

**Aus dem Institut für Arbeits- und Sozialmedizin  
der Universität Tübingen  
Abteilung Arbeits- und Sozialmedizin  
Direktor: Professor Dr. F.W. Schmahl**

**Zytotoxische Wirkung von Amalgam-Extrakten  
auf organspezifische Zell-Linien**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der  
Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Stephan Haarmann  
aus Werl  
2003**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. C. Dartsch

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Lindemann

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. P.C. Dartsch danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, für die intensive, freundliche Betreuung und kompetenten Hilfestellungen, ohne die diese Arbeit nicht durchführbar gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. F.W. Schmahl danke ich für die Möglichkeit, die vorliegende Dissertation im Institut Arbeits- und Sozialmedizin der Universität Tübingen anfertigen zu können.

Frau Heilig sage ich Dank für die Einarbeitung und aufwendige Unterstützung im experimentellen Teil dieser Arbeit.

Mein Dank gilt M. Rücker, der mir bei „Computerfragen“ stets mit freundschaftlichem Rat zur Stelle war.

---

# Inhalt

## 1 Einleitung

1.1	Quecksilber und Amalgam	1
1.1.1	Quecksilber: Eigenschaften	1
1.1.2	Vorkommen	1
1.1.3	Belastungssituation	2
1.1.4	Ökologie des Quecksilbers	2
1.1.5	Quecksilber-Intoxikation	3
1.1.6	Das Füllungsmaterial Amalgam: Werkstoffkunde	4
1.1.7	Belastung durch Amalgam	5
1.1.8	Kontraindikationen für das Legen neuer Amalgam- füllungen lt. Bundesgesundheitsamt (BGA 1992a und b)	6
1.2	Verwendung von Amalgam in der Zahnheilkunde – ein historischer Abriß	6
1.3	Bewertung der Quecksilber-Belastung und –toxizität von Amalgam in vivo und in vitro	9
1.3.1	Tierversuche	9
1.3.2	Toxizitätstests mit Zellkulturen	10
1.4	Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit	12

## 2 Material und Methoden

2.1	Zellmaterial und Kulturbedingungen	13
2.1.1	Kulturmedium	13

2.1.2	Kulturbedingungen	14
2.2	Testsubstanzen	14
2.2.1	Herstellung des Prüfkörpers	14
2.2.2	Extraktherstellung	15
2.2.3	Zusammensetzung der Speichersatzlösungen	16
2.3	Versuchsdurchführung	16
2.4	Berechnung der zellulären Wachstumsrate	17
2.5	Mikroskopie	17
2.6	Statistische Auswertung	17
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	
3.1	Wachstumscharakteristika der verwendeten Zell-Linien	18
3.2	Einfluß der Speichersatzlösungen auf die Zellvitalität	18
3.2.1	Wirkung auf L-929	19
3.2.2	Wirkung auf 3T3	22
3.2.3	Wirkung auf V-79	25
3.2.4	Zusammenfassender Überblick	25
3.3	Wirkung der Prüfkörper-Extrakte auf die Zellvitalität	28
3.3.1	Wirkung auf L-929	28
3.3.2	Wirkung auf 3T3	31
3.3.3	Wirkung auf V-79	34
3.3.4	Zusammenfassender Überblick	34

---

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	
4.1	Aktuelle Amalgamkontroverse in Deutschland	37
4.2	Stellenwert von Zellkulturen	37
4.3	Einfluß der Speichellersatzlösungen auf die Zellvitalität	38
4.4	Zytotoxizität von Quecksilber	40
4.5	Zytotoxizität von Kupfer	41
4.6	Einfluß der Inkubationszeit auf die Toxizität der Extrakte	42
4.7	Einfluß des pH-Wertes auf die Vitalität der Zellen	45
4.8	Organspezifische Wirkung	46
4.8.1	Belastungssituation durch Amalgam	46
4.9	Umweltproblematik von Amalgam und Quecksilber	47
<b>5</b>	<b>Schlussfolgerungen</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>62</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BGA	Bundesgesundheitsamt
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetales Kälberserum
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
Hg	Quecksilber
HgF	Fusayama-Extrakt des Amalgams
HgNa	Natriumlaktat-Extrakt des Amalgams
IZ	Inkubationszeit
MW	Mittelwert
MG	Molekulargewicht
MAK	Maximale-Arbeitsplatz-Konzentration
NaCl	Natriumchlorid
NEM	Nichtedelmetall-Legierung
PD	Populationsverdoppelungen
PD/Tag	Populationsverdoppelungen pro Tag
S.D.	Standardabweichung
SEL	Speichersatzlösung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Tab.	Tabelle
WHO	World Health Organisation
WR	Wachstumsrate

# 1 Einleitung

## 1.1 Quecksilber und Amalgam

### 1.1.1 Quecksilber: Eigenschaften

Quecksilber (engl. mercury) ist als einziges Metall bei Raumtemperatur flüssig und glänzt in diesem Zustand silbrig-weiß.

Elementsymbol: Hg (Hydrargum)

Ordnungszahl: 80

Schmelzpunkt:  $-38,87^{\circ}\text{C}$

Siedepunkt:  $356,58^{\circ}\text{C}$

Metallisches Quecksilber besitzt einen hohen Dampfdruck von  $1,2 \times 10^{-3}$  Torr bei  $20^{\circ}\text{C}$ . Bei Raumtemperatur enthält eine gesättigte Atmosphäre ungefähr  $18 \text{ mg Hg/m}^3$ .

Quecksilber tritt in verschiedenen Zuständen bzw. chemischen Verbindungen auf:

- metallisches, flüssiges Quecksilber
- elementares Quecksilber, einatomiger Dampf
- Quecksilber-Ionen in anorganischen Verbindungen
- Organische Quecksilber-Verbindungen: in diese Gruppe fallen alle Substanzen, in denen Quecksilber kovalent an ein Kohlenstoffatom gebunden ist. Hier sind in erster Linie kurzkettige Alkyl-Verbindungen, d.h. Methyl- und Ethyl-Quecksilber von Bedeutung.
- Legierungen mit anderen Metallen

### 1.1.2 Vorkommen

Quecksilber ist ubiquitär, d.h. in Spuren findet es sich überall in der Umwelt. Der Gehalt in der Erdkruste beträgt im Mittel  $50\text{-}80 \text{ }\mu\text{g Hg/kg}$  (Molin 1990). Neben den natürlichen Quellen (Entgasung der Erdkruste, Vulkanismus, Verwitterung



von Gesteinen) tragen menschliche Aktivitäten zum Quecksilber-Hintergrund bei. Nach einem WHO-Bericht soll die jährliche Hg-Freisetzung aus den natürlichen Quellen 2700-6000 Tonnen betragen (WHO 1991). Die anthropogene Hg-Gesamtemission liegt nach Schätzungen der WHO weltweit bei ca. 3000 Tonnen jährlich (WHO 1991).

### **1.1.3 Belastungssituation**

Die wichtigste Belastung mit Quecksilber erfährt der Mensch über die Nahrung. Methylquecksilber wird nahezu ausschließlich durch den Fischverzehr aufgenommen, für anorganisches Quecksilber sind pflanzliche Nahrungsmittel, aber auch Fleischprodukte nach entsprechender Fütterung der Schlachttiere und Eier Hauptquellen.

### **1.1.4 Ökologie des Quecksilbers**

Quecksilber hat in den letzten Jahren erhebliche ökologische Bedeutung erlangt. Organische Quecksilberverbindungen sind z.T. in der Umwelt sehr beständig. Mit Saatbeizmitteln und anderen Fungiziden können regional beträchtliche Mengen in den Boden gelangen, von dort über Flüsse und Seen in Wassertiere und so in die menschliche Nahrungskette eingeschleust werden. Auch anorganisches Quecksilber kann über mikrobielle Methylierung in Fischnahrung und – bei Verwendung von Fischabfällen zur Schlachttierfütterung – in Fleischwaren gelangen. Methylquecksilber ist stark neurotoxisch, klinische Symptome treten bei 0,2 µg/ml auf. Derartige Konzentrationen können bei Verzehr stärker kontaminierter Fische erreicht werden. Die Halbwertszeit im Menschen ist mit 70-80 Tagen sehr lang, die Kumulationsgefahr groß. Im ZNS verweilt es noch deutlich länger (HWZ mehr als 100 Tage). Eine Massenvergiftung in Minamata, Japan, mit 111 Erkrankungen, 48 Todesfällen und im weiteren Verlauf 41 hirngeschädigter Neugeborener von 4000 Geburten ist ein warnendes Beispiel für die deletären Folgen unkontrollierter Umweltverschmutzung. Doch ist Quecksilber – im Gegensatz zu DDT – ein lokal-punktuell, kein globales Umweltproblem: Aus

fossilen und musealen Fundanalysen geht hervor, dass der durchschnittliche Hg-Gehalt von Wasser und Landtieren, der Mensch eingeschlossen, mit der steigenden Produktion und Verwendung von Quecksilber nicht zugenommen hat.

