

Abteilung Zahnerhaltung und Parodontologie

■ Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. Hüsamettin Günay

Forschungsprofil

Die Abteilung Zahnerhaltung ist Teil des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde. Klinische und wissenschaftliche Schwerpunkte sind die Kinderzahnheilkunde und Prophylaxe, die konservierende Zahnheilkunde (Kariologie) einschließlich der Endodontie, die Behandlung von Parodontal- und Periimplantärerkrankungen sowie zellbiologische Untersuchungen zur Biokompatibilität von Füllungskunststoffen.

Forschungsprojekte

Chemisch-biologische Wechselwirkungen von Kombinationen von Peroxiden und metallischen bzw. organischen Inhaltsstoffen zahnärztlicher Materialien auf das antioxidative System menschlicher oraler Zellen

Beim Bleichen von Zähnen werden Peroxide in Konzentrationen freigesetzt, die zu einer oxidativen Belastung von oralen Zellen führen können. Gleichzeitig können sie zu einer erhöhten Freisetzung von Metallionen (z.B. Nickel und Quecksilber) aus Gußlegierungen bzw. Amalgam beitragen und die Oberfläche zahnärztlicher Kunststoffe beeinträchtigen. Die Förderung von oxidativem Stress scheint eine wichtige Rolle im Mechanismus der akuten Toxizität und Mutagenität von Metallen wie Nickel und Nickelkomponenten und Methacrylaten wie TEGDMA zu spielen. Das Ziel unserer Untersuchungen ist, Ursachen und Auswirkungen der schädigenden Wirkung von oxidativem Stress erzeugt durch H₂O₂ allein und in Kombination mit Bestandteilen von zahnärztlichen Metallen (Nickel) bzw. Kunststoffen (TEGDMA) in subtoxischen Konzentrationen zu untersuchen. Zur Erfassung der Ursachen werden die intrazellulären Glutathiongehalte, Konzentrationen an reaktiven Sauerstoff-Spezies („reactive oxygen species“, ROS) und die Lipidperoxidation gemessen. Die gesetzten Schäden werden anhand der Änderungen der Apoptoseinduktion (mitochondriales Membranpotential, DNA-Fragmentierung, Nachweis der Phosphatidylserinumlagerung in den Zellmembranen) und der Zytotoxizität (PI-Assay, XTT-Assay) erfasst. Alle Untersuchungen werden mit menschlichen Fibroblasten der Mundhöhle durchgeführt (humane Gingivafibroblasten (HGF), humane Pulpafibroblasten (HPF), humane Parodontalligamentfibroblasten (HPDLF)). Die ermittelten Daten geben wichtige Hinweise zur Wirkung subtoxischer Konzentrationen von eluierbaren Inhaltsstoffen zahnärztlicher Materialien.

Werden Peroxide und Inhaltsstoffe zahnärztlicher Materialien in die Mundhöhle freigesetzt, können sie durch Verschlucken in den Gastrointestinaltrakt gelangen. Peroxide aus

Bleichungsmitteln sind relativ stabil im sauren Milieu und werden im Darm freigesetzt. Die Resorption von Nickel und Methacrylaten findet ebenfalls hauptsächlich während der Darmpassage statt. Von dort aus können sie im gesamten Organismus verteilt werden. Für eine umfassende Beurteilung der Biokompatibilität sind daher Untersuchungen an systemisch betroffenen Zellen unerlässlich. Dieses ist die Grundlage des zukünftigen DFG-Antrags.

Durchgeführte Untersuchungen:

Intrazellulärer Glutathiongehalt; Fragestellung: Welchen Einfluss haben Nickel und Triethylenglykoldimethacrylat (TEGDMA) allein und in Kombination mit Wasserstoffperoxid auf den Glutathionstoffwechsel von humanen oralen Zellen?

Wir untersuchten an oralen Zellen den Einfluss von toxischen und subtoxischen Konzentrationen von Nickel und TEGDMA allein und in Kombination mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) auf Glutathion (GSH), welches eine zentrale Funktion beim Schutz von Zellen gegen Xenobiotika und oxidative Schädigungen besitzt.

