

In-vitro-Untersuchung zur Zytotoxizität von Self-Etch-Adhäsivsystemen

Zusammenfassung

Ziel dieser In-vitro-Studie war die Analyse der Zytotoxizität verschiedener Self-Etch-Adhäsivsysteme nach Applikation auf Dentinprüfkörper mit unterschiedlicher Schichtstärke.

Bovine Dentinscheiben (1,0, 1,5 und 2,5 mm, je n = 5) wurden in einer Polykarbonatkammer mit Zellkulturmedium (2 ml/h) perfundiert. Auf die pulpaferne Seite der Dentinscheibe wurden die Adhäsivsysteme (A: Adper Prompt-L-Pop, B: Xeno III, C: Clearfil SE Bond, D: One up Bond F, E: Resulcin Aqua Prime & Monobond) oder die toxische Positivkontrolle (F: 35% H₂O₂) appliziert. Die Eluate wurden unmittelbar vor und 15, 30, 45, 60 und 120 min nach der Applikation der Adhäsive entnommen und L-929-Fibroblasten zugeführt. Die Zytotoxizität der Materialien wurde durch den MTT-Test ermittelt und in Relation zum entsprechenden Basiswert bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte durch eine Varianzanalyse ($p < 0,05$).

Die Applikation der Adhäsivsysteme B–E auf 1,0 mm und der Adhäsivsysteme B und E auf 1,5 mm schichtstarke Dentinscheiben führte nach 15 min Perfusion zu einer signifikanten Reduktion der Enzymaktivität der Fibroblasten, die jedoch nach 30 min Perfusion nicht mehr nachweisbar war. In allen Gruppen nahm die Zytotoxizität mit steigender Dentinschichtstärke ab. Adper Prompt-L-Pop zeigte insgesamt ein signifikant geringeres zytotoxisches Potenzial als die Adhäsivsysteme B–E.

Self-Etch Adhäsivsysteme können zytotoxisch auf L-929 Fibroblasten wirken. Die Zytotoxizität ist jedoch zeitlich limitiert und von der Schichtstärke des verwendeten Dentins abhängig.

Schweiz Monatsschr Zahnmed 116: 614–621 (2006)

Schlüsselwörter: Zytotoxizität, Adhäsivsysteme, Dentindicke, Perfusion, Zellkultur

Zur Veröffentlichung angenommen: 25. März 2006

Korrespondenzadresse:

Dr. Annette Wiegand

Klinik für Präventivzahnmedizin, Parodontologie und Kariologie, Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universität Zürich

Plattenstr. 11, CH-8032 Zürich

Tel. +41 44 634 3412, Fax +41 44 634 4308

E-Mail: annette.wiegand@zzmk.unizh.ch

ANNETTE WIEGAND^{1, 2}, CAROLINE CASPAR¹,
KLAUS BECKER^{1, 2}, CAROLA WERNER³ und
THOMAS ATTIN^{1, 2}

¹ Abteilung Zahnerhaltung, Präventive Zahnheilkunde und Parodontologie, Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Universität Göttingen

² Klinik für Präventivzahnmedizin, Parodontologie und Kariologie, Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Universität Zürich

³ Abteilung Medizinische Statistik, Universität Göttingen

Einleitung

Die Befestigung von Kompositen an Schmelz oder Dentin erfordert eine sorgfältige Konditionierung der Zahnhartsubstanz. Während Schmelz nach der Konditionierung mit Säuren ein mikroretentives Relief aufweist, an welchem niedrigvisköse Komposite anhaften können (BUONOCORE 1955), erfordert die Konditionierung des hydrophileren Dentins komplexere Massnahmen (LOPES et al. 2002; HALLER 2000). Adhäsivsysteme dienen als Dentinhaftvermittler für die Adhäsion von Kompositen und bestehen in der Regel aus den drei Komponenten Konditio-

nierer, Primer und Adhäsiv. Nach Konditionierung des Dentins durch geeignete Säuren oder säurehaltige Primer können die Haftvermittler in das freigelegte Kollagenetzwerk des Dentins penetrieren und über die Ausbildung einer Hybridschicht den Haftverbund zwischen Komposit und Dentin bewirken. Während bei der Verwendung konventioneller Adhäsivsysteme die notwendige Demineralisierung des Dentins durch eine separate Säurekonditionierung vor Applikation des Primers bzw. des Adhäsivs hervorgerufen wird («Etch & Rinse»-Adhäsivsysteme), vereinigen Self-Etch-Adhäsive («Non-Rinse»- oder «selbstkonditionierende» Systeme) diese beiden Arbeitsschritte (VAN MEERBEEK et al. 2003; 2001).

Es konnte bislang in einigen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass die Applikation von Adhäsivsystemen zu Irritationen oder entzündlichen Veränderungen der Pulpa führen kann (ABEBE et al. 2005; ACCORINTE et al. 2005; COX et al. 2003; SOUZA COSTA et al. 2002; DEMARCO et al. 2001). Das Ausmass der Schädigung ist dabei von der Art und Zusammensetzung des verwendeten Adhäsivsystems, der Applikationsdauer sowie der Dentinsklerosierung und der Restdentinstärke über der Pulpa abhängig (GALLER et al. 2005; SOUZA COSTA et al. 2002; BOUILLAGUET et al. 1998). Als Ursache für die Reaktion der Pulpa werden verschiedene Monomere diskutiert, die durch die Dentintubuli bis in die Pulpa diffundieren und dort entzündliche Veränderungen hervorrufen können.

In der Literatur sind zahlreiche Untersuchungen zur Zytotoxizität von konventionellen «Etch & Rinse»-Adhäsivsystemen beschrieben (HUANG & CHANG 2002; SCHMALZ et al. 2002; SZEP et al. 2002; KOLINIOTOU-KOUBIA et al. 2001; CAMPS et al. 1997). Self-Etch-Systeme sind jedoch erst in den vergangenen Jahren entwickelt worden, sodass bislang nur wenige vergleichende Untersuchungen bezüglich der Zytotoxizität dieser Materialien vorliegen (GALLER et al. 2005; VAJRABHAYA et al. 2003).

Zahnärztliche Restaurationsmaterialien bedürfen vor ihrem klinischen Einsatz sowohl einer Prüfung ihrer physikalischen, chemischen und mechanischen Eigenschaften, als auch einer sorgfältigen Analyse ihrer Gewebeerträglichkeit. Zu den biologischen Prüfverfahren gehören In-vitro-Untersuchungen, welche helfen, die unspezifische Zytotoxizität von Materialien zu ermitteln.

Das Ziel der vorliegenden In-vitro-Untersuchung war es daher, die unspezifische Zytotoxizität verschiedener Self-Etch-Adhäsivsysteme in Abhängigkeit von der Dentindicke und Perfusionsdauer von Dentin zu ermitteln.

