

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische  
und ästhetische Operationen der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Rudolf Hagen

# **DNA-Strangbruchinduktion, Mikrokernbildung, Zellzyklusalteration und Apoptose durch Zahnwerkstoffe in humanen Lymphozyten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Sabrina Zinnitsch  
aus Crailsheim

Würzburg, Juni 2010

Referent: Prof. Dr. med. Norbert Kleinsasser

Korreferent: Prof. Dr. med. dent. Bernd Klaiber

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2010

Die Promovendin ist Zahnärztin

**Wer nicht mehr will als er kann,  
bleibt unter seinem Können!**

Herbert Marcuse

(deutsch-amerikanischer Soziologe und Philosoph)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Kapitel 1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Zahnärztliche Füllungsmaterialien – Gefährdung durch Komposite?</b>	<b>1</b>
1.1.1	Einteilung zahnfarbener Füllungsmaterialien	2
1.1.2	Komposite	3
1.1.2.1	HEMA und TEGDMA	4
1.1.2.2	Restmonomere	6
1.1.3	Biologische Verträglichkeit	9
1.1.3.1	Wirkung freigesetzter (Ko)Monomere auf den Organismus	9
<b>1.2</b>	<b>Apoptose</b>	<b>13</b>
<b>1.3</b>	<b>Zellzyklus</b>	<b>15</b>
<b>1.4</b>	<b>Chromosomen</b>	<b>17</b>
<b>1.5</b>	<b>Arbeitshypothese und Ziele der Arbeit</b>	<b>18</b>
<b>Kapitel 2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Lymphozytenisolierung</b>	<b>19</b>
2.1.1	Methoden zur Lymphozytenisolierung	19
2.1.2	Lösungen	20
<b>2.2</b>	<b>Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung</b>	<b>21</b>
2.2.1	Trypanblau-Ausschlusstest	21
2.2.2	CASY-Zellzählgerät	21
<b>2.3</b>	<b>Stimulierung der Lymphozyten</b>	<b>23</b>
2.3.1	Lösungen	23
<b>2.4</b>	<b>Behandlung der Lymphozyten</b>	<b>24</b>
2.4.1	Lösungen	25
<b>2.5</b>	<b>Comet Assay</b>	<b>26</b>
2.5.1	Grundlagen des Comet Assay	26
2.5.2	Grundlagen des Comet Assay mit Fpg	26

2.5.3	Puffer und Lösungen	27
2.5.4	Durchführung	28
2.5.4.1	Beschichtung der Objektträger	28
2.5.4.2	Durchführung des Comet Assay mit Fpg	29
2.5.5	Auswertung des Comet Assay mit Fpg	30
<b>2.6</b>	<b>Mikrokerntest</b>	<b>31</b>
2.6.1	Grundlagen des Mikrokerntests	31
2.6.2	Puffer und Lösungen	32
2.6.3	Durchführung des Mikrokerntests	33
2.6.4	Auswertung des Mikrokerntests	33
<b>2.7</b>	<b>Durchflusszytometrie</b>	<b>34</b>
2.7.1	Grundlagen der Durchflusszytometrie	34
2.7.2	Apoptosemessung	35
2.7.2.1	Grundlagen der Apoptosemessung	35
2.7.2.2	Puffer und Lösungen	36
2.7.2.3	Durchführung der Apoptosemessung	36
2.7.3	Zellzyklusanalyse	38
2.7.3.1	Grundlagen der Zellzyklusanalyse	38
2.7.3.2	Puffer und Lösungen	39
2.7.3.3	Durchführung der Zellzyklusanalyse	39
2.7.3.4	Auswertung der Zellzyklusanalyse	39
<b>2.8</b>	<b>Chromosomentests</b>	<b>40</b>
2.8.1	Grundlagen des Chromosomenaberrationstests	40
2.8.2	Grundlagen des Schwesterchromatidaustauschtests	40
2.8.3	Vorbereitungen	41
2.8.4	Puffer und Lösungen	41
2.8.5	Chromosomenpräparation	42
2.8.6	Färbung der Chromosomenaberrationen	43
2.8.7	Auswertung des Chromosomenaberrationstests	43
2.8.8	Färbung der Schwesterchromatidaustausche	45
2.8.9	Auswertung des Schwesterchromatidaustauschtests	45
<b>2.9</b>	<b>Statistische Analyse</b>	<b>47</b>
2.9.1	Grafische Darstellung der Ergebnisse	47
2.9.2	Statistische Testverfahren	47
2.9.2.1	Friedman-Test	47
2.9.2.2	Wilcoxon-Test	48

<b>2.10</b>	<b>Methodenspezifische Labormaterialien</b>	<b>49</b>
2.10.1	Chemikalien	49
2.10.2	Geräte und Zubehör	51
2.10.3	Verbrauchsmaterialien	52

## **Kapitel 3 Ergebnisse 53**

<b>3.1</b>	<b>Zahlen - Daten - Fakten</b>	<b>53</b>
<b>3.2</b>	<b>Zahlen</b>	<b>54</b>
3.2.1	Zellzahlen der mit HEMA behandelten Lymphozyten	54
3.2.2	Zellzahlen der mit TEGDMA behandelten Lymphozyten	56
<b>3.3</b>	<b>Vitalitäten</b>	<b>58</b>
3.3.1	Zellvitalitäten der mit HEMA behandelten Lymphozyten	58
3.3.2	Zellvitalitäten der mit TEGDMA behandelten Lymphozyten	60
<b>3.4</b>	<b>Comet Assay mit Fpg</b>	<b>62</b>
3.4.1	Ergebnisse der mit HEMA behandelten Lymphozyten	62
3.4.2	Ergebnisse der mit TEGDMA behandelten Lymphozyten	64
<b>3.5</b>	<b>Mikrokerntest</b>	<b>66</b>
3.5.1	Ergebnisse der mit HEMA behandelten Lymphozyten	66
3.5.2	Ergebnisse der mit TEGDMA behandelten Lymphozyten	69
<b>3.6</b>	<b>Chromosomenaberrationstest</b>	<b>72</b>
3.6.1	Ergebnisse der mit HEMA behandelten Lymphozyten	72
3.6.2	Ergebnisse der mit TEGDMA behandelten Lymphozyten	74
<b>3.7</b>	<b>Schwesterchromatidaustauschtest</b>	<b>76</b>
3.7.1	Ergebnisse der mit HEMA behandelten Lymphozyten	76
3.7.2	Ergebnisse der mit TEGDMA behandelten Lymphozyten	77
<b>3.8</b>	<b>Apoptosemessung</b>	<b>78</b>
3.8.1	Ergebnisse der mit HEMA behandelten Lymphozyten	78
3.8.2	Ergebnisse der mit TEGDMA behandelten Lymphozyten	80
<b>3.9</b>	<b>Zellzyklusanalyse</b>	<b>82</b>
3.9.1	Ergebnisse der mit HEMA behandelten Lymphozyten	82
3.9.2	Ergebnisse der mit TEGDMA behandelten Lymphozyten	84

## **Kapitel 4 Diskussion 86**

<b>4.1</b>	<b>Komposit – bedenkenlos anwendbar?</b>	<b>86</b>
<b>4.2</b>	<b>Dosis-Wirkung/Ausschluss zytotoxischer Konzentrationen</b>	<b>87</b>
<b>4.3</b>	<b>Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung</b>	<b>87</b>
<b>4.4</b>	<b>Restmonomergehalt/eluierbare HEMA- und TEGDMA-Konzentrationen</b>	<b>88</b>
<b>4.5</b>	<b>Genmutation durch oxidativen Stress</b>	<b>88</b>
<b>4.6</b>	<b>Welche Effekte lösen HEMA und TEGDMA in realistischen in vivo Konzentrationen aus?</b>	<b>91</b>
4.6.1	DNA-Strangbrüche im Comet Assay mit Fpg	91
4.6.2	Induktion von Mikrokernen im Mikrokerntest	93
4.6.3	Vergleich Mikrokerntest und Comet Assay	94
4.6.4	Chromosomen	95
4.6.4.1	Chromosomenaberrationstest	95
4.6.4.2	Schwesterchromatidaustauschtest	96
4.6.5	Vergleich Mikrokerntest und Chromosomenaberrationstest	97
4.6.6	Induzieren HEMA und TEGDMA eine erhöhte Apoptoserate?	97
4.6.7	Manipulieren HEMA und TEGDMA den Zellzyklus?	100
<b>4.7</b>	<b>HEMA und TEGDMA - ihre Eigenschaften, ihre genotoxische Wirkung und ihre Zukunft</b>	<b>102</b>

## **Kapitel 5 Anhang 104**

<b>5.1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>104</b>
<b>5.2</b>	<b>Ergebnisse Friedman-Test</b>	<b>106</b>
5.2.1	Friedman-Test Zellzahlen	106
5.2.2	Friedman-Test Vitalitäten	107
5.2.3	Friedman-Test Comet Assay mit Fpg	108
5.2.4	Friedman-Test Mikrokerntest	110
5.2.5	Friedman-Test Chromosomenaberrationstest	112
5.2.6	Friedman-Test Schwesterchromatidaustauschtest	113
5.2.7	Friedman-Test Apoptosemessung	114

5.2.8	Friedman-Test Zellzyklusanalyse	115
<b>5.3</b>	<b>Ergebnisse Wilcoxon-Test</b>	<b>116</b>
5.3.1	Wilcoxon-Test Zellzahlen	116
5.3.2	Wilcoxon-Test Vitalitäten	117
5.3.3	Wilcoxon-Test Comet Assay mit Fpg	118
5.3.4	Wilcoxon-Test Mikrokerntest	119
5.3.5	Wilcoxon-Test Chromosomenaberrationstest	120
5.3.6	Wilcoxon-Test Schwesterchromatidaustauschtest	120
5.3.7	Wilcoxon-Test Apoptosemessung	121
5.3.8	Wilcoxon-Test Zellzyklusanalyse	122
<b>5.4</b>	<b>Verwendete Abkürzungen und chemische Formeln</b>	<b>123</b>
<b>5.5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>126</b>
<b>5.6</b>	<b>Danke</b>	<b>136</b>
<b>5.7</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>137</b>



## 1.1 Zahnärztliche Füllungsmaterialien – Gefährdung durch Komposite?

Den optimalen Füllungswerkstoff zu finden, ist die Zahnmedizin schon immer gefordert. Aussehen, Haltbarkeit und Wirkung auf den Organismus sind dabei die entscheidenden Kriterien für den Einsatz von Füllungsmaterialien. Wegen seiner Stabilität und Abnutzungsfestigkeit im Seitenzahnbereich wurde Amalgam anderen Materialien, z. B. Kompositen, vorgezogen. Doch der Quecksilberanteil im Amalgam und die damit verbundene Toxizität führten zu Kontroversen um dieses silberfarbene Füllungsmaterial und in der Folge zur Verunsicherung der Patienten. Das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) erließ 1992 schließlich eine Indikationsbeschränkung für Amalgam.

Vor allem auch die steigenden ästhetischen Ansprüche der Patienten förderten die Weiterentwicklung von Restaurationsmaterialien, die wie natürliche Zahnhartsubstanz aussehen. Ihre Anwendung richtet sich nach Art (Primär- oder Sekundärversorgung) und Umfang (Zahnhartsubstanzverlust und Defektorientierung) der Zahnschädigung. Die Komposite spielen in der heutigen Füllungstherapie eine herausragende Rolle. Jedoch können auch einzelne Bestandteile dieser Komposite schädigende Auswirkungen auf den Organismus haben. Zwei solcher Bestandteile sind Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) und Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA). Wie bereits in vorherigen Studien gezeigt, sind die beiden Komonomere aufgrund ihrer hohen Wasserlöslichkeit von außergewöhnlicher biologischer Relevanz. Sie wurden in dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Geno- und Zytotoxizität in humanen Lymphozyten in realistischen in vivo Konzentrationen untersucht.

### 1.1.1 Einteilung zahnfarbener Füllungsmaterialien

Zahnfarbene Füllungsmaterialien werden in direkte und indirekte Materialien unterteilt. Indirekte Füllungsmaterialien, wie Inlays oder Kronen, sind solide Körper, die außerhalb des Mundes hergestellt werden. Sie sind zeitlich aufwendiger und kostenintensiver als direkte Füllungsmaterialien. Direkte Füllungsmaterialien, wie Komposite und Glasionomerezemente, sind plastisch formbar und werden unmittelbar nach der Kariesentfernung in die Kavität eingebracht. Unterschieden werden direkte Füllungsmaterialien nach ihrer Abbinde-Reaktion, also nach dem Aushärtevorgang. Glasionomerezemente härten über eine Säure-Base-Reaktion unter Wasserfreisetzung aus, Komposite dagegen durch lichtinduzierte Polymerisation ohne Wasserabspaltung (siehe Tab. 1). Im Vergleich zu den Kompositen weisen die Glasionomerezemente eine schlechtere Biegefestigkeit auf. Aus diesem Grund werden die Komposite in der heutigen Füllungstherapie bevorzugt [Reichl, 2003]. Sie sind ästhetisch ansprechend, stabil und abnutzungsresistent [Craig et al., 2006].

**Tabelle 1:** Plastische zahnfarbene Materialien [Hellwig et al., 2007].

Material		Härtung
<b>Komposite</b>	Hybridkomposite	Licht
	Makrofüllerkomposite	
	Mikrofüllerkomposite	
	Niedrig visköse Komposite	
	Poly(mer)glas	
	Ormocere	
	Kompomere	
	Fließfähige Kompomere	
<b>Glasionomerezemente (GIZ)</b>	Konventionelle GIZ	Chemisch
	Hoch visköse GIZ	Säure-Base-Reaktion
	Hybridionomere	Licht und chemisch

## 1.1.2 Komposite

Die drei Hauptbestandteile moderner zahnärztlicher Kompositmaterialien sind die organische Matrix, die disperse Phase (Füller) und die Verbundphase (Haftvermittler) [Ferracane, 1995; Hellwig et al., 2007] (siehe Tab. 2).

Sie basieren auf dem von R. L. Bowen 1962 entwickelten Bis-GMA, den so genannten Bowen-Kunststoff, eine Verbindung zwischen Methylmethacrylatsäure und Epoxidharz. Durch die Zugabe von silan-behandelten Quarzpartikeln wurde der Kunststoff weiterentwickelt [Bowen 1962, 1965]. Diese Kombination stellt die Grundlage für die heute gebräuchlichen Komposite dar.

Für die Bildung der Kunststoffpolymermatrix werden überwiegend Monomere wie Mono- und Dimethacrylate eingesetzt [Peutzfeld, 1997]. Sie werden in schwere Basismonomere (z. B. Bis-GMA und UDMA) und leichte Komonomere (z. B. HEMA und TEGDMA) unterteilt [Reichl, 2003]. Weitere Bestandteile der organischen Matrix sind Initiatoren, Stabilisatoren, Pigmente und Additiva. Initiatoren setzen die freie radikalische Kettenpolymerisation in Gang [Bowen, 1979; Reichl, 2003; Hellwig et al., 2007], sind für eine vollständige Aushärtung (Polymerisationsgrad und Konversionsrate) und die Farbstabilität entscheidend [Hellwig et al., 2007]. Stabilisatoren (Inhibitoren) verhindern eine vorzeitige Polymerisation. Als Farbpigmente werden häufig Eisenoxide eingesetzt, als Additiva Weichmacher, Lichtschutzmittel und optische Aufheller [Hellwig et al., 2007]. Durch die Zugabe anorganischer Füller erlangen heutige Komposite überlegene Materialeigenschaften gegenüber den nichtgefüllten Kompositen [Bowen, 1979; Ernst et al., 2003]. Es wird zwischen Mikro- und Makrofüllern unterschieden. Aus einer Kombination von Mikro- und Makrofüllern bestehen die heute bevorzugten Hybridkomposite [Ernst et al., 2003]. Mit der Silanisierung der Füllstoffe durch bifunktionelle, silikon-organische Verbindungen werden die anorganischen Füllerpartikel an die Kunststoffmatrix gekoppelt [Craig et al., 2006] und somit eine stabile Verbindung zwischen organischer und anorganischer Phase hergestellt [Bowen, 1979; Ferracane, 1995].

**Tabelle 2:** Typische Hauptbestandteile eines Komposit-Restaurationsmaterials [Hellwig et al., 2007].

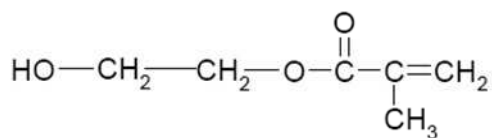
Hauptbestandteil		Abkürzung	Chemische Bezeichnung
<b>Organische Matrix</b>	Monomer	Bis-GMA	Bisphenol-A-Glycidyl-Methacrylat sog. Bowen-Kunststoff
	Komonomer	UDMA	Urethandimethacrylat
		TEGDMA	Triethylen-Glycol-Dimethacrylat
		EGDMA	Ethylen-Glycol-Dimethacrylat
	Initiator (Autopolymerisat)	Peroxide	Benzoylperoxid
	Initiator (Photopolymerisat)		Kampferchinon
	Akzelerator		z. B. Dihydroxyethyl-p-Toluidin
Inhibitor		z. B. Eugenol	
<b>Verbundphase</b>	Haftvermittler	Silan	z. B. Methacryloxy-propyl-trimethoxysilan
<b>Disperse Phase</b>	Makrofüller	Quarz, Glas, Keramik	Lithium-Aluminium-Silikat
	Mikrofüller	feinstteiliges SiO <sub>2</sub>	z. B. pyrogenes SiO <sub>2</sub>

### 1.1.2.1 HEMA und TEGDMA

Aufgrund der hohen Viskosität der hochmolekularen Matrixmonomere werden niedrigmolekulare Verdünner (Komonomere) wie HEMA und TEGDMA zugesetzt. Dadurch wird die Verarbeitbarkeit von Kompositen verbessert und die Menge an Füllstoffen kann erhöht werden, was wiederum zu besseren Materialeigenschaften führt [Bowen, 1979; Hellwig et al., 2007]. HEMA und TEGDMA werden aber nicht nur als Komonomere in Füllungskunststoffen eingesetzt, sondern auch in Dentinadhäsiven, kunststoffhaltigen Zementen, Klebstoffen für Inlays, Kronen, Veneers, orthodontischen Brücken, Keramiken sowie in Unterfüllungen für Amalgam- und Goldfüllungen und als Fissurenversiegler [Reichl, 2003].

**HEMA:**

Hydroxyethylmethacrylat ist hauptsächlich mit etwa 30-55 % in Primern für die Dentinhaftvermittlung enthalten [Gerzina et al., 1991]. HEMA ist ein hydrophiles Methacrylsäurederivat (siehe Abb. 1). Es lockert die Kollagenstruktur an Kavitätenwand und -boden auf, das anschließend aufgebrauchte Adhäsiv verbindet sich dann mit der Dentinschicht [Lexikon Zahnmedizin Zahntechnik, 2000]. Ebenso kann dieses wasserlösliche Monomer auch ein Bestandteil von Dentinadhäsiven sein [Hellwig et al., 2007]. Seine Anwesenheit in Eluaten von Kompositen wird dadurch erklärt, dass HEMA möglicherweise ein Abbauprodukt von UDMA ist [Michelsen et al., 2006].

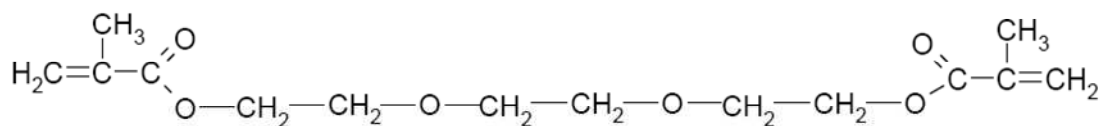


HEMA

**Abbildung 1:** Chemische Struktur von Hydroxyethylmethacrylat (HEMA).

**TEGDMA:**

Triethylenglycoldimethacrylat ist das am häufigsten eingesetzte Komonomer [Bowen, 1979; Ferracane, 1995], das hauptsächlich mit etwa 25-50 % in Kompositen, Fissurenversiegeln und Dentinadhäsiven enthalten ist [Gerzina et al., 1991]. TEGDMA ist ein amphiphiles Dimethacrylat (siehe Abb. 2). Die Hauptaufgabe besteht in der Herabsetzung der Viskosität der Komposite. Da es sowohl hydrophile als auch hydrophobe Gruppen enthält, trägt es zur Haftung zwischen dem hydrophoben Komposit und dem hydrophilen Dentin bei.

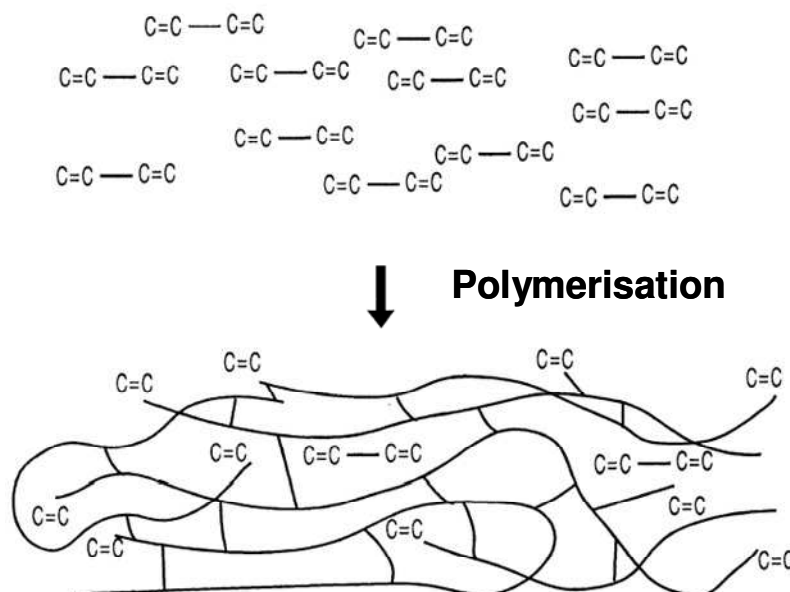


TEGDMA

**Abbildung 2:** Chemische Struktur von Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA).

### 1.1.2.2 Restmonomere

Die Polymerisation (Monomer-Polymer-Konversion) der Monomere und vor allem der Konomere ist nie vollständig [Ruyter und Svendsen, 1978; Ferracane, 1995; Reichl, 2003]. Die Konversionsrate, die bei der Polymerisation umgesetzten Doppelbindungen, liegt bei 35-77 %. Der Grund sind Polymerisationsinhibitoren wie Sauerstoff aber auch Bestandteile von Unterfüllungs- oder provisorischen Füllungsmaterialien [Hellwig et al., 2007]. Zum Beispiel entsteht eine sauerstoffinhibierte Schicht nach der Lichthärtung auf der Oberfläche von Dentinadhäsiven. Es konnte anhand von Bondingsubstanzen gezeigt werden, dass die Sauerstoffinhibition im Vergleich zu Bedingungen ohne Sauerstoffinhibition den Konversionsgrad signifikant ( $p < 0,01$ ) reduziert [Franz et al., 2008]. Eine unvollständige Polymerisation bedeutet, dass ein hoher Anteil an lang- und kurzkettigen Monomeren nach dem Aushärten des Komposits noch ungebunden vorliegt und durch den Speichel ausgelaugt werden kann (siehe Abb. 3).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Polymerisation. Die Abbildung zeigt die Polymerisation von Dimethacrylat-Monomeren (oben) und die Bildung des quervernetzten Polymernetzwerkes dentaler Komposite (unten), welches geringe Mengen an unreaktierten Monomeren ( $C=C-C=C$ ) und viele anhängende Methacrylatgruppen ( $C=C$ ) enthält [Ferracane, 1995].

Studien über eluierbare Restmonomere zeigten, dass die Konomere HEMA und TEGDMA zum größten Teil innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Polymerisation aus den Kunststoffrestaurationen in Konzentrationen im  $\mu\text{g-mg}$ -Bereich freigesetzt werden [Hume und Gerzina, 1996b; Guertsen, 2000]. Eluierbar sind bis zu 11 % des Ausgangsgewichts in organischen Lösungsmitteln [Hellwig et al., 2007]. Die Freisetzung ungebundener Monomere

lag nach drei Stunden in einem Ethanol-Wasser-Gemisch bei 75 % und in Wasser bei 50 %. Die Auswaschung beinahe aller löslichen Komponenten war nach 24 Stunden in jedem Lösungsmittel beendet [Ferracane und Codon, 1990]. Bei der Untersuchung der Löslichkeit mehrerer Komposite nach Lichthärtung wurde TEGDMA in allen Wasserproben entdeckt. Die komplette Freisetzung an TEGDMA variierte zwischen 100 und 500 nMol (30-150 µg). Am ersten Tag lag die Gesamtlöslichkeit bei 50 % und am dritten Tag bereits bei 90 %. Die größte Löslichkeitsrate befand sich dabei in den ersten vier Minuten. TEGDMA konnte allerdings auch noch in 30-100 Tage alten Proben entdeckt werden [Gerzina und Hume, 1995b]. Fissurenversiegler sind fließfähige Komposite, die ihre flüssige Eigenschaft durch Verringerung des Füllstoffanteils oder durch Erhöhung des TEGDMA-Anteils erreichen. Bei ihnen war ebenfalls die Löslichkeit direkt nach der Versiegelung am höchsten. Etwa 700 nMol (210 µg) wurden innerhalb des ersten Tages gelöst, damit war die Freisetzung im Wesentlichen abgeschlossen [Hamid und Hume, 1996a]. Jedoch berücksichtigen diese Studien nicht die orale Situation, wie Zusammensetzung, pH-Wert und die Menge an sezerniertem Speichel. Eine Studie mit Ringerlösung, die das orale Milieu simuliert, gegenüber Ethanol als Lösungsmittel, hatte zum Ergebnis, dass die Löslichkeit in Ethanol (höchste eluierbare TEGDMA-Konzentration: 3,28 µg/mm<sup>2</sup>) signifikant höher ist als in Ringerlösung (HEMA: 0,1-0,3 µg/mm<sup>2</sup> und TEGDMA: 0,1-0,5 µg/mm<sup>2</sup>). Die Eluierung in Ringerlösung kann nach sieben Tagen als abgeschlossen angesehen werden. Anhand der vier auf Monomerbasis getesteten Materialien konnte auch gezeigt werden, dass diese sich hinsichtlich ihres Löslichkeitsmusters nicht nur in den eluierbaren Stoffen, sondern auch bezüglich der eluierbaren Mengen der Gesamt- und Einzelkomponenten unterscheiden [Michelsen et al., 2006]. Nach 24-stündigem Eintauchen der beiden Komposite Tetric EvoCeram und Filtek Z250 in humanen Speichel war HEMA aus beiden (TEC: 0,34 µg/cm<sup>2</sup> und FZ: 0,41 µg/cm<sup>2</sup>) und TEGDMA nur aus Filtek Z250 (1,84 µg/cm<sup>2</sup>) nachweisbar [Michelsen et al., 2008].

Während HEMA und TEGDMA also innerhalb der ersten Minuten und Stunden nach der Applikation im Speichel vorhanden sind, erreichen sie die Pulpahöhle über das Dentin erst Stunden bis Tage nach der Applikation [Hume und Gerzina, 1996b]. Um festzustellen, ob das Dentin einen Schutz vor Monomerdiffusion gibt, wurde die Menge von freigesetztem HEMA und TEGDMA durch das menschliche Dentin hindurch mit dem in vitro Zahnmodell von Hume (1985) gemessen [Gerzina und Hume, 1994, 1996a]. In den ersten 43 Minuten nach der Applikation des Komposits auf das Dentin konnte kein TEGDMA in der Pulpahöhle

nachgewiesen werden. Die Diffusionsrate ab diesem Zeitpunkt bis Ende des ersten Tages betrug im Vergleich zu der Menge, die direkt in Wasser abgegeben wurde, weniger als 1 %. Nach drei Tagen war der prozentuale Anteil des diffundierenden TEGDMA auf 60 % angestiegen. Der schützende Effekt des Dentins besteht also in erster Linie in der Dämpfung oder Verzögerung der initial hohen TEGDMA-Diffusionsrate [Gerzina und Hume, 1994]. Jedoch nimmt die Diffusion der Monomere mit einer dünneren Dentinschicht zwischen dem Füllungsmaterial und der Pulpahöhle deutlich zu [Hamid und Hume, 1997]. Auch die Kombination eines TEGDMA-haltigen Komposits mit einem TEGDMA-haltigen Dentinadhäsiv (Bonding) beschleunigte und erhöhte die TEGDMA-Diffusion durch das Dentin. Ein HEMA-haltiges Dentinadhäsiv reduzierte die TEGDMA-Diffusion nur geringfügig [Gerzina und Hume, 1996a]. Dennoch konnte beobachtet werden, dass Bondingsubstanzen keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Zytotoxizität von Kompositmaterialien haben [Franz et al., 2008]. Ebenso wurde gezeigt, dass der positive pulpale Druck die pulpawärts gerichtete Diffusion von HEMA und TEGDMA aus der Bonding-Komposit-Kombination reduziert. Dieser Druck leistet allerdings keinen vollständigen Schutz der Pulpa vor der Monomerdiffusion. In der Pulpahöhle sammelte sich dabei signifikant mehr HEMA, das ein niedrigeres Molekulargewicht gegenüber TEGDMA hat, an [Gerzina und Hume, 1995a].

Welchen Effekt das Bleichen von Zähnen auf die Elution der Monomere moderner dentaler Kompositmaterialien hat, wurde ebenfalls untersucht. Die getesteten Bleichsubstanzen reduzierten sogar bei einigen der Monomere die eluierbare Menge. Daraus wurde geschlossen, dass der Kontakt von Bleichsubstanzen mit den Kompositmaterialien wegen einer höheren Monomerfreisetzung keine nachteiligen Folgen auf die menschliche Gesundheit haben kann [Polydorou et al., 2008].



### 1.1.3 Biologische Verträglichkeit

Die zahnärztlichen Werkstoffe werden verstärkt nach ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften hin ausgewählt. Bedeutender jedoch ist die Beurteilung der Biokompatibilität dieser Materialien hinsichtlich Allergenität, Toxizität, Mutagenität und Onkogenität.

Die Restmonomere können bei Patienten über drei Wege in den Körper gelangen [Hume und Gerzina, 1996b]. Über die Gingiva, den Speichel und über das Dentin und die Pulpa ist ein Eindringen möglich. Zudem ist bei zahnärztlichem Personal eine Absorption über die Haut hoch wahrscheinlich.

Nicht umgesetzte Restmonomere werden nicht nur während der initialen Phase nach der Polymerisation durch den Speichel ausgewaschen, sondern auch später in der Gebrauchsphase [Geurtsen, 2000]. Die Freisetzung im Mund erfolgt hauptsächlich durch Abrieb bzw. Verschleiß und wird durch sauren Speichel, saure Nahrung und Getränke, Erwärmung durch heiße Speisen und Getränke sowie durch Alkohol, je hochprozentiger desto mehr, begünstigt [Graf, 2004]. Es wurde gezeigt, dass die Verschleißrate von Kompositfüllungen (BisGMA/TEGDMA-Polymer) durch die Hydrolasen im Speichel erhöht wird [Munksgaard und Freund, 1990; Larsen et al., 1992] und somit die enzymatisch-hydrolytische Aktivität im Mund und das Versagen der Kompositfüllung zusammenhängen [Freund und Munksgaard, 1990].

Um den Organismus zu schädigen, müssen die ausgewaschenen Kompositinhaltsstoffe in die Zellen und/oder in die Organsysteme gelangen [Reichl, 2003].

#### 1.1.3.1 Wirkung freigesetzter (Ko)Monomere auf den Organismus

HEMA und TEGDMA erreichen innerhalb kürzester Zeit die Pulpa und erhalten somit Anschluss an den systemischen Kreislauf [Gerzina und Hume, 1996b]. Die Auswirkungen auf die Pulpa selbst können von Nicht-Reaktion über Reizungen und chronische Entzündungen bis zu Nekrosen reichen. Diese Reaktionen treten besonders bei Verwendung von Dentinhaftvermittlern auf, welche direkt auf das Dentin [de Souza et al., 2000] oder als direkte Überkappung auf die Pulpa [Pereira et al., 2000] aufgetragen werden.

Die freigesetzten (Ko)Monomere können mit dem Speichel in den Magen-Darm-Trakt und nach der Resorption mit dem Blut in die Organe gelangen. Eine weitere Möglichkeit ist die inhalative Aufnahme von abradierten Partikeln mit einer Größe bis zu 100 µm, welche über die Lunge in die Blutbahn gelangen [Reichel, 2003]. Bei einer akuten Exposition mit TEGDMA ist die Niere das Zielorgan, dies geht aus einer Studie an Meerschweinchen mit radioaktiv markierten Komonomeren hervor [Reichl, 2003]. In weiteren Studien mit radioaktiv markiertem  $^{14}\text{C}$ -TEGDMA und  $^{14}\text{C}$ -HEMA wurden deren Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung beim Meerschweinchen untersucht [Reichl, 2001a, b und 2002a, b, c]. Die Verteilung zeigte, dass die erreichten Gewebekonzentrationen bei HEMA um das 1.000.000-fache und bei TEGDMA um das 100.000-fache unter dem Spiegel von bekannten toxischen in vitro Konzentrationen liegen [Reichl 2002a, b, c]. Die Ausscheidung von  $^{14}\text{C}$ -TEGDMA/HEMA und/oder  $^{14}\text{C}$ -TEGDMA/HEMA-Metaboliten erfolgt rasch, vor allem durch Exhalation ( $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxid) [Reichl, 2001b und 2002a, b, c]. Es wurden zwei Reaktionswege für die Metabolisierung beschrieben, beide werden durch die Spaltung von HEMA und TEGDMA durch unspezifische Esterasen eingeleitet [Munksgaard und Freund, 1990; Reichl, 2002a, c]. Bei einem dieser Wege wird beim Abbau von HEMA und TEGDMA im Organismus 2,3-Epoxy-Methacrylsäure bzw. 2,3-Epidioxy-Methacrylsäure gebildet, das in  $^{14}\text{C}$ -Pyruvat und Formaldehyd umgewandelt wird. Gerade die Bildung von  $^{14}\text{C}$ -Pyruvat spricht für die Existenz von toxischen, wahrscheinlich kanzerogenen und mutagenen  $^{14}\text{C}$ -HEMA/TEGDMA-Intermediaten [Reichl, 2002a, c]. Diesbezüglich wurde gezeigt, dass 2,3-Epoxy-Methacrylsäure vergleichbare toxische Effekte wie das reine Komonomer TEGDMA induziert [Emmler et al., 2008]. Aus Pyruvat können Zellen Glucose neu bilden, womit HEMA und TEGDMA Einfluss auf die Gluconeogenese bekommen [Reichl, 1999]. Epoxide, auch Oxirane genannt, sind eine Gruppe sehr reaktionsfähiger zyklischer Ether. Im Allgemeinen gelten Epoxide und Peroxide als sehr toxische, vorwiegend kanzerogene und mutagene Substanzen [Reichl, 2003]. Tatsache ist, dass Peroxide in unserem Organismus durch tägliche Stressbelastung sowie durch die heutige Ernährungsweise verstärkt gebildet werden, sie werden auch beim Bleichen der Zähne eingesetzt [Graf, 2004]. Es wurde mit humanen Gingivafibroblasten bewiesen, dass die zytotoxischen Eigenschaften der dentalen Restaurationsmaterialien mit der Reduzierung des Glutathionspiegels zusammenhängen [Stanislawski et al., 2000]. HEMA und TEGDMA induzieren eine intrazelluläre Glutathionminderung (Antioxidans). Im Gegenzug kommt es zu einem Anstieg des ROS-Spiegels (engl.: reactive oxygen species, Prooxidans) und somit zur Auslösung oxidativen Stresses. Die Kombination von TEGDMA und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), das beim Bleichen

von Zähnen als aktive Komponente eingesetzt wird, verstärkt die Erniedrigung des GSH-Gehalts und die Erhöhung des ROS-Gehalts in Fibroblasten [Volk et al., 2007]. In humanen Gingiva- und Pulpafibroblasten erhöhte  $H_2O_2$  die Toxizität von TEGDMA aber nicht von HEMA [Reichl et al., 2008]. Einige Studien mit V79-Zellen, Submandibulariszellen von der Ratte und humanen Gingiva- und Pulpafibroblasten berichten über den Zusammenhang der von HEMA und TEGDMA hervorgerufenen toxischen Effekte und oxidativem Stress [Stanislawski et al., 2000 und 2003; Lee et al., 2006; Samuelsen et al., 2007; Volk et al., 2006; Schweikl et al., 2006 und 2007]. Folgen des oxidativen Stresses sind Apoptosen, Genotoxizität und Zellzyklusarrest. Doch mittels Antioxidantien wie Trolox (Vitamin E), Vitamin C, Ascorbat und N-Acetylcystein lassen sich die durch (Ko)Monomere verursachten Zellschäden mindern [Stanislawski et al., 2000 und 2003; Walther et al., 2004; Lee et al., 2006; Samuelsen et al., 2007; Schweikl et al., 2007]. Der Zusatz von NAC vor oder begleitend mit der Applikation von Kompositen könnte für die Gesundheit und Sicherheit der Patienten vorteilhaft sein [Paranjipe et al., 2008].

Es ist eindeutig bewiesen, dass Kompositkomponenten, einschließlich HEMA und TEGDMA, im mM-Konzentrationsbereich zytotoxisch sind [Schweikl et al., 2001; Issa et al., 2004; Kleinsasser et al., 2004 und 2006], wobei die Lipophilie der Monomere ihr zytotoxisches Potential beeinflusst [Issa et al., 2004]. Dadurch und mit einer schnelleren Zellgängigkeit von TEGDMA wird auch die höhere Toxizität von TEGDMA gegenüber HEMA begründet [Reichl et al., 1999]. Da TEGDMA und HEMA maximal nur  $\mu M$ -Konzentrationen im Speichel erreichen [Reichl, 2003], ist es äußerst unwahrscheinlich, dass sie irgendwelche systemisch toxischen Effekte verursachen [Reichl, 2001a und 2002c].

Dennoch kann es bei direktem Kontakt der Haut oder Mundschleimhaut mit zahnärztlichen Füllungsmaterialien zu allergischen Reaktionen kommen. Dabei werden hauptsächlich Typ IV Reaktionen beschrieben. Es wurde aber auch schon über einen anaphylaktischen Schock (Typ I Reaktion) nach Durchführung einer Fissurenversiegelung berichtet [Hallström, 1993]. Ein allergenes Potential für HEMA und TEGDMA ist bekannt. Besonders HEMA wurde als stark sensibilisierend beschrieben [Kanerva et al., 1994] und sollte deshalb in Primern durch TEGDMA ersetzt werden [Akiyama et al., 2007]. Betroffen ist hauptsächlich zahnärztliches Personal, weil dieses im Vergleich zu Patienten über eine längere Zeit einer vergleichsweise großen Menge eines noch nicht vollkommen unlöslichen Materials vor und während der Verarbeitung ausgesetzt ist [Munksgaard, 1992a]. Die Folgen können Irritationen der Haut,

Augen oder Schleimhäute, Parästhesien an Fingern, Asthma, gastrointestinale Beschwerden und Störungen des ZNS wie Kopfschmerzen, Übelkeit, Müdigkeit, Schlafstörungen, Reizbarkeit oder Gedächtnisverlust sein [Lönnroth und Shahnnavaz, 1997; Lindström et al., 2002]. Selbst Handschuhe geben keinen ausreichenden Schutz [Lönnroth und Shahnnavaz, 1997], denn vor allem niedermolekulare Monomere wie TEGDMA und besonders HEMA diffundieren innerhalb weniger Minuten durch die Handschuhe [Munksgaard, 1992b; Nakamura et al., 2003]. Dabei spielt auch die Hydrophilie der Monomere, die bei HEMA größer ist als bei TEGDMA, eine Rolle. Etwa 2 % dänischer Zahnärzte berichteten über Hautreaktionen, die auf den Umgang mit (Di)Methacrylaten zurückzuführen sind [Munksgaard et al., 1996]. Gezeigt wurde auch, dass der Mundschutz nicht vor der Inhalation von Monomerpartikeln und gewöhnliche Brillen nicht vor Monomernebel schützen [Lönnroth und Shahnnavaz, 1997]. Die durch die Arbeit verursachte Haut- und Atemwegs-Symptome können eine zahnärztliche Berufsausübung beschränken oder sogar beenden [Andreasson et al., 2001; Lindström et al., 2002].

Auch bei Patienten können kontaktallergische Reaktionen auftreten. Nach der Versorgung großer Zahndefekte steht der Füllungskunststoff in vielen Fällen in direktem Kontakt mit dem parodontalen Gewebe. Zwischen dem Auftreten von lichenoiden Reaktionen der Mundschleimhaut und der topographischen Nähe zu Komposit-Restaurationen besteht ein möglicher Zusammenhang [Lind, 1988; Issa et al., 2005], ebenso zu einer möglichen Begleitung von Candidainfektionen [Blomgren et al., 1996]. Bei drei von fünf getesteten Patienten war Formaldehyd der Auslöser lichenoider Reaktionen [Lind, 1988], weil Formaldehyd nach der Polymerisation aus der sauerstoffinhibierten Zone der Füllungsoberfläche freigesetzt werden kann.

## 1.2 Apoptose

Unter Apoptose versteht man den programmierten Zelltod der betroffenen Zelle. Er ist daher ein Teil des Zellstoffwechsels. Am Häufigsten tritt der programmierte Zelltod in Geweben mit hoher Zellumsatzrate auf. Dies betrifft z. B. die Zellen der Haut, des Magen-Darm-Traktes und die kernhaltigen Blutzellen. Die Apoptose ist wichtig für die Organisation, die Entwicklung und den Erhalt des vielzelligen Organismus. Eine wichtige Rolle spielt der apoptotische Zelltod in der Embryonalentwicklung bei der Formgebung von Körper und Organen [Renehan et al., 2001]. So werden zum Beispiel zur Bildung der Gliedmaßen die Häute zwischen Fingern und Zehen apoptotisch entfernt. Auch die Selektion von Keimzellen ist bedeutsam, durch sie wird die Weitergabe von krankhaft geschädigtem Genmaterial verhindert. Die Apoptose ist auch ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems, denn die Apoptose sensitiver T-Lymphozyten ist von entscheidender Bedeutung für das Gleichgewicht, für die Selbsttoleranz, Immunsuppression und das Abschalten einer Immunantwort [Krammer, 2000]. Auch Zellen, die durch mutagene Substanzen geschädigt wurden und daraufhin tumorartig entarten oder Zellen, die von Viren infiziert sind, werden apoptotisch entfernt [Thompson, 1995].