Nickel ist ein weitverbreiteter Bestandteil verschiedener metallischer Restaurationsmaterialien, dem zytotoxische, mutagene, karzinogene und allergene Eigenschaften zugeschrieben werden. Als Vertreter der Methacrylate wird das häufig verwendete Komonomer TEGDMA

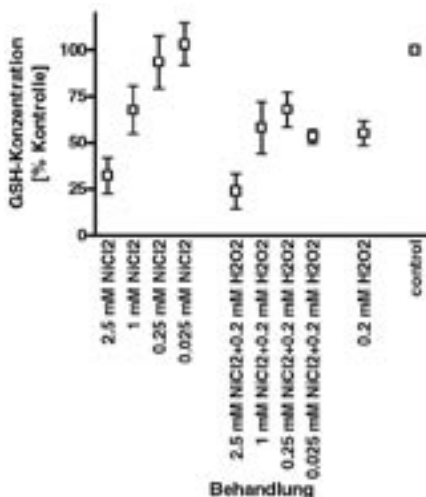


Abb. 1: Relative intrazelluläre Glutathionkonzentration in HGF nach 24-stündiger Inkubation mit $NiCl_2$ allein und kombiniert mit 0,2 mM H_2O_2 anschließend über 90 Minuten ($n=6$)

untersucht. Es besitzt ein hohes zytotoxisches Potential. Über die Entstehung oxidativen Stresses durch verstärkte Bildung von ROS durch zahnärztliche Kunststoffbestandteile in oralen, aber auch anderen Zelltypen ist bisher wenig bekannt. In ersten Versuchen wurden Dosis-Wirkungskurven (Zytotoxizität) von $NiCl_2$, TEGDMA und H_2O_2 bei humanen Gingivafibroblasten ermittelt. Anhand der Kurven zu Wachstum und Vitalität wurden die Konzentrationen definiert, mit denen Untersuchungen des intrazellulären Redoxsystems und zum Apoptoseverhalten durchgeführt wurden. Das schädigende Potential von Nickel hängt

mit dem Oxidationszustand und der Löslichkeit (Wasserlöslichkeit, Lipidlöslichkeit), die die Bioverfügbarkeit beeinflussen, zusammen. Unsere Untersuchungen zeigten, dass NiCl₂ in nicht ausreichender Menge im wässrigen Medium gelöst werden konnte, um ED50-Bestimmungen nach 24 h-Exposition an Gingivafibroblasten vorzunehmen. Nickel und H₂O₂ reduzierten die Vitalität der Zellen bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen (0,05 mM). TEGDMA reduzierte die Vitalität signifikant auf 60% bei 5 mM.

Anhand der Kurven zu Wachstum und Vitalität wurden die Konzentrationen definiert, mit denen Untersuchungen am GSH-Stoffwechsel durchgeführt wurden. Es konnte gezeigt werden, dass NiCl₂ und H₂O₂ das intrazelluläre GSH konzentrationsabhängig signifikant erniedrigten. Allerdings konnten unter den gewählten Versuchsbedingungen keine synergistischen Effekte durch die Kombinationsbehandlung gemessen werden. (Abbildung 1).

Erste Versuche mit TEGDMA in Kombination mit H₂O₂ zeigten ebenfalls eine deutliche Abnahme von GSH (Abbildung 2). Im Gegensatz zur Nickel/H₂O₂-Kombination scheinen allerdings synergistische Effekte eine Rolle zu spielen.

Die Ursachen dieser Synergismen sind im Detail noch nicht geklärt. Möglicherweise kommt es durch Methacrylate zu einer Beeinträchtigung der Redoxhomöostase und anschließender Überbeanspruchung des antioxidativen Systems.

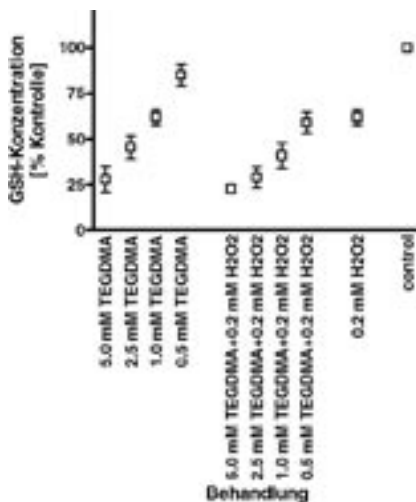


Abb. 2: Relative intrazelluläre Glutathionkonzentration in HGF nach 24-stündiger Inkubation mit TEGDMA allein und kombiniert mit 0,2 mM H₂O₂ anschließend über 90 Minuten (n = 2).

Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS); Fragestellung: Führt die Erniedrigung des Glutathions zu einer erhöhten ROS-Bildung von humanen oralen Zellen?

Aufgrund der beobachteten signifikanten Erniedrigung der intrazellulären GSH-Konzentration wurde von uns überprüft, ob es in den behandelten Zellen zu einer erhöhten Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies („reactive oxygen species“, ROS) als Hinweis auf oxidativen Stress kommt. Es konnte ein deutlicher Effekt durch alle untersuchten Substanzen nachge-

wiesen werden, wobei die ROS-Bildung mit dem abnehmenden intrazellulären GSH-Gehalt korrelierte.

