

Aus der Klinik für Kieferorthopädie  
(Direktor: Prof. H. Fischer–Brandies)  
an der Christian–Albrechts–Universität zu Kiel

**Bioverträgliche Ästhetik in der Kieferorthopädie:  
Vergleichende Studie von kieferorthopädischen  
Polymer–Harz–Bögen mit superelastischen NiTi–Bögen  
hinsichtlich ihrer Bioverträglichkeit in vitro**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Würde  
eines Doktors der Zahnheilkunde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian–Albrechts–Universität  
zu Kiel

vorgelegt von

**Peter–Andreas Schneeberg**

aus Kiel

Kiel 2013

**1. Berichtstatter:** Prof. Dr. H. Fischer-Brandies  
**2. Berichtstatter:** Prof. Dr. Dr. Jörg Wiltfang  
**Tag der mündlichen Prüfung:** 06.06.2014  
**Zum Druck genehmigt, Kiel,** 06.06.2014

**gez.:** Priv.-Doz. Dr. Dr. Volker Gassling  
**(Vorsitzender der Prüfungskommission)**

## INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Ästhetik im Verlauf einer Bissregulierung	1
1.2 NiTi-Verbindungen in der Kieferorthopädie	2
1.3 Polymere in der Kieferorthopädie	3
1.4 Bioverträglichkeitsuntersuchungen	4
1.5 Fragestellung	6
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>7</b>
2.1 Probenmaterial	7
2.2 Zellkultur	8
2.2.1 Fibroblastenkultivierung	9
2.2.2 Keratinozytenkultivierung	11
2.3 Bioverträglichkeitsprüfungen	12
2.3.1 Quantitative Untersuchungen	12
2.3.1.1 Direkte Testmethode - Zellwachstumsprüfungen auf Probenkörpern	12
2.3.1.2 Indirekte Testmethode - Probenherstellung und Eluatgewinnung	13
2.3.1.3 Testverfahren	14
2.3.1.3.1 MTT-Test	14
2.3.1.3.2 XTT-Test	16
2.3.1.3.3 BCA-Test	17
2.3.1.3.4 LHA-Test	18
2.3.2 Qualitative Untersuchungen	19
2.3.2.1 Giemsa-Färbung und Lichtmikroskopie	20
2.3.2.2 Rasterelektronenmikroskopie	21
2.4 Photometrie	21

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>23</b>
3.1	Quantitative Untersuchungsergebnisse	23
3.1.1	Ergebnisse der direkten Tests	24
3.1.2	Ergebnisse der indirekten Tests	26
3.2	Qualitative Untersuchungsergebnisse	27
3.2.1	Morphologische Ergebnisse bei NiTi–Proben	27
3.2.2	Morphologische Ergebnisse bei Optis–Proben	28
3.2.3	Strukturelle Oberflächenveränderungen der Proben	30
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>34</b>
4.1	Bewertung der Methoden	34
4.1.1	Variabilität in der Zellkultur	34
4.1.2	Bewertung der Probenherstellung	35
4.1.3	Bioverträglichkeitstests im Vergleich	36
4.1.4	Bewertung der lichtmikroskopischen Untersuchung	38
4.1.5	Bewertung der Oberflächenuntersuchung im REM	39
4.2.	Bewertung der Ergebnisse	40
4.2.1	Vergleich der Statistikergebnisse	40
4.2.2	Bewertung gefärbter Zellkulturen mit Probenkörpern	42
4.2.3	Oberflächenbewertung im REM	45
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>54</b>
<b>8</b>	<b>Veröffentlichung</b>	<b>62</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>63</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>64</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	NiTi-Bogen mit Metallbrackets	3
Abb. 2:	Polymer-Glasfaser-Bogen mit Kompositbrackets	3
Abb. 3:	Fibroblasten aus 2. Passage	8
Abb. 4:	Keratinocyten aus 4. Passage	8
Abb. 5:	Aufnahme eines MTT-Testansatzes in einer 96-well-Kulturplatte	15
Abb. 6:	Giemsa-Färbung: Fibroblasten nach 11 Tagen. Wachstum mit Optis	20
Abb. 7:	Darstellung der Bioverträglichkeiten mit Standardabweichung in % von NiTi und Optis mit Fibroblasten nach 24 und 48 Stunden für den MTT, XTT, BCA und LHA Test	25
Abb. 8:	Darstellung der Bioverträglichkeiten mit Standardabweichung in % von NiTi und Optis mit Epithel nach 24 und 48 Stunden für den MTT, XTT, BCA und LHA Test	25
Abb. 9:	Darstellung der Bioverträglichkeiten mit Standardabweichung von NiTi und Optis mit Fibroblasten nach 24 und 48 Stunden für die Eluate von 10%, 50% und 100% für den XTT-Test	26
Abb. 10:	Darstellung der Bioverträglichkeiten mit Standardabweichung von NiTi und Optis mit Epithel nach 24 und 48 Stunden für die Eluate von 10%, 50% und 100% für den XTT-Test	26
Abb. 11:	NiTi (neu) im Fibroblastenzellrasen	27
Abb. 12:	Fibroblasten-Negativkontrolle	27
Abb. 13:	NiTi(neu) im Epithelzellrasen	28
Abb. 14:	Epithelzellen - Negativkontrolle	28
Abb. 15:	Fibroblastenrasen unter Optis-probe	29
Abb. 16:	Epithelzellrasen unter Optis-probe	29
Abb. 17:	REM-Aufnahme eines neuen NiTi-Bogens (Schnittkante)	30
Abb. 18:	REM-Aufnahme eines neuen Optis-Bogens (Schnittkante)	30
Abb. 19:	Lichtmikroskopische Aufnahme eines Optis preformed archwire	31
Abb. 20:	REM- Aufnahme eines neuen NiTi-Bogens (Mitte)	31
Abb. 21:	REM-Aufnahme eines neuen Optis-Bogens (Mitte)	31
Abb. 22:	NiTi-Mitte aus LHA-Test	33
Abb. 23:	Optis-Mitte aus LHA-Test	33
Abb. 24:	NiTi-Kante aus LHA-Test	33
Abb. 25:	Optis-Kante aus LHA-Test	33
Abb. 26:	Fibroblastenwachstum um Stahldraht	44
Abb. 27:	Fibroblastenwachstum um NiTi-Probe	44
Abb. 28:	Fibroblastenabriss nach Entfernung der NiTi-Probe	44

Abb. 29:	Epithelzellwachstum um Optis-Probe	44
Abb. 30:	NiTi-Mitte aus XTT-Test nach 24 Stunden	46
Abb. 31:	NiTi-Mitte aus XTT-Test nach 48 Stunden	46
Abb. 32:	NiTi-Mitte aus BCA-Test nach 24 Stunden	46
Abb. 33:	NiTi-Mitte aus BCA-Test nach 48 Stunden	46
Abb. 34:	Optis-Mitte aus XTT-Test nach 24 Stunden	47
Abb. 35:	Optis-Mitte aus XTT-Test nach 48 Stunden	47
Abb. 36:	Optis-Mitte aus BCA-Test nach 24 Stunden	48
Abb. 37:	Optis-Mitte aus BCA-Test nach 48 Stunden	48

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Angaben zu den kieferorthopädischen Proben dieser Studie	8
Tab. 2:	Mediumansatz	10
Tab. 3:	komplettiertes Fibroblastenmedium, phenolrotfrei	10
Tab. 4:	komplettiertes Kerationzytenmedium	11
Tab. 5:	Übersicht über die in dieser Studie angewendeten quantitativen Testverfahren	14
Tab. 6:	Mikrotiterplattenbelegung im direkten Zellvitalitätstest (XTT-, MTT-, BCA- und LHA-Test)	17
Tab. 7:	Messbereiche der Extinktionsmaxima	22
Tab. 8	Gesamtbeurteilung des Zellwachstumsverhaltens der Zellen mit den Probenkörpern	29
Tab. 9a:	Oberflächen von Nickel-Titan-Bögen und Polymerharz-Bögen (neu) im Vergleich.	32
Tab. 9b:	Oberflächen von Nickel-Titan-Bögen und Polymerharz-Bögen (getestet) im Vergleich.	32
Tab. 10a:	Mittelwerte und Standardabweichungen der direkten Tests von M, NK, M+OP, M+NiTi, F+OP, F+NiTi für 24 bzw. 48 Std.	54
Tab. 10b:	Mittelwerte und Standardabweichungen der direkten Tests von M, NK, M+OP, M+NiTi, E+OP, E+NiTi für 24 bzw. 48 Std.	55
Tab. 11a:	Mittelwerte und Standardabweichungen der indirekten Tests von M, NK, M+OP, M+NiTi, F+OP, F+NiTi, für 24 bzw. 48 Std.	56
Tab. 11b:	Mittelwerte und Standardabweichungen der indirekten Tests von M, NK, M+OP, M+NiTi, E+OP, E+NiTi, für 24 bzw. 48 Std.	57
Tab. 12:	Shapiro-Wilks Test	58
Tab. 13:	t-Statistik für Epithel und Fibroblasten mit Optis und NiTi der direkten Tests bei 24 Stunden versus 48 Stunden	59
Tab. 14:	t-Statistik für Epithel und Fibroblasten mit Optis und NiTi der indirekten Tests bei 24 Stunden versus 48 Stunden	59
Tab. 15a:	t-Statistik für Epithel und Fibroblasten mit Optis und NiTi der direkten Tests bei 24 Stunden	60
Tab. 15b:	t-Statistik für Epithel und Fibroblasten mit Optis und NiTi der direkten Tests bei 48 Stunden	60
Tab. 16a:	t-Statistik für Epithel und Fibroblasten mit Optis und NiTi der indirekten Tests bei 24 Stunden	61
Tab. 16b:	t-Statistik für Epithel und Fibroblasten mit Optis und NiTi der indirekten Tests bei 48 Stunden	61

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BCA	bicinchoninic acid
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DIN	Deutsches Institut für Normung
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Epithelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EN	Europäische Norm
F	Fibroblasten
HB	Hämoglobin
HCl	Chlorwasserstoff
hEGF	human epidermal growth factor
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
KFO	Kieferorthopädie
KGM	Firmenname eines Keratinozytenmediums
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
LHA	lysosomal-hexoaminidase-assay
M	Medium
MEM	Modified Eagle Medium
mM	millimol/Liter
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NAG	N-Acetylglucosamin
NiTi	Nickel–Titan
NK	Negativkontrolle
OP	Optis
PBS	phosphate buffered saline
PMMA	Polymethylmethacrylat
PMS	Phenanzinmethosulfat
REM	Rasterelektronenmikroskopie
SD	Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfate
Std	Stunden



## Abkürzungsverzeichnis

---

XTT	(2,3-bis (Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxyanilid)
Tab.	Tabelle

## **1 Einleitung**

### **1.1 Ästhetik im Verlauf einer Bissregulierung**

Die Entwicklung der Kieferorthopädie hat sich zu einem wichtigen Teilbereich der Zahnmedizin entwickelt, der sich traditionell mit der Beseitigung von Zahnfehlstellungen, der Okklusion und Fehlfunktionen des Kiefergelenks beschäftigt. Mittlerweile sind die Ansprüche auf diesem Gebiet über die rein medizinische Intention weit hinausgewachsen. Durch sämtliche Medien wird für ein perfektes Erscheinungsbild mit einer perfekten Okklusion geworben. Dabei spielen physische, psychische und vor allem auch soziale Komponenten eine ganz entscheidende Rolle. Eine fehlerhafte Bissstellung wird mit mangelnder Attraktivität gleichgestellt. Genau diese mangelnde Ästhetik wird als Statussymbol empfunden. Laut einer Studie [1] würden 24% der befragten Erwachsenen eine kieferorthopädische Behandlung von Zahnfehlstellungen aufgrund von Schmerzen vornehmen, aber 50% sofort aus ästhetischen Gründen.

Gerade dieser Wunsch nach Perfektion führt zum Anspruch einer Ästhetik, die nicht nur als Ergebnis einer Zahn- bzw. Bisskorrektur entsteht, sondern auch im Verlauf der Bissregulierung im Vordergrund stehen soll. Im Einklang mit dem Wunsch des Patienten kann der Erfolg einer kieferorthopädischen Therapie nur mit einer ausführlichen Patientenaufklärung über die kieferorthopädischen Maßnahmen und auch deren Risiken wie beispielsweise Kariesprädisposition, ästhetische Einbußen während der Behandlungsdauer, mögliche allergische Reaktionen oder Wurzelresorptionen einhergehen.

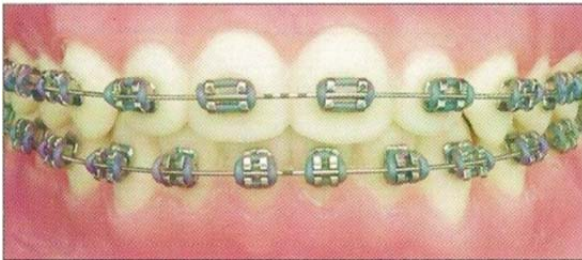
Alle diese Risiken werden im jugendlichen Alter eher in Kauf genommen oder sind zu dem Zeitpunkt oft nicht relevant. Erwachsene Patienten sind einerseits diejenigen, denen eine Zahnfehlstellung am meisten Probleme bereitet, die aber andererseits die Hauptträger oben genannter Risiken sind. Ästhetisches Bewusstsein ist allerdings keine Frage des Alters sondern ein individuelles Bewusstsein. Wurde früher eher eine ästhetische Verbesserung im Kinder- oder Jugendalter angestrebt, wird heute auf eine ästhetische Erscheinung gerade im fortgeschrittenen Alter Wert gelegt, weil man entweder im Jugendalter die kieferorthopädische Behandlung schlichtweg verpasst hat oder weil sich im Laufe der Jahre nachträgliche Bissveränderungen ergeben haben.

Kieferorthopädie wird also nicht durch das Alter limitiert, sie erreicht im fortschreitenden Alter sogar die optimale Akzeptanz [44]. Gerade der erwachsene Patient stellt aber an die Behandlung besonders hohe Ansprüche: eine kieferorthopädische Apparatur sollte einen akzeptablen Tragekomfort in Aussicht stellen und die Ästhetik des Kopfes nur minimal beeinflussen [25]. Sowohl Erwachsene für sich selbst als auch Eltern für ihre Kinder haben gegenüber Metallapplikationen die geringste Akzeptanz, da für sie Ästhetik die höchste Priorität hat [29]. Deshalb sind im Lauf der Zeit immer mehr möglichst ästhetische Apparaturen entwickelt worden, die natürlich die gleichen Anforderungen an den Behandlungserfolg stellen.

## **1.2 NiTi-Verbindungen in der Kieferorthopädie**

Bei einer kieferorthopädischen Behandlung mit festsitzenden Apparaturen kommen in der Regel Bögen aus unterschiedlichen Metalllegierungen zum Einsatz. Häufig fällt in der Nivellierungsphase die Wahl auf Bögen aus der intermetallischen quasi äquiatomaren NiTi-Legierung. Aufgrund ihrer außergewöhnlichen mechanischen Eigenschaften wie Superelastizität und Formgedächtniseffekt fand die Anfang der 60er Jahre von dem Naval Ordnance Laboratory in den USA entwickelte NiTi-Legierung „Nitinol“ in der orthodontischen Nutzung ein ideales Anwendungsgebiet. Seit 1994 werden Nickel-Titan-Drähte (Abb. 1) standardmäßig als festsitzende kieferorthopädische Apparatur eingesetzt, weil sie in der Lage sind, konstante Kräfte über einen sehr breiten Auslenkungsbereich abzugeben. Trotz ihres hohen Nickelanteils zeigen korrekt verarbeitete NiTi-Produkte eine gute in vitro Bioverträglichkeit auf. Der Grund hierfür liegt in dem besonderen atomaren Bindungsverhältnis einer intermetallischen Legierung. Dennoch ist der Einsatz von NiTi-Drähten im Fall einer nachgewiesenen Nickelallergie kontraindiziert. Zudem werden Metalldrähte unabhängig von ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften während der KFO-Behandlung häufig als „unästhetisch“ empfunden. McDonald und Cobourne [18] haben festgestellt, dass aber ästhetische Applikationen zu erhöhter Behandlungsakzeptanz und somit zu einem effektiveren Behandlungserfolg führen können. Eine ästhetische Alternative zur NiTi-Legierung könnten Verbundwerkstoffe sein, die ähnliche mechanische Eigenschaften

aufweisen, aber über eine gute optische Transluzenz verfügen beziehungsweise zahnfarben erscheinen.



**Abb. 1:** NiTi-Bogen mit Metallbrackets



**Abb. 2:** Polymer-Glasfaser-Bogen mit Kompositbrackets

### 1.3 Polymere in der Kieferorthopädie

Für Patienten, die sich an dem Aussehen der NiTi-Bögen stören oder aus Vorsichtsmaßnahmen metallfrei behandelt werden möchten, bietet sich durch Polymerbögen eine Alternative.

Die Nutzung von Polymeren begann mit der Vulkanisation von Naturkautschuk durch Goodyear im Jahre 1839. Ein entscheidender Wandel der Kunststoffverwendung in der Zahnmedizin vollzog sich in den 30er Jahren. 1936 wurde erstmalig das PMMA oder Plexiglas entdeckt. PMMA wurde durch seine physikalischen Eigenschaften bald zu einem vielfältig einsetzbaren Kunststoff im zahnmedizinischen Bereich [14]. Seit 1955 wurde dann die Herstellung von elastomeren Kunststoffen forciert, die letztendlich auch zu einer wesentlich größeren Bandbreite an Material führte. Man konnte endlich ein geeignetes Material zur Mundabformung nutzen. Danach wurden Kunststoffe wesentlich vielfältiger verwendet: zahnmedizinisch konservierend findet man sie beispielsweise in Füllungen, Adhäsiven oder Fissurenversiegelungen, prothetisch dienen sie unter anderem als Prothesenkörper, Prothesenzähne, Kronen- und Brückenverblendung, Befestigungszement sowie als Provisorien. Die in der Zahnmedizin meist genutzten Polymere sind heute Polymethacrylate und Polysiloxane. Anfang der 90iger Jahre kamen in der Zahnmedizin auch faserverstärkte Kunststoffe zum Einsatz.

Mit der recht späten Entwicklung der Kieferorthopädie und der noch viel späteren Nutzung geeigneter Polymere wurden diese in der Kieferorthopädie zunächst nur zur Herstellung herausnehmbarer Apparaturen und als Befestigung festsitzender Apparaturen verwendet.

Neueste Trends entwickelten dieses Material für herausnehmbare KFO–Apparaturen in verschiedenfarbigen, durchscheinenden Varianten mit Einlegebildern als besonderen Effekt. Komposites werden meistens als transparente, glasfaser-verstärkte Polycarbonate hergestellt (Dentaurum).

Neueste Alternativen zu den festsitzenden Apparaturen gerade für Erwachsene sind transparente Aligner, die eine ähnliche Korrektur der Zahnstellung erlauben. Amerikanische, orthodontische Firmen haben in ihrer Forschungstätigkeit inzwischen auch Kompositbrackets (Abb. 2), kunststoffanteilige Lip Bumper und Retainer entwickelt. Seit 2008 gibt es inzwischen auch ein Patent für einen Polymer-Glasfaser-Bogen (Abb. 2), der auch ein superelastisches Verhalten zeigen soll, ähnlich dem eines NiTi-Bogens.

In Deutschland ist diese patentierte Technologie übernommen worden. Es werden stabile Verbundkunststoffe hergestellt, die mit Nanofasern verstärkt werden (Nanostart AG). Diese Nanofüllstoffe sind der Grund für die ähnlichen, mechanischen Eigenschaften der benutzten Polymere wie die NiTi- Bögen [22]. Die Funktionalität diese Kunststoffe ist immer abhängig vom Typ, Qualität, Menge und Anordnung des Fasermaterials sowie von der Ummantelung der Fasern und die Verbindung zum umliegenden Gesamtpolymer. Daraus entsteht dann die Biegefestigkeit und Steifigkeit des entwickelten Materials. Zur Verstärkung werden Glas-, Karbon–Polyäthylen-, Keramik-oder Metalloxydfasern eingesetzt.

In dem Polymer-Glasfaser-Bogen Optis (TP Orthodontics) wurden in den Kompositaufbau Glasfasern zugesetzt. Die kieferorthopädische Funktionalität wurde in einer Patientenstudie nachvollzogen [6].

#### **1.4 Bioverträglichkeitsuntersuchungen**

Um Bioverträglichkeitsuntersuchungen zu standardisieren und damit Ergebnisse vergleichbar zu machen war es notwendig geworden, bestimmte Richtlinien zur Prüfung von Biomaterialien zu erstellen [21]. Diese Richtlinien sind durch die International Organization for Standardization (ISO) erarbeitet und unter anderem in der ISO 10993-58 (13) für Studien zur Biokompatibilität festgelegt worden.

Unter Biokompatibilität wird die Verträglichkeit zwischen einem technischen und einem biologischen System verstanden [43]. Dabei gilt: Je geringer der Einfluss auf die prozentuale Vitalität, desto höher die Biokompatibilität; je niedriger die prozentuale

Vitalität, desto höher das zytotoxische Potential. Eine Zellviabilität unter 70% wird als zytotoxisch eingestuft. Der Wirkstoff sollte für eine bestimmte Zeit einem biologischen System, in dem er mit Gewebe in Berührung kommt, ausgesetzt sein. Das Ergebnis der Bioverträglichkeit kann dann aber immer nur für diese untersuchten Gewebe aussagekräftig deklariert werden.

Für biokompatible Untersuchungen muss zunächst der Wirkstoff genau untersucht und charakterisiert werden. Es erfolgen In-Vitro-Untersuchungen, seltener auch In-Vivo-Untersuchungen. Das Ergebnis dieser In-Vitro-Tests kann zugleich auch als Hinweis auf die Korrosionsbeständigkeit des Werkstoffs gewertet werden, da in der Regel die Höhe der Zellproliferation in Anwesenheit des Werkstoffs Rückschlüsse auf eine intakte oder korrodierte Oberfläche des Werkstoffs zulässt. In-Vitro-Zelltests können sowohl qualitativ als auch quantitativ sein, aber sie sollten sich stets auf die DIN ISO 10993 beziehen.

Qualitative Tests können mit mikroskopischen Mitteln (Durchlicht, Fluoreszenz, Auflicht, REM) beurteilt werden. Quantitative Tests können über Vitalfärbungen, Proteinsynthese der Zellen (BCA), enzymatische Zellaktivität (MTT, XTT), Immunoassays (BrdU) oder Durchflusszytometrie (Zytokinfreisetzung) berechenbare Ergebnisse liefern.