Die Apoptose wird entweder durch interne Signale, wie proteolytische Enzyme (Caspasen) über den mitochondrialen Weg, oder durch externe Signale, infolge einer Bindung entsprechender Liganden an integrale Membranproteine (Todesrezeptoren), ausgelöst [Krammer, 2000; Löffler, 2003].

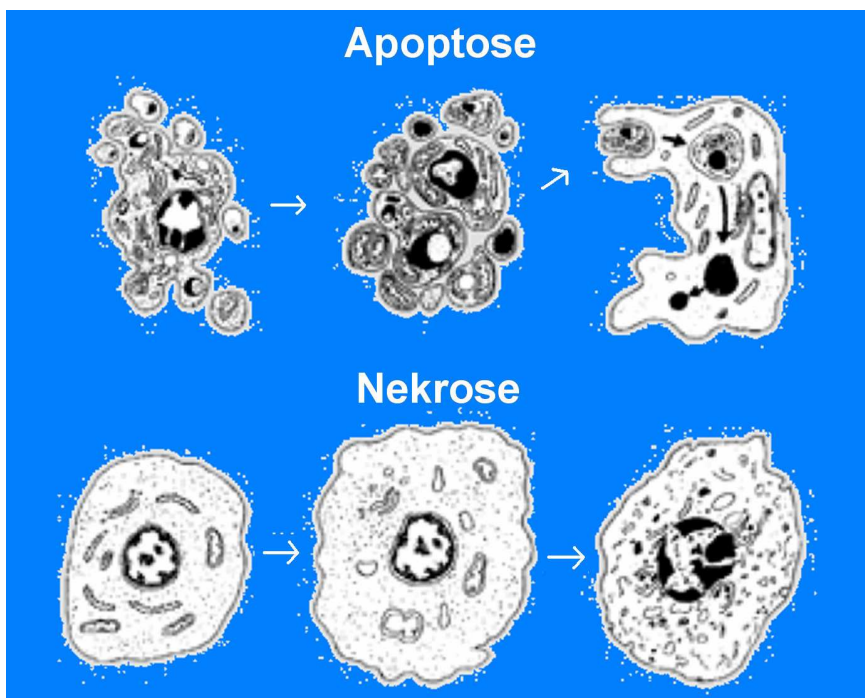
Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, dass eine defekte Apoptose die Persistenz von geschädigten, mutierten Zellen duldet, welche unter normalen Bedingungen entfernt worden wären [Wyllie, 1997]. Ein zu Viel an Apoptose kann zu Autoimmunerkrankungen und ein zu Wenig zu Tumorerkrankungen führen [Krammer, 2000].

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Apoptose für den Organismus unerlässlich ist, denn sie ist verantwortlich für die Homöostase von Geweben und die Beseitigung von alten, verletzten, mutierten oder „gefährlichen“ Zellen [Krammer, 2000].

Bei der Apoptose sind in der Regel nur einzelne Zellen betroffen. Im Unterschied dazu sind es bei der Nekrose größere Bereiche. Die Eliminierung der Zellen wird von außen z. B. durch mechanische Verletzung, Strahlung, Verbrennung, Vergiftung oder Virusbefall eingeleitet (siehe Abb. 4). Der Nekrose schließt sich immer eine Entzündungsreaktion an.

### Merkmale der Apoptose:

- Zellschrumpfung → Verlust des Kontakts zu Nachbarzellen
- Chromatinverdichtung
- Erhöhte Endonukleaseaktivität → DNA-Fragmentierung
- Intakte Zellmembran im Anfangsstadium
- Verlust der Membranintegrität im Spätstadium
- Abschnürung membranumschlossener Vesikel
- Phagozytose der Überreste



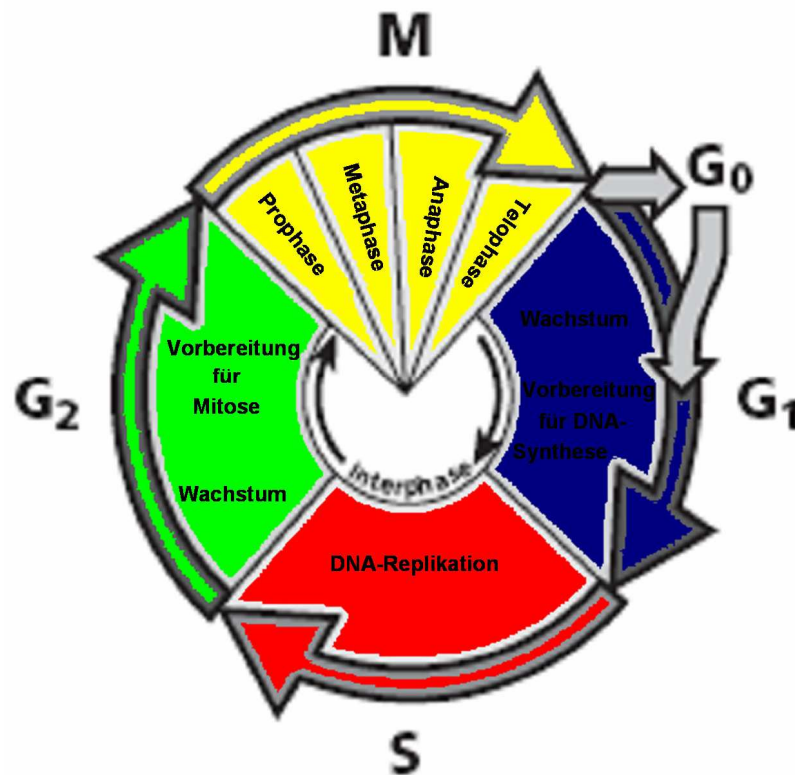
**Abbildung 4:** Unterschied zwischen Apoptose (oben) und Nekrose (unten). [Krammer, 2000].

### Merkmale der Nekrose:

- Kernkondensation
- Anschwellen der Zellorganellen
- Fragmentierung und Auflösung des Zellkerns
- Platzen der Zelle
- Entzündungsreaktion

## 1.3 Zellzyklus

Der Zellzyklus steuert und koordiniert die Reproduktion von Zellen. Er wird in zwei Hauptphasen, in die mitotische Phase (M-Phase) und die Interphase, unterteilt (siehe Abb. 5). In der M-Phase findet die Zellteilung statt. Sie setzt sich aus Mitose (Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase) und der Zytokinese zusammen. Die Interphase beschreibt die Zeit zwischen zwei Zellteilungen. Sie besteht aus der G<sub>1</sub>-, S- und G<sub>2</sub>-Phase.



**Abbildung 5:** Phasen des Zellzyklus [BD Biosciences, 2005].

In der G<sub>1</sub>-Phase (engl. gap = Lücke) befindet sich die Zelle zwischen der letzten mitotischen Teilung und dem Beginn der DNA-Neusynthese. Hier wächst die Zelle und bereitet sich auf die nachfolgende Chromosomenverdopplung vor. In der S-Phase (Synthesephase) findet ein weiteres Zellwachstum statt. Schließlich wird die DNA einmal repliziert, so dass die Zelle am Ende tetraploid ist. In der G<sub>2</sub>-Phase (engl. gap = Lücke, Postsynthesephase) wächst die Zelle fast auf das Doppelte heran und trifft die Vorbereitungen für die nächste Mitose.

Der Übergang von einer Phase des Zellzyklus in die nächste ist streng kontrolliert. Dieses Kontrollsystem besteht aus so genannten Restriktionspunkten (Checkpoints). Es gibt den G<sub>1</sub>-, S-, G<sub>2</sub>- und Spindel-Checkpoint. Mit ihnen können Fehler, die während eines Zyklus auftreten, behoben werden. Diese Prozesse sind nicht nur für den normalen Ablauf der Differenzierung eines Organismus entscheidend, sondern auch um die Häufigkeit von entarteten Zellen zu reduzieren und die Entstehung von Krebs zu verhindern [Shackelford et al., 1999].

Als Zellzyklusregulatoren fungieren Cycline, cyclinabhängige Proteinkinasen (Cdks) und Cdk Inhibitoren [Ko et al., 1997; Shackelford et al., 1999; Löffler, 2003]. Durch Komplexbildung der verschiedenen Cycline mit den Cdks werden weiterführende oder stoppende Schritte im Zellzyklus eingeleitet. Cyclin D ist, wenn auch in schwankenden Konzentrationen, während des ganzen Zellzyklus vorhanden. Cyclin E befindet sich am Übergang G1/S-Phase. Ein Anstieg von Cyclin A leitet die Zelle in die G2-Phase und Cyclin B wird für den Mitosestart benötigt [Löffler, 2003]. Für ihre Entdeckung als Schlüsselregulatoren des Zellzyklus erhielten der Amerikaner Leland Hartwell und die beiden Briten Paul Nurse und Tim Hunt 2001 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin.

Die Zelle hat zwei Möglichkeiten aus dem Zellzyklus auszusteigen. Entweder die Zelle wechselt von der G1-Phase in die G0-Phase (Ruhephase), in welcher sie mehrere Tage bis Jahre verbleiben kann, oder sie geht in der Apoptose unter.



## 1.4 Chromosomen

Der Mensch besitzt 46 Chromosomen, also 23 Chromosomenpaare von denen jeweils die Hälfte von Mutter und Vater stammen. 44 werden als Autosomen und 2 als Gonosomen bezeichnet. Bei den Autosomen können immer zwei nach ihrer Größe und Form zu homologen Paaren angeordnet werden. Somit ergeben sich 22 Autosomen- bzw. Homologenpaare. Die Gonosomen beim weiblichen Geschlecht weisen zwei identische X-Chromosomen (XX) und beim männlichen Geschlecht ein X- und ein Y-Chromosom (XY) auf.

Die Chromosomen sind die Träger der genetischen Information. Sie bestehen hauptsächlich aus Desoxyribonukleotidsäure (DNA). Ein Chromosom besteht, je nach dem in welcher Phase des Zellzyklus sich eine Zelle befindetet, aus einer Chromatide oder zwei identischen Hälften, so genannte Schwesterchromatiden, die durch das Zentromer zusammengehalten werden. Das Zentromer unterteilt sie in einen kurzen p-Arm und einen langen q-Arm. Je nach Lage des Zentromers spricht man von meta-, submeta- oder akrozentrischen Chromosomen.

Fehler bei der Kernteilung, aber auch äußere Einflüsse wie ionisierende Strahlen oder chemische Stoffe können das genetische Material so schädigen, dass es zu Chromosomenaberrationen und schließlich zu Mutationen kommt.

Eine Chromosomenaberration steht für eine Veränderung in der Struktur und/oder in der Anzahl von Chromosomen eines Genoms. Voraussetzung für eine Chromosomenaberration ist der DNA-Doppelstrangbruch. Wenn das Bruchereignis an unreplizierten Chromosomen stattfindet, handelt es sich um einen Chromosomenbruch und bei replizierten Chromosomen um einen Chromatidenbruch [Madle et al., 1993]. Man unterscheidet zwischen strukturellen und numerischen Aberrationen. Eine strukturelle Aberration stellt eine Veränderung im Aufbau und der Zusammensetzung des Chromosoms dar. Sie wird daher auch als Chromosomenmutation bezeichnet. Bei der numerischen Aberration ist hingegen die Anzahl der Chromosomen verringert oder erhöht. Deshalb wird sie auch Genommutation genannt.

Eine spezielle Variante einer Chromosomenmutation ist der Schwesterchromatidaustausch (engl. Sister Chromatid Exchanges; SCEs). SCEs können spontan während der Replikation auftreten. Zum Austausch kommt es auch, wenn beide Chromatiden eines Chromosoms durch chemische oder physikalische Agenzien so geschädigt werden, dass es zum Aufbrechen der DNA-Stränge kommt und anschließend diese jedoch reziprok wieder eingebaut werden [Speit, 1993].

## 1.5 Arbeitshypothese und Ziele der Arbeit

Komposite wurden seit ihrer Einführung 1960 zahlreichen Studien unterzogen, wobei der Schwerpunkt anfänglich bei den physikalisch-chemischen Eigenschaften lag. Inzwischen wurden diese Materialien auch auf ihre Biokompatibilität hin getestet. Dabei traten neben anderen Füllungskomponenten die beiden niedermolekularen Komonomere Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) und Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) in den Fokus der Forschung. Es wurde für diese beiden Stoffe u. a. ein allergenes Potential, eine Nephrotoxizität, eine Zytotoxizität, eine Genotoxizität sowie die Einflussnahme auf den Zellzyklus und eine Verbindung zu oxidativen Stress beschrieben.

In dieser Arbeit sollen mögliche zytotoxische und genotoxische Effekte von den Leitsubstanzen der Komposite, HEMA und TEGDMA, in einem in vivo relevanten Konzentrationsbereich untersucht werden. Hierzu werden Vitalitätsbestimmungen und der alkalische Einzelzell-Mikrogel-Elektrophorese (Comet) Assay in Verbindung mit dem Basenexzisionsreparaturenzym Fpg, der Mikrokerntest, die durchflusszytometrische Apoptosemessung und Zellzyklusanalyse sowie der Chromosomenaberrationstest und der Schwesterchromatidaustauschtest eingesetzt. Es werden so die Zusammenhänge von genotoxischer Schädigung mit oxidativem Stress, die Einflussnahme auf den Zellzyklus und die Apoptoserate sowie Auswirkungen der Komposite auf Chromatidebene dargestellt.

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Erstellung eines humanen Risikoprofils dieser Zahnwerkstoffe leisten.

## 2.1 Lymphozytenisolierung

Für den ersten Teil der Arbeit wurde von gesunden weiblichen und männlichen Spendern durch Venenpunktion eine heparinisierte Blutprobe von 18 ml entnommen. Für den zweiten Teil wurde ausschließlich eine heparinisierte Blutprobe (36-45 ml) von zehn gesunden männlichen Spendern für die Untersuchung der Lymphozyten abgenommen.

### 2.1.1 Methoden zur Lymphozytenisolierung

#### **1. Methode:**

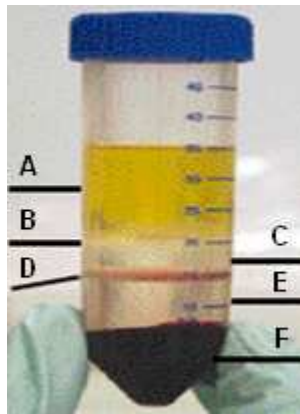
Von frischem Vollblut wurden jeweils 6 ml auf 6 ml Dichtegradient Biocoll (RT) in ein 15-ml-Röhrchen geschichtet. Die Lymphozytenisolierung erfolgte durch 20-minütige Zentrifugation bei 515 x g, Raumtemperatur (RT) und ohne Bremse. Nach der Zentrifugation ergaben sich folgende Schichten:

- Plasma
- Lymphozyten
- Separationsmedium
- Erythrozyten und Granulozyten

Die Plasmafraktion wurde mit einer Pasteurpipette bis auf eine Schichtdicke von etwa 2 mm abgenommen, um eine Kontamination der Lymphozyten mit den Thrombozyten zu verhindern. Der Phasenring (undurchsichtige Interphase: mononukleäre Zellen) wurde mit einer Pasteurpipette geerntet und in ein frisches Zentrifugenröhrchen gegeben. 10 ml 1 x PBS wurden zugegeben und das Zellpellet vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden 10 min bei 340 x g gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut in 10 ml 1 x PBS resuspendiert und gewaschen. Anschließend wurde der Überstand wieder verworfen und das Zellpellet in 30 ml Lymphozytenmedium resuspendiert.

**2. Methode:**

Mit dieser neuen, optimierten Methode zur Lymphozytenisolierung ließen sich die Erträge an Lymphozyten aus der gleichen Menge Vollblut erhöhen. Das Besondere an dieser Methode ist eine Trennscheibe im Zentrifugenröhrchen, die zum einen vor der Zentrifugation ein Vermischen des Vollblutes mit Separationsmedium und zum anderen nach erfolgter Separation die Rekontamination der Lymphozyten mit Erythrozyten und Granulozyten verhindert. Zu Beginn wurde das Zentrifugenröhrchen mit 15 ml Biocoll (RT) befüllt und 30 sec. bei 1000 x g und RT zentrifugiert, so dass danach das Separationsmedium unterhalb der Trennscheibe war. Das Vollblut wurde in das Röhrchen pipettiert und dann 10 min bei 1000 x g und RT ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation ergaben sich folgende Schichten (siehe Abb. 6):



**Abbildung 6:** Schichtung nach Zentrifugation des Vollblutes im Leucosep<sup>R</sup>-Zentrifugenröhrchen [greiner bio-one, 2007].

- A:** Plasma
- B:** angereicherte Zellfraktion (Interphase aus Lymphozyten/PBMC's)
- C:** Separationsmedium
- D:** Trennscheibe
- E:** Separationsmedium
- F:** Erythrozyten und Granulozyten

Danach wurde wie in Methode 1 ein Teil des Plasmas entfernt, die Lymphozyten geerntet und in ein frisches Zentrifugenröhrchen gegeben. Die angereicherte Zellfraktion wurde vorsichtig in 10 ml 1 x PBS resuspendiert und 10 min bei 250 x g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde danach noch zweimal mit jeweils 5 ml 1 x PBS wiederholt. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 30 ml Lymphozytenmedium aufgenommen.

## 2.1.2 Lösungen

### Lymphozytenmedium

- 500 ml RPMI 1640
- 75 ml BSF
- 5 ml Na-Pyruvat (100 mM Lsg.)
- 5 ml AS nicht essentiell (100 x Konz.)
- 5 ml Pen-Strep (10.000 E/ml Pen;  
10.000 µg/ml Strep)

### PBS (1 x), pH 7,4

- PBS (10 x), pH 7,0
- mit Aqua bidest. 1:10 verdünnen

## 2.2 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Die Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung erfolgte nach der Lymphozytenisolierung sowie nach der Behandlung von stimulierten und unstimulierten Zellen.

### 2.2.1 Trypanblau-Ausschlusstest

Die Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung erfolgte mit dem Mikroskop und einer Zählkammer (Neubauerkammer). Dafür wurden 10  $\mu\text{l}$  Zellsuspension mit 10  $\mu\text{l}$  Trypanblau gemischt und 10  $\mu\text{l}$  davon in die Zählkammer eingebracht. Trypanblau kann nicht durch die intakte Zellmembran vitaler Zellen diffundieren, dringt daher nur in tote Zellen ein und färbt deren Zytoplasma blau. In einem ersten Zählvorgang wurden vitale und tote Zellen gezählt. Im zweiten Durchgang wurden nur die blau gefärbten Zellen gezählt, um danach den prozentualen Anteil gefärbter Zellen zu berechnen.

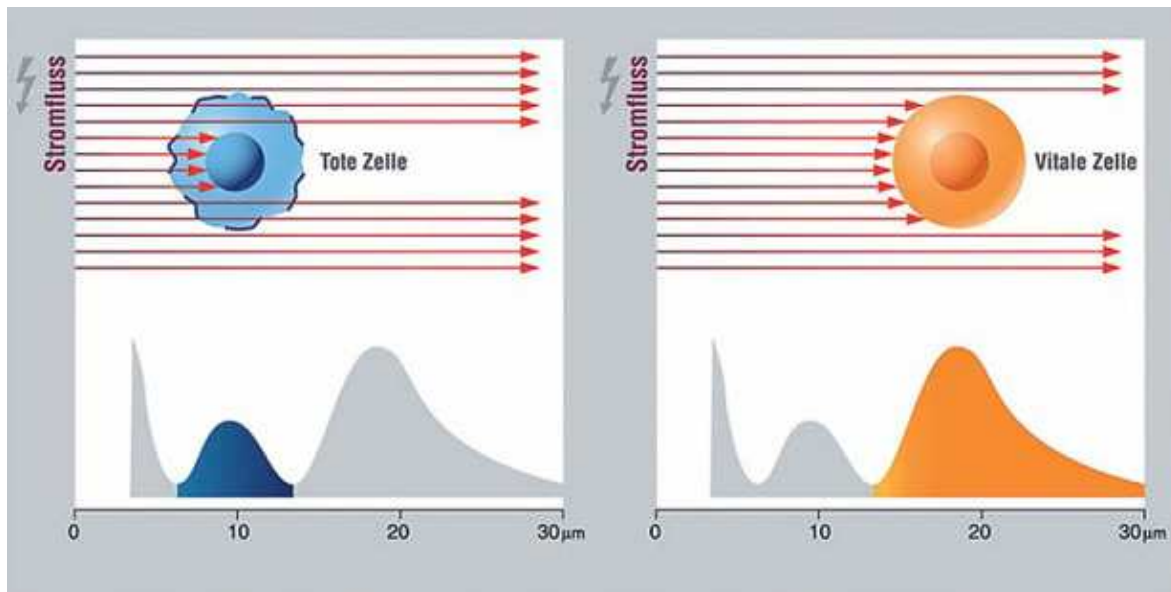
### 2.2.2 CASY-Zellzählgerät

Bei der Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung mit dem Strom-Ausschluss-Verfahren wird die Membranintegrität durch elektrischen Strom erfasst. Die Zellen werden in einem Cell Analyser (siehe Abb. 7) mit Unterdruck durch eine Messprobe gesaugt, über der ein mit 1 MHz getaktetes, elektrisches Niederspannungsfeld anliegt [Schärfe, 2004].

Vitale Zellen mit intakter Zellmembran sind elektrische Isolatoren. Hingegen wird bei toten Zellen mit defekter Zytoplasmamembran der zytoplasmatische Raum leitfähig. Während vitale Zellen mit ihrer tatsächlichen Größe erfasst werden, werden tote Zellen nur mit ihrem Zellmatrixvolumen detektiert, was in etwa dem Volumen ihres Zellkerns entspricht [Glauner, 2006] (siehe Abb. 8).



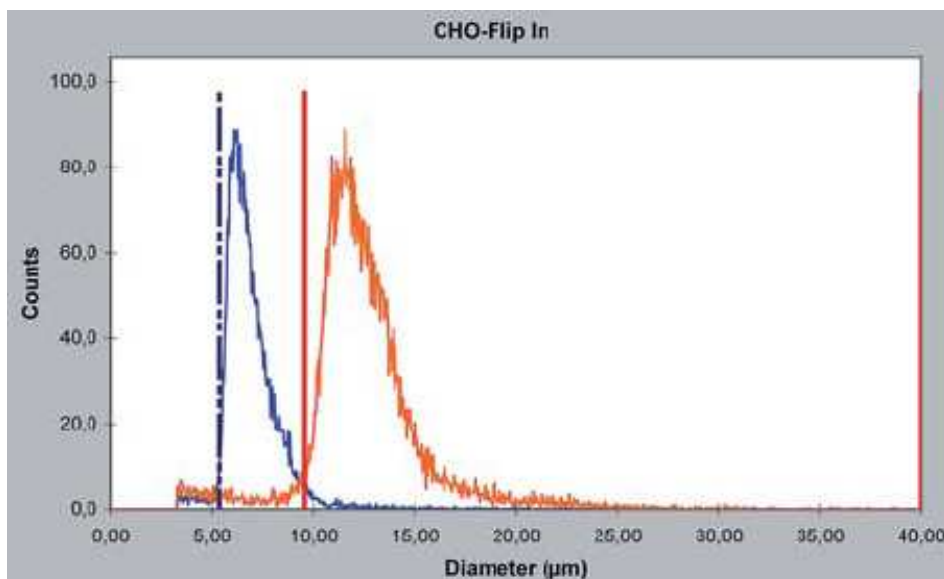
Abbildung 7: CASY<sup>®</sup> Model DT [Innovatis].



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung des Stromausschlussverfahrens. Vitale Zellen (rechts) mit intakter Membran schließen den elektrischen Strom aus, während bei toten Zellen (links) mit defekter Membran der zyttoplasmatische Raum leitfähig wird [Glauner, 2006].

Bei der Durchführung wurden CASY-Cups mit 10 ml sterifiziertem CASY-Ton befüllt. Von jeder zu zählenden Probe wurden 100 µl zu den 10 ml hinzu gegeben, durch zweimaliges Drehen - nicht schütteln! - miteinander vermischt und anschließend dreimal 400 µl der Zellsuspension gemessen. Hierbei wurden jeweils folgende Parameter erfasst (siehe Abb. 9):

- Zellzahl
- Zellvitalität



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung toter (erster Peak) und vitaler Zellen (zweiter Peak) [Glauner, 2006].

## 2.3 Stimulierung der Lymphozyten

Für den Mikrokerntest und die Zellzyklusanalyse wurden die Zellen am Tag der Lymphozytenisolierung stimuliert. Dazu wurde die Zellsuspension auf 800.000 Zellen/ml mit Lymphozytenmedium verdünnt und zur Stimulation 2,4 µg/ml Kultur PHA-L zugegeben. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine 75-cm<sup>2</sup>-Kulturflasche (200 ml) pipettiert und 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank belassen.

Die Zellen für den Schwesterchromatidaustauschtest und den Chromosomenaberrationstest wurden ebenfalls auf 800.000 Zellen/ml eingestellt und mit PHA-L stimuliert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf zwei 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen aufgeteilt. Zu der Zellsuspension für den Schwesterchromatidaustauschtest wurde außerdem noch 6 µl BrdU/ml Kultur zugegeben und die Flasche mit Alufolie umwickelt.

### 2.3.1 Lösungen

#### PHA-Stammlösung (240 µg/ml)

- 1,2 mg PHA in 5 ml PBS

#### PBS (1 x), pH 7,4

- PBS (10 x), pH 7,0

- mit Aqua bidest. 1:10 verdünnen

#### BrdU-Stammlösung

## 2.4 Behandlung der Lymphozyten

### 1. Teil:

Für die Dosis-Wirkung wurden die Lymphozyten mit HEMA (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM und 6 mM) und TEGDMA (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 750  $\mu\text{M}$ , 1 mM, 2 mM und 3,8 mM) 24 Stunden bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  behandelt. Als Negativkontrolle diente das Lösungsmittel DMSO. Im Laufe der einzelnen Versuche wurden mehrere Positivkontrollen für die einzelnen Methoden getestet:

- Comet Assay: MMS (5  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ )
- Mikrokerntest: MMC (200 ng/ml 4 Stunden behandelt, 20 ng/ml)  
MMS (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  24 Stunden behandelt, 300  $\mu\text{M}$  1 Stunde behandelt)
- Apoptosemessung: CPT (10  $\mu\text{M}$ , 90  $\mu\text{M}$ , 100 nM)  
MMS (100  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ )
- Zellzyklusanalyse: CPT (90  $\mu\text{M}$ , 108  $\mu\text{M}$ )  
MMS (10  $\mu\text{M}$ )  
APC (2,5  $\mu\text{g/ml}$ )

Alle Substanzen wurden in DMSO gelöst und als 1000-fach konzentrierte Stammlösungen in einem Volumen von 1  $\mu\text{l/ml}$  zu den Kulturen zugegeben.



## 2. Teil:

In dieser Versuchsreihe wurden die Lymphozyten mit HEMA (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M und 1 mM) und TEGDMA (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 100  $\mu$ M) 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> behandelt. Als Negativkontrolle diente DMSO und als Positivkontrolle diente die zuvor ermittelte geeignete Positivkontrolle:

- Comet Assay: 3,8 mM TEGDMA
- Mikrokerntest: 40 ng/ml MMC
- Apoptosemessung: 3,8 mM TEGDMA
- Zellzyklusanalyse: 2,5  $\mu$ g/ml APC
- Schwesterchromatidaustauschtest: 50 ng/ml MMC
- Chromosomenaberrationstest: 50 ng/ml MMC

Die Substanzen wurden in DMSO gelöst und als 1000-fach konzentrierte Stammlösungen in einem Volumen von 1  $\mu$ l/ml zu den Kulturen zugegeben.

Am Tag der Lymphozytenisolierung wurden 11 Ansätze in einer 24-Lochplatte mit je 500.000 Zellen/ml Zellsuspension mit DMSO, HEMA und TEGDMA für den Comet Assay mit Fpg und für die Apoptosemessung behandelt.

Nach 48 Stunden Stimulation wurden für den Mikrokerntest 10 Ansätze in einer 24-Lochplatte mit je 200.000 Zellen/ml mit DMSO, HEMA, TEGDMA und MMC behandelt. Zusätzlich wurde pro ml Kultur 5  $\mu$ g Cytochalasin B zugegeben, um eine Zellteilung nach abgeschlossener Kernteilung zu verhindern. Für die Zellzyklusanalyse wurden 10 Ansätze in einer 24-Lochplatte mit je 500.000 Zellen/ml mit DMSO, HEMA, TEGDMA und APC behandelt.

Für den Schwesterchromatidaustauschtest und den Chromosomenaberrationstest wurden jeweils 5 ml der Zellsuspension in ein Zellkulturrohrchen pipettiert und anschließend mit DMSO, HEMA, TEGDMA und MMC behandelt. Am Tag der Chromosomenpräparation wurden die Zellen noch 1 Stunde mit 50 ng Colchicin/ml Kultur behandelt.

### 2.4.1 Lösungen

Colchicin-Lösung (10  $\mu$ g/ml)

## 2.5 Comet Assay

### 2.5.1 Grundlagen des Comet Assay

Der Comet Assay ist ein sehr einfacher, schneller und empfindlicher Genotoxizitätstest zum Nachweis von DNA-Schäden. Es kann neben DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen, alkalilabilen Stellen auch die Reparatur zuvor induzierter DNA-Schäden erfasst werden. Die DNA-Schäden werden auf dem Einzelzellniveau nachgewiesen. Dieses Indikator-Testsystem lässt sich praktisch mit jeder Zellpopulation (hier humane Lymphozyten) durchführen und erfordert nur sehr geringe Zellmengen. Der Test kann mit proliferierenden und nicht-proliferierenden Zellen durchgeführt werden. Der Comet Assay beruht darauf, dass DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld schneller zur Anode wandern als ganze, ungeschädigte Chromosomen. Erkennbar wird diese Wanderung nach Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid-Färbelösung in Gestalt eines Kometenschweifs. Dabei dienen Schweiflänge und Intensität als Maß für den Grad der DNA-Schädigung.

Bei der Testdurchführung werden die Zellen in Agarose aufgenommen und auf Agarose beschichtete Objektträger aufgebracht. Anschließend werden in der Lyse unter alkalischen Bedingungen die Membranstrukturen zerstört. Beim modifizierten Comet Assay mit Fpg (Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase) werden die Zellen nach der Lyse gewaschen und ein Teil mit Fpg und der andere Teil mit Puffer behandelt. Nach der Inkubation erfolgt die Entwindung der DNA-Helixstruktur durch den Elektrophoresepuffer, gefolgt von der Elektrophorese und anschließender Neutralisation und Färbung.

### 2.5.2 Grundlagen des Comet Assay mit Fpg

Mit der Modifikation des Comet Assay mit dem Fpg-Protein lassen sich zusätzlich zu Strangbrüchen und der Reparatur der DNA oxidativ geschädigte Basen mit hoher Sensitivität nachweisen [Collins et al. 1993 und 1997; Dennog et al. 1996]. Die Differenz der Tail-Intensität ergibt sich aus den Gesamt-DNA-Schäden inklusive oxidativer DNA-Schäden, die durch Fpg detektiert werden nach Enzymbehandlung abzüglich der DNA-Strangbrüchen im konventionellen Comet Assay nach Pufferinkubation und gibt somit das Ausmaß der oxidativen Schäden an.

## 2.5.3 Puffer und Lösungen

### NaOH 5 M

- 200 g NaOH
- mit Aqua bidest. auf 950 ml auffüllen
- lösen
- mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen

### EDTA-Stammlösung 0,2 M

- 14,89 g EDTA
- mit Aqua bidest. auf 180 ml auffüllen
- pH 10 mit NaOH-Plätzchen einstellen
- mit Aqua bidest. auf 200 ml auffüllen
- autoklavieren
- lichtgeschützt bei RT lagern

### Lysepuffer

- 67 ml N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz
- 292,8 g NaCl
- 2,4 g TRIS
- 74,4 g EDTA
- in 1,8 l Aqua bidest. mischen
- NaOH-Plätzchen zugeben bis sich die Substanz löst
- pH 10 mit 5 M NaOH einstellen
- mit Aqua bidest. auf 2 l auffüllen

### Lyselösung

- 0,75 ml Triton (X 100)
- 7,5 ml DMSO
- 66,75 ml Lysepuffer

### PBS (1 x), pH 7,4

- PBS (10 x) pH 7
- mit Aqua bidest. auf 1:10 verdünnen

### TRIS-Neutralisationspuffer 0,4 M

- 97 g TRIS
- mit Aqua bidest. auf 1950 ml auffüllen
- pH 7,5 mit 10 M HCl einstellen
- mit Aqua bidest. auf 2 l auffüllen
- autoklavieren
- bei RT lagern

### Ethidiumbromid-Färbelösung

- 20 µg/ml in Aqua bidest.
- lichtgeschützt bei 4 C° lagern

### Elektrophoresepuffer

- 120 ml 5 M NaOH
- 10 ml EDTA-0,2 M-Stammlösung
- mit Aqua bidest. auf 2 l auffüllen

AgaroseLösung I

- 1,5 g NMP-Agarose
- 100 ml 1 x PBS

AgaroseLösung II

- 50 mg LMP-Agarose
- 10 ml 1 x PBS

Enzympuffer (10 x) 10 ml

- 9,5 g HEPES (400 mM)
- 7,5 g KCl (1 M)
- 186 mg EDTA (5 mM)
- pH 8 mit KOH einstellen
- bei -20 C° lagern

Enzympuffer (1 x)

- 1 ml 10 x Enzympuffer
- 9 ml Aqua bidest.

BSA-Lösung

- 10 mg BSA
- in 10 ml Aqua bidest. lösen
- sterifiltrieren
- bei -20 C° lagern

Enzym-BSA-Puffer

- 4 ml 1 x Enzympuffer
- 1 ml BSA-Lösung

Fpg-Lösung

- 1 µl Fpg
- 3 ml Enzym-BSA-Puffer

## 2.5.4 Durchführung

### 2.5.4.1 Beschichtung der Objektträger

1,5 %ige AgaroseLösung I wurde solange aufgekocht bis keine Schlieren mehr zu sehen waren und in einen 50-ml-Erlenmeyerkolben gegossen. Danach wurden Superfrost-Plus-Objektträger, die zuvor mit EtOH 70 % abgerieben wurden, in die noch heiße AgaroseLösung (> 60 °C) eingetaucht. Die Objektträgerunterseite wurde mit einem Tuch abgewischt und die Objektträger zum Trocknen ausgelegt. Nach einem Tag konnten die beschichteten Objektträger für den Comet Assay eingesetzt werden. Die mit AgaroseLösung beschichteten Objektträger können mehrere Wochen bei Raumtemperatur gelagert werden.

### 2.5.4.2 Durchführung des Comet Assay mit Fpg

Am Tag der Durchführung des Comet Assays wurden zuerst der Lysepuffer und der Elektrophoresepuffer hergestellt und kaltgestellt (4 °C). Die Agaroselösung II für die Zellen wurde ebenfalls frisch hergestellt und im Wasserbad (30 °C) warm gehalten. Danach wurden die Zellen geerntet, in Eppendorfcups pipettiert und sofort dunkel in Eis gestellt. Je 100 µl der 1-ml-Zellsuspensionen wurde für die Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung eingesetzt, 400 µl wurden für den Comet Assay in Eppendorfcups pipettiert, die restlichen 500 µl wurden der Apoptosemessung (siehe 2.7.2.) zugeführt. Die Zellen für den Comet Assay wurden bei 244 x g und RT 6 min zentrifugiert. Zwischenzeitlich wurde die Heizplatte angestellt um die Eppendorfcups für die Agarose-Zellsuspension anzuwärmen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand bis auf ca. 50 µl abpipettiert um anschließend 40 µl der Zellsuspension mit 360 µl warmer Agaroselösung II zu vermischen. 60 µl dieser Mischung wurden auf die beschichteten Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas (24 x 32 mm) abgedeckt. Pro Konzentration wurden 4 Objektträger eingedeckt. Nach 3-5 min wurden die Deckgläser abgenommen, die Präparate in eine mit Lyselösung befüllten Küvette gestellt und 2 Stunden bei 4 C° lichtgeschützt lysiert. In dieser Zeit wurde der Enzym-Puffer und die BSA-Lösung im Wasserbad aufgetaut, dann der 1 x-Enzympuffer, der Enzym-BSA-Puffer und die Fpg-Lösung hergestellt und in Eis kalt gestellt. Nach der Lyse wurden die Objektträger dreimal für 5 min in eiskaltem Enzympuffer gewaschen. Je 2 Objektträger einer Konzentration wurden daraufhin mit 100 µl Enzym-BSA-Puffer oder mit Fpg-Lösung eingedeckt und im Brutschrank bei 37 °C 30 min lichtgeschützt inkubiert. Während der Inkubation wurde die Elektrophoresekammer mit Eis umgeben und mit gekühltem Elektrophoresepuffer befüllt. Nach 30 min wurden die Präparate aus dem Brutschrank genommen, die Deckgläser abgezogen, die Objektträger kurz in Aqua bidest. getaucht und horizontal, der Länge nach mit der Agaroseschicht nach oben in die Elektrophoresekammer gelegt. Die Objektträger mussten leicht mit Elektrophoresepuffer bedeckt sein. Die leeren Plätze wurden mit unbeschichteten Objektträgern aufgefüllt. Zur Entwindung und Trennung der doppelsträngigen DNA wurde die befüllte Kammer 20 min lichtgeschützt stehen gelassen. Anschließend erfolgte eine 20-minütige Elektrophorese, wobei eine konstante Spannung von 25 V und ein konstanter Strom von 300 mA über die Puffermenge eingestellt wurden. Nach der Elektrophorese wurden die Objektträger 5 min in einer mit TRIS-Neutralisationspuffer befüllten Küvette neutralisiert. Danach wurden sie zum Abtropfen senkrecht aufgestellt und schließlich mit 20 µl Ethidiumbromid-Färbelösung gefärbt und eingedeckt. Die Präparate wurden bis zur

Auswertung in einer feuchten Kammer bei 4 °C aufbewahrt. Diese Lagerung war maximal eine Woche möglich.

## 2.5.5 Auswertung des Comet Assay mit Fpg

Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop bei 40-facher Vergrößerung mittels der Comet 5.5 Software. Pro Konzentration wurden 2 Objektträger mit je 50 Zellen ausgewertet.

Das Ausmaß der DNA-Fragmentierung wurde an folgenden Parametern ausgemacht:

- Olive Tail Moment (OTM):

Das Olive Tail Moment ist das Produkt aus der Menge der DNA im Schweif und der Distanz zwischen der Kopfmitte und der Schweifmitte [Olive und Banath, 1993]. Das OTM wird ohne Einheit angegeben.

- Tail Length:

Die Schweiflänge ist die Distanz der DNA-Wanderung vom Körper des Kerns aus.

- Tail DNA:

Tail DNA gibt den prozentualen Anteil der Gesamt-DNA im Schweif an.

- Head DNA:

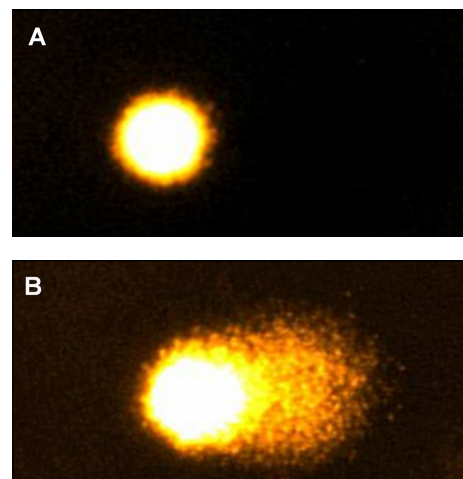
Head DNA gibt den prozentualen Anteil der Gesamt-DNA im Kopf an.

Ein Komet (siehe Abb. 10) besteht aus einer nahezu ungeschädigten Kopf-DNA und einer geschädigten Schweif-DNA. Je nach Schädigung ist dieses Kometenbild mehr oder weniger stark ausgeprägt. Es entsteht dadurch, dass stärker geschädigte DNA wesentlich schneller und daher weiter im elektrischen Feld wandert als geringer geschädigte.

**Abbildung 10:** Fluoreszenzmikroskopische Bilder von Zellkernen mit unterschiedlichem Fragmentierungsgrad bei der Auswertung des Comet Assays.

**A:** DNA einer unbehandelten Kontrolle.

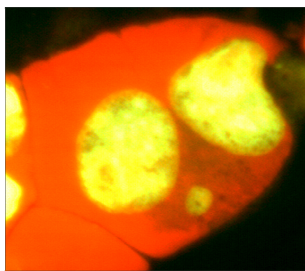
**B:** DNA-Schäden in Form eines Kometenschweifes in einer Zelle, die mit Methylmethansulfonat behandelt wurde.



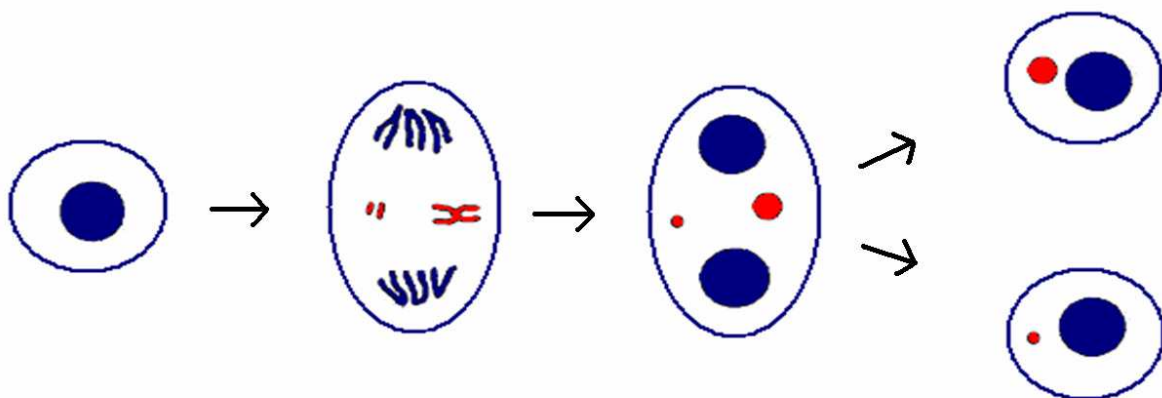
## 2.6 Mikrokerntest

### 2.6.1 Grundlagen des Mikrokerntests

Mit dem Mikrokerntest werden manifeste DNA-Schäden auf DNA-Ebene in Form von Mikrokernen nachgewiesen (siehe Abb. 11). Diese können nach Chromosomenbruch aus Chromosomenfragmenten oder nach Chromosomenverlust aus ganzen Chromosomen bestehen. Mikrokerne entstehen während der Mitose (Anaphase), indem Chromosomen oder Fragmente davon nicht an den Spindelapparat angeheftet werden. Nach der Kernteilung liegen diese Fragmente abseits des Chromosomensatzes und werden bei der Neubildung der Kernmembran nicht in den Kern der Tochterzellen integriert, sondern erhalten eine eigene Membran [Fenech, 1993] (siehe Abb. 12).