Die ROS- und GSH-Messungen zeigten, dass bereits deutliche Änderungen im Redoxzustand der Gingivafibroblasten bei diesen niedrigen NiCl₂- und TEGDMA-Konzentrationen in konzentrationsabhängiger Weise auftreten (< ED10) und die Abnahme des intrazellulären GSH-Gehalts, als auch die ROS-Bildung mit der abnehmenden Vitalität korrelierten. Da ROS eine Reihe negativer Effekte in Zellen verursachen, vermuten wir hier eine Ursache für die Toxizität von Nickel und auch von in der Zahnmedizin eingesetzten Methacrylaten wie TEGDMA.

Untersuchungen zum Mechanismus des Zelltods; Fragestellung: Führt eine erhöhte ROS-Bildung zur Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose)?

Wenn die Kapazität der Zelle nicht ausreicht, die ROS abzufangen, können z.B. Schädigungen des Erbguts die Folge sein. Greifen die zelleigenen Reparaturmechanismen nicht, können Zellen durch Apoptose zu Grunde gehen. Eines der späten und unumkehrbaren Kennzeichen der Apoptose ist häufig die DNA-Fragmentierung in gleich große Fragmente von 185 bp bis 220 bp. Kritisch bei dieser Analyse ist die Zelldichte während der Behandlung und der Zeitpunkt, zu dem die genomische DNA isoliert wird. Deshalb wurden zunächst Vorversuche durchgeführt, um einen Eindruck über den Verlauf eines apoptotischen Prozesses zu erhalten („Kinetik“). Die Untersuchungen wurden bisher mit Nickel durchgeführt, das keine nachweisbare Fragmentierung der DNA unter den gewählten Versuchsbedingungen induzierte.

Weitere Untersuchungen zur Apoptose sind geplant und umfassen u.a. eine durchflusszytometrische Methode (Annexin/PI-Assay). Da wir die Depolarisation der Mitochondrienmembran als ein sehr frühes Ereignis der Apoptosekaskade erwarten, beginnen wir derzeit mit der Etablierung des JC-1-Assays im Mikrotiterplattenformat zur Bestimmung von Änderungen des mitochondrialen Membranpotentials.

Peroxide, Nickel und Methacrylate beeinflussen direkt oder indirekt den Redoxzustand der Zelle. Sollten die Zellschädigungen in der Kombination subletaler Bestandteile zahnärztlicher Materialien, nicht jedoch durch Einzelsubstanzen allein zu einer erhöhten Toxizität führen, so muss die Gefährdung sowohl durch Peroxide als auch durch Kunststoffe und Metalle differenzierter bewertet werden.

■ Projektverantwortlich: Volk, J; Leyhausen, G; Dogan, S; Geurtsen, W.; Förderung: DGZMK

Weitere Forschungsprojekte

Bioverträgliche Werkstoffe auf Basis monomererfreier Nanokomposite für Zahnfüllungsmaterialien und Prothetik

■ Projektverantwortlich: Leyhausen, G; Volk, J; Engelmann, J; Geurtsen, W; Maletz R, Danebrock M (Voco GmbH, Cuxhaven); Wolter H, Gellermann C (Fraunhofer Institut f. Silicatforschung); Förderung: BMBF

Chemisch-biologische Wechselwirkungen zwischen Bestandteilen von Kunststoff-modifizierten Füllungsmaterialien und menschlichen primären Zellen der Mundhöhle

■ Projektverantwortlich: Leyhausen, G; Volk, J; Engelmann, J; Geurtsen, W.; Förderung: DFG

Einfluss von bakteriellen Toxinen auf die In vitro-Zytotoxizität von Metallionen aus zahnärztlichen Restaurationen

■ Projektverantwortlich: Lührs, A; Leyhausen, G; Engelmann, J; Geurtsen, W.

Interaktive Effekte zwischen organischen Kompositbestandteilen und Natriumfluorid im Hinblick auf die Biokompatibilität

■ Projektverantwortlich: Trempetic, R; Engelmann, J; Leyhausen, G; Geurtsen, W.

Studie zur In vitro-Zytotoxizität des metallischen Primers Sebond Smart

■ Projektverantwortlich: Leyhausen, G; Volk, J. (in Zusammenarbeit mit Schütz Dental, Rosbach)

Die Wirkung von Inhaltsstoffen zahnärztlicher Materialien auf den Glutathiongehalt von Fibroblasten: Etablierung eines enzymatischen Nachweises von reduziertem und oxidiertem Glutathion

■ Projektverantwortlich: Fischer, S; Leyhausen, G; Engelmann, J; Geurtsen, W.

Untersuchungen zur Zytotoxizität von Sealer-Eluaten auf primäre orale und immortalisierte Zellkulturen

■ Projektverantwortlich: Johann, B; Leyhausen, G; Schwarze, T; Geurtsen, W.

Untersuchungen zu Einzel- und Kombinationswirkungen von Kompositbestandteilen auf Wachstum und den Redoxhaushalt primärer oraler Fibroblasten und immortalisierter Zellkulturen

■ Projektverantwortlich: Kittkowske, B; Leyhausen, G; Volk, J; Geurtsen, W.