Im Rahmen einer kieferorthopädischen Behandlung stehen die untersuchten Bögen in ständigem Kontakt mit der Mundschleimhaut. Diese Tatsache führte zu den Bioverträglichkeitstests von Proben der Polymer-Glasfaser-Bögen und der NiTi-Bögen mit Keratinozyten und Fibroblasten aus der Gingiva. Die in der kieferorthopädischen Behandlung verwendeten Materialien haben eine kürzere Verweildauer im Mund als diejenigen der Zahnerhaltung. Deshalb ist es schwierig, Biounverträglichkeitsreaktionen auf kieferorthopädische Maßnahmen zurückzuführen. Dieses gelingt am besten anhand verschiedener In-vitro-Untersuchungen mit relevanten Zellen des Zahnhalteapparates. Gleichzeitig sollte auch die Möglichkeit der Elution toxischer Stoffe in Betracht gezogen und durch einen Elutionstest untersucht werden.

In-vitro-Tests sind tendenziell geeignet, Materialeinflüsse auf ausgewähltes organisches Gewebe darzulegen und so folgende Rückschlüsse zu erlauben:

- 1) Toxizität im In-vitro-Test lässt mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Biounverträglichkeit des Materials schließen
- 2) keine Veränderung gegenüber der Kontrolle ohne Material im In-vitro-Test ist ein Zeichen für Bioverträglichkeit

Je größer die Anzahl unterschiedlicher In-vitro-Tests, umso sicherer die Aussagewahrscheinlichkeit bei gleichem Ergebnis.

### **1.5 Fragestellung**

Ist der zu untersuchende Polymer-Glasfaser-Bogen in der Lage, im Vergleich zu den bewährten NiTi-Bögen außer in der Ästhetik auch bezüglich der Bioverträglichkeit neue Maßstäbe zu setzen?

In dieser Studie sollen vergleichende Zytotoxizitätsuntersuchungen an einem zahnfarbenen und damit deutlich unauffälligeren Bogen in mehreren unterschiedlichen In-vitro-Tests (MTT-, XTT-, BCA- und LHA-Tests) zeigen, ob Polymere in der Kieferorthopädie zukünftig mehr als nur eine ästhetische Alternative sein können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Probenmaterial

Untersucht wurden 2 Rundbogentypen mit dem Durchmesser ( $d = 0,41 \text{ mm}$ ) eines Herstellers (TP Orthodontics, Indiana, USA):

- a) Optis preformed archwire sind sog. Polymer–Glasfaser-Bögen, bestehend aus Glasfasern eingebettet in einem Polymer-Kunstharzgemisch und einer Polymerbeschichtung.
- b) NiTi reflex wire besteht aus Nickel Titanium (NiTi) mit einem Nickelgehalt von ca. 55 gew. %

Als Biokompatibilitätsreferenz wurden die entsprechenden NiTi–Bögen des gleichen Herstellers verwendet, die die gleiche Funktionalität aufweisen sollen. Die Bögen mussten für die Zellkulturplatten in adäquate Probenkörper geteilt werden. Als Grundlage dafür galt die Iso–Norm (EN ISO 10271:2001(D)) [7], die eine Gesamtoberfläche der Probenkörper von mindestens  $10\text{cm}^2$  vorschreibt und ein Verhältnis von 1 ml Lösung je  $1\text{cm}^2$  Probenoberfläche vorgibt, um eine aussagekräftige Probenelution zu erlangen. Da die Schnittflächen eine neu geschaffene Oberfläche aufweisen, wurden die Probenkörper entsprechend ihrer maximalen Biegefähigkeit in größere Proben (P2) mit möglichst wenig Schnittflächen für die indirekte Probestestung geteilt. In der direkten Testung war die Probengröße mit 4 Schnittflächen (P1) unvermeidlich. Nur so konnten Bogenabschnitte in die Testplatten eingebracht werden ohne Kontakt mit dem Zellrasen zu haben (Tab. 1). Die Probenherstellung der Polymer–Glasfaser–Bögen erfolgte mit einem sterilem Skalpell (No. 11).

Die NiTi–Bögen wurden mit einem scharfen, alkoholisch gereinigten Seitenschneider (Heavy Duty, Ortho-Dent-Bavaria) zurechtgeschnitten, nachdem ihre Länge zuvor exakt markiert war.



<b>Bogenbezeichnung</b>	<b>Optis preformed archwire 0,41 mm</b>	<b>NiTi reflex wire 0,41 mm</b>
Bestell-Nr.	381-002	381-165
Material	Polymer, Glasfaser	Nickel, Titan
P1: Oberfläche für direkte Testung	13,0264 mm <sup>2</sup> Probenlänge 10 mm	13,0264 mm <sup>2</sup> Probenlänge 10 mm
P2: Oberfläche für indirekte Testung	76,8614 mm <sup>2</sup> Probenlänge 60 mm	76,8614 mm <sup>2</sup> Probenlänge 60 mm

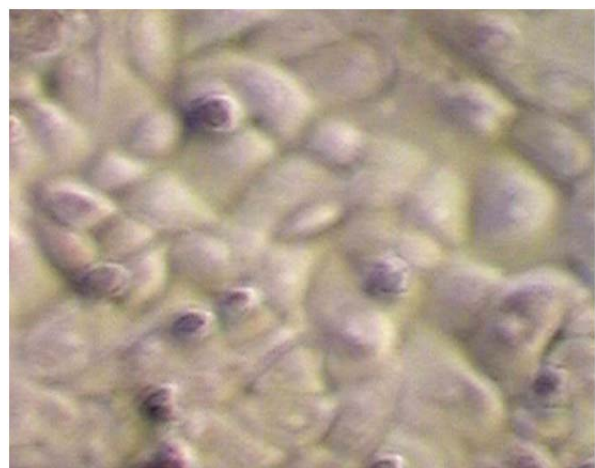
**Tab. 1:** Angaben zu den kieferorthopädischen Proben dieser Studie.

## 2.2 Zellkultur

In dieser Studie wurden ausschließlich Primärkulturen aus Gingivaexplantaten von Patienten im Alter zwischen 18 und 23 Jahren verwendet. Aus den Explantaten wurden Fibroblasten und Epithelzellen angezüchtet. Es wurden ausschließlich Zellen der zweiten und dritten Passage (Abb. 3), bei den Fibroblasten teils auch der vierten und fünften Passage (Abb. 4) verwendet. Vor den Testansätzen wurden die Kulturen auf ihre Morphologie überprüft, bevor sie experimentell eingesetzt wurden.



**Abb. 3:** Fibroblasten aus 2. Passage.



**Abb. 4:** Keratinozyten aus 4. Passage.

Alle Gewebeproben wurden nach der Probengewinnung für zwölf Stunden im pH-neutralen Kulturmedium ( $\alpha$  MEM (Sigma), M0644) supplementiert mit fötalem

Kälberserum (PAA, A15-101 mit HB-Gehalt < 20 mg/dl), Antibiotika (PAA, P11-010) und einem Antimykotikum (PAA, P11-001)) (Tab 3) bis zur Präparation bei 4°C steril gelagert. Danach erfolgte die Gingivapräparation bei 20°C im sterilen Raum. Dazu wurde mit einem Skalpell das Gewebe in ca. 1 mm<sup>2</sup> große Explantate zerteilt. Jeweils vier davon wurden in einer Zellkulturschale (Sarstedt, Ø 65mm<sup>2</sup>) kurz gelagert bis sie mit dem jeweiligen Kulturmedium aufgefüllt in einem Brutschrank (Heraeus, B5060 EC/CO<sub>2</sub>) bei 37°C und einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub>-Zusatz für eine Woche kultiviert wurden. Danach wurden die Primärexplantate ihrem Kulturwachstum entsprechend selektiert. Im weiteren Verlauf wurde das Kulturmedium alle drei bis vier Tage gewechselt, um einerseits die Zellen mit frischen Nährstoffen zu versorgen und um andererseits alle Abfallprodukte des zellulären Stoffwechsels zu entfernen. Gleichzeitig wurde dadurch auch eine gleichbleibende Konzentration an Antibiotika und Antimykotika erreicht.

### **2.2.1 Fibroblastenkultivierung**

Primäre Fibroblasten wurden in  $\alpha$  MEM supplementiert mit fötalem Kälberserum kultiviert, das einerseits für das Wachstum obligat ist und gleichzeitig für die Adhärenz der Zellen am Kulturgefäßboden sorgt. Der Zusatz von Penicillin / Streptomycin und Amphotericin B verhinderte eine Kontamination durch Bakterien oder Pilze. Im weiteren Verlauf der Zellkultivierung wurden Zellkulturflaschen von 75 cm<sup>2</sup> Fläche und einem Inhalt von 250 ml (Sarstedt, 83.1813.002) verwendet.

Sobald die Zellen eine Konfluenz von ca. 90% erreicht hatten, wurden sie passagiert, um eine ausreichende Anzahl proliferierender Zellen für die Tests zu gewinnen. Vor der Passage wurden die Zellen sorgfältig mit einem Phosphatpuffer ohne Kalzium und Magnesium, pH 7,4 (0,01M PBS, PAA: 0,2 g/l KCl, 0,2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,0 g/l NaCl, 1,15 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), gespült, um alle Serumreste zu entfernen.

Das benötigte Enzym Trypsin (PAA, L11-003) als 10-fach-Konzentrat wurde vor Gebrauch mit PBS zu einer Gebrauchskonzentration von 0,5%/0,2% Trypsin/EDTA verdünnt. Jeweils 3 ml Trypsinlösung wurden pro Kulturflasche als dünner Film auf die Zellen gegeben. Diese wurden dann bei 37°C fünf Minuten inkubiert und dann durch sorgfältiges Mischen mit einer Pipette vom Boden der Kulturflasche gelöst und vereinzelt. Zu der verwendeten Trypsinmenge wurde genauso viel Volumen Nährmedium gegeben, um das darin enthaltene Serum als Trypsininhibitor zu

nutzen. Danach wurden die Zellen bei 1800 U/Min. für 9 Minuten zentrifugiert, damit alle Trypsinreste entfernt werden konnten. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in frischem Medium resuspendiert.

Für die Bioverträglichkeitsuntersuchungen wurde ein phenolrotfreies Eagle Medium verwendet, weil der Indikator Phenolrot unter Umständen das photometrische Messergebnis beeinflussen kann.

Menge	Gehalt	Substanz	Konzentration
1 x		MEM, Sigma, M3024	
1 Liter		Aqua Dest.	
2,2 g		NaHCO <sub>3</sub>	
0,292 g		L-Glutamin	

**Tab. 2:** *Mediumansatz.*

Menge	Gehalt	Substanz	Konzentration
440 ml	88%	MEM, pH 7,4 oder $\alpha$ MEM	
50 ml	10%	Fötale Kälberserum	
5 ml	1%	Penicillin/Streptomycin	5x10 <sup>4</sup> U/5x10 <sup>4</sup> $\mu$ g
5 ml	1%	Amphotericin B	250 $\mu$ g/ml

**Tab. 3:** *Komplettiertes Fibroblastenmedium, phenolrotfrei.*

Zur Bestimmung einer definierten Zellzahl für den jeweiligen Versuchsansatz mussten die Zellen zunächst in einer Zählkammer in ihrer Gesamtheit bestimmt werden. Nach Volumenmessung der Zellsuspension wurden 14  $\mu$ l sorgfältig gemischter Suspension mit der gleichen Menge 0,4% Trypanblaulösung suspendiert. Ebenfalls 14  $\mu$ l dieser gefärbten Zelllösung wurden in eine Neubauer Zählkammer pipettiert. Trypanblau (Serva, 37252) ist ein Zellfarbstoff, der eine vitale Zellwand nicht durchdringen kann und nur von letalen Zellen aufgenommen wird. Dadurch war

es möglich, ungefärbte vitale Zellen von letalen blau gefärbten zu differenzieren. Die Zellen wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^5/\text{ml}$  für den direkten Bioverträglichkeitstest (direkte Probenauflage über der Zellfläche) bzw.  $2 \times 10^5/\text{ml}$  für den indirekten Bioverträglichkeitstest (eluiertes Probenmedium mit Zellkontakt) verwendet.

### 2.2.2 Keratinozytenkultivierung

Die Explantate wurden prinzipiell wie in Kap. 2.2.1 behandelt. Sobald nach ca. 5 Tagen Epithelzellen rund um das adhärierte Explantat auswuchsen, erfolgte aber ein Wechsel zu einem speziellen serumfreien Keratinozytenmedium, das einerseits die Proliferation der Keratinozyten anregt und andererseits die der Fibroblasten eher hemmt (Tab. 4).

Menge	Substanz	Gehalt
500 ml	KGM-2 (Lonza, CC-3107 )	-
2 ml	Bovine Pituary Extract	0,4%
0,5 ml	hEGF	0,1%
0,5 ml	Insulin	0,1%
0,5 ml	Hydrocortison	0,1%
0,5 ml	Transferrin	0,1%
0,5 ml	Epinephrin	0,1%
0,5 ml	Gentamicin/Amphotericin B	0,1%

**Tab. 4:** *Komplettiertes Keratinozytenmedium.*

Im Unterschied zur Fibroblastenkultivierung mußten die Keratinozyten zum einen 9 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  trypsiniert werden, zum anderen wurde die Inaktivierung des Trypsins nicht mit Serum durchgeführt, da eine Keratinozytenkultur nach Serumkontakt schneller ausdifferenziert. Trypsininhibitor (Gibco, 17075-029) wurde in einer Konzentration von  $1\text{mg/ml}$  Medium dem Trypsin–Zellgemisch zugegeben. Danach wurden die Zellen zentrifugiert und der Überstand abgesaugt, damit sowohl Trypsin

als auch Trypsininhibitor komplett entfernt wurden und frisches Medium zugegeben werden konnte.

Eine Zellzählung wurde genauso wie bei der Fibroblastenkultur durchgeführt, aber das Aussäen in neue Zellkulturflaschen musste mit etwa  $4 \text{ bis } 5 \times 10^5$  Zellen/10ml Medium erfolgen. Anders als bei den Fibroblasten mussten die Kulturflaschen bereits nach einer Konfluenz von ungefähr 70% Wachstum neu passagiert werden. Für die Bioverträglichkeitstests in dieser Studie wurden die Keratinozyten nach der zweiten und zum Teil schon nach der ersten Passage eingesetzt.

## **2.3 Bioverträglichkeitsprüfungen**

### **2.3.1 Quantitative Untersuchungen**

In dieser Studie wurden unterschiedliche quantitative enzymatische Untersuchungen durchgeführt:

- bei den direkten Tests wurde das Untersuchungsmaterial in Kontakt mit den Zellen inkubiert und danach in unterschiedlichen kolorimetrischen Testverfahren in ihrem Wachstumsverhalten quantitativ bestimmt.
- bei den indirekten Tests wurde mit dem Untersuchungsmaterial ein Eluat hergestellt, dieses in Kontakt mit den Zellen gebracht und anschließend im kolorimetrischem Zellkulturtest untersucht.

Die Probenherstellung erfolgte im Rahmen der ISO-Norm 10993-5. Die geforderte Größendimension einer Probe betrug mindestens  $10 \text{ mm}^2 / 100 \mu\text{l}$  Versuchsmedium. Um die geforderte Größendimension in Übereinstimmung mit den Dimensionen der Zellkulturgefäße zu bringen, wurde eine Probengröße von  $13 \text{ mm}^2 / 100 \mu\text{l}$  Versuchsmedium gewählt.

#### **2.3.1.1 Direkte Testmethode - Zellwachstumsprüfungen auf Probenkörpern**

Die Tests wurden in 96-well-Platten mit Mehrfachbelegungen des gleichen Prüftyps durchgeführt. Um die Vorgaben der ISO-Norm bezüglich der Prüfgröße zu erfüllen, mussten die Drähte in jeweils  $2 \times 0,5 \text{ cm}$  Probenabschnitte geteilt werden. Dadurch ergaben sich pro Gefäßvertiefung zwei Prüfkörper mit insgesamt vier Schnittkanten

(Kap. 2.1, Tab. 1, P1), aber nur so konnten auch die Bogenabschnitte in die Testplatten eingebracht werden, ohne Kontakt mit dem Zellrasen zu haben.

### **2.3.1.2 Indirekte Testmethode - Probenherstellung und Eluatgewinnung**

Als Grundlage galt die Größe der jeweiligen Oberfläche, die laut Iso-Norm [7] eine aussagekräftige Probenelution ergibt.

Da die Schnittflächen eine neu geschaffene Oberfläche zeigten, wurden die Probenkörper entsprechend ihrer maximalen Biegefähigkeit in größtmögliche Proben (Kap. 2.1, Tab. 1, P2) mit möglichst wenig Schnittflächen geteilt. Die Probenstücke wurden in einer Länge von 6 cm hergestellt und konnten erst ab dieser Größe in einer Kulturplatte mit einer Grundfläche von 9,46 cm<sup>2</sup> eingebracht werden ohne strukturelle Veränderungen zu provozieren.

Gemäß ISO-Norm wurden alle Probenabschnitte in absolutem Alkohol durch Ultraschall (Transsonic 420, Elma) entfettet und gereinigt. Danach erfolgte eine Trocknung aller Proben unter der Sterilwerkbank (Typ HB2472K, Heraeus). Anschließend wurden alle Segmente für 15 Minuten bei 121°C sterilisiert. Für die indirekte Zellinkubation wurden Probeneluate mit doppelter Konzentration hergestellt. Weil im Testverfahren schon eine mit Medium bedeckte Zelllage vorgegeben war, musste die zugefügte Menge an Eluat das gleiche Volumen haben, aber in doppelter Konzentration vorliegen.

Die Probenexposition in komplettiertem phenolrotfreiem Medium wurde nach Ergebnissen verschiedener Studien [20, 24, 38] auf 72 Stunden festgelegt. Dabei wurden die verschlossenen Gefäße bei einer Temperatur von 37°C im Brutschrank inkubiert. Pro Vertiefung einer 6-well-Zellkulturplatte konnten 12 Bogensegmente à 60 mm Länge in einem Volumen von 3,6 ml Medium eingebracht werden. Gleichzeitig wurde mit dem Ansatz der Eluate eine entsprechende Menge an Medium ohne Probenzusatz im gleichen Zeitraum bei 37°C als Referenz für die probenexponierten Zellen inkubiert.

Im jeweiligen Testansatz wurden 10%ige, 50%ige und 100%ige Eluatverdünnungen getestet.

### 2.3.1.3 Testverfahren

Für die direkten Tests wurde der MTT-, XTT-, BCA und LHA-Test jeweils für 24 und 48 Stunden angewandt. Für die indirekten Tests wurden die unterschiedlichen Eluatkonzentrationen jeweils für 24 und 48 Stunden im XTT-Test untersucht (Tab. 5).

<b>Testverfahren</b>	<b>Direkter Test</b> (direkter Probenkontakt mit den Zellen)	<b>Indirekter Test</b> (Zellinkubation mit Probeneluaten)
<b>MTT</b> (enzymbasierter Proliferationstest zum Nachweis der Zellaktivität)	24 Std.	-
	48 Std.	-
<b>XTT</b> (enzymbasierter Proliferationstest zum Nachweis der Zellaktivität)	24 Std.	24 Std.
	48 Std.	48 Std.
<b>BCA</b> (quantitative Proteinbestimmung)	24 Std.	-
	48 Std.	-
<b>LHA</b> (enzymbasierter Test zur Bestimmung der Zellzahl zwecks spektral- photometrischer Auswertung)	24 Std.	-
	48 Std.	-

**Tab. 5:** Übersicht über die in dieser Studie angewendeten quantitativen Testverfahren.

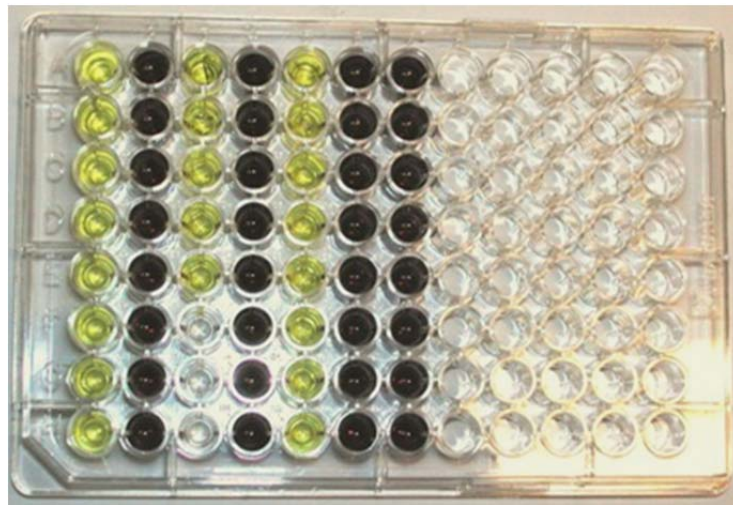
#### 2.3.1.3.1 MTT-Test

Zellaktivität und damit auch Zellvitalität kann durch den Nachweis enzymatischer Tätigkeit in den Zellen aufgezeigt werden. Bestimmte Zellenzyme sind in der Lage, die Reduktion von Tetrazoliumsalzen zu katalysieren. Diese Eigenschaft macht man sich zunutze, weil die Reduktion eines Tetrazoliumsalzes immer mit einer sichtbaren Farbreaktion einhergeht, die in einem bestimmten Wellenlängenbereich quantitativ messbar ist. Die photometrisch gemessene optische Dichte des reduzierten Tetrazoliumsalzes korreliert dabei mit dem Proliferationsverhalten der Zellen [19]. Ist die Zellproliferation durch toxische Einflüsse eingeschränkt, wird dies durch eine verminderte Farbintensität im kolorimetrischen Assay sichtbar. Als Negativkontrolle wurden Zellen dem gleichen Testverfahren unterzogen, ohne dass sie mit dem Probenkörper bzw. dessen Eluat Kontakt hatten.

MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) ist ein gelbliches, wasserlösliches Tetrazoliumsalz, das von lebenden Zellen aufgenommen wird. Gesunde Zellen sind in der Lage, das MTT enzymatisch zu dem blauen, wasserunlöslichen Formazan zu reduzieren.

MTT-Formazan kann durch acidiertes Isopropanol oder DMSO gelöst werden [19]. In diesem Test wurde ein modifiziertes Verfahren genutzt [36], welches den Vorteil hat, dass man einerseits das Formazan in Lösung bringt und gleichzeitig eine Zelllyse erreicht. Durch die Verwendung einer sauren SDS-Lösung entsteht eine klare Farblösung, die in einem Spektralphotometer untersucht werden kann.

In den direkten Zellinkubationen wurden 96-well-Kulturplatten (Sarstedt, 83.1835) (Abb. 5) verwendet. Die Zellen wurden in einem Verhältnis von  $10^5$  Zellen/ml suspendiert. Dadurch ergab sich eine Zellzahl von  $10^4$  Zellen/100  $\mu$ l, die mit einer 8-Kanal-Pipette (Brand) jeweils in eine senkrechte Reihe Plattenvertiefungen pipettiert wurde.