**Abbildung 11:** Doppelkernige Zelle mit Mikrokern [Kampfinger, 2008].



**Abbildung 12:** Schematische Darstellung der Mikrokernebildung [Fenech, 1993].

Zelluläre Reaktionen wie Mitosen, Apoptosen und Nekrosen sowie die Proliferationsrate der Zellen lassen sich durch Zählung von ein-, doppel- und mehrkernigen Zellen ebenfalls bestimmen. Die Mehrkernigkeit wird durch die Zugabe des Zytokinaseinhibitors Cytochalasin B erreicht. Dieser verhindert eine Zellteilung nach abgeschlossener Kernteilung [Fenech und Morley, 1985 und 1986]. Bei der Zählung der Mikrokerne werden nur doppelkernige Zellen (zweiter Zählthroughang) ausgewertet, um Fehlinterpretationen wegen fehlender Proliferation der Zellen auszuschließen.

## 2.6.2 Puffer und Lösungen

### Soerensen-Puffer, pH 6,8

- 2,92 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  (15 mM)
- 2,3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  (15 mM)
- in 1 l Aqua bidest.
- autoklavieren

### Acridinorange-Färbelösung (0,006 %)

- 4,5 ml Acridinorange-Stammlösung
- 67,5 ml Soerensen-Puffer

### PBS (1 x)

- PBS (10 x) pH 7
- mit Aqua bidest. auf 1:10 verdünnen

### Acridinorange-Stammlösung (0,1 %)

- 100 mg Acridinorange
- in 100 ml Aqua bidest.

### Cytochalasin B (1 mg/ml)

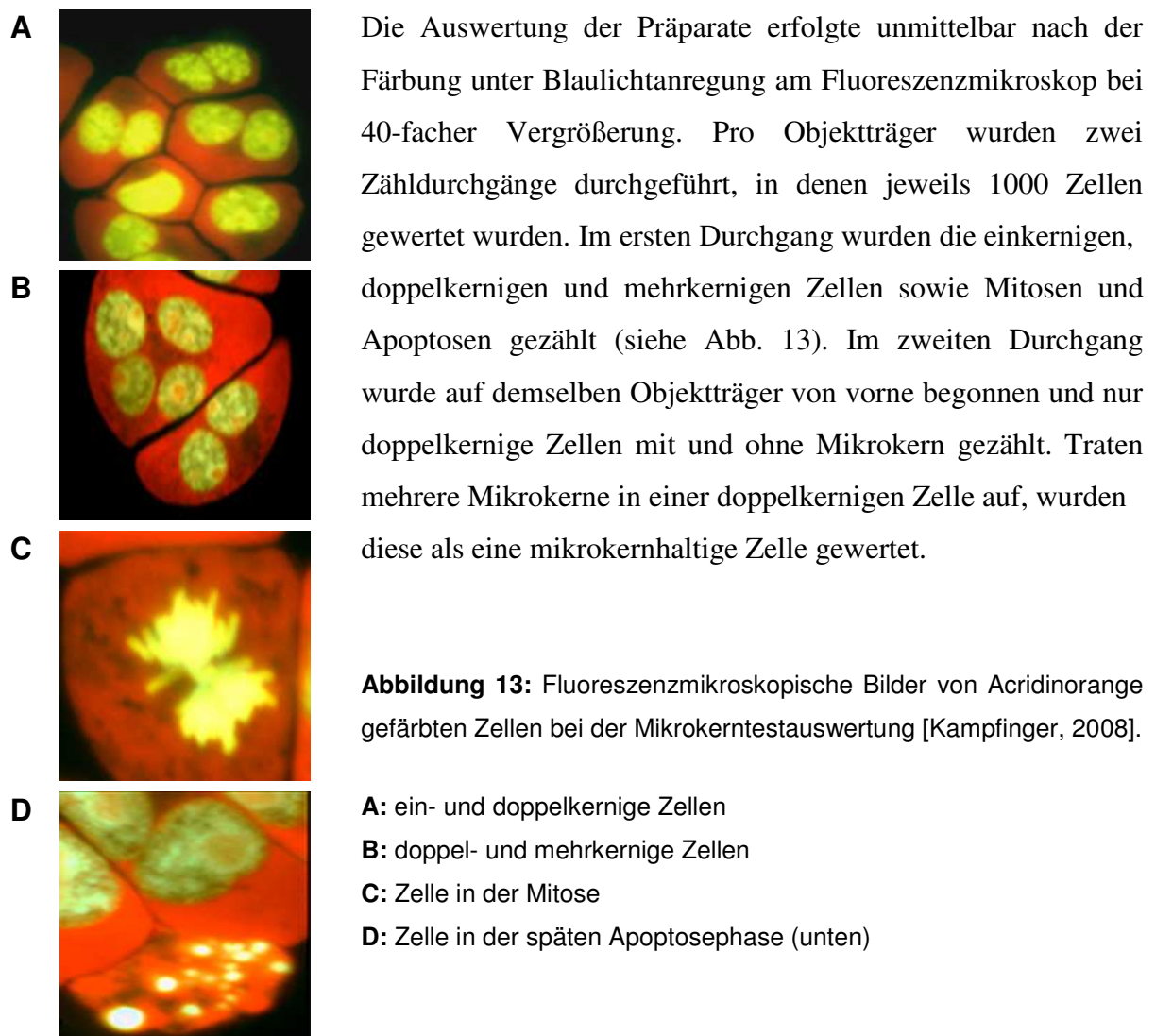
- 2 mg Cytochalasin B
- 2 ml DMSO
- bei  $-20^\circ\text{C}$  lagern



### 2.6.3 Durchführung des Mikrokerntests

Nach der Behandlung wurden 30.000 Zellen auf einen Objektträger mittels Zytozentrifugation aufgebracht und anschließend mindestens 2 Stunden in eiskaltem Methanol bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  fixiert. Anschließend wurden die Objektträger 3-5 min in Acridinorange-Färbelösung angefärbt, zweimal 5 min in Soerensen-Puffer entfärbt und mit Soerensen-Puffer eingedeckt. Acridinorange ist ein DNA-Farbstoff, der an einzel- und doppelsträngige Nukleinsäure bindet. Unter Blaulichtanregung fluoresziert die doppelsträngige DNA (Kern) gelb-grün und die einzelsträngige RNA (Zytoplasma) rot.

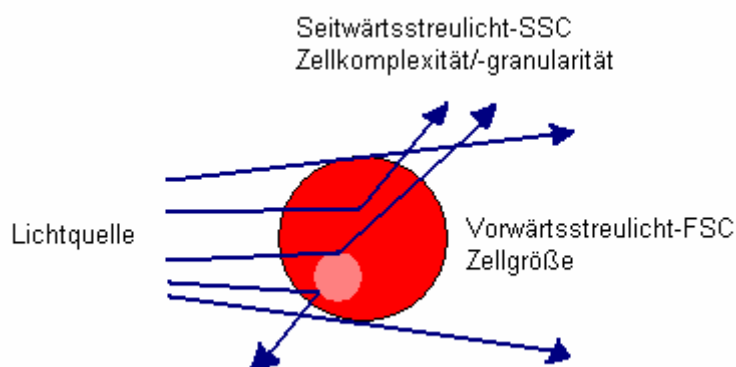
### 2.6.4 Auswertung des Mikrokerntests



## 2.7 Durchflusszytometrie

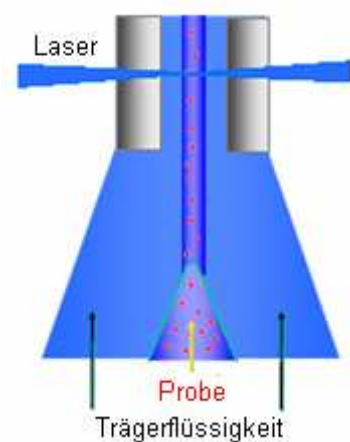
### 2.7.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie können relative Größe (Vorwärtsstreuung-FSC), relative Granularität oder interne Komplexizität (Seitwärtsstreuung-SSC) (siehe Abb. 14) sowie spezifische Fluoreszenz und die entsprechende relative Fluoreszenzintensität von suspendierten Einzelzellen erfasst werden [BD Biosciences, 2000].



**Abbildung 14:** Erfassung von Zellgröße und Zellkomplexität/-granularität [BD Biosciences, 2000].

Das Gerät besteht aus einem Flüssigkeitssystem, einem optischen System und einem elektronischen System. Durch die Trägerflüssigkeit wird eine laminare Strömung (Hüllstrom) erzeugt, welche die suspendierten Einzelzellen zur Analyse durch den Laserstrahl führt. Durch eine Querschnittsverringering in der Messküvette werden Proben- und Hüllstrom beschleunigt und verjüngt (hydrodynamische Fokussierung). Dadurch wird der Abstand zwischen den Zellen vergrößert, so dass die Zellen einzeln den Laserstrahl passieren und einzeln gemessen werden können (siehe Abb. 15) [BD Biosciences, 2000]. Das optische System bestimmt die Zellmerkmale. Es besteht aus einem oder mehreren Lasern, der die Partikel im laminaren Strom anstrahlt (Anregungsoptik) und aus optischen Filtern, die die austretenden Lichtsignale zu den Detektoren leiten (Detektionsoptik). In den Detektoren werden durch das elektronische System zuerst die optischen Signale in elektronische Signale umgewandelt. Danach erfolgt die Digitalisierung der elektronischen Signale für die Computeranalyse. Diese erfolgt mit der Software FACSDiva.



**Abbildung 15:** Funktion der Durchflusszytometrie [BD Biosciences, 2000]

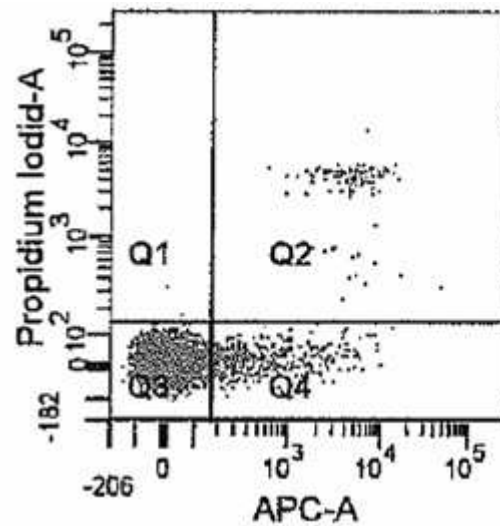
## 2.7.2 Apoptosemessung

### 2.7.2.1 Grundlagen der Apoptosemessung

Die frühesten Merkmale der Apoptose sind die Veränderungen in der Plasmamembran. Die Plasmamembran von Zellen ist asymmetrisch aufgebaut. In der frühen Phase der Apoptose kommt es zum Verlust der Asymmetrie. Dabei werden die Membranphospholipide (Phosphatidylserine) von der Innenseite auf die Außenseite der Plasmamembran verlagert [van Engeland et al., 1998].

Annexin-V ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges, phospholipid-bindendes Protein, das eine hohe Affinität zu Phosphatidylserinen hat. Annexin-V erkennt und bindet die Phosphatidylserine. Es kann daher im Gegensatz zu Analysen, die auf Kernänderungen wie z. B. DNA-Fragmentation basieren, die Apoptosen in der frühen Phase, in welcher die Membranintegrität noch erhalten ist,

identifizieren. An Annexin-V ist das Fluorochrom APC gebunden, wodurch der durchflusszytometrische Nachweis möglich wird. Durch die Kombination der Annexin-V-APC-Färbung mit dem DNA-Farbstoff Propidiumiodid (PI), welcher die geschädigte Plasmamembran anfärbt, ist es möglich zwischen frühen apoptotischen Zellen (Annexin-V positiv, PI negativ) und Zellen in späteren Phasen der Apoptose oder Nekrosen (Annexin-V positiv, PI positiv) zu unterscheiden. Der Test differenziert allerdings nicht zwischen Zellen, die in der Apoptose untergegangen sind, von solchen, die als Ergebnis des nekrotischen Wegs starben, da beide Zelltod-Typen mit der Zerstörung der Membranintegrität einhergehen und somit von Annexin-V und PI angefärbt werden können [BD Biosciences, 2005] (siehe Abb. 16 und 17).



**Abbildung 16:** Durchflusszytometrische Apoptosemessung mit Annexin-V und Propidiumiodid: Vitale Zellen (Q3), frühapoptotische Zellen (Q4) und spätapoptotische/nekrotische Zellen (Q2).

### 2.7.2.2 Puffer und Lösungen

#### Annexin-V Binding Buffer (10 x)

- 0,1 M HEPES/NaOH (pH 7,4)
- 1,4 M NaCl
- 25 mM CaCl<sub>2</sub>
- sterilfiltriert
- Lagerung bei 4 °C

#### Annexin-V Binding Buffer (1 x)

- 1:10-Verdünnung des 10 x Bindepuffers mit Aqua bidest.

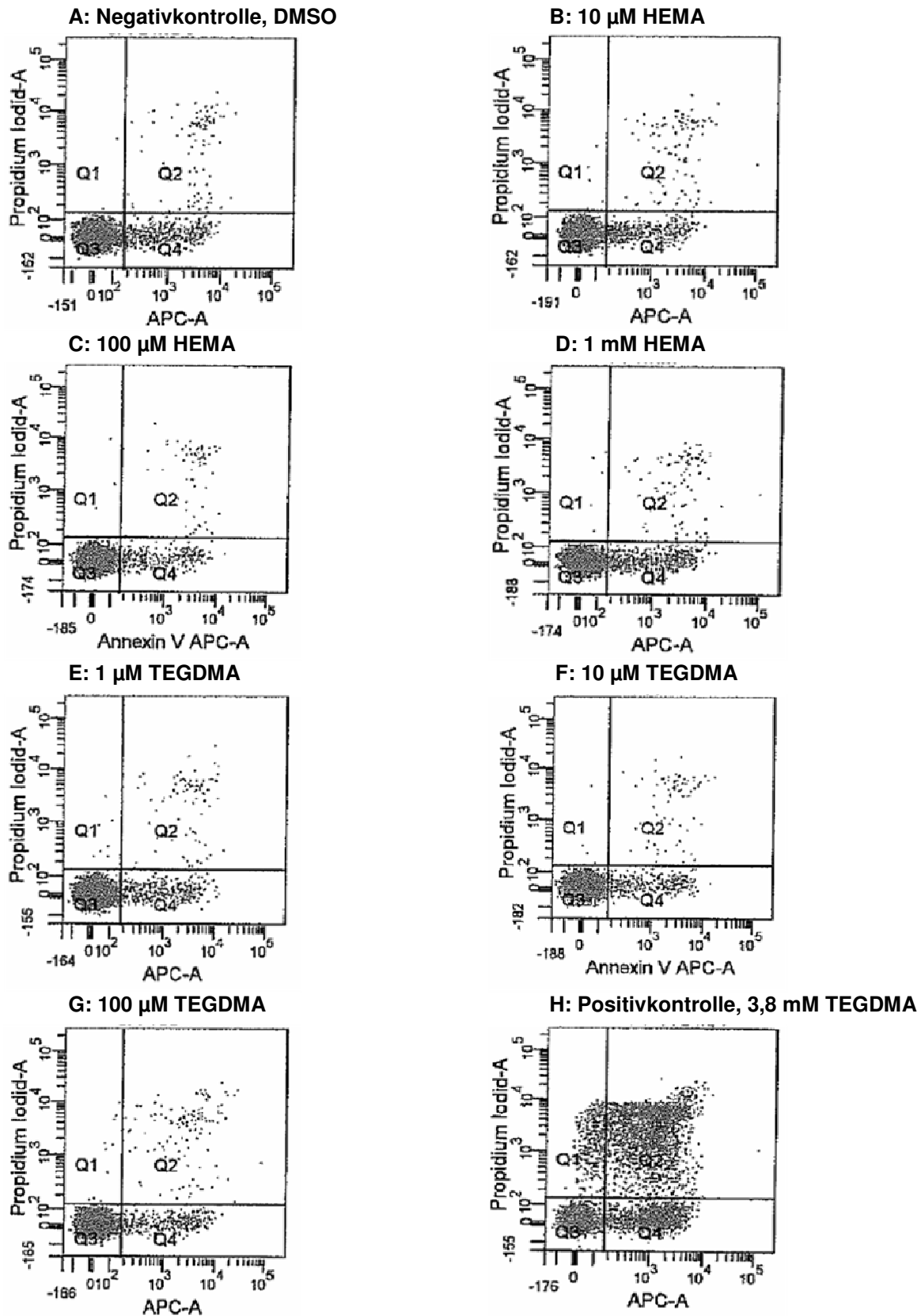
#### Propidiumiodid-Stammlösung

- 100 µl Propidiumiodid
- 2 ml Binding Buffer
- sterilfiltriert
- Lagerung lichtgeschützt im Kühlschrank

#### Annexin-V-APC

### 2.7.2.3 Durchführung der Apoptosemessung

Nach der Behandlung wurden die Zellen geerntet, in FACS-Röhrchen pipettiert und bei 300 x g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl 1 x Binding Buffer resuspendiert. Die Zellen wurden daraufhin mit 5 µl Annexin-V-APC und 5 µl PI angefärbt, vorsichtig homogen gemischt und 15 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Danach wurden 400 µl Binding Buffer zugegeben und innerhalb einer Stunde die Apoptosen mit dem FACS Canto-Gerät gemessen (siehe Abb. 17). Die für diesen Versuch zusätzliche Negativkontrolle (DMSO, 11. Ansatz) wurde nicht mit Annexin-V-APC und PI angefärbt, denn diese diente bei der Messung zur Lagebestimmung der negativen Zellen.

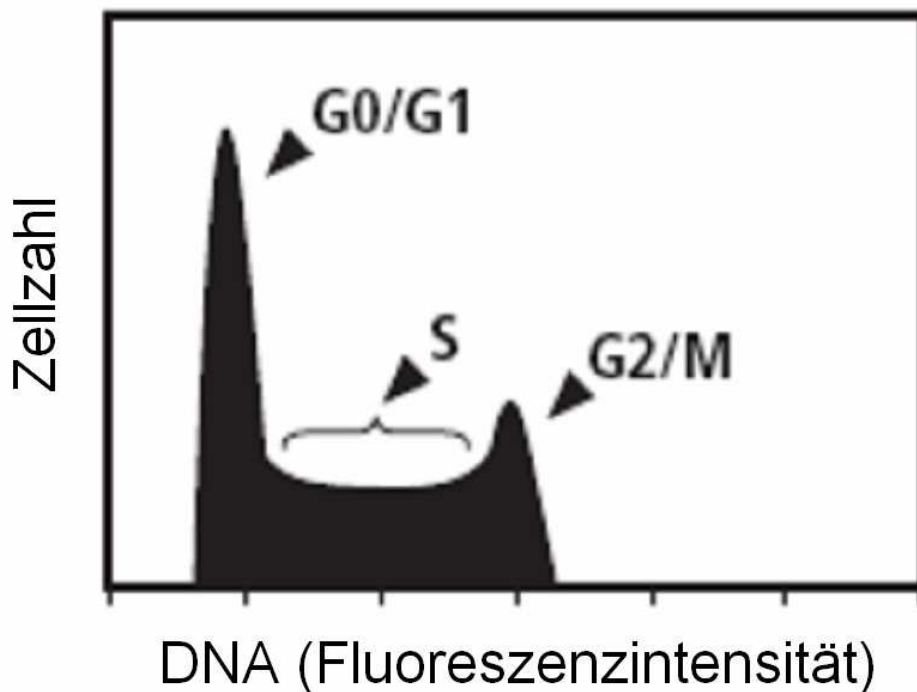


**Abbildung 17:** Anschauungsgrafiken der durchflusszytometrischen Apoptosemessung eines Probanden. Apoptosemessung der mit HEMA (B-D) und TEGDMA (E-G) behandelten Lymphozyten sowie die Apoptosen der Negativ (A)- und Positivkontrolle (H).

## 2.7.3 Zellzyklusanalyse

### 2.7.3.1 Grundlagen der Zellzyklusanalyse

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, wird der Zellzyklus in Interphase und Mitose unterteilt. Der DNA-Gehalt ist in den einzelnen Phasen unterschiedlich. Dies ermöglicht anhand der Durchflusszytometrie die Zellverteilung auf die einzelnen Phasen darzustellen. Der erste Peak in der Interphase zeigt die G1-Phase mit einem einfachen Chromosomensatz. Darauf folgt die S-Phase, in der der DNA-Gehalt zunimmt. Der zweite Peak zeigt die G2-Phase mit einem doppelten Chromosomensatz (siehe Abb. 18). In der G1- und G2-Phase werden Reparaturen an geschädigten Zellen vorgenommen. Die DNA wird mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) angefärbt. PI schaltet sich in die DNA-Helix ein. Da PI sowohl doppelsträngige DNA als auch doppelsträngige RNA anfärbt, werden die Zellen mit RNase behandelt [BD Biosciences, 2005].



**Abbildung 18:** Analyse des zellulären DNA-Gehalts [BD Biosciences, 2005].

### 2.7.3.2 Puffer und Lösungen

#### PBS (1 x)

- 1:10-Verdünnung des 10 x PBS

#### Fixierlösung

- Ethanol 70 %

#### PI/RNase Staining Buffer

### 2.7.3.3 Durchführung der Zellzyklusanalyse

Nach der Behandlung wurden die Zellen bei 300 x g 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl 70 %igem Ethanol für mindestens 1 Stunde bei -20 °C fixiert. Anschließend wurden 500 µl eiskaltes PBS zugegeben und die Zellen wieder bei 300 x g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl PI/RNase Staining Buffer resuspendiert. Die Proben wurden danach 15 min lichtgeschützt bei RT inkubiert und schließlich mit dem FACS Canto-Gerät gemessen.

### 2.7.3.4 Auswertung der Zellzyklusanalyse

Die Auswertung der Zellzyklusanalyse wurde mit der Software ModFit LT3.2 von Veriety Software House durchgeführt.

## 2.8 Chromosomentests

### 2.8.1 Grundlagen des Chromosomenaberrationstests

Der Chromosomenaberrationstest kann mit allen proliferierenden Zellen durchgeführt werden. Bei menschlichen Lymphozytenkulturen erweist sich ein konstanter Karyotyp und eine konstante Spontanrate an Chromosomenmutationen als vorteilhaft [Madle et al., 1993]. Um die Chromosomen lichtmikroskopisch gut beurteilen zu können, müssen die Zellen in der Metaphase arretiert werden. Um dies zu erreichen, wird der Zellsuspension eine Stunde vor Präparationsbeginn Colchicin zugesetzt. Colchicin ist ein starkes Zell-, Kapillar- und Mitosegift, das die Ausbildung der Spindelfasern hemmt. Die Mitose wird dadurch aber nicht unterbrochen. Es unterbleibt lediglich die äquatoriale Ausrichtung der Chromosomen und das Aufteilen der Schwesterchromatiden in der Anaphase. Bei Zellteilung entstehen eine kernhaltige und eine kernlose nicht überlebensfähige Zelle.

### 2.8.2 Grundlagen des Schwesterchromatidaustauschtests

Der Schwesterchromatidaustauschtest ist ein relativ einfacher, schneller und empfindlicher Indikatorstest, der mit allen proliferierenden Zellen durchgeführt werden kann. Er ist gut mit dem Chromosomenaberrationstest kombinierbar, da die Methoden ähnlich sind. Eine differentielle Markierung der Schwesterchromatiden ist für die Darstellung der SCEs maßgebend. Durch die Zugabe von Bromdesoxyuridin (BrdU) werden nicht nur die SCEs sichtbar gemacht, sondern auch Informationen über die Proliferation der Kulturen gegeben [Speit, 1993]. BrdU ist ein Thymidinbasenanalogen, das in der S-Phase an Stelle von Thymidin in die DNA des neu synthetisierten Strangs eingebaut wird. Wenn es während der Kultivierung zu einem zweiten Zyklus kommt, wird BrdU auch in den anderen Tochterstrang eingebaut. Das Metaphasenchromosom besteht danach aus einer bifilar und einer unifilar mit BrdU substituierten Chromatide [Speit, 1993]. Sichtbar wird diese asymmetrische BrdU-Substitution nach Färbung der Chromosomen durch die unterschiedliche Farbintensität der Schwesterchromatiden.



### 2.8.3 Vorbereitungen

Etwa 3 Tage vor der Chromosomenpräparation wurden die Objektträger in ein Aceton-Ethanol-Gemisch (50:50) über Nacht gestellt. Am nächsten Tag wurden die Objektträger mit H<sub>2</sub>O gewässert und danach in Aqua dest. im Kühlschrank gelagert.

### 2.8.4 Puffer und Lösungen

#### 0,4 %ige KCl-Lösung

- 0,4 g KCl in 100 ml Aqua bidest.
- vor jeder Präparation auf 37 °C erwärmen

#### Soerensen-Puffer (10 x)

- 11,13 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 8,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- in 500 ml Aqua bidest.

#### PBS (1 x), pH 7,4

- PBS (10 x), pH 7,0
- mit Aqua bidest. auf 1:10 verdünnen

#### Hoechstlösung

- 1 ml Hoechst-Stammlösung
- 70 ml Aqua bidest.

#### Fixierlösung

- Methanol-Eisessig (3:1)
- immer frisch ansetzen
- bei -20 °C kühlen

#### 5 %ige Giemsa-Lösung

- 10 ml Soerensen-Puffer (10 x)
- 7 ml Giemsa-Lösung
- in 100 ml Aqua bidest.
- frisch filtrieren

#### Trypsin-Lösung

- 1 ml Trypsin
- 100 ml PBS (1 x)
- frisch ansetzen

#### Eindeckmittel

- Eukitt

## 2.8.5 Chromosomenpräparation

Nach der einstündigen Behandlung der Zellen mit Colchicin wurden die Zellsuspensionen bei 222 x g 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 5 ml PBS aufgenommen und die Zellzahl und Vitalität gemessen. Danach erfolgte eine weitere zehnminütige Zentrifugation bei 222 x g. Der Überstand wurde bis auf etwa 1 cm abgesaugt und die Zellen im restlichen Medium resuspendiert. Dann wurden zwei Pasteurpipetten der 0,4 %igen KCl-Lösung (37 °C) zugegeben und 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde eine Pasteurpipette Fixierlösung (-20 °C) dazugegeben, gemischt und bei 222 x g 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder bis auf etwa 1 cm abgesaugt und das Pellet im restlichen Medium resuspendiert. Danach wurden zwei Pasteurpipetten Fixierlösung zugegeben und bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde bei 222 x g 7 min zentrifugiert, der Überstand wie zuvor abgesaugt und das Pellet im restlichen Medium resuspendiert. Danach wurden zweimal zwei Pasteurpipetten Fixierlösung zugegeben, bei 222 x g 7 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet im restlichen Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf die vorbereiteten feuchten Objektträger aufgetropft und stehend bei Raumtemperatur getrocknet.

Für den Schwesterchromatidaustauschtest erfolgte eine Alterung der Präparate zuerst 24 Stunden dunkel bei 37 °C im Trockenschrank und danach 24 Stunden dunkel bei Raumtemperatur. Für den Chromosomenaberrationstest wurden die Objektträger erst für 30 min auf die 90 °C heiße Heizplatte gelegt und dann 24 Stunden bei 60 °C im Ofen gelagert.

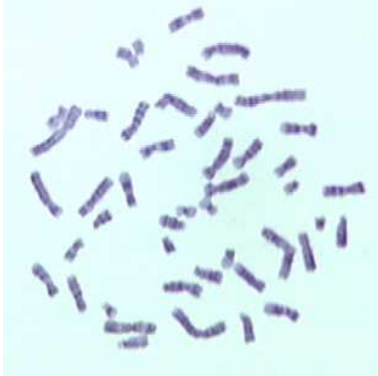
## 2.8.6 Färbung der Chromosomenaberrationen

Zu Beginn wurde eine Küvette mit 2 x SSC in das 60 °C warme Wasserbad gestellt und die Objektträger 10 min im Dunkeln mit Hoechstlösung kultiviert. Anschließend wurden diese mit 1 x PBS gewaschen. Die Objektträger wurden danach in eine Wanne gelegt, mit ca. 1 cm 1 x PBS überschichtet und 25 min mit 360 nm behandelt. Danach wurden die Objektträger sofort in die 2 x SSC-Küvetten und in ein Wasserbad (60 °C) gestellt. Nach 90 min wurden diese zweimal mit Aqua bidest. gewaschen und im Dunkeln gelagert und getrocknet. Nach ausreichender Trocknung wurden die Objektträger 2 min mit der frisch angesetzten Trypsin-Lösung gefärbt, dann in 1 x PBS gewaschen und schließlich 2 min mit Giemsa-Lösung gefärbt. Danach wurden diese in Aqua bidest. gewaschen, getrocknet und mit Eukitt eingedeckt.

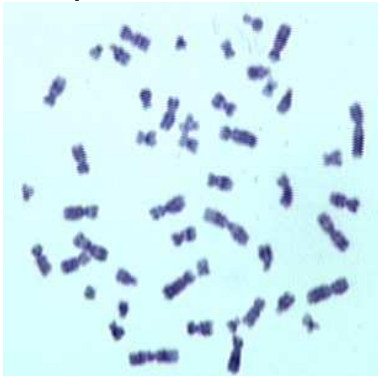
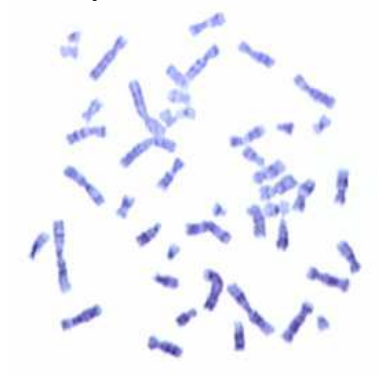
## 2.8.7 Auswertung des Chromosomenaberrationstests

Die Auswertung des Chromosomenaberrationstests erfolgte an einem Mikroskop. Ausgewertet wurden strukturelle und numerische Aberrationen. Bei den strukturellen Aberrationen wurde zwischen Chromatidtypaberrationen und Chromosomentypaberrationen unterschieden. Beim Chromatidtyp ist eine der beiden Schwesterchromatiden und beim Chromosomentyp sind beide Schwesterchromatiden an homologen Stellen betroffen. Diese beiden Typen wurden nach Chromatiden- bzw. Chromosomenbrüche und Reunionen ausgewertet. Im Idealfall ist bei Chromatidenbrüchen das dislozierte Fragment parallel zu seinem homologen Bereich auf der Schwesterchromatide und bei Chromosomen sind die Bruchenden offen (siehe Abb. 19).

A: Negativkontrolle, DMSO

B: 10  $\mu$ M HEMAC: 100  $\mu$ M HEMA

D: 1 mM HEMA

E: 1  $\mu$ M TEGDMAF: 10  $\mu$ M TEGDMAG: 100  $\mu$ M TEGDMA

H: Positivkontrolle, 50 ng/ml MMC



**Abbildung 19:** Anschauungsbeispiele der Chromosomenaberrationen eines Probanden. CAs der mit HEMA (B-D) und TEGDMA (E-G) behandelten Lymphozyten sowie die CAs der Negativ (A)- und Positivkontrolle (H).

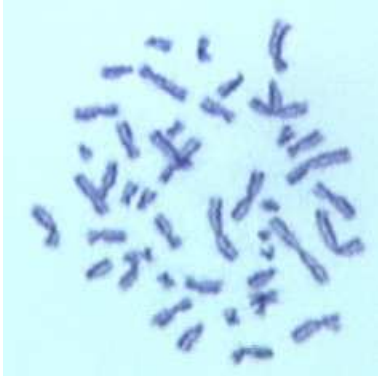
## 2.8.8 Färbung der Schwesterchromatidaustausche

Wie bei der Färbung der Chromosomen wurde auch hier eine Küvette mit 2 x SSC in das 60 °C warme Wasserbad gestellt. Die Objektträger wurden 10 min im Dunkeln mit Hoechstlösung kultiviert, dann in 1 x PBS gewaschen und danach in einer Wanne mit 1 x PBS überschichtet und 25 min mit einer Wellenlänge von 360 nm behandelt. Nach der UV-Behandlung wurden die Objektträger sofort in die 2 x SSC Küvetten und 90 min in ein Wasserbad (60 °C) gestellt. Danach wurden diese mindestens zweimal mit Aqua bidest. gewaschen und im Dunkeln gelagert, um sie ausreichend trocknen zu lassen. Die Objektträger wurden mit der frisch hergestellten Giemsa-Lösung ca. 2 min gefärbt, getrocknet und mit Eukitt eingedeckt.

## 2.8.9 Auswertung des Schwesterchromatidaustauschtests

Pro Kultur wurden 25 Mitosen ausgewertet. Dabei wurde jeder Farbwechsel von einer Chromatide auf die andere als SCE gewertet. Zwei benachbarte SCEs, durch die ein kleines Segment zwischen den Chromatiden ausgetauscht wird, wurden korrekt als zwei SCEs gewertet. SCEs am Ende einer Chromatide (in Telomernähe) wurden nur gezählt, wenn gegenüber dem dunklen Segment am Ende der hellen Chromatide tatsächlich ein helles Segment am Ende der dunklen Chromatide zu erkennen war (siehe Abb. 20). SCEs können auch im Zentromer stattfinden. Jedoch sind diese manchmal nicht eindeutig von Überlagerungen der Chromatiden im Zentromer (Twist) zu unterscheiden. Um Unsicherheiten zu vermeiden, wurden Farbwechsel im Zentromer nicht bewertet.

A: Negativkontrolle, DMSO



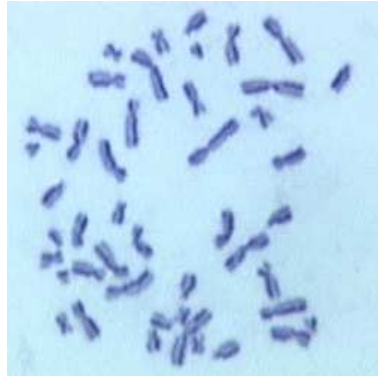
B: 10 µM HEMA



C: 100 µM HEMA



D: 1 mM HEMA



E: 1 µM TEGDMA



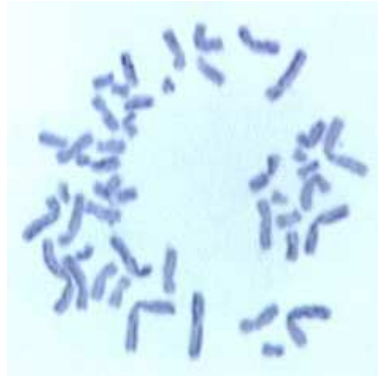
F: 10 µM TEGDMA



G: 100 µM TEGDMA



H: Positivkontrolle, 50 ng/ml MMC

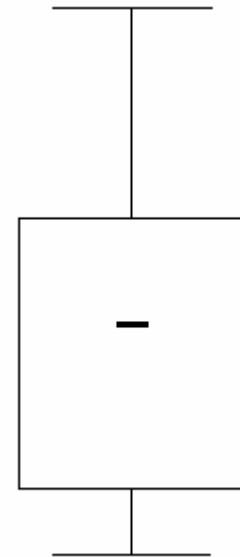


**Abbildung 20:** Anschauungsbeispiele der Schwesterchromatidaustausche eines Probanden. SCEs der mit HEMA (B-D) und TEGDMA (E-G) behandelten Lymphozyten sowie die SCEs der Negativ (A)- und Positivkontrolle (H).

## 2.9 Statistische Analyse

### 2.9.1 Grafische Darstellung der Ergebnisse

Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Boxplots (siehe Abb. 21), die mit der Datenanalyse-Software Statistica 8.0 von StatSoft, Inc., USA (StatSoft (Europe) GmbH, Deutschland) erstellt wurden. Die Box wird unten von der 25. Perzentil begrenzt, d. h. 25 % der Werte liegen unterhalb dieser Linie. Die mittlere Linie kennzeichnet den Median, d. h. 50 % aller Werte liegen über und 50 % unterhalb dieser Linie. Die obere Begrenzung der Box steht für das 75. Perzentil, d. h. 75 % der Werte liegen unterhalb dieser Linie. Die obere bzw. umgekehrte T-Linie markiert den größten bzw. den kleinsten Wert im Bereich von eineinhalb Seitenlängen ober- und unterhalb der Box. Ausreißerwerte liegen zwischen eineinhalb und drei Boxlängen außerhalb und werden durch einen Kreis dargestellt. Extremwerte liegen mehr als drei Boxlängen außerhalb und werden durch ein Kreuz dargestellt.



**Abbildung 21:** Boxplot

### 2.9.2 Statistische Testverfahren

Für die statistischen nichtparametrischen Testverfahren wurde ebenfalls die Datenanalyse-Software Statistica 8.0 verwendet.

#### 2.9.2.1 Friedman-Test

Der Friedman-Test ist ein nichtparametrischer Test. Er wurde vom amerikanischen Wirtschaftswissenschaftler Milton Friedman entwickelt. Dieser Test dient dem Vergleich von mehreren verbundenen Variablen. Die Nullhypothese des Tests besteht in der Annahme, dass alle Variablen dieselbe Verteilung haben. Er wurde eingesetzt, um die Durchschnittswerte der einzelnen HEMA- und TEGDMA-Konzentrationen und der Negativkontrolle zu vergleichen.

### 2.9.2.2 Wilcoxon-Test

Der Wilcoxon-Test ist ebenfalls ein nichtparametrischer Test. Er ist benannt nach dem Chemiker und Statistiker Frank Wilcoxon. Bei diesem Test werden zwei verbundene Variablen wiederum mit der Annahme geprüft, dass beide dieselbe Verteilung haben. Hierbei werden die Mediane der beiden Variablen verglichen. Das lokale  $\alpha$ -Niveau wurde bei  $p < 0,05$  festgelegt. Eingesetzt wurde der Test zum Vergleich der Effekte von HEMA und TEGDMA mit steigender Konzentration und im Vergleich zur Negativkontrolle.



## 2.10 Methodenspezifische Labormaterialien

### 2.10.1 Chemikalien

Chemikalien	Firma
Acridine Orange	Serva, Heidelberg, D
Agarose (MEEO)	Roth, Karlsruhe, D
Agarose Type VII (LMP)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Aminosäuren (nicht essentiell) 100 x	Biochrom, Berlin, D
Annexin-V-APC (100 Tests)	BD Biosciences, Heidelberg, D
Annexin-V-Binding-Buffer, 10 x	BD Biosciences, Heidelberg, D
Aphidicolin <i>Nigrospora sphaerica</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
BD FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg, D
BD FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg, D
BD Propidiumiodid Staining Solution (50 µg/ml)	BD Biosciences, Heidelberg, D
BD Shutdown Solution	BD Biosciences, Heidelberg, D
Biocoll Trennlösung (1,077 g/ml) isoton	Biochrom, Berlin, D
BrdU	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
BSA/BSF (Albumin bovine serum)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D Linaris, Wertheim-Bettingen, D
CaCl <sub>2</sub>	Merck Biosciences, Schwalbach/Ts., D
Camptothecin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
CASY-Ton	Innovatis, Reutlingen, D
Colchicin	Biochrom, Berlin, D
Cytochalasin B	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ethanol	J. T. Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid	Merck Biosciences, Schwalbach/Ts., D
Fpg	New England Biolabs, Frankfurt, D
HEMA	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
HEPES minimum 99,5 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
KOH	Merck Biosciences, Schwalbach/Ts., D
Kaliumchlorid	Merck Biosciences, Schwalbach/Ts., D
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck Biosciences, Schwalbach/Ts., D
Konservierer für Wasserbäder	Roth, Karlsruhe, D

MMC	Medac, Hamburg, D
MMS	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck Biosciences, Schwalbach/Ts., D
Natriumchlorid	Merck Biosciences, Schwalbach/Ts., D
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck Biosciences, Schwalbach/Ts., D
Natrium-Pyruvat 100 mM	Biochrom, Berlin, D
Natronlauge	Merck Biosciences, Schwalbach/Ts., D
N-Lauroylsarcosine 30 %	Serva, Heidelberg, D
NEB-Enzypuffer-BSA-Fpg, M0240S (400 U)	New England Biolabs, Frankfurt, D
Penicillin-Streptomycin (1000 U/1000 µg/ml)	Biochrom, Berlin, D
PHA-L	Biochrom, Berlin, D
PI/RNAse Staining Buffer	BD Biosciences, Heidelberg, D
PBS, 10 x	Roche Diagnostics, Mannheim, D
RPMI 1640 mit stab. Glutamin; 2,0 g/l NaHCO <sub>3</sub>	Biochrom, Berlin, D
Salzsäure 1 M	Merck Biosciences, Schwalbach/Ts., D
Salzsäure 5 M	Merck Biosciences, Schwalbach/Ts., D
TEGDMA	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tris(-hydroxymethyl)	Merck Biosciences, Schwalbach/Ts., D
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Trypan Blue Solution 0,4 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Trypsin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

## 2.10.2 Geräte und Zubehör



Geräte und Zubehör	Firma
Brutschränke	
CO <sub>2</sub> Inkubator NU5500E	NuAire, Plymouth, USA
CO <sub>2</sub> Inkubator mit Heißluftsterilisation CB210	BINDER, Tuttlingen D
Counter, elektronisches Zähl- und Speichergerät	Karl Hecht, Sondheim, D
Durchflusszytometer, FACSCanto™	BD Biosciences, Heidelberg, D
Elektrophoresekammern (220 V-50 H)	Renner, Dannstadt, D
Elektrophoresenetzgerät, EV202	Consort, Turnhout, B
Fluoreszenzlampen, ebq 100 ISOLATED	Leica, Heerbrugg, CH
Fluoreszenzmikroskop (Comet 5.5), DM4000B	Leica, Heerbrugg, CH
Fluoreszenzmikroskop (Mikrokern)	Leica, Heerbrugg, CH
Gefrierschrank (-80 °C)	New Brunswick Scientific, Nürtingen, D
Heizplatte, M6	CAT, Staufen, D
Kammern	Brand, Wertheim, D
Kühlschrank (+4 °C)	Bosch, Stuttgart, D
Küvetten nach Hellendahl	Carl Roth, Karlsruhe, D
Membran-Vakuumpumpe	ABM, Marktredwitz, D
Mikroskop, 473028	Zeiss, Oberkochen, D
Mikrowelle	Bauknecht, Schorndorf, D
pH-Meter	Wissenschaftliche-Technische Werkstätte, Weilheim i. OB, D
Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
Sterile Werkbank, HERAsafe <sup>®</sup>	Thermo Electron Corporation, Langenselbold, D
Vortex, Genie <sup>®</sup> 2	Bender & Hobein, Zürich, CH
Waagen	August Sauter, Ebingen, D
Wasserbad, HAAKE SWB25	Thermo Electron Corporation Langenselbold, D
Zählkammer, Neubauer	Langenbrinck, Emmendingen, D
Zellzählgerät, CASY <sup>®</sup>	Innovatis, Reutlingen, D
Zentrifugen	
Centrifuge 5415R eppendorf	
MiniSpin <sup>®</sup> -Zentrifuge	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
Zytozentrifuge Cellspin I	Tharmac, Waldsolms, D

## 2.10.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma
Blutentnahmesystem, S-Monovette	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
Cellcountergefäße, CASY-Cups	Innovatis, Reutlingen, D
Deckgläser (24 x 32 mm)	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, D
FACS-Röhrchen, BD Falcon™, Rundbodenröhrchen aus Polystyrol (5 ml)	BD Biosciences, Heidelberg, D
Objektträger (ca. 76 x 26 mm)	Langenbrinck, Emmendingen, D
Pasteurpipetten (Glas)	Brand, Wertheim, D
Pipetten aus Polystyrol (1 ml, 5 ml, 10 ml)	Corning, New York, USA
Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl) (0,5-10 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, D Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml (transparent); 1,5 ml (braun))	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Zellkulturflasche (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Zellkulturplatte (24 Loch)	BD Biosciences, Heidelberg, D
Zellkulturröhrchen, Chromosomenröhrchen	Nunc, Roskilde, DK
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

### 3.1 Zahlen - Daten - Fakten

In diesem Teil der Arbeit werden die Wirkungen von HEMA und TEGDMA in humanen Lymphozyten nach 24-stündiger Behandlung präsentiert. Zuerst werden die Effekte von HEMA und TEGDMA auf die Zellzahl und die Zellvitalität dargestellt. Als Bezugsgröße dient die Negativkontrolle, sie wird immer gleich 100 % gesetzt. Damit wird eine reduzierende oder steigernde Wirkung von HEMA und TEGDMA deutlich sichtbar. Anschließend folgen die Ergebnisse zur Genotoxizität im Comet Assay. Um zusätzlich noch Aussagen über mögliche oxidative Schädigungen treffen zu können, wurde der herkömmliche Comet Assay modifiziert. Dazu wurden nach erfolgter Elektrophorese je die Hälfte der Präparate einer Konzentration 30 Minuten mit Enzym-BSA-Puffer bzw. mit Fpg-Lösung inkubiert. Dadurch wird ein direkter Vergleich der DNA-Fragmentierung mit und ohne Fpg in nur einem Versuch möglich. Das Ausmaß der genetischen Schädigung wird grafisch anhand des Olive Tail Moment gezeigt. Weitere Parameter, wie Head DNA (Kopf-DNA), Tail DNA (Schweif-DNA) und Tail Length (Schweiflänge) sind unter 5.2.3. und 5.3.3. aufgeführt. Schädigende Effekte von HEMA und TEGDMA auf DNA-Ebene werden im Mikrokernstest anhand der Auswirkungen auf die Anzahl doppelkerniger und mehrkerniger Zellen sowie auf die Mitose- und Apoptoserate und die Mikrokernbildung gezeigt. Um ein mögliches direktes Einwirken von HEMA und TEGDMA auf chromosomaler Ebene zeigen zu können, wurde mit der Hälfte der Proben (5) zusätzlich ein Chromosomenaberrationstest und ein Schwesterchromatidaustauschtest durchgeführt. Zuletzt werden die Ergebnisse zum Nachweis der Zytotoxizität von HEMA und TEGDMA anhand der Messung von Apoptosen mit dem Annexin-V-Affinitätstest und der Analyse des Zellzyklus aufgeführt.