Einfluss von Rauchen auf die klinischen und mikrobiologischen Ergebnisse der adjuvanten Antibiotikatherapie bei Patienten mit aggressiver Parodontitis

■ Projektverantwortlich: Jalilvand, N; Dogan, S; Günay, H.

Einfluss von Rauchen auf die Mikroflora der Periimplantitis

■ Projektverantwortlich: Dogan, S; Günay, H.

Informationsstand der Mundgesundheit während der Schwangerschaft

■ Projektverantwortlich: Rahman, A; Günay, H.

Mundgesundheit während der Schwangerschaft bei Migranten

■ Projektverantwortlich: Yücel, E; Rahman, A; Günay, H.

Vergleichende in-vitro Untersuchung zur Fissurenversiegelung: Ultraschall versus klassisch

■ Projektverantwortlich: Banhagel, M; Rahman, A; Günay, H.

Die Rolle der Ernährung bei entzündlichen Parodontalerkrankungen; bei Vegetariern

■ Projektverantwortlich: Osterburg, G; Deac, A; Bohnenkamp, A; Günay, H.

Apexifikation mit EMP

■ Projektverantwortlich: Günay, H; Stephan, K.

Zungenreinigung mit Spatel oder Bürste?

■ Projektverantwortlich: Bohnenkamp, A; Günay, H.

Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) der Tumor-Necrosis-Faktor- α , IL-10 und IL-1 β -Gene bei Parodontitis-erkrankten und gesunden Patienten

■ Projektverantwortlich: Dogan, S; Geurtsen, W; Günay, H.

Apikale Dichtigkeit von 3 verschiedenen Wurzelkanalfüllzementen in Verbindung mit 4 unterschiedlichen Wurzelkanalfülltechniken – getestet durch Bakterienpenetration

■ Projektverantwortlich: Stephan, K; Schwarze, T.

Vergleichende Untersuchung des Exkavationsergebnisses von Hartmetall-Rosenbohrern und Polymer-Instrumenten mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop

■ Projektverantwortlich: Schilke, R.

Versuchsdesign einer multizentrischen Parodontitispräventionsstudie bei Patienten mit schwerer chronischer Neutropenie

■ Projektverantwortlich: Schilke, R; Zeidler, C; Welte, K; Gunzer, F; Finke (Charité Kinderzahnheilkunde Berlin)

Originalpublikationen

Deutel, A; Munack, J; Geurtsen, W; Günay, H. Randschluss- und Frakturverhalten von Keramik- und Galvano-Keramik-Hybrid-Inlays bei dentinbegrenzter Kavität und bei Höckerersatz. Dtsch Zahnärztl Z 59,159-162 (2004)

Engelmann, J; Janke, V.; Volk, J.; Leyhausen, G.; von Neuhoff, N.; Schlegelberger, B.; **Geurtsen, W.** Effects of BisGMA on glutathione metabolism and apoptosis in human gingival fibroblasts in vitro. Biomaterials 25,4573-80 (2004)

Ibarra, G; Aw, TC; **Geurtsen, W.** Substanzschonende Behandlung kariöser Läsionen in der Zahnerhaltung. Dtsch Zahnärztl Z 59,130-140 (2004)

Leyhausen, G; Beckedorf, A; Heidebach, H; Volk, J; In-vitro-Zytotoxizität des Metal Primers Sebond Smart. Dental-praxis 9/10 (2004)

Schwarze, T. Mineral Trioxide Aggregate (MTA) – Eine Literaturübersicht. Endodontie 13/3,211-221 (2004)

Bauss, O.; Engelke, W.; Fenske, C.; **Schilke, R.;** Schwestka-Polly, R. Autotransplantation of immature third molars into edentulous and atrophied jaw sections. Int J Oral Maxillofac Surg 33,558-563 (2004)

Sarwary, N.; Schilke, R. Hypophosphatasie im Kindesalter. Dtsch Zahnärztl Z 59,671-679 (2004)

Buchbeiträge, Monographien

Geurtsen, W. Polymethylmetacrylat-Kunststoffe. S. 246-262. In: Schmalz G, Arenholt-

Binslev D, editors. Biokompatibilität und Nebenwirkungen von PMMA-Kunststoffen für herausnehmbare Prothesen und kieferorthopädische Geräte; 2004.

Abstracts

2004 wurden 6 Abstracts publiziert.

Promotionen

Dr. med. dent. A.Curyk: In-vivo-Akkumulation von parodontalpathogenen Keimen an Restaurationen und natürlichem Zahnschmelz. – Eine Literaturübersicht und experimentelle Studie.

Dr. rer. nat. J. Volk: Untersuchungen zur circadianen Rhythmik und Photomorphogenese bei Höheren Pflanzen.