**Abb. 5:** Aufnahme eines MTT-Testansatzes in einer 96-well-Kulturplatte. (Sarstedt, 83.1835).

Nach einer Inkubationsphase von 2 Stunden im CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank hatten sich alle Zellen am Boden des Kulturgefäßes abgesetzt. Für jeden Testdurchgang wurde stets eine Mediummessung durchgeführt. Es wurde ebenfalls immer eine Messung des Mediums mit Probenkörpern mitgeführt. Jede Mikrotiterplatte wurde einmal als 24-stündige und einmal als 48-stündige Inkubation durchgeführt.



Nach entsprechender Inkubation wurden im MTT- bzw. XTT-Test jeweils 25µl Tetrazoliumsalz in alle Vertiefungen pipettiert:

- 25 µl 12 mM MTT
- 25 µl (1,4 mM XTT + 0,02 mM PMS)

Die Umsetzung des Tetrazoliumsalzes in ein Formazan erfolgte nach 3-stündiger Inkubation im CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank. Anschließend wurde durch Zugabe von 100µl saurem SDS (10% SDS in 0,01M HCl) pro Vertiefung zum einen eine Lösung des unlöslichen Formazans im MTT-Test und zugleich eine Zellyse in beiden Testverfahren erreicht.

#### **2.3.1.3.2 XTT-Test**

XTT (2,3-bis (Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxyanilid) wird durch Dehydrogenasen lebender Zellen ebenso reduziert wie MTT. Es bildet sich ein Formazan, das allerdings in einem anderen Wellenlängenbereich absorbiert. Die gelöste Form des XTT in wässrigen Lösungen ist hellgelb, während das gebildete Formazan orange erscheint.

Zur Auslösung der Reaktion ist die Zugabe von PMS (Phenanzinmethosulfat) notwendig. Sowohl die Menge an verwendetem XTT wie auch das Verhältnis von PMS zu XTT beeinflusst dabei die gemessene Extinktion des entstandenen Formazans [31]. Die Konzentration des XTT wurde auf 1,4 mM und die des PMS auf 0,02 mM festgelegt. Nach Reduktion des XTT zu Formazan sollte dieser Farbstoff nach Durchmischen gelöst und damit spektralphotometrisch messbar sein. Um aber eine Lösung ohne Zellkörper zu erhalten, wurde in dieser Studie ebenso wie beim MTT verfahren und die Zellen durch Zugabe von saurer SDS-Lösung lysiert.

Die Versuchsdurchführung im indirekten Bioverträglichkeitstest unterschied sich vom direkten Test zunächst in einer konzentrierteren Zellsuspension.

Beim Ansatz der Eluate wurde ein Proben-Medium-Verhältnis gewählt, das doppelt so hoch konzentriert war, da das Eluat im Test 1:1 mit dem Zellmedium verdünnt wurde. Dementsprechend musste auch die Zellzahl doppelt so hoch konzentriert werden (Kap. 2.3.2). Die Probeneluate wurden in unterschiedlichen Verdünnungen (10%, 50%, 100%) pipettiert, da im Vorfeld nicht bekannt war, in welcher Verdünnung eine eingeschränkte Zellproliferation zu erwarten war.

Jede Mikrotiterplatte wurde jeweils für einen Probenotyp (NiTi bzw. Polymer) inkubiert. Eine Wiederholung fand einmal für eine 24-stündige sowie für eine 48-stündige Inkubation statt. Der komplette Testablauf wurde sowohl für Fibroblasten als auch für Keratinozyten durchgeführt.

<b>M</b>	<b>NK</b>	<b>MN</b>	<b>ZN</b>	<b>MO</b>	<b>ZO</b>	<b>NK</b>					
<b>M</b>	<b>NK</b>	<b>MN</b>	<b>ZN</b>	<b>MO</b>	<b>ZO</b>	<b>NK</b>					
<b>M</b>	<b>NK</b>	<b>MN</b>	<b>ZN</b>	<b>MO</b>	<b>ZO</b>	<b>NK</b>					
<b>M</b>	<b>NK</b>		<b>ZN</b>		<b>ZO</b>	<b>NK</b>					
<b>M</b>	<b>NK</b>		<b>ZN</b>		<b>ZO</b>	<b>NK</b>					
<b>M</b>	<b>NK</b>		<b>ZN</b>		<b>ZO</b>	<b>NK</b>					
<b>M</b>	<b>NK</b>		<b>ZN</b>		<b>ZO</b>	<b>NK</b>					
<b>M</b>	<b>NK</b>		<b>ZN</b>		<b>ZO</b>	<b>NK</b>					

**Tab. 6:** Mikrotiterplattenbelegung im direkten Zellvitalitätstest für XTT-, MTT-, BCA- und LHA-Test.

**M** = Medium ohne Phenolrot (100µl Medium +25µl MTT (12mM) + 100µl 10% SDS für MTT-Test) (100µl Medium +25µ XTT (1,4mM + 0,02mM PMS) + 100µl 10% SDS f. XTT-Test)

**NK** = Zellen ohne Probenkörper

**MN** = Medium mit NiTi-Probe

**ZN** = Zellen mit NiTi-Probe

**MO** = Medium mit Optis-Probe

**ZO** = Zellen mit Optis-Probe

### 2.3.1.3.3 BCA-Test

Als Maß für die Proliferation von Zellen und somit auch ihre potentielle Vitalität wurde in den enzymatischen Proliferationsassays die enzymatische Tätigkeit der Zellen gemessen. Zum Vergleich wurde ein Test herangezogen, der den Gesamtproteingehalt bestimmt. Das Prinzip des Assays beruht auf einer Anlagerung von Kupfer(II)-Ionen an die Peptidbindungen der Proteine und deren Reduktion zu Kupfer(I)-Ionen in alkalischer Umgebung. Der Kupfer(I)-Proteinkomplex kann durch Zugabe von Bicinchoninsäure detektiert werden. Proportional zur Proteinmenge

entsteht ein violettes Reaktionsprodukt, das im Spektralphotometer gemessen werden kann. Die Proteinmenge wird durch die Ermittlung des Standardproteingehaltes errechnet. Da zu jeder Messung eine Negativkontrolle, d.h. eine Zellinkubation ohne Probenexposition stattfand, konnte ein direkter Vergleich zur optimalen Zellvitalität gezogen werden. Proportional zur Negativkontrolle zeigt der abweichende Proteingehalt eine gleiche oder verminderte Zellproliferation.

Im BCA-Test wurden nach Zellinkubation zunächst die Vertiefungen 3 x mit einem neutralen PBS-Puffer, pH 7,4 (PAA, H15-002) gewaschen. Danach wurden 100 µl eines 10mM Tris-HCl-Puffers (12a) (5ml 0,2M Tris/HCl + 10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 130mM NaCl + 1% Triton X ad 100ml Aqua Dest., pH 7,5) in alle Vertiefungen zur Lyse der Zellen gegeben. Bei 4°C war nach 45 Minuten eine komplette Zelllyse erfolgt. Jeweils 25 µl des Zelllysats wurden gemäß vorangegangener Mikrotiterplattenbelegung in eine neue Mikrotiterplatte gegeben und mit 200 µl einer BCA-working solution (Pierce, Protein Assay: Lösung A mit Lösung B im Verhältnis 1:20 mischen) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach war eine vollständige Kupferreduktion erfolgt, die je nach Proteingehalt eine entsprechende Violettfärbung zeigte.

Gleichzeitig mit der Proben-Zellinkubation wurde eine zweite Mikrotiterplatte mit einem kommerziellen BSA-Standard belegt, wobei in jeder Vertiefung jeweils 25 µl eines genau definierten Proteinstandards (Sigma, P7656) mit 200 µl entsprechender BCA-working solution unter gleichen Bedingungen reagierten. Diese Standardmessung sollte als Maß für die tatsächlich vorhandene Proteinmenge der Zellen gelten.

#### **2.3.1.3.4 LHA-Test**

Im Lysosomalen-Hexoaminidase-Assay wird das lysosomale Enzym  $\beta$ -N-Acetyl-Glucosaminidase nachgewiesen, das intrazellulär zum Abbau von Glykolipiden und Glykoproteinen beiträgt. In gesunden menschlichen Zellen ist jeweils eine bestimmte Konzentration des Enzyms in deren Lysosomen enthalten. Das Testprinzip beruht auf der Hydrolyse des Substrats 4-Nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminid unter sauren Bedingungen durch enzymatische Tätigkeit. Es entsteht farbloses p-Nitrophenol, das durch Zugabe eines basischen Stoppreagenzes zum gelblichen p-Nitrophenylat

reagiert. Genau wie in allen anderen Testverfahren wurde ebenfalls zu jedem Test eine Negativkontrolle angelegt.

Im lysosomalen Hexoaminidase-Test wurde das Substrat 4-Nitrophenyl-N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminid (Sigma, N9376) 12 mM in 10ml 0,09 mM Citratpuffer (Sigma, C2488, pH 4,8) gelöst und 1:2 mit 0,5% Triton X-100 (Bio-Rad, 161-0407) in Aqua Dest. versetzt. Nach Inkubation der Zellen mit den Probenkörpern (Mikrotiterplattenbelegung wie bei allen direkten Versuchsansätzen) wurden die Vertiefungen zunächst mit jeweils 200  $\mu$ l PBS-Puffer (pH 7,4) 3 x gewaschen. 60  $\mu$ l der NAG-Citrat-Lösung wurden in die Vertiefungen pipettiert und für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde mit 90  $\mu$ l/Vertiefung eines 50 mM Glycin-Puffers (Walter, pH 10,4), der mit 5mM EDTA (Sigma, E4884) versetzt war, gestoppt. Der entstandene Farbumschlag von farblos nach gelb gab das Maß für die vorhandene Enzymaktivität wieder.

### **2.3.2 Qualitative Untersuchungen**

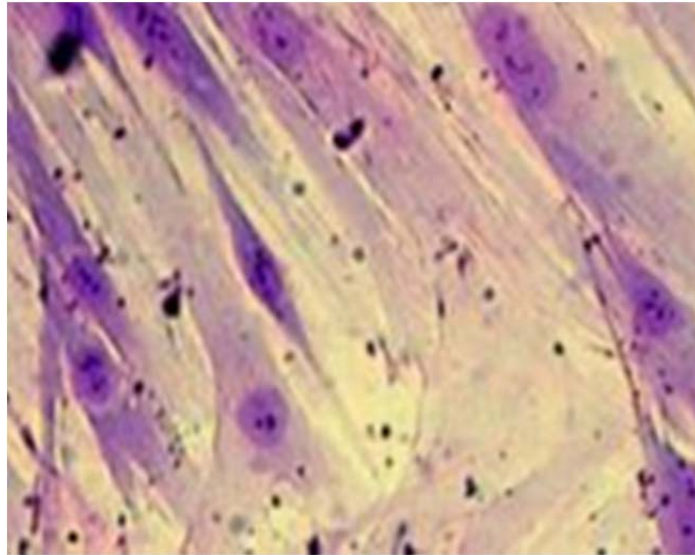
Parallel zu den quantitativen Testverfahren wurden auch qualitative Untersuchungen mit den Probenkörpern durchgeführt. Es wurde qualitativ das Zellwachstum mit den Proben im Direktkontakt lichtmikroskopisch beurteilt und eine Begutachtung der Probenoberfläche im REM durchgeführt.

Dazu wurden neue Probenkörper entsprechend der direkten Testverfahren hergestellt. Alle Probenkörper aus den unterschiedlichen direkten Testverfahren wurden in diesem qualitativen Testverfahren erneut getestet, um nachzuweisen, ob nach einer eventuellen Biounverträglichkeit noch wachstumshemmende Stoffe abgegeben werden.

Da die Dauer der Probenexposition eine Rolle im Proliferationsverhalten der Zellen spielt, wurde pro Zelltyp jeweils eine Testdurchführung mit einer 24-stündigen Inkubationsphase und mit einer 48-stündigen Inkubationsphase durchgeführt. Deshalb wurde in dieser Studie eine Zellzahl von  $10^4$ /Vertiefung in den Zellkulturplatten gewählt. Damit die Zellzahl möglichst für jeden einzelnen Testablauf konstant blieb, wurden die Zellen bei jedem Arbeitsgang mittels eines Mikroshakers (Ika, MS1) in einem Pipettiergefäß (Thermo) in konstanter Suspension gehalten.

### 2.3.2.1 Giemsa-Färbung und Lichtmikroskopie

Die Giemsa-Färbung ist eine schnelle Differenzialfärbemethode, die im allgemeinen die Zellkerne rot bis violett färbt (Abb. 6), während das Zytoplasma blau bis rötlich erscheint.



**Abb. 6:** Giemsa-Färbung: Fibroblasten nach 11 Tagen. Wachstum mit Optis.

Die Zellkulturen in dieser Studie wurden nach ihrer 11-tägigen Inkubationszeit mit den Probenkörpern zunächst vorsichtig zweimal mit pH-neutralem Phosphatpuffer (0,01M PBS, PAA: 0,2g/l KCl, 0,2g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8,0g/l NaCl, 1,15g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) gespült und anschließend für 30 Minuten bei 4°C mit 2,5 % Glutardialdehyd (Merck, 1.04239) in PBS fixiert. Nach der Fixierung erfolgte erneut ein Spülen mit PBS (2 x 5 Minuten), um die Fixierlösung zu entfernen. Eine Inkubation in Aqua dest. (5 Minuten) löste alle störenden Pufferreste im Probengefäß. Danach wurden die Zellen und die Proben für 10 Minuten mit einer 1:1 verdünnten Giemsa (PAA, S11-019) / Aqua destillata – Lösung bei Raumtemperatur gefärbt. Der Farbüberstand wurde sorgfältig entfernt. Anschließend wurden die Zellkulturen maximal 3 Sekunden mit 100%igem Ethanol differenziert, mehrfach in Aqua destillata gespült und anschließend lichtmikroskopisch untersucht.

Alle gefärbten Proben wurden mit einem Durchlichtmikroskop (Nikon, Optiphot-2) und einem kombinierten Auflicht-Durchlicht-Stereomikroskop (Motic, Stereomikroskop DMW 143) fotografisch über eine Videokamera (Fa. Kappa, CF11/1) festgehalten

und digital gespeichert. Dabei wurden die Proben immer im wässrigen Milieu gehalten, damit es nicht zu Strukturveränderungen kam. Im Stereomikroskop wurde zunächst eine Übersichtsaufnahme (10 x) und dann eine Detailaufnahme (40 x) gemacht. Die Vergrößerungen im Durchlichtmikroskop entsprachen 100-fach und 200-fach.

### **2.3.2.2 Rasterelektronenmikroskopie**

Alle zytologischen Tests sollten Veränderungen der Morphologie und der Physiologie typischer oraler Gewebszellen aufzeigen. Da jedoch gerade die Beschaffenheit der Probenoberfläche einen enormen Einfluss auf diese Veränderungen hat, war es wichtig, zunächst die Probenoberfläche vor den Testdurchläufen und nach den Zellkontakten in ihrer genauen Strukturierung festzuhalten.

Es sollte aufgezeigt werden, ob die Schnittstellen einen Einfluss auf das Zellverhalten hatten, da gerade die Polymer–Glasfaser–Struktur eine große Veränderung der Oberfläche zur Folge hatte. Auch bei den Schnittstellen der NiTi–Bögen kam es beim Herstellen der Probenkörper zur Oberflächenveränderung. Gleichzeitig sollte sichtbar werden, ob es durch den Einfluss der Testsubstanzen zu Strukturveränderungen sowohl in der Polymer– als auch in der Metallschicht kommt. Eine zweite Aufnahme mit 750-facher Vergrößerung zeigte den seitlichen Randbereich der Probe, der den engsten Kontakt zur Zellschicht hatte.

## **2.4 Photometrie**

Alle kolorimetrischen Auswertungen wurden mit einem Spektralphotometer (Biotek, MQuant) vorgenommen. Lediglich das Probenvolumen sowie die Wellenlänge variierte bei den unterschiedlichen Testverfahren. Dabei war die gemessene optische Dichte das Maß für Abschwächung des Lichtstrahls einer bestimmten Wellenlänge im jeweiligen Medium. Dieses wird durch das Lambert–Beersche Gesetz belegt. Dabei ist die Extinktion  $E_\lambda$  der negative dekadische Logarithmus des Transmissionsgrades der durchgelassenen Strahlung und abhängig von der Absorption, Streuung, Reflexion und der Wellenlänge.

$$E_{\lambda} = -\lg\left(\frac{I_1}{I_0}\right) = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

- $I_1$ : Intensität des transmittierten Lichtes
- $I_0$ : Intensität des einfallenden (eingestrahnten) Lichtes
- $c$ : Konzentration der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit
- $\epsilon_{\lambda}$ : dekadischer molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge  $\lambda$ . Dieser ist eine für die absorbierende Substanz spezifische Größe und kann unter anderem vom pH-Wert oder vom Lösungsmittel abhängen.
- $d$ : Schichtdicke des durchstrahlten Körpers.

Die Höhe der gemessenen Extinktion war proportional zur Zellproliferation des untersuchten Zelltyps. Die Wellenlängen der jeweiligen Lösungen waren durch bekannte Testverfahren [17, 19, 33] vorgegeben. Somit ergaben sich folgende Wellenlängenbereiche für die verschiedenen Testverfahren:

Testverfahren	Messfilter	Referenzfilter	Volumen
<b>MTT-Test</b>	570 nm	630 nm	175 $\mu$ l
<b>XTT-Test</b>	470 nm	630 nm	175 $\mu$ l
<b>BCA-Test</b>	562 nm	-	225 $\mu$ l
<b>LHA-Test</b>	405 nm	620 nm	130 $\mu$ l

**Tab. 7:** Messbereiche der Extinktionsmaxima.

Beim BCA-Test wurde ein Volumen von 225  $\mu$ l verwendet, beim LHA-Test ein Volumen von 130  $\mu$ l und beim MTT- bzw. XTT-Test von 175  $\mu$ l. Alle Faktoren zusammen ergaben im jeweiligen Testverfahren Werte der optischen Dichte.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Quantitative Untersuchungsergebnisse

Die optische Dichte der Reaktionsprodukte der einzelnen Tests wurde photometrisch gemessen. Ebenso wurden die entsprechenden Negativkontrollen (Zellen ohne Probenkörpereinfluß mit Medium) und auch das Medium allein photometrisch bestimmt.

Der gemessene Wert der Negativkontrolle (NK) abzüglich des Mediumwertes (M) entsprach 100% Bioverträglichkeit. Die Probenextinktionen der verschiedenen Untersuchungen als Differenz von Fibroblasten mit Probe (F+NiTi bzw. F+Op) und Medium mit Probe (M+NiTi bzw. M+Optis) wurden bestimmt. Abschließend wurde die Probenextinktion zu dem entsprechenden berechneten 100%-Idealwert ins Verhältnis gesetzt und ergab so das Maß der Bioverträglichkeit in Prozent.

Die Extinktionsmesswerte, das prozentuale Bioverträglichkeitsergebnis, die Mittelwerte und Standardabweichungen der direkten Testverfahren mit Fibroblasten sind in Tab. 10a und Abb. 7, mit Epithelzellen in Tab. 10b und Abb. 8 abgebildet, die der indirekten Testverfahren mit Fibroblasten sind in Tab. 11a und Abb. 9, mit Epithelzellen in Tab. 11b und Abb. 10 dargestellt.

Der Shapiro-Wilks Test für kleine Stichproben zeigte auf einem 5%-Signifikanzniveau annähernd normalverteilte Testreihen.

Der Anova-Test zeigte, dass die Messergebnisse der einzelnen direkten Testverfahren nach 24 Stunden gegenüber 48 Stunden für Fibroblasten und Epithelzellen signifikant gleich sind ( $p > 0,05$ ; Tab. 13). Das gleiche Ergebnis ergab sich bei den indirekten Testverfahren (Tab. 14). Statistisch signifikant gleich waren auch die Messreihen der unterschiedlichen Eluate der indirekten Tests nach 24 Stunden (Tab. 16a) und 48 Stunden (Tab. 16b). Dagegen ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede ( $p \neq 0,05$ ) ergaben sich bei dem Vergleich der einzelnen Testverfahren der direkten Tests untereinander sowohl nach 24 Stunden (Tab. 15a) als auch nach 48 Stunden (Tab. 15b).

