR, Rossouw RJ (2004). Volumetric polymerisation shrinkage of different dental restorative materials. *SADJ : journal of the South African Dental Association = tydskrif van die Suid-Afrikaanse Tandheekkundige Vereniging* 59:8–12.
- Oktyabrsky ON, Smirnova GV (2007). Redox regulation of cellular functions. *Biochemistry Mosc.* 72:132–145.
- Palin WM, Fleming GJP (2003). Low-shrink monomers for dental restorations. *Dent Update* 30:118–122.
- Palin WM, Fleming GJP, Burke FJT, Marquis PM, Randall RC (2005). The influence of short and medium-term water immersion on the hydrolytic stability of novel low-shrink dental composites. *Dent Mater* 21:852–863.
- Pashley DH, Carvalho RM, Tay FR, Agee KA, Lee K (2002a). Solvation of dried dentin matrix by water and other polar solvents. *American journal of dentistry* 15:97–102.
- Pashley DH, Pashley EL, Carvalho RM, Tay FR (2002b). The effects of dentin permeability on restorative dentistry. *Dent. Clin. North Am.* 46:211-45, v-vi.
- Pelka M, Distler W, Petschelt A (1999). Elution parameters und HPLC-detection of single components from resin composite. *Clinical oral investigations* 3:194–200.
- Penning TM, Ohnishi ST, Ohnishi T, Harvey RG. Generation of reactive oxygen species during the enzymatic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiols catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. *Chem. Res. Toxicol.* 9:84–92.
- Persinger RL, Melamede R, Bespalov I, Wallace S, Taatjes DJ, Janssen-Heininger Y (2001). Imaging techniques used for the detection of 8-oxoguanine adducts and DNA repair proteins in cells and tissues. *Exp. Gerontol.* 36:1483–1494.
- Peutzfeldt A (1997). Resin composites in dentistry: the monomer systems. *Eur. J. Oral Sci.* 105:97–116.
- Proteggente AR, England TG, Rehman A, Rice-Evans CA, Halliwell B (2002). Gender differences in steady-state levels of oxidative damage to DNA in healthy individuals. *Free Radic. Res.* 36:157–162.
- Radcliff G, Jaroszeski MJ (1998). Basics of flow cytometry. *Methods Mol. Biol.* 91:1–24.
- Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB (1995). Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J. Dent. Res.* 74:1602–1606.

- Reichenberger F, Tamm M (2002). [N-acetylcystein in the therapy of chronic bronchitis]. *Pneumologie* 56:793–797.
- Reichl F, Durner J, Hickel R, Spahl W, Kehe K, Walther U et al. (2002). Uptake, clearance und metabolism of TEGDMA in guinea pigs. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 18:581–589.
- Reliene R, Fischer E, Schiestl RH (2004). Effect of N-acetyl cysteine on oxidative DNA damage und the frequency of DNA deletions in atm-deficient mice. *Cancer Res.* 64:5148–5153.
- Robinson JP (1993). Handbook of flow cytometry methods. New York: Wiley-Liss.
- Rochat T, Lacroix J, Jornot L (2004). N-acetylcysteine inhibits Na⁺ absorption across human nasal epithelial cells. *J. Cell. Physiol.* 201:106–116.
- Santerre JP, Shajii L, Leung BW (2001). Relation of dental composite formulations to their degradation und the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 12:136–151.
- Santerre JP, Shajii L, Tsang H (1999). Biodegradation of commercial dental composites by cholesterol esterase. *J. Dent. Res.* 78:1459–1468.
- Shen Y, Troxel AB, Vedantam S, Penning TM, Field J (2006). Comparison of p53 mutations induced by PAH o-quinones with those caused by anti-benzo[a]pyrene diol epoxide in vitro: role of reactive oxygen and biological selection. *Chem. Res. Toxicol.* 19:1441–1450.
- Schweikl H, Schmalz G (1999). Triethylene glycol dimethacrylate induces large deletions in the hprt gene of V79 cells. *Mutat. Res.* 438:71–78.
- Schweikl H, Schmalz G, Weinmann W (2004). The induction of gene mutations and micronuclei by oxiranes and siloranes in mammalian cells in vitro. *J. Dent. Res.* 83:17–21.
- Schweikl H, Hiller K, Eckhardt A, Bolay C, Spagnuolo G, Stempf T et al. (2008). Differential gene expression involved in oxidative stress response caused by triethylene glycol dimethacrylate. *Biomaterials* 29:1377–1387.
- Schweikl, Helmut (2009). Molekulare Toxikologie von Monomeren zahnärztlicher Komposite. Forschungsbericht - Publikationsserver der Universität Regensburg. <http://epub.uni-regensburg.de/10849/> (Dec 20, 2009).
- Schweikl H, Hartmann A, Hiller K, Spagnuolo G, Bolay C, Brockhoff G et al. (2007). Inhibition of TEGDMA und HEMA-induced genotoxicity und cell cycle arrest by N-acetylcysteine. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 23:688–695.
- Schweikl H, Schmalz G, Rackebrandt K (1998). The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in Salmonella typhimurium und V79 cells. *Mutat. Res.* 415:119–130.
- Schweikl H, Schmalz G, Spruss T (2001). The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J. Dent. Res.* 80:1615–1620.
- Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G (2006). Genetic und cellular toxicology of dental resin monomers. *J. Dent. Res.* 85:870–877.
- Schweikl H, Schmalz G, Weinmann W (2002). Mutagenic activity of structurally related oxiranes und siloranes in Salmonella typhimurium. *Mutat. Res.* 521:19–27.
- Seiss M, Nitz S, Kleinsasser N, Buters JTM, Behrendt H, Hickel R et al. (2007). Identification of 2,3-epoxymethacrylic acid as an intermediate in the metabolism of dental materials in human liver microsomes. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 23:9–16.
- Seiss M, Track N, Hickel R, Reichl F (2009). In vitro stability of methylmethacrylic acid, TEGDMA und HEMA exposed to esterases. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 25:1044–1049.
- Silikas N, Eliades G, Watts DC (2000). Light intensity effects on resin-composite degree of conversion und shrinkage strain. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 16:292–296.
- Soheili Majd E, Goldberg M, Stanislawski L (2003). In vitro effects of ascorbate und Trolox on the biocompatibility of dental restorative materials. *Biomaterials* 24:3–9.
- Solomon JJ (1999). Cyclic adducts und intermediates induced by simple epoxides. *IARC Sci. Publ.* (150):123–135.
- Stanislawski L, Soheili-Majd E, Perianin A, Goldberg M (2000). Dental restorative biomaterials induce glutathione depletion in cultured human gingival fibroblast: protective effect of N-acetyl cysteine. *J. Biomed. Mater. Res.* 51:469–474.
- Stanislawski L, Lefevre M, Bourd K, Soheili-Majd E, Goldberg M, Périanin A (2003). TEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early und drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *Journal of biomedical materials research. Part A* 66:476–482.