### 1.1.5 Quecksilber-Intoxikationen

Durch industrielle Hg-Emissionen, quecksilberhaltige Saatbeizen, Desinfektionsmittel oder Medikamente wurden in der Vergangenheit zahlreiche Vergiftungsunfälle ausgelöst. Derzeit treten akute Quecksilber-Intoxikationen nur noch vereinzelt nach Unfällen auf. Die Bedeutung von Quecksilber als Umweltgift ist in Mitteleuropa geringer als z.B. diejenige von Blei oder Cadmium (Ewers 1990, Halbach 1995).

Das toxikologische Profil der verschiedenen Quecksilber-Verbindungen ist gut dokumentiert. Bei Quecksilber-Vergiftungen muss, wie bei jeder anderen Vergiftung auch, zwischen akuten und chronischen Formen unterschieden werden.

**Akute Vergiftungen** rufen Krankheitsbilder hervor, die für die auslösenden Quecksilber-Verbindung charakteristisch sind. Bei akuten Vergiftungen mit Hg-Dampf ist die Lunge das kritische Organ (Berlin 1986). Quecksilbersalze sind korrosiv und nephrotoxisch; bei akuten Intoxikationen stehen Verätzungen des Gastrointestinaltraktes und Nierenschäden im Vordergrund.. Zielorgan für organische Quecksilber-Verbindungen ist das Gehirn. Akute und subakute Vergiftungen äußern sich durch Parästhesien, Einschränkungen des Gesichtsfeldes, Bewegungs- und Sprach- und Hörstörungen. Die Vergiftung hat eine Latenzzeit von mehreren Wochen (Halbach 1994).

Die **manifeste, chronische Quecksilber-Vergiftung** (sog. Mercurialismus) weist charakteristische, objektivierbare Symptome auf (Baader 1961, Schiele 1991):

- Tremor mercurialis: Feinschlägiger Intentionstremor der Finger, Augenlider und Lippen, der bei beabsichtigten Bewegungen verstärkt wird. Charakteristisch ist die sog. Zitterschrift.

- Erethismus mercurialis: Verhaltens- und Persönlichkeitsveränderungen charakterisiert durch nervöse Reizbarkeit, Befangenheit, Stimmungslabilität, Schreckhaftigkeit, Kritik-Intoleranz, und Gedächtnisschwund (Berlin 1986).
- Verwaschene Sprache (Psellismus mercurialis)
- Nephritis und Proteinurie
- selten eine Stomatitis mercurialis mit gingivalem Quecksilbersaum (HgS-Ablagerungen am Zahnfleischsaum).

Die Bezeichnungen **asthenisch-vegetatives Syndrom** resp. **Mikromerkuralismus** werden von verschiedenen Autoren zur Beschreibung einer milderen Ausprägung der chronischen Hg-Intoxikation verwendet. Es handelt sich dabei um ein unspezifisches Syndrom, dass sich durch Beschwerden wie Schwächegefühl, schnelle Ermüdbarkeit, Abgeschlagenheit, Appetitmangel, Nervosität, schlechte Merkfähigkeit Kopfschmerzen, Arbeitsunlust oder erhöhte Reizbarkeit äußert (Halbach 1994). Die genannten Symptome sind unspezifisch und können aufgrund andere Ursachen auch bei Personen ohne Hg-Exposition auftreten (MAK 1980).

#### **1.1.6 Das Füllungsmaterial Amalgam: Werkstoffkunde**

Silberamalgame in der Zahnheilkunde sind Legierungen des Quecksilbers mit Silber, Zinn, Kupfer und Spuren weiterer Metalle. Vor der Verarbeitung liegt das Material in Form von Legierungs-Pulver (Ag-Cu-Sn Legierung), auch Feilung oder Alloy genannt, und hochreinem, flüssigem Quecksilber vor. Die Komponenten werden in genau abgestimmten Verhältnissen (ca. 1:1) intensiv durchmisch (Tituration). Kurzfristig bildet das Amalgam eine plastische Masse von wachsartiger Konsistenz. Dann bindet es volumen- und formtreu ab. Einige Stunden später kann die Amalgamfüllung beim Kauen belastet werden.

Ausgehärtetes Silberamalgam ist ein Mischkristall aus intermetallischen Phasen. Das Quecksilber ist darin ähnlich wie in einer chemischen Verbindung gebunden (Aldinger et al. 1976, Kropp 1986). Der Hg-Gehalt des fertigen Silberamalgams beträgt in Abhängigkeit vom Amalgamtyp und den Verarbeitungsbedingungen 47-55%.

Die Einteilung der dentalen Silberamalgame erfolgt nach ihren metallurgischen Eigenschaften und der Zusammensetzung des Legierungspulvers. Neben dem Massenverhältnis der Legierungskomponenten (Ag, Sn, Cu) hängt das Verhalten eines Silberamalgams von der Form der Feilungspartikel ab. Bezeichnungen wie Kugel- oder Splitter-Amalgam beziehen sich auf die Form der Feilungspartikel.

1992 wurden in der Bundesrepublik Deutschland Kupferamalgame und gamma-2-haltige Amalgame verboten. Bei der gamma-2-Phase handelt es sich um  $\text{Sn}_8\text{Hg}$ , welches beim Abbinden entsteht und mechanisch besonders instabil und korrosionsanfällig ist. *“Durch die Erhöhung des in den älteren Spezifikationen auf max. 6% begrenzten Kupfergehaltes gelang es, die Bildung der  $\text{Sn}_8\text{Hg}$ -Phase zu unterdrücken oder sie innerhalb kürzester Zeit wieder aufzulösen“* (Eichner et al. 1971). Moderne Amalgame, sog. non-gamma-2-Amalgame, zeichnen sich somit durch bessere mechanische Eigenschaften und eine geringere Korrosionsanfälligkeit aus.

### 1.1.7 Belastung durch Amalgam

Amalgamfüllungen setzen geringe Quecksilbermengen frei. Die Quecksilberkonzentrationen im Blut, in der Niere und im Gehirn sind bei Amalgam-Trägern erhöht, ebenso die Ausscheidung im Urin (Nylander et al. 1991, Olstadt et al. 1987). Es sind einzelne Fälle von allergischen Reaktionen (Kontaktallergie) oder lokalen Schleimhautreizungen (lichenoide Reaktionen, Ulzerationen) bekannt. Empfindliche Personen können auf metallische zahnärztliche Werkstoffe mit elektrischen Missempfindungen oder Metallgeschmack reagieren (BGA 1992a).

### **1.1.8 Kontraindikationen für das Legen neuer Amalgamfüllungen lt. Bundesgesundheitsamt (BGA 1992a und 1992b)**

Das Legen neuer Amalgamfüllungen sollte vermieden werden bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion bzw. schweren Nierenfunktionsstörungen, sowie Patienten mit Allergie gegen Amalgambestandteile. Amalgam ist nicht geeignet für retrograde Wurzelfüllungen. *“Das Bundesgesundheitsamt empfiehlt ... als Vorsichtsmaßnahme, dass bei Kleinkindern bis zum 6. Lebensjahr, vornehmlich in den ersten drei Lebensjahren, besonders sorgfältig abgewogen werden sollte, ob Füllungen mit Amalgam notwendig sind“* (BGA 1992a). *“Obgleich es nach derzeitigem wissenschaftlichen Erkenntnisstand keine Hinweise für fruchtschädigende Risiken durch Amalgamfüllungen gibt, ist das Bundesgesundheitsamt der Ansicht, dass jede umfangreiche Amalgamtherapie in der Schwangerschaft vermieden werden sollte“* (BGA 1992b).