Material und Methode

Selbstkonditionierende Adhäsivsysteme

In der vorliegenden Untersuchung wurden die Self-Etch-Adhäsivsysteme Adper Prompt-L-Pop (A), Xeno III (B), Clearfil SE Bond (C), One up Bond F (D) und Resulcin Aqua Prime & Monobond (E) verwendet, deren Zusammensetzungen in Tab. I dargestellt sind.

Präparation der Dentinprüfkörper

Bovine Unterkiefer-Schneidezähne wurden in Kunststoff (Palavit G, Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) eingebettet und unter konstanter Wasserkühlung in horizontaler Richtung geschnitten (Trennschleifsystem 300/310, Exakt, Norderstedt, Deutschland). Dabei wurden ausgehend vom koronalen Pulpdach Querschnitte der Zähne in koronaler Richtung durchgeführt, welche 1,0 mm, 1,5 mm oder 2,5 mm dick waren (Abb. 1). Die Schmier-schicht auf der pulpalen Seite der Dentinprüfkörper wurde durch 15 s Applikation von 38% Phosphorsäure entfernt. Anschließend wurde die Tubulidichte der Dentinprüfkörper durch Ermitteln des elektrischen Widerstands bestimmt (Prepometer, Hager

Tab. I Hersteller, Chargennummer, Bestandteile, pH-Werte (nach VAN MEERBEEK et al. 2003 und GRÉGOIRE & MILLAS 2005) und Lösungsmittel der Self-Etch-Adhäsivsysteme.

| Adhäsivsystem/ Klassifikation | Hersteller | Charge | Bestandteile | pH-Wert | Lösungsmittel |
|---|---|------------|--|---------|---------------|
| Adper Prompt-L-Pop One-Step Self-Etch | Espe, Seefeld, Deutschland | 198484 | Methacrylat Phosphorester, Bis-GMA, Champferchinon, HEMA, Polyalkensäuren, Stabilisatoren | 0,35 | Wasser |
| Xeno III One-Step Self-Etch | Dentsply DeTrey, Konstanz, Deutschland | 0305001039 | HEMA, Wasser, Butylhydroxytuluol, Siliziumoxid, Methacrylatharze, Phosphorsäure-funktionalisierte Polymethacrylatharze, Kampf- erchinon, 4-Dimethylaminoethyl- Benzoat | 0,98 | Ethanol |
| Clearfil SE Bond Two-Step Self-Etch | Kuraray, Osaka, Japan | 41364 | Primer: MDP, HEMA, hydrophile Dimethacrylate, dl-Camphorachinon, dl-Camphorchinon, Adhäsiv: MDP, Methacrylat-oxycyl Dehydrogen- phosphat, 2-Bis-Phenol A, Diglycytat- Methacrylat, HEMA | 1,90 | Wasser |
| One up Bond F One-Step Self-Etch | Tokuyama, Tokio, Japan | X001902 | Methacryloxyalkyl Säurephosphat, MAC-10, Multifunktionale Metha- crylmonomere, Photoinitiatator, HEMA, Silikatglas | 1,09 | Wasser |
| Resulcin Aqua Prime & Monobond Two-Step Self-Etch | Merz, Lütjenburg, Deutschland | 523502 | Phosphorsäure-HEMA-Ester, Bis-GMA, TEGDMA, Polymethacrylologmaleinsäure | 0,7 | Wasser |

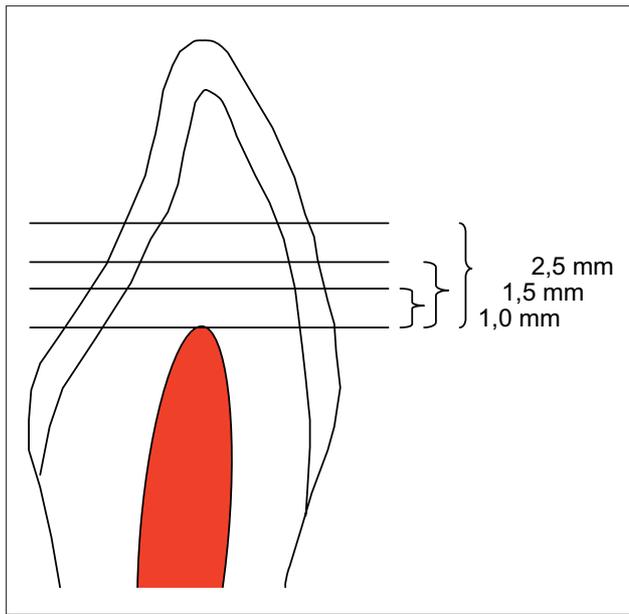


Abb. 1 Herstellung der Dentinprüfkörper. Ausgehend vom koronalen Pulpadach wurden Dentinscheiben mit einer Schichtstärke von 1, 1,5 oder 2,5 mm geschnitten.

& Werken, Duisburg, Deutschland). Das Messprinzip des Prepermeters beruht auf der Analyse der elektrischen Leitfähigkeit des Dentins bzw. der Dentintubuli. Eine Korrelation zwischen dem elektrischen Widerstand des Dentins und der Dentintubulidichte bzw. der Restdentindicke über der Pulpa konnte nachgewiesen werden (GENTE & BECKER-DETERT 1991; GENTE & WENZ 1991). Zur Versuchsdurchführung wurden je 30 Dentinprüfkörper mit 1,0 mm, 1,5 mm und 2,5 mm Dicke ausgewählt, die jeweils gleiche elektrische Leitfähigkeiten aufwiesen. Durch dieses Vorgehen wurde gewährleistet, dass Dentinprüfkörper mit gleicher Schichtstärke auch gleiche Permeabilitätseigenschaften aufwiesen. Nach Bestimmung des elektrischen Widerstands wurden die ausgewählten Proben mit γ -Strahlen sterilisiert (Gamma-Service Produktbestrahlung GmbH, Radeberg, Deutschland).

Zellkultur

L-929 Mausfibroblasten (Permanentzelllinie, Universität Göttingen, Deutschland) wurden bei 37 °C unter 5% CO₂-Sättigung in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, Biochrom, Berlin, Deutschland) kultiviert, welches mit 10% fötalem Kälberserum (FKS, Invitrogen, Paisley, Schottland), 2% Gentamycin (Biochrom, Berlin, Deutschland) und 25 mM HEPES(2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethan-sulfonsäure)-Puffer (Seromed, Berlin, Deutschland) versetzt wurde.

Vor Applikation der perfundierten Eluate wurden je 12500 Zellen/well für 24 h in 96-well-Mikrotiterplatten in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37 °C kultiviert.