Die Ergebnisse sind grafisch in Boxplots dargestellt. Der Boxplot  wird vom 25. Perzentil und vom 75. Perzentil begrenzt. Die innere Linie repräsentiert den Median –. Die obere bzw. umgekehrte T-Linie steht für den größten bzw. kleinsten Wert. Ausreißer sind durch einen Kreis  und Extremwerte durch ein Kreuz + markiert.

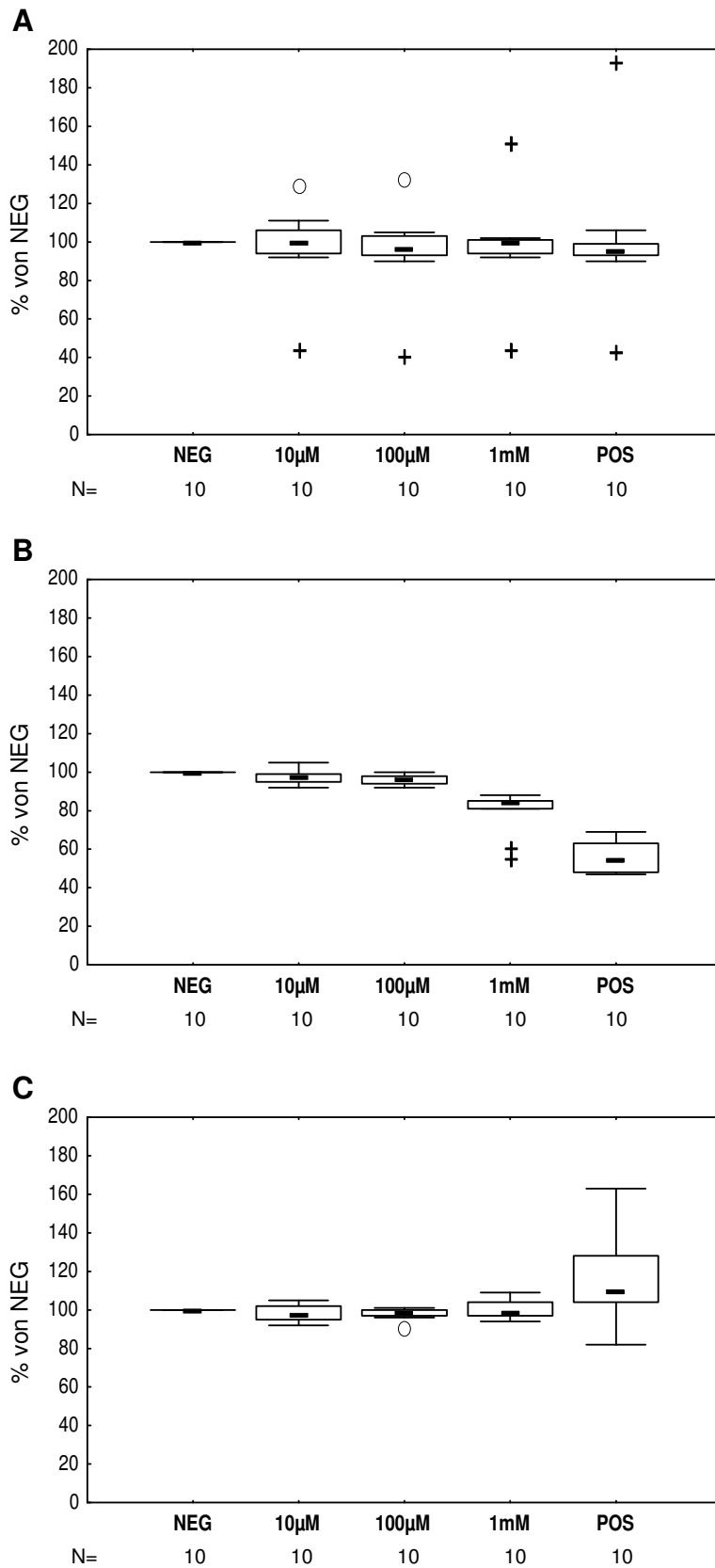
## 3.2 Zahlen

### 3.2.1 Zellzahlen der mit HEMA behandelten Lymphozyten

Die Zellzahlen stimulierter, mit HEMA behandelter Lymphozyten für den Mikrokerntest weichen nicht signifikant von der Zellzahl der Negativkontrolle ab (siehe Abb. 22A, 5.2.1. Tab. 4 und 5.3.1. Tab. 20).

Mit steigender HEMA-Konzentration sinken die Zellzahlen stimulierter Lymphozyten für die Zellzyklusanalyse. Signifikant ist der Abfall bei 100  $\mu\text{M}$  und bei 1 mM. Die als Positivkontrolle verwendeten 2,5  $\mu\text{g/ml}$  APC wirken sich mit einer durchschnittlichen Zellzahl von < 60 % signifikant aus (siehe Abb. 22B, 5.2.1. Tab. 4 und 5.3.1. Tab. 20).

Die Zellzahlen unstimulierter, mit HEMA behandelter Lymphozyten weichen bei 100  $\mu\text{M}$  signifikant von der Zellzahl der Negativkontrolle ab. Bei der Positivkontrolle steigt die Zellzahl signifikant an (siehe Abb. 22C, 5.2.1. Tab. 4 und 5.3.1. Tab. 20).



**Abbildung 22:** Darstellung der Wirkung von **HEMA** auf die Zellzahlen der Lymphozyten.

**NEG** (100 %, Negativkontrolle): DMSO, **POS** (Positivkontrolle): 40 ng/ml MMC (Mikrokerntest, A), 2,5 µg/ml APC (Zellzyklusanalyse, B), 3,8 mM TEGDMA (Comet Assay, Apoptosemessung, C), **µM**: Mikromolar (HEMA), **mM**: Millimolar (HEMA), **N**: Anzahl der Versuche, **-** Median, **□** 25 %-75 %, **[** Nicht-Ausreißer-Bereich, **○** Ausreißer, **+** Extremwert.

**A:** stimulierte Lymphozyten (Mikrokerntest)

**B:** stimulierte Lymphozyten (Zellzyklusanalyse)

**C:** unstimulierte Lymphozyten (Comet Assay, Apoptosemessung)

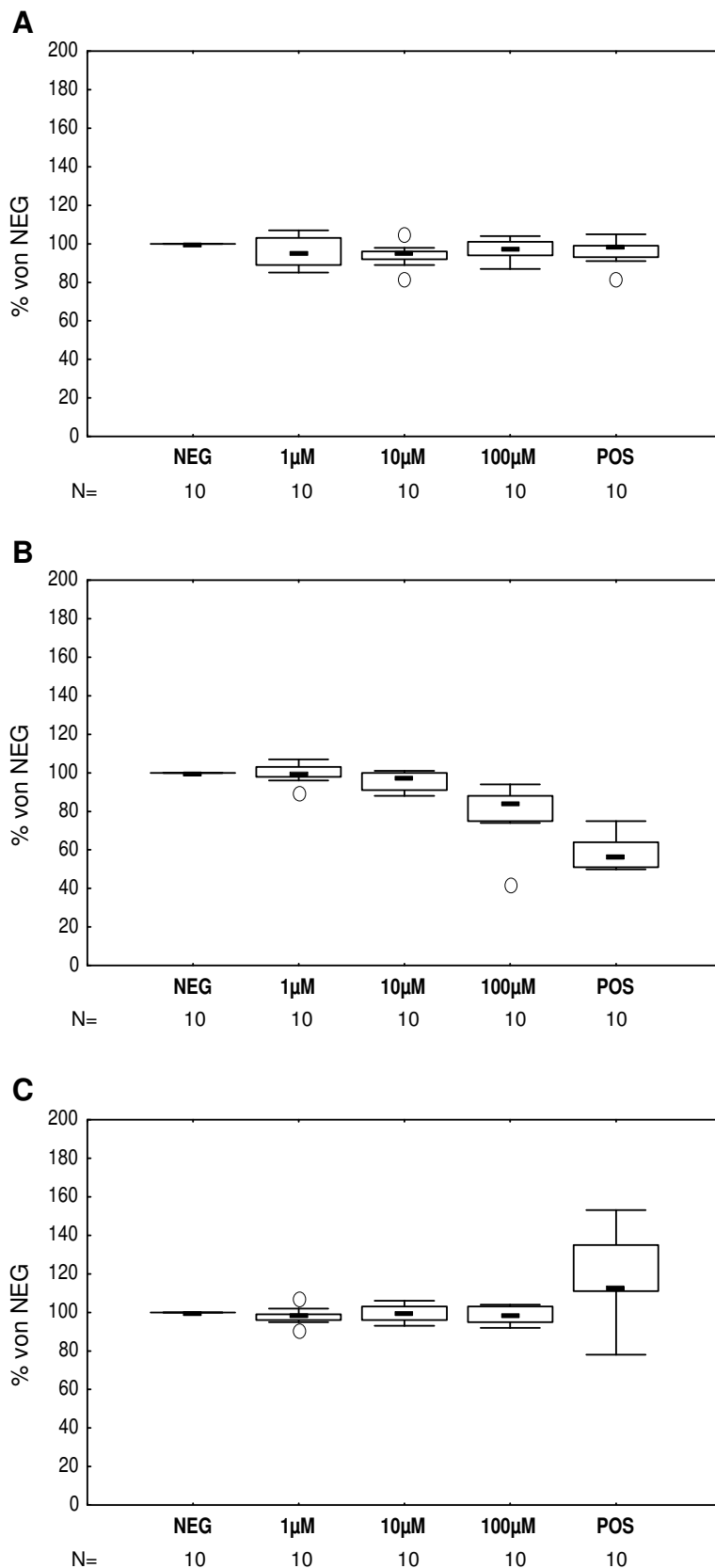
### 3.2.2 Zellzahlen der mit TEGDMA behandelten Lymphozyten

Die Zellzahlen stimulierter, mit TEGDMA behandelter Lymphozyten für den Mikrokerntest weichen nicht signifikant von der Zellzahl der Negativkontrolle ab (siehe Abb. 23A, 5.2.1. Tab. 5 und 5.3.1. Tab. 21).

Aber auch hier sinken die Zellzahlen stimulierter Lymphozyten für die Zellzyklusanalyse mit steigender TEGDMA-Konzentration. Signifikant ist der Abfall bei 10  $\mu\text{M}$  und bei 100  $\mu\text{M}$ . Die als Positivkontrolle verwendeten 2,5  $\mu\text{g/ml}$  APC wirken sich mit einer durchschnittlichen Zellzahl von < 60 % signifikant aus (siehe Abb. 23B, 5.2.1. Tab. 5 und 5.3.1. Tab. 21).

Die Zellzahlen unstimulierter, mit TEGDMA behandelter Lymphozyten weichen nicht signifikant von der Zellzahl der Negativkontrolle ab. Bei der Positivkontrolle steigt die Zellzahl signifikant an (siehe Abb. 23C, 5.2.1. Tab. 5 und 5.3.1. Tab. 21).





**Abbildung 23:** Darstellung der Wirkung von **TEGDMA** auf die Zellzahlen der Lymphozyten.

**NEG** (100 %, Negativkontrolle): DMSO, **POS** (Positivkontrolle): 40 ng/ml MMC (Mikrokerneltest, A), 2,5 µg/ml APC (Zellzyklusanalyse, B), 3,8 mM TEGDMA (Comet Assay, Apoptosemessung, C), **µM**: Mikromolar (TEGDMA), **mM**: Millimolar (TEGDMA), **N**: Anzahl der Versuche, — Median,  25 %-75 %,  Nicht-Ausreißer-Bereich,  Ausreißer.

**A:** stimulierte Lymphozyten (Mikrokerneltest)

**B:** stimulierte Lymphozyten (Zellzyklusanalyse)

**C:** unstimulierte Lymphozyten (Comet Assay, Apoptosemessung)

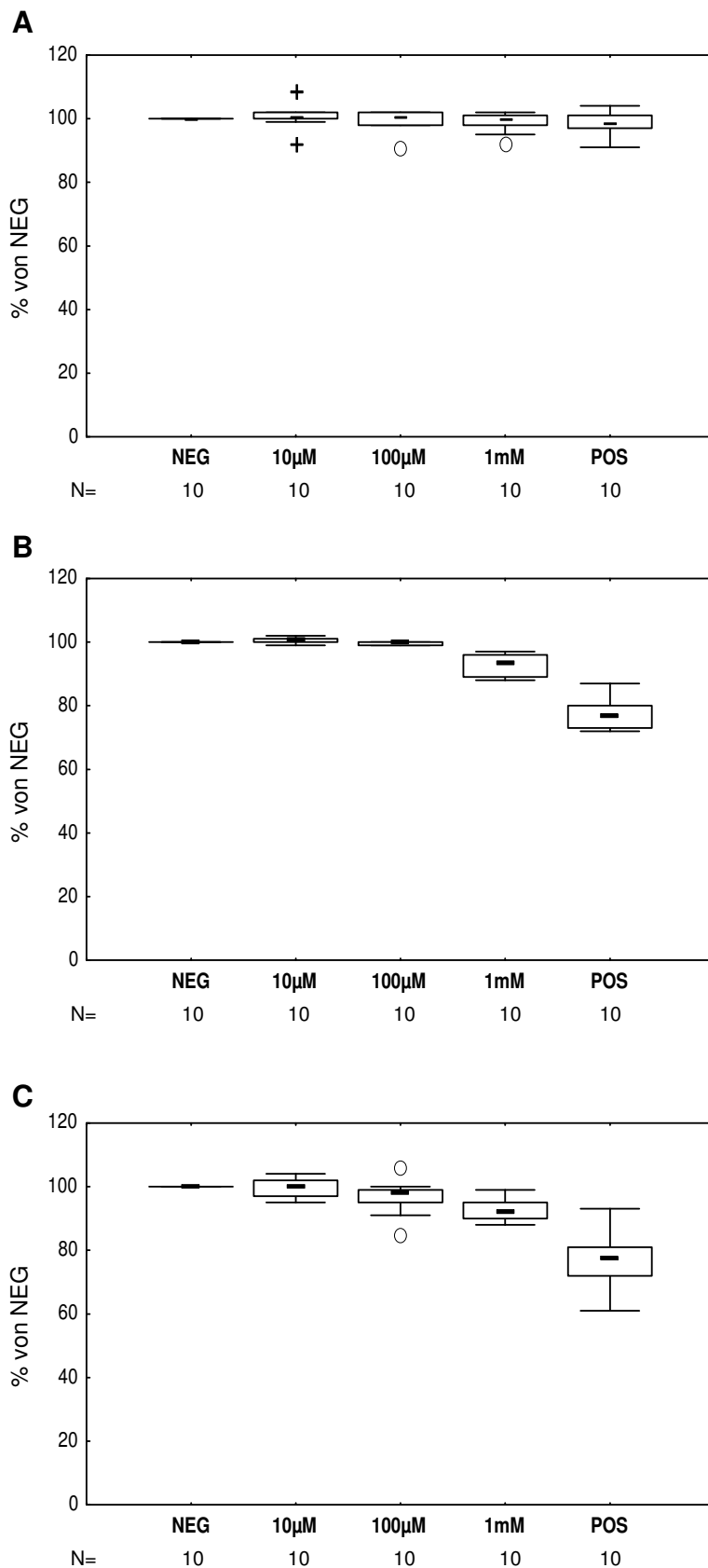
## 3.3 Vitalitäten

### 3.3.1 Zellvitalitäten der mit HEMA behandelten Lymphozyten

Die Vitalitäten stimulierter, mit HEMA behandelter Lymphozyten für den Mikrokerntest bleiben bezogen auf die Negativkontrolle konstant (siehe Abb. 24A, 5.2.2. Tab.6 und 5.3.2. Tab. 22).

Hingegen sinken die Vitalitäten stimulierter Lymphozyten für die Zellzyklusanalyse mit steigender HEMA-Konzentration. Signifikant ist der Abfall bei 100  $\mu$ M und bei 1 mM. Die als Positivkontrolle verwendeten 2,5  $\mu$ g/ml APC wirken sich mit einer durchschnittlichen Vitalität von < 80 % signifikant aus (siehe Abb. 24B, siehe 5.2.2. Tab.6 und 5.3.2. Tab. 22).

Die Vitalitäten unstimulierter, mit HEMA behandelter Lymphozyten sinken mit steigender Konzentration. Signifikant ist der Vitalitätsabfall bei 1 mM in Bezug auf die Negativkontrolle. Die als Positivkontrolle verwendeten 3,8 mM TEGDMA wirken sich mit einer durchschnittlichen Vitalität von < 80 % signifikant aus (siehe Abb. 24C, 5.2.2. Tab. 6 und 5.3.2. Tab. 22).



**Abbildung 24:** Darstellung der Wirkung von **HEMA** auf die Zellvitalitäten der Lymphozyten.

**NEG** (100 %, Negativkontrolle): DMSO, **POS** (Positivkontrolle): 40 ng/ml MMC (Mikrokerntest, A), 2,5 µg/ml APC (Zellzyklusanalyse, B), 3,8 mM TEGDMA (Comet Assay, Apoptosemessung, C), **µM**: Mikromolar (HEMA), **mM**: Millimolar (HEMA), **N**: Anzahl der Versuche, **—** Median, **□** 25 %-75 %, **]** Nicht-Ausreißer-Bereich, **○** Ausreißer, **+** Extremwert.

**A:** stimulierte Lymphozyten (Mikrokerntest)

**B:** stimulierte Lymphozyten (Zellzyklusanalyse)

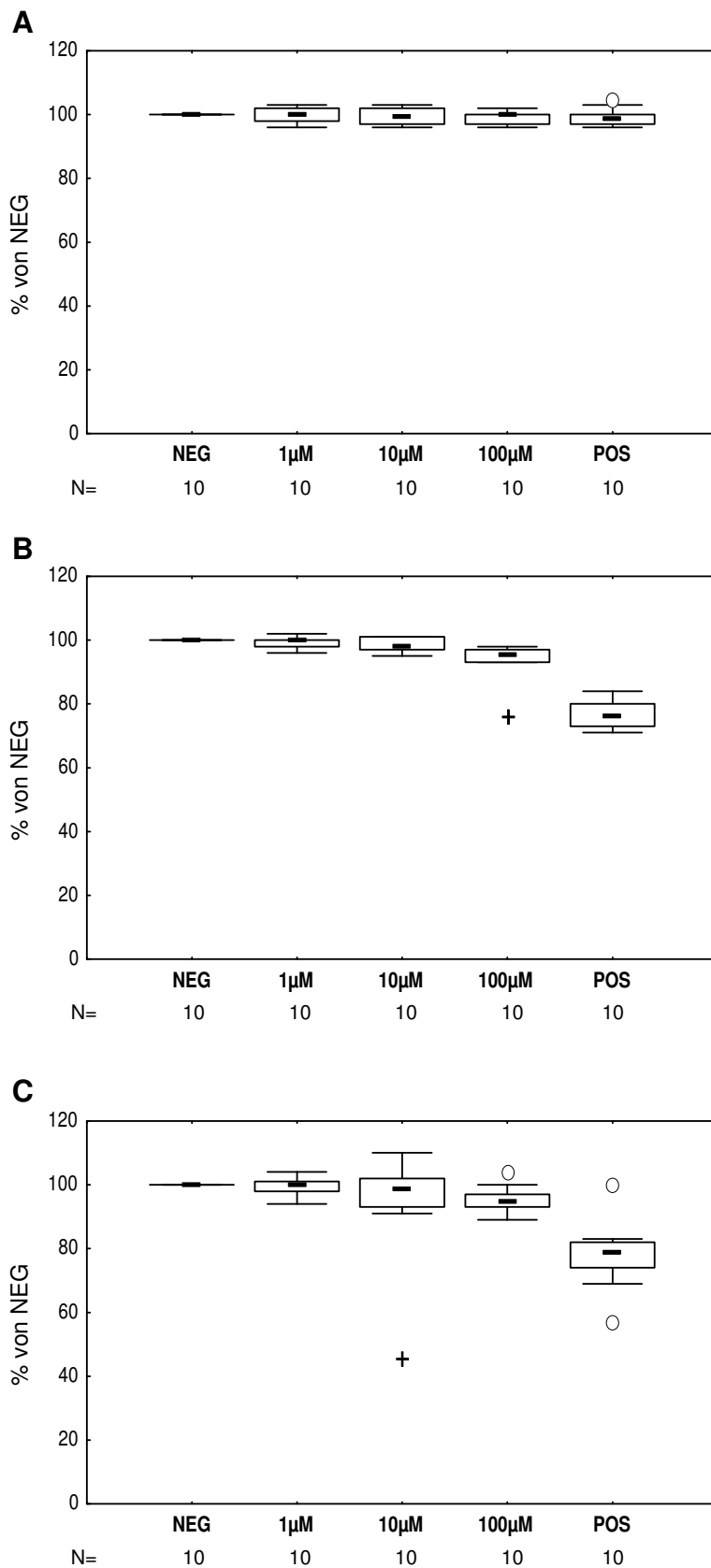
**C:** unstimulierte Lymphozyten (Comet Assay, Apoptosemessung)

### 3.3.2 Zellvitalitäten der mit TEGDMA behandelten Lymphozyten

Die Vitalitäten stimulierter, mit TEGDMA behandelter Lymphozyten für den Mikrokerntest bleiben bezogen auf die Negativkontrolle konstant (siehe Abb. 25A, 5.2.2. Tab. 7 und 5.3.2. Tab. 23).

Die Vitalitäten stimulierter, mit TEGDMA behandelter Lymphozyten sinken mit steigender Konzentration. Signifikant ist der Vitalitätsabfall bei 100  $\mu\text{M}$  in Bezug auf die Negativkontrolle. Die als Positivkontrolle verwendeten 2,5  $\mu\text{g/ml}$  APC wirken sich mit einer durchschnittlichen Vitalität von  $< 80 \%$  signifikant aus (siehe Abb. 25B, siehe 5.2.2. Tab. 7 und 5.3.2. Tab. 23).

Die Vitalitäten unstimulierter, mit TEGDMA behandelter Lymphozyten sinken mit steigender Konzentration. Signifikant ist der Vitalitätsabfall bei 100  $\mu\text{M}$  in Bezug auf die Negativkontrolle. Die als Positivkontrolle verwendeten 3,8 mM TEGDMA wirken sich mit einer durchschnittlichen Vitalität von  $< 80 \%$  signifikant aus (siehe Abb. 25C, 5.2.2. Tab. 7 und 5.3.2. Tab. 23).



**Abbildung 25:** Darstellung der Wirkung von **TEGDMA** auf die Zellvitalitäten der Lymphozyten.

**NEG** (100 %, Negativkontrolle): DMSO, **POS** (Positivkontrolle): 40 ng/ml MMC (Mikrokerntest, A), 2,5 µg/ml APC (Zellzyklusanalyse, B), 3,8 mM TEGDMA (Comet Assay, Apoptosemessung, C), **µM**: Mikromolar (TEGDMA), **N**: Anzahl der Versuche, **—** Median, **□** 25 %-75 %, **┌** Nicht-Ausreißer-Bereich, **○** Ausreißer, **+** Extremwert.

**A:** stimulierte Lymphozyten (Mikrokerntest)

**B:** stimulierte Lymphozyten (Zellzyklusanalyse)

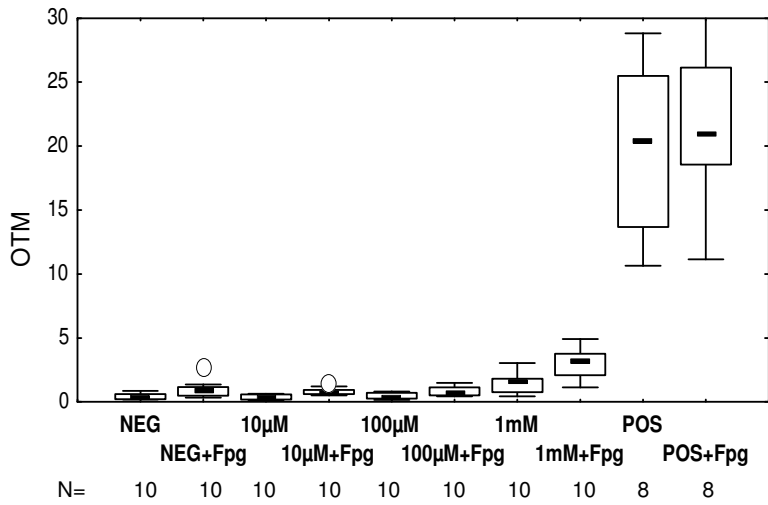
**C:** unstimulierte Lymphozyten (Comet Assay, Apoptosemessung)

## 3.4 Comet Assay mit Fpg

### 3.4.1 Ergebnisse der mit HEMA behandelten Lymphozyten

Der Grad der DNA-Schädigung weicht bei 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  nicht wesentlich von dem der Negativkontrolle ab. Eine stärkere DNA-Fragmentierung tritt mit 1 mM ein. Signifikant ist, dass durch die Fpg-Behandlung jeweils eine Verdoppelung der Schädigung bei NEG, 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 1 mM erreicht wird. Ebenfalls signifikant ist die höhere DNA-Schädigung bei einer Erhöhung der Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  auf 1 mM und von 100  $\mu\text{M}$ +Fpg auf 1 mM+Fpg. Die Positivkontrolle (OTM-Median 20,49) zeigt eine signifikante DNA-Schädigung, welche durch Fpg (OTM-Median 21,02) nochmals erhöht wird (siehe Abb. 26, 5.2.3 Tab. 8 und 5.3.3. Tab. 24).

Neben den OTM-Werten wurden die Werte von Head DNA, Tail DNA und Tail Length erfasst. Der durchschnittliche Anteil der DNA im Kometenkopf nimmt bei allen Proben signifikant durch die Behandlung mit Fpg ab. Signifikant ist die Abnahme der Kopf-DNA bei einer Erhöhung der Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  auf 1 mM und von 100  $\mu\text{M}$ +Fpg auf 1 mM+Fpg. Der durchschnittliche Anteil der DNA im Kometenschweif wird signifikant durch die Fpg-Behandlung nahezu verdoppelt. Statistisch relevant ist hier der Anstieg des DNA-Gehalts im Schweif bei einer Konzentrationserhöhung von 100  $\mu\text{M}$  auf 1 mM und von 100  $\mu\text{M}$ +Fpg auf 1 mM+Fpg. Die Schweiflänge wird signifikant durch die Fpg-Behandlung verlängert. Signifikant ist die Längenzunahme bei einer Erhöhung der Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  auf 1 mM und von 100  $\mu\text{M}$ +Fpg auf 1 mM+Fpg. Die Positivkontrolle hebt sich mit und ohne Fpg in den drei Parametern signifikant von den HEMA-Konzentrationen ab (siehe 5.2.3. Tab. 8 und 5.3.3. Tab. 24).



**Abbildung 26:** Darstellung des Ausmaßes der DNA-Fragmentierung durch **HEMA** und der zusätzlichen Erfassung oxidativer Schäden durch das Fpg-Protein.

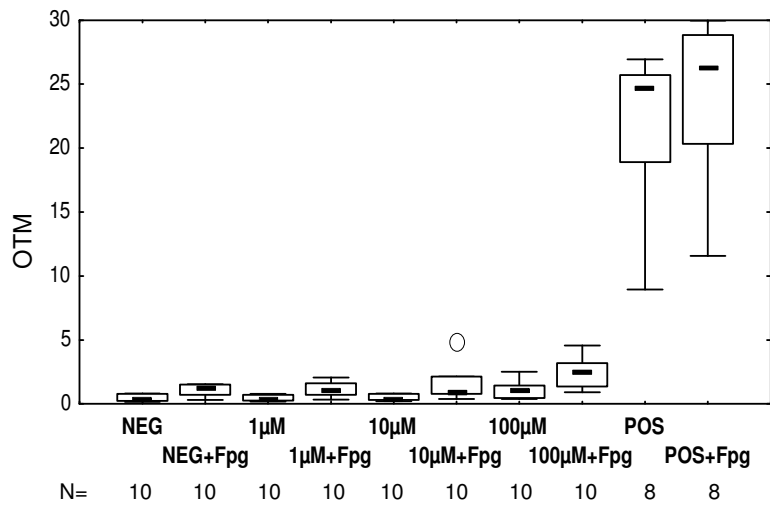
**NEG** (Negativkontrolle): DMSO, **POS** (Positivkontrolle): 3,8 mM TEGDMA, **OTM**: Olive Tail Moment, **µM**: Mikromolar (HEMA), **mM**: Millimolar (HEMA), **N**: Anzahl der Versuche, **—** Median, **□** 25 %-75 %, **[** Nicht-Ausreißer-Bereich, **○** Ausreißer.

### 3.4.2 Ergebnisse der mit TEGDMA behandelten Lymphozyten

Der Grad der DNA-Schädigung weicht bei 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  nicht signifikant von dem der Negativkontrolle ab. Signifikant ist, dass durch die Behandlung mit Fpg mehr als eine Verdoppelung der DNA-Schädigung bei NEG, 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  erreicht wird. Ebenfalls signifikant ist die höhere DNA-Schädigung bei einer Erhöhung der Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  auf 100  $\mu\text{M}$  und von 10  $\mu\text{M}$ +Fpg auf 100  $\mu\text{M}$ +Fpg. Die Positivkontrolle (OTM-Median 24,70) zeigt eine signifikante DNA-Schädigung, welche durch Fpg (OTM-Median 26,24) nochmals erhöht wird (siehe Abb. 27, 5.2.3. Tab. 9 und 5.3.3. Tab. 25).

Neben den OTM-Werten wurden die Werte von Head DNA, Tail DNA und Tail Length erfasst. Der durchschnittliche Anteil der DNA im Kometenkopf nimmt bei allen Proben signifikant durch die Behandlung mit Fpg ab. Signifikant ist die Abnahme der Kopf-DNA bei einer Erhöhung der Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  auf 100  $\mu\text{M}$  und von 10  $\mu\text{M}$ +Fpg auf 100  $\mu\text{M}$ +Fpg. Der durchschnittliche Anteil der DNA im Kometenschweif wird signifikant durch die Fpg-Behandlung verdoppelt. Signifikant ist der Anstieg der Schweif-DNA bei einer Konzentrationserhöhung von 10  $\mu\text{M}$  auf 100  $\mu\text{M}$  und von 10  $\mu\text{M}$ +Fpg auf 100  $\mu\text{M}$ +Fpg. Die Schweiflänge wird signifikant durch die Fpg-Behandlung verlängert. Signifikant ist die Längenzunahme bei einer Konzentrationserhöhung von 10  $\mu\text{M}$  auf 100  $\mu\text{M}$  und von 10  $\mu\text{M}$ +Fpg auf 100  $\mu\text{M}$ +Fpg. Die Positivkontrolle hebt sich mit und ohne Fpg in den drei Parametern signifikant von den TEGDMA-Konzentrationen ab (siehe 5.2.3. Tab. 9 und 5.3.3. Tab. 25).





**Abbildung 27:** Darstellung des Ausmaßes der DNA-Fragmentierung durch **TEGDMA** und der zusätzlichen Erfassung oxidativer Schäden durch das Fpg-Protein.

**NEG** (Negativkontrolle): DMSO, **POS** (Positivkontrolle): 3,8 mM TEGDMA, **OTM**: Olive Tail Moment, **µM**: Mikromolar (TEGDMA), **N**: Anzahl der Versuche, — Median,  $\square$  25 %-75 %,  $\lrcorner$  Nicht-Ausreißer-Bereich,  $\circ$  Ausreißer.

## 3.5 Mikrokerntest

### 3.5.1 Ergebnisse der mit HEMA behandelten Lymphozyten

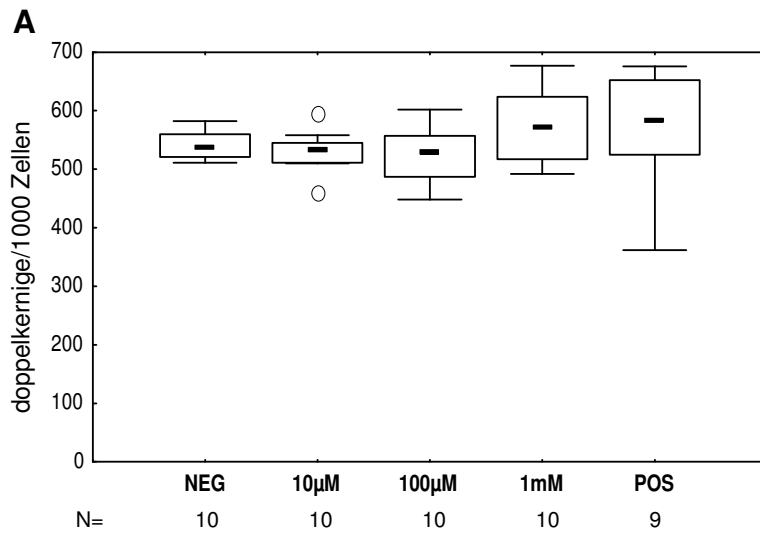
Die durchschnittliche Anzahl doppelkerniger Zellen nimmt bei 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  bezogen auf die Negativkontrolle leicht ab. Hingegen steigt der Anteil doppelkerniger Zellen bei einer Erhöhung der Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  auf 1 mM signifikant wieder an. Die Positivkontrolle weist ebenso eine erhöhte Anzahl doppelkerniger Zellen auf (siehe Abb. 28A, 5.2.4 Tab. 10 und 5.3.4. Tab. 26).

Die Anzahl mehrkerniger Zellen ist in Bezug zur Negativkontrolle bei 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  konstant. Hingegen verringert sich der Anteil mehrkerniger Zellen bei einer Konzentrationserhöhung von 100  $\mu\text{M}$  auf 1 mM signifikant. Die Positivkontrolle wirkt sich ebenso wie 1 mM auf die Proliferation aus (siehe Abb. 28B, 5.2.4. Tab. 10 und 5.3.4. Tab. 26).

Die Anzahl der Mitosen steigt bezogen auf die Negativkontrolle bei 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  leicht an. Hingegen verringert sich die Anzahl der Mitosen bei einer Erhöhung der Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  auf 1 mM signifikant. Die Positivkontrolle wirkt sich ebenso wie 1 mM auf die Mitoserate aus (siehe Abb. 28C, 5.2.4. Tab. 10 und 5.3.4. Tab. 26).

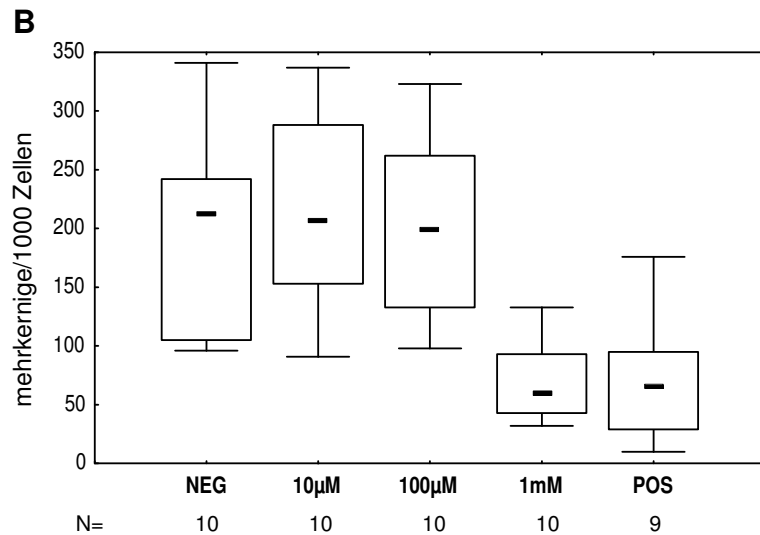
HEMA zeigt keine signifikante dosisabhängige Wirkung auf die Anzahl der Apoptosen. Die Positivkontrolle (Medianwert 12) wirkt sich in Bezug auf die Negativkontrolle und die HEMA-Konzentrationen auf die Apoptoserate aus (siehe Abb. 28D, 5.2.4. Tab. 10 und 5.3.4. Tab. 26).

Die unterschiedlichen HEMA-Konzentrationen wirken sich nicht dosisabhängig auf die Mikrokernbildung aus. In Bezug zur Negativkontrolle bleiben die Werte weitgehend konstant. Die als Positivkontrolle verwendeten 40 ng/ml MMC wirken sich signifikant auf die Mikrokernbildung aus (siehe Abb. 28E, 5.2.4. Tab. 10 und 5.3.4. Tab. 26).

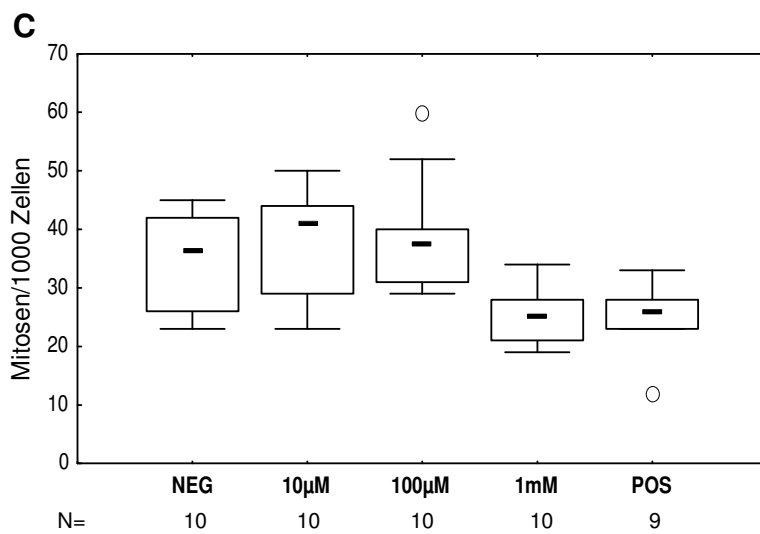


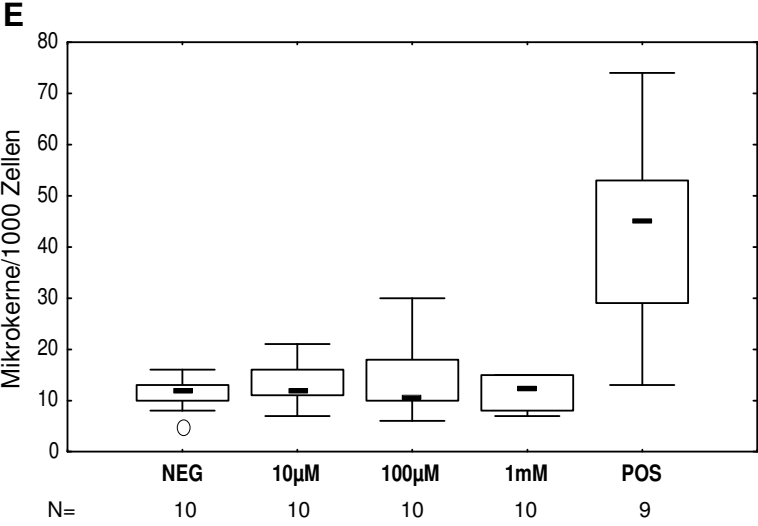
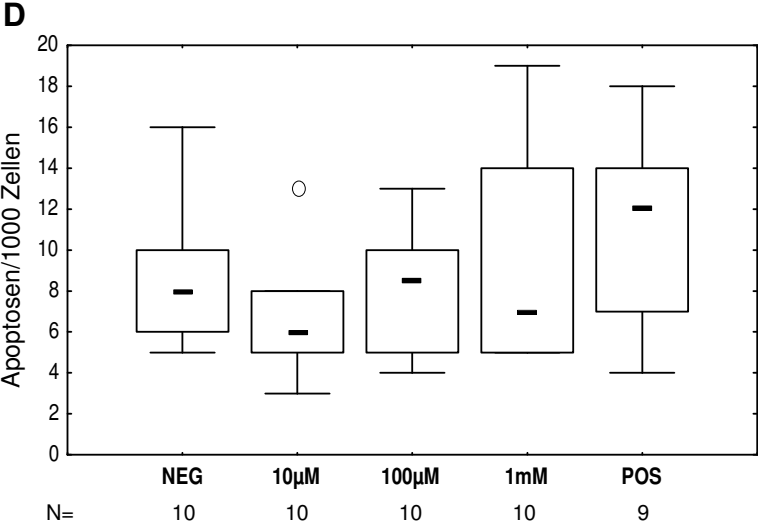
**Abbildung 28:** Darstellung der Wirkung von **HEMA** auf DNA-Ebene.