## **1.2 Verwendung von Amalgam in der Zahnheilkunde - ein historischer Abriss**

Die Erstverwendung von Amalgam ist geschichtlich nicht genau datierbar, aber eine „Silberpaste“ wurde bereits zu Füllungszwecken um 659 v. Chr. in China verwendet. Um 30 v. Chr. wurde empfohlen, kariös zerstörte Zähne mit Blei oder Leinen zu stopfen, um ein Zerbrechen des Zahnes während der Extraktion zu verhindern. Unterschiedliche Arten von Wachsen und gummiähnlichen Pasten wurden während des Mittelalters verwendet, um Zahndefekte zu füllen und Barbieri, sog. Zahnreißer, nutzten zu diesem Zweck lösliche Zemente. Die Haltbarkeit dieser Füllungsmaterialien war zumeist nicht von langer Dauer (Bird 1972). Im späten 15. Jahrhundert wurde erstmals Gold als Füllungsmaterial beschrieben, im 18. Jahrhundert wurden die mögliche Verwendung dreier Metalle (Gold, Zinn und Blei) zu Füllungszwecken erwähnt. Trotzdem standardisierte sich erst nach 1800 die Behandlung kariöser Zahndefekte mit metallenen Füllungsmaterialien. In den frühen Jahren des 19. Jahrhunderts wurden Experimente mit unterschiedlichen plastischen und flüssigen Metallen durchgeführt. Die ersten Silberamal-

game werden Bell in England und Taveau in Frankreich zugeschrieben. 1826 schlug Taveau den Gebrauch von „Silberpaste“ vor, die aus einem Gemisch von reinem Silber und Quecksilber bestand, um kariöse Zähne dauerhaft zu füllen. 1833 brachten zwei Franzosen, die Gebrüder Crawcour, Amalgam als sogenanntes „royal mineral succedaneum“ nach Amerika. Dieses „succedaneum“ bestand aus dem Pulver zerriebener Silbermünzen, dem Quecksilber zugemischt wurde. Trotz ihres geringen Wissens über das Material und zahnärztliche Zusammenhänge erfuhr Amalgam eine unkontrollierte Verbreitung und bereits 1844 bestanden 50% aller Füllungen in New York aus Amalgam. Weitere Erkenntnisse über die Giftigkeit von Quecksilberdampf und die sich mehrende Unzufriedenheit über die nicht sachgerecht gelegten Amalgamfüllungen führten 1834 zu einer Ausweisung der Gebrüder Crawcour aus den USA und veranlasste die American Society of Dental Surgeons 1845 zur Abfassung einer Resolution, nach der der Gebrauch von Amalgam als Füllungsmaterial verboten wurde. Ein Nichtunterzeichnen dieser Resolution führte zum Ausschluss aus dieser Sozietät (Eley 1997).

Die Einstellung dem Amalgam gegenüber wurde um 1850 neu überdacht und es folgten mehrere Untersuchungen über die Bestandteile des Amalgams und ihrer Eigenschaften in Frankreich, England und den USA. Diese Forschungsergebnisse, aufgenommen 1861 in den Berichten der Odontological Society, führten zur Akzeptanz des Amalgams als gebräuchliches Füllungsmaterial. Das Ausbleiben gesundheitsschädigender Effekte am Patienten ließ das Vertrauen in das Restaurationsmaterial wachsen. Seine große klinische Akzeptanz fand dieses Material schließlich 1895 nach den Publikationen von G.V. Black.

Die zweite große Debatte um das Amalgam begann in Europa Anfang des 20. Jahrhunderts als Folge der Veröffentlichungen von A. Stock, Professor der Chemie am Kaiser-Wilhelm-Institut in Deutschland. Er litt an einer chronischen Quecksilbervergiftung infolge 25-jähriger Exposition mit diesem Metall in seinen chemischen Laboratorien. In seinen Publikationen betonte er die Giftigkeit von Quecksilberdampf und wandte sich strikt gegen die Verwendung von

Quecksilber in der Zahnheilkunde. Seine Arbeiten erlangten große Aufmerksamkeit und öffentliches Interesse und führten dazu, dass die Medizinische Abteilung der Charité in Berlin eine Kommission einberief, die sich mit der Forschung über die Toxizität von Amalgam beschäftigte. Aufgrund der Forschungsergebnisse dieser Kommission erfolgte 1930 die Erklärung, dass das neue Silberamalgam keine Gesundheitsrisiken berge, was infolgedessen zu einer erneuten klinischen Akzeptanz und zu einem Einzug dieses Materials in zahnärztliche Praxen führte.

Die aktuelle Kontroverse nahm ihren Lauf in den 70er Jahren nach Seminaren, Publikationen und Video-Aufführungen des Zahnarztes H.A. Huggins in den USA, der seine Forschung initiiert sah durch die Behauptungen eines brasilianischen Arztes. Dieser behauptete, dass hinter nahezu allen Krankheiten, von der Leukämie bis zur Übelkeit, eine Belastung mit Quecksilber stecken könne. Selbst zahlreiche wissenschaftliche Studien über Amalgam und die resultierende Quecksilberfreisetzung konnten nicht verhindern, dass diese Forschungsergebnisse ohne wissenschaftliche Basis große Aufmerksamkeit in den Medien erregten und es zu einer Verunsicherung der Bevölkerung kam. Infolge dieser Verunsicherung befürworteten das UK Department of Health, die British Dental Association (BDA), die American Dental Association (ADA) und die Canadian Dental Association (CDA) in Stellungnahmen weiterhin den Gebrauch von Amalgam als Füllungsmaterial. Deutschland und Schweden hingegen unterstützten die Reduzierung des Amalgamgebrauchs aus vornehmlich ökologischen Gründen, um eine Belastung des Abwassers mit Quecksilber aus zahnärztlichen Praxen zu vermindern. Andere Länder beriefen Kommissionen, die das vom Amalgam ausgehende Gefährdungspotential neu überprüfen sollten.

Aufgrund der großen Verunsicherung in der Bevölkerung sowie der weitgehenden Nichtakzeptanz des Amalgams als Füllungsmaterial aus gesundheitlichen und ästhetischen Gründen ist die Verwendung dieses Materials in Deutschland drastisch rückläufig. Waren noch 1985 fast 75% aller Füllungen im Seitenzahn-

gebiet aus Amalgam, so waren es 1992 noch etwa 50%, 1995 ca. 30% und 2001 nur noch 20% (Saekel 1997).

### **1.3 Bewertung der Quecksilber-Belastung und -toxizität von Amalgam in vivo und in vitro**

Es gibt eine Reihe von methodischen Ansätzen zur Bestimmung der Hg-Exposition durch Amalgamfüllungen. Jede dieser Methoden weist spezifische Vor- und Nachteile auf. So wurden z.B. Prüfkörper aus Amalgam in künstlichen Speichel, Korrosionslösungen, Getränke oder andere Medien gelegt und die Hg-Freisetzung in ihrem zeitlichen Verlauf bestimmt (Fritz et al. 1991).

Messungen des Hg-Gehaltes von Blut, Urin und Faeces gelten als Standardverfahren zur Beurteilung von kontinuierlichen Quecksilberexpositionen (Biological Monitoring). Zahlreiche dieser Messungen wurden durchgeführt z.B. von Brune (1986), Khayat et al. (1983), Zander et al. (1992), Daunderer (1990). Des Weiteren wurden der Hg-Gehalt in Atemluft und Speichel von Langworth et al. (1991), Aronsson et al. (1989), postmortal in Organen beispielsweise von Nylander et al. (1987, 1989) sowie in oralen Geweben in der Nähe von Amalgamfüllungen gemessen z. B. Willershausen-Zönnchen et al. (1992).

#### **1.3.1 Tierversuche**

Tierexperimentelle Studien erlauben invasive Untersuchungstechniken, die am Patienten nicht vertretbar oder unmöglich sind. Ihr Nutzen hinsichtlich der Amalgamfrage sollte jedoch nicht überbewertet werden. Ernährungsverhalten und Gebissfunktion der meisten Versuchstiere unterscheiden sich vom Menschen. Bei Wiederkäuern und Nagetieren ist die physiologische Belastung der Zähne hoch, die Kauaktivität nimmt mehrere Stunden des Tages ein. Viele Tiere haben ein kontinuierliches Zahnwachstum zum Ausgleich der Abrasion. Eine direkte Übertragung von Meßergebnissen auf den Menschen ergibt daher zu hohe Werte.



Aufnahmemechanismus und Verteilung des Quecksilbers lassen sich tierexperimentell detailliert untersuchen. Die vorliegenden Studien sichern die Befunde am menschlichen Sektionsgut ab. Hauptzielorgane des Quecksilbers aus Amalgamfüllungen sind Niere, Leber, Gehirn und Hypophyse. Die Aufnahme des Quecksilbers erfolgt über die Lunge sowie den Verdauungstrakt. Die auffallend hohen Hg-Konzentrationen im Faeces dürften auf abradierte Amalgampartikel durch den Kauvorgang zurückzuführen sein.