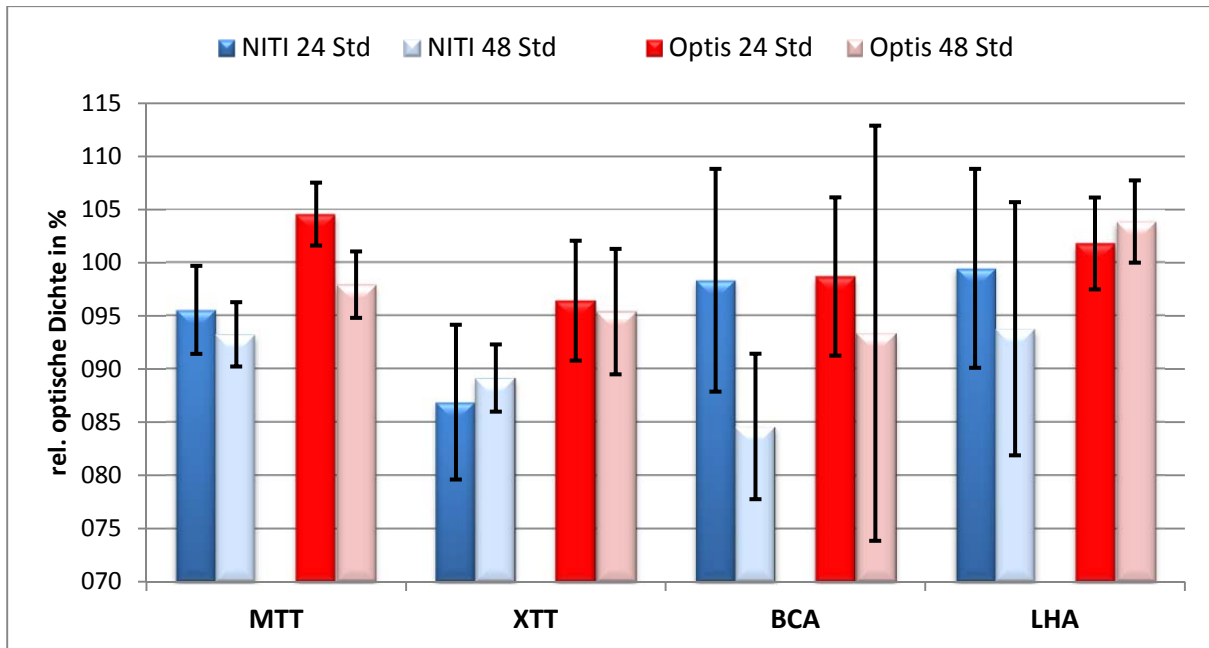


### **3.1.1 Ergebnisse der direkten Tests**

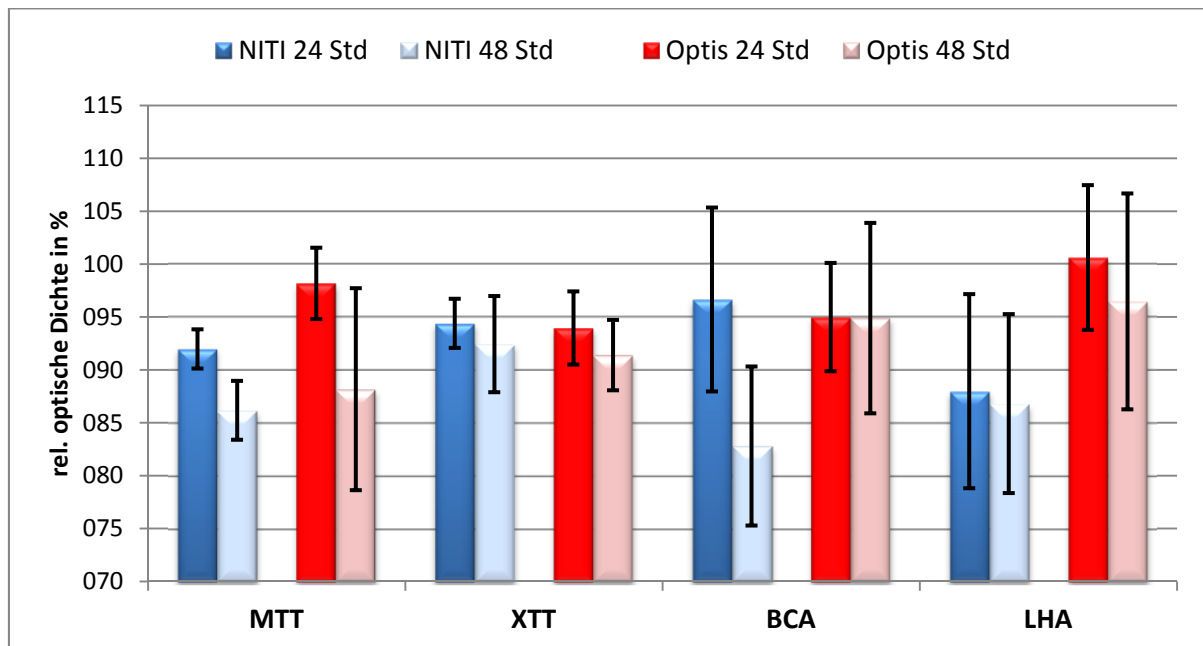
Bei allen direkten Bioverträglichkeitstests ergab sich insgesamt eine relative optische Dichte von deutlich über 85% sowohl für die Nickel–Titan–Drähte als auch für die Polymer–Harz–Bögen (Abb. 7 und 8), die damit über eine gute bis sehr gute Bioverträglichkeit aufweisen. Generell war das Ergebnis nach 48 Stunden etwas schlechter. Dies zeigte sich bei den Inkubationen mit NiTi ausgeprägter als bei den Optis-Bögen.

Beim BCA– und LHA–Test konnte beim Optis–Bogen eine nahezu 100%ige Bioverträglichkeit festgestellt werden. Beim MTT–Test und beim BCA–Test waren die Ergebnisse der Bioverträglichkeit nach 48 Stunden sowohl beim Polymer–Bogen als auch beim NiTi–Bogen niedriger als nach 24 Stunden Inkubation. Dies war besonders beim Nickel–Titan–Draht festzustellen (Abb. 7 und 8).

Im XTT–Test gab es kaum Ergebnisunterschiede in den Inkubationszeiten, aber hier konnten insgesamt bessere Bioverträglichkeiten für Polymer–Harz–Bögen bei der Kultivierung mit Fibroblasten nachgewiesen werden.



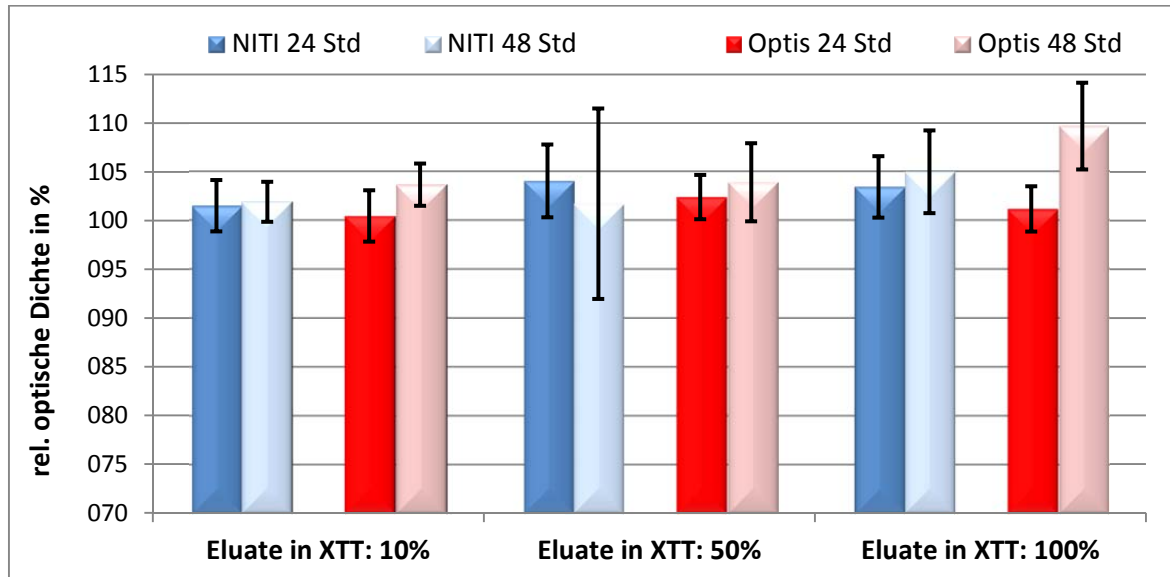
**Abb. 7:** Darstellung der Bioverträglichkeiten (relative optische Dichte in %) mit Standardabweichung in % von NiTi und Optis mit Fibroblasten nach 24 und 48 Stunden (Std) für den MTT-, XTT-, BCA- und LHA-Test.



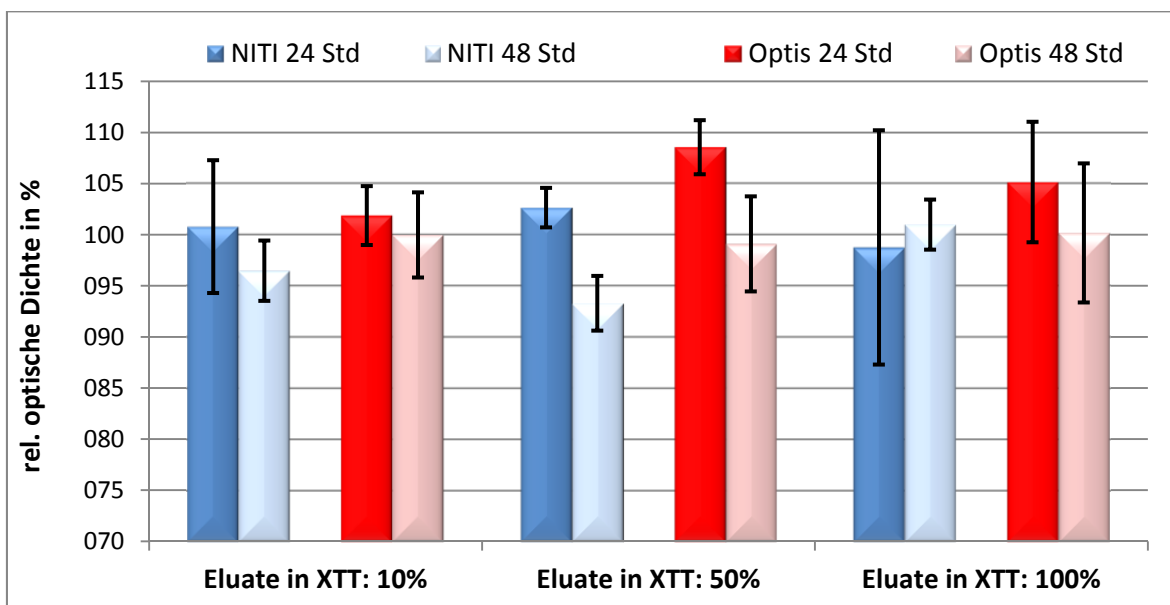
**Abb. 8:** Darstellung der Bioverträglichkeiten (relative optische Dichte in %) mit Standardabweichung in % von NiTi und Optis mit Epithel nach 24 und 48 Stunden (Std) für den MTT-, XTT-, BCA- und LHA-Test.

### 3.1.2 Ergebnisse der indirekten Tests

Die Ergebnisse der Bioverträglichkeitsuntersuchungen mit den unterschiedlichen Eluaten in Fibroblastenkultur und Epithelzellenkultur wiesen – wie in Abb. 9 und 10 ersichtlich – auf insgesamt sehr gute Bioverträglichkeiten hin.



**Abb. 9:** Darstellung der Bioverträglichkeiten (relative optische Dichte in %) mit Standardabweichung von NiTi und Optis mit Fibroblasten nach 24 und 48 Stunden (Std) für die Eluate von 10%, 50% und 100% für den XTT-Test.



**Abb. 10:** Darstellung der Bioverträglichkeiten (relative optische Dichte in %) mit Standardabweichung von NiTi und Optis mit Epithel nach 24 und 48 Stunden (Std) für die Eluate von 10%, 50% und 100% für den XTT-Test.

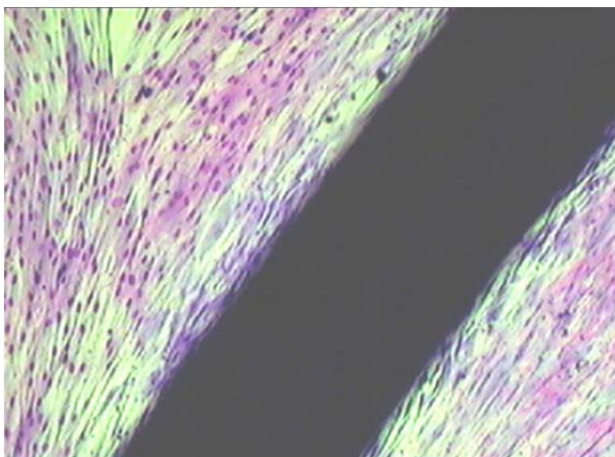
Generell waren sowohl bei den indirekten als auch bei den direkten Tests die Bioverträglichkeiten der Proben mit den Fibroblasten etwas besser gegenüber den Epithelzellen.

### 3.2 Qualitative Untersuchungsergebnisse

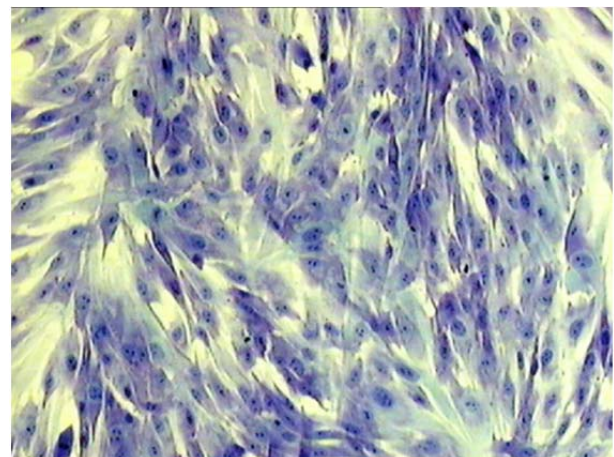
Sowohl neue Probenstücke als auch die bereits quantitativ untersuchten Prüfkörper der NiTi-Bögen und der Polymer-Harz-Bögen wurden mit den Gingivaexplantaten inkubiert, um anschließend die Zellen in der direkten Probenumgebung lichtmikroskopisch und die Proben rasterelektronenmikroskopisch zu begutachten (Kap. 2.3.2).

#### 3.2.1 Morphologische Ergebnisse bei NiTi-Proben

Die Fibroblasten zeigten eine gut beurteilbare Zellmorphologie bei allen verwendeten Probenkörpern und allen Testreihen. Typischerweise waren ein gut sichtbarer Zellkern mit der für Fibroblasten üblichen Spindelform gleichmäßig erkennbar. Bei den Probenkörpern, die zuvor in den Bioverträglichkeitstests eingesetzt wurden, war die Zellform der Fibroblasten zugunsten der Spindelform um den Probenkörper herum extrem langgestreckt. Die schmale, längliche Zellform ging mit einem mehrlagigen, vernetzten Wachstum der Zellen am Probenkörper einher (Abb. 11).



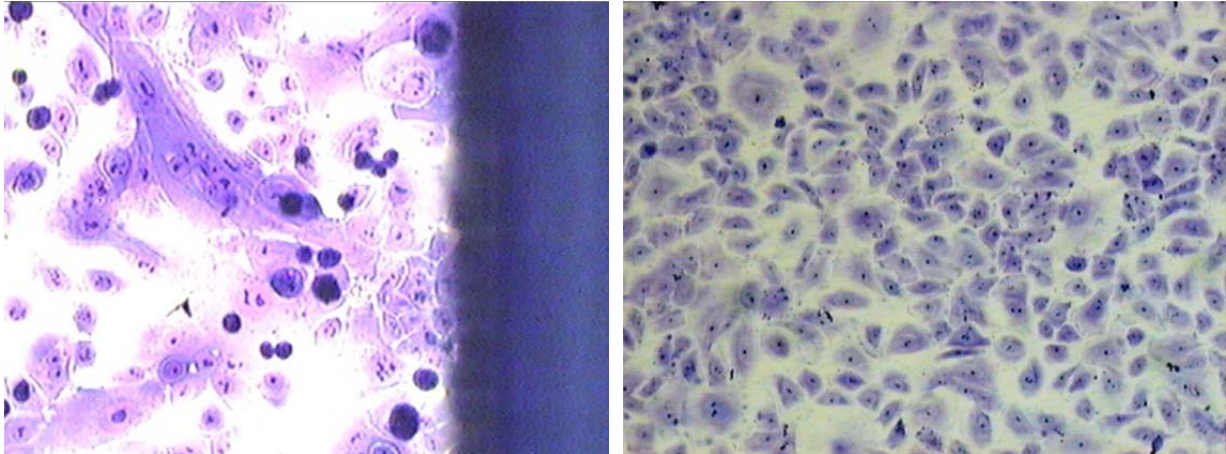
**Abb. 11:** NiTi (neu) im Fibroblastenzellrasen.



**Abb. 12:** Fibroblasten-Negativkontrolle.

Die Epithelzellen wuchsen in einem ausgeglichenen Verhältnis zwischen undifferenzierten und ausdifferenzierten Zellen. Erkennbar war aber ein vermehrtes Vorhandensein von letalen

Zellen bei der Kultivierung mit einem neuen Probenstück (Abb. 13). NiTi-Proben aus den Zelltests wurden gar nicht oder mit Einzelzellen bewachsen.



**Abb. 13:** NiTi (neu) im Epithelzellrasen.

**Abb. 14:** Epithelzellen – Negativkontrolle.

### 3.2.2 Morphologische Ergebnisse bei Optis-Proben

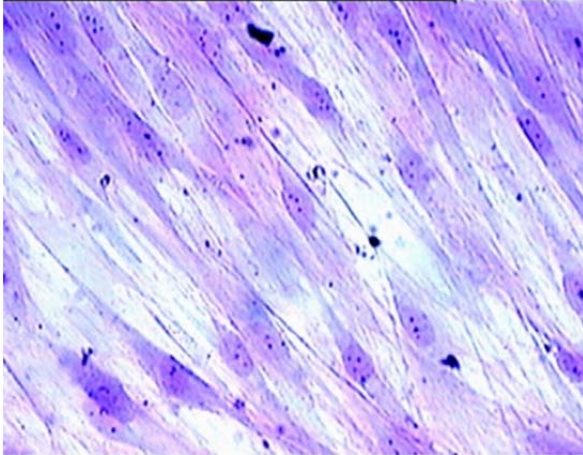
Alle Fibroblasten wuchsen in einer morphologisch sehr gut ausgeprägten Zellform mit einem gut erkennbaren Kernkörper und einer typischen Spindelstruktur. Die Zellen zeigten untereinander eine gut sichtbare Vernetzung (Abb. 15). Die Epithelzellen waren als typische „cobblestone“-Zellform gleichmäßig kubisch gewachsen. Dabei zeigten sich nur sehr wenig ausdifferenzierte Zellformen (Abb. 16), sowohl auf Glas als auch auf Kunststoffuntergrund. Ein Unterschied zwischen dem Kultivieren mit neuen oder im Test verwendeten Optis-Proben zeigten morphologisch keine Unterschiede.

Die morphologische Gesamtbeurteilung für das Wachstum der Zellen mit den NiTi-Proben lag bei einer Tendenz von guter bis sehr guter Struktur, während die Morphologie der Zellen mit den Optis-Proben durchweg mit sehr gut zu bewerten war.

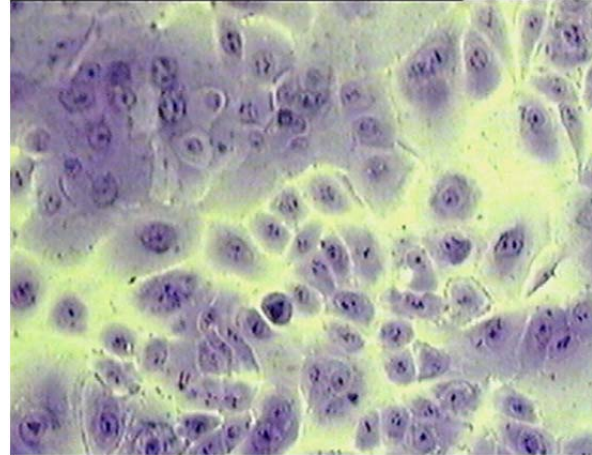
Auffällig am Verhalten beider Zelltypen gegenüber den NiTi-Proben und den Optis-Proben war der Unterschied, dass sich die Optis-Proben ohne Mühe vom Zellrasen abnehmen ließ und sich so auch die Zellen unter den Probenstücken beurteilen



ließen (Abb. 15 und 16, Proben sind entfernt). Die NiTi-Proben hingegen wurden von den Fibroblasten regelrecht vernetzt und zerrissen bei Abnahme den gesamten Zellrasen. Die Epithelzellen zeigten ein deutlich höheres Verhältnis letaler Zellen um die NiTi-Proben (Tab. 8).



**Abb. 15:** Fibroblastenrasen unter Optisprobe.



**Abb. 16:** Epithelzellrasen unter Optisprobe.

Wachstums- verhalten der Zellen	Fibroblasten		Epithelzellen	
	NiTi- Probenkörper	Optis- Probenkörper	NiTi- Probenkörper	Optis- Probenkörper
1	XXX	XXX	XX	XXX
2	ca.5%	ca.5%	ca.30%	ca.5%
3	XXX	XXX	XXX	XXX
4	XXX	XXX	XXX	XXX
5	XXX	∅	∅	∅
6	XXX	X	XX	X

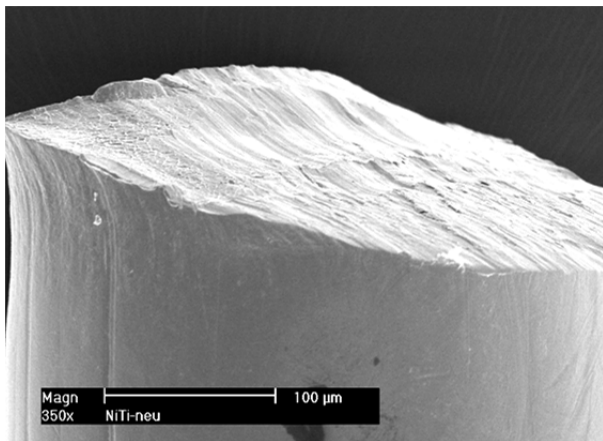
**Tab. 8:** Gesamtbeurteilung des Zellwachstumsverhaltens der Zellen mit den Probenkörpern.

Bewertungsindex: ∅ negativ X wenig XX vermehrt XXX stark  
Wachstumsverhalten der Zellen mit den Probenkörpern:

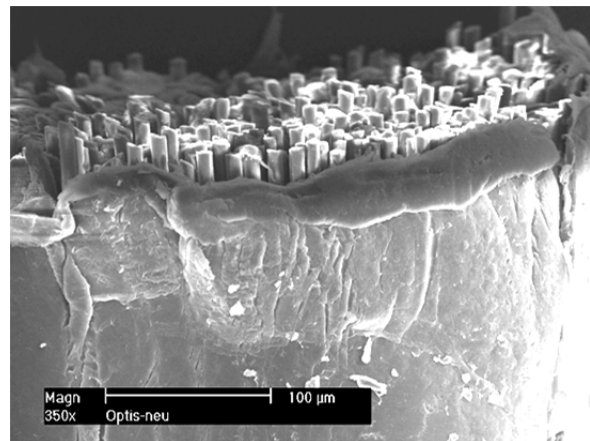
- 1 konfluentes, gleichmäßiges Wachstum wie die Negativkontrolle (Zellen ohne Probenkörper) im Kulturgefäß
- 2 Verhältnis letaler zu vitalen Zellen
- 3 Wachstum bis an den Probenkörper
- 4 Wachstum unter dem Probenkörper
- 5 Wachstum auf einem neuen, unbehandelten Probenkörper
- 6 Wachstum auf dem im Test verwendeten Probenkörper

### 3.2.3 Strukturelle Oberflächenveränderungen der Proben

Die Untersuchung der neuen und im Test verwendeten Probenabschnitte im Rasterelektronenmikroskop sollte die Oberflächenbeschaffenheit einer unbehandelten Probe sowie die Einwirkungen physiologischer und chemischer Stoffe auf dieselbe wiedergeben, sowie deren mögliche Beeinflussung der Zellkultur. Untersucht wurden einmal die abgetrennten Probenenden (Abb. 17 und 18) und die Oberfläche (Abb. 20 und 21), die den Bogen umgibt.