**NEG** (Negativkontrolle): DMSO, **POS** (Positivkontrolle): 40 ng/ml MMC, **µM**: Mikromolar (HEMA), **mM**: Millimolar (HEMA), **N**: Anzahl der Versuche, **—** Median, **□** 25 %-75 %, **┌** Nicht-Ausreißer-Bereich, **○** Ausreißer.



**A:** doppelkernige Zellen  
**B:** mehrkernige Zellen  
**C:** Mitosen  
**D:** Apoptosen  
**E:** Mikrokerne





### 3.5.2 Ergebnisse der mit TEGDMA behandelten Lymphozyten

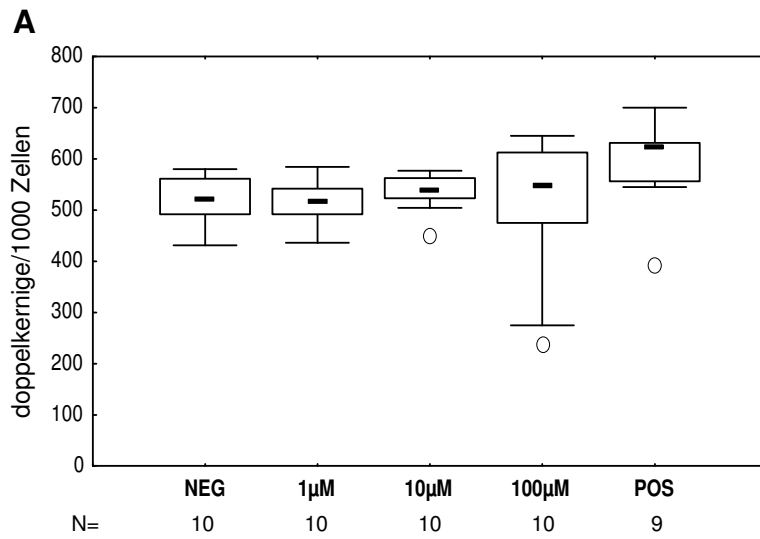
Die Anzahl doppelkerniger Zellen ist in Bezug zur Negativkontrolle bei 1  $\mu\text{M}$  konstant und steigt bei 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  an. Aufgrund der hohen Standardabweichung bei 100  $\mu\text{M}$  ist bei dieser Konzentration der Durchschnitt im Vergleich zu NEG, 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  geringer. Die Anzahl doppelkerniger Zellen ist bei der Positivkontrolle (Medianwert 625) signifikant höher (siehe Abb. 29A, 5.2.4. Tab. 11 und 5.3.4. Tab. 27).

Die Anzahl mehrkerniger Zellen ist in Bezug zur Negativkontrolle bei 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  weitgehend konstant. Hingegen verringert sich der Anteil mehrkerniger Zellen bei einer Erhöhung der Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  auf 100  $\mu\text{M}$  signifikant. Die Positivkontrolle wirkt sich ebenso wie 100  $\mu\text{M}$  negativ auf die Proliferation aus (siehe Abb. 29B, 5.2.4. Tab. 11 und 5.3.4. Tab. 27).

Die Anzahl der Mitosen von TEGDMA behandelten Zellen steigt zunächst bei 1  $\mu\text{M}$  bezogen auf die Negativkontrolle signifikant an. Hingegen bleiben 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  konstant. Die als Positivkontrolle verwendeten 40 ng/ml MMC reduzieren die Mitoserate signifikant (siehe Abb. 29C, 5.2.4. Tab. 11 und 5.3.4. Tab. 27).

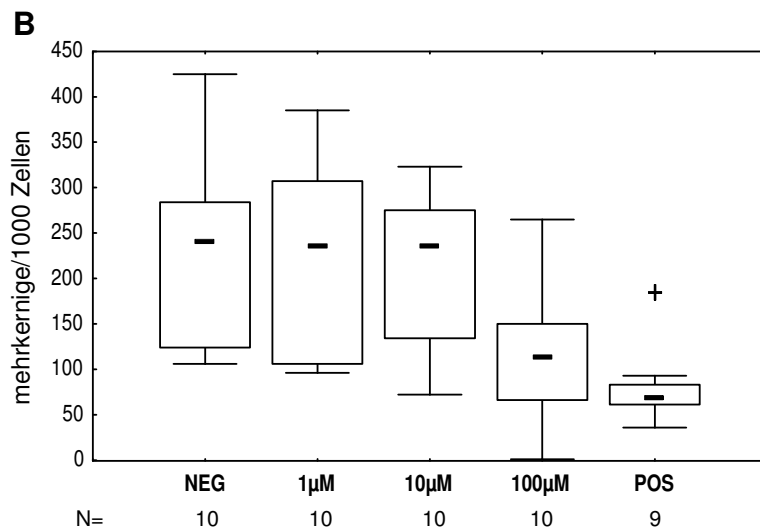
Die Anzahl der Apoptosen ist bei den unterschiedlichen TEGDMA-Konzentrationen in Bezug auf die Negativkontrolle konstant. Die als Positivkontrolle verwendeten 40 ng/ml MMC erhöhen die Anzahl der Apoptosen (siehe Abb. 29D, 5.2.4. Tab. 11 und 5.3.4. Tab. 27).

Die unterschiedlichen TEGDMA-Konzentrationen wirken sich nicht dosisabhängig auf die Mikrokernbildung aus. In Bezug zur Negativkontrolle ist die Mikrokernbildung bei 1  $\mu\text{M}$  signifikant höher. Die als Positivkontrolle verwendeten 40 ng/ml MMC wirken sich signifikant auf die Mikrokernbildung aus (siehe Abb. 29E, 5.2.4. Tab. 11 und 5.3.4. Tab. 27).



**Abbildung 29:** Darstellung der Effekte von **TEGDMA** auf DNA-Ebene.

**NEG** (Negativkontrolle): DMSO, **POS** (Positivkontrolle): 40 ng/ml MMC, **µM**: Mikromolar (TEGDMA), **N**: Anzahl der Versuche, **—** Median, **□** 25 %-75 %, **┌** Nicht-Ausreißer-Bereich, **○** Ausreißer, **+** Extremwert.



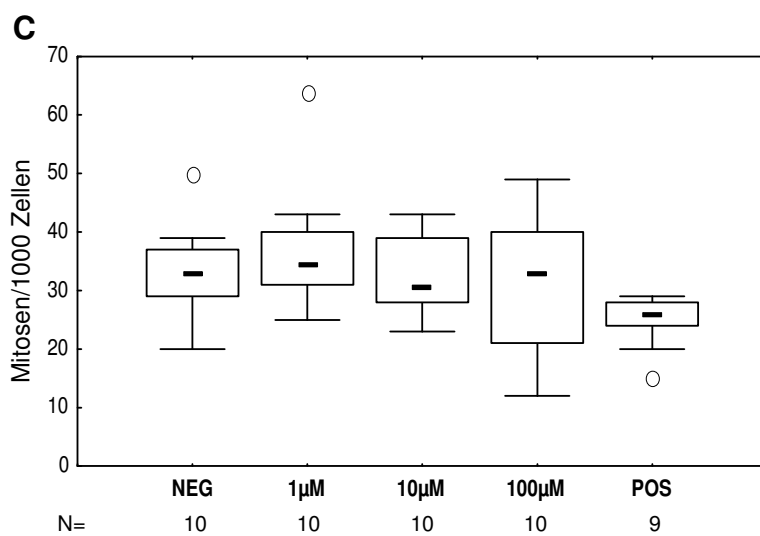
**A:** doppelkernige Zellen

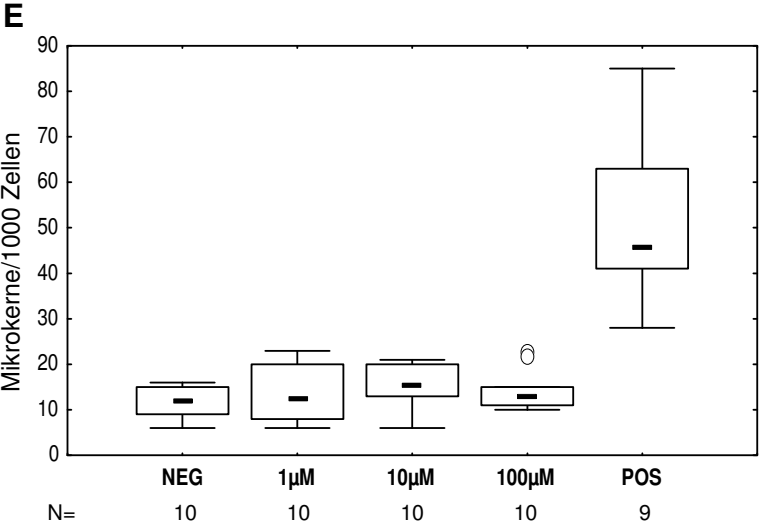
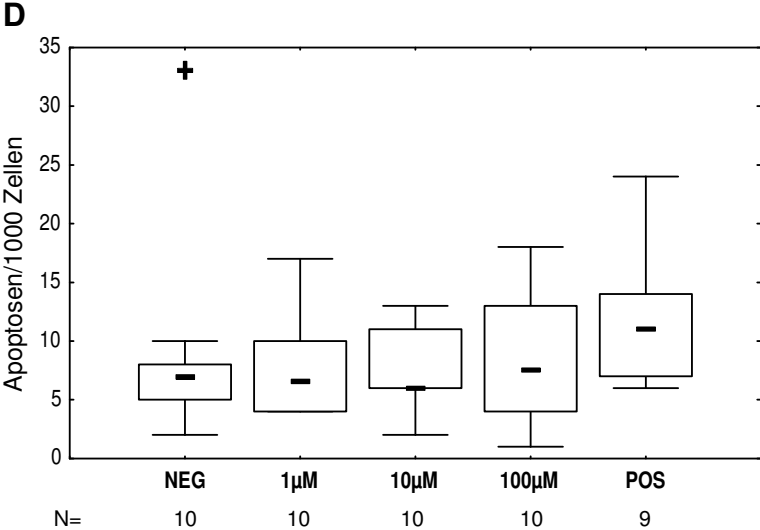
**B:** mehrkernige Zellen

**C:** Mitosen

**D:** Apoptosen

**E:** Mikrokerne





## 3.6 Chromosomenaberrationstest

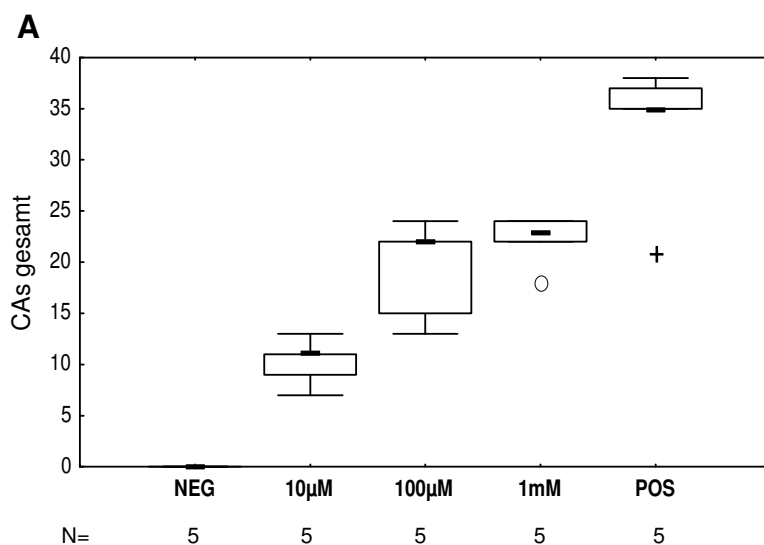
### 3.6.1 Ergebnisse der mit HEMA behandelten Lymphozyten

Die Anzahl der gesamten Chromosomenaberrationen (CAs), d. h. numerische und strukturelle CAs zusammen, nimmt im Durchschnitt dosisabhängig zu. Signifikant ist der Anstieg bei 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$ . Die als Positivkontrolle verwendeten 50 ng/ml MMC bewirken eine signifikant höhere Anzahl (Medianwert 35) (siehe Abb. 30A, 5.2.5. Tab. 12 und 5.3.5. Tab. 28).

Die Anzahl der CAs vom Chromatidtyp steigen in Bezug auf die Negativkontrolle im Durchschnitt kontinuierlich an. Signifikant ist der Anstieg bei 10  $\mu\text{M}$ . Mit der Positivkontrolle (Medianwert 8) kann die Anzahl noch gesteigert werden, jedoch schwanken diese Werte deutlich bei den fünf Probanden (siehe Abb. 30B, 5.2.5. Tab. 12 und 5.3.5. Tab. 28).

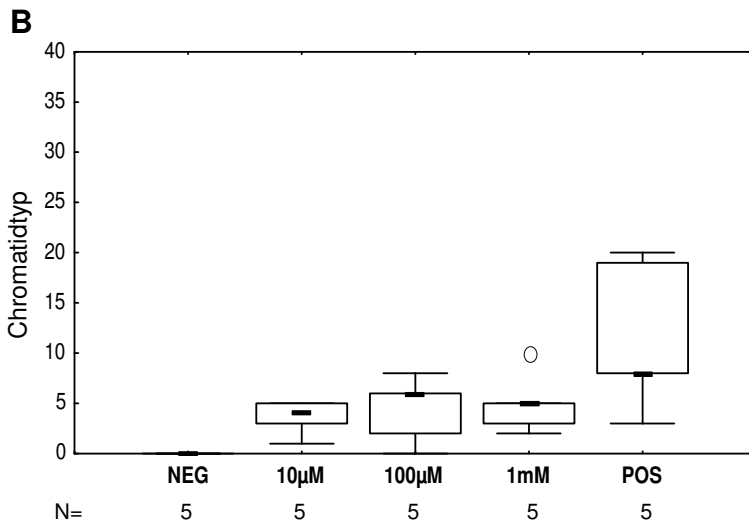
Die Anzahl der CAs vom Chromosomentyp nimmt bezogen auf die Negativkontrolle mit steigender HEMA-Konzentration zu. Signifikant ist der Anstieg bei einer Erhöhung der Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  auf 100  $\mu\text{M}$ . Mit der Positivkontrolle (Medianwert 12) kann die Anzahl noch gesteigert werden, jedoch schwanken diese Werte deutlich bei den fünf Probanden (siehe Abb. 30C, 5.2.5. Tab. 12 und 5.3.5. Tab. 28).

Die Anzahl der numerischen CAs nimmt in Bezug auf die Negativkontrolle mit steigender HEMA-Konzentration zu. Signifikant ist der Anstieg bei 10  $\mu\text{M}$  im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Positivkontrolle (Medianwert 7) wirkt sich ebenfalls signifikant aus (siehe Abb. 30D, 5.2.5. Tab. 12 und 5.3.5. Tab. 28).

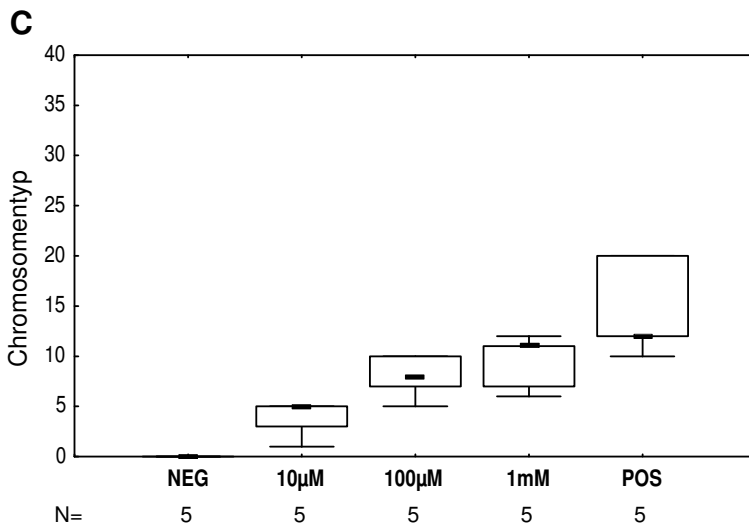


**Abbildung 30:** Darstellung der Wirkung von **HEMA** auf Chromosomen-Ebene in Form von Chromosomenaberrationen.

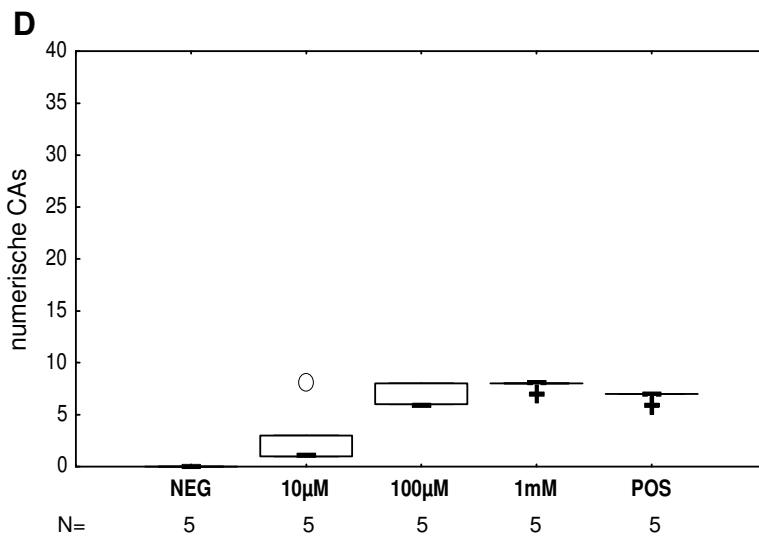




**NEG** (Negativkontrolle): DMSO, **POS** (Positivkontrolle): 50 ng/ml MMC, **CAs**: Chromosomenaberrationen, **µM**: Mikromolar (HEMA), **mM**: Millimolar (HEMA), **N**: Anzahl der Versuche, **-** Median, **□** 25 %-75 %, **[** Nicht-Ausreißer-Bereich, **○** Ausreißer, **+** Extremwert.



**A**: CAs gesamt  
**B**: CAs vom Chromatidtyp  
**C**: CAs vom Chromosomentyp  
**D**: numerische Chromosomenaberrationen



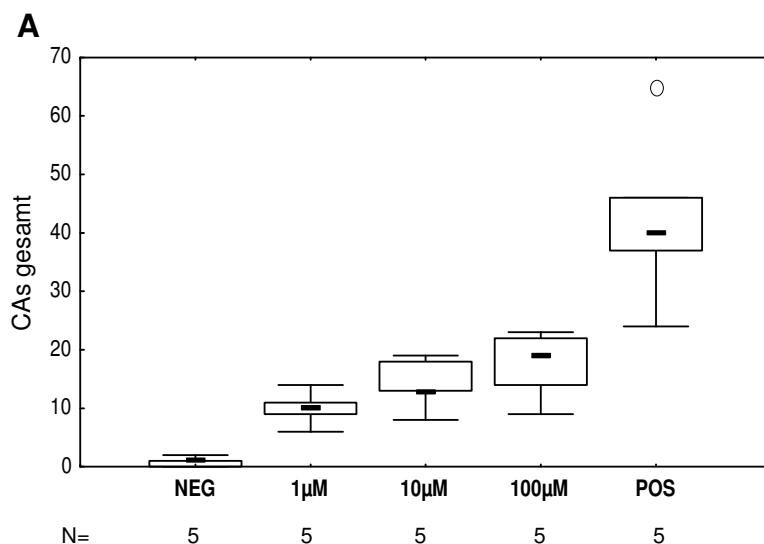
### 3.6.2 Ergebnisse der mit TEGDMA behandelten Lymphozyten

Die Anzahl der gesamten Chromosomenaberrationen (CAs) nimmt dosisabhängig signifikant zu. Die als Positivkontrolle verwendeten 50 ng/ml MMC bewirken eine signifikant höhere Anzahl (Medianwert 40) (siehe Abb. 31A, 5.2.5. Tab. 13 und 5.3.5. Tab. 29).

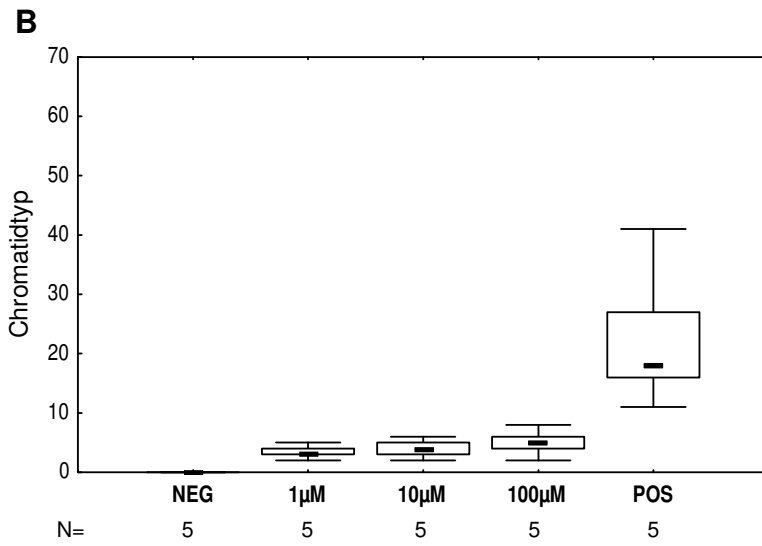
Die Anzahl der CAs vom Chromatidtyp steigen in Bezug auf die Negativkontrolle im Durchschnitt kontinuierlich an. Signifikant ist der Anstieg bei 1  $\mu\text{M}$ . Die Positivkontrolle (Medianwert 18) wirkt sich signifikant auf die Anzahl aus (siehe Abb. 31B, 5.2.5. Tab. 13 und 5.3.5. Tab. 29).

Die Anzahl der CAs vom Chromosomentyp nimmt bezogen auf die Negativkontrolle mit steigender TEGDMA-Konzentration zu. Signifikant ist der Anstieg bei einer Erhöhung der Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  auf 10  $\mu\text{M}$ . Die Positivkontrolle (Medianwert 16) wirkt sich ebenfalls signifikant auf die Anzahl aus (siehe Abb. 31C, 5.2.5. Tab. 13 und 5.3.5. Tab. 29).

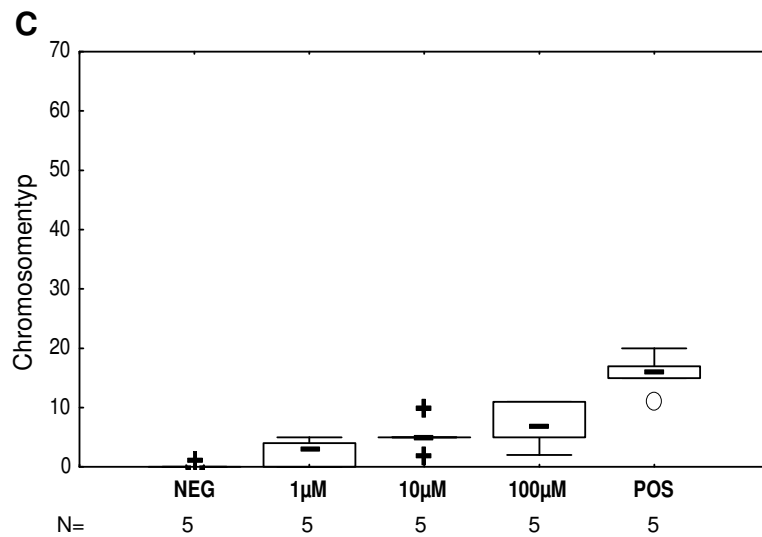
Die Anzahl der numerischen CAs nimmt in Bezug auf die Negativkontrolle mit steigender TEGDMA-Konzentration zu. Ausnahme bilden 10  $\mu\text{M}$ , bei denen der Medianwert auf 3 sinkt und bei 100  $\mu\text{M}$  wieder auf 6 ansteigt. Signifikant ist der Anstieg bei 1  $\mu\text{M}$  im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Positivkontrolle (Medianwert 5) wirkt sich ebenfalls signifikant aus (siehe Abb. 31D, 5.2.5. Tab. 13 und 5.3.5. Tab. 29).



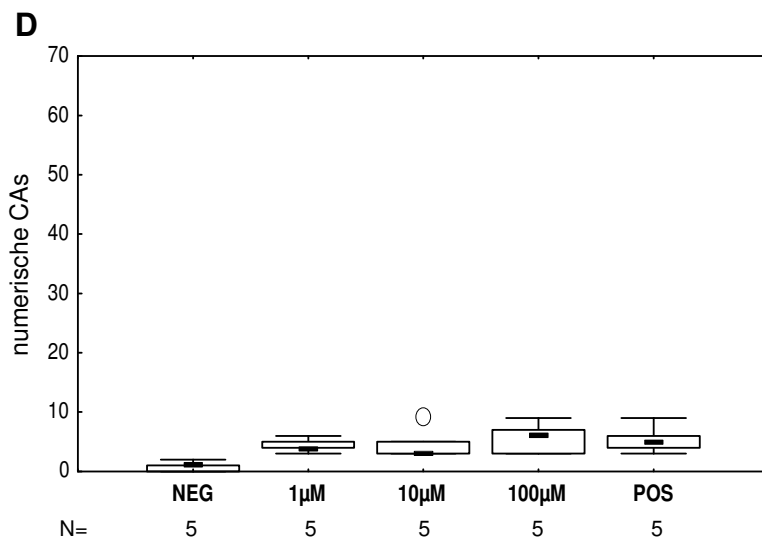
**Abbildung 31:** Darstellung der Wirkung von **TEGDMA** auf Chromosomen-Ebene in Form von Chromosomenaberrationen.



**NEG** (Negativkontrolle): DMSO, **POS** (Positivkontrolle): 50 ng/ml MMC, **CAs**: Chromosomenaberrationen, **µM**: Mikromolar (TEGDMA), **N**: Anzahl der Versuche, **-** Median, **□** 25 %-75 %, **|** Nicht-Ausreißer-Bereich, **○** Ausreißer, **+** Extremwert.



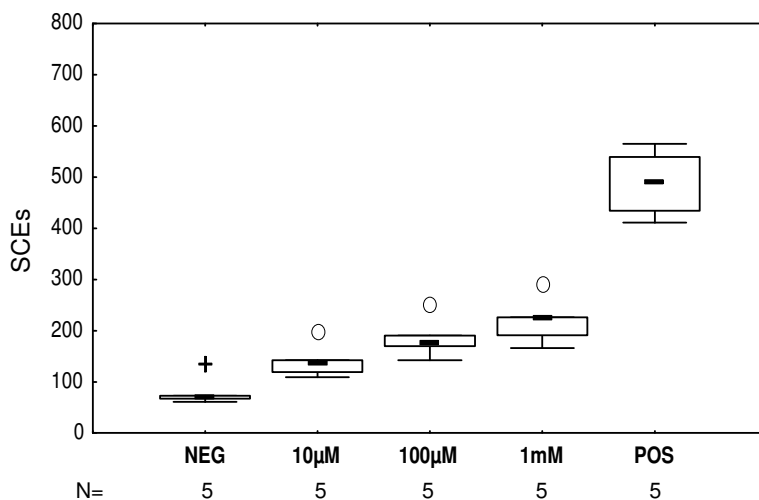
**A**: CAs gesamt  
**B**: CAs vom Chromatidtyp  
**C**: CAs vom Chromosomentyp  
**D**: numerische Chromosomenaberrationen



## 3.7 Schwesterchromatidaustauschtest

### 3.7.1 Ergebnisse der mit HEMA behandelten Lymphozyten

Mit steigender HEMA-Konzentration nehmen die Schwesterchromatidaustausche (SCEs) in Bezug auf die Negativkontrolle zu. Signifikant ist der Anstieg bei 10  $\mu\text{M}$  im Vergleich zur Negativkontrolle. Die SCEs steigen bei einer Konzentrationserhöhung von 10  $\mu\text{M}$  auf 100  $\mu\text{M}$  und von 100  $\mu\text{M}$  auf 1 mM jeweils durchschnittlich um etwa 40 an. Die als Positivkontrolle verwendeten 50 ng/ml MMC bewirken eine signifikant höhere Anzahl an SCEs (Medianwert 493) (siehe Abb. 32, 5.2.6. Tab. 14 und 5.3.6. Tab. 30).

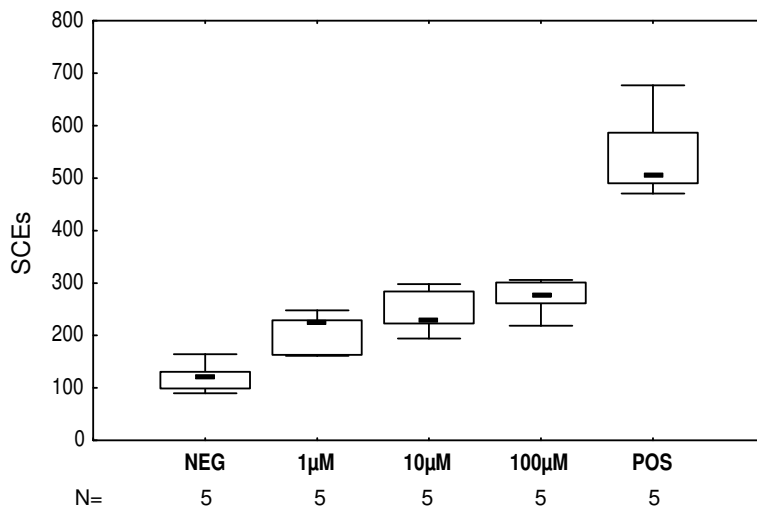


**Abbildung 32:** Darstellung der Wirkung von **HEMA** auf Chromosomen-Ebene in Form von Schwesterchromatidaustausche.

**NEG** (Negativkontrolle): DMSO, **POS** (Positivkontrolle): 50 ng/ml MMC,  **$\mu\text{M}$** : Mikromolar (HEMA), **mM**: Millimolar (HEMA), **N**: Anzahl der Versuche, **—** Median, **□** 25 %-75 %, **]** Nicht-Ausreißer-Bereich, **○** Ausreißer, **+** Extremwert.

### 3.7.2 Ergebnisse der mit TEGDMA behandelten Lymphozyten

Die Schwesterchromatidaustausche (SCEs) nehmen in Bezug auf die Negativkontrolle mit steigender Konzentration signifikant zu. Die als Positivkontrolle verwendeten 50 ng/ml MMC bewirken eine signifikant höhere Anzahl an SCEs (Medianwert 505) (siehe Abb. 33, 5.2.6. Tab. 15 und 5.3.6. Tab. 31).



**Abbildung 33:** Darstellung der Wirkung von **TEGDMA** auf Chromosomen-Ebene in Form von Schwesterchromatidaustausche.

**NEG** (Negativkontrolle): DMSO, **POS** (Positivkontrolle): 50 ng/ml MMC, **µM**: Mikromolar (TEGDMA), **N**: Anzahl der Versuche, — Median,  $\square$  25 %-75 %,  $\lceil$  Nicht-Ausreißer-Bereich.

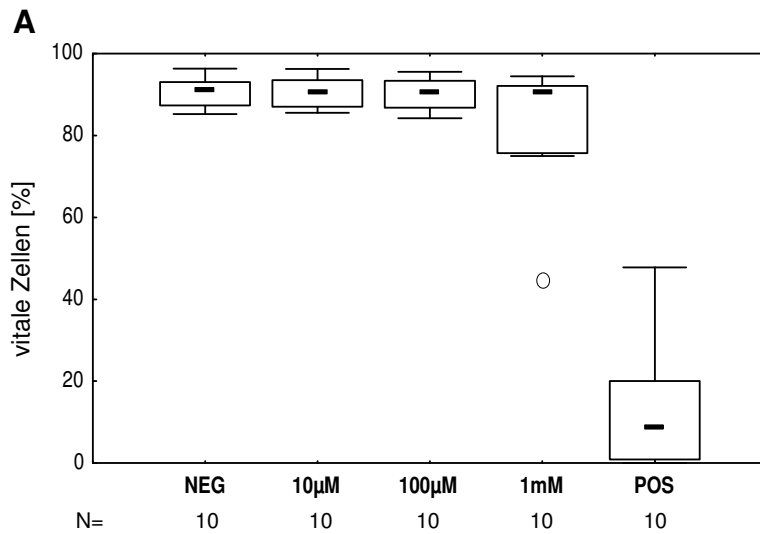
## 3.8 Apoptosemessung

### 3.8.1 Ergebnisse der mit HEMA behandelten Lymphozyten

Der prozentuale Anteil vitaler Zellen bleibt in Bezug auf die Negativkontrolle bei 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  konstant. Signifikant ist der Abfall bei einer Erhöhung der Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  auf 1 mM. Die als Positivkontrolle (Medianwert 8,7) verwendeten 3,8 mM TEGDMA wirken sich signifikant auf den Anteil vitaler Zellen aus (siehe Abb. 34A, 5.2.7. Tab. 16 und 5.3.7. Tab. 32).

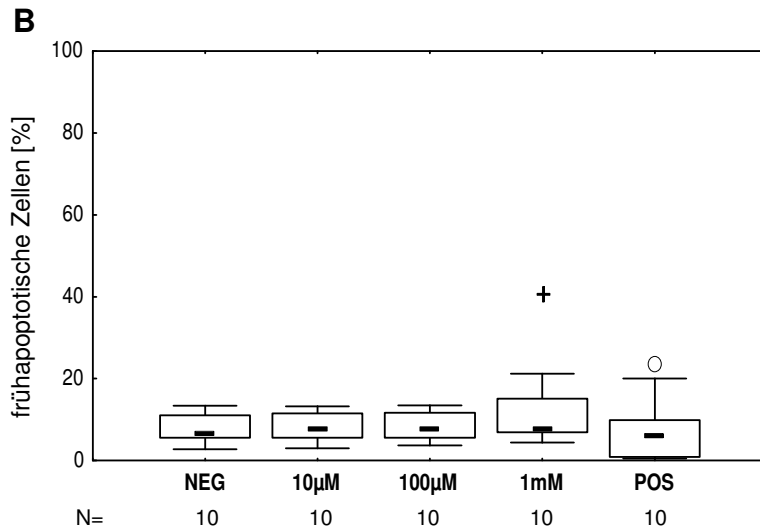
Der prozentuale Anteil früher Apoptosen bleibt bezogen auf die Negativkontrolle bei 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  konstant. Signifikant ist der Anstieg bei einer Erhöhung der Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  auf 1 mM. Die als Positivkontrolle (Medianwert 6,35) verwendeten 3,8 mM TEGDMA induzieren keine signifikant erhöhte frühe Apoptoserate (siehe Abb. 34B, 5.2.7. Tab. 16 und 5.3.7. Tab. 32).

Der prozentuale Anteil später Apoptosen/Nekrosen bleibt in Bezug auf die Negativkontrolle bei 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  konstant. Signifikant ist der Anstieg bei einer Erhöhung der Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  auf 1 mM. Die als Positivkontrolle (Medianwert 83,45) verwendeten 3,8 mM TEGDMA induzieren eine signifikant erhöhte Rate an späten Apoptosen/Nekrosen (siehe Abb. 34C, 5.2.7. Tab. 16 und 5.3.7. Tab. 32).

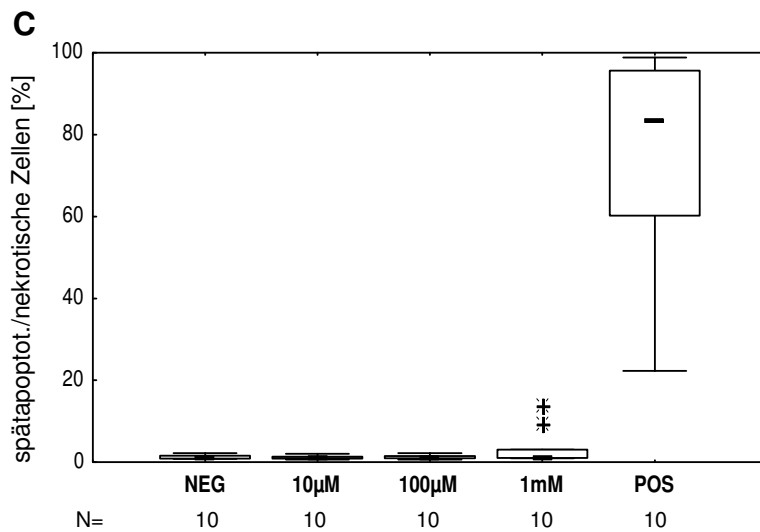


**Abbildung 34:** Darstellung der Wirkung von **HEMA** auf die Apoptoserate.

**NEG** (Negativkontrolle): DMSO, **POS** (Positivkontrolle): 3,8 mM TEGDMA, **µM**: Mikromolar (HEMA), **mM**: Millimolar (HEMA), **N**: Anzahl der Versuche, **-** Median, **□** 25 %-75 %, **[** Nicht-Ausreißer-Bereich, **○** Ausreißer, **+** Extremwert.



**A:** vitale Zellen  
**B:** frühapoptotische Zellen  
**C:** spätapoptotische/nekrotische Zellen



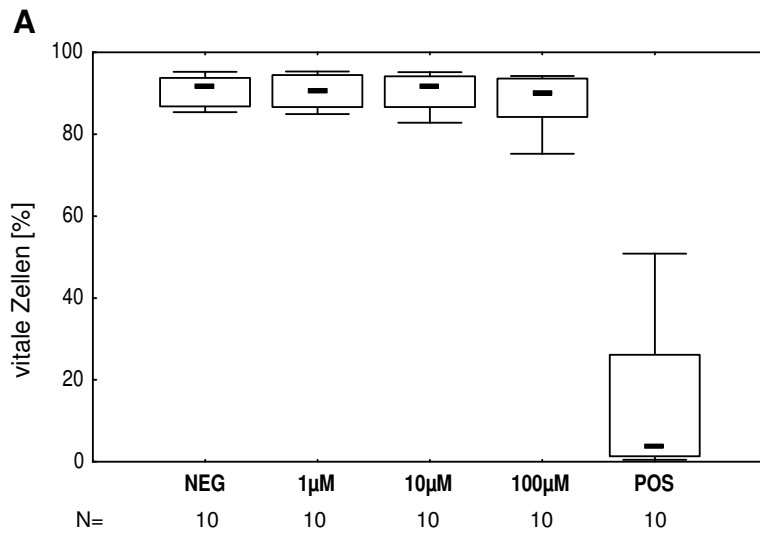
### 3.8.2 Ergebnisse der mit TEGDMA behandelten Lymphozyten

Der prozentuale Anteil vitaler Zellen bleibt in Bezug auf die Negativkontrolle bei 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  konstant. Signifikant ist der Abfall bei einer Erhöhung der Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  auf 100  $\mu\text{M}$ . Die als Positivkontrolle (Medianwert 3,9) verwendeten 3,8 mM TEGDMA wirken sich signifikant auf den Anteil vitaler Zellen aus (siehe Abb. 35A, 5.2.7. Tab. 17 und 5.3.7. Tab. 33).

Der prozentuale Anteil früher Apoptosen bleibt bezogen auf die Negativkontrolle bei 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  konstant. Signifikant ist der Anstieg bei einer Erhöhung der Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  auf 100  $\mu\text{M}$ . Die als Positivkontrolle (Medianwert 4) verwendeten 3,8 mM TEGDMA induzieren keine signifikant erhöhte frühe Apoptoserate (siehe Abb. 35B, 5.2.7. Tab. 17 und 5.3.7. Tab. 33).

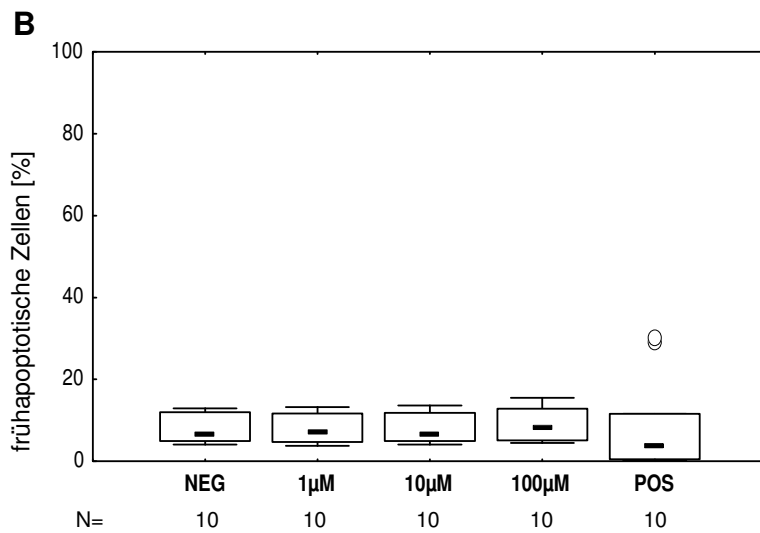
Der prozentuale Anteil später Apoptosen/Nekrosen bleibt in Bezug auf die Negativkontrolle bei 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  konstant. Signifikant ist der Anstieg bei einer Erhöhung der Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  auf 100  $\mu\text{M}$ . Die als Positivkontrolle (Medianwert 91,3) verwendeten 3,8 mM TEGDMA induzieren eine signifikant erhöhte Rate an späten Apoptosen/Nekrosen (siehe Abb. 35C, 5.2.7. Tab. 17 und 5.3.7. Tab. 33).