- Urcan E, Scherthan H, Styllou M, Haertel U, Hickel R, Reichl F (2010). Induction of DNA double-strand breaks in primary gingival fibroblasts by exposure to dental resin composites. *Biomaterials* 31:2010–2014.
- Vettori MV, Cagliari A, Goldoni M, Castoldi AF, Darè E, Alinovi R et al. (2005). Analysis of oxidative stress in SK-N-MC neurons exposed to styrene-7,8-oxide. *Toxicol In Vitro* 19:11–20.
- Volk J, Engelmann J, Leyhausen G, Geurtsen W (2006). Effects of three resin monomers on the cellular glutathione concentration of cultured human gingival fibroblasts. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 22:499–505.
- Wallace SS (2002). Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic. Biol. Med.* 33:1–14.
- Walther UI, Siagian II, Walther SC, Reichl FX, Hickel R (2004). Antioxidative vitamins decrease cytotoxicity of HEMA und TEGDMA in cultured cell lines. *Arch. Oral Biol.* 49:125–131.
- Wang J, Xiong S, Xie C, Markesbery WR, Lovell MA (2005). Increased oxidative damage in nuclear und mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 93:953–962.
- Wataha JC, Hanks CT, Strawn SE, Fat JC (1994). Cytotoxicity of components of resins und other dental restorative materials. *Journal of oral rehabilitation* 21:453–462.
- Weinmann W, Thalacker C, Guggenberger R (2005). Siloranes in dental composites. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 21:68–74.
- Witz G (1989). Biological interactions of alpha,beta-unsaturated aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 7:333–349.
- Wu X, Kassie F, Mersch-Sundermann V (2005). Induction of apoptosis in tumor cells by naturally occurring sulfur-containing compounds. *Mutat. Res.* 589:81–102.
- Yourtee D, Holder AJ, Smith R, Morrill JA, Kostoryz E, Brockmann W et al. (2001a). Quantum mechanical quantitative structure activity relationships to avoid mutagenicity in dental monomers. *Journal of biomaterials science. Polymer edition* 12:89–105.
- Yourtee DM, Smith RE, Russo KA, Burmaster S, Cannon JM, Eick JD et al. (2001b). The stability of methacrylate biomaterials when enzyme challenged: kinetic und systematic evaluations. *J. Biomed. Mater. Res.* 57:522–531.
- Yusof M, Yildiz D, Ercal N (1999). N-acetyl-L-cysteine protects against delta-aminolevulinic acid-induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation. *Toxicol. Lett.* 106:41–47.
- Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M (2003). Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell. Mol. Life Sci.* 60:6–20.
- Zecca L, Youdim MBH, Riederer P, Connor JR, Crichton RR (2004). Iron, brain ageing und neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 5:863–873.

7.1.2 Danksagung

Aufs herzlichste danke ich Herrn Prof. Dr. Helmut Schweikl für die Überlassung des Themas, seine unermüdliche Unterstützung, die angenehme Atmosphäre bei den Besprechungen und für die viele Zeit und Geduld.

Herrn Prof. Dr. Gottfried Schmalz danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit unter seiner Schirmherrschaft durchführen zu können.

Bei Herrn Dr. Alexander Eckhardt bedanke ich mich für seine engagierte Unterstützung während der praktischen Ausführung der Arbeit.

Großer Dank gilt auch Frau Claudia Waha und Frau Carola Bolay für die freundliche sehr angenehme Zusammenarbeit und ihre Geduld.

Herrn Dr. Karl-Anton Hiller danke ich für die mathematisch-statistische Auswertung der vielen Daten.

Allen Mitarbeiter des Forschungsbereichs der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie danke ich für die fachliche Beratung und stetige Unterstützung, sowie für die wahnsinnig angenehme und hilfsbereite Atmosphäre.