Prüfkammer und Versuchsdurchführung

Zur Simulation einer künstlichen Pulpa-Dentin-Einheit wurden die sterilisierten Dentinprüfkörper in Prüfkammern (Medizinische Werkstätten, Universität Göttingen, Deutschland) eingesetzt und mit Zellkulturmedium perfundiert. Die Prüfkammer besteht aus zwei autoklavierbaren verschliessbaren Kunststoffzylindern (Makrolon, Lutze, Göttingen, Deutschland), zwischen die eine Dentinscheibe eingespannt werden kann. Jeder Zylinder weist eine Öffnung (Durchmesser 3 mm) am Kontakt zum Den-

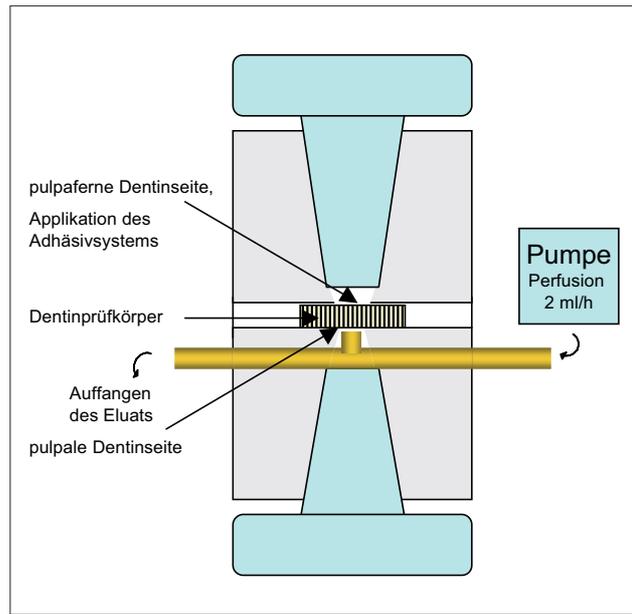


Abb. 2 Schematische Darstellung der Perfusionskammer

tinprüfkörper auf, sodass die Applikation des Adhäsivsystems auf die pulpaferne Dentinseite und die Perfusion des Prüfkörpers über die pulpale Dentinseite erfolgen kann (Abb. 2).

Unmittelbar vor Applikation der Adhäsivsysteme wurden die Prüfkörper zunächst für 15 min über die pulpale Dentinseite mit Zellkulturmedium (2 ml/h) perfundiert. Dazu wurde die Versuchsanordnung an eine 12-Kanal-Schlauchpumpe (IPC, Ismatec SA Zürich, Schweiz) angeschlossen. Das perfundierte Medium wurde entnommen, 1:2 verdünnt und zur Bestimmung des Basiswerts der unbehandelten Dentinprüfkörper dem MTT-Test zugeführt. Anschliessend wurden die Adhäsivsysteme A–E nach Herstellerangabe auf die pulpaferne Seite aufgetragen und für 10 s lichtpolymerisiert (Translux CL, Fa. Heraeus Kulzer, Hanau). Als toxische Positivkontrolle wurde 35%ige H₂O₂-Lösung (Gruppe F) appliziert. In jeder Gruppe A–F wurden je fünf Dentinprüfkörper mit 1,0 mm, 1,5 mm und 2,5 mm Schichtstärke verwendet. Das perfundierte Medium wurde gesammelt und nach 15, 30, 45, 60 und 120 min jeweils vollständig entnommen und 1:2 verdünnt.

Die zuvor für 24 h inkubierten L-929 Fibroblasten wurden nun für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ mit den Eluaten inkubiert und anschliessend dem MTT-Test zugeführt. Der MTT-Test wurde bei jeder Probe in Dreifachbestimmung vorgenommen. Der Mittelwert dieser drei Messungen wurde der weiteren statistischen Analyse zugeführt.

MTT-Test

Der MTT-Test ist eine Nachweismethode zur Quantifizierung der Formazanbildung, die nur in vitalen Zellen nach Zugabe von MTT (3[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid) erfolgt. Durch die Aktivität der mitochondrialen Succinatdehydrogenase wird der Tetrazoliumring des MTT reduziert. Das dabei entstehende Formazan kann fotometrisch bestimmt werden.

In der vorliegenden Untersuchung wurden die für 24 h mit dem perfundierten Medium inkubierten Zellen mit MTT-Reagenz (100 μ l Zellkulturmedium und 25 μ l MTT-Lösung/well) versetzt

und für 120 min inkubiert. Die gebildeten Formazankristalle wurden durch 20-minütige Inkubation mit 100 μ l Dimethylsulfoxid (DMSO) freigesetzt und fotometrisch bei 595 nm quantifiziert (Genion plus, Tecan Austria, Salzburg, Österreich).

Statistische Auswertung

Die Extinktion des durch die unbehandelten Dentinprüfkörper perfundierten Mediums diente zur Bestimmung der Basisaktivität der Succinyldehydrogenase und wurde als 100%-Wert definiert. Die Extinktion des perfundierten Eluats wurde in Relation zu diesem Basiswert ermittelt.

Mithilfe von Bonferroni-Holm-adjustierten Einstichproben-t-Tests wurde für jedes Adhäsivsystem überprüft, ob sich die Aktivität der Succinyldehydrogenase nach 15 min signifikant vom Basiswert unterscheidet. Die statistische Auswertung potenzieller Unterschiede der Succinatdehydrogenase-Aktivität nach Anwendung der verschiedenen Adhäsivsysteme erfolgte durch eine Varianzanalyse ($p < 0,05$), wobei die Schichtstärke der

Dentinprüfkörper und die einzelnen Adhäsivsysteme als unabhängige Variablen dienten. Die Aktivität der Succinyldehydrogenase nach 15 min wurde hierbei als Primärvariable angesehen, da bereits in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass potenzielle Unterschiede nur zum Zeitpunkt $t = 15$ erwartet werden können. Die Werte zum Zeitpunkt $t = 30$ wurden nur zu deskriptiven Zwecken ausgewertet. Deshalb war in diesem Fall keine Adjustierung notwendig. Auf signifikante Haupteffekte erfolgte allerdings eine Analyse aller Paarvergleiche innerhalb der Faktoren, die nach TUKEY adjustiert wurde.

Resultate

Die Aktivität der Succinyldehydrogenase nach Auftragen der verschiedenen Self-Etch-Adhäsivsysteme auf die 1,0 mm, 1,5 mm und 2,5 mm schichtstarken Dentinprüfkörper ist in Abb. 3 in Relation zum entsprechenden Basiswert und in Abhängigkeit von der Perfusionszeit des Mediums dargestellt.