Tierexperimentelle Untersuchungen zu Auswirkungen auf physiologische Vorgänge sollten zurückhaltend interpretiert werden. „Low-Dose-Effekte“ sind häufig speziesabhängig. Ein akzeptiertes Tiermodell für die Wirkungen kleiner Hg-Mengen existiert derzeit nicht (Hursh et al. 1989). Zudem unterscheidet sich der Stoffwechsel unterschiedlicher Tierspezies teilweise wesentlich von dem des Menschen. Die Konzentration an Selen im Speichel vieler Tiere ist z. B. höher als die im Speichel des Menschen (Berlin 1986). Wegen der Wechselwirkungen zwischen Selen und Quecksilber im Organismus und der damit verbundenen veränderten Metabolisierung des Quecksilbers kommt diesem Zustand Bedeutung zu. Zahlreiche Tierstudien z.T. mit widersprüchliche Befunden, liegen vor, z. B. von Fredin (1987), Hahn et al. (1989), Eley (1997), Vimy et al. (1990).

### **1.3.2 Toxizitätstests mit Zellkulturen**

Die Exposition von Zellkulturen mit Hg-haltigen Proben erlaubt es, Aussagen über die Zytotoxizität dieser Substanzen zu treffen. Beispielhaft werden Zellen verwendet, um Auswirkungen auf den Organismus abschätzen zu können. Vorteilhaft ist die Standardisierung und Reproduzierbarkeit dieser Versuche; fraglich die Übertragung der in vitro ermittelten Ergebnisse auf Verhältnisse in vivo. Zahlreiche solcher Studien wurden durchgeführt. Die dabei verwendeten Zellen, die mit den zu prüfenden Stoffen exponiert wurden, waren unterschiedlicher Herkunft. Sowohl Zellen menschlichen Ursprungs, z. B. Schleimhautexplantate, Epithelzellen, Gingivafibroblasten, Osteoblastenzellen, Keratozyten u.a., als auch Zellen tierischen Ursprungs, z.B. Fibroblasten von der Maus, Embryonalzellen

von Hühnermilz und -herz. Unter anderem Kawahara et al. (1975) demonstrieren, dass Kupfer, Zink und Quecksilber eine intensive Toxizität aufweisen, Silber gering toxisch ist und sowohl Zinn als auch das Alloy-Pulver nicht toxisch sind. Die Arbeiten zahlreiche Wissenschaftler wie Tsutsumi et al. (1988), Wennberg et al. (1979), Milleding et al. (1985), Meryon (1984), und Kaga et al. (1991) zeigten die zytotoxischen Effekte des Amalgams und alle betonten, dass die Zytotoxizität mit dem Alterungsprozess des Amalgams abnimmt. Darüber hinaus hatte die Kupferkonzentration als Vergleich zwischen hoch- und nieder-konzentrierten Kupfer Amalgamen wenig Einfluß auf die Zytotoxizität, solange sie nicht Zink enthielten. Wennberg et al. (1979) und Meryon (1984) waren die ersten, die zeigten, dass Zink-haltige Amalgame zytotoxischer waren als Zink-freie Amalgame. Milleding et al. (1985) erkannten in ihren Arbeiten die Bedeutung zwischen der Zytotoxizität des Amalgams und dem Grad der Korrosion der Prüfkörper. Arbeiten von Nakajima et al. (1997), Osorio et al. (1998), Zhu et al. (1999) und andere unterstrichen die Zytotoxizität von Amalgam erneut.

Die Biokompatibilität dentaler Amalgame wurde bereits häufig in Zell-Kulturen und in Implantationsversuchen untersucht. Ein toxischer Effekt ausgehend von frisch tituriertem Silber-Amalgam konnte in Zell-Kulturen demonstriert werden (Nakamura et al. 1979). Der Effekt konventioneller Silber-Amalgame und non-gamma 2-Amalgame war 24 h nach Tituration vernachlässigbar gering. Bei den meisten Untersuchungen über die Biokompatibilität von Amalgam wurden zudem entweder frisch hergestellte Prüfkörper oder Prüfkörper, die unterschiedlichen Zeiten der Luft bzw. einer bestimmten Atmosphäre ausgesetzt waren, verwendet. Lagerung in gewöhnlicher Luft oder bei einer Luftfeuchtigkeit geringer als 60% lassen jedoch keine nennenswerte Korrosion des Prüfkörpers erwarten. Diese Prüfkörper kontaktierten dann die Zellen meistens direkt (z.B. als Pulver oder als Scheibe) oder waren dem Zellkulturmedium beigesetzt. Bereits Milleding et al. (1985) verweist jedoch auf die immense Bedeutung des Korrosionsprozesses des Amalgams durch den Speichel bei der Überprüfung einer möglichen Zytotoxizität.

## 1.4 Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit

Das zahnärztliche Team als auch der Patient sind beim Umgang mit Silberamalgamen für Zahnfüllungen Quecksilber und Quecksilberdämpfen ausgesetzt. Der Zahnarzt entfernt und legt Amalgamfüllungen, die zahnmedizinische Fachhelferin poliert alte und neue Füllungen, entsorgt überschüssiges Material und der Patient ist in nahezu alle diese Arbeitsschritte involviert und trägt schließlich über mehrere Jahre eine Amalgamfüllung, die im Mund unterschiedlichsten Einflüssen ausgesetzt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die dermale Exposition und die pulmonale Aufnahme von Quecksilber aus Amalgamfüllungen untersucht, indem beispielhaft Fibroblasten der Haut sowie Fibroblasten der Lunge als Zellkulturen dienten, um Effekte auf die Zellvitalität nach Exposition mit quecksilberhaltigen Extrakten bewerten zu können. Sowohl die korrodierenden Eigenschaften des Speichels als auch der Einfluß der Inkubationsdauer auf die Zytotoxizität der Extrakte wurde in der Anordnung der Versuche berücksichtigt. Dazu wurden zwei unterschiedliche SEL verwendet, in welche die Amalgamprüfkörper dann unterschiedlich lange inkubiert wurden. Darüber hinaus wurden die Versuche so durchgeführt, dass ein direkter Zellkontakt mit den Amalgamprüfkörpern vermieden wurde, um eine realitätsnahe Belastung der Zellen mit den im Speichel gelösten Metallionen zu simulieren. Das Versuchsprotokoll war so gewählt, dass Fehler früherer Arbeiten nicht begangen wurden. So erfolgte kein direkter Kontakt zwischen den Zell-Linien und den Amalgamprüfkörpern, sondern Extrakte aus Amalgam wurden verwendet. Bei Herstellung der Extrakte wurden die physiologischen Bedingungen in der Mundhöhle (pH-Wert, Atmosphärendruck) berücksichtigt und die Korrosion der Prüfkörper erfolgte nicht an der Luft. Ebenso wurde der Alterungsprozess des Amalgams und die sich daraus ergebenden Effekte bezüglich der Toxizität der Extrakte beachtet, indem unterschiedlich lange Inkubationszeiten gewählt wurden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellmaterial und Kulturbedingungen

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen drei verschiedener, adhärent wachsender Fibroblasten-Zell-Linien verwendet.

- L-929; Bindegewebsfibroblasten von der Maus, DSMZ Nr: ACC 2.
- 3T3; Fibroblasten von der Schweizer Albino Maus, DSMZ Nr: ACC 173.
- V-79; Fibroblasten von Lungengewebe des Hamsters, DSMZ Nr: ACC 335.

Diese Zell-Linien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Abteilung für Menschliche und Tierische Zellkulturen, Braunschweig, bezogen.

#### 2.1.1 Kulturmedium

Das Kulturmedium für die drei Zell-Linien bestand aus einer Mischung von DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium mit 1000 mg/l Glucose) und F12 (Nutrient Mixture Ham's F12 mit L-Glutamin) (1:1; v/v) mit Zusatz von 10% FCS und 100 Units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin.

Alle aufgelisteten Zellkulturreagenzien wurden von GibcoBRL Life Technologies, Eggenstein, bezogen.

Der Zusatz von FCS liefert die zum Wachstum und zur Proliferation benötigten Wachstumsfaktoren, Hormone, anorganischen Salze, Spurenelemente, Vitamine und Aminosäuren. Der Zusatz der Antibiotika soll eine mögliche bakterielle Kontamination verhindern.

### 2.1.2 Kulturbedingungen

Routinemäßig erfolgte die Kultivierung der Zellen als Massenkulturen in Kulturflaschen (75 cm<sup>2</sup> Cellstar; Greiner, Frickenhausen). Zur Zellneuausaat nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit PBS (GibcoBRL Life Technologies, Eggenstein) gewaschen und mit einer sterilen Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 g/l Schweinetrypsin 1:250 und 0,2 g/l EDTA; Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen) vom Boden abgelöst und nach Verdünnung auf die erforderliche Zellzahl in 6-Loch Platten (9,6 cm<sup>2</sup> pro Vertiefung; Becton Dickson, Heidelberg) ausgesät.