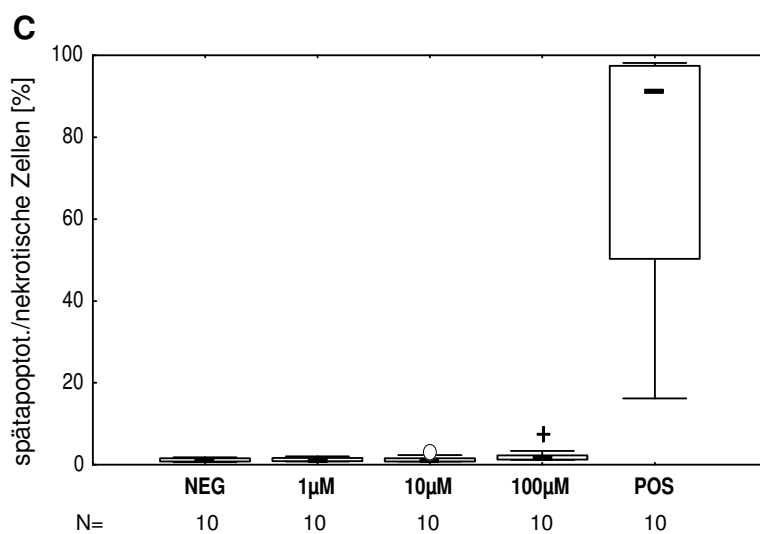


**Abbildung 35:** Darstellung der Wirkung von **TEGDMA** auf die Apoptoserate.

**NEG** (Negativkontrolle): DMSO, **POS** (Positivkontrolle): 3,8 mM TEGDMA, **µM**: Mikromolar (TEGDMA), **N**: Anzahl der Versuche, **—** Median, **□** 25 %-75 %, **┌** Nicht-Ausreißer-Bereich, **○** Ausreißer, **+** Extremwert.



**A:** vitale Zellen  
**B:** frühapoptotische Zellen  
**C:** spätapoptotische/nekrotische Zellen



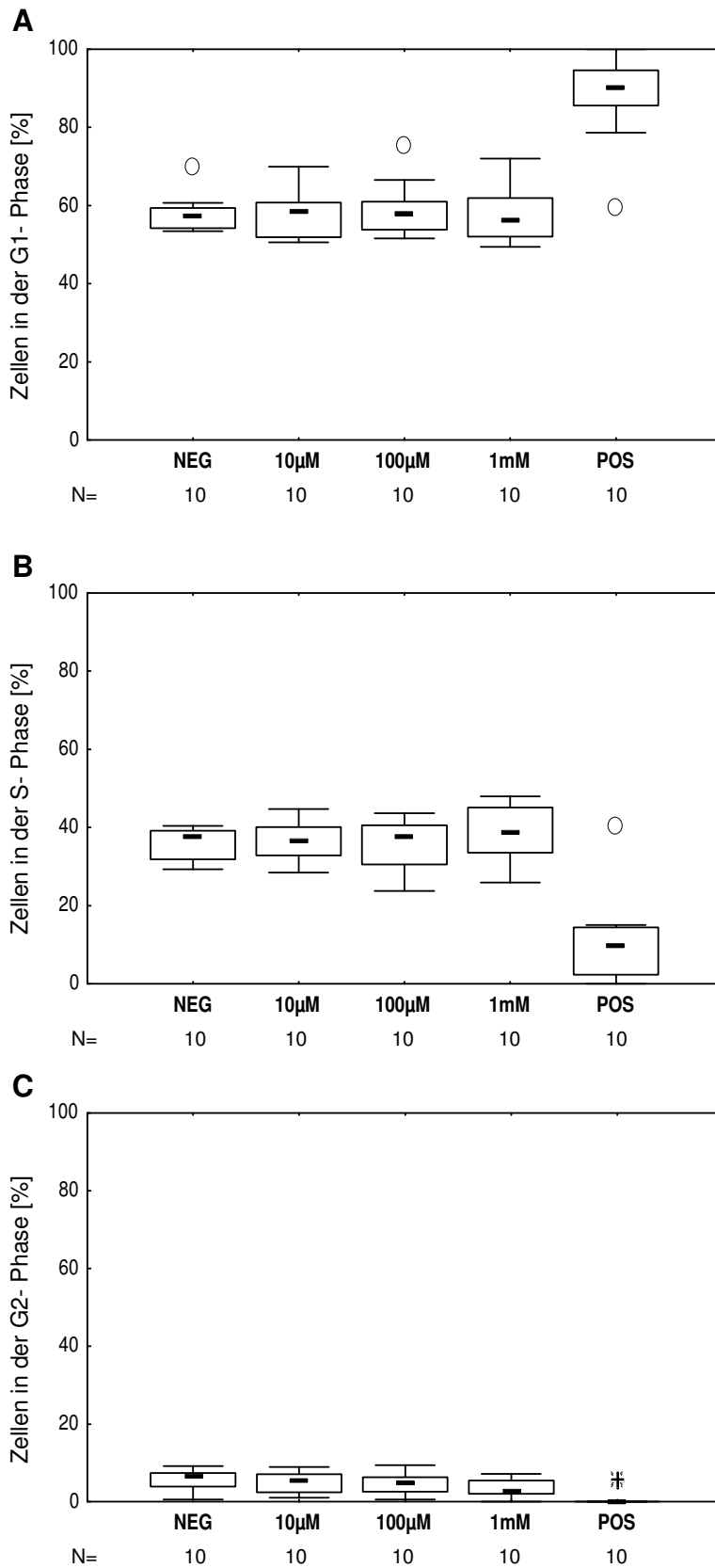
## 3.9 Zellzyklusanalyse

### 3.9.1 Ergebnisse der mit HEMA behandelten Lymphozyten

Der prozentuale Anteil der Zellen in der G1-Phase bleibt in Bezug auf die Negativkontrolle konstant. Bei den als Positivkontrolle verwendeten 2,5 µg/ml APC befinden sich signifikant mehr Zellen in der G1-Phase (siehe Abb. 36A, 5.2.8. Tab. 18 und 5.3.8. Tab. 34).

Der prozentuale Anteil der Zellen in der S-Phase bleibt bei 10 µM und 100 µM bezogen auf die Negativkontrolle konstant. Der Anteil bei 1 mM hebt sich nicht signifikant von der Negativkontrolle ab. Signifikant ist der geringe Anteil der Zellen in der S-Phase bei der Positivkontrolle (siehe Abb. 36B, 5.2.8. Tab. 18 und 5.3.8. Tab. 34).

Der prozentuale Anteil der Zellen in der G2-Phase sinkt in Bezug auf die Negativkontrolle mit steigender Konzentration. Signifikant ist die Abnahme bei einer Erhöhung der Konzentration von 100 µM auf 1 mM. Bei der Positivkontrolle sind bis auf zwei Extremwerte keine Zellen in der G2-Phase mehr vorhanden (siehe Abb. 36C, 5.2.8. Tab. 18 und 5.3.8. Tab. 34).



**Abbildung 36:** Darstellung der Wirkung von **HEMA** auf den Zellzyklus.

**NEG** (Negativkontrolle): DMSO, **POS** (Positivkontrolle): 2,5 µg/ml APC, **µM**: Mikromolar (HEMA), **mM**: Millimolar (HEMA), **N**: Anzahl der Versuche, **—** Median, **□** 25 %-75 %, **┌** Nicht-Ausreißer-Bereich, **○** Ausreißer, **+** Extremwert.

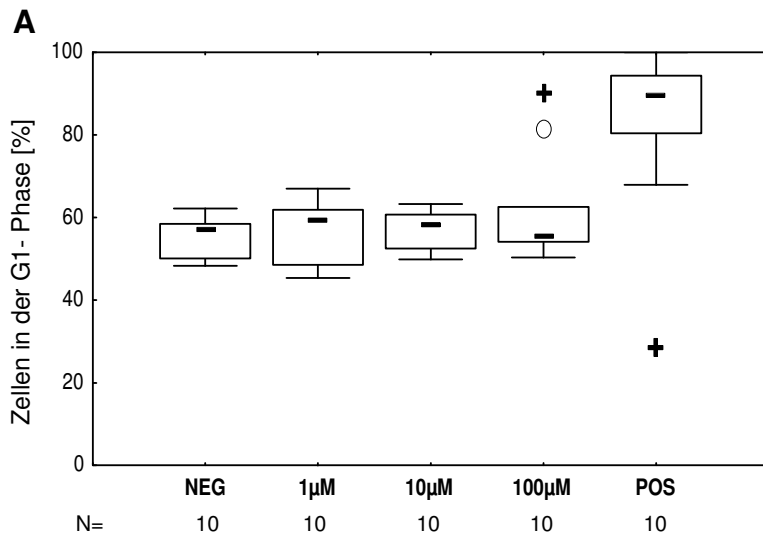
- A:** Zellen in der G1-Phase
- B:** Zellen in der S-Phase
- C:** Zellen in der G2-Phase

### 3.9.2 Ergebnisse der mit TEGDMA behandelten Lymphozyten

Der prozentuale Anteil der Zellen in der G1-Phase bleibt bei 1  $\mu\text{M}$  bezogen auf die Negativkontrolle weitgehend konstant. Signifikant mehr Zellen befinden sich im Vergleich zur Negativkontrolle bei 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  in der G1-Phase. Bei den als Positivkontrolle verwendeten 2,5  $\mu\text{g/ml}$  APC befinden sich signifikant mehr Zellen in der G1-Phase (siehe Abb. 37A, 5.2.8. Tab. 19 und 5.3.8. Tab. 35).

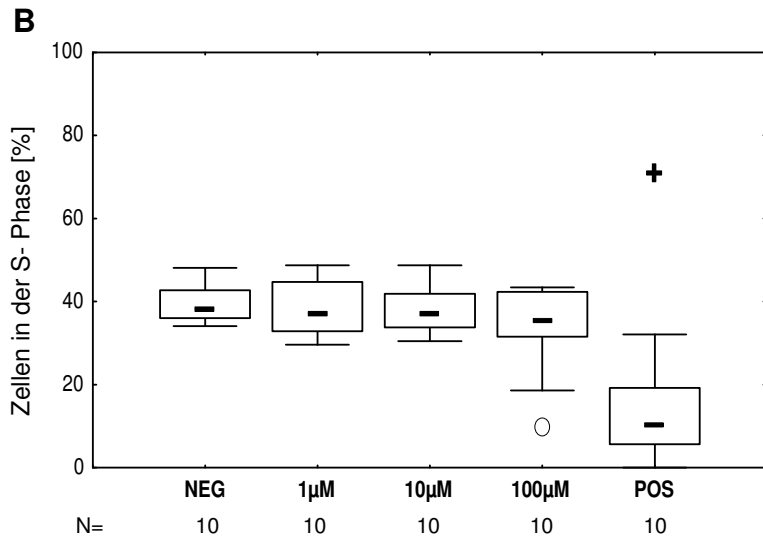
Der prozentuale Anteil der Zellen in der S-Phase bleibt bezogen auf die Negativkontrolle bei 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  weitgehend konstant. Signifikant geringer ist in Bezug auf die Negativkontrolle der Anteil bei 100  $\mu\text{M}$ . Bei der Positivkontrolle ist der Anteil signifikant erniedrigt (siehe Abb. 37B, 5.2.8. Tab. 19 und 5.3.8. Tab. 35).

Der prozentuale Anteil der Zellen in der G2-Phase hebt sich nicht signifikant von dem der Negativkontrolle ab. Bei der Positivkontrolle sind bis auf zwei Extremwerte keine Zellen in der G2-Phase mehr vorhanden (siehe Abb. 37C, 5.2.8. Tab. 19 und 5.3.8. Tab. 35).

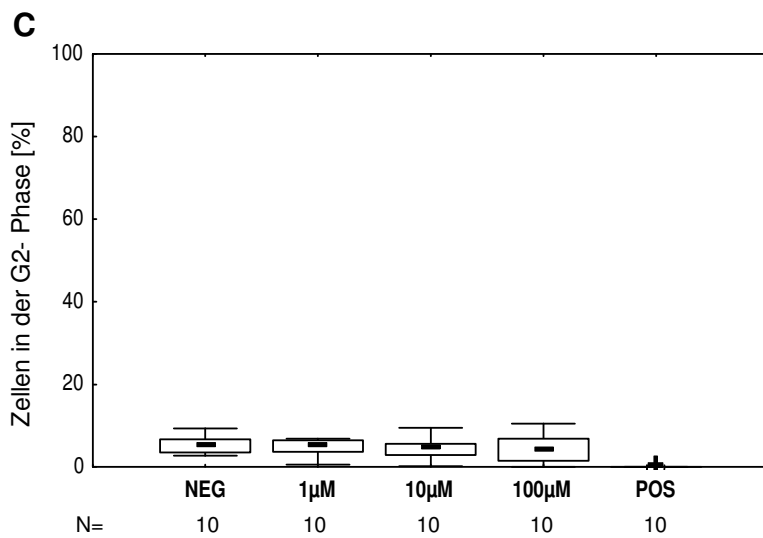


**Abbildung 37:** Darstellung der Wirkung von **TEGDMA** auf den Zellzyklus.

**NEG** (Negativkontrolle): DMSO, **POS** (Positivkontrolle): 2,5 µg/ml APC, **µM**: Mikromolar (TEGDMA), **N**: Anzahl der Versuche, **—** Median, **□** 25 %-75 %, **┆** Nicht-Ausreißer-Bereich, **○** Ausreißer, **+** Extremwert.



**A:** Zellen in der G1-Phase  
**B:** Zellen in der S-Phase  
**C:** Zellen in der G2-Phase



## 4.1 Komposit – bedenkenlos anwendbar?

In der ganzheitlichen Zahnmedizin wird das Füllungsmaterial Amalgam im Hinblick auf seine möglichen gesundheitsschädlichen Wirkungen grundsätzlich abgelehnt. Auch ein Großteil der Patienten lehnt dieses Material einerseits wegen seiner schlechten Propaganda und andererseits wegen seiner unästhetischen Farbe ab. Während aus ästhetischer Sicht die Komposite als optimale Füllungswerkstoffe angepriesen werden, stehen die Anhänger der ganzheitlichen Zahnmedizin deren Verwendung nicht ohne Vorbehalt gegenüber. Die beiden Komonomere HEMA und TEGDMA, für die in Veröffentlichungen unerwünschte Wirkungen auf den Organismus bestätigt wurden, sind in einer Bandbreite von kunststoffhaltigen zahnärztlichen Werkstoffen enthalten. Deswegen finden Kunststoffe jeglicher Art in der biologischen Zahnmedizin nur eine sehr begrenzte Indikation, bei regulationsgestörten oder auch chronisch kranken Problempatienten verbietet sich ihre Anwendung sogar [Graf, 2004].

Diese radikale Auffassung legt nahe, diese beiden zahnärztlichen Werkstoffe speziell auf ihre genotoxische Wirkung hin zu untersuchen, allerdings in einem für sie in vivo relevanten Konzentrationsbereich.

In dieser Arbeit wurden humane Lymphozyten von zehn Probanden für 24 Stunden mit HEMA und TEGDMA behandelt. Für die anschließenden Untersuchungen wurden bereits etablierte Testverfahren wie der Comet Assay, der Mikrokerntest, die Apoptosemessung und die Zellzyklusanalyse herangezogen. Des Weiteren wurden zum Einblick in das chromosomale Geschehen bei fünf der Probanden ein Schwesterchromatidaustauschtest und ein Chromosomenaberrationstest durchgeführt.

In den beiden ersten Abschnitten wird zunächst noch einmal allgemein auf die Dosiswirkungskurve und speziell auf die Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung eingegangen. Anschließend werden der Restmonomergehalt von HEMA und TEGDMA, deren Löslichkeit und der daraus resultierenden Toxizität für den Organismus in Form von Genmutationen durch oxidativen Stress erörtert. Dann folgt die Diskussion der einzelnen Methoden, deren erbrachte Ergebnisse und der Vergleich des Mikrokerntest mit dem Comet Assay und dem Chromosomenaberrationstest. Am Ende erfolgt eine Gegenüberstellung von HEMA und

TEGDMA bezüglich ihrer Toxizität und inwieweit dabei ihre chemischen Eigenschaften eine Rolle spielen.

## 4.2 Dosis-Wirkung/Ausschluss zytotoxischer Konzentrationen

Bei dieser Arbeit wurden zunächst die verschiedenen Methoden mit einer Reihe von HEMA- (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM und 6 mM) und TEGDMA- (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 250  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 750  $\mu$ M, 1 mM und 3,8 mM) Konzentrationen durchgeführt, um die zytotoxischen Konzentrationen aus den nachfolgenden Versuchen ausschließen zu können. Es ist wichtig diese zytotoxischen Konzentrationen auszuschließen, denn apoptotische Effekte erscheinen allgemein bei Konzentrationen, die zytotoxisch sind. Zudem ist es wahrscheinlich, dass Monomere genotoxische Effekte in Konzentrationen auslösen können, die geringer sind als jene für apoptotische Effekte [Lee et al., 2006]. Es zeigte sich, dass 10  $\mu$ M HEMA und 1  $\mu$ M TEGDMA keine Schäden zur Folge haben, während 1 mM HEMA und 100  $\mu$ M TEGDMA fähig sind, gerade eben keine oder nur sehr schwache zytotoxische Effekte auszulösen. Als weitere klinisch relevante Konzentrationen wurde für HEMA 100  $\mu$ M und für TEGDMA 10  $\mu$ M eingesetzt.

## 4.3 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Die Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung wurde mit dem CASY-Zellzählgerät durchgeführt. Stichprobenhaft wurde zusätzlich ein Trypanblau-Ausschlusstest gemacht. Die Vitalitäten lagen für die Negativkontrolle und die HEMA- und TEGDMA-Konzentrationen deutlich über 80 % und für die Positivkontrolle unter 80 %. Somit lagen alle Proben über der 75 %-Schwelle, denn niedrigere Werte hätten bei der Interpretation der Testergebnisse zytotoxische Effekte zur Folge gehabt [Kleinsasser et al., 2006]. Der Trypanblau-Ausschlusstest bestätigte die Messungen durch das CASY-Zellzählgerät. Zur besseren Vergleichbarkeit der zehn durchgeführten Messungen wurde die Negativkontrolle gleich 100 % gesetzt.

## 4.4 Restmonomergehalt/eluierbare HEMA- und TEGDMA-Konzentrationen

Die Komonomere HEMA und TEGDMA erreichen im Speichel des Menschen nach Elution aus Komposit-Füllungen maximal nur  $\mu\text{M}$ -Konzentrationen, selbst beim Vorhandensein höchster Füllungszahlen und unter Berücksichtigung ungünstiger Umstände (z. B. Alkoholkonsum) [Reichl, 2003]. Eluierbar sind die so genannten Restmonomere, die nach einer nur „unvollständigen“ Polymerisation ungebunden vorliegen und in die Pulpa, den Speichel und die Gingiva freigesetzt werden können. Es wurde gezeigt, dass Eluate von Restaurationsmaterialien, die ein vorpolymerisiertes Netzwerk enthalten, weniger toxisch sind als solche mit unvorpolymerisiertem Netzwerk. Dies weist darauf hin, dass die unpolymerisierten Monomere für die zytotoxischen Effekte verantwortlich sind [Stanislawski et al., 2000]. Stoffwechselwege, welche die zelluläre Homöostase, Dentinogenese oder Gewebereparatur regulieren, können durch Monomere im subzytotoxischen Konzentrationsbereich verändert werden [Schweikl et al., 2006]. Es ist daher abzuklären, ob die tatsächlich in vivo relevanten HEMA- und TEGDMA-Konzentrationen fähig sind, biologische Effekte zu entfalten.

## 4.5 Genmutation durch oxidativen Stress

Bei oxidativem Stress handelt es sich um eine Stoffwechselsituation mit gesteigerten Oxidationsvorgängen und/oder verminderten antioxidierenden Vorgängen. Durch reaktive Sauerstoffspezies (engl.: reactive oxygen species, ROS) kommt es zur oxidativen Schädigung von DNA, Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden [Sies, 1986]. Guaninbasen, wie 8-oxo-Guanine, sind besonders anfällig [Collins, 1999]. ROS werden auch als Sauerstoffradikale bezeichnet und sind schädliche Formen des Sauerstoffs, die als natürliche Stoffwechselprodukte im Körper produziert werden. Sie entstehen endogen in der Lipidperoxidation und in den Mitochondrien als Nebenprodukt der Zellatmung aber auch durch Entzündungszellen, um Viren und Bakterien zu schädigen. Exogene, wie Arzneimittel, ionisierende Strahlen, UV-Licht, Chemikalien und Zigarettenrauch stellen ebenfalls Quellen für ROS dar. Zu den ROS zählen Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ), Superoxid-Anion-Radikal ( $\text{O}_2^-$ ), Peroxyl-Radikal ( $\text{OH}_2$ ), Hydroxyl-Radikal ( $\text{HO}$ ) und Ozon ( $\text{O}_3$ ).



Antioxidantien (Oxidationshemmer) wirken als Radikalfänger (Scavenger) und schützen die Zellen vor oxidativer Schädigung. Die Radikalfänger werden in endogene, wie antioxidative Enzyme und nicht-enzymatische Scavenger, und in exogene Antioxidantien eingeteilt. Glutathion (GSH) ist ein nicht-enzymatischer Scavenger und ist wahrscheinlich das wichtigste zelluläre Antioxidationsmittel [Meister, 1994]. Es ist ein Tripeptid, das aus je einem Mol der Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin besteht. Es kommt in fast allen Zellen des Organismus vor, in den Erythrozyten aber in besonders hoher Konzentration [Löffler, 2003]. GSH fungiert als der einzige Kofaktor für die GSH-Peroxidase zur Detoxifikation von Fremdstoffen (Peroxide) [Löffler, 2003; Meister, 1994] und ist das Hauptsubstrat der Glutathion-S-Transferase zur Konjugation von Fremdstoffen (Epoxide) [Fjellstedt et al., 1973; Meister, 1994]. Zu den exogenen Antioxidantien zählen u. a. die Vitamine A, C und E, die in zahlreichen Lebensmitteln enthalten sind.

HEMA und TEGDMA sind in der Lage den intrazellulären Glutathionspiegel zu senken und/oder die Produktion von ROS zu steigern [Stanislawski et al., 2003; Chang et al., 2005; Lee et al., 2006; Samuelsen et al., 2007]. Der von HEMA und TEGDMA induzierte drastische GSH-Abfall ist eine frühe Reaktion, die nach etwa 15-30 min beginnt und nach ca. vier bis sechs Stunden abgeschlossen ist. Sie kann daher vor anderen zytotoxischen Veränderungen und sogar bei niedrigen Konzentrationen ( $\mu\text{M}$ ) ausgelöst werden [Stanislawski et al., 2003; Volk et al., 2006]. Diesem frühen GSH-Abbau folgt drei bis vier Stunden nach der Behandlung eine fortschreitend ansteigende ROS-Produktion [Stanislawski et al., 2003]. Dadurch werden Reaktionswege aktiviert, die zu DNA-Strangbruchinduktion [Kleinsasser et al., 2004 und 2006], Mikrokernbildung [Schweikl et al., 2001 und 2006; Lee et al., 2006], Zellzyklusalteration [Schweikl et al., 2005 und 2007; Chang et al., 2005] und Apoptose [Paranjpe et al., 2005; Lee et al., 2006; Samuelsen et al., 2007] führen. Die Rolle der ROS bei der Geno- und Zytotoxizität von Monomeren konnte durch Co-Behandlung der Zellen mit exogenen Antioxidantien gezeigt werden. So konnte bei einer Messung der ROS-Produktion in Gingivafibroblasten, die nach drei bis vier Stunden Behandlung mit 1,6 mM TEGDMA eine deutliche ROS-Produktion zeigten, in Anwesenheit von 2-3  $\mu\text{M}$  Trolox (synthetisches Analogon von  $\alpha$ -Tocopherol oder Vitamin E) eine teilweise und mit 5-10  $\mu\text{M}$  eine komplette Hemmung der ROS-Produktion erreicht werden. Bei der Testdurchführung mit 200  $\mu\text{M}$  Ascorbat (Vitamin C) konnte dagegen keine signifikante Hemmung beobachtet werden. Ein teilweise hemmender Effekt von Ascorbat konnte allerdings bei niedrigeren TEGDMA-Konzentrationen erreicht werden [Stanislawski et al., 2003]. Eine einstündige Behandlung

einer Submandibulariszelllinie der Ratte mit HEMA (3,8 mM, 7,5 mM, 15 mM)/TEGDMA (750  $\mu$ M, 1,5 mM, 3 mM) erbrachte einen signifikanten dosisabhängigen Anstieg von ROS. Bei einer Co-Behandlung mit Vitamin C war dies dagegen nicht der Fall [Samuelsen et al., 2007]. Kürzlich konnte auch die ROS-Produktion als frühe Antwort auf eine TEGDMA-Exposition nachgewiesen werden [Schweikl et al., 2008].

Die meisten Schäden werden durch effektive DNA-Reparaturenzyme repariert [Jackson und Loeb, 2001]. Allerdings kann ein persistierender ROS-induzierter DNA-Schaden zur Entstehung von schädigenden Mutationen führen [Schweikl et al., 2006], da sie möglicherweise zu einer genetischen Instabilität und zu einem mutierten Phänotyp in einigen Tumoren beitragen [Jackson und Loeb, 2001]. Der oxidative Stress ist jedoch nicht alleine für die Mutagenität der Monomere verantwortlich. Denn im Mikrokerntest mit HEMA und TEGDMA behandelten V79-4 Fibroblasten konnte festgestellt werden, dass die Induktion von Mikrokernen durch TEGDMA selbst bei niedrigen Konzentrationen nicht komplett durch die Co-Behandlung mit 10 mM NAC aufgehoben wird [Lee et al., 2006]. Somit müssen noch andere Mechanismen für die Auslösung der schädigenden Effekte der Zahnwerkstoffe in Frage kommen.

## 4.6 Welche Effekte lösen HEMA und TEGDMA in realistischen in vivo Konzentrationen aus?

### 4.6.1 DNA-Strangbrüche im Comet Assay mit Fpg

ROS sind die Hauptverantwortlichen für endogene DNA-Schäden, welche Einzel- und Doppelstrangbrüche, basenfreie Stellen, wie AP-Läsionen, apurinische und apyrimidinische Läsionen bzw. alkalilabile Läsionen und oxidierte Basen einschließen. Besonders anfällig sind Guanin-Basen [Collins, 1999; Moller und Loft, 2002]. Der Comet Assay (Einzelzellgelelektrophorese) macht es möglich, diese DNA-Schäden mit Einzelzellen nachzuweisen. Vorteilhaft sind seine einfache Anwendbarkeit und die außerordentlich niedrige Nachweisbarkeitsgrenze von DNA-Schäden [Reichl, 2003]. Dennoch muss bei diesem Testverfahren darauf geachtet werden, dass der Comet Assay während einer bestehenden Exposition oder unmittelbar nach dem Ende einer akuten oder chronischen Exposition durchgeführt werden sollte, da die meisten DNA-Schäden, die zur DNA-Wanderung beitragen, innerhalb weniger Stunden repariert bzw. eliminiert werden [Speit et al., 2001].

Erstmals wurde der Comet Assay 1984 in einer Mikrogelelektrophorese-Studie bei strahleninduzierten DNA-Schäden in Form von Doppelstrangbrüchen in einzelnen Brustdrüsenzellen beschrieben [Oestling und Johanson, 1984]. Dabei handelte es sich um einen neutralen Comet Assay, in dem Lyse und Elektrophorese unter pH-neutralen Bedingungen abliefen. Im Laufe der Jahre wurde diese Technik modifiziert und hat in den Bereichen der genetischen Toxikologie und dem humanen Biomonitoring rasch an Bedeutung gewonnen. Durch Einführung der alkalischen Mikrogelelektrophorese (pH > 13) wurde die Nachweisbarkeit von DNA-Schäden um Einzelstrangbrüche und alkalilabile Stellen erweitert [Singh et al., 1988; Olive, 1989; Olive et al., 1990].

In dieser Arbeit wurde eine weitere Modifizierung des Comet Assay angewendet. Die Kombination des herkömmlichen Comet Assay mit dem Fpg-Protein bringt den Vorteil, in nur einem Versuch nicht nur DNA-Strangbrüche, alkalilabile Stellen und DNA-Reparatureinschnitte, sondern auch oxidativ geschädigte Basen nachzuweisen [Collins, 1993]. Das Fpg erhöht die Sensitivität und Spezifität des Comet Assays [Collins, 2004; Wong et al., 2005] und liefert somit bedeutende Einblicke in die Mechanismen der DNA-Schädigung

[Gielazyn et al., 2003]. Fpg weist oxidativ geschädigte Purine, besonders 8-OH-Guanine nach [Collins und Dusinska, 1996; Dennog et al., 1996; Moller und Loft, 2002; Speit et al., 2004]. Fpg steht für Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase und ist ein Basenexzisions-reparaturenzym zur Reparatur promutagener oxidativer DNA-Schäden in aeroben Organismen. Es stammt unter anderem aus *Escheria coli*. Experimente mit dem aus *Escheria coli*. stammenden, gereinigten Fpg-Protein bestätigen, dass dieses Enzym für die Erkennung von Singulett-sauerstoff-induzierten DNA-Basen-Modifikationen verantwortlich ist [Müller et al., 1990].

Eine Induktion von DNA-Strangbrüchen durch HEMA und TEGDMA konnte bereits nach einer Stunde Behandlung in humanen Lymphozyten gezeigt werden. Für möglich relevante in vivo Konzentrationen ( $< 100 \mu\text{M}$ ), wie sie auch in dieser Arbeit zum Einsatz kamen, wurde keine signifikante Steigerung der DNA-Wanderung beobachtet [Kleinsasser et al., 2004]. In einer weiteren Studie fand ein Vergleich der DNA-Schädigung nach einer Stunde Behandlung zwischen humanen Lymphozyten und Parotiszellen statt. In Parotiszellen wurde eine signifikante Steigerung der DNA-Wanderung bei 1 mM HEMA und 10  $\mu\text{M}$  TEGDMA beobachtet. In Lymphozyten hingegen war die niedrigste Konzentration für signifikante DNA-Wanderung 10  $\mu\text{M}$  HEMA und 1 mM TEGDMA. Damit wurde nachgewiesen, dass TEGDMA im niedrigen Konzentrationsbereich ( $\leq 100 \mu\text{M}$ ) in Lymphozyten signifikant niedrigere Wanderungen zeigt als in Parotiszellen. Aufgrund der genotoxischen Effekte in dieser Studie wurde ein mögliches tumorinitiierendes Potential in humanen Speicheldrüsen nicht vollkommen ausgeschlossen [Kleinsasser et al., 2006].

In dieser Arbeit wurden die genotoxischen Effekte nach 24-stündiger Behandlung mit HEMA und TEGDMA anhand von Olive Tail Moment, Tail Length, Tail DNA und Head DNA quantifiziert.

Bei der Beurteilung der OTM-Werte verhält es sich so, dass aufgrund des geringen DNA-Schadens in der Negativkontrolle (DMSO) bei einem OTM mit und ohne Fpg von  $< 2$  davon ausgegangen werden kann, dass die niedrig eingesetzten Konzentrationen (10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  HEMA und 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  TEGDMA) mit und ohne Fpg ( $\text{OTM} < 2$ ) keine genotoxische Wirkung entfalten. Diese Konzentrationen bleiben bezüglich der Negativkontrolle mit und ohne Fpg konstant. Demnach kann man bei den durchschnittlichen OTM-Werten für 1 mM HEMA von 3,06 und für 100  $\mu\text{M}$  TEGDMA von 2,42 auf das Vorhandensein von mutagenen

DNA-Defekten schließen. Sie heben sich, ob mit oder ohne Fpg, signifikant (1 mM HEMA +/- Fpg:  $p = 0,013/0,007$  und TEGDMA +/- Fpg:  $p = 0,013/0,011$ ) von der jeweils darunter liegenden Konzentration ab. Aufgrund der jeweiligen Verdoppelung der DNA-Fragmentierung ( $p = 0,005$ ) durch das Fpg gegenüber der Pufferbehandlung wird das Vorhandensein von oxidativ geschädigten Basen und damit die Aussage bestätigt, dass HEMA und TEGDMA mit oxidativem Stress in Verbindung stehen [Stanislawski et al., 2003; Schweikl et al., 2006; Lee et al., 2006]. Bereits in anderen toxikologischen Studien konnte mit Hilfe des Fpg-Proteins gezeigt werden, dass oxidativer Stress für die Schädigung der DNA verantwortlich ist [Domijan et al., 2006]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass bereits subzytotoxische Konzentrationen fähig sind, in zelluläre Vorgänge einzugreifen, indem sie für ein Ungleichgewicht des zellulären Redoxpotentials sorgen. Dies bestätigt die Aussage, dass nach vierstündiger Behandlung bereits 500  $\mu\text{M}$  HEMA und TEGDMA schon ab 100  $\mu\text{M}$  und signifikant ab 500  $\mu\text{M}$  einen intrazellulären GSH-Abbau in humanen Gingivafibroblasten induzieren [Volk et al., 2006].

Signifikant höhere Werte werden auch in Tail Length, Tail DNA und Head DNA bei allen mit Fpg behandelten Zellen im Vergleich zur Pufferbehandlung beobachtet (siehe 5.3.3 Tab. 24 und 25).

#### 4.6.2 Induktion von Mikrokernen im Mikrokerntest

Der Mikrokerntest hat sich als eine der bevorzugten Methoden für die Bewertung von Chromosomenschäden herausgestellt, weil mit diesem Test sowohl Chromosomenverluste als auch Chromosomenbrüche zuverlässig gemessen werden können [Fenech, 1993, 2000, 2005 und 2007]. Ein Mikrokern besteht aus Chromatin und ist wesentlich kleiner. Er misst maximal 1/3 des Hauptkerndurchmessers eines normalen Zellkerns. Die Häufigkeit der Mikrokerne wird als quantitatives Maß für den schädigenden Einfluss von Substanzen auf die Zelle gesehen. Dabei ist entscheidend, jene Zellen zu identifizieren, welche sich erst nach der Behandlung mit dem Agens geteilt haben, da Mikrokerne in der Anaphase gebildet werden und nur in geteilten Zellen auftreten [Fenech, 1993]. Durch die Entwicklung der Zytokinese-Block-Mikrokern-(CBMN)Technik, welche Cytochalasin B verwendet, konnte erreicht werden, die Zellen nach erfolgter Kernteilung an der Zytokinese zu hindern [Fenech und Morley, 1985 und 1986]. Durch die Zugabe des Zytokineseblockers Cytochalasin B, der die Mikrofilamentzusammensetzung hemmt, wird der Test genauer und sensitiver [Fenech und Morley, 1986]. Es entsteht ein Zellbild von ein-, doppel- und mehrkernigen Zellen. In seiner gegenwärtigen Form kann der Mikrokerntest (CBMN) Genotoxizität und Zytotoxizität anhand

von Chromosomenbruch, Chromosomenverlust, Genumstellung (Nukleoplasmabrücke), Zellteilungshemmung, Nekrosen und Apoptosen erfassen [Fenech, 2000, 2005 und 2007].

In dieser Arbeit wurden doppel- und mehrkernige Zellen sowie Mitosen, Apoptosen und Mikrokerne gewertet. Vorangegangene Mikrokern-Studien beschreiben eine dosisabhängige Genotoxizität der Monomere in V79/-4-Zellen [Schweikl et al., 2001 und 2006; Lee et al., 2006]. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen bezüglich HEMA und TEGDMA in humanen Lymphozyten zwar die Induktion von Mikrokerneln, jedoch zeigen sie in diesem eng beieinander liegenden niedrigen Konzentrationsbereich keine signifikante Dosisabhängigkeit. Signifikant wirken sich 1  $\mu\text{M}$  TEGDMA ( $p = 0,044$ ) aus. Dies lässt vermuten, dass es zu chromosomaler Aberration kommen kann.

Ein Vorteil des Mikrokerntests ist, dass er neben manifesten DNA-Schäden auch Informationen über andere zelluläre Reaktionen wie Apoptosen, Nekrosen, Mitosen und die Proliferation der Zellen liefert. Auch wenn sich HEMA und TEGDMA nicht signifikant auf die Mikrokernbildung auswirken, so konnte doch mit diesem Test anhand der Zählung mehrkerniger Zellen die Einflussnahme von 1 mM HEMA ( $p = 0,005$ ) und 100  $\mu\text{M}$  TEGDMA ( $p = 0,007$ ) auf die Proliferation gezeigt werden. Signifikant ist bei HEMA, dass es nach einem milden dosisabhängigen Abfall doppelkerniger Zellen plötzlich zu einem signifikanten Anstieg bei 1 mM ( $p = 0,013$ ) kommt. Durch Wertung der Mitosen konnte bei 1 mM HEMA ( $p = 0,005$ ) eine signifikant niedrigere Mitoserate gezeigt werden. Trotz der Eingriffe durch die höchst eingesetzten HEMA- und TEGDMA-Konzentrationen in die zellulären Vorgänge wurde keine erhöhte Apoptoserate bei diesen Konzentrationen beobachtet.

### 4.6.3 Vergleich Mikrokerntest und Comet Assay

Im Comet Assay wird mit und ohne Fpg eine signifikant höhere DNA-Schädigung bei 1 mM HEMA und 100  $\mu\text{M}$  TEGDMA erreicht. Parallel bleibt im Mikrokerntest eine Erhöhung der Mikrokernbildung aus. Dennoch wird ein stärker schädigendes Potential dieser Konzentrationen auch im Mikrokerntest bei der Wertung mehrkerniger Zellen beobachtet. Ein Vorteil des Comet Assays gegenüber dem Mikrokerntest ist, dass er sowohl mit unstimulierten als auch mit stimulierten Zellen durchführbar ist. Außerdem ist er weniger aufwendig bei der Auswertung und liefert schnellere Ergebnisse. Die Auswertung des Mikrokerntests ist eher als subjektiv zu bewerten, da diese durch eine Person am

Fluoreszenzmikroskop erfolgt. Der Comet Assay wird mit der Comet 5.5 Software ausgewertet.

## 4.6.4 Chromosomen

Der Chromosomenaberrationstest und der Schwesterchromatidaustauschtest wurden bei fünf Probanden zusätzlich durchgeführt. Dies soll neben den anderen durchgeführten Methoden einen kleinen Einblick auf das direkte Einwirken von HEMA und TEGDMA auf die Chromosomen geben.

### 4.6.4.1 Chromosomenaberrationstest

Der Begriff Chromosomenaberration steht für eine Abweichung in der Anzahl oder Struktur der Chromosomen. Daher auch die Bezeichnungen numerische und strukturelle Chromosomenaberration. Bei der numerischen kann es zu einem Chromosom mehr, Trisomie, oder einem weniger, Monosomie, kommen. Die wohl bekannteste Form einer numerischen Aberration ist die Trisomie 21, das Down-Syndrom. Abbrüche von Chromosomenmaterial oder ein fehlerhaftes Zusammensetzen von Chromosomenstücken führen zu einer strukturellen Aberration. Diese können in Chromosomenaberrationen vom Chromosomen- und Chromatidtyp unterteilt werden. Beim Cri-du-chat-Syndrom, dem Katzenschrei-Syndrom, handelt es sich um eine strukturelle Chromosomenaberration mit partiellem Verlust der kurzen Arme des Chromosoms 5.

Chromosomenmutationstests sind heute ein unerlässlicher Bestandteil für die Genotoxizitätsprüfung von Stoffen. Mit diesem Test lassen sich Chromosomenaberrationen nachweisen, die zu Chromosomenmutationen führen können, wenn aus den betroffenen Zellen nach Ablauf einer Mitose lebensfähige Tochterzellen hervorgehen [Madle et al., 1993].

In einer Genotoxizitätsstudie wurde mittels Chromosomenaberrationstests die genotoxische Aktivität von fünf Dentinadhäsiven untersucht, die alle HEMA enthielten. Dazu wurden humane Lymphozyten mit 0,2 und 0,5-5 µg/ml Dentinadhäsiv für eine Stunde, 24 Stunden und fünf Tage behandelt. Die gewonnenen Ergebnisse verdeutlichen, dass die Genotoxizität mit der Konzentration des Dentinadhäsivs bzw. seiner Komponenten steigt und mit der Lösungszeit fällt. Die größte Genotoxizität wurde nach 24 Stunden in Wasser und/oder Ethanol beobachtet [Prisca et al., 2007].

In dieser Arbeit wurden zum einen die gesamten Chromosomenaberrationen, die strukturellen CAs vom Chromosomen- und Chromatidtyp sowie die numerischen Chromosomenaberrationen ausgewertet.

Die Versuchsreihen zeigten, dass HEMA und TEGDMA einen signifikanten dosisabhängigen Anstieg der strukturellen und numerischen Aberrationen bewirken. Bei HEMA und TEGDMA sind die Anstiege der Aberrationen im Vergleich der Negativkontrolle mit 10  $\mu\text{M}$  HEMA/1  $\mu\text{M}$  TEGDMA ( $p = 0,043$ ), 10  $\mu\text{M}$  mit 100  $\mu\text{M}$  HEMA und 1  $\mu\text{M}$  mit 10  $\mu\text{M}$  TEGDMA (jeweils Chromosomentyp:  $p = 0,043$ ) signifikant (siehe 5.3.5. Tab.28 und 29).

#### 4.6.4.2 Schwesterchromatidaustauschtest

Schwesterchromatidaustausche sind reziproke Austausche, intrachromosomale Rekombinationen, zwischen den DNA-Molekülen eines replizierten Chromosoms. SCEs stehen nicht direkt mit dem Entstehen von Genmutationen und Chromosomenaberrationen in Verbindung. Als Indikatorrest ergänzt der Schwesterchromatidaustauschtest den Chromosomenaberrationstest [Speit, 1993].

Sowohl HEMA als auch TEGDMA bewirken einen signifikanten dosisabhängigen Anstieg der Schwesterchromatidaustausche. Signifikant sind bei HEMA und TEGDMA der Anstieg der SCEs im Vergleich der Negativkontrolle mit 10  $\mu\text{M}$  HEMA/1  $\mu\text{M}$  TEGDMA. Des Weiteren ist die Zunahme der SCEs mit den höheren TEGDMA-Konzentrationen ebenfalls signifikant ( $p = 0,043$ ).

Mit den beiden Chromosomenanalysemethoden wird eine signifikante Auswirkung von HEMA und TEGDMA auf die Chromosomen bereits im relevanten in vivo Konzentrationsbereich von  $\leq 100 \mu\text{M}$  beobachtet. Dies bestätigt die genotoxische Aktivität dieser beiden Werkstoffe.