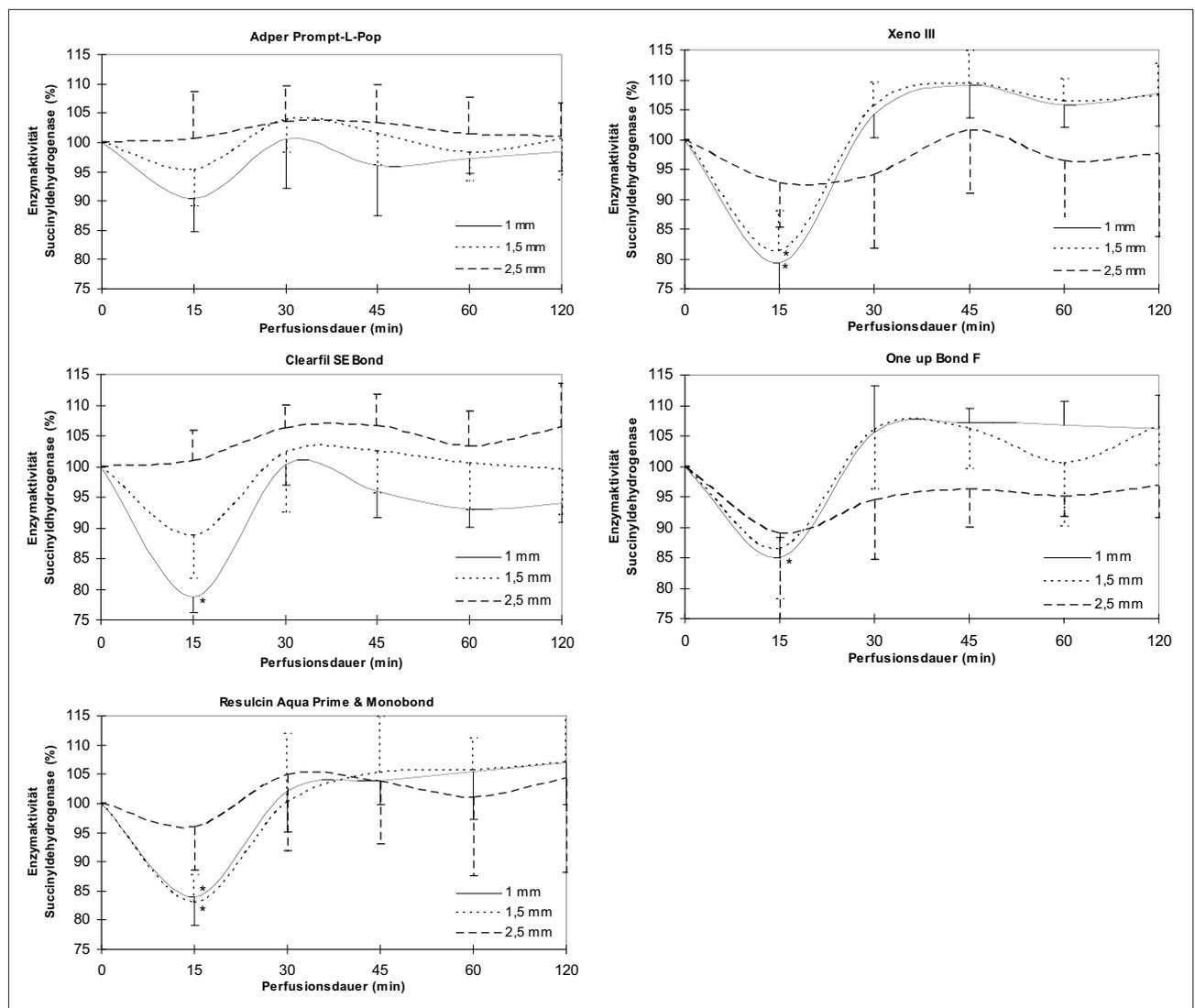


Abb. 3a–e Aktivität der Succinyldehydrogenase (Mittelwert [MW] (%) und Standardabweichung [SD]) nach Auftragen der verschiedenen Adhäsivsysteme auf die 1,0, 1,5 und 2,5 mm schichtstarken Dentinprüfkörper in Abhängigkeit von der Perfusionsdauer des Mediums. Die mit * gekennzeichneten Werte sind signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Basiswert (Aktivität der Succinyldehydrogenase vor Auftragen des Adhäsivsystems = 100%).

Im Gegensatz zur Applikation von Adper Prompt-L-Pop (A) führte die Anwendung der Adhäsivsysteme B–E (Xeno III, Clearfil SE Bond, One up Bond F, Resulcin Aqua Prime & Monobond) auf 1,0 mm dicke Dentinscheiben zu einer signifikanten Reduktion der Enzymaktivität auf 78,8–84,9%. Diese Veränderung war im weiteren zeitlichen Verlauf jedoch rückläufig, sodass nach 30 min kein signifikanter Unterschied im Vergleich zum Basiswert vor Applikation des entsprechenden Adhäsivsystems mehr feststellbar war. Bei 1,5 mm dicken Dentinprüfkörpern führte nur das Auftragen von Xeno III (B: 81,3%) und Resulcin Aqua Prime & Monobond (E: 82,9%) nach 15-minütiger Perfusionsdauer zu einer signifikant geringeren Enzymaktivität, die nach 30 min jedoch ebenfalls nicht mehr nachweisbar war. Das Auftragen der Self-Etch-Adhäsivsysteme auf 2,5 mm dicke Dentinscheiben führte in keiner Gruppe zu einer signifikanten Veränderung der Enzymaktivität.

Bei allen Adhäsivsystemen A–E war die Aktivität der Succinyldehydrogenase zum Zeitpunkt $t = 15$ bei Dentinschichtstärken 1,0 mm, 1,5 mm und 2,5 mm signifikant unterschiedlich, d. h., das zytotoxische Potenzial der Adhäsivsysteme wurde mit zunehmender Schichtstärke der Dentinprüfkörper reduziert. Im Vergleich aller untersuchten Adhäsivsysteme zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Enzymaktivität zwischen der Gruppe A (Adper Prompt-L-Pop) und allen anderen Adhäsivsystemen B–E, welche wiederum nicht signifikant unterschiedlich voneinander waren. Insgesamt war die Zytotoxizität von Adper Prompt-L-Pop somit signifikant niedriger als die Zytotoxizität von Xeno III, Clearfil SE Bond, One up Bond F und Resulcin Aqua Prime & Monobond.

Die Applikation der 35%igen H_2O_2 -Lösung (Positivkontrolle) führte bei allen Prüfkörpern unabhängig von der Dentinschichtstärke im gesamten Untersuchungszeitraum von 120 min zu keiner messbaren Extinktion mehr, sodass von einem vollständigen Zelltod ausgegangen werden kann.