Zur eigentlichen Versuchsdurchführung wurden 20.000 Zellen pro 2 ml in 6-Lochplatten (siehe Kap. 2.3) ausgesät.

Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre. Der Brutschrank wurde mit 6% CO<sub>2</sub> und 94% Luft begast. Durch diesen CO<sub>2</sub>-Partialdruck wird das CO<sub>2</sub>/Bicarbonat-Puffersystem des Kulturmediums auf den pH-Wert von 7,2-7,4 eingestellt und konstant gehalten.

## 2.2 Testsubstanzen

Zur Herstellung des Extraktes wurden Amalgam Prüfkörper hergestellt und über festgelegte Zeiträume (t = 2 Tage und 378 Tage) bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 6% CO<sub>2</sub> und 94% Luft in zwei verschiedenen Speichersatzlösungen im Brutschrank inkubiert.

### 2.2.1 Herstellung des Prüfkörpers:

Der Amalgam Prüfkörper wurde entsprechend der DIN-Vorschrift 13904 vom Juli 1990 zur Prüfkörperherstellung von Legierungen aus Amalgam, Ersatz für Teil 1 vom November 1981, hergestellt.

Auszug: 7.3 Herstellung der Prüfkörper: Quecksilber und Legierung in ausreichender Menge zur Herstellung eines Prüfkörpers werden nach Gebrauchsanweisung in einem maschinellen Mischer angemischt. Das gesamte angemischte Amalgam wird in die

Stopfform eingebracht und sofort mit einem Stopfer von etwa 3,5 mm Durchmesser leicht kondensiert, ohne Quecksilber abzapfen. Anschließend wird der Stempel eingesetzt und die Herstellung des Prüfkörpers nach folgendem Zeitplan durchgeführt:

Ende des Mischens (Titration) .....	00 sec.
Belastung mit 14 N/mm <sup>2</sup> .....	30 sec.
Entlastung und Entfernen des Platzhalters .....	45 sec.
Erneute Belastung .....	50 sec.
Entlastung .....	90 sec.
Wegbürsten des abgepressten Hg und Ausdrücken des Prüfkörpers mit dem Stempel .....	120 sec.

Prüfkörper mit sichtbaren Fehlern an der Oberfläche werden ausgeschieden.

Das verwendete Amalgam war Amalgam in Kapselform der Größe 3 (Amalcap plus non-gamma 2; Vivadent, Schaar, FL). Beim Anmischen wurde entsprechend der Packungsbeilage verfahren. Die Prüfsylinder wurden nach einer 7-tägigen, trockenen Lagerung bei Raumtemperatur mit einem Schleifpapier der Körnung 1200 bei 120 U/min des Poliermotors unter Wasserkühlung poliert. Zur Sterilisation wurden die Prüfkörper eine halbe Stunde in 70% Ethanol gelagert, anschließend wurden das Ethanol entfernt und die Prüfkörper zwei Tage lang in der Laminar Flow getrocknet.

### 2.2.2 Extrakterstellung

Zwei unterschiedliche Amalgamextrakte wurden hergestellt. Das mittlere Gewicht der Amalgamprüfkörper betrug  $1,618 \pm 0,043$  g (MW  $\pm$  S.D.). Ein Prüfkörper wurde unter sterilen Bedingungen in Fusayama-SEL, ein anderer in NaCl/Laktat-SEL inkubiert. Dabei wurde ein standardisiertes Volumen der SEL pro Metallmenge des Prüfkörpers gewählt (10 ml SEL pro 1 g Prüfkörpermasse). Diese Proben wurden nun über verschieden lange Zeiträume im Brutschrank bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre inkubiert. Die Begasung erfolgte bei 6% CO<sub>2</sub> und 94% Luft.

Nach der Inkubationszeit wurden die Prüfkörper aus den Speichelersatzlösungen entfernt. Diese Extrakte wurden in zwei Zentrifugenröhrchen (Greiner, Frickenhausen) aufgeteilt, von denen eines im Kühlschrank bei + 8°C und eines im Gefrierschrank bei -22°C aufbewahrt wurde.

Als Kontrollen wurden zu denselben Zeitpunkten Proben mit den SEL, jedoch ohne die Prüfkörper, angesetzt und genauso wie die anderen Proben aufbewahrt, inkubiert und zentrifugiert.

### 2.2.3 Zusammensetzung der Speichelersatzlösungen

Bei den SEL handelt es sich um spezifische Elektrolytlösungen.

- Fusuyama-SEL: NaCl 400 mg/l, KCl 400 mg/l, CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 690 mg/l, Harnstoff 1000 mg/l und Na<sub>2</sub>S 50 mg/l in modifizierter Form (pH 5,0-5,25)
- NaCl/Laktat-SEL: NaCl 5,85 g/l (0,1 M/l), Laktat 8,9 g/l (0,1 M/l) (pH ca. 2,3)

## 2.3 Versuchsdurchführung

Für die Untersuchungen wurden die Zellen in einer Dichte von 20.000 Zellen pro 2 ml Kulturmedium in 6-Lochplatten (Becton Dickson, Heidelberg) ausgesät. Dies entspricht einer Aussaatdichte von ca. 2000 Zellen/cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche. 24 h nach Aussaat wurde das Kulturmedium gewechselt. Danach erfolgte die Zugabe der Extrakte resp. der SEL-Kontrollen. Die Lösungen wurden in Verdünnungen von 1:80 (25 µl/2 ml), 1:40 (50 µl/2 ml), 1:20 (100 µl/2 ml) und 1:10 (200 µl/2 ml) zugegeben. Die Expositionszeit der Zellkulturen betrug 72 h. Nach dieser Zeit wurde das Kulturmedium abgesaugt und einmal mit PBS gespült, um bereits abgelöste und lysierte Zellen (Debris) zu entfernen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung und eine 10 minütige Inkubation im Brutschrank, um die verbliebenen adhärenen und vitalen Zellen vom Substrat zu lösen. Die quantitative Bestimmung der Zellen erfolgte mit Hilfe einer Zähl-

kammer nach Neubauer unter dem Mikroskop. Jede gezählte Zelle pro großem Quadrat in der Zählkammer entspricht dabei 10.000 Zellen.

## 2.4 Berechnung der zellulären Wachstumsrate

Ausgehend von der Zellzahl  $N_0$  zum Zeitpunkt 24 h nach Zellaussaat und unmittelbar vor Zugabe des Extraktes resp. der Kontrolllösungen und der am Versuchsende (nach 72-stündiger Exposition) gezählten Zellzahl  $N_1$  wird mit (1) die Gesamtzahl der Populationsverdoppelungen und mit (2) die Wachstumsrate in Populationsverdoppelungen pro Tag berechnet.

Anhand der Wachstumsraten pro Tag kann der Einfluß der zu testenden Substanz auf das Wachstumsverhalten der Zellen, d. h. eine Förderung oder Hemmung des Zellwachstums ermittelt werden. Als Referenz wird die Kontrolllösung herangezogen.

$$\text{Anzahl der Populationsverdoppelungen (PD)} = \frac{\log N_1 - \log N_0}{\log 2} \quad (1)$$

$$\text{Wachstumsrate} = \frac{\text{Anzahl der Populationsverdoppelungen}}{\text{Anzahl der Tage in Kultur}} \quad [\text{PD/Tag}] \quad (2)$$

## 2.5 Mikroskopie

Zur Untersuchung der Zellmorphologie vor und nach Exposition sowie zur Ermittlung der Zellzahl mittels der Neubauerkammer wurde ein Nikon Inversionsmikroskop TMS (Nikon, Düsseldorf) mit dem Objektiv Plan 10/0.30 DL (Nikon) verwendet.

## 2.6 Statistische Auswertung

In dieser Arbeit wird der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) angegeben. Die Signifikanzberechnung der erhaltenen Messergebnisse erfolgte nach dem Student's  $t$ -Test.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Wachstumscharakteristika der verwendeten Zell-Linien

Bei den verwendeten Zell-Linien L-929, 3T3 und V-79 handelt es sich um adhärenz wachsende Zellen. Das Wachstum der Zellen ist kontaktinhibiert, so dass das Zellwachstum nach Erreichen der Konfluenz sistiert. Die Zellen sind bindegewebigen Ursprungs. Die Morphologie der Zellen ist unterschiedlich. Die L-929 Zellen und 3T3 Zellen wachsen als Monolayer, das heißt es bildet sich eine einzellige Zellschicht auf dem Substrat gleichmäßig aus. Die Zellgestalt ist polygonal und der Zellkern liegt meist zentral. Die V-79 Zellen wachsen in „Clustern“, das heißt es bilden sich Zellhaufen auf dem Substrat aus. Die Zellgestalt ist segelförmig.