**Abb. 17:** REM-Aufnahme eines neuen NiTi-Bogens (Schnittkante).



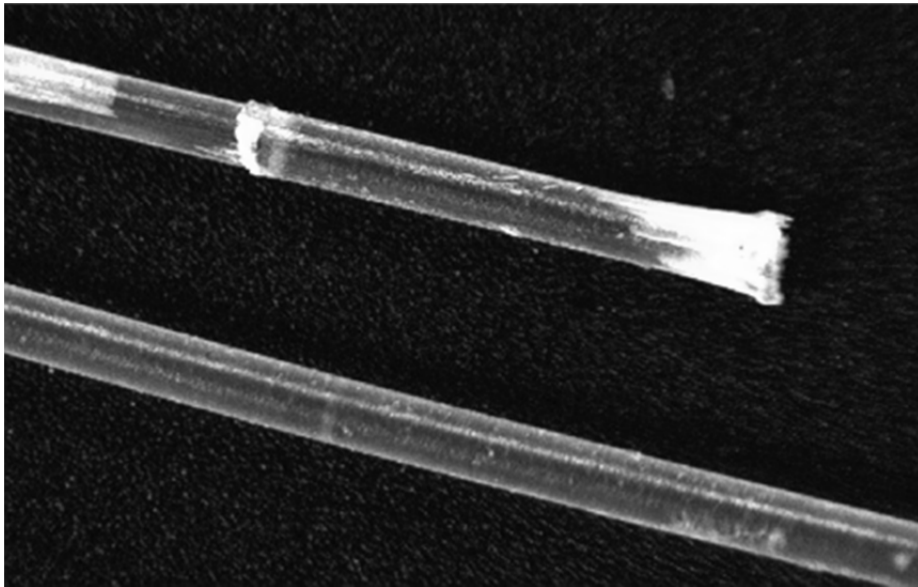
**Abb. 18:** REM-Aufnahme eines neuen Optis-Bogens (Schnittkante.)

Die NiTi-Bögen besitzen eine polierte Oberfläche eines kompakten Metallkörpers, während bei den Polymerbögen die Oberfläche immer aus einem Kunststoffmantel besteht, der ein Bündel Glasfasern umspannt.

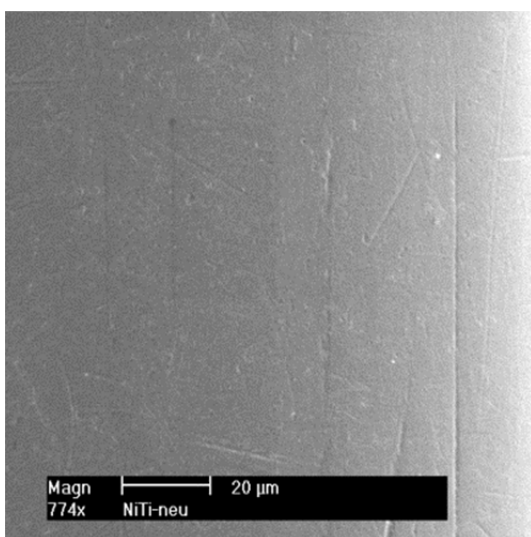
Die Bemessung der Probengröße konnte mit einem wasserfesten Stift direkt aufgetragen werden und im Einklang mit der ISO-Vorgabe durch Reinigung mit absolutem Ethanol im Ultraschallbad mühelos entfernt werden. Dieses hatte weder eine Strukturveränderung noch eine veränderte Oberfläche zur Folge. Die Probenherstellung mittels Seitenschneider (Kap. 2.1) ergab eine Kantenbildung mit Schnittrillen (Abb. 17).

Bei Spannung des Polymer-Harz-Bogens über 60 Grad kam es zum Bruch (Abb. 19). Bei den Polymerbögen waren Markierungen zur Bemessung der verschiedenen Dimensionen auf dem Kunststoff zwar möglich, wurden aber unentfernbar vom

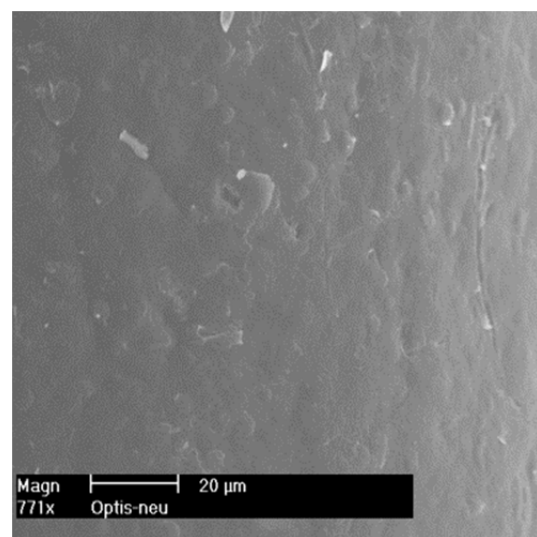
Kunststoff aufgenommen. Daher konnten vor der Dimensionierung keine Markierungen auf den Kunststoffbögen aufgebracht werden. Die Oberflächenresistenz gegen Ethanol war aber wie bei den Nickel–Titan–Bögen vollständig erhalten. Die Oberfläche der Schnittkanten hat eine veränderte Oberfläche, die auch die Struktur selbst verändert (Abb. 18 und 19). Es konnten mit einem Skalpell (Kap. 2.1) exakte Schnittkanten erzielt werden, die aber einen ausgefransten Rand zeigten und das Bündel Glasfasern freilegte. Es entstand jedoch eine exakte Probengröße mit einer exakten Probenbegrenzung.



**Abb. 19:** Lichtmikroskopische Aufnahme eines Optis preformed archwire. (oben: Bruchstelle und Schnittstelle).



**Abb. 20:** REM-Aufnahme eines neuen NiTi-Bogens (Mitte).



**Abb. 21:** REM-Aufnahme eines neuen Optis-Bogens (Mitte).



**Oberflächen im Vergleich:**

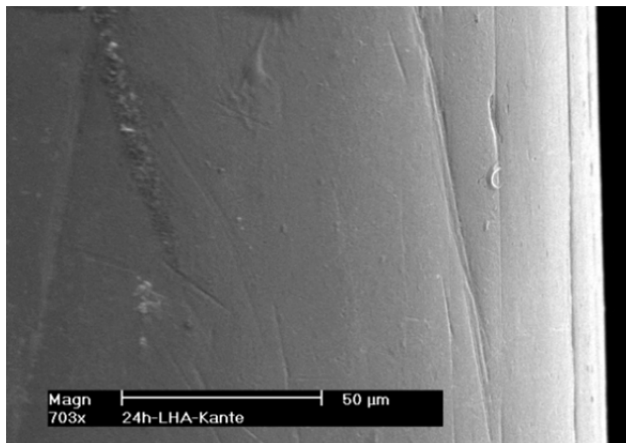
<b>Nickel–Titan–Bögen: neu</b>	<b>Polymerharz–Bögen: neu</b>
- eine glatte Oberfläche mit sichtbaren Kratzern	- eine raue Oberfläche, die sehr wellig erscheint
- viele, starke Schnittrillen am Probenende	- freigelegtes Glasfaserbündel am Ende
- regelrechte Abstufungen mit Kantenbildung im Randbereich	- verdickter Kunststoffrand mit Einrissen im Randbereich

**Tab. 9a:** Oberflächen von Nickel-Titan-Bögen und Polymerharz-Bögen im Vergleich.

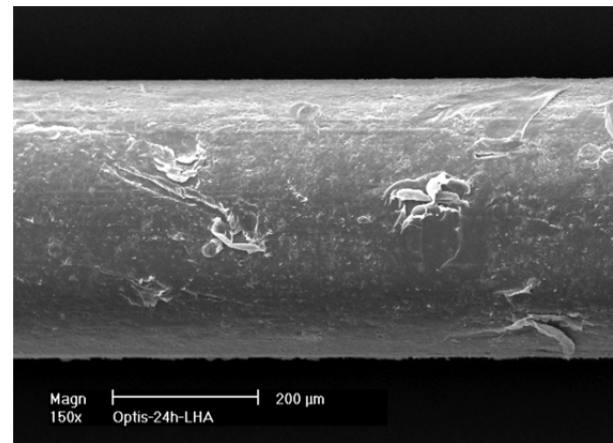
<b>Nickel–Titan–Bögen: getestet</b>	<b>Polymerharz–Bögen: getestet</b>
- glatte Oberfläche mit vereinzelt Rauigkeiten und Kratzern	- raue Oberfläche mit vielen Kratzspuren, z. T. sehr breite Rillen
- Probe aus BCA-Test mit kugelförmigen Ablagerungen	- Probe aus BCA-Test mit Ablagerungen
	- am Probenende klare Begrenzung des Glasfaserbündels, aber viele Kunststofffransen am Rand

**Tab. 9b:** Oberflächen von Nickel-Titan-Bögen und Polymerharz-Bögen im Vergleich.

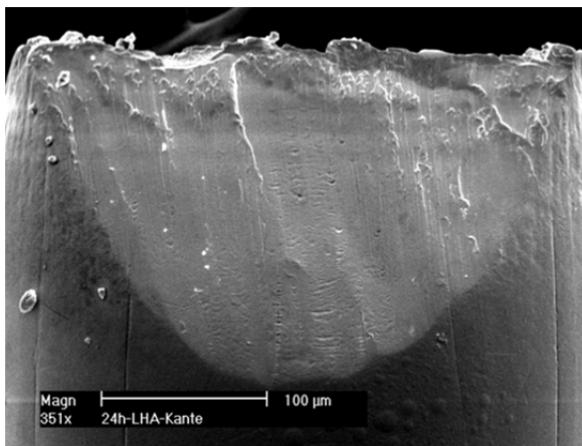
Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen des Mittelteils der unbehandelten Testobjekte zeigten eine deutliche glattere Oberfläche des NiTi-Bogens gegenüber dem Optis-Bogen, der eine schon fast schuppige Oberfläche aufweist (Abb. 20 und 21). Auch bei den Aufnahmen der getesteten Bögen vor allem des LHA- und des BCA-Tests waren viel mehr Ablagerungen am Polymer-Harz-Probenstück als am NiTi-Probenstück zu erkennen (Abb. 22, 23, 24 und 25).



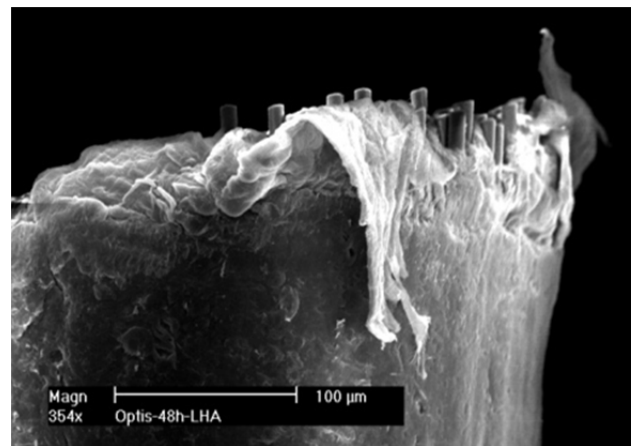
**Abb. 22:** NiTi-Mitte aus LHA-Test.



**Abb. 23:** Optis-Mitte aus LHA-Test.



**Abb. 24:** NiTi-Kante aus LHA-Test.



**Abb. 25:** Optis-Kante aus LHA-Test.

## **4 Diskussion**

In den letzten Jahrzehnten sind zahlreiche in vitro und in vivo Untersuchungen bezüglich der Biokompatibilität von NiTi-Legierungen durchgeführt worden. Größtenteils wurden gute bis sehr gute Bioverträglichkeiten sowohl bei In-vitro- [8, 27, 35, 2, 30] als auch In-vivo-Studien [33, 34, 31] festgestellt. Problematisch ist dabei die Vergleichbarkeit von den unterschiedlichen Untersuchungen.

Aus diesem Grund wurde in dieser Studie das neue Polymer-Glasfaser-Bogenmaterial als „Herausforderer“ mit dem etablierten, als biokompatibel eingestuftem NiTi-Bogen verglichen und das mit möglichst standardisierten Testverfahren. Ausgewählt wurden Prüfungen auf „In-vitro-Zytotoxizität“ nach DIN ISO 10993-5, auf deren Grundlage auch die biologische Beurteilung von Medizinprodukten stattfindet. So hat sich beispielsweise am Fraunhofer IGB die Testung von Biokompatibilität / Zytotoxizität nach DIN EN ISO 10993-5:2009 als Serviceleistung etabliert ([www.igb.fraunhofer.de](http://www.igb.fraunhofer.de)).

### **4.1 Bewertung der Methoden**

#### **4.1.1 Variabilität in der Zellkultur**

Eine In-vitro-Testung an humanen Zellen des Organbereiches, an dem das Biomaterial eingesetzt wird, kommt dem In-vivo-Ergebnis am nächsten. Um eine gute Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse von Standardassays zu erzielen, wurden - entsprechend der Empfehlung der ISO 10993-5 - primäre Zelllinien verwendet [21] und auf die Kontinuität bei der Patientenauswahl, die möglichst frische Gewebeentnahme aus gleichen, geeigneten Regionen und die kontrollierte spezifische Zellanzucht geachtet [28].

Die Mundgesundheit verbunden mit oraler Hygiene und einer guten Konstitution des Patienten hat ebenfalls einen erheblichen Einfluss auf die spätere Zellkultur [21]. Als Zelltyp wurden Fibroblasten und Epithelzellen gewählt. Für primäre Zellkulturen zeichnen sich Fibroblasten durch eine gute Vermehrung mit kontinuierlichen Proliferationsraten und langlebiger Passagierfähigkeit aus.

Auch Fibroblasten sind in Kultur nicht unbegrenzt passagierbar und lebensfähig [12], deshalb wurde die Anzahl der Passagen möglichst niedrig gehalten, ebenso bei den empfindlicheren Epithelzellen.

#### **4.1.2 Bewertung der Probenherstellung**

Zur Erlangung möglichst aussagekräftiger, vergleichbarer und reproduzierbarer Testergebnisse wurde für die Probenherstellung die ISO-Norm EN ISO 10271:2001 angewandt (Kap. 2.1).

Abschnitt A 3.1. der ISO Norm 10271 gibt als Testbehälter Kunststoffgefäße vor, die in dieser Studie in Form von 96-well-Platten bei den direkten Tests und 6-well-Platten bei den indirekten Tests zum Einsatz kamen. Außerdem sollten mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt werden. Deshalb wurden zur statistischen Auswertung immer 8-fach-Messungen angelegt.

Bei der Prüfungsdurchführung wurde (nach Abschnitt 4.1.7 der ISO Norm 10271) ein Verhältnis von 1cm<sup>2</sup> Probenoberfläche in 1 ml Prüflösung bei 37°C eingehalten. Für die Probenherstellung der einzelnen Testabläufe wurde als Zielsetzung die geringste Veränderung der Originalbögen angestrebt. Dieses ließ sich aber nur begrenzt durchführen, da die Bogeneigenschaften, die Kulturgefäße und die zugrunde gelegten ISO-Normen die Verifizierung limitierten (Kap. 2.1).

Aufgrund der Größe der Vertiefungen in den 96-well-Platten und der begrenzten Biegefähigkeit des Drahtes war eine Teilung der Prüfkörper (Kap. 2.3.1.1) zur Durchführung der direkten Zellinkubation unumgänglich. Die Drähte mussten in jeweils 2 x 0,5 cm Probenabschnitte mit insgesamt vier Schnittflächen dimensioniert werden, um die komplette Bedeckung mit Prüflösung sicherzustellen (Tab. 10). Das sind jeweils zwei unregelmäßige Bogenenden mehr als bei einer kieferorthopädischen Anwendung entstehen würden. Die Probenstücke lagen oberhalb der Zelllage ohne die Zellen zu berühren. Dabei waren die Proben aber stets mit Inkubationsmedium bedeckt, so dass eine Abgabe von Schadstoffen direkten Einfluss auf die Zellen hatte, diese aber nicht durch Druckauflage von den Proben in ihrem Wachstum behindert wurden.

Für die Herstellung der Eluate sollten die Prüfkörper möglichst groß bleiben, da auch bei Einhaltung der ISO-Norm (Kap. 4.1.7 der ISO-Norm 10271) das Verhältnis von

Probengröße zu Probenlösung gewahrt wäre. Bei den 6-well-Platten der indirekten Tests konnte die Größe der NiTi- und der Optis-Proben auf maximal 6 cm eingehalten werden (Tab. 1).

Nur durch das Biegen der Drähte war es überhaupt möglich, die Proben in die geforderten geringen Prüfvolumina einzulegen. Es wurde streng darauf geachtet, dass alle Oberflächen mit Lösung bedeckt waren. Besonders beim Schneiden des NiTi-Bogens entstanden unregelmäßige Schnittkanten. Diese Kante variierte und damit auch minimal die Gesamtoberfläche. Die Dimensionierung in mehrfache kleinere Probenvolumina führte zu statistisch nachvollziehbaren Ergebnissen, auch wenn dadurch die Originalgröße verändert wurde.

Nach der Probendimensionierung wurden die Abschnitte wie gefordert (Kap. 4.1.6.4.2 der ISO-Norm 10271) 2 Minuten mit Ethanol im Ultraschall gereinigt und anschließend mit Wasser abgespült. Die geforderte Prüfzeit wurde auf 3 Tage bei der Elution der Proben bzw. auf 1 und 2 Tage bei der direkten Testung der Proben auf den Zellen bedingt durch das Verhalten des Kulturmediums bei einer Kultivierung von 37°C verkürzt. Abschnitt A 3.2.2 der ISO Norm 10271 erlaubt eine Kurzzeitprüfung, die mindestens 24 Stunden betragen sollte, so dass die in dieser Studie eingesetzte Prüfzeit auch statistisch relevant ist.

### **4.1.3 Bioverträglichkeitstests im Vergleich**

Um medizinisch relevante Aussagen über die Bioverträglichkeit bestimmter Substanzen, Produkte oder Applikationen zu tätigen, sind eine Vielzahl an verschiedensten Assays möglich. Enzymatische Testverfahren verfügen über viele Vorteile gegenüber anderen Prüfmöglichkeiten. Sie sind kostengünstiger als beispielsweise Immunoassays (BrdU) und können mit wenig Etat eine große Anzahl an Proben testen. Die meisten enzymatischen Verfahren sind relativ schnell durchzuführen.

Auf der anderen Seite ergeben sich aber auch Fehlermöglichkeiten, die bei der Durchführung des Tests oder durch die Eigenschaft der verwendeten Substanzen entstehen. Die Bestimmung der Zellzahl, die individuelle Zellvitalität verbunden mit der Enzymaktivität und das Verhalten bestimmter Substanzen können die Ergebnisse beeinflussen.

Der MTT-Test ist ein seit langem etabliertes Verfahren, um ein ungünstiges Einwirken, hervorgerufen durch eine Prüfsubstanz auf einen Zellmonolayer, zahlenmäßig zu belegen.

Mosmann [19] stellte besonders die Möglichkeit in den Vordergrund, dass eine aufwendige Zellzählung mit Radioisotopen damit überflüssig sei. Er verwies darauf, dass dieser Assay eine große Zellvariabilität zulässt. Das heißt auch, dass alle Arten von Zellen zuverlässig durch den Test mit sehr guten statistischen Werten überprüft werden können. Der dabei entstehende Farbumschlag liefert eine sehr gut differenzierte Aussage.

Tada et al. [37] modifizierten den Testablauf nur wenig und bewerteten ihn durchweg positiv, weil er im Gegensatz zu anderen Verfahren keine Waschschriffe bei der Durchführung benötigt. Auch die Verwendung schadstoffarmer Substanzen macht ihn für die Bioverträglichkeitstestung attraktiv.

Wie Studien inzwischen belegt haben, zeigt der MTT-Test (Kap. 2.3.1.3.1) in Anwesenheit von bestimmten Metallionen Grenzen, weil die Eigenschaft der Chelatbildung zu einer Formazanbildung führt, die nicht durch die enzymatische Tätigkeit der Zellen zurückzuführen ist [15, 23].

Der zweite enzymatische Test in dieser Studie, der XTT-Test, war ebenfalls auf die Ringöffnung eines Tetrazoliumsals bezogen. In aller Regel sind die Ergebnisse des XTT-Tests mit denen des MTT-Tests vergleichbar [26]. Auch Stevens [36] bescheinigt in einer Testanalyse die Vergleichbarkeit der Ergebnisse von MTT-Tests mit denen des XTT-Tests. Allerdings ergeben sich durch die unterschiedliche Handhabung der Methodik (Zusatz von PMS beim XTT-Test, SDS beim MTT-Test) auch weitere Kriterien in den Ergebnissen.

Kuhn et al. [16] konnten nachweisen, dass beim XTT-Umsatz in Formazan durch *Candida* ein Restgehalt an Formazan in den Zellen verblieb und eine Nonlinearität bei den Ergebnissen feststellen. Damit geht unter Umständen ein Teil des Formazans nicht in die direkte Messung mit ein und würde eine niedrigere Bioverträglichkeit nachweisen. In dieser Studie wurden zum einen deshalb die Zellen nach dem XTT-Test (Kap. 2.3.1.3.2) auch mit Detergenz lysiert, zum anderen entsteht ein direkter Testvergleich mit MTT. Außerdem wurde der PMS-Gehalt so bemessen, dass die Extinktionsmaxima sich annähernd gleichen.

Damit ein von Zellaktivität abhängiges Ergebnis durch die Zellzahl insgesamt bestätigt wird, wurde in dieser Studie auch ein Test verwendet, der den

Gesamtproteingehalt aller Zellen nachweisen sollte. Beim BCA-Test (Kap. 2.3.1.3.3) handelt es sich um ein standardisiertes 1-Step-Verfahren, das mit einfacher Durchführung kontinuierlich zu einer intensiven Farbgebung führt (Fa. Pierce). Um eine Testlinearität zu gewährleisten und den Proteingehalt direkt berechnen zu können, wurde eine Standardkurve mit einem Rinderserumalbumin, das gehaltsspezifisch exakt angesetzt war, vor Testansatz ermittelt.

Der BCA-Test toleriert aber im Gegensatz zu anderen Verfahren die Anwesenheit von Detergenzien oder denaturierenden Substanzen [41], allerdings führen andere Substanzen, die ebenfalls Kupfer reduzieren, bei diesem Test zu falschen Proteinergebnissen, auch wenn eine Standardkurve obligat geführt wurde. In dieser Studie wurden aber alle Kontrollen wie Blank und Negativkontrolle ebenso behandelt wie die zu testenden Materialien, um ein falsches Ergebnis auszuschließen. Auch die Standards müssen ebenso behandelt werden wie die Proben, um korrekte Werte zu erreichen (Fa. Serva).