Diskussion

Methodische Aspekte

Zellkulturmodelle dienen der initialen Prüfung der unspezifischen Zytotoxizität und damit der biologischen Charakterisierung dentaler Werkstoffe. Zur Analyse der zytotoxischen Eigenschaften von Adhäsivsystemen werden Prüfsysteme empfohlen, die durch eine Diffusionsbarriere in Form von Dentinprüfkörpern einen indirekten Kontakt zwischen Testmaterial und Zielzellen herstellen und somit die Situation der klinischen Applikationsform simulieren (VAJRABHAYA et al. 2003; SCHMALZ et al. 2002, 1999, 1996; BOUILLAGUET et al. 1998; HANKS et al. 1988). Als Vergleichsgrösse sollte ein in seinem biologischen Verhalten bekanntes Material Verwendung finden, sodass in der vorliegenden Untersuchung eine 35%ige H_2O_2 -Lösung als Positivkontrolle appliziert wurde, deren starke Toxizität vielfach nachgewiesen wurde. Erwartungsgemäss konnte nach Auftragen der H_2O_2 -Lösung keine Enzymaktivität der L-929-Fibroblasten mehr nachgewiesen werden.

Aufgrund der ähnlichen Zusammensetzung, Dichte und Diffusionseigenschaften von bovinem und humanem Dentin werden bovine Prüfkörper in zahlreichen Untersuchungen zur Toxizität von Adhäsivsystemen verwendet (GALLER et al. 2005; SCHMALZ et al. 2002, 2001, 1996; SCHILKE et al. 2000). Im Vergleich zu humanem Dentin weisen bovine Prüfkörper eine geringere Variabilität der Perfusionseigenschaften auf (SCHMALZ et al. 2001) und können in grösserer Masse aus kariesfreien Zähnen gewonnen werden, sodass eine hohe Homogenität der Prüfkörper erzielt

werden kann. Da eine Korrelation zwischen dem elektrischen Widerstand von Dentin und der Dentintubulidichte besteht (GENTE & BECKER-DETERT 1991; GENTE & WENZ 1991), wurde in der vorliegenden Untersuchung zusätzlich die elektrische Leitfähigkeit der 1,0 mm, 1,5 mm und 2,5 mm schichtstarken Proben bestimmt. Durch dieses Vorgehen wurde sichergestellt, dass Prüfkörper mit gleicher Schichtstärke auch gleiche Permeabilitätseigenschaften aufweisen.

Auch Permanentzelllinien werden in Dentinbarrieretests häufig eingesetzt, da sie einfach zu kultivieren sind und ein reproduzierbares Wachstumsverhalten aufweisen.

In verschiedenen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass sich Primärkulturen aus humanen pulpalen oder gingivalen Fibroblasten hinsichtlich der Sensitivität gegenüber Kompositmaterialien von Permanentzelllinien unterscheiden (MOODLEY et al. 2005; GROBLER et al. 2004; HUANG et al. 2002; THONEMANN et al. 2002). Dabei waren im Vergleich zu Permanentzelllinien entweder höhere (GROBLER et al. 2004; THONEMANN et al. 2002) oder niedrigere Konzentrationen (MOODLEY et al. 2005; HUANG et al. 2002) der Testmaterialien notwendig, um die gleiche zelluläre Reaktion in der Primärkultur zu induzieren. Insgesamt ist die Rangfolge der Toxizität verschiedener Kompositmaterialien in Primär- und Permanentzellkulturen jedoch identisch oder ähnlich, sodass die Anwendung von Permanentzelllinien für Zytotoxizitätstests durchaus angemessen ist und empfohlen wird.

Die verwendete Prüfkammer wurde in Anlehnung an das Modell von SCHMALZ et al. (1996) entwickelt und erlaubt neben der Diffusion des Testmaterials auch die Perfusion des Dentinprüfkörpers. Die Perfusion der Dentinscheibe dient der Simulation der Mikrozirkulation in der Pulpa, die für den Abtransport potenzieller toxischer Substanzen verantwortlich ist. Die Perfusionsrate von 2 ml/h orientiert sich an Untersuchungen von KIM et al. (1990), KIM (1985), MATTHEWS & ANDREW (1995), die eine pulpale Blutflussgeschwindigkeit von 0,6 bis 5 ml/h feststellen konnten. Obwohl die Bestimmung der unspezifischen Zytotoxizität der L-929 Fibroblasten durch eine indirekte Analyse (Applikation des perfundierten Eluats) vorgenommen wurde, ermöglicht das Prüfsystem standardisierte und reproduzierbare Versuchsbedingungen und erlaubt einen Vergleich der verschiedenen Adhäsivsysteme hinsichtlich ihrer unspezifischen Zytotoxizität.

Zytotoxizität der Adhäsivsysteme

In der vorliegenden Untersuchung zeigten die untersuchten Eluate der Self-Etch-Adhäsivsysteme Xeno III, Clearfil SE Bond, One up Bond F und Resulcin Aqua Prime & Monobond zytotoxisches Potenzial. Insgesamt war die Toxizität aller Materialien jedoch mit zunehmender Schichtstärke und Perfusionsdauer der Dentinprüfkörper deutlich rückläufig.

Zahlreiche Untersuchungen zeigten, dass verschiedene Bestandteile der Adhäsivsysteme, z. B. Monomere oder Fotoinitiatoren, zytotoxische Effekte auslösen können (SCHMALZ et al. 2005; OLIVEIRA MAMEDE et al. 2004; HUANG & CHANG 2002; THONEMANN et al. 2002; KAGA et al. 2001). Das Ausmass der Toxizität ist sowohl von der Permeabilität des Dentins und der Diffusionsgeschwindigkeit der Adhäsivbestandteile als auch von der Sensitivität der verwendeten Zellen abhängig.

BOUILLAGUET et al. (1998) und GALLER et al. (2005) konnten nachweisen, dass die toxischen Auswirkungen von Adhäsivsystemen mit zunehmender Dentinschichtstärke und abnehmender Permeabilität der Dentinprüfkörper deutlich reduziert werden. Fer-

ner kann die nach Präparation des Dentins vorhandene Schmier-schicht die Diffusion von Monomeren reduzieren (PASHLEY et al. 1988). Die Toxizität der Materialien wird ausserdem von der Perfusion des Dentins beeinflusst und ist mit zunehmender Perfusionsgeschwindigkeit und -dauer deutlich rückläufig (SCHMALZ et al. 2002, 2001, 1999; BOUILLAGUET et al. 1998).