Als basale Wachstumsrate ergab sich für die L-929 Zellen eine Wachstumsrate von  $1,98 \pm 0,03$  PD pro Tag. Für die 3T3 Zellen ergab sich eine Wachstumsrate von  $1,96 \pm 0,08$  PD pro Tag, für die V-79 Zellen eine Wachstumsrate von  $2,1 \pm 0,06$  PD pro Tag (jeweils  $n = 5$ ).

### 3.2 Einfluß der Speichellersatzlösungen auf die Zellvitalität

Um den Einfluß der in den Extrakten enthaltenen Metallionen auf das Wachstumsverhalten der verwendeten Zell-Linien erkennen zu können, war es nötig, vorab zu prüfen, ob die SEL allein bereits die Zellproliferation beeinflussen. Diese Ergebnisse konnten dann später mit dem Ergebnissen der Extraktprüfung korreliert werden und auf Signifikanz hin untersucht werden (Kapitel 3.3).

### 3.2.1 Wirkung auf L-929

In Bezug auf die Fusayama-SEL wurde für die L-929 Zell-Linie eine Dosis-Wirkungs-Beziehung festgestellt (Tab. 1; Abb. 1).

Dabei war der Kurvenverlauf bei  $IZ_{378}$  und  $IZ_2$  diametral entgegengesetzt. Während die 378 Tage lang inkubierte Fusayama-SEL in niedriger Konzentration resp. hohen Verdünnung (1:80, 1:40) zunächst proliferationshemmend wirkte, kam es in niedriger Verdünnung (1:20, 1:10) zu einer Steigerung der Proliferation. Die Berechnung der linearen Regression ergab für  $IZ_{378}$  eine positive Steigung ( $y = 28x + 4,5$ ) bei einem  $R^2 = 0,88$ .

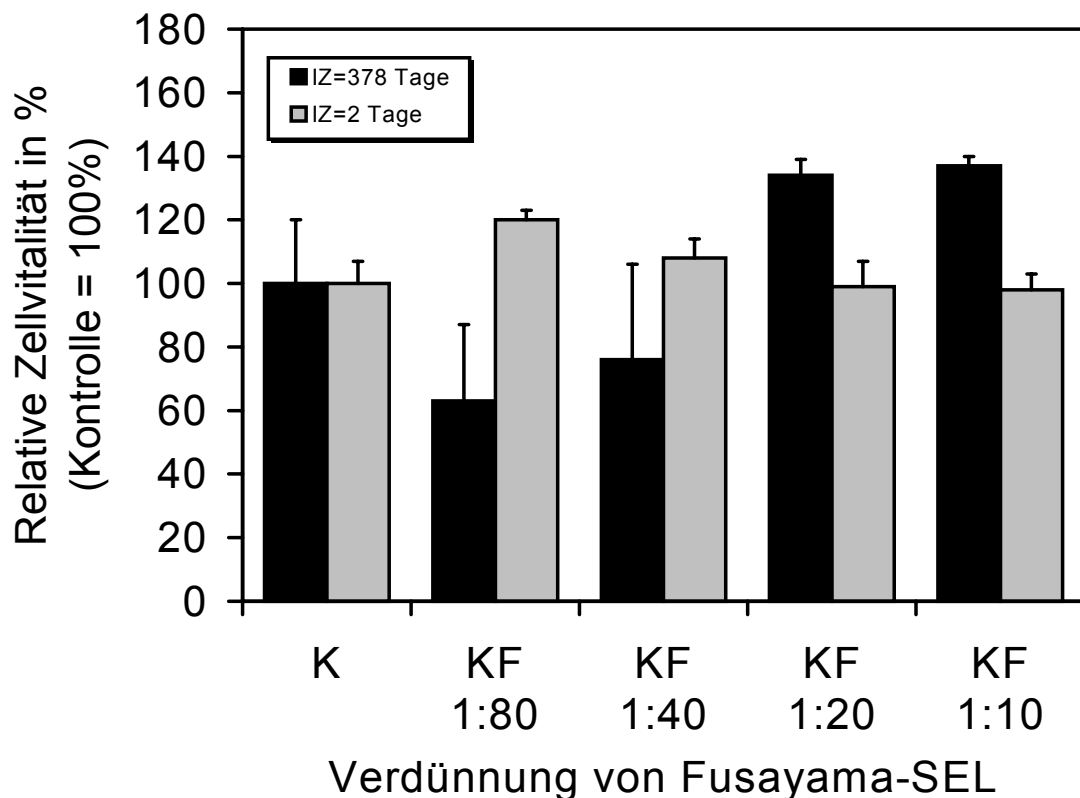
Für  $IZ_2$  ergab sich ein entgegengesetzter Kurvenverlauf. In hoher Verdünnung (1:80, 1:40) kam es zu einer Steigerung der Proliferation, in niedriger Verdünnung (1:20, 1:10) zu einer Hemmung. Die Berechnung der linearen Regression ergab für  $IZ_2$  eine negative Steigung ( $y = -7,5x + 132,5$ ) bei einer Korrelation von  $R^2 = 0,90$ .

Für die NaCl/Laktat-SEL ergaben sich ähnliche Kurvenverläufe (siehe Tab. 2; Abb. 2). Im Gegensatz zur Fusayama-SEL nahm jedoch die Anzahl der vitalen Zellen in einer Verdünnung von 1:10 bei 378-tägiger Inkubation unter den Kontrollwert ab. Für  $IZ_2$  war dieser Wert signifikant. Die Berechnung der linearen Regression ergab für  $IZ_2$  eine negative Steigung ( $y = 19,2x + 149,2$ ) bei einer Korrelation von  $R^2 = 0,97$ . Aufgrund der Datenverteilung wurde für  $IZ_{378}$  keine lineare Regression berechnet.

**Tab. 1:** Vitale Zellen (Absolutwerte) und die sich daraus ergebende Wachstumsrate (WR) nach 72-stündiger Exposition mit Fusayama-SEL.

*Zell-Linie L-929*

Probe	Vitale Zellen IZ <sub>378</sub>				Vitale Zellen IZ <sub>2</sub>			
	Mittelwert	SEM	WR	n	Mittelwert	SEM	WR	n
t=0	22.222	3.211	-	3	33.334	6.124	-	2
Kontrolle	1.403.056	277.645	1,990	3	1.986.250	135.179	1,970	2
KF 1:80	888.333	332.885	1,770	3	2.387.500	56.088	2,050	2
KF 1:40	1.060.000	418.458	1,860	3	2.152.500	121.673	2,000	2
KF 1:20	1.880.000	63.456	2,130	3	1.973.750	166.768	1,960	2
KF 1:10	1.925.833	46.094	2,150	3	1.951.250	105.845	1,960	2