Abschließend wurde ein enzymatischer Bioverträglichkeitstest angewandt, um sicherzustellen, dass alle Testreihen statistisch vertretbar sind. Entwickelt wurde der lysosomale Hexoaminidase Assay (LHA-Test, Kap. 2.3.1.3.4) von Landegren zunächst zur Analyse der Zellzahl [17]. Für ihn war es von Vorteil, dass der Test keine teuren oder instabilen Reagenzien beinhaltet. Er hob hervor, dass der LHA schnell durchführbar ist und selbst bei längerer Inkubation eine konstante Enzymaktivität behält. Auch ein obligat mitgeführter Blank spielt gerade bei diesem Test eine große Rolle, da bei einem Teil des Substrats die Hydrolyse spontan abläuft (Fa. Sigma). Die sorgfältige Testdurchführung zeigt konstant die Proportionalität der Aktivität des ubiquitären Enzyms Hexoaminidase zur Zahl lebender Zellen in der Kultur [38]. Somit wird das Ausmaß zytotoxischer Effekte *in vitro* nach Zellexposition durch Änderung der Hexoaminidaseaktivität quantitativ messbar.

#### **4.1.4 Bewertung der lichtmikroskopischen Untersuchung**

Eine histologische Darstellung eines Gewebes mit vorangegangener Fixierung und Färbung mit Mehrfachfarbstoffen zeigt eine gute morphologische Bestimmung von intakten Zellen oder Zellschäden über die Darstellung des Zytoplasmas, einer begrenzten Kernmembran, Vakuolen, komprimierte Zellkerne oder auch einer

Zytolyse. Bereits vorher abgestorbene Zellen, die abgeschwommen sind, werden nicht mitbeurteilt.

Die spezifische Zellmorphologie zeigt eine Reaktion der Zellen auf die verwendeten Proben, wenn sie direkt in Kultur damit konfrontiert wurden, und ermöglicht eine qualitative Beurteilung der Ergebnisse. Dieser Studie sollte klären, ob das morphologische Bild der Zellkulturen im Direktkontakt mit den Proben die Ergebnisse der quantitativen Tests bestätigt. Bei Fibroblasten wird die Morphologie des Zellkörpers auffällig, wenn es zum Verlust der typischen Spindelform oder im ungünstigsten Fall zum Ausbilden runder Zellen kommt.

Epithelzellen verlieren das übliche Wachstum des „Cobblestone“-Musters, differenzieren und bilden spiegeleiförmige Riesenzellen. P. Murray et al. [21] weisen aber darauf hin, dass es auch in einer normalen Zellpopulation biologisch unterschiedliche Zellmorphologien gibt.

Ein weiteres Problem ergibt sich beim Handling der Kulturen, denn es kann auch zu einer mechanisch verursachten Zellzerstörung oder zu einer Zellkontamination über die Proben kommen [32]. Diese möglichen Gefahren wurden sorgfältig ausgeschlossen, da die Kulturen möglichst wenig bewegt und die Proben intensiv gereinigt und sterilisiert wurden.

Schmalz et al. [32] weisen auf die Notwendigkeit einer morphologischen Beurteilung hin, da in vivo eine mögliche Toxizität ebenfalls über morphologische Veränderungen diagnostiziert wird.

#### **4.1.5 Bewertung der Oberflächenuntersuchung im REM**

Für eine weitere qualitative Aussage wurden in dieser Studie die Proben im Rasterelektronenmikroskop beurteilt. Als Ausgangslage wurden die unbehandelten Probenabschnitte untersucht, um eine mögliche ungünstige Oberflächenbeschaffenheit zu ermitteln. Die Oberflächen eines Objektes bestimmen die zu erwartende Bioverträglichkeit erheblich.

Bei den NiTi-Bögen kommt es bei einer intakten Oberfläche zu keiner nennenswerten Ionenabgabe [9] und damit auch nicht zu Biounverträglichkeiten. Auch Wang et al. [42] wiesen darauf hin, dass polymeres Biomaterial ebenfalls erst durch die Oberflächeneigenschaften bioverträglich wird. Die in dieser Studie



eingesetzten Probenabschnitte waren für den Testeinsatz sehr klein dimensioniert und hatten deshalb auch Auswirkungen auf die Struktur.

S. Shabalovskaya [35] stellte fest, dass je kleiner ein Material ist, desto größer sind auch die Auswirkungen auf die Oberflächendefekte. Sie wies auch darauf hin, dass bei der Vorbereitung der Proben für z. B. Zellkulturtests das Probenmaterial durch den Vorgang der Sterilisation eine Oberflächenveränderung entstehen könnte. Dies geschieht sowohl auf der Oberfläche selbst aber auch im Randbereich an den Schnittkanten durch mechanische und physikalische Einwirkungen. Die Probenabschnitte aus den Zellkulturtests können sich ebenfalls oberflächlich verändern.

Im rasterelektronenmikroskopischen Bild wird dann eine quantitative Beurteilung eventuell noch einmal qualitativ bestätigt. Die mögliche Freisetzung toxischer Substanzen wird umso wahrscheinlicher, je größer die Oberflächendefekte einer Probe eintreten. Die bei der Probenvorbereitung entstandenen Schnittkanten sind eine vorab unkalkulierbare Exposition veränderter Oberflächenbereiche. Die Bilder im REM lassen eine Beurteilung der individuellen Oberfläche vor und nach den Tests zu und sind eine Ergänzung zu den qualitativen morphologischen Ergebnissen, die lichtmikroskopisch ausgewertet wurden.

## **4.2. Bewertung der Ergebnisse**

### **4.2.1 Vergleich der Statistikergebnisse**

In den Biokompatibilitätstests folgt die Korrelation der optischen Dichte linear dem Anstieg der Konzentration durch die Zunahme der enzymatischen Zellaktivität bzw. Zellproliferation. Dieser lineare Zusammenhang zweier Berechnungsparameter oder auch die Regression wird in den Testverfahren durch die Gegenüberstellung der gebildeten Konzentration des jeweiligen Substrats zur gemessenen optischen Dichte beurteilt.

Pro Probenabschnitt wurden jeweils 8 gleichwertige Ansätze gemittelt. Als korrekter Sollwert jedes Testansatzes wurde zum Vergleich des ungehinderten Zellwachstums eine Testreihe mit Zellen ohne Proben am Anfang und am Ende der Testreihen inkubiert und der Wert dieser Negativkontrolle (Zellen ohne Probenabschnitt) mit 100%iger Bioverträglichkeit gleichgesetzt. Eine Ergebnisberichtigung dieses Wertes

fand durch Abzug des Mediumwertes statt, da die Eigenfarbe des Mediums selbst einen zwar geringen, aber unterschiedlichen Wert hervorbringt.

Die Mehrfachbestimmungen eines identischen Verfahrensablaufes ergibt in der Summe der Daten eine Normalverteilung, d. h. eine Verteilung annähernd identischer Werte. Die Normalverteilung oder auch Gauß'sche Verteilungskurve zeigt deutlich, inwieweit die Werte voneinander abweichen. In der Biometrie muss diese Kurve möglichst eng sein, wird aber auch durch Streufehler sehr beeinflusst. Dabei ist die Kenntnis des Normalen die Voraussetzung für die Definition des Krankhaften [4]. Die Ermittlung des Mittelwertes als Durchschnittswert der Datenverteilung zeigt die Abweichung von den Negativkontrollen. Je größer der Datenumfang ist, desto geringer wird das Risiko, in der statistischen Entscheidung einen Fehler zu begehen [3].

In dieser Studie wird über Balkendiagramme der Bezug von der Extinktion zur Konzentration der umgesetzten Reaktionsprodukte dargestellt. Dabei erlaubt die Konzentration als Ausdruck der Zellvitalität den direkten Bezug prozentualer Abhängigkeit zur Negativkontrolle.

Trotz sorgfältigster Zellkulturarbeit haben unterschiedliche Testmethoden auch unterschiedliche Stärken und Schwächen. Um Fehlerquellen zu vermeiden wurden drei verschiedene Enzymteste herangezogen (Tab. 5). Als Abgrenzung zum Ergebnis dieser Auswertungen wurde die tatsächliche Zellmasse als Proteingehalt bewertet und statistisch dem Normalwert gegenübergestellt (Tab. 5).

Die Ergebnisse der direkten Tests (Tab. 10a, 10b) sind in Form von Balkendiagrammen in Abb. 7 für Fibroblasten und in Abb. 8 für Epithelzellen dargestellt. Es ist tendenziell zu erkennen, dass die Bioverträglichkeit von Optis geringfügig höher als von NiTi ist und bei beiden durch längere Einwirkzeit abnimmt.

Die Ergebnisse der direkten Tests werden durch die Ergebnisse der indirekten Tests (Tab. 11a, 11b) – ebenfalls graphisch dargestellt in Abb. 9 und Abb. 10 – bestätigt. Ist bei den direkten Untersuchungen die vereinzelt auftretende Erhöhung der optischen Dichte unter Probenbelastung über 100% noch durch Schwankungen in der Zellzahl beim Aussäen erklärbar, so ist bei den indirekten Untersuchungen die oft sehr hohe optische Dichte unter Eluateinfluss nicht erklärbar. Die quantitativen Tests zeigen trotzdem eine sehr hohe Bioverträglichkeit beider Untersuchungsobjekte. Da pro Testablauf immer gleiche Voraussetzungen bei den Proben als auch bei den Negativkontrollen gegeben waren, ist eine Abweichung durch mögliche Fehlerquellen

überall zu finden und damit relativiert. Bei einer Testwiederholung sind zwar andere Werte möglich, stehen aber durch diesen Bezug prozentual immer im gleichen Verhältnis. Verschiedene Testverfahren mit verschiedenen Substraten lassen dementsprechend auch verschiedene Ergebniswerte erwarten. In allen Testverfahren wurde auf ein exakt gleiches Probenvolumen geachtet, damit alle zu erwartenden Ergebnisse bei einer gleichbleibend photometrischen Messung möglichst vergleichbar sind. Als Bewertungskriterium wurde die ISO 10993-5:2009 herangezogen, die besagt, je niedriger eine prozentuale Vitalität ist, desto höher ist das zytotoxische Potenzial. Dabei gilt bei eine Reduktion der Zellvitalität unter 70% als zytotoxisch.

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe von IBM SPSS Statistics Version 20 (IBM Cooperation, Armonk, New York United States) durchgeführt. Die Normalverteilung der Testergebnisse wurde per Shapiro-Wilks Test überprüft (Tab. 12). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Testreihen wurden mit einem t-test (Tab. 13, 14, 15 und 16) mit einem Signifikanzniveau von  $p = 5\%$  bestimmt.

Trotz gleicher Probenvolumina in allen Tests ergeben die t-Tests beim Vergleich der unterschiedlichen Testverfahren miteinander signifikante Unterschiede (Tab. 15 und 16). Aber jede Testanalyse per se zeigt eine gute Bioverträglichkeit beider Materialien unter allen Testbedingungen.

#### **4.2.2 Bewertung gefärbter Zellkulturen mit Probenkörpern**

Eine qualitative Auswertung des Zellwachstums mit den Probenkörpern wurde nach mehreren verschiedenen Parametern bemessen: die Zellmorphologie, die Besiedlung des Zellrasens, das Verhältnis vitaler zu letalen Zellen und das Wachstum um bzw. auf dem Probenkörper.

Eine nachlassende Zellvitalität geht immer mit einer sich ändernden Zellform einher. Beim Unterschreiten eines bestimmten Maßes an Bindung mit dem Untergrund oder mit anderen Zellen erfolgt ein im Körper programmiertes Absterben der Zellen [43]. Sichtbar wird dies durch einen Formwechsel zu einer durchweg runden Zelle oder durch eine beschädigte Zellmembran. Neben der fehlenden Adhärenz kann es zu Kernpyknosen oder zur Fragmentation des Zytoplasmas kommen [20].

Eine deutlich gesunde Zelle zeichnet sich durch ein ausgebreitetes Zytoplasma und eine scharf begrenzte Kernmembran aus. Schon im Ansatz einer neuen Primärkultur

wird durch die Zellmorphologie klar, ob die Zellen einwandfrei und gesund wachsen, so dass die Auswahl der verwendeten Zelllinie für die Bioverträglichkeitsprüfung dadurch kritisch erfolgen kann.

Entwickelt sich nach Zellanzucht zügig ein konfluenter Zellrasen, kann man davon ausgehen, dass eine gute Zellproliferation mit einer guten Dopplungszeit und einem ungehinderten Zellwachstum ohne Zellschäden stattgefunden hat.

Ein Vergleich der Wachstumsbereiche der verschiedenen Proben mit den Negativkontrollen macht unterschiedliche Proliferationsraten und bioverträgliche Kulturmstände deutlich.

Eine lichtmikroskopische Kontrolle erfolgt, um die Zellmorphologie abgrenzend zum Wachstum des Zellrasens beurteilen zu können, da eine Ausbreitung des Zytoplasmas durch Zunahme der Zelldichte verhindert wird.

Wird das Wachstum des Monolayers überschritten, und es kommt zu einer mehrlagigen Wachstumsschicht, entsteht eine Unterversorgung der untersten Zelllage [10]. Zudem bedingt die Auflage der Probe auf dem Zellrasen eine mechanische Belastung, die aufgrund des sehr geringen Gewichtes bei den Polymerprobenstücken geringer als bei den NiTi-Proben ausfällt.

Bei der Beurteilung des Ausbreitens eines gleichmäßig konfluenten Zellrasens wichen nur die Kulturgefäße mit den NiTi-Proben auf den Epithelzellen ab, da hier ein negativer Einfluss deutlich wurde, der eher auf einer Abgabe wachstumshemmender Substanzen als auf das Gewicht der Probenkörper zurückzuführen ist, da das Wachstum der Fibroblasten von den NiTi-Proben mit gleichem Gewicht unbeeinflusst blieb.

Bei der Ausbildung eines Zellrasens in Kultur kann der Differenzierungsgrad der Keratinozyten mikroskopisch nicht ermessen werden, weshalb die tatsächliche Integrität des Monolayers nur geschätzt werden kann. Man muss auch erwähnen, dass es „keine Standardisierung über die messbare Größe des Bedeckungsgrades eines Monolayers gibt“ [39].

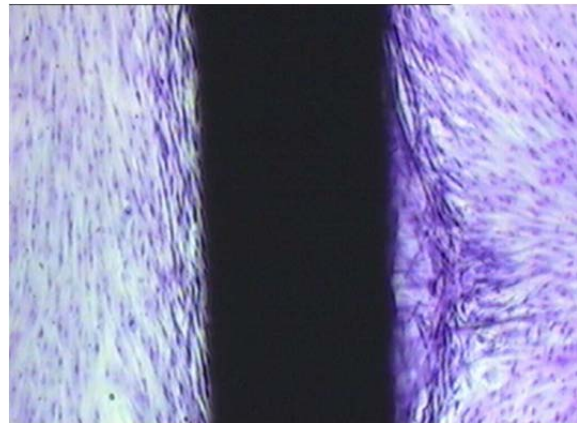
Ferner wurden die Zellen an der Probe und um die Probe hinsichtlich einer Bioverträglichkeit beurteilt. Bedingt durch die Probenstücke kommt es unter der Probe zu einer Unterversorgung der Zellen, die aber in allen Kulturgefäßen zwar in ihrer Zellzahl vermindert aber vorhanden waren.

Unter den NiTi-Proben waren die Fibroblasten so stark vernetzt, dass es nach Entfernung der Probe zu einem Abriss des Zellrasens kam. Die Probenabschnitte

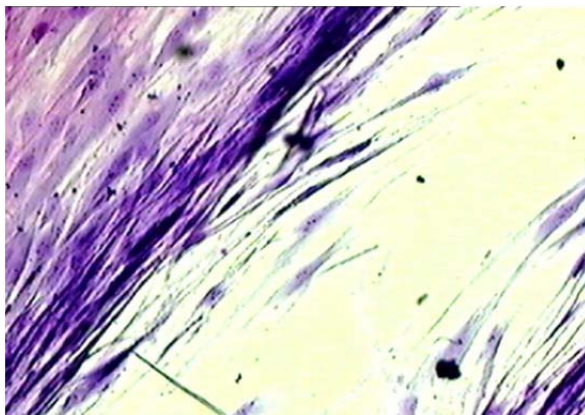
aus den Zellkulturtests bildeten mit den Fibroblasten ein Gewebe um die Probe sowie auch auf der Probe, das an den Enden besonders verdichtet auftrat. Ein ebenfalls mitkultivierter Stahldraht wurde ebenfalls vollständig von den Fibroblasten überwachsen.



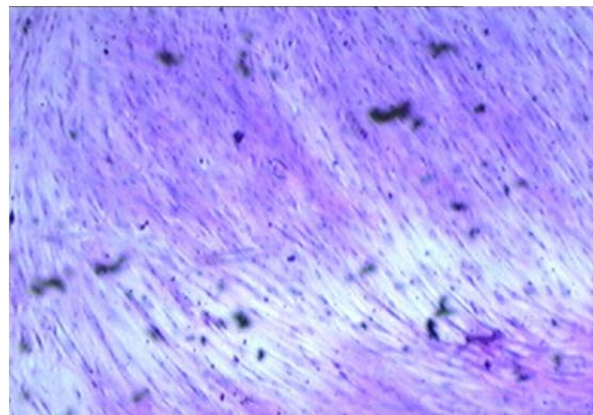
**Abb. 26:** *Fibroblastenwachstum um Stahldraht.*



**Abb. 27:** *Fibroblastenwachstum um NiTi-Probe.*



**Abb. 28:** *Fibroblastenabriss nach Entfernung der NiTi-Probe.*



**Abb. 29:** *Epithelzellwachstum um Optis-Probe.*

Auf den neuen NiTi-Probenabschnitten konnte kein Epithelwachstum festgestellt werden. Auch auf den Proben aus den Bioverträglichkeitstests wurden nur vereinzelte Keratinozyten entdeckt.

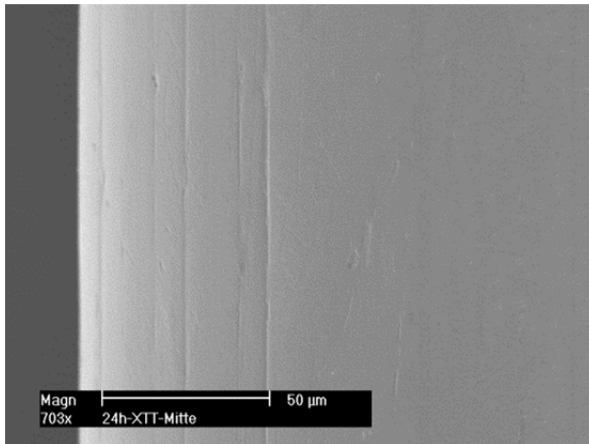
Die Optis-Proben wurden weder von Fibroblasten noch von Epithelzellen bewachsen, es ließen sich nur vereinzelte Fibroblasten entdecken. Bei den Optis-Proben aus den Toxizitätstests waren nur vereinzelte Fibroblasten besonders an der

dem Zellrasen zugewandten Seite zu finden. Auch die Epithelzellen waren in sehr verminderter Zahl an diesen verwendeten Probenstücken durch den Zellrasenkontakt ersichtlich. Konkret besteht nur bei Nickel-Titan die Neigung, die Probe wie inkorporiert einzuschließen. Epithelzellen vermeiden nicht den Kontakt mit Nickel-Titan, wachsen aber nur um den Bogen herum. Die Polymerbögen werden wie körpereigenes Gewebe nicht eingeschlossen und sowohl von Fibroblasten als auch von Keratinozyten als wachstumsbegleitende Gegebenheit toleriert.

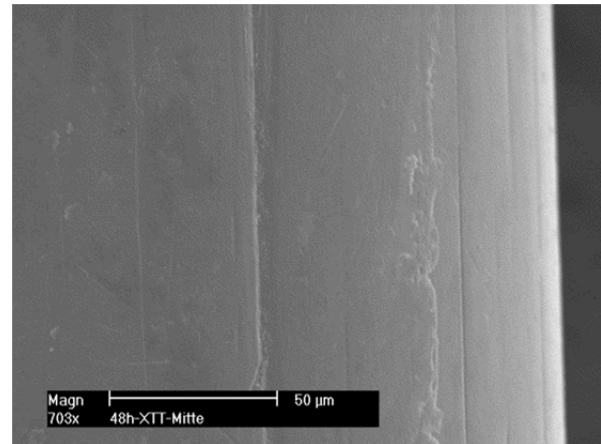
### **4.2.3 Oberflächenbewertung im REM**

Die Beurteilung der Probenoberflächen im Rasterelektronenmikroskop diente zum Vergleich einer unbenutzten Bogenprobe mit einer im Test benutzten Probe. Die unverbrauchten, bereits dimensionierten NiTi-Probenabschnitte zeigten eine glatte Oberfläche, die aber Längsrillen, Mikrovertiefungen und kurze Querrillen aufwies (Abb. 17 und 20). Diese Querrillen sind typischerweise bei der Probenherstellung entstanden, als die Drähte mit einer Pinzette fixiert wurden. Ebenfalls durch die Probenherstellung verursacht waren die Probenenden extrem aufgeraut mit zum Teil starken Vertiefungen. Diese Tatsache lässt die Schlussfolgerung zu, dass es durch die veränderten Kanten zur Beeinflussung der Zytotestergebnisse kommt. Gerade bei kleineren Proben hat eine Veränderung der Probenoberfläche bedeutendere Auswirkungen als bei größeren Proben. Die vorhandenen Unebenheiten auf der Oberfläche können sich zum Nachteil auf die Bioverträglichkeit auswirken.

Die NiTi-Proben aus dem XTT-Test wiesen wie die unverbrauchten Proben mal mehr und mal weniger Längsrillen bei einer ziemlich glatten Oberfläche auf. Es gab vereinzelte aufgeraute Stellen sowie kleine Ablagerungen in den Rillen. Auch an den Kanten der Proben waren diese Ablagerungen zu finden. Sie können einerseits Reste von Testsubstanzen oder von den lysierten Zellen sein, die durch Proteine an die Proben gebunden waren. Signifikanterweise ließen sich diese Ablagerungen aber weder durch Ethanol noch durch eine Reinigung im Ultraschall entfernen.



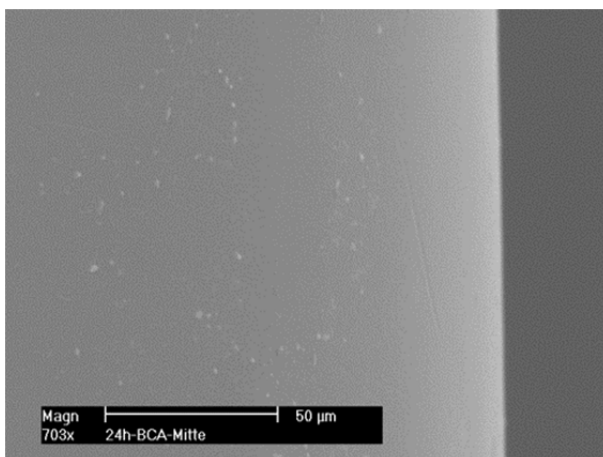
**Abb. 30:** NiTi-Mitte aus XTT-Test nach 24 Stunden.