#### 4.6.5 Vergleich Mikrokerntest und Chromosomenaberrationstest

Der Vorteil des Mikrokerntest gegenüber dem Chromosomenaberrationstest ist seine einfachere und schnellere Durchführbarkeit und er ist weniger aufwendig auszuwerten. Jedoch kann der Mikrokerntest nur zur indirekten Messung der Induktion von strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen eingesetzt werden [Romagna, 1993]. Mit ihm lässt sich das genotoxische Potential von Substanzen abklären. Die Analyse mittels Chromosomenaberrationstest und Schwesterchromatidaustauschtest zeigen dagegen das direkte Einwirken auf die Chromosomen. Dieser Unterschied der beiden Methoden spiegelt sich auch in den Resultaten wieder. Mit dem Mikrokerntest lassen sich im Falle der subzytotoxischen HEMA- und TEGDMA-Konzentrationen keine gezielten Aussagen über deren Genotoxizität treffen, sondern anhand des Einwirkens auf die Proliferations- und Mitoserate eher vermuten. Signifikant hingegen ist, dass in den Chromosomenanalysen einerseits ein dosisabhängiger Anstieg der Aberrationen und andererseits vermehrte Chromatidaustausche beobachtet werden können.

#### 4.6.6 Induzieren HEMA und TEGDMA eine erhöhte Apoptoserate?

Der Begriff Apoptose wurde erstmals in einer Veröffentlichung von Kerr, Wyllie und Currie eingeführt [Kerr et al., 1972] und ist heute die allgemeine Bezeichnung, um morphologische Prozesse zu beschreiben, die zur kontrollierten Selbstzerstörung einer Zelle führen.

Die Apoptose ist in zahlreiche biologische Prozesse, von der Embryogenese bis zur Alterung, von der normalen Gewebemöostase bis zur Entstehung von Krankheiten, involviert. Dadurch stellt sie einen der wichtigsten Bereiche der biomedizinischen Forschung dar [Renehan et al., 2001].

Vitale Zellen wahren eine strikte Asymmetrie in ihrer Plasmamembran, auf deren Innenseite die Phosphatidylserine (PS) eingelagert sind. Während der Apoptose werden die PS-Moleküle auf die Membranaußenseite verlagert. Die Exprimierung der Phosphatidylserine spielt eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Entfernung der apoptotischen Zellen durch Makrophagen [Koopman et al., 1994]. Koopman und Mitarbeitern gelang schließlich als erste die durchflusszytometrische Entdeckung von Apoptosen durch die Bindung von Annexin-V an exprimierten Phosphatidylserinen [Koopman et al., 1994]. Ein Hapten-markiertes

Annexin-V kann mit hoher Affinität, in Anwesenheit einer mM- $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, an das nach außen verlagerte PS binden [Koopman et al., 1994; van Engeland et al., 1998]. Als einem der ersten gelang es Reutelingsperger, das Annexin-V aus humaner Nabelschnur zu isolieren [Reutelingsperger et al., 1985]. Die Annexin-V-Apoptosemessung mit dem Durchflusszytometer ist ein einfacher und schneller Test zur Erfassung früher Apoptosen. Um allerdings vitale Zellen von frühapoptotischen und spätapoptotischen Zellen unterscheiden zu können, werden die Zellen zusätzlich mit Propidiumiodid (PI) angefärbt [van Engeland et al., 1998].

Die Apoptosemessung mit Annexin-V und PI erfolgte in einer Studie zur Abklärung inwieweit HEMA fähig ist Apoptose zu induzieren und ob ein Unterschied in der Apoptosezahl zwischen Zellen von Gesunden und HEMA-sensitiven Patienten besteht. Hierbei wurden humane periphere Blut-Mononukleare Zellen (PBMCs) von Gesunden und HEMA-sensitiven Patienten sowie Mausmakrophagen für 12-18 Stunden mit HEMA behandelt. Ergebnis: der durch HEMA induzierte Zelltod bei Gesunden, HEMA-Sensitiven und Mausmakrophagen steigt dosisabhängig. Allerdings ist die Apoptoserate in PBMCs von HEMA-sensitiven Patienten verglichen mit dem Gesunder niedriger. Beispielsweise lag die Rate vitaler Zellen (16,4 mM HEMA), d. h. Zellen die weder von Annexin-V noch von PI angefärbt wurden, bei den Gesunden bei 25,4 % und bei den HEMA-Sensitiven bei 64 %. Die abnehmende Anfälligkeit der Lymphozyten auf den HEMA-vermittelten Zelltod kann einen wichtigen Mechanismus für die Entstehung und Persistenz von hypersensitiven Reaktionen darstellen [Paranjpe et al., 2005]. Die von TEGDMA induzierten Apoptosen und/oder Nekrosen in humanen Gingivafibroblasten sind abhängig von der Behandlungszeit und der Konzentration. So wurden nach vier Stunden noch keine Apoptosen beobachtet. Nach 24-stündiger Behandlung wurden für 1 mM und 2,5 mM kein, für 5 mM und 7,5 mM dagegen ein signifikanter Anstieg apoptotischer Zellen nachgewiesen [Janke et al., 2003]. Dass die von HEMA und TEGDMA induzierte Apoptose ebenso wie ihre Mutagenität durch oxidativen Stress vermittelt wird, zeigt eine Studie anhand der durchflusszytometrischen Apoptosemessung, in welcher RPC-C2A Pulpazellen mit HEMA und TEGDMA in Ab- und Anwesenheit von NAC 24 Stunden behandelt wurden. Dabei reduzierte NAC die Anzahl apoptotischer Zellen bei 14 mM HEMA von 22 % auf 7 % und bei 7 mM TEGDMA von 20 % auf 4 % [Lee et al., 2006]. Mit der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Apoptose in einer Submandibulariszelllinie der Ratte konnte eine erste apoptotische Antwort nach 8-10 Stunden Behandlung mit HEMA und TEGDMA entdeckt werden. Bis 7,5 mM HEMA stiegen

die Apoptosen dosisabhängig, bei höheren Konzentrationen pendelten sich die Apoptosen auf  $< 25\%$  ein. Im Gegenzug nahm die Anzahl nekrotischer Zellen drastisch zu. Bis ungefähr 2 mM TEGDMA stiegen auch hier die Apoptosezahlen an und blieben danach stabil bei ca. 25 % während die nekrotischen Zellen zunahm [Samuelsen et al., 2007]. Dieses Überwiegen von Nekrose gegenüber Apoptose ab 2 mM TEGDMA wurde auch mit der durchflusszytometrischen Apoptosemessung anhand der Behandlung humaner Pulpazellen beobachtet. Außerdem konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass eine Hemmung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI<sub>3</sub>-K) die durch TEGDMA vermittelte Apoptose noch verstärkt [Spagnuolo et al., 2004]. Die PI<sub>3</sub>-Kinase ist eines der wichtigsten regulierenden Enzyme. Aufgrund seiner doppelenzymatischen Aktivität (Lipid- und Protein-Kinase) und seiner Fähigkeit eine Reihe von Signalproteinen, einschließlich einiger Onkoproteine, zu aktivieren, hat die PI<sub>3</sub>-Kinase eine fundamentale Bedeutung in der Regulation der Zellfunktionen, wie Wachstum und Überleben, Alterung und maligne Transformation [Krasilnikov, 2000].

Bei der Apoptosemessung subzytotoxischer HEMA- und TEGDMA-Konzentrationen in dieser Arbeit blieben die spätapoptotischen/nekrotischen Zellen prozentual deutlich unter den frühapoptotischen Zellen. Es zeigte sich auch kein signifikanter dosisabhängiger Anstieg. 1 mM HEMA erhöhte die frühe Apoptoserate ( $p = 0,028$ ) signifikant auf durchschnittlich 12,52 % und die späte Apoptoserate ( $p = 0,025$ ) auf durchschnittlich 3,53 %. Dagegen blieben 10  $\mu$ M und 100  $\mu$ M sowohl bei den frühen wie auch bei den späten Apoptosen konstant zur Negativkontrolle (DMSO). 100  $\mu$ M TEGDMA erhöhte die frühe Apoptoserate ( $p = 0,013$ ) signifikant auf durchschnittlich 8,74 % und die späte Apoptoserate ( $p = 0,008$ ) auf durchschnittlich 2,39 %. Die niedrigen Konzentrationen blieben auch hier jeweils konstant zur Negativkontrolle. 1 mM HEMA ( $p = 0,032$ ) und 100  $\mu$ M TEGDMA ( $p = 0,008$ ) wirkten sich signifikant auf die Vitalität der Lymphozyten aus. Sie senkten den Anteil vitaler Zellen unter 90 %, wobei die niedrigen Konzentrationen bei HEMA wie auch bei TEGDMA mit der Negativkontrolle konstant bei etwa 90 % blieben. Aufgrund der niedrigen frühen und späten Apoptoserate der Negativkontrolle und der Tatsache, dass die niedrigen HEMA- und TEGDMA-Konzentrationen keine höheren Apoptoseraten induzieren, lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die erhöhten Raten bei 1 mM HEMA und 100  $\mu$ M TEGDMA tatsächlich auf das Einwirken der beiden Stoffe zurückzuführen sind. Die niedrigen Apoptoseraten bei den relevanten in vivo Konzentrationen ( $< 100 \mu$ M) könnten bei der Hypersensitivität gegenüber dieser Monomere eine Rolle spielen (siehe oben Paranjpe).

### 4.6.7 Manipulieren HEMA und TEGDMA den Zellzyklus?

Der Zellzyklus ist ein sich regelmäßig wiederholender Ablauf von Interphase und Mitose und wird systemimmanent strengstens kontrolliert. Die Cycline und die cyclinabhängigen Kinasen bilden Cyclin-cdk-Komplexe und können somit an vier Kontrollpunkten, dem G1-, S-, G2- und Metaphasen-Kontrollpunkt, auf den Zellzyklus Einfluss nehmen. Das Protein p53 ist ebenfalls an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. Als Transkriptionsfaktor kontrolliert es nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die an der Zellzykluskontrolle, der Apoptoseinduktion und DNA-Reparatur beteiligt sind. P53 wird gebildet bevor also eine Replikation oder eine Mitose fehlerhaft ablaufen würde. P53 sammelt sich in der Zelle an, wodurch die Reparatur der DNA gestartet und der Zellzyklus am Übergang von der G1- in die S-Phase gestoppt wird. Kann der Schaden repariert werden, so sinkt der p53-Spiegel wieder in der Zelle und der Zyklus kann fortgesetzt werden [Löffler, 2003].

In einer Studie wurde durch die durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus beobachtet, wie unterschiedlich sich TEGDMA auf den Zellzyklus von V79 Chinesischer Hamster Lungenfibroblasten mit einer unzulänglichen p53-Funktion, von N1 humanen Hautfibroblasten sowie humanen Pulpafibroblasten mit einer fähigen p53-Funktion auswirkt. Die mit 1,5 mM TEGDMA behandelten V79-Zellen sammelten sich zu 1 % in G1, 27 % in S und 72 % in G2 an. Gänzlich anders verhielten sich die humanen N1-Zellen. 3 mM TEGDMA bewirkten eine Ansammlung von 76 % in G1, 16 % in S und 9 % in G2. Bei den humanen Pulpafibroblasten sammelten sich dagegen bei 3 mM TEGDMA 40 % in G1, 10 % in S und 50 % in G2 an. Damit wurde gezeigt, dass die durch TEGDMA verursachte Zellzyklusverzögerung durch p53-abhängige und p53-unabhängige Wege vermittelt wird. Daraus wurde geschlossen, dass TEGDMA in biologische Prozesse wie Zellwachstum und Zelldifferenzierung eingreifen könnte [Schweikl et al., 2005]. In einer Folgestudie wurden die Auswirkungen von HEMA (2-8 mM) und TEGDMA (0,5-3 mM) auf den Zellzyklus in An- und Abwesenheit von NAC in V79-Zellen analysiert. Eine durch TEGDMA verursachte Zellzyklusverzögerung in der G2-Phase blieb aus, sobald die Zellen zusätzlich mit NAC behandelt wurden. Ähnlich führte NAC auch in mit HEMA behandelten Zellen zu einer Revidierung der Verzögerung des Zellzyklus. Hiermit wurde bestätigt, dass die Modifizierung des Zellzyklus durch HEMA und TEGDMA durch oxidativen Stress vermittelt wird [Schweikl et al., 2007]. In einer Zellzyklusanalyse von TEGDMA behandelten normalen humanen Hautfibroblasten zeigte sich nach 2-, 6- und 24-stündiger Behandlung mit TEGDMA eine ähnliche Verzögerung in der G1-Phase. Hieraus wurde geschlossen, dass die

Aktivierung der Zellzykluskontrollpunkte eine unmittelbare Antwort auf den monomer-  
verursachten Zellschaden ist [Schweikl et al., 2008].

Beurteilt man die in dieser Arbeit verwendeten humanen Lymphozyten in ihrem Zellzyklus, ist festzustellen, dass diese unterschiedlich auf die Exposition mit den subzytotoxischen HEMA- und TEGDMA-Konzentrationen reagieren. Eine Behandlung der Zellen mit HEMA wirkt sich nicht signifikant auf die G1-Phase aus. Der durchschnittliche prozentuale Anteil beträgt bei unbehandelten 58,22 % und bei behandelten Lymphozyten 57,94 % bis 59,20 %. Bei den mit TEGDMA behandelten Zellen sammelten sich hingegen bei 10  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,007$ ) und 100  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,047$ ) signifikant mehr Zellen in der G1-Phase im Vergleich zu Unbehandelten. 1 mM HEMA bewirkt einen nicht signifikanten Anstieg des durchschnittlichen Zellanteils in der S-Phase. 100  $\mu\text{M}$  TEGDMA ( $p = 0,022$ ) senken im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant den Anteil in dieser Phase. 1 mM HEMA führt im Vergleich zu 100  $\mu\text{M}$  zu einem signifikanten Abfall des Anteils der Zellen in der G2-Phase. Die G2-Phase der mit TEGDMA behandelten Lymphozyten bleibt dagegen weitgehend konstant.

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, bei den humanen Lymphozyten handelt es sich wie bei den N1 humanen Hautfibroblasten und den humanen Pulpafibroblasten um p53-funktionstüchtige Zellen. Bezieht man die Resultate auf die möglichen im  $\mu\text{M}$ -Bereich vorkommenden in vivo Konzentrationen, so kann davon ausgegangen werden, dass HEMA keinen Einfluss auf den Zellzyklus nimmt. TEGDMA bewirkt ab 10  $\mu\text{M}$  eine G1-Verzögerung. Eine Blockade des Zellzyklus in der G1-Phase konnte bereits in N1-Fibroblasten mit niedrigen und nichttoxischen TEGDMA-Konzentrationen nach 24-stündiger Behandlung gezeigt werden [Schweikl et al., 2005].

## 4.7 HEMA und TEGDMA - ihre Eigenschaften, ihre genotoxische Wirkung und ihre Zukunft

HEMA und TEGDMA finden ihren Einsatz in zahlreichen zahnärztlichen Werkstoffen. Ihre Eigenschaften werden genutzt, um unter anderem die Viskosität der Komposite herabzusetzen, ihren Füllstoffanteil zu erhöhen und um die Verbindung zwischen der hydrophilen Zahnhartsubstanz und dem hydrophoben Komposit zu ermöglichen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und auch andere Studien zuvor zeigen, dass TEGDMA weitaus toxischer ist als HEMA [Reichl et al., 1999 und 2006a, b]. Erklärbar ist das unterschiedliche toxische Potential durch ihre unterschiedlichen Eigenschaften. So besitzt TEGDMA ein höheres Molekulargewicht und eine höhere Lipophilie als HEMA. Bereits im Vorfeld dieser Arbeit zeigte sich in der Dosis-Wirkungskurve zum Ausschluss der zytotoxischen Konzentrationen, dass HEMA ab 1 mM und TEGDMA schon ab 100  $\mu$ M geringe toxische Effekte auslösen.

Entscheidend ist aber, ob die für HEMA und TEGDMA relevanten in vivo Konzentrationen genotoxische Effekte zeigen und ob TEGDMA in diesem Konzentrationsbereich auch toxischer ist als HEMA. Bei den Vorversuchen wurde für 10  $\mu$ M HEMA und TEGDMA keine Zytotoxizität beobachtet. Deswegen wird im Folgenden diese Konzentration der beiden Stoffe zum Vergleich ihrer Auswirkungen gegenübergestellt (siehe Tab. 3):

**Tabelle 3:** Vergleich der durchschnittlichen Ergebniswerte bei 10  $\mu\text{M}$  HEMA und 10  $\mu\text{M}$  TEGDMA. Deutliche Abweichungen sind grau hervorgehoben.

Methode	10 $\mu\text{M}$ HEMA	10 $\mu\text{M}$ TEGDMA
<b>Comet Assay:</b> OTM/OTM+Fpg	0,37/0,86	0,49/1,53
<b>Mikrokerntest:</b> Mehrkernige	214,80	219,4
Mitosen	37,90	32,40
Apoptosen	6,60	7,60
Mikrokerne	13,10	15,30
<b>Chromosomenaberrationstest:</b>		
CAs gesamt	10,20	14,20
<b>Schwesterchromatidaustauschtest:</b> SCEs	140,80	245,80
<b>Apoptosemessung:</b> frühe	8,13	7,77
späte	1,25	1,41
<b>Zellzyklusanalyse:</b> G1-Phase	58,03	57,09
S-Phase	36,71	38,15
G2-Phase	5,02	4,76

Zusammenfassend ist festzustellen, weder HEMA noch TEGDMA entfalten im relevanten in vivo Konzentrationsbereich ( $< 100 \mu\text{M}$ ) eine genotoxische Wirkung. Beim Vergleich der Werte aus Comet Assay mit Fpg, Mikrokerntest, Apoptosemessung und Zellzyklusanalyse zeigen 10  $\mu\text{M}$  TEGDMA die Tendenz zu einer etwas stärkeren Wirkung als 10  $\mu\text{M}$  HEMA. Wesentlich deutlicher wird der Unterschied zwischen HEMA und TEGDMA bei der Gegenüberstellung der durchschnittlichen Schwesterchromatidaustausche und der Chromosomenaberrationen.

Die Bedenken der ganzheitlichen Zahnmediziner ist also nicht vollkommen unbegründet, denn sowohl HEMA wie auch TEGDMA entfalten in den Chromosomentests signifikante Wirkungen. Daher sollten weitere Untersuchungen erfolgen, wenn diese beiden Stoffe künftig in zahnärztlichen Materialien verwendet werden sollen. Eine Entwicklung von HEMA und TEGDMA-freien Kompositen ist bereits im Gange und die ersten Produkte sind am Markt verfügbar.

## 5.1 Zusammenfassung

Die Zahnwerkstoffe HEMA (Hydroxyethylmethacrylat) und TEGDMA (Triethylenglycol-dimethacrylat) gehören zu den so genannten Restmonomeren. Sie liegen nach der Polymerisation noch ungebunden vor und werden anschließend freigesetzt. Sie gelangen in den Organismus über die Pulpa, die Gingiva oder über den Speichel und können biologisch wirksam werden. Bisherige Studien zeigen dosisabhängige mutagene Effekte in tierischen und menschlichen Zellen. HEMA und TEGDMA führen zu DNA-Strangbrüchen, Mikrokernbildung, Apoptosen und nehmen Einfluss auf den Zellzyklus (G1- und G2-Verzögerung). Ebenso wurden ein allergenes Potential und eine toxische Wirkung auf die Niere beschrieben. In dieser Arbeit wurden genotoxische Effekte von HEMA und TEGDMA in humanen Lymphozyten in Konzentrationsbereichen überprüft, wie sie auch im Körper auftreten können. Hierfür wurden die Lymphozyten 24 Stunden mit 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 1 mM HEMA und mit 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  TEGDMA behandelt.

Mit dem Comet Assay werden DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie die Reparatur zuvor induzierter DNA-Schäden erfasst. Durch die Modifikation des Comet Assay mit dem Fpg-Protein werden zusätzlich oxidativ geschädigte Basen mit hoher Sensitivität nachgewiesen. Der Mikrokerntest weist manifeste DNA-Schäden auf DNA-Ebene in Form von Mikrokernen nach. Daneben lassen sich auch andere zelluläre Reaktionen wie Mitosen und Apoptosen sowie die Proliferationsrate der Zellen bestimmen. Der Chromosomenaberrationstest dient zum Nachweis von Veränderungen in der Struktur und/oder in der Anzahl von Chromosomen eines Genoms. Mit dem Schwesterchromatidaustauschtest werden ebenfalls Chromosomenmutationen nachgewiesen. Durchflusszytometrische Methoden werden zum Nachweis von Apoptosen und zur Zellzyklusanalyse eingesetzt.

Im herkömmlichen Comet Assay zeigen HEMA und TEGDMA keine signifikante Wirkung auf die DNA (OTM < 2). Es kann aber gezeigt werden, dass die Behandlung mit Fpg zu einer Verdoppelung des OTM führt. Bei 1 mM HEMA und 100  $\mu\text{M}$  TEGDMA wird dadurch das OTM auf > 2 angehoben. HEMA und TEGDMA wirken sich nicht auf die Mikrokernbildung aus, jedoch wird durch den Mikrokerntest ab 1 mM HEMA und 100  $\mu\text{M}$  TEGDMA eine



Einflussnahme auf die Proliferation gezeigt. Die Rate früher (< 10%) und später Apoptosen Apoptosen (< 4 %) bleibt im Durchschnitt weitgehend konstant. Eine Ausnahme sind 1 mM HEMA, die die frühen Apoptosen auf > 10 % anheben. Eine Einflussnahme auf den Zellzyklus, in Form einer Verzögerung, üben 1 mM HEMA in der S-Phase und 100 µM TEGDMA in der G1-Phase aus. In den Chromosomentests werden einerseits ein dosisabhängiger Anstieg der Aberrationen und andererseits vermehrte Chromatidaustausche beobachtet.

In dieser Arbeit wird die Verbindung von HEMA und TEGDMA zu oxidativen Stress im Comet Assay mit Fpg gezeigt. Da die tatsächlich in vivo erreichbaren Konzentrationen unter 100 µM liegen, ist zu schließen, dass HEMA und TEGDMA in diesem niedrigen Konzentrationsbereich keine nachteiligen Effekte ausüben, denn nur die hohen Konzentrationen (1 mM HEMA, 100 µM TEGDMA) sind in der Lage eine genotoxische Wirkung zu entfalten. Jedoch kann das Auslösen von Mutationen mit dem Chromosomenaberrationstest und Schwesterchromatidaustauschtest bestätigt werden. Um das Schädigungsprofil dieser häufig eingesetzten Zahnwerkstoffe detaillierter beschreiben zu können, müssen Untersuchungen auf Chromatidebene intensiviert werden.

## 5.2 Ergebnisse Friedman-Test

In diesem Teil werden die Ergebnisse von den Friedman-Tests zu den einzelnen Methoden analog zum Ergebnisteil aufgeführt.

### 5.2.1 Friedman-Test Zellzahlen

**Tabelle 4:** Friedman-Test der Zellzahlen von mit **HEMA** behandelten Zellen. Das lokale  $\alpha$ -Niveau ( $p$ -Wert) ist grau hervorgehoben.

Lymphozyten/ $p$ -Wert	HEMA	Durchschnittlicher Rang	Summe der Ränge	Durchschnitt	Standard- abweichung
<b>Stimuliert Mikrokerntest</b> <b>p = 0,974</b>	NEG	2,60	26,00	100,00	-
	10 $\mu$ M	2,50	25,00	97,10	21,57
	100 $\mu$ M	2,35	23,50	95,50	22,59
	1 mM	2,55	25,50	98,20	25,66
<b>Stimuliert Zellzyklusanalyse</b> <b>p = 0,00001</b>	NEG	3,75	37,50	100,00	-
	10 $\mu$ M	3,05	30,50	97,50	3,81
	100 $\mu$ M	2,20	22,00	95,80	2,62
	1 mM	1,00	10,00	79,10	11,41
<b>unstimuliert</b> <b>p = 0,355</b>	NEG	3,00	30,00	100,00	-
	10 $\mu$ M	2,40	24,00	98,20	4,54
	100 $\mu$ M	2,00	20,00	97,70	2,83
	1 mM	2,60	26,00	99,80	4,94

**Tabelle 5:** Friedman-Test der Zellzahlen von mit **TEGDMA** behandelten Lymphozyten. Das lokale  $\alpha$ -Niveau ( $p$ -Wert) ist grau hervorgehoben.

Lymphozyten/ $p$ -Wert	TEGDMA	Durchschnittlicher Rang	Summe der Ränge	Durchschnitt	Standard- abweichung
<b>Stimuliert Mikrokerntest</b> <b>p = 0,206</b>	NEG	3,20	32,00	100,00	-
	1 $\mu$ M	2,20	22,00	96,00	7,79
	10 $\mu$ M	2,10	21,00	94,10	5,97
	100 $\mu$ M	2,50	25,00	96,70	5,85
<b>Stimuliert Zellzyklusanalyse</b> <b>p = 0,00009</b>	NEG	3,35	33,50	100,00	-
	1 $\mu$ M	3,15	31,50	99,70	4,95
	10 $\mu$ M	2,50	25,00	96,00	4,78
	100 $\mu$ M	1,00	10,00	80,30	14,83
<b>unstimuliert</b> <b>p = 0,458</b>	NEG	2,90	29,00	100,00	-
	1 $\mu$ M	2,00	20,00	98,20	4,24
	10 $\mu$ M	2,60	26,00	99,50	4,38
	100 $\mu$ M	2,50	25,00	98,60	4,30

## 5.2.2 Friedman-Test Vitalitäten

**Tabelle 6:** Friedman-Test der Vitalitäten von mit **HEMA** behandelten Lymphozyten. Das lokale  $\alpha$ -Niveau (p-Wert) ist grau hervorgehoben.

Lymphozyten/ p-Wert	HEMA	Durchschnittlicher Rang	Summe der Ränge	Durchschnitt	Standard- abweichung
<b>Stimuliert Mikrokerntest</b>	NEG	2,20	22,00	100,00	-
	10 $\mu$ M	2,80	28,00	100,80	4,16
	100 $\mu$ M	2,60	26,00	99,50	3,34
	1 mM	2,40	24,00	99,10	3,25
<b>p = 0,655</b>					
<b>Stimuliert Zellzyklusanalyse</b>	NEG	3,00	30,00	100,00	-
	10 $\mu$ M	3,55	35,50	100,50	0,85
	100 $\mu$ M	2,45	24,50	99,60	0,52
	1 mM	1,00	10,00	92,90	3,35
<b>p = 0,00001</b>					
<b>unstimuliert</b>	NEG	3,30	33,00	100,00	-
	10 $\mu$ M	3,30	33,00	99,90	3,11
	100 $\mu$ M	2,20	22,00	96,70	5,58
	1 mM	1,20	12,00	93,10	3,73
<b>p = 0,00019</b>					

**Tabelle 7:** Friedman-Test der Vitalitäten von mit **TEGDMA** behandelten Lymphozyten. Das lokale  $\alpha$ -Niveau (p-Wert) ist grau hervorgehoben.

Lymphozyten/ p-Wert	TEGDMA	Durchschnittlicher Rang	Summe der Ränge	Durchschnitt	Standard- abweichung
<b>Stimuliert Mikrokerntest</b>	NEG	2,60	26,00	100,00	-
	10 $\mu$ M	2,50	25,00	99,80	2,30
	100 $\mu$ M	2,55	25,50	99,70	2,67
	1 mM	2,35	23,50	99,20	2,10
<b>p = 0,967</b>					
<b>Stimuliert Zellzyklusanalyse</b>	NEG	3,30	33,00	100,00	-
	10 $\mu$ M	3,00	30,00	99,30	1,83
	100 $\mu$ M	2,70	27,00	99,20	2,30
	1 mM	1,00	10,00	91,80	8,50
<b>p = 0,00015</b>					
<b>unstimuliert</b>	NEG	3,05	30,50	100,00	-
	10 $\mu$ M	2,85	28,50	99,60	2,88
	100 $\mu$ M	2,65	26,50	94,30	17,81
	1 mM	1,45	14,50	95,40	4,38
<b>p = 0,017</b>					

## 5.2.3 Friedman-Test Comet Assay mit Fpg

**Tabelle 8:** Friedman-Test Comet Assay mit Fpg von mit **HEMA** behandelten Lymphozyten. Das lokale  $\alpha$ -Niveau (p-Wert) ist grau hervorgehoben. Die +Fpg-Werte sind dunkelgrau hervorgehoben.

p-Wert	HEMA	Durchschnittlicher Rang	Summe der Ränge	Durchschnitt	Standardabweichung
OTM	NEG	2,60	26,00	0,45	0,25
	+Fpg	1,95	19,50	0,96	0,67
p = 0,002	10 $\mu$ M	1,40	14,00	0,37	0,19
	+Fpg	2,20	22,00	0,86	0,30
p = 0,003	100 $\mu$ M	2,40	24,00	0,47	0,23
	+Fpg	2,05	20,50	0,90	0,40
(+Fpg)	1 mM	3,60	36,00	1,50	0,80
	+Fpg	3,80	38,00	3,06	1,13
Head DNA	NEG	2,70	27,00	98,40	0,72
	+Fpg	3,10	31,00	96,98	1,59
p = 0,004	10 $\mu$ M	3,50	35,00	98,64	0,54
	+Fpg	2,70	27,00	97,17	0,86
p = 0,0003	100 $\mu$ M	2,40	24,00	98,35	0,70
	+Fpg	3,20	32,00	97,11	1,03
(+Fpg)	1 mM	1,40	14,00	95,94	1,73
	+Fpg	1,00	10,00	92,49	2,23
Tail DNA	NEG	2,30	23,00	1,60	0,72
	+Fpg	1,90	19,00	3,02	1,59
p = 0,004	10 $\mu$ M	1,50	15,00	1,36	0,54
	+Fpg	2,30	23,00	2,83	0,86
p = 0,0003	100 $\mu$ M	2,60	26,00	1,65	0,70
	+Fpg	1,80	18,00	2,89	1,03
(+Fpg)	1 mM	3,60	36,00	4,06	1,73
	+Fpg	4,00	40,00	7,51	2,23
Tail Length	NEG	2,80	28,00	41,63	8,79
	+Fpg	2,30	23,00	52,87	10,33
p = 0,005	10 $\mu$ M	1,35	13,50	39,60	8,40
	+Fpg	2,10	21,00	51,03	6,98
p = 0,0008	100 $\mu$ M	2,50	25,00	41,87	9,33
	+Fpg	1,70	17,00	51,18	7,30
(+Fpg)	1 mM	3,35	33,50	52,36	8,20
	+Fpg	3,90	39,00	68,47	8,54

**Tabelle 9:** Friedman-Test Comet Assay mit Fpg von mit **TEGDMA** behandelten Lymphozyten. Das lokale  $\alpha$ -Niveau (p-Wert) ist grau hervorgehoben. Die +Fpg-Werte sind dunkelgrau hervorgehoben.

p-Wert	TEGDMA	Durchschnittlicher Rang	Summe der Ränge	Durchschnitt	Standardabweichung
OTM	NEG	1,80	18,00	0,47	0,26
	+Fpg	1,90	19,00	1,08	0,44
p = 0,0007	1 $\mu$ M	1,75	17,50	0,45	0,24
	+Fpg	2,10	21,00	1,18	0,59
p = 0,003 (+Fpg)	10 $\mu$ M	2,65	26,50	0,49	0,24
	+Fpg	2,35	23,50	1,53	1,33
	100 $\mu$ M	3,80	38,00	1,16	0,74
	+Fpg	3,65	36,50	2,42	1,23
Head DNA	NEG	3,30	33,00	98,63	0,64
	+Fpg	3,20	32,00	96,66	1,28
p = 0,0007	1 $\mu$ M	3,00	30,00	98,61	0,58
	+Fpg	2,90	29,00	96,74	1,29
p = 0,003 (+Fpg)	10 $\mu$ M	2,60	26,00	98,51	0,62
	+Fpg	2,70	27,00	96,11	2,92
	100 $\mu$ M	1,10	11,00	96,62	1,60
	+Fpg	1,20	12,00	93,14	3,25
Tail DNA	NEG	1,70	17,00	1,37	0,64
	+Fpg	1,80	18,00	3,34	1,28
p = 0,0007	1 $\mu$ M	2,00	20,00	1,39	0,58
	+Fpg	2,10	21,00	3,26	1,29
p = 0,003 (+Fpg)	10 $\mu$ M	2,40	24,00	1,49	0,62
	+Fpg	2,30	23,00	3,89	2,92
	100 $\mu$ M	3,90	39,00	3,38	1,60
	+Fpg	3,80	38,00	6,86	3,25
Tail Length	NEG	2,40	24,00	40,24	8,40
	+Fpg	1,80	18,00	54,30	9,89
p = 0,005	1 $\mu$ M	1,70	17,00	39,53	6,90
	+Fpg	2,00	20,00	54,16	8,82
p = 0,0009 (+Fpg)	10 $\mu$ M	2,20	22,00	40,78	8,33
	+Fpg	2,30	23,00	56,75	12,56
	100 $\mu$ M	3,70	37,00	48,85	7,89
	+Fpg	3,90	39,00	66,23	10,75

## 5.2.4 Friedman-Test Mikrokerntest

**Tabelle 10:** Friedman-Test Mikrokerntest von mit **HEMA** behandelten Lymphozyten. Das lokale  $\alpha$ -Niveau (p-Wert) ist grau hervorgehoben.

p-Wert	HEMA	Durchschnittlicher Rang	Summe der Ränge	Durchschnitt	Standardabweichung
<b>p = 0,268</b>	NEG	2,70	27,00	541,20	26,31
	10 $\mu$ M	2,50	25,00	530,90	36,22
	100 $\mu$ M	1,60	16,00	524,20	46,73
	1 mM	3,20	32,00	575,10	64,71
<b>p = 0,0004</b>	NEG	3,00	30,00	192,00	84,22
	10 $\mu$ M	3,10	31,00	214,80	86,18
	100 $\mu$ M	2,90	29,00	203,70	77,07
	1 mM	1,00	10,00	69,80	33,87
<b>p = 0,001</b>	NEG	2,45	24,50	34,30	8,35
	10 $\mu$ M	3,15	31,50	37,90	9,45
	100 $\mu$ M	3,20	32,00	39,30	9,80
	1 mM	1,20	12,00	25,00	5,12
<b>p = 0,239</b>	NEG	3,10	31,00	8,70	3,30
	10 $\mu$ M	2,00	20,00	6,60	2,76
	100 $\mu$ M	2,30	23,00	7,90	2,92
	1 mM	2,60	26,00	8,90	4,98
<b>p = 0,591</b>	NEG	2,15	21,50	11,40	3,20
	10 $\mu$ M	2,90	29,00	13,10	4,12
	100 $\mu$ M	2,60	26,00	13,80	7,50
	1 mM	2,35	23,50	12	3,23

**Tabelle 11:** Friedman-Test Mikrokerntest von mit **TEGDMA** behandelten Lymphozyten. Das lokale  $\alpha$ -Niveau (p-Wert) ist grau hervorgehoben.

p- Wert	TEGDMA	Durchschnittlicher Rang	Summe der Ränge	Durchschnitt	Standardabweichung	
<b>p = 0,112</b>	Doppelkernige	NEG	2,00	20,00	517,60	49,95
		1 $\mu\text{M}$	2,00	20,00	519,60	44,10
		10 $\mu\text{M}$	3,00	30,00	535,20	37,31
		100 $\mu\text{M}$	3,00	30,00	504,80	142,86
<b>p = 0,0007</b>	Mehrkernige	NEG	3,30	33,00	234,60	105,23
		1 $\mu\text{M}$	2,65	26,50	227,10	101,95
		10 $\mu\text{M}$	2,95	29,50	219,40	84,75
		100 $\mu\text{M}$	1,10	11,00	117,10	87,78
<b>p = 0,291</b>	Mitosen	NEG	2,20	22,00	33,30	8,07
		1 $\mu\text{M}$	3,15	31,50	36,90	11,14
		10 $\mu\text{M}$	2,45	24,50	32,40	7,06
		100 $\mu\text{M}$	2,20	22,00	31,60	11,46
<b>p = 0,938</b>	Apoptosen	NEG	2,65	26,50	9,10	8,70
		1 $\mu\text{M}$	2,30	23,00	7,70	4,03
		10 $\mu\text{M}$	2,55	25,50	7,60	3,31
		100 $\mu\text{M}$	2,50	25,00	8,50	5,87
<b>p = 0,297</b>	Mikrokerne	NEG	1,95	19,50	11,80	3,33
		1 $\mu\text{M}$	2,35	23,50	13,60	6,13
		10 $\mu\text{M}$	2,95	29,50	15,30	4,62
		100 $\mu\text{M}$	2,75	27,50	14,40	4,53

## 5.2.5 Friedman-Test Chromosomenaberrationstest

**Tabelle 12:** Friedman-Test Chromosomenaberrationen von mit **HEMA** behandelten Lymphozyten. Das lokale  $\alpha$ -Niveau (p-Wert) ist grau hervorgehoben.

p- Wert	HEMA	Durchschnittlicher Rang	Summe der Ränge	Durchschnitt	Standardabweichung	
<b>p = 0,003</b>	CAAs gesamt	NEG	1,00	5,00	0,00	-
		10 $\mu$ M	2,00	10,00	10,20	2,28
		100 $\mu$ M	3,20	16,00	19,20	4,87
		1 mM	3,80	19,00	22,20	2,49
<b>p = 0,034</b>	Chromatidtyp	NEG	1,10	5,50	0,00	-
		10 $\mu$ M	2,80	14,00	3,60	1,67
		100 $\mu$ M	3,00	15,00	4,40	3,29
		1 mM	3,10	15,50	5,00	3,08
<b>p = 0,003</b>	Chromosomentyp	NEG	1,00	5,00	0,00	-
		10 $\mu$ M	2,00	10,00	3,80	1,79
		100 $\mu$ M	3,30	16,50	8,00	2,12
		1 mM	3,70	18,50	9,40	2,70
<b>p = 0,004</b>	numerische CAAs	NEG	1,00	5,00	0,00	-
		10 $\mu$ M	2,20	11,00	2,80	3,03
		100 $\mu$ M	3,20	16,00	6,80	1,10
		1 mM	3,60	18,00	7,80	0,45

**Tabelle13:** Friedman-Test Chromosomenaberrationen von mit **TEGDMA** behandelten Lymphozyten. Das lokale  $\alpha$ -Niveau (p-Wert) ist grau hervorgehoben.

p-Wert	TEGDMA	Durchschnittlicher Rang	Summe der Ränge	Durchschnitt	Standardabweichung	
<b>p = 0,002</b>	CAAs gesamt	NEG	1,00	5,00	0,80	0,84
		1 $\mu$ M	2,00	10,00	10,00	2,92
		10 $\mu$ M	3,00	15,00	14,20	4,44
		100 $\mu$ M	4,00	20,00	17,40	5,86
<b>p = 0,011</b>	Chromatidtyp	NEG	1,00	5,00	0,00	-
		1 $\mu$ M	2,60	13,00	3,40	1,14
		10 $\mu$ M	2,80	14,00	4,00	1,58
		100 $\mu$ M	3,60	18,00	5,00	2,24
<b>p = 0,003</b>	Chromosomentyp	NEG	1,20	6,00	0,20	0,45
		1 $\mu$ M	1,80	9,00	2,40	2,30
		10 $\mu$ M	3,20	16,00	5,40	2,88
		100 $\mu$ M	3,80	19,00	7,20	3,90
<b>p = 0,003</b>	numerische CAAs	NEG	1,00	5,00	0,80	0,84
		1 $\mu$ M	3,10	15,50	4,40	1,14
		10 $\mu$ M	2,60	13,00	4,60	2,61
		100 $\mu$ M	3,30	16,50	5,60	2,61



## 5.2.6 Friedman-Test Schwesterchromatidaustauschtest

**Tabelle 14:** Friedman-Test Schwesterchromatidaustausche von mit **HEMA** behandelten Lymphozyten. Das lokale  $\alpha$ -Niveau (p-Wert) ist grau hervorgehoben.

p-Wert	HEMA	Durchschnittlicher Rang	Summe der Ränge	Durchschnitt	Standardabweichung
<b>p = 0,003</b>	NEG	1,00	5,00	81,40	30,31
	10 $\mu$ M	2,10	10,50	140,80	35,03
	100 $\mu$ M	3,10	15,50	185,80	39,95
	1 mM	3,80	19,00	220,00	47,09

**Tabelle 15:** Friedman-Test Schwesterchromatidaustausche von mit **TEGDMA** behandelten Lymphozyten. Das lokale  $\alpha$ -Niveau (p-Wert) ist grau hervorgehoben.

p-Wert	TEGDMA	Durchschnittlicher Rang	Summe der Ränge	Durchschnitt	Standardabweichung
<b>p = 0,002</b>	NEG	1,00	5,00	121,20	29,13
	1 $\mu$ M	2,00	10,00	204,80	40,15
	10 $\mu$ M	3,00	15,00	245,80	43,69
	100 $\mu$ M	4,00	20,00	273,00	35,21

## 5.2.7 Friedman-Test Apoptosemessung

**Tabelle 16:** Friedman-Test Apoptosemessung von mit **HEMA** behandelten Lymphozyten. Das lokale  $\alpha$ -Niveau (p-Wert) ist grau hervorgehoben.

p-Wert	HEMA	Durchschnittlicher Rang	Summe der Ränge	Durchschnitt	Standardabweichung	
<b>p = 0,190</b>	Vitale Zellen	NEG	2,70	27,00	90,68	3,60
		10 $\mu$ M	2,65	26,50	90,54	3,56
		100 $\mu$ M	2,90	29,00	90,58	3,67
		1 mM	1,75	17,50	83,80	15,45
<b>p = 0,160</b>	Frühe Apoptosen	NEG	2,10	21,00	7,92	3,53
		10 $\mu$ M	2,50	25,00	8,13	3,37
		100 $\mu$ M	2,15	21,50	8,05	3,33
		1 mM	3,25	32,50	12,52	11,19
<b>p = 0,191</b>	Späte Apoptosen/ Nekrosen	NEG	2,70	27,00	1,31	0,46
		10 $\mu$ M	2,10	21,00	1,25	0,40
		100 $\mu$ M	2,10	21,00	1,28	0,45
		1 mM	3,10	31,00	3,53	4,45

**Tabelle 17:** Friedman-Test Apoptosemessung von mit **TEGDMA** behandelten Lymphozyten. Das lokale  $\alpha$ -Niveau (p-Wert) ist grau hervorgehoben.

p-Wert	TEGDMA	Durchschnittlicher Rang	Summe der Ränge	Durchschnitt	Standardabweichung	
<b>p = 0,017</b>	Vitale Zellen	NEG	2,85	28,50	90,91	3,66
		1 $\mu$ M	2,70	27,00	90,67	3,88
		10 $\mu$ M	3,05	30,50	90,71	4,23
		100 $\mu$ M	1,40	14,00	88,59	6,03
<b>p = 0,146</b>	Frühe Apoptosen	NEG	2,30	23,00	7,76	3,40
		1 $\mu$ M	2,30	23,00	7,95	3,58
		10 $\mu$ M	2,10	21,00	7,77	3,54
		100 $\mu$ M	3,30	33,00	8,74	3,92
<b>p = 0,010</b>	Späte Apoptosen/ Nekrosen	NEG	1,80	18,00	1,21	0,43
		1 $\mu$ M	2,50	25,00	1,30	0,47
		10 $\mu$ M	2,15	21,50	1,41	0,84
		100 $\mu$ M	3,55	35,50	2,39	2,01

## 5.2.8 Friedman-Test Zellzyklusanalyse

**Tabelle 18:** Friedman-Test Zellzyklusanalyse von mit **HEMA** behandelten Lymphozyten. Das lokale  $\alpha$ -Niveau (p-Wert) ist grau hervorgehoben.

p-Wert	HEMA	Durchschnittlicher Rang	Summe der Ränge	Durchschnitt	Standardabweichung
<b>p = 0,392</b>	NEG	2,50	25,00	58,22	4,85
	10 $\mu$ M	2,00	20,00	58,03	6,35
	100 $\mu$ M	3,00	30,00	59,20	7,30
	1 mM	2,50	25,00	57,94	7,06
<b>p = 0,253</b>	NEG	2,20	22,00	36,21	3,89
	10 $\mu$ M	2,80	28,00	36,71	5,11
	100 $\mu$ M	2,00	20,00	36,03	6,52
	1 mM	3,00	30,00	38,59	7,07
<b>p = 0,021</b>	NEG	3,00	30,00	5,43	2,06
	10 $\mu$ M	2,30	23,00	5,02	2,02
	100 $\mu$ M	2,30	23,00	4,76	2,47
	1 mM	2,40	24,00	4,53	3,48

**Tabelle 19:** Friedman-Test Zellzyklusanalyse von mit **TEGDMA** behandelten Lymphozyten. Das lokale  $\alpha$ -Niveau (p-Wert) ist grau hervorgehoben.

p-Wert	TEGDMA	Durchschnittlicher Rang	Summe der Ränge	Durchschnitt	Standardabweichung
<b>p = 0,086</b>	NEG	1,70	17,00	55,21	4,94
	1 $\mu$ M	2,40	24,00	56,90	7,43
	10 $\mu$ M	2,80	28,00	57,09	4,88
	100 $\mu$ M	3,10	31,00	62,00	13,17
<b>p = 0,029</b>	NEG	3,20	32,00	39,36	4,37
	1 $\mu$ M	2,90	29,00	38,07	6,72
	10 $\mu$ M	2,30	23,00	38,15	5,52
	100 $\mu$ M	1,60	16,00	33,47	11,08
<b>p = 0,564</b>	NEG	3,00	30,00	5,43	2,06
	1 $\mu$ M	2,30	23,00	5,02	2,02
	10 $\mu$ M	2,30	23,00	4,76	2,47
	100 $\mu$ M	2,40	24,00	4,53	3,48

## 5.3 Ergebnisse Wilcoxon-Test

### 5.3.1 Wilcoxon-Test Zellzahlen

**Tabelle 20:** Wilcoxon-Test, p-Werte für den Vergleich der Zellzahl-Mediane von mit **HEMA** behandelten Lymphozyten bei jedem Konzentrationsanstieg. Das lokale  $\alpha$ -Niveau wurde bei  $< 0,050$  definiert.  $\alpha$ -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hervorgehoben.