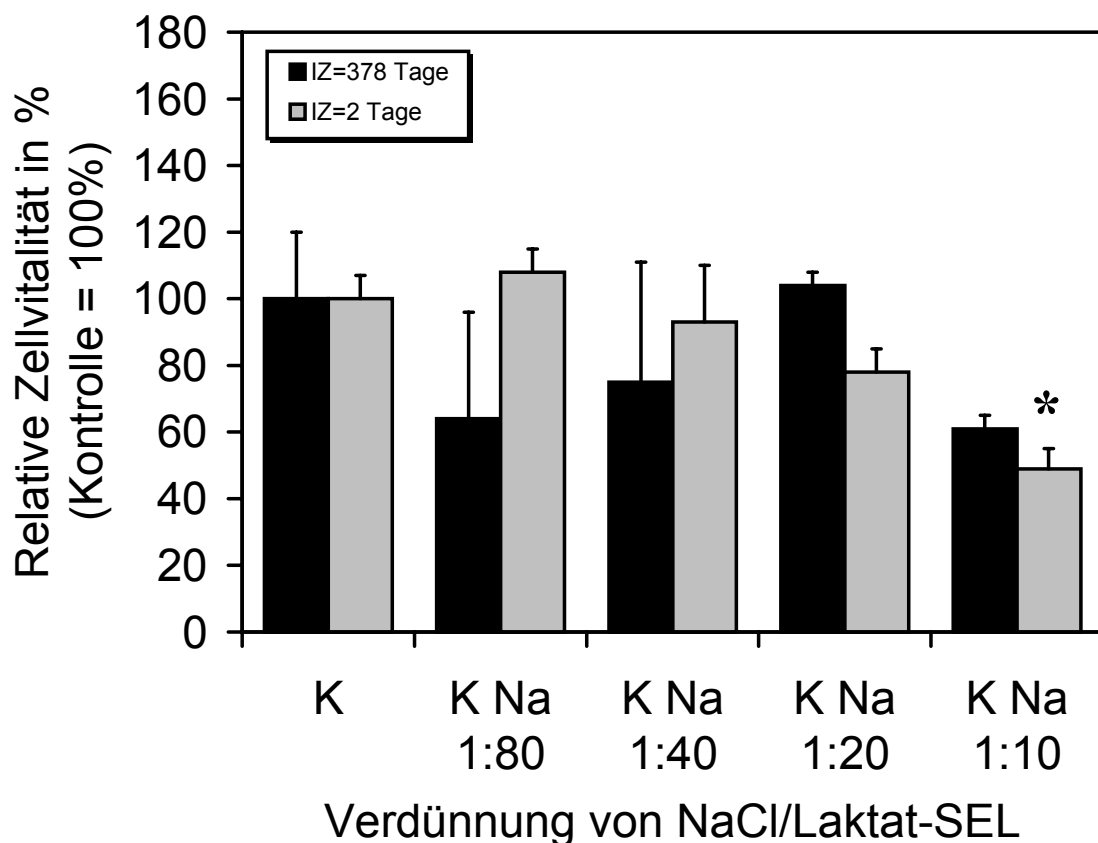


**Abb. 1:** Darstellung der relativen Zellvitalität von Zellen der Zell-Linie L-929 nach 72-stündiger Exposition in Abhängigkeit von der IZ und der SEL-Verdünnung. Angegeben ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM.

**Tab. 2:** Vitale Zellen (Absolutwerte) und die sich daraus ergebende Wachstumsrate (WR) nach 72-stündiger Exposition mit NaCl/Laktat-SEL.

*Zell-Linie L-929*

Probe	Vitale Zellen IZ <sub>378</sub>				Vitale Zellen IZ <sub>2</sub>			
	Mittelwert	SEM	WR	n	Mittelwert	SEM	WR	n
K Na 1:80	899.167	444.333	1,780	3	2.140.000	146.288	2,000	2
K Na 1:40	1.055.000	504.235	1,860	3	1.856.250	340.311	1,930	2
K Na 1:20	1.460.833	56.669	2,010	3	1.547.500	143.889	1,850	2
K Na 1:10	859.167	53.616	1,760	3	973.750	118.229	1,620	2



**Abb. 2:** Darstellung der relativen Zellvitalität von Zellen der Zell-Linie L-929 nach 72-stündiger Exposition in Abhängigkeit von der IZ und der SEL – Verdünnung. Angegeben ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM; \*  $p < 0,05$ ; Student's  $t$ -Test, bezogen auf den Wert der unbehandelten Kontrolle.

### 3.2.2 Wirkung auf 3T3

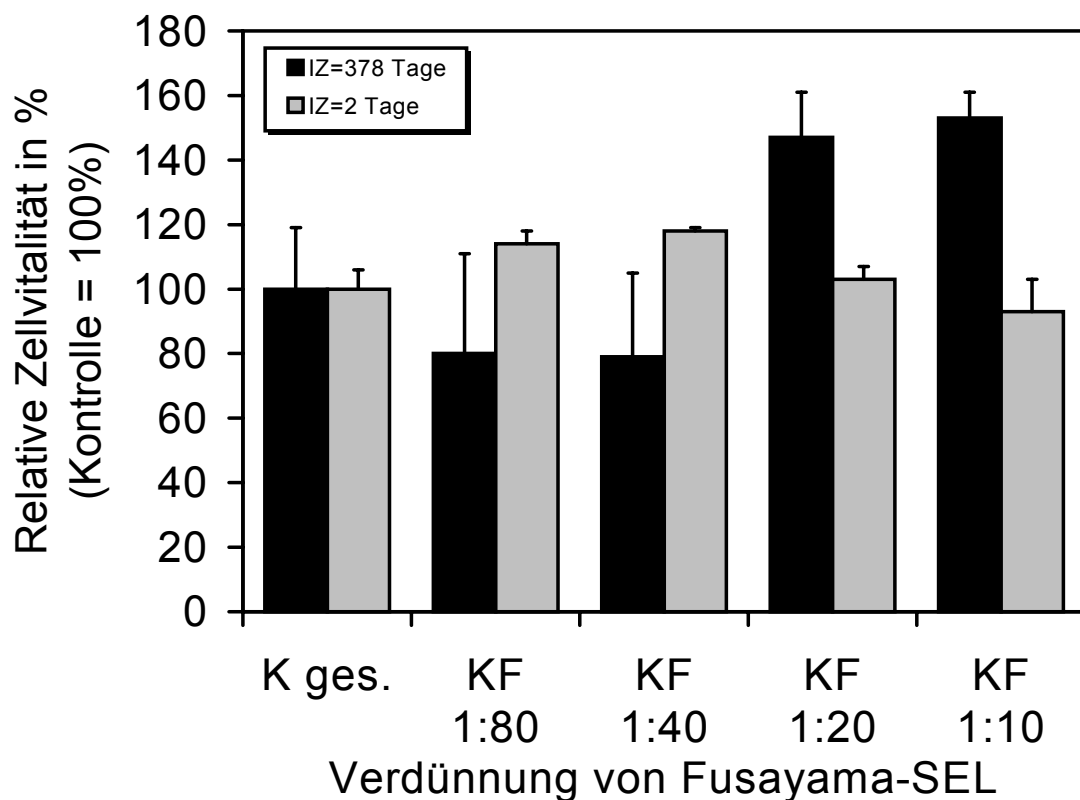
In Bezug auf die Fusayama-SEL wurde für die 3T3 Zell-Linie ebenfalls eine dosisabhängige Wirkungsbeziehung festgestellt (Tab 3. und Abb. 3). Auch hier war der Verlauf der Wirkungsbeziehung für  $IZ_2$  und  $IZ_{378}$  entgegengesetzt. In niedriger Konzentration (1:80, 1:40) wirkte die 378 Tage lang inkubierte Fusayama-SEL proliferationshemmend, die nur 2 Tage lang inkubierte Fusayama-SEL dagegen proliferationsfördernd. In niedriger Verdünnung (1:20, 1:10) kam es für  $IZ_{378}$  zu einer Steigerung der Proliferation um nahezu 50%, bei  $IZ_2$  Tage zu einem normalen bzw. leicht gehemmten Wachstum. Die Berechnung der linearen Regression ergab für  $IZ_{378}$  eine positive Steigung ( $y = 28,7x + 14,3$ ) bei einer Korrelation von  $R^2 = 0,83$ , für  $IZ_2$  eine negative Steigung ( $y = -7,8x + 134,3$ ) bei einer Korrelation von  $R^2 = 0,80$ .

Die Wirkung der 378 Tage lang inkubierten NaCl/Laktat-SEL auf die 3T3 Zellen war eine proliferationshemmende (Tab. 4 und Abb. 4). Lediglich bei einer Konzentration von 1:10 kam es zu einer geringfügigen Steigerung des Wachstums. In hoher Verdünnung (1:80, 1:40) kam es bei der 2 Tage lang inkubierten NaCl-SEL zu einer Steigerung der Proliferation, bei niedriger Verdünnung (1:20, 1:10) zu einer Hemmung. Dabei war die Wachstumshemmung bei einer Konzentration 1:10 für  $IZ_2$  signifikant. Die Berechnung der linearen Regression ergab für  $IZ_2$  eine negative Steigung ( $y = -20,1x + 158,1$ ) bei einer Korrelation von  $R^2 = 0,80$ . Aufgrund der Datenverteilung wurde für  $IZ_{378}$  keine lineare Regression berechnet.

**Tab. 3:** Vitale Zellen (Absolutwerte) und die sich daraus ergebende Wachstumsrate (WR) nach 72-stündiger Exposition mit Fusayama-SEL.