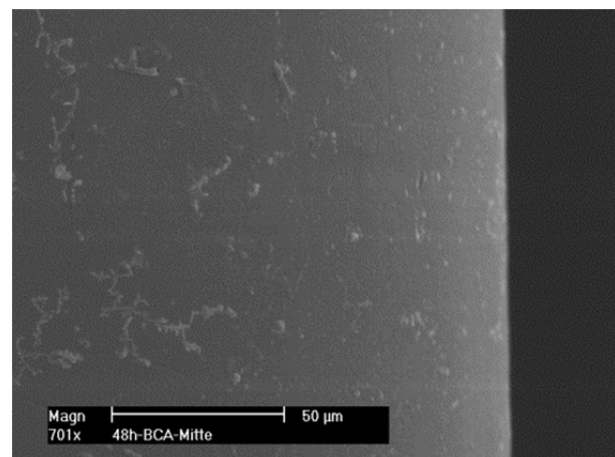
**Abb. 31:** NiTi-Mitte aus XTT-Test nach 48 Stunden.

Die Proben aus dem LHA-Test zeigten sich ähnlich strukturiert wie die unverbrauchten NiTi-Drähte (Abb. 22, 24). Da hier keine Ablagerungen festzustellen waren, die permeabilisierten Zellen aber ebenfalls Kontakt zur Metalloberfläche hatten, fand wahrscheinlich eine Bindung der Testsubstanzen aus dem XTT-Test mit den Ionen der Oberfläche statt.

Die Proben aus dem BCA-Test wiesen viele kleine Ablagerungen über die gesamte Oberfläche und im Rillenbereich der Kanten auf. Diese können keine Zellreste sein, da auch in den anderen Tests eine Zellyse stattgefunden hatte und die Reinigung mit Ethanol im Ultraschall zur Eliminierung geführt hätte. Die in diesem Test gebildeten Proteinkomplexe besitzen aber funktionelle Gruppen, die mit den vorhandenen Ionen auf der Oberfläche eine Bindung eingegangen sein könnten.



**Abb. 32:** NiTi-Mitte aus BCA-Test nach 24 Stunden.

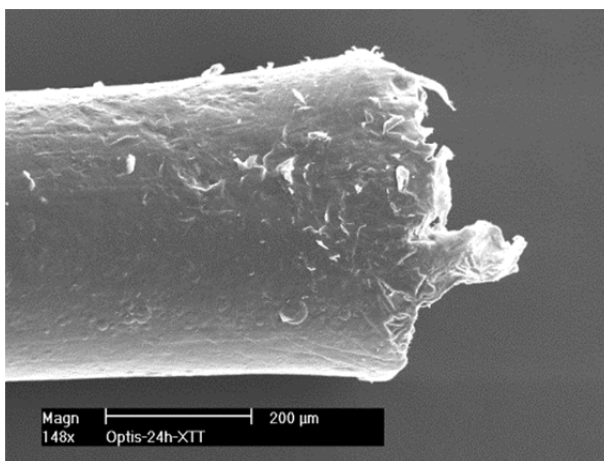


**Abb. 33:** NiTi-Mitte aus BCA-Test nach 48 Stunden.

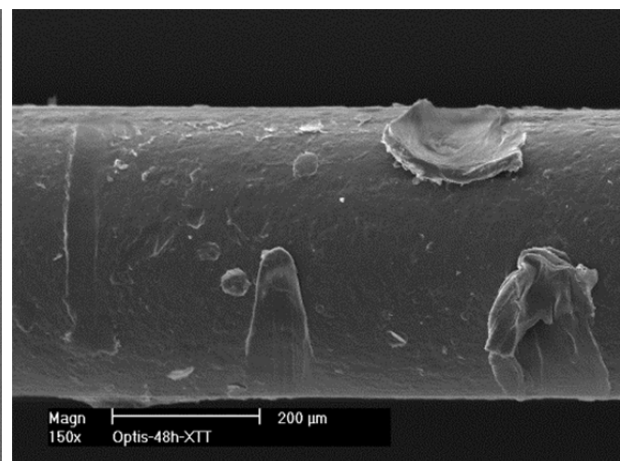
Betrachtet man die unbenutzten Polymer-Glasfaserproben, wird man mit einer sehr unebenen Oberfläche konfrontiert, die zum Teil fast schuppenartig anmutet. Man erkennt Teile, die sich ablösen und ebenfalls Längsrillen. Der Kantenrand erscheint eingerissen, verdickt und mit aufgelagerten Polymerpartikeln. Zudem liegt ein dickes Glasfaserbündel frei (Abb. 18 und 21).

Diese Glasfasern selbst sind eine potentielle Verletzungsquelle im Mikrobereich. Zudem wird der schlechte mechanische Polymerwiderstand durch Fremdeinwirkung gerade im Randbereich sichtbar. Man kann auf die Gefahr des schnellen Polymerabriebs schließen, weil die Proben bei der Herstellung nur durch eine Pinzette gehalten und mit einem scharfen Skalpell dimensioniert wurden. Durch den Abrieb, alternierenden pH-Wert oder Temperatur kommt es zur Begünstigung der Freisetzung von Restmonomeren [11]. Außerdem tritt durch Oberflächendefekte ein vorher nicht entstandener Quelleffekt ein, der zur Auflösung des Materials führen könnte.

Die Optis-Proben aus dem XTT-Test zeigten viele Kratzspuren und einen deutlichen Abrieb mit sich lösenden Polymerpartikeln. Manche Oberflächendefekte waren so tief, dass fast die komplette Ummantelung zerstört war.



**Abb. 34:** *Optis-Mitte aus XTT-Test nach 24 Stunden.*

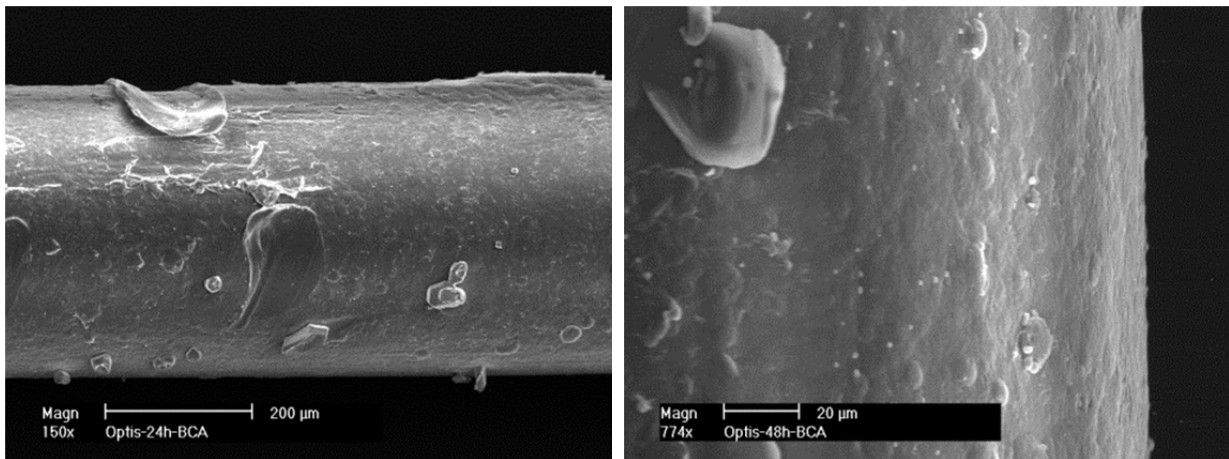


**Abb. 35:** *Optis-Mitte aus XTT-Test nach 48 Stunden.*

Diese Defekte sind eindeutig durch das Handling der Proben mit einer Pinzette entstanden. Polymerabschnitte aus dem LHA-Test zeigten von der Kante ausgehend lineare, sehr tiefe Risse, die die Kunststoffstruktur völlig perforiert hatten. Es wurden feine, abgeschobene Kunststoffschichten sichtbar, und in manchen Bereichen



erschien die oberste Polymerschicht nicht mehr homogen sondern porös. Es scheint, als ob hier eine Reaktion von Kunststoffmonomeren mit bestimmten Substanzen stattgefunden hat (Abb. 23 und 25). Die zelluläre Wechselwirkung mit einem Biomaterial hängt von den physikalisch–chemischen Eigenschaften der Oberfläche wie Benetzbarkeit, Topographie und die Anwesenheit funktioneller Gruppen ab [40]. Eine ungünstige Wechselwirkung scheint auch bei den Optis–Proben aus dem BCA–Test eingetreten zu sein. Es waren breite Abriebspuren sichtbar und zum Teil fast kristalline Auflagerungen. Außerdem verteilten sich über die gesamte Oberfläche feine Kügelchen, wie sie auch auf den NiTi–Proben vom BCA–Test zu sehen waren. Die Struktur an den Kanten entsprach etwa denen der XTT–Proben.



**Abb. 36:** *Optis-Mitte aus BCA-Test nach 24 Stunden.* **Abb. 37:** *Optis-Mitte aus BCA-Test nach 48 Stunden.*

Die gebildeten Proteinkomplexe hatten sich über funktionelle Gruppen fest an die Oberfläche gebunden, so dass sie weder mit Ethanol noch durch Ultraschall zu entfernen waren. Wird jedoch die Oberfläche in irgendeiner Form verändert, so ist der Erhalt eines bioinerten Biomaterials nicht mehr gegeben. Dies ist aber die Voraussetzung für den Fortbestand einer einvernehmlichen Bioverträglichkeit.

## 5 Zusammenfassung

Die Untersuchungen dieser Studie wurden mit primären Fibroblasten und Epithelzellen durchgeführt, um dem Zielgewebe in vivo zu entsprechen. Das Ziel sollte die Beurteilung der Bioverträglichkeit von NiTi- bzw. Polymerbögen im kieferorthopädischen Einsatz sein.

Die Eluierung der Proben hat gezeigt, dass eine Verweildauer für kurze Zeit in einem flüssigen Milieu wie etwa dem Speichel keine biounverträglichen Auswirkungen hat. Mit den NiTi-Proben nahm das Zellwachstum im direkten NiTi-Gewebe-Kontakt nach 48 Stunden geringfügig ab. Zudem scheint die Oberfläche nach Beanspruchung Proteine zu binden und ihre Anfangsintegrität zu verlieren. Die NiTi-Drähte besitzen zunächst eine hervorragende, inerte Oberfläche, die aber trotz offensichtlich guter Bioverträglichkeit friktionsbedingte Oberflächendefekte erwirbt. Dieser resistente, biegsame Draht hat ein geringes Gewicht und ist durch seine mechanischen Eigenschaften geeignet, den kieferorthopädischen Ansprüchen gerecht zu werden, wobei nicht beurteilt werden kann, ob eine lange Verweildauer im Mund die gute Biokompatibilität tatsächlich negativ beeinflusst. Der Polymer-Harz-Bogen zeigte eine außerordentlich gute Bioverträglichkeit, die auch langfristig erhalten zu bleiben scheint. Sein geringes Gewicht belastet die Zähne nicht und die optische Transparenz macht ihn nahezu unsichtbar und ästhetisch interessant. Im Gegensatz zum NiTi-Bogen wird eine körpereigene Verkapselung durch Kollagen unterdrückt, so dass der Draht wie körpereigen anerkannt wird.

Durch die Testung zeigte sich aber, wie schnell sich die Oberfläche der Optis-Bögen veränderte. Schon die Probenherstellung machte deutlich, dass der Kunststoff Farbstoffe aufnimmt, ohne dass diese sich entfernen lassen. Viele Lebensmittel wie Rotwein oder Curry könnten der Ästhetik des Drahtes schon nach kurzer Zeit entgegenwirken. Außerdem zeigte die Verformbarkeit des Bogens schnell Grenzen, so dass es im täglichen Gebrauch zu unentdeckten Brüchen des Drahtes kommen kann. Dass der transluzente Bogen von Biomern mechanisch weniger verlässlich als ein legierter Bogen ist, wird auch in einer neueren Studie bestätigt [5]. Da der Polymermantel sehr dünn und sehr weich ist, kann die Friktion im Slot die Oberfläche schnell aufrauen oder im ungünstigsten Fall sogar zerstören. Eine defekte Oberfläche kann zu einer Reaktion mit Restmonomeren durch bestimmte Substanzen oder Mikroorganismen führen.

Die sehr dünne, sehr anfällige Oberfläche impliziert, dass das Spannungsverhalten des Drahtes nur durch die Glasfasern entsteht. Die Bruchanfälligkeit führt beim Tragen zu Spannungsveränderungen und geringer Belastungsfähigkeit. Die Mundhygiene beim Einsatz der Polymerbögen ist sehr wichtig, wenn die optische Transparenz erhalten bleiben soll.

Die Ästhetik dieses Bogens ermöglicht aber gerade bei älteren Patienten die Entwicklung einer positiven Einstellung zur kieferorthopädischen Rekonstruktion. Die sehr gute Biokompatibilität verbunden mit einer ausgezeichneten Ästhetik zeigte auch nach Veränderung des Kunststoffes keine Biobelastung. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass der Einsatz von Kunststoff als kieferorthopädisches Material für die zukünftige Behandlung enorme Vorteile bietet. Allerdings ist bezüglich der Zusammensetzung des Materials noch viel wissenschaftliche Forschung nötig, um eine inerte Struktur mit stabilen Spannungsverhältnissen und chemischer Beständigkeit zu gewährleisten.

Dieser Polymer–Harz–Bogen kann aber durchaus sinnvoll sein, wenn bei der Patientenauswahl sorgfältig differenziert wird. Gerade Patienten, für die die Ästhetik eine Grundvoraussetzung einer notwendigen kieferorthopädischen Behandlung ist, könnten sich mit diesem Material bei guter Beratung des Behandlers eher zu einer Therapie entschließen. Ein nicht unerhebliches Problem bleibt noch die Finanzierung häufiger Folgebögen, das nur von bestimmten Patienten akzeptiert und realisiert werden kann.

Der Einsatz von Polymer–Harz–Bögen ist unter ganz bestimmten Bedingungen eine gute Alternative, um eine kieferorthopädische Behandlung durchzuführen, die mit NiTi–Drähten nicht stattgefunden hätte.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Birkeland K., Kattø A., Løvgreen S., Bøe O.E., Wisth P.J., Factors influencing the decision about orthodontic treatment, a longitudinal study among 11 – and 15 – year – olds and their parents, *Journal of orofacial orthopedics*, Vol. 60 ( 5 ), p 292 – 307, 1997.
- [2] Bogdanski D., Köller M., Müller D., Muhr G., Brahm M., Buchkremer A., Stöver D., Choi J., Epple M., Easy assessment of the biocompatibility of nitinol by in-vitro cell culture experiments on a functionally graded Ni-NiTi-Ti material. *Biomaterials*, 23, p 4549-4555, 2002.
- [3] Bortz J., Lienert G.,A., Boehnke K., *Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik*, 3. Auflage, Springer, 2008.
- [4] Bünte H., Bünte K., *Spektrum der Medizin: illustriertes Handbuch von den Grundlagen bis zur Klinik*, Schattauer, New York, 2004.
- [5] Chang Ju-Han, *The Effect of Water Storage on Bending Properties of Esthetic, Fiber-Reinforced Composite Orthodontic Wires*, Marquette University, 2012.
- [6] Chudasama Dipak, *Clinical Trial to evaluate fiber – reinforced composite archwire in orthodontic treatment, study at Jacksonville University clinic*, 2008.
- [7] EN ISO 10271:2001(D), *Dentale metallische Werkstoffe – Korrosionsprüfverfahren. Deutsche Fassung EN ISO 10271:2001*.
- [8] Es-Souni M., *Assessing the biocompatibility of NiTi shape memory alloys used for medical applications*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 381, No. 3, p 557 – 567, 2005.
- [9] Es-Souni M., Fischer-Brandies H., Es-Souni M., *Chemical composition, phase transformation and mechanical properties of different NiTi orthodontic archwires*, *Inf Orthod Kieferorthop*, 33(1), p 87-106, 2001.
- [10] F. Gerlach, S. Herrmann, D. Seitz, G. Ziegler, W. Vonau, *Biokompatibles Sensorarray – System für Online – Messungen in der Zellkulturtechnik*, Kurt – Schwabe–Institut für Mess– und Sensortechnik e. V., Meinsberg, 2009.
- [11] Graf Karlheinz, *Zahnärztliche Werkstoffe unter umweltmedizinischen Aspekten – Kunststoffe und Haftvermittler*, *Ärztezeitschrift für Naturheilverfahren und Regulationsmedizin*, 46(4), p 193-197, 2005.
- [12] Hayflick L., Moorhead P.S., *The serial cultivation of human diploid cell strains*, *Experimental Cell Research*, Vol. 25, Issue 3, p 585-621, 1961.
- [13] ISO 10993-5:2009(E), *Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity*. 2009.
- [14] Jarkas, M.I. *Werkstoffmechanischer Vergleich hypoallergener Prothesenbasisstoffe*, Dissertation, Halle – Wittenberg, 2007.
- [15] Krause J., *Untersuchungen zur Anwendbarkeit des MTT – Tests in Gegenwart von Nickelsulfat an kultivierten Maus – und Humanfibroblasten*, Dissertation, Klinik für Kieferorthopädie, Kiel, 2009.

- [16] Kuhn D.M., Balkis M., Chandra J., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A., Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism, *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (1), p 506-508, 2003.
- [17] Landegren, U., Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase. Applications to detection of lymphokines and cell surface antigens, *Journal of Immunological Methods*, 67, p 379- 388, 1984.
- [18] Mc Donald F., Cobourne M., Adult Orthodontics: perils and pitfalls, *Progress in Orthodontics*, 8 ( 2 ), p 308 – 313, 2007.
- [19] Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, 65, p 55 – 63, 1983.
- [20] Müller W.D., Biokompatibilität von Dentalwerkstoffen, *Werkstoffkunde - Praktikum WS 06/07, Zahnärztliche Werkstoffkunde und Biomaterialforschung, Charité, Berlin*.
- [21] Murray P.E., Godoy C.G., Godoy F.G. ,How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated?, *Med. Oral Pathol. Cir. Bucal.*, 12, p 258–266, 2007.
- [22] Nanostart AG Geschäftsbericht 2010 – Nanostart AG.
- [23] Ott J., Vergleich der Anwendbarkeit unterschiedlicher Tetrazoliumsalze in Biotoxitätsassays in Anwesenheit von Nickel- und Kupferionen. Dissertation, Klinik für Kieferorthopädie, Kiel, S. 46-48. 2012.
- [24] Peters M., Leyens C., Titan und Titanlegierungen, Wiley – VCH, ISBN 3-527-30539-4, Weinheim, 2002.
- [25] Roehlike J., Braumann B., Meier M., Schatlo B., Bourauel C., Bis zu 30% weniger Friktion, *Kieferorthopädie Nachrichten*, 4, 2010.
- [26] Roehm N.W., Rogers G.H., Hatfield S.M., Glasebrook A.L., An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT, *Journal of Immunological Methods*, Vol . 142, Issue 2, p 257 – 265, 1991.
- [27] Rose E.C., Jonas I.E., Kappert H.F., In vitro investigation into the biological assessment of orthodontic wires, *Journal of Orofacial Orthopedics*, Volume 59, Number 5, 253-264, 1998.
- [28] Rose E.C., Bumann J., Jonas I.E., Kappert H.F., Contribution to the biological assessment of orthodontic acrylic materials, *Journal of Orofacial Orthopedics*, 61, p 246 – 257, 2000.
- [29] Rosvall M.D., Fields H.W., Ziuchkovski J., Rosentiel S.F., Johnston M.W., Attractiveness, acceptability and value of orthodontic appliances, *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, Vol. 135, Issue 3, p 276 – 277, March 2009.
- [30] Ryänen J., Niemi E., Serlo W., Niemela E., Sandvik P., Pernu H., Salo T., Biocompatibility of nickel-titanium shape memory metal and its corrosion behavior in human cell cultures. *J Biomed Mater Res.*, 35:451-457. 1997.

- [31] Ryänen J., Kallioinen M., Tuukkanen J., Junila J., Niemela E., Sandvik P., Serlo W., In vivo biocompatibility evaluation of nickel-titanium shape memory metal alloy: Muscle and Perineural tissue responses and capsule membrane thickness. *J Biomed Mater Res.*, 41:481-488. 1998.
- [32] G. Schmalz, Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials – advantages and limitations, *Journal of Dentistry*, 22 Suppl. 2, pp. S6–S11, 1994.
- [33] Scudiero D.A., Shoemaker R.H., Paull K.D., Monks A., Tierney S., Nofziger T.H., Currens M.J., Seniff D., Boyd M.R., Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines, *Cancer Research*, 48, p 4827-4833, 1988.
- [34] Shabalovskaya S.A., On the nature of the biocompatibility and on medical applications of NiTi shape memory and superelastic alloys, *Biomedical materials and engineering*, 6 (4), p 267 – 288, 1996.
- [35] Shabalovskaya S.A., Surface, corrosion and biocompatibility aspects of Nitinol as an implant material, *Biomedical materials and engineering*, 12, p 69 – 109, 2002.
- [36] Stevens M.G., Olsen S.C., Comparative analysis of using MTT and XTT in colorimetric assays for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity, *Journal of Immunological Methods*, Vol. 157, Issues 1–2, p 225-231, 1993.
- [37] Tada H., Shiho O., Kurosshima K.-I., Koyama M., Tsukamoto K., An improved colorimetric assay for interleukin 2, *Journal of Immunological Methods*, 93, p 157 – 165, 1986.
- [38] Tomakidi P., Koke K., Kern R., Erdinger L., Krüger H., Kohl A., Komposch G., Assessment of acute cytotoxicity and genotoxicity of corrosion eluates obtained from orthodontic materials using monolayer cultures of immortalized human gingival keratinocytes, *Journal of Orofacial Orthopedics*, Volume 61, Number 1, p 2- 19, 2000.
- [39] Unteregger G., Qualitätssicherung und Standardisierung im Zellkulturlabor: Warum wir endlich eine „good cell culture practice“ brauchen!, Institut für Molekularbiologie, Hamburg, Biospektrum, 2008.
- [40] Todorka G. Vladkova, Surface Engineered Polymeric Biomaterials with Improved Biocontact Properties, *International Journal of Polymer Science*, Vol. 2010, p 1 -22, 2010.
- [41] Walker J.M., The bicinchoninic assay for protein quantitation, *The Protein Protocols Handbook*, Part 1, p11 – 14.
- [42] Wang Y.-X., Robertsson J.L., Spillman W.B. Jr., Claus R.O., Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility, *Pharmaceutical Research*, Vol.21, No. 8, 2004.
- [43] Wintermantel E., Ha S.-W., *Medizintechnik – Life Science Engineering*, 4. Auflage, Springer, 2008.
- [44] Zachisson B.U., Orthodontic treatment in a group of elderly adults, *World Journal of Orthodontics*, Vol. 1, Issue 1, p 55 – 70, 2000.