Die Dentindiffusion ist ferner vom Molekulargewicht und der Wasserlöslichkeit der Adhäsivbestandteile abhängig, wobei kleinere hydrophile Monomere, z.B. HEMA, schneller durch das Dentin diffundieren und somit initial ein grösseres toxisches Potenzial aufweisen als grössere Methacrylate, z.B. Bis-GMA (THONEMANN et al. 2002; KAGA et al. 2001; HAMID & HUME 1997a; HAMID & HUME 1997b; BOUILLAGUET et al. 1996; GERZINA & HUME 1995). Im weiteren zeitlichen Verlauf zeigen dann jedoch lipophile Monomere, z.B. Bis-GMA, aufgrund ihrer besseren Membrangängigkeit ein grösseres zytotoxisches Potenzial (OLIVEIRA MAMEDE et al. 2004; SZEP et al. 2002; YOSHII 1997). Methacrylate können mit zellulärem Cholesterin und Phospholipiden interagieren und somit zu Veränderungen von membrangebundenen Funktionen führen. Ferner können mitochondriale Membranstrukturen verändert und die ATP-Synthese inhibiert werden. Grundsätzlich können einzelne Adhäsivbestandteile sowohl synergistisch, additiv oder antagonistisch wirken und die enzymatische Zellaktivität reduzieren (HASHIEH et al. 1999; RATANASATHIEN et al. 1995). Auch Fotoinitiatoren, z.B. Campherchinon, können über die Bildung freier Radikale zytotoxisches und mutagenes Potenzial entfalten (GEURTSSEN et al. 1999a; 1999b). Ebenso konnte in vitro nachgewiesen werden, dass das in einigen Adhäsivsystemen enthaltene Glutaraldehyd mutagen wirken kann (SCHWEIKL & SCHMALZ 1999).

Die Monomer-Freisetzung aus Adhäsivsystemen oder Komponenten ist zunächst von dem Konversionsgrad der Materialien abhängig. Verschiedene Untersuchungen konnten daher zeigen, dass die Polymerisationsdauer und die Art der verwendeten Polymerisationslampen somit indirekt auch die Zytotoxizität dentaler Restaurationsmaterialien und Adhäsivsysteme beeinflussen können (SPAGNUOLO et al. 2004; ROLL et al. 2004; KAGA et al. 2001; SLETTEN & DAHL 1999). Allerdings können verschiedene Materialbestandteile auch im Anschluss an die Polymerisation durch Erosion oder Degradation freigesetzt werden.

Bislang liegen nur sehr wenige Untersuchungen zur Zytotoxizität von Self-Etch-Adhäsivsystemen vor. VAJRABHAYA et al. (2003) stellten fest, dass die Applikation von «Etch & Rinse-Adhäsivsystemen auf 500 µm dicken Dentinscheiben zu einer grösseren Reduktion von L-929-Fibroblasten führte als die Anwendung eines Self-Etch-Adhäsivsystems. Ebenso konnten HUANG & CHANG (2002), HASHIEH et al. (1999) und VAJRABHAYA et al. (2003) in vitro nachweisen, dass Self-Etch-Adhäsivsysteme eine geringere Toxizität aufweisen als konventionelle «Etch & Rinse»-Adhäsivsysteme. SCHMALZ et al. (2002) zeigten, dass das selbstätzende Adhäsivsystem Prompt-L-Pop trotz seines deutlich niedrigeren pH-Wertes (pH: 1) weniger zytotoxisch war als verschiedene konventionelle Mehrkomponenten-Systeme mit einem pH-Wert zwischen 4 und 6, die in der «Etch & Rinse»-Technik eingesetzt werden.

Als Ursache für die höhere Zytotoxizität der «Etch & Rinse»-Systeme wird die mit der Phosphorsäurekonditionierung der Mehrkomponenten-Adhäsive einhergehende Erhöhung der Permeabilität des Dentins diskutiert, die zu einer besseren Diffusion der toxischen Bestandteile führen kann (VAJRABHAYA et al. 2003). SCHMALZ et al. (2001) und GALLER et al. (2005) wiesen hingegen nach, dass die Wirkung der Säurekonditionierung auf die oberste Dentinschicht begrenzt ist und eine signifikante

Zunahme der Permeabilität erst bei Dentinschichtstärken von weniger als 300 µm zu verzeichnen ist.

In der vorliegenden Untersuchung zeigte Adper Prompt-L-Pop ein signifikant geringeres toxisches Potenzial als Xeno III, Clearfil SE Bond, One up Bond F und Resulcin Aqua Prime & Monobond. Im Vergleich zum Basiswert löste die Applikation von Adper Prompt-L-Pop weder bei 2,5 und 1,5 mm schichtstarken noch bei 1,0 mm dicken Dentinprüfkörpern zytotoxische Reaktionen aus. Auch GALLER et al. (2005) konnten kürzlich zeigen, dass Prompt-L-Pop erst bei Anwendung auf Dentinprüfkörpern mit einer Schichtstärke von weniger als 500 µm zytotoxische Reaktionen auslöste. Im Gegensatz dazu können Xeno III, Clearfil SE Bond, One up Bond F und Resulcin Aqua Prime & Monobond auch bei deutlich höheren Dentinschichtstärken von 1,0 bis 1,5 mm Zellirritationen hervorrufen. Diese zytotoxischen Effekte sind jedoch zeitlich begrenzt und nach einer Perfusionsdauer von 30 min nicht mehr nachweisbar. Das unterschiedliche zytotoxische Potenzial von Adper Prompt-L-Pop im Vergleich zu den Adhäsivsystemen Xeno III, Clearfil SE Bond, One up Bond F und Resulcin Aqua Prime & Monobond könnte ebenfalls auf Unterschiede in der Produktzusammensetzung der einzelnen Materialien zurückzuführen sein. Hierbei ist eine Wertung der vorliegenden verwendeten Materialien aber nur schwerlich möglich, da die untersuchten Materialien sehr heterogen aufgebaut sind. Weitere Untersuchungen müssen daher durchgeführt werden, um mögliche zytotoxische Komponenten der Materialien zu identifizieren sowie die Kinetik der zytotoxischen Reaktion zu identifizieren.

Die vorliegende In-vitro-Untersuchung zeigt, dass die Applikation von Self-Etch-Adhäsivsystemen auf Dentin mit einer Schichtstärke von weniger als 1,5 mm zytotoxische Reaktionen auslösen kann. Die Zytotoxizität der Materialien ist jedoch zeitlich limitiert und nimmt mit steigender Dentinschichtstärke ab. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob sich die zytotoxischen Eigenschaften selbstätzender «Non-Rinse»-Adhäsive von Systemen unterscheiden, die im Sinne der Total-Ätz-Technik («Etch & Rinse») angewendet werden. Dabei könnte es von besonderem Interesse sein, welche dieser Adhäsivsysteme bei pulpanahem Dentin geringere Zytotoxizitäten aufweisen und somit speziell für diese Anwendung geeignet sind.

Summary

WIEGAND A, CASPAR C, BECKER K, WERNER C, ATTIN T: **In vitro cytotoxicity of different self-etching dental adhesive systems** (in German). Schweiz Monatsschr Zahnmed 116: 614–621 (2006)

The study evaluated the cytotoxicity of five self-etching dentin adhesive systems applied on dentin specimens of different thicknesses.