Lymphozyten	NEG & 10 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$ & 100 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$ & 1 mM	NEG & 100 $\mu\text{M}$
<b>Stimuliert Mikrokerntest</b>	p = 0,878	p = 0,646	p = 0,441	-
<b>Stimuliert Zellzyklusanalyse</b>	p = 0,083	p = 0,021	p = 0,005	-
<b>unstimuliert</b>	p = 0,241	p = 0,624	p = 0,169	p = 0,021

**Tabelle 21:** Wilcoxon-Test, p-Werte für den Vergleich der Zellzahl-Mediane von **TEGDMA** behandelten Lymphozyten bei jedem Konzentrationsanstieg. Das lokale  $\alpha$ -Niveau wurde bei  $< 0,050$  definiert.  $\alpha$ -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hervorgehoben.

Lymphozyten	NEG & 1 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$ & 10 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$ & 100 $\mu\text{M}$
<b>Stimuliert Mikrokerntest</b>	p = 0,110	p = 0,683	p = 0,126
<b>Stimuliert Zellzyklusanalyse</b>	p = 0,799	p = 0,035	p = 0,005
<b>unstimuliert</b>	p = 0,139	p = 0,155	p = 0,953

### 5.3.2 Wilcoxon-Test Vitalitäten

**Tabelle 22:** Wilcoxon-Test, p-Werte für den Vergleich der Vitalitäten-Mediane von mit **HEMA** behandelten Lymphozyten bei jedem Konzentrationsanstieg. Das lokale  $\alpha$ -Niveau wurde bei  $< 0,050$  definiert.  $\alpha$ -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hervorgehoben

Lymphozyten	NEG & 10 $\mu$ M	10 $\mu$ M & 100 $\mu$ M	100 $\mu$ M & 1 mM	NEG & 1 mM
<b>Stimuliert Mikrokerntest</b>	p = 0,237	p = 0,272	p = 0,345	-
<b>Stimuliert Zellzyklusanalyse</b>	p = 0,116	p = 0,018	p = 0,005	-
<b>unstimuliert</b>	p = 0,866	p = 0,058	p = 0,161	p = 0,005

**Tabelle 23:** Wilcoxon-Test, p-Werte für den Vergleich der Vitalitäten-Mediane von mit **TEGDMA** behandelten Lymphozyten bei jedem Konzentrationsanstieg. Das lokale  $\alpha$ -Niveau wurde bei  $< 0,050$  definiert.  $\alpha$ -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hervorgehoben

Lymphozyten	NEG & 1 $\mu$ M	1 $\mu$ M & 10 $\mu$ M	10 $\mu$ M & 100 $\mu$ M	NEG & 100 $\mu$ M
<b>Stimuliert Mikrokerntest</b>	p = 0,779	p = 0,893	p = 0,515	-
<b>Stimuliert Zellzyklusanalyse</b>	p = 0,249	p = 0,107	p = 0,005	-
<b>unstimuliert</b>	p = 0,735	p = 0,445	p = 0,161	p = 0,021

### 5.3.3 Wilcoxon-Test Comet Assay mit Fpg

**Tabelle 24:** Wilcoxon-Test, p-Werte für den Vergleich der Mediane von mit **HEMA** behandelten Lymphozyten. Das lokale  $\alpha$ -Niveau wurde bei  $< 0,050$  definiert.  $\alpha$ -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hervorgehoben.

	NEG & NEG+Fpg	10 $\mu$ M & 10 $\mu$ M+Fpg	100 $\mu$ M & 100 $\mu$ M+Fpg	1 mM & 1 mM+Fpg	100 $\mu$ M & 1 mM	100 $\mu$ M+Fpg & 1 mM+Fpg
<b>OTM</b>	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,013	p = 0,007
<b>Head DNA</b>	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,007	p = 0,017	p = 0,005
<b>Tail DNA</b>	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,007	p = 0,017	p = 0,005
<b>Tail Length</b>	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,007	p = 0,028	p = 0,005

**Tabelle 25:** Wilcoxon-Test, p-Werte für den Vergleich der Mediane von mit **TEGDMA** behandelten Lymphozyten. Das lokale  $\alpha$ -Niveau wurde bei  $< 0,050$  definiert.  $\alpha$ -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hervorgehoben.

	NEG & NEG+Fpg	1 $\mu$ M & 1 $\mu$ M+Fpg	10 $\mu$ M & 10 $\mu$ M+Fpg	100 $\mu$ M & 100 $\mu$ M+Fpg	10 $\mu$ M & 100 $\mu$ M	10 $\mu$ M+Fpg & 100 $\mu$ M+Fpg
<b>OTM</b>	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,013	p = 0,011
<b>Head DNA</b>	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,017
<b>Tail DNA</b>	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,017
<b>Tail Length</b>	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,009	p = 0,017

### 5.3.4 Wilcoxon-Test Mikrokerntest

**Tabelle 26:** Wilcoxon-Test, p-Werte für den Vergleich der Mediane von mit **HEMA** behandelten Lymphozyten. Das lokale  $\alpha$ -Niveau wurde bei  $< 0,050$  definiert.  $\alpha$ -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hervorgehoben.

	NEG & 10 $\mu$ M	10 $\mu$ M & 100 $\mu$ M	100 $\mu$ M & 1 mM
<b>Doppelkernige</b>	p = 0,386	p = 0,415	p = 0,013
<b>Mehrkernige</b>	p = 0,508	p = 0,646	p = 0,005
<b>Mitosen</b>	p = 0,236	p = 0,760	p = 0,005
<b>Apoptosen</b>	p = 0,176	p = 0,221	p = 0,541
<b>Mikrokerne</b>	p = 0,308	p = 0,959	p = 0,508

**Tabelle 27:** Wilcoxon-Test, p-Werte für den Vergleich der Mediane von mit **TEGDMA** behandelten Lymphozyten. Das lokale  $\alpha$ -Niveau wurde bei  $< 0,050$  definiert.  $\alpha$ -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hervorgehoben.

	NEG & 1 $\mu$ M	1 $\mu$ M & 10 $\mu$ M	10 $\mu$ M & 100 $\mu$ M
<b>Doppelkernige</b>	p = 0,919	p = 0,059	p = 0,799
<b>Mehrkernige</b>	p = 0,241	p = 0,594	p = 0,007
<b>Mitosen</b>	p = 0,041	p = 0,241	p = 0,799
<b>Apoptosen</b>	p = 0,834	p = 0,767	p = 0,646
<b>Mikrokerne</b>	p = 0,044	p = 0,401	p = 0,541

### 5.3.5 Wilcoxon-Test Chromosomenaberrationstest

**Tabelle 28:** Wilcoxon-Test, p-Werte für den Vergleich der Mediane von mit **HEMA** behandelten Lymphozyten. Das lokale  $\alpha$ -Niveau wurde bei  $< 0,050$  definiert.  $\alpha$ -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hervorgehoben.

	NEG & 10 $\mu$ M	10 $\mu$ M & 100 $\mu$ M	100 $\mu$ M & 1 mM
<b>CAs gesamt</b>	p = 0,043	p = 0,043	p = 0,080
<b>Chromatidtyp</b>	p = 0,043	p = 0,686	p = 0,465
<b>Chromosomentyp</b>	p = 0,043	p = 0,043	p = 0,465
<b>numerische CAs</b>	p = 0,043	p = 0,068	p = 0,144

**Tabelle 29:** Wilcoxon-Test, p-Werte für den Vergleich der Mediane von mit **TEGDMA** behandelten Lymphozyten. Das lokale  $\alpha$ -Niveau wurde bei  $< 0,050$  definiert.  $\alpha$ -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hervorgehoben.

	NEG & 1 $\mu$ M	1 $\mu$ M & 10 $\mu$ M	10 $\mu$ M & 100 $\mu$ M
<b>CAs gesamt</b>	p = 0,043	p = 0,043	p = 0,043
<b>Chromatidtyp</b>	p = 0,043	p = 0,593	p = 0,281
<b>Chromosomentyp</b>	p = 0,109	p = 0,043	p = 0,109
<b>numerische CAs</b>	p = 0,043	p = 0,715	-

### 5.3.6 Wilcoxon-Test Schwesterchromatidaustauschtest

**Tabelle 30:** Wilcoxon-Test, p-Werte für den Vergleich der Mediane von mit **HEMA** behandelten Lymphozyten. Das lokale  $\alpha$ -Niveau wurde bei  $< 0,050$  definiert.  $\alpha$ -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hervorgehoben.

NEG & 10 $\mu$ M	10 $\mu$ M & 100 $\mu$ M	100 $\mu$ M & 1 mM
p = 0,043	p = 0,068	p = 0,080

**Tabelle 31:** Wilcoxon-Test, p-Werte für den Vergleich der Mediane von mit **TEGDMA** behandelten Lymphozyten. Das lokale  $\alpha$ -Niveau wurde bei  $< 0,050$  definiert.  $\alpha$ -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hervorgehoben.

NEG & 1 $\mu$ M	1 $\mu$ M & 10 $\mu$ M	10 $\mu$ M & 100 $\mu$ M
p = 0,043	p = 0,043	p = 0,043



### 5.3.7 Wilcoxon-Test Apoptosemessung

**Tabelle 32:** Wilcoxon-Test, p-Werte für den Vergleich der Mediane von mit **HEMA** behandelten Lymphozyten. Das lokale  $\alpha$ -Niveau wurde bei  $< 0,050$  definiert.  $\alpha$ -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hervorgehoben.

	NEG & 10 $\mu$ M	10 $\mu$ M & 100 $\mu$ M	100 $\mu$ M & 1 mM
Vitale Zellen	p = 1,000	p = 0,760	p = 0,032
Frühe Apoptosen	p = 0,541	p = 0,678	p = 0,028
Späte Apoptosen/Nekrosen	p = 0,183	p = 0,767	p = 0,025

**Tabelle 33:** Wilcoxon-Test, p-Werte für den Vergleich der Mediane von mit **TEGDMA** behandelten Lymphozyten. Das lokale  $\alpha$ -Niveau wurde bei  $< 0,050$  definiert.  $\alpha$ -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hervorgehoben.

	NEG & 1 $\mu$ M	1 $\mu$ M & 10 $\mu$ M	10 $\mu$ M & 100 $\mu$ M
Vitale Zellen	p = 0,286	p = 0,813	p = 0,008
Frühe Apoptosen	p = 0,476	p = 0,646	p = 0,013
Späte Apoptosen/Nekrosen	p = 0,327	p = 0,889	p = 0,008

### 5.3.8 Wilcoxon-Test Zellzyklusanalyse

**Tabelle 34:** Wilcoxon-Test, p-Werte für den Vergleich der Mediane von mit **HEMA** behandelten Lymphozyten. Das lokale  $\alpha$ -Niveau wurde bei  $< 0,050$  definiert.  $\alpha$ -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hervorgehoben.

	NEG & 10 $\mu$ M	10 $\mu$ M & 100 $\mu$ M	100 $\mu$ M & 1 mM
<b>G1-Phase</b>	p = 0,386	p = 0,203	p = 0,721
<b>S-Phase</b>	p = 0,575	p = 0,508	p = 0,169
<b>G2-Phase</b>	p = 0,508	p = 0,139	p = 0,028

**Tabelle 35:** Wilcoxon-Test, p-Werte für den Vergleich der Mediane von mit **TEGDMA** behandelten Lymphozyten. Das lokale  $\alpha$ -Niveau wurde bei  $< 0,050$  definiert.  $\alpha$ -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hervorgehoben.

	NEG & 1 $\mu$ M	1 $\mu$ M & 10 $\mu$ M	10 $\mu$ M & 100 $\mu$ M	NEG & 10 $\mu$ M	NEG & 100 $\mu$ M
<b>G1-Phase</b>	p = 0,575	p = 0,575	p = 0,285	p = 0,007	p = 0,047
<b>S-Phase</b>	p = 0,575	p = 0,721	p = 0,074	-	p = 0,022
<b>G2-Phase</b>	p = 0,333	p = 0,878	p = 0,799	-	-

## 5.4 Verwendete Abkürzungen und chemische Formeln

Abb.	Abbildung
Aqua dest./bidest.	Einfach/zweifach destilliertes Wasser
APC	Aphidicolin
AS	Aminosäure
Bis-GMA	Bisphenol-A-Glycidyl-Methacrylat
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA/BSF	Bovine Serum Albumin
BTA	Biologisch Technischer Assistent
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
Ca	Calcium
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CAs	Chromosomenaberrationen
CASY	Cell Counter + Analyse System
cm/cm <sup>2</sup>	Zentimeter/Quadratzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CPT	Camptothecin
°C	Grad Celsius
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Einheit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGDMA	Ethylenglycoldimethacrylat
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
engl.	englisch
EtOH	Ethanol
Fpg	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
FSC	Front Scatter (Vorwärtsstreulicht)
g	Fallbeschleunigung/Gramm
GIZ	Glasionomerzement
GSH	Glutathion
HEMA	Hydroxyethylmethacrylat
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure

HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasser
Inc.	Incorporated
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LMP-Agarose	Low-Melting-Temperature-Agarose
Lsg.	Lösung
M	Molare Masse
mg	Milligramm
mHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
mm/mm <sup>2</sup>	Millimeter/Quadratmillimeter
mM	Millimol
MMC	Mitomycin
MMS	Methylmethansulfonat
N	Anzahl
Na	Natrium
NAC	N-Acetylcystein
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NEG	Negativkontrolle
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM/nMol	Nanomol
NMP-Agarose	Normal-Melting-Temperature-Agarose
OTM	Olive Tail Moment
p	Allgemeines Signifikanzniveau
PBMCs	Periphere Blut-Mononukleare Zellen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
Pen	Penicillin
PHA/PHA-L	Phytohaemagglutinin/Leucoagglutinin
PI	Propidiumiodid
POS	Positivkontrolle
PS	Phosphatidylserin
RNA	Ribonukleinsäure

ROS	Reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institut 1640
RT	Raumtemperatur
sec.	Sekunde
SCEs	Schwesterchromatidaustausche
SiO <sub>2</sub>	Siliciumoxid
SL	Stammlösung
sog.	so genannt
SSC	Lsg. aus Natriumcitrat und Natriumchlorid (sodium citrate, Sodium chloride) in destilliertem Wasser
SSC	Side Scatter (Seitwärtsstreulicht)
Strep	Streptomycin
Tab.	Tabelle
TEGDMA	Triethylenglycoldimethacrylat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u. a.	unter anderem
UDMA	Urethandimethacrylat
USA	United States of America
V	Volt
x	mal
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
α	Irrtumswahrscheinlichkeit

## 5.5 Literaturverzeichnis

- Akiyama T, Manabe A, Tani C, Takahashi Y, Itho K, Hisamitsu H: Guinea pig maximization test of tri-ethylene glycol mono-methacrylate. *Dent Mater* 2007; 26(3): 312-5.
- Andreasson H, Ortengren U, Barregard L, Karlsson S: Work-related skin and airway symptoms among Swedish dentists rarely cause sick leave or change of professional career. *Acta Odontol Scand* 2001; 59(5): 267-72.
- BD Biosciences: Einführung in die Durchflusszytometrie, Customer education. 2000; <http://genome.tugraz.at/GrundlBiomTechnik/FACS.pdf>.
- BD Biosciences: Life, Death and Cell Proliferation; A product guide to apoptosis, cell cycle and cytotoxicity. 2005.
- Blomgren J, Axell T, Sandahl O, Jontell M: Adverse reactions in the oral mucosa associated with anterior composite restorations. *J Oral Pathol Med* 1996; 25(6): 311-3.
- Bowen RL: Dental filling materials comprising vinyl silane treated fused silica and a binder consisting of the reaction product of bis phenol and glycidyl acrylate. US Patent 1962; 3(006): 112.
- Bowen RL: Silica-resin direct filling material and method of preparation. US Patent 1965; 3(194): 783
- Bowen RL: Compatibility of various materials with oral tissues I: The components in composite restorations. *J Dent Res* 1979; 58(5): 1493-1503.
- Chang HH, Guo MK, Kasten FH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, Wang RS, Jeng JH: Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA. *Biomaterials* 2005; 26(7): 745-53.
- Collins A, Dusinska M, Franklin M, Somorovska M, Petrovska H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslova K, Vaughan N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ Mol Mutagen* 1997; 30(2): 139-146.
- Collins AR, Dusinka M, Gedik CM, Stetina R: Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environmental Health Perspectives* 1996; 104(Supl 3): 465-469.
- Collins AR, Duthie SJ, Dobson VL: Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 1993; 14: 1733-1735.

- Collins AR: Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *Bioessays* 1999; 21(3): 238-46.
- Collins AR: The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 2004; 26(3): 249-61.
- Craig RG, Powers JM, Wataha JC: Materialien für direkte ästhetische Restaurationen; Zahnärztliche Werkstoffe. München, Urban & Fischer 2006; 63-83.
- de Souza Costa CA, Hebling J, Hanks CT: Current status of pulp capping with dentine adhesive systems: a review. *Dental Materials* 2000; 16: 188-197.
- Dennog C, Hartmann A, Frey G, Speit G: Detection of DNA damage after hyperbaric oxygen (HBO) therapy. *Mutagenesis* 1996; 11: 605-609.
- Domijan AM, Zieljezic D, Kopjar N, Peraica M: Standard and Fpg-modified comet assay in kidney cells of ochratoxin A- and fumonisin B1-treated rats. *Toxicology* 2006; 222(1-2): 53-59.
- Emmler J, Seiss M, Kreppel H, Reichl FX, Hickel R, Kehe K: Cytotoxicity of the dental composite component TEGDMA and selected metabolic by-products in human pulmonary cells. *Dent Mater* 2008; 24(12): 1670-5.
- Ernst CP, Willershausen B: Eine aktuelle Standortbestimmung zahnärztlicher Füllungskomposite. *Zahnärztl Mitt* 2003; 93(7): 30-40.
- Fenech M, Morley AA: Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 1985; 147(1-2): 29-36.
- Fenech M, Morley AA: Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutat Res* 1986; 161(2): 193-8.
- Fenech M: The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 2000; 455(1-2): 81-95.
- Fenech M: In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. *Methods Mol Med* 2005; 111: 3-32.
- Fenech M: The micronucleus assay determination of chromosomal level DNA damage. *Methods in Molecular Biology* 2007; 410: 185-216.
- Fenech M: The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environ Health Perspect* 1993; 101(Suppl 3): 101-107.
- Ferracane JL, Condon JR: Rate of elution of leachable components from composite. *Dent Mater* 1990; 6(4): 282-7.

- Ferracane JL: Current trends in dental composites. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995; 6(4): 302-318.
- Fjellstedt TA, Allen RH, Duncan BK, Jakoby WB: Enzymatic conjugation of epoxides with glutathione. *The Journal of Biological Chemistry* 1973; 248(10): 3702-3707.
- Franz A, König F, Lucas T, Watts DC, Schedle A: Cytotoxic effects of dental bonding substances as a function of degree of conversion. *Dent Mater* 2008; doi:10.1016/j.dental.2008.07.003.
- Freund M, Munksgaard EC: Enzymatic degradation of BisGMA/TEGDMA-polymers causing decreased microhardness and greater wear in vitro. *Scand J Dent Res* 1990; 98(4): 351-5.
- Gerzina TM, Hume WR: TEGDMA release from composite resin: the influence of physical variables. *J Dent Res* 1995b; 74: 749.
- Gerzina TM, Hume WR: Diffusion of monomers from bonding resin-composite combinations through dentine in vitro. *J Dent* 1996a; 24(1-2): 125-8.
- Gerzina TM, Hume WR: Effect of dentine on release of TEGDMA from resin composite in vitro. *J Oral Rehabil* 1994; 21(4): 463-8.
- Gerzina TM, Hume WR: Effect of hydrostatic pressure on the diffusion of monomers through dentin in vitro. *J Dent Res* 1995a; 74(1): 369-373.
- Gerzina TM, Picker K, Hood A, Hume W: Toxicity and quantitative analysis of TEGDMA and composite resin eluates. *Journal of Dental Research* 1991; 70(suppl): 424.
- Geurtsen W: Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11(3): 333-355.
- Gielazyn ML, Ringwood AH, Piegorsch WW, Stancyk SE: Detection of oxidative DNA damage in isolated marine bivalve hemocytes using the comet assay and formamidopyrimidine glycosylase (Fpg). *Mutat Res* 2003; 542(1-2): 15-22.
- Glauner B: Stromausschlussverfahren, Standardisierung der Vitalitätsbestimmung; BIOSpektrum. Schärfe System GmbH, Reutlingen 2006; 4.
- Graf K: Zahnärztliche Werkstoffe unter umweltmedizinischen Aspekten, Kunststoffe und Haftvermittler (Teil 1). *Co`Med* 2004; 08/04: 1-3.
- greiner bio-one: Leucosep<sup>R</sup>; Gebrauchsanweisung 2007; 1: Laucosep-Anleitung\_D.pdf.
- Hallström U: Adverse reaction to a fissure sealant: report of case. *ASDC J Dent Child* 1993; 60(2): 143-6.



- Hamid A, Hume WR: TEGDMA diffusion from resin pit and fissure sealants in vitro. *J Dent Res* 1996; 75: 289.
- Hamid A, Hume WR: The effect of dentine thickness on diffusion of resin monomers in vitro. *J Oral Rehabil* 1997, 24(1): 20-5.
- Hellwig E, Klimek J, Attin T: Restaurationen mit plastischen Füllungsmaterialien; Einführung in die Zahnerhaltung. München, Urban & Fischer 2007; 155-228.
- Hume WR, Gerzina TM: Bioavailability of components of resin-based materials which are applied to teeth. *Crit Rev Oral Biol Med* 1996b; 7(2): 172-179.
- Innovatis: CASY<sup>R</sup> Model DT; The electronic cell counter for fast determination of cell count and viability. CASY\_DT\_910020601.pdf.
- Issa Y, Duxbury AJ, Macfarlane TV, Brunton PA: Oral lichenoid lesions related to dental restorative materials. *Br Dent J* 2005; 198(6): 361-6.
- Issa Y, Watts DC, Brunton PA, Waters CM, Duxbury AJ: Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. *Dental Materials* 2004; 20: 12-20.
- Jackson AL, Loeb LA: The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat Res* 2001; 477(1-2): 7-21.
- Janke V, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Leyhausen G, Geurtsen W: TEGDMA causes apoptosis in primary human gingival fibroblasts. *J Dent Res* 2003; 82(10): 814-818.
- Kampfing K: Nachweis einer Mismatch-Reparatur-Defizienz in L5178Y Tk +/-3.7.2C-Mauslymphomzellen. Dissertation 2008; <http://www.opus-bayern.de/uni-wuerzburg/volltexte/2008/2602/>.
- Kanerva L, Henriks-Eckerman M-L, Estlander T, Jolanki R, Tarvainen K: Occupational allergic contact dermatitis and composition of acrylates in dental bonding systems. *J Eur Acad Derm Venereol* 1994; 3: 157-169.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4): 239-57.
- Kerr JF: History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 2002; 181-182: 471-4.

- Kleinsasser NH, Schmid K, Sassen AW, Harreus UA, Staudenmaier R, Folwaczny M, Glas J, Reichl FX: Cytotoxic and genotoxic effects of resin monomers in human salivary gland tissue and lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *Biomaterials* 2006; 27: 1762-1770.
- Kleinsasser NH, Wallner BC, Harreus UA, Kleinjung T, Folwaczny M, Hickel R, Kehe K, Reichl FX: Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *Journal of Dentistry* 2004; 32: 229-234.
- Ko TC, Bresnahan WA, Thompson EA: Intestinal cell cycle regulation. *Prog Cell Cycle Res* 1997; 3: 43-52.
- Koopman G, Reutelingsperger CPM, Kuijten GAM, Keehnen RMJ, Pals ST, van Oers MHJ: Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994; 84(5): 1415-1420.
- Krammer PH: Apoptose. *Dt Ärztbl* 2000; 97: A-1752-1759 [Heft 25].
- Krasilnikov MA: Phosphatidylinositol-3 Kinase Dependent Pathways: the Role in Control of Cell Growth, Survival, and Malignant Transformation. *Biochemistry (Moscow)* 2000; 65(1): 68-78
- Larsen IB, Freund M, Munksgaard EC: Change in surface hardness of BisGMA/TEGDMA polymer due to enzymatic action. *J Dent Res* 1992; 71(11): 1851-3.
- Lee DH, Lim BS, Lee YK, Ahn SJ, Yang HC: Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures. *Dental Materials* 2006; 22: 1086-1092.
- Lexikon; Zahnmedizin, Zahntechnik. München, Urban & Fischer 2000; 331-332.
- Lind PO: Oral lichenoid reactions related to composite restorations. Preliminary report *Acta Odontol Scand* 1988; 46(1): 63-5.
- Lindström M, Alanko K, Keskinen H, Kanerva L: Dentist's occupational asthma, rhinoconjunctivitis, and allergic contact dermatitis from methacrylates. *Allergy* 2002; 57(6): 543-5.
- Löffler G: Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. Berlin Heidelberg, Springer 2003.
- Lönnroth EC, Shahnava H: Use of polymer materials in dental clinics, case study. *Swed Dent J* 1997; 21(4): 149-59.

- Madle S, Beek B, Nowak C: Zum Verständnis von Chromosomenmutationstests an Somazellen. Fahrig R (hrsg.); Mutationsforschung und genetische Toxikologie. Darmstadt, Wiss Buchgesellschaft 1993; 224-242.
- Meister A: Glutathione, ascorbate and cellular protection. *Cancer Res* 1994; 54: 1969-1975.
- Michelsen VB, Moe G, Skalevik R, Jensen E, Lygre H: Quantification of organic eluates from polymerized resin-based dental restorative materials by use of GC/MS. *J Chromatogr B* 2006; doi:10.1016/j.jchromb.2006.11.003.
- Michelsen VB, Moe G, Strom MB, Jensen E, Lygre H: 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* 2008; 24: 724-731.
- Moller P, Loft S: Oxidative DNA damage in human white blood cells in dietary antioxidant intervention studies. *AM J Clin Nutr* 2002; 76: 303-10.
- Müller E, Boiteux S, Cunningham RP, Epe B: Enzymic recognition of DNA modifications induced by singlet oxygen and photosensitizers. *Nucleic Acids Research* 1990; 18(20): 5969-5973.
- Munksgaard EC, Freund M: Enzymatic hydrolysis of (di)methacrylates and their polymers. *Scand J Dent Res* 1990; 98(3): 261-7.
- Munksgaard EC, Hansen EK, Engen T, Holm U: Self-reported occupational dermatological reactions among Danish dentists. *Eur J Oral Sci* 1996; 104(4(Pt1)): 396-402.
- Munksgaard EC: Toxicology versus allergy in restorative dentistry. *Adv Dent Res* 1992a; 6: 17-21.
- Munksgaard EC: Permeability of protective gloves to (di)methacrylates in resinous dental materials. *Scand J Dent Res* 1992b; 100(3): 189-92.
- Nakamura M, Oshima H, Hashimoto Y: Monomer permeability of disposable dental gloves. *J Prosthet Dent* 2003; 90(1): 81-5.
- Olive PL, Banath JP, Durand RE: Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res* 1990; 122(1): 86-94.
- Olive PL, Banath JP: Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and 125I-dUrd. *Int J Radiat Biol* 1993; 64: 349-358.

- Olive PL: Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. *Radiat Res* 1989; 117(1): 79-92.
- Oestling O, Johanson KJ: Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 123(1): 291-8.
- Paranjipe A, Sung EC, Cacalano NA, Hume WR, Jewett A: N-acetyl cysteine protects pulp cells from resin toxins in vivo. *J Dent Res* 2008; 87(6): 537-41.
- Paranjipe A, Bordador LCF, Wang MY, Hume WR, Jewett A: Resin monomer 2-Hydroxyethyl methacrylate (HEMA) is a potent inducer of apoptotic cell death in human and mouse cells. *J Dent Res* 2005; 84(2): 172-177.
- Pereira JC, Segala AD, Costa CA: Human pulpal response to direct pulp capping with an adhesive system. *Am J Dent* 2000; 13(3): 139-47.
- Peutzfeldt A: Resin composites in dentistry: the monomer systems. *Eur J Oral Sci* 1997; 105(2): 97-116.
- Polydorou O, Beiter J, König A, Hellwig E, Kümmerer K: Effect of bleaching on the elution of monomers from modern dental composite materials. *Dent Mater* 2008; doi:10.1016/j.dental.2008.07.004.
- Prica D, Galic N, Zeljezic D, Prica A, Segovic S: Genotoxic potential of dentin bonding agents. *Acta Stomatol Croat* 2007; 41(2): 104-14.
- Reichl FX, Durner J, Hickel R, Kunzelmann KH, Jewett A, Wang MY, Spahl W, Kreppel H, Moes GW, Kehe K, Walther U, Forth W, Hume WR: Distribution and excretion of TEGDMA in guinea pigs and mice. *J Dent Res* 2001a; 80(5): 1412-5.
- Reichl FX, Durner J, Hickel R, Spahl W, Kehe K, Walther U, Gempel K, Liebl B, Kunzelmann KH, Hume W: Uptake, clearance and metabolism of TEGDMA in guinea pigs. *Dental Materials* 2002a; 18: 581-589.
- Reichl FX, Durner J, Kehe K, Manhart J, Folwaczny M, Kleinsasser N, Hume WR, Hickel R: Toxicokinetic of HEMA in guinea pigs. *Journal of Dentistry* 2002c; 30: 353-358.
- Reichl FX, Durner J, Kunzelmann KH, Hickel R, Spahl W, Hume WR, Moes GWH, Kehe K, Walther U, Forth W: Biological clearance of TEGDMA in guinea pigs. *Arch Toxicol* 2001b; 75: 22-27.

- Reichl FX, Durner J, Manhart J, Spahl W, Gempel K, Kehe K, Liebl B, Walther UI, Hume WR, Hickel R: Biological clearance of HEMA in guinea pigs. *Biomaterials* 2002b; 23(10): 2135-41.
- Reichl FX, Durner J, Mückter H, Elsenhans B, Forth W, Kunzelmann KH, Hickel R, Spahl W, Hume WR, Moes GW.: Effect of dental materials on gluconeogenesis in rat kidney tubules. *Arch Toxicol* 1999; 73(7): 381-6.
- Reichl FX, Esters M, Simon S, Seiss M, Kleinsasser N, Folwaczny M, Glas J, Hickel R: Cell death effects of resin-based dental materials compounds and mercurials in human gingival fibroblasts. *Arch Toxicol* 2006a; 80: 370-7.
- Reichl FX, Seiss M, Marquardt W, Kleinsasser N, Schweikl H, Kehe K, Hickel R: Toxicity potentiation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with components of dental restorative materials on human oral cells. *Arch Toxicol* 2008; 82(1): 21-8.
- Reichl FX, Simon S, Esters M, Seiss M, Kehe K, Kleinsasser N, Hickel R: Cytotoxicity of dental composite (co)monomers and the amalgam component Hg(2+) in human gingival fibroblasts. *Arch Toxicol* 2006b; 80(8): 465-72.
- Reichl FX: Toxikologie zahnärztlicher Restaurationsmaterialien. *Zahnärztl Mitt* 2003; 93(7): 68-74.
- Renahan AG, Booth C, Potten CS: What is apoptosis, and why is it important? *BMJ* 2001; 322: 1536-8.
- Reutelingsperger CPM, Hornstra G, Hemker HC: Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord. *Eur J Biochem* 1985; 151: 625-629.
- Romagna F: Mikrokerntestsyste. Fahrig R (hrsg.), *Mutationsforschung und genetische Toxikologie*. Darmstadt, Wiss Buchges 1993; 290-298.
- Ruyter IE, Svendsen SA: Remaining methacrylate groups in composite restorative materials. *Acta Odontol Scand* 1978; 36(2): 75-82.
- Samuelsen JT, Dahl JE, Karlsson S, Morisbak E, Becher R: Apoptosis induced by monomers HEMA and TEGDMA involves formation of ROS and differential activation of the MAP-kinases p38, JNK and ERK. *Dent Mater* 2007; 23(1): 34-9.
- Schärfe J, Schärfe System GmbH, Reutlingen: Elektronische Zellvitalitätsbestimmung, ein Vergleich mit dem klassischen Trypanblau Assay. *BIOspektrum* 2004; 3: 2-4.

- Schweikl H, Altmannberger I, Hanser N, Hiller KA, Bolay C, Brockhoff G, Spagnuolo G, Galler K, Schmalz G: The effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cell cycle of mammalian cells. *Biomaterials* 2005; 26: 4111-4118.
- Schweikl H, Hartmann A, Hiller KA, Spagnuolo G, Bolay C, Brockhoff G, Schmalz G: Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. *Dental Materials* 2007; 23: 688-695.
- Schweikl H, Hiller KA, Eckhardt A, Bolay C, Spagnuolo G, Stempf T, Schmalz G: Differential gene expression involved in oxidative stress response caused by triethylene glycol dimethacrylate. *Biomaterials* 2008; 29: 1377-1387.
- Schweikl H, Schmalz G, Spruss T: The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res* 2001; 80(7): 1615-1620.
- Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G: Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res* 2006; 85(10): 870-877.
- Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS: Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environ Health Perspect.* 1999; 107(Suppl 1): 5-24.
- Sies H: *Biochemie des oxidativen Stress*. Angewandte Chemie; Weinheim, Wiley-VCH 1986.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175(1): 184-91.
- Spagnuolo G, Galler K, Schmalz G, Cosentino C, Rengo S, Schweikl H: Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase amplifies TEGDMA-induced apoptosis in primary human pulp cells. *J Dent Res* 2004; 83(9): 703-707.
- Speit G, Merk O, Rothfuß A: Zytogenetische Parameter: Der Comet Assay als Test im Biomonitoring. Angerer J (hrsg.), Deutsche Forschungsgemeinschaft; Biological Monitoring: Heute und künftige Möglichkeiten in der Arbeits- und Umweltmedizin. Weinheim, Wiley-VCH 2001; 128-137.
- Speit G, Schütz P, Bonzheim I, Trenz K, Hoffman H: Sensitivity of the Fpg protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicol Lett* 2004; 146(2): 151-8.
- Speit G: Schwesterchromatidaustausch als Indikator für genotoxische Effekte. Fahrig R (hrsg.), Mutationsforschung und genetische Toxikologie. Darmstadt., Wiss Buchgesellschaft 1993; 263-273.

- Stanislawski L, Lefeuvre M, Bourd K, Soheili-Majd E, Goldberg M, Perianin A: TEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *J Biomed Mater Res* 2003; 66A: 476-482.
- Stanislawski L, Soheili-Majd E, Perianin A, Goldberg M: Dental restorative biomaterials induce glutathione depletion in cultured human gingival fibroblasts: Protective effect of N-acetyl cysteine. *J Biomed Mater Res* 2000; 51: 469-474.
- Thompson CB: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267(5203): 1456-62.
- van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM: Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998; 31: 1-9.
- Volk J, Engelmann J, Leyhausen G, Geurtsen W: Effects of three resin monomers on the cellular glutathione concentration of cultured human gingival fibroblasts. *Dental Materials* 2006; 22: 499-505.
- Volk J, Leyhausen G, Dogan S, Geurtsen W: Additive effects of TEGDMA and hydrogenperoxide on the cellular glutathione content of human gingival fibroblasts. *Dent Mater* 2007; 23(8): 921-6.
- Walther UI, Siagian II, Walther SC, Reichl FX, Hickel R: Antioxidative vitamins decrease cytotoxicity of HEMA and TEGDMA in cultured cell lines. *Arch Oral Biol* 2004; 49(2): 125-31.
- Wong VWC, Szeto YT, Collins AR, Benzie IFF: The comet assay: a biomonitoring tool for nutraceutical research. *Current Topics in Nutraceutical Research* 2005; 3(1): 1-14.
- Wyllie AH: Apoptosis and carcinogenesis. *Eur J Cell Biol* 1997; 73(3): 189-97.
- verfügbar.

### 5.6 Danke

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und ganz besonders bei...

...Herrn Prof. Dr. med. Rudolf Hagen für die Unterstützung der Laborarbeit durch Bereitstellung von Räumlichkeiten und finanziellen Mitteln.

...Herrn Prof. Dr. med. Norbert Kleinsasser, der mir die Möglichkeit gab, im Labor der Ökogenotoxikologie zu promovieren. Er war stets am Fortgang meiner Arbeit interessiert und hat mit seiner konstruktiven Kritik und kompetenten Anregungen einen bedeutenden Anteil beigetragen.

...Frau Dr. med. Katrin Frölich, für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Ihre fachlichen Anregungen rundeten jedes Kapitel ab.

...Frau Dr. Dipl. Biologin Katja Kampfinger, die mich für diese Arbeit begeistern konnte und mich anfänglich betreute und daher maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

...Frau Dipl. Biologin Gudrun Friehs, die mich in die Welt des Comet Assays einführte und darüber hinaus für eine schöne Zeit durch fachliche und nichtfachliche Gespräche sorgte.

...Frau MTA Silke Hummel, die mir beim Einstieg in die Laborarbeit behilflich war und ohne die der Einblick in die chromosomale Ebene nicht möglich gewesen wäre.

...den MTAs: Frau Renate Port, die wöchentlich für frisches Blut sorgte sowie fachlich und menschlich immer für mich da war. Herrn Michael Kessler, der Ruhepol, der egal wie viel er auch zu tun hatte, mir immer mit Rat und Tat behilflich war. Sowie Frau Ursula Kepp und Frau Margarethe Appelmann für ihre Unterstützung.

...Frau Dipl. Haushaltsökonomin Evelyn Schibrani und Herrn Dipl. Betriebswirt, Dipl. Journalist Harald Schibrani, die keine Zeit gescheut haben Korrektur zu lesen.

...Herrn Dipl.-Ing. (FH) Hartmut Siegel, der mit seinen Computerfachkenntnissen entscheidend zum Erscheinungsbild dieser Arbeit beigetragen hat.

...meinen Eltern, die all die Jahre mein Tun begleitet und bestätigt haben. Sie standen stets wie ein Fels hinter mir - ich weiß, dass das nicht immer ganz einfach war.

...meiner Schwester Simone, meiner persönlichen „roten Liste“, die stets für mich da war und ohne die so einiges in meinem Leben nicht so glatt gelaufen wäre.



## 5.7 Lebenslauf

### **Persönliche Daten:**

Name	Sabrina Zinnitsch
Geburtstag	29.01.1983
Geburtsort	Crailsheim

### **Schulbildung:**

09/1989-06/1993	Grundschule Crailsheim-Tiefenbach
09/1993-06/1999	Realschule in Crailsheim
09/1999-06/2002	Wirtschaftsgymnasium in Crailsheim

### **Studium:**

10/2002-07/2007	Studium der Zahnmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
09/2003	Vorphysikum
03/2005	Physikum
07/2007-11/2007	Staatsexamen

### **Promotion:**

02/2008	Universitätsklinikum Würzburg Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen Prof. Dr. med. N. Kleinsasser
---------	--

### **Berufliche Tätigkeit:**

Seit 01/2009	Zahnärztliche Vorbereitungsassistentin in der Zahnarztpraxis Dr. Wetzel in Crailsheim
--------------	---