## 7 Anhang

Direkte Tests	Variablen	Fibroblasten + Optis 24 Stunden		Fibroblasten + Optis 48 Stunden		Fibroblasten + NiTi 24 Stunden		Fibroblasten + NiTi 48 Stunden	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
MTT	M	0,0310	0,0013	0,0263	0,0012	0,0310	0,0013	0,0263	0,0012
	NK	0,3879	0,0142	0,3908	0,0180	0,3879	0,0142	0,3908	0,0180
	M+Op	0,0284	0,0009	0,0243	0,0006				
	M+NiTi					0,0262	0,0013	0,0210	0,0017
	F+Op	0,4016	0,0097	0,3814	0,0120				
	F+NiTi					0,3673	0,0135	0,3610	0,0127
	Bioverträglichkeit in %	104,58	2,96	97,94	3,13	95,57	4,14	93,26	3,03
XTT	M	0,0413	0,0030	0,0416	0,0014	0,0436	0,0031	0,0416	0,0014
	NK	0,3946	0,0330	0,5758	0,0366	0,4440	0,0260	0,5758	0,0366
	M+Op	0,0357	0,0025	0,0440	0,0010				
	M+NiTi					0,0395	0,0007	0,0397	0,0067
	F+Op	0,3764	0,0224	0,5536	0,0324				
	F+NiTi					0,3874	0,0298	0,5159	0,0234
	Bioverträglichkeit in %	96,43	5,63	95,40	5,90	86,89	7,28	89,15	3,16
BCA	M	0,0990	0,0039	0,1033	0,0026	0,0990	0,0039	0,1033	0,0026
	NK	0,2280	0,0153	0,3069	0,0338	0,2280	0,0153	0,3069	0,0338
	M+Op	0,0927	0,0006	0,1035	0,0007				
	M+NiTi					0,0930	0,0010	0,1110	0,0113
	F+Op	0,2200	0,0102	0,2936	0,0405				
	F+NiTi					0,2199	0,0145	0,2833	0,0252
	Bioverträglichkeit in %	98,71	7,44	93,37	19,52	98,35	10,48	84,59	6,84
LHA	M	0,0136	0,0015	0,0088	0,0009	0,0139	0,0018	0,0088	0,0009
	NK	0,2045	0,0177	0,3494	0,0341	0,2430	0,0262	0,3494	0,0341
	M+Op	0,0117	0,0021	0,0090	0,0017	0,0117	0,0012	0,0080	0,0000
	M+NiTi					0,0117	0,0012	0,0080	0,0000
	F+Op	0,2060	0,0103	0,3629	0,0149				
	F+NiTi					0,2396	0,0226	0,3275	0,0405
	Bioverträglichkeit in %	101,81	4,32	103,88	3,87	99,47	9,36	93,79	11,91

**Tab. 10a:** Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der direkten Testverfahren von Medium (M), Negativkontrolle (NK), Medium mit Optis (M+OP) bzw. mit NiTi (M+NiTi) und Fibroblasten mit Optis (F+OP) bzw. mit NiTi (F+NiTi) für Epithel mit Optis bzw. NiTi für 24 und 48 Stunden.

Direkte Tests	Variablen	Epithel + Optis 24 Stunden		Epithel + Optis 48 Stunden		Epithel + NiTi 24 Stunden		Epithel + NiTi 48 Stunden	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
MTT	M	0,0158	0,0009	0,0116	0,0011	0,0158	0,0009	0,0124	0,0011
	NK	0,7596	0,0220	0,5186	0,0153	0,7596	0,0220	0,6680	0,0128
	M+Op	0,0158	0,0015	0,0103	0,0006				
	M+NiTi					0,0138	0,0008	0,0107	0,0012
	F+Op	0,7460	0,0235	0,4574	0,0489				
	F+NiTi					0,6980	0,0128	0,5756	0,0194
	<b>Bioverträglichkeit in %</b>	<b>98,18</b>	<b>3,37</b>	<b>88,17</b>	<b>9,54</b>	<b>91,99</b>	<b>1,85</b>	<b>86,17</b>	<b>2,78</b>
XTT	M	0,0411	0,0016	0,0320	0,0041	0,0411	0,0016	0,0320	0,0041
	NK	0,4123	0,0068	0,5560	0,0336	0,4123	0,0068	0,5560	0,0336
	M+Op	0,0440	0,0010	0,0333	0,0006				
	M+NiTi					0,0413	0,0015	0,0340	0,0010
	F+Op	0,3928	0,0138	0,5123	0,0180				
	F+NiTi					0,3917	0,0101	0,5184	0,0247
	<b>Bioverträglichkeit in %</b>	<b>93,96</b>	<b>3,46</b>	<b>91,40</b>	<b>3,33</b>	<b>94,40</b>	<b>2,32</b>	<b>92,44</b>	<b>4,54</b>
BCA	M	0,0974	0,0032	0,0978	0,0021	0,0974	0,0032	0,0950	0,0019
	NK	0,3527	0,0241	0,3426	0,0196	0,3527	0,0241	0,3393	0,0266
	M+Op	0,0967	0,0025	0,0990	0,0010				
	M+NiTi					0,0957	0,0042	0,0950	0,0042
	F+Op	0,3391	0,0156	0,3314	0,0230				
	F+NiTi					0,3424	0,0263	0,2973	0,0226
	<b>Bioverträglichkeit in %</b>	<b>94,99</b>	<b>5,12</b>	<b>94,90</b>	<b>9,01</b>	<b>96,66</b>	<b>8,69</b>	<b>82,80</b>	<b>7,52</b>
LHA	M	0,0078	0,0014	0,0084	0,0011	0,0078	0,0014	0,0196	0,0325
	NK	0,2614	0,0341	0,3426	0,0384	0,2614	0,0341	0,3426	0,0384
	M+Op	0,0067	0,0006	0,0067	0,0006				
	M+NiTi					0,0100	0,0026	0,0100	0,0030
	F+Op	0,2619	0,0179	0,3291	0,0347				
	F+NiTi					0,2331	0,0259	0,2904	0,0303
	<b>Bioverträglichkeit in %</b>	<b>100,62</b>	<b>6,84</b>	<b>96,48</b>	<b>10,21</b>	<b>87,99</b>	<b>9,18</b>	<b>86,81</b>	<b>8,46</b>

**Tab. 10b:** Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der direkten Testverfahren von Medium (M), Negativkontrolle (NK), Medium mit Optis (M+OP) bzw. mit NiTi (M+NiTi) und Epithelzellen mit Optis (E+OP) bzw. mit NiTi (E+NiTi) für Epithelzellen mit Optis bzw. NiTi für 24 und 48 Stunden.



Indirekte Tests	Variablen	Fibroblasten + Optis 24 Stunden		Fibroblasten + Optis 48 Stunden		Fibroblasten + NiTi 24 Stunden		Fibroblasten + NiTi 48 Stunden	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
		Eluate in XTT: 10%	M	0,0418	0,0013	0,0430	0,0033	0,0433	0,0023
NK	0,3864		0,0045	0,5066	0,0116	0,4304	0,0091	0,4903	0,0223
M+Op	0,0377		0,0015	0,0347	0,0012				
M+Op						0,0347	0,0015	0,0370	0,0020
M+NiTi	0,3840		0,0106	0,5154	0,0112				
F+Op						0,4277	0,0117	0,4923	0,0111
<b>Bioverträglichkeit in %</b>	100,48		2,64	103,68	2,17	101,53	2,63	101,93	2,05
Eluate in XTT: 50%	M	0,0435	0,0026	0,0430	0,0033	0,0430	0,0023	0,0436	0,0021
	NK	0,4529	0,0110	0,5066	0,0116	0,4277	0,0055	0,4903	0,0223
	M+Op	0,0410	0,0026	0,0360	0,0000				
	M+Op					0,0353	0,0006	0,0400	0,0010
	M+NiTi	0,4603	0,0120	0,5179	0,0186				
	F+Op					0,4357	0,0150	0,4944	0,0446
	<b>Bioverträglichkeit in %</b>	102,41	2,28	103,94	4,01	104,07	3,74	101,74	9,77
Eluate in XTT: 100%	M	0,0435	0,0026	0,0430	0,0033	0,0430	0,0023	0,0436	0,0021
	NK	0,4529	0,0110	0,5066	0,0116	0,4277	0,0055	0,4903	0,0223
	M+Op	0,0373	0,0031	0,0360	0,0036				
	M+NiTi					0,0390	0,0010	0,0390	0,0020
	F+Op	0,4516	0,0125	0,5446	0,0242				
	F+NiTi					0,4370	0,0131	0,5080	0,0209
	<b>Bioverträglichkeit in %</b>	101,20	2,32	109,71	4,45	103,45	3,15	105,01	4,24

**Tab. 11a:** Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der indirekten Testverfahren von Medium (M), Negativkontrolle (NK), Medium mit Optis (M+OP) bzw. mit NiTi (M+NiTi) und Fibroblasten mit Optis (F+OP) bzw. mit NiTi (F+NiTi) für Epithel mit Optis bzw. NiTi für 24 und 48 Stunden.

Indirekte Tests	Variablen	Epithel + Optis 24 Stunden		Epithel + Optis 48 Stunden		Epithel + NiTi 24 Stunden		Epithel + NiTi 48 Stunden	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
		Eluate in XTT: 10%	M	0,0344	0,0015	0,0303	0,0015	0,0431	0,0036
NK	0,3230		0,0110	0,2796	0,0145	0,4791	0,0363	0,3964	0,0166
M+Op	0,0293		0,0012	0,0277	0,0012				
M+NiTi						0,0387	0,0029	0,0385	0,0035
F+Op	0,3234		0,0095	0,2770	0,0115				
F+NiTi						0,4781	0,0312	0,3829	0,0140
<b>Bioverträglichkeit in %</b>	101,88		2,88	99,98	4,17	100,79	6,50	96,48	2,95
Eluate in XTT: 50%	M	0,0344	0,0015	0,0303	0,0015	0,0420	0,0028	0,0394	0,0015
	NK	0,3230	0,0110	0,2796	0,0145	0,2458	0,0171	0,3964	0,0166
	M+Op	0,0337	0,0015	0,0270	0,0026				
	M+NiTi					0,0365	0,0092	0,0410	0,0000
	F+Op	0,3470	0,0092	0,2741	0,0142				
	F+NiTi					0,2457	0,0073	0,3740	0,0095
	<b>Bioverträglichkeit in %</b>	108,56	2,65	99,10	4,66	102,65	1,94	93,29	2,68
Eluate in XTT: 100%	M	0,0344	0,0015	0,0385	0,0050	0,0395	0,0019	0,0345	0,0028
	NK	0,3230	0,0110	0,1795	0,0158	0,2505	0,0154	0,3598	0,0151
	M+Op	0,0345	0,0007	0,0340	0,0000				
	M+NiTi					0,0320	0,0035	0,0327	0,0021
	F+Op	0,3380	0,0177	0,1753	0,0096				
	F+NiTi					0,2404	0,0276	0,3611	0,0100
	<b>Bioverträglichkeit in %</b>	105,15	5,89	100,18	6,80	98,76	11,46	100,99	2,45

**Tab. 11b:** Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der direkten Testverfahren von Medium (M), Negativkontrolle (NK), Medium mit Optis (M+OP) bzw. mit NiTi (M+NiTi) und Epithelzellen mit Optis (E+OP) bzw. mit NiTi (E+NiTi) für Epithelzellen mit Optis bzw. NiTi für 24 und 48 Stunden.

Shapiro-Wilk	Fibroblasten + Optis	Fibroblasten + Niti	Epithel + Optis	Epithel + NiTi	Fibroblasten + Optis	Fibroblasten + Niti	Epithel + Optis	Epithel + NiTi
	MTT 24 Stunden				MTT 48 Stunden			
Statistik	0,969	0,818	0,968	0,965	0,940	0,919	0,967	0,937
Signifikanz p	0,892	0,084	0,659	0,860	0,636	0,500	0,650	0,610
	XTT 24 Stunden				XTT 48 Stunden			
Statistik	0,955	0,968	0,842	0,923	0,812	0,993	0,835	0,800
Signifikanz p	0,773	0,878	0,220	0,491	0,054	0,995	0,201	0,041
	BCA 24 Stunden				BCA 48 Stunden			
Statistik	0,968	0,959	0,778	0,891	0,985	0,914	0,793	0,948
Signifikanz p	0,882	0,815	0,062	0,278	0,979	0,461	0,097	0,708
	LHA 24 Stunden				LHA 48 Stunden			
Statistik	0,899	0,900	0,969	0,945	0,808	0,829	10,000	0,907
Signifikanz p	0,324	0,373	0,664	0,682	0,050	0,105	0,968	0,373
	Eluate 10% 24 Stunden				Eluate 10% 48 Stunden			
Statistik	0,952	0,986	0,921	0,969	0,780	0,966	0,975	0,948
Signifikanz p	0,747	0,976	0,456	0,894	0,026	0,868	0,696	0,714
	Eluate 50% 24 Stunden				Eluate 50% 48 Stunden			
Statistik	0,961	0,941	0,912	0,901	0,709	0,823	0,992	0,886
Signifikanz p	0,824	0,670	0,424	0,337	0,050	0,093	0,826	0,255
	Eluate 100% 24 Stunden				Eluate 100% 48 Stunden			
Statistik	0,980	0,909	0,815	0,980	0,826	0,992	1,000	0,962
Signifikanz p	0,962	0,432	0,150	0,962	0,074	0,994	1,000	0,832

**Tab. 12:** Test auf Normalverteilung (Shapiro-Wilks Test für kleine Stichproben unter  $n < 50$ ) der direkten und indirekten Tests für Fibroblasten mit Optis bzw. NiTi für 24 und 48 Stunden und Epithel mit Optis bzw. NiTi für 24 und 48 Stunden. Für Signifikanz  $p \geq 0,05$  sind die Messreihen normalverteilt.

direkte Tests	Epithel + Optis		Epithel + NiTi		Fibroblasten + Optis		Fibroblasten + NiTi	
	p-Wert	t-Wert	p-Wert	t-Wert	p-Wert	t-Wert	p-Wert	t-Wert
<b>MTT</b>	0,405	14,899	0,270	15,047	0,806	3,729	0,891	0,954
<b>XTT</b>	0,273	-12,604	0,560	14,902	0,462	-12,721	0,405	-9,577
<b>BCA</b>	0,444	3,687	0,254	0,788	0,055	-4,316	0,194	-6,157
<b>LHA</b>	0,938	-3,899	0,068	-4,612	0,475	-23,208	0,096	-5,078

**Tab. 13:** *t*-Statistik für Epithel und Fibroblasten mit Optis und NiTi der direkten Tests bei 24 Stunden versus 48 Stunden auf Signifikanzniveau von 5%.

indirekte Tests	Epithel + Optis		Epithel + NiTi		Fibroblasten + Optis		Fibroblasten + NiTi	
	p-Wert	t-Wert	p-Wert	t-Wert	p-Wert	t-Wert	p-Wert	t-Wert
<b>Eluate 10%</b>	0,194	7,884	0,707	8,792	0,993	-24,087	0,489	-10,946
<b>Eluate 50%</b>	0,884	23,529	0,101	12,167	0,089	-7,373	0,087	-3,307
<b>Eluate 100%</b>	0,024	11,085	0,270	21,309	0,048	-9,110	0,903	-10,576

**Tab. 14:** *t*-Statistik für Epithel und Fibroblasten mit Optis und NiTi der indirekten Tests bei 24 Stunden versus 48 Stunden auf Signifikanzniveau von 5%.

Test- verfahren	Epithel + Optis		Epithel + NiTi		Fibroblasten + Optis		Fibroblasten + NiTi	
	p-Wert	t-Wert	p-Wert	t-Wert	p-Wert	t-Wert	p-Wert	t-Wert
<b>MTT vs XTT</b>	0,424	50,726	0,023	38,689	0,024	2,575	0,108	-2,123
<b>MTT vs BCA</b>	0,017	34,334	0,754	28,487	0,116	9,390	0,156	7,127
<b>MTT vs LHA</b>	0,003	45,001	0,795	36,208	0,694	37,917	0,323	16,469
<b>XTT vs BCA</b>	0,007	4,646	0,083	2,974	0,411	7,217	0,570	7,169
<b>XTT vs LHA</b>	0,001	15,080	0,039	11,075	0,045	19,305	0,318	12,103
<b>BCA vs LHA</b>	0,918	8,074	0,935	5,413	0,159	1,355	0,282	-0,025

**Tab. 15a:** *t*-Statistik für Epithel und Fibroblasten mit Optis und NiTi der direkten Tests bei 24 Stunden auf Signifikanzniveau von 5%.

Test- verfahren	Epithel + Optis		Epithel + NiTi		Fibroblasten + Optis		Fibroblasten + NiTi	
	t-Wert	p-Wert	t-Wert	p-Wert	t-Wert	p-Wert	t-Wert	p-Wert
<b>MTT vs XTT</b>	0,816	5,154	0,047	4,919	0,161	-6,903	0,128	-16,415
<b>MTT vs BCA</b>	0,571	26,453	0,106	1,145	0,052	2,168	0,128	7,780
<b>MTT vs LHA</b>	0,237	22,434	0,216	4,820	0,310	2,170	0,006	2,231
<b>XTT vs BCA</b>	0,831	18,665	0,012	4,126	0,499	6,350	0,897	19,100
<b>XTT vs LHA</b>	0,419	16,485	0,323	12,508	0,557	7,546	0,087	11,381
<b>BCA vs LHA</b>	0,461	0,514	0,029	1,747	0,211	-0,794	0,120	-2,622

**Tab. 15b:** *t*-Statistik für Epithel und Fibroblasten mit Optis und NiTi der direkten Tests bei 48 Stunden auf Signifikanzniveau von 5%.

Test- verfahren	Epithel + Optis		Epithel + NiTi		Fibroblasten + Optis		Fibroblasten + NiTi	
	p-Wert	t-Wert	p-Wert	t-Wert	p-Wert	t-Wert	p-Wert	t-Wert
Eluate 10% vs Eluate 50%	0,085	19,199	0,294	-3,229	0,415	- 12,593	0,175	-1,251
Eluate 10% vs Eluate 100%	0,938	16,147	0,580	-2,096	0,633	- 11,993	0,145	-1,411
Eluate 50% vs Eluate 100%	0,013	0,494	0,480	1,374	0,765	1,076	0,954	-0,177

**Tab. 16a:** *t*-Statistik für Epithel und Fibroblasten mit Optis und NiTi der indirekten Tests bei 24 Stunden auf Signifikanzniveau von 5%.

Test- verfahren	Epithel + Optis		Epithel + NiTi		Fibroblasten + Optis		Fibroblasten + NiTi	
	p-Wert	t-Wert	p-Wert	t-Wert	p-Wert	t-Wert	p-Wert	t-Wert
Eluate 10% vs Eluate 50%	0,502	0,995	0,077	1,038	0,218	-0,801	0,001	0,868
Eluate 10% vs Eluate 100%	0,411	3,564	0,379	1,821	0,075	-1,356	0,195	-2,210
Eluate 50% vs Eluate 100%	0,903	1,914	0,254	0,421	0,672	-0,353	0,021	-1,561

**Tab. 16 b:** *t*-Statistik für Epithel und Fibroblasten mit Optis und NiTi der indirekten Tests bei 48 Stunden auf Signifikanzniveau von 5%.

## **8 Veröffentlichung**

Die Veröffentlichung der Studie erfolgte als Kurzvortrag im Rahmen einer Poster-demonstration auf der 85. Wissenschaftlichen Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kieferorthopädie (DGKFO) mit dem Thema „Kiefer & Gesicht und Funktion & Ästhetik“ vom 26. - 29. September 2012 in Stuttgart:

Schneeberg P.-A., Fischer-Brandies, H., Schneeberg M., Es-Souni M.,  
Vergleich der Bioverträglichkeit von Polymer-Glasfaser-Bögen mit NiTi-Bögen.

(siehe Abstractband Seite 115).

## **9 Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. Fischer-Brandies für die Möglichkeit, an der Klinik für Kieferorthopädie des Universitäts-Klinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel die Untersuchungen für diese Arbeit durchführen zu können.

Ebenfalls herzlichen Dank an Frau Dr. Es-Souni für die Übernahme und Betreuung der Dissertation sowie für die mit der Durchsicht und Korrektur verbundene Arbeit.

Ganz herzlichen Dank auch an Herrn Robert Ciesielski, der mir trotz engem Terminkalender stets helfend zur Seite stand.

Ebenfalls danke ich der Firma TP Orthodontics für die Bereitstellung der Polymer-Glasfaser- und NiTi-Bögen für diese Studie.

Mein ganz besonderer herzlicher Dank gilt meiner Frau Martina, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und ohne deren Unterstützung und Beistand die Erstellung dieser Arbeit kaum möglich gewesen wäre.



## 10 Lebenslauf

Peter–Andreas Schneeberg

geboren 18.05.1960

in Dortmund

verheiratet, drei Kinder

### Schulausbildung

April 1966:

Einschulung in die Grundschule in Hamdorf

1967:

Umzug nach Rendsburg und Wechsel in die Rendsburger  
Altstädter Grund- und Hauptschule

Juli 1969:

Wechsel zum Rendsburger Gymnasium Herderschule

Juni 1980:

Abiturabschluss an der Herderschule

Juli 1980 – Sept. 1981:

Ableistung des 15–monatigen Wehrdienstes in Schleswig

Nov. 1981 – Apr. 1982:

Absolvierung eines 6-monatigen Maschinenbaupraktikums  
auf der Werft „Nobiskrug“ in Rendsburg

### Studium

Okt. 1982 – Apr. 1989:

Studium der Zahnmedizin mit Abschluss Examen an der  
Christian–Albrechts–Universität zu Kiel  
Approbation zum Zahnarzt

### Berufsausbildung

Sept. 1989 – Dez. 1991:

Ausbildungsassistent in freier Praxis in Kaltenkirchen

Jan. 1992 - Dez. 1992:

Hospitation in der Klinik für Kieferorthopädie,  
UK Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Jan. 1993 – März 2010:

selbstständiger Zahnarzt in Gemeinschaftspraxis in Kiel

seit April 2010:

selbstständiger Zahnarzt in eigener Praxis in Kiel

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass meine Dissertation, abgesehen von Ratschlägen meines Doktorvaters und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich außer den in der Arbeit aufgeführten keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe und die aus den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe, Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.