The test materials (A: Adper Prompt-L-Pop, B: Xeno II, C: Clearfil SE Bond, D: One up Bond F, E: Resulcin Aqua Prime & Monobond) and a positive control (35% H₂O₂) were applied on 1.0, 1.5 and 2.5 mm thick bovine dentin specimens (each subgroup n = 5) in a dentin barrier test device. The experiments were performed with perfusion (2 ml/h) of the pulpal part of the chamber. The eluates were obtained before (baseline) and 15, 30, 45, 60 and 120 min after application of the adhesives and pipetted onto L-929 fibroblasts. Cytotoxicity of the materials was determined in relation to the baseline value using the MTT assay and statistical analysis was performed by ANOVA.

After 15 min perfusion, test materials B–E applied on 1.0 mm and B and E applied on 1.5 mm dentin specimens exhibited cytotoxic

potential. However, after 30 min perfusion none of the adhesives showed any toxicity. Cytotoxicity decreased with increasing thickness of the dentin slices and was lower for Adper Prompt-L-Pop compared to adhesives B-E.

Self-etching adhesive systems might exhibit cytotoxic potential when applied on dentin of less than 1.5 mm thickness. However, cytotoxicity of the materials decreased with increasing dentin thickness and increasing duration of perfusion.

Résumé

Le but de cette étude *in vitro* était d'évaluer la cytotoxicité de cinq systèmes d'adhésion dentinaire de type «automordant», après application sur des spécimens dentinaires d'une épaisseur différente.

Des disques de dentine bovine (1,0, 1,5 et 2,5 mm d'épaisseur: n=5 par groupe) ont été mis sous perfusion (2 ml/h) dans un milieu de culture cellulaire situé dans une chambre en polycarbonate. Les adhésifs dentinaires automordants suivants ont été appliqués du côté opposé de la pulpe: Adper Prompt-L-Pop (A); Xeno III (B); Clearfil SE Bond (C); One up Bond F (D); Resulcin Aqua Prime & Monobond (E). Le H₂O₂ 35% (F) servait de contrôle. Les surnageants ont été collectionnés avant (baseline) et 15, 30, 45, 60 et 120 minutes après application de l'adhésif, puis ajoutés aux cultures de fibroblastes (L-929). La réponse cellulaire a été déterminée par la méthode du MIT et comparée à la valeur «baseline», en appliquant l'analyse statistique ANOVA (p < 0,05). Après 15 minutes de perfusion, les matériaux expérimentaux B-E, appliqués sur un échantillon dentinaire de 1,5 mm, montraient des effets cytotoxiques. En revanche, après 30 minutes, aucun des adhésifs testés ne révélait un effet de cytotoxicité. En fait, la cytotoxicité diminuait avec une épaisseur croissante de dentine et était plus faible pour le Adper-Prompt-L-Pop comparé aux adhésifs B-E.

Il peut être conclu que les systèmes d'adhésion dentinaire automordants montrent un potentiel cytotoxique quand ils sont appliqués sur de la dentine d'une épaisseur inférieure à 1,5 mm. En revanche, la cytotoxicité des matériaux testés diminuait en fonction d'une épaisseur dentinaire croissante et d'une durée de perfusion prolongée.

Literaturverzeichnis

- ABEBE W, PASHLEY D H, RUEGGERBERG F A: Vasorelaxant effect of resin-based, single-bottle dentin bonding systems. *J Endod* 31: 194–197 (2005)
- ACCORINTE M L, LOGUERCIO A D, REIS A, MUENCH A, DE ARAUJO V C: Adverse effects of human pulps after direct pulp capping with the different components from a total-etch, three-step adhesive system. *Dent Mater* 21: 599–607 (2005)
- BOUILLAGUET S, VIRGILLITO M, WATAHA J, CIUCCHI B, HOLZ J: The influence of dentine permeability on cytotoxicity of four dentine bonding systems, *in vitro*. *J Oral Rehabil* 25: 45–51 (1998)
- BOUILLAGUET S, WATAHA J C, HANKS C T, CIUCCHI B, HOLZ J: *In vitro* cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. *J Endod* 22: 244–248 (1996)
- BUONOCORE M G: A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res* 34: 849–853 (1955)
- CAMPS J, TARDIEU C, DEJOU J, FRANQUIN J C, LADAIQUE P, RIEU R: *In vitro* cytotoxicity of dental adhesive systems under simulated pulpal pressure. *Dent Mater* 13: 34–42 (1997)
- COX C F, KIM K M, STEVENSON R G, III, HAFEZ A A: Histological evaluation of a self-priming etchant adhesive system. *Compend Contin Educ Dent* 24: 17–20 (2003)
- DEMARCO F F, TARQUINIO S B, JAEGER M M, DE ARAUJO V C, MATSON E: Pulp response and cytotoxicity evaluation of 2 dentin bonding agents. *Quintessence Int* 32: 211–220 (2001)
- GALLER K, HILLER K A, ETTL T, SCHMALZ G: Selective influence of dentin thickness upon cytotoxicity of dentin contacting materials. *J Endod* 31: 396–399 (2005)
- GENTE M, WENZ H J: Nicht-invasive Methode zur Dentinwiderstandsmessung zur Begrenzung der Präparationstiefe. *Dtsch Zahnärztl Z* 46: 771–773 (1991)
- GENTE M, BECKER-DETERT D: Untersuchungen zum unspezifischen elektrischen Widerstand des Dentins menschlicher Zähne. *Dtsch Zahnärztl Z* 46: 803–806 (1991)
- GERZINA T M, HUME W R: Effect of hydrostatic pressure on the diffusion of monomers through dentin *in vitro*. *J Dent Res* 74: 369–373 (1995)
- GEURTSSEN W, SPAHL W, LEYHAUSEN G: Variability of cytotoxicity and leaching of substances from four light-curing pit and fissure sealants. *J Biomed Mater Res* 44: 73–77 (1999a)
- GEURTSSEN W, SPAHL W, MULLER K, LEYHAUSEN G: Aqueous extracts from dentin adhesives contain cytotoxic chemicals. *J Biomed Mater Res* 48: 772–777 (1999b)
- GRÉGOIRE G, MILLAS A: Microscopic evaluation of dentin interface obtained with 10 contemporary self-etching systems: correlation with their pH. *Oper Dent* 30: 481–491 (2005)
- GROBLER S R, OLIVIER A, MOODLEY D, VAN KOTZE T W: Cytotoxicity of two concentrations of a dentine bonding agent on mouse 3T3 and human pulp fibroblast cell-lines. *SADJ* 59: 368–370 (2004)
- HALLER B: Recent developments in dentin bonding. *Am J Dent* 13: 44–50 (2000)
- HAMID A, HUME W R: Diffusion of resin monomers through human carious dentin *in vitro*. *Endod Dent Traumatol* 13: 1–5 (1997a)
- HAMID A, HUME W R: The effect of dentine thickness on diffusion of resin monomers *in vitro*. *J Oral Rehabil* 24: 20–25 (1997b)
- HANKS C T, CRAIG R G, DIEHL M L, PASHLEY D H: Cytotoxicity of dental composites and other materials in a new *in vitro* device. *J Oral Pathol* 17: 396–403 (1988)
- HASHIEH I A, COSSET A, FRANQUIN J C, CAMPS J: *In vitro* cytotoxicity of one-step dentin bonding systems. *J Endod* 25: 89–92 (1999)
- HUANG F M, CHANG Y C: Cytotoxicity of dentine-bonding agents on human pulp cells *in vitro*. *Int Endod J* 35: 905–909 (2002)
- HUANG T H, TSAI C Y, CHEN S L, KAO C T: An evaluation of the cytotoxic effects of orthodontic bonding adhesives upon a primary human oral gingival fibroblast culture and a permanent, human oral cancer-cell line. *J Biomed Mater Res* 63: 814–821 (2002)
- KAGA M, NODA M, FERRACANE J L, NAKAMURA M, OGUCHI H, SANO H: The *in vitro* cytotoxicity of eluates from dentin bonding resins and their effect on tyrosine phosphorylation of L929 cells. *Dent Mater* 17: 333–339 (2001)
- KIM S: Microcirculation of the dental pulp in health and disease. *J Endod* 11: 465–471 (1985)
- KIM S, LIU M, MARKOWITZ K, BILOTTO G, DORSCHER-KIM J: Comparison of pulpal blood flow in dog canine teeth determined by the laser Doppler and the 133xenon washout methods. *Arch Oral Biol* 35: 411–413 (1990)
- KOLINIOTOU-KOUBIA E, DIONYSOPOULOS P, KOULAOUZIDOU E A, KORTSARIS A H, PAPADOGIANNIS Y: *In vitro* cytotoxicity of six dentin bonding agents. *J Oral Rehabil* 28: 971–975 (2001)

- LOPES G C, BARATIERI L N, DE ANDRADA M A, VIEIRA L C: Dental adhesion: present state of the art and future perspectives. *Quintessence Int* 33: 213–224 (2002)
- MATTHEWS B, ANDREW D: Microvascular architecture and exchange in teeth. *Microcirculation* 2: 305–313 (1995)
- MOODLEY D, GROBLER S R, OLIVLER A: Cytotoxicity of a dentine bonding agent on four different cell-lines. *SADJ* 60: 234–236 (2005)
- OLIVEIRA MAMEDE L F, WALTHER U, EL MAHDI K, HAFFNER C, KEHE K, SEISS M, HICKEL R, FOLWACZNY M, REICHL F X: Zytotoxizität von (Ko)Monomeren an primären humanen Gingiva- und Pulpafibroblasten. *Dtsch Zahnärztl Z* 59: 648–649 (2004)
- PASHLEY D H, DERKSON G D, TAO L, DERKSON M, KALATHOOR S: The effects of a multi-step dentin bonding system on dentin permeability. *Dent Mater* 4: 60 (1988)
- RATANASATHIEN S, WATAHA J C, HANKS C T, DENNISON J B: Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res* 74: 1602–1606 (1995)
- ROLL E B, DAHL J E, RUNNINGEN G, MORISBAK E: In vitro cell death induced by irradiation and chemicals relevant for dental applications; dose-response and potentiation effects. *Eur J Oral Sci* 112: 273–279 (2004)
- SCHILKE R, LISSON J A, BAUSS O, GEURTSSEN W: Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol* 45: 355–361 (2000)
- SCHMALZ G, GARHAMMER P, SCHWEIKL H: A commercially available cell culture device modified for dentin barrier tests. *J Endod* 22: 249–252 (1996)
- SCHMALZ G, GEURTSSEN W, ARENHOLT-BINDSLEV D: Die Biokompatibilität von Komposit-Kunststoffen. *Dtsch Zahnärztl Z* 60: 563–570 (2005)
- SCHMALZ G, HILLER K A, NUNEZ L J, STOLL J, WEIS K: Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. *J Endod* 27: 23–30 (2001)
- SCHMALZ G, SCHUSTER U, KOCH A, SCHWEIKL H: Cytotoxicity of low pH dentin-bonding agents in a dentin barrier test in vitro. *J Endod* 28: 188–192 (2002)
- SCHMALZ G, SCHUSTER U, NUETZEL K, SCHWEIKL H: An in vitro pulp chamber with three-dimensional cell cultures. *J Endod* 25: 24–29 (1999)
- SCHWEIKL H, SCHMALZ G: Triethylene glycol dimethacrylate induces large deletions in the hprt gene of V79 cells. *Mutation Res* 438: 71–78 (1999)
- SLETTEN G B, DAHL J E: Cytotoxic effects of extracts of comonomers. *Acta Odontol Scand* 57: 316–322 (1999)
- SOUZA COSTA C A, DO NASCIMENTO A B, TEIXEIRA H M: Response of human pulps following acid conditioning and application of a bonding agent in deep cavities. *Dent Mater* 18: 543–551 (2002)
- SPAGNUOLO G, ANNUNZIATA M, RENGO S: Cytotoxicity and oxidative stress caused by dental adhesive systems cured with halogen and LED lights. *Clin Oral Investig* 8: 81–85 (2004)
- SZEP S, KUNKEL A, RONGE K, HEIDEMANN D: Cytotoxicity of modern dentin adhesives – in vitro testing on gingival fibroblasts. *J Biomed Mater Res* 63: 53–60 (2002)
- THONEMANN B, SCHMALZ G, HILLER K A, SCHWEIKL H: Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent Mater* 18: 318–323 (2002)
- VAJRABHAYA L O, PASASUK A, HARNIRATTISAI C: Cytotoxicity evaluation of single component dentin bonding agents. *Oper Dent* 28: 440–444 (2003)
- VAN MEERBEEK B, DE MUNCK J, YOSHIDA Y, INOUE S, VARGAS M, VIJAY P, VAN LANDUYT K, LAMBRECHTS P, VANHERLE P: Buonocore Memorial Lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent* 28: 215–235 (2003)
- VAN MEERBEEK B, VARGAS M, INOUE S, YOSHIDA Y, PEUMANS M, LAMBRECHTS P, VANHERLE G: Adhesives and cements to promote preservation dentistry. *Oper Dent Suppl* 6: 119–144 (2001)
- YOSHII E: Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res* 37: 517–524 (1997)