*Zell-Linie 3T3*

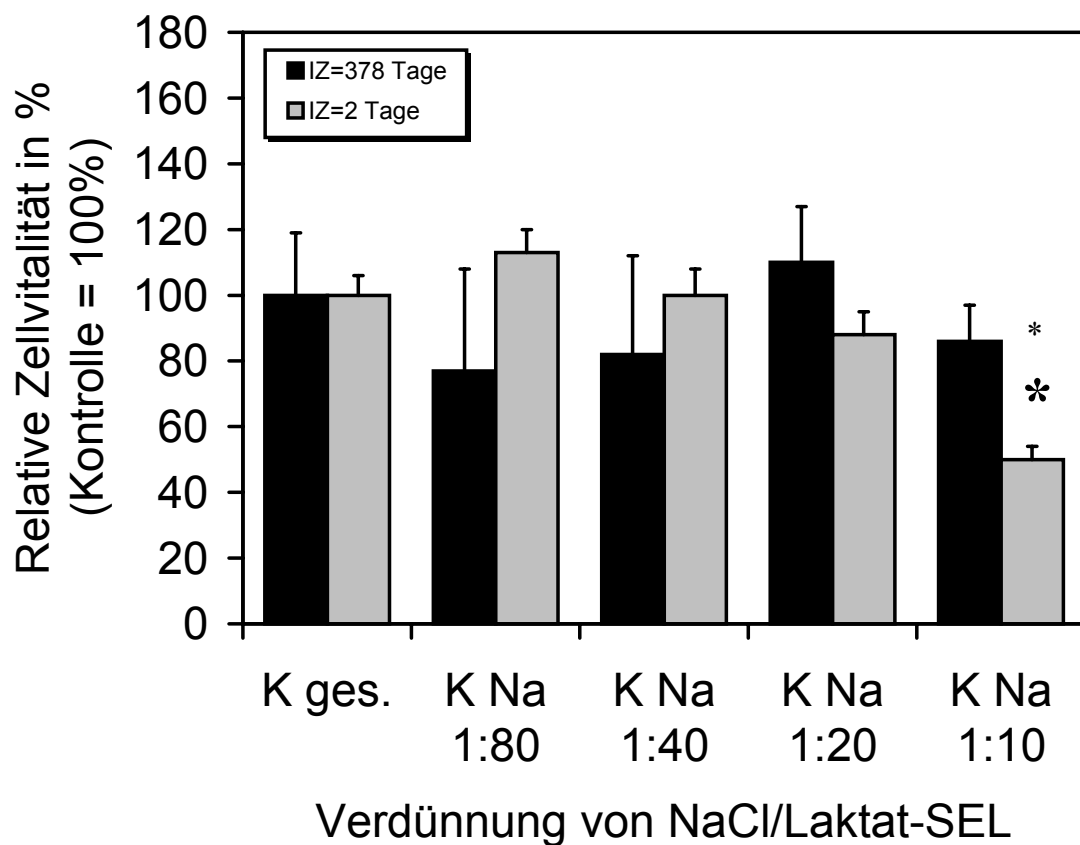
Probe	Vitale Zellen IZ <sub>378</sub>				Vitale Zellen IZ <sub>2</sub>			
	Mittelwert	SEM	WR	n	Mittelwert	SEM	WR	n
t=0	22.222	2.778	-	3	30.542	7.759	-	2
Kontrolle	1.176.667	222.570	1,910	3	2.120.417	129.435	2,040	2
KF 1:80	940.000	366.442	1,800	3	2.413.750	89.227	2,100	2
KF 1:40	932.500	308.322	1,800	3	2.502.500	29.083	2,120	2
KF 1:20	1.733.333	158.857	2,100	3	2.173.750	92.077	2,050	2
KF 1:10	1.805.833	94.964	2,110	3	1.966.250	219.457	2,000	2



**Abb. 3:** Darstellung der relativen Zellvitalität von Zellen der Zell-Linie 3T3 nach 72-stündiger Exposition in Abhängigkeit von der IZ und der SEL – Verdünnung. Angegeben ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM.

**Tab. 4:** Vitale Zellen (Absolutwerte) und die sich daraus ergebende Wachstumsrate (WR) nach 72-stündiger Exposition mit NaCl/Laktat.

Probe	Vitale Zellen IZ <sub>378</sub>				Vitale Zellen IZ <sub>2</sub>			
	Mittelwert	SEM	WR	n	Mittelwert	SEM	WR	n
	K Na 1:80	907.500	362.642	1,780	3	2.390.000	147.026	2,100
K Na 1:40	970.000	350.257	1,820	3	2.126.250	162.593	2,040	2
K Na 1:20	1.290.000	203.879	1,950	3	1.857.500	148.057	1,980	2
K Na 1:10	1.015.000	126.807	1,840	3	1.070.000	91.788	1,710	2



**Abb. 4 :** Darstellung der relativen Zellvitalität von Zellen der Zell-Linie 3T3 nach 72-stündiger Exposition in Abhängigkeit von der IZ und der SEL – Verdünnung. Angegeben ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM; \*  $p < 0,05$ ; Student's  $t$ -Test, bezogen auf den Wert der unbehandelten Kontrolle.

### 3.2.3 Wirkung auf V-79

Die Wirkung der Fusayama-SEL auf die V-79 Zell-Linie war im Gegensatz zu den beiden anderen Zellkulturen nicht sehr ausgeprägt (Tab. 5 und Abb. 5).

Für IZ = 378 Tage ergab sich eine geringe Proliferationssteigerung in allen Konzentrationen. Die 2 Tage lang inkubierte Fusayama-SEL wirkte leicht proliferationshemmend auf die Zellen, lediglich bei einer Konzentration von 1:20 kam es zu einer geringen Proliferationssteigerung.

Die NaCl/Laktat-SEL hatten für IZ<sub>2</sub> und IZ<sub>378</sub> einen hemmenden Einfluß auf das Zellwachstum (Tab. 6 und Abb. 6). Dieser war signifikant in niedriger Verdünnung (1:10). Die Berechnung der linearen Regression ergab für IZ<sub>378</sub> eine negative Steigung ( $y = -13,4x + 130,9$ ) bei einer Korrelation von  $R^2 = 0,73$ ; für IZ<sub>2</sub> auch eine negative Steigung ( $y = -12,3x + 122,8$ ) bei einer Korrelation von  $R^2 = 0,72$ .

### 3.2.4 Zusammenfassender Überblick

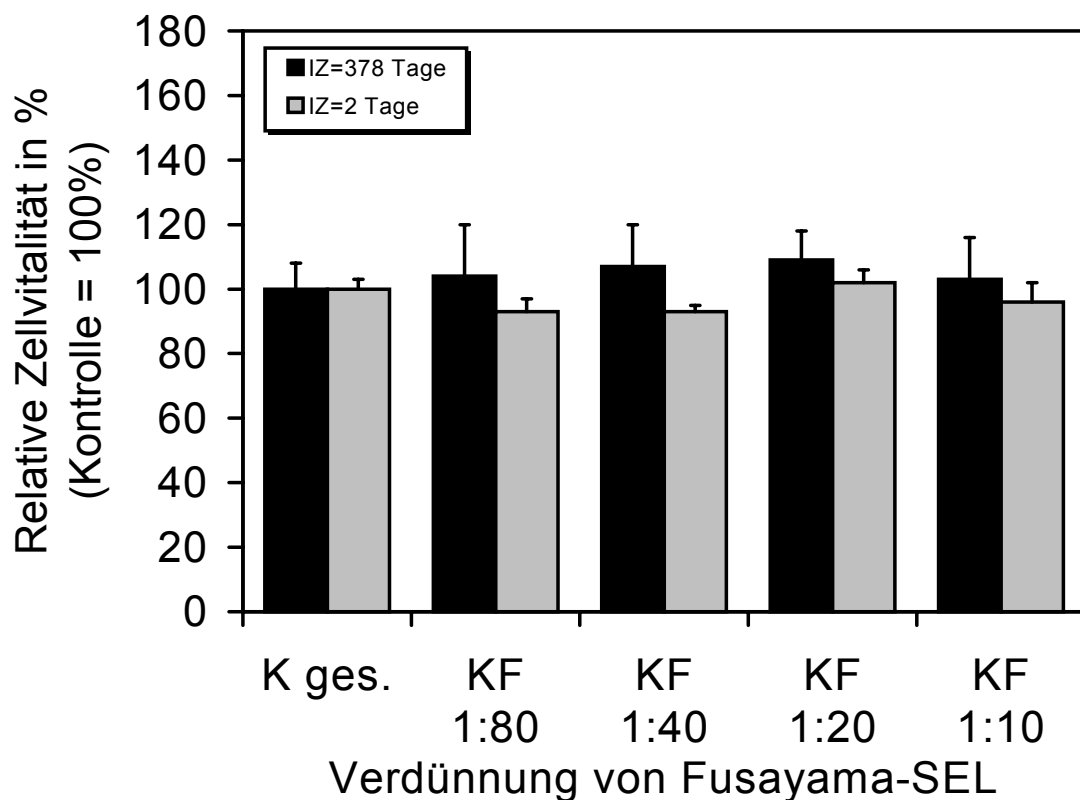
Der Einfluß der Fusayama-SEL auf die Vitalität der Zellen der verwendeten Zell-Linien war in allen Konzentrationen und zu beiden IZ nicht ausgeprägt, aber eher proliferationsfördernd bei niedrigen Konzentrationen. Die NaCl/Laktat-SEL hatte in der niedriger Verdünnung (1:10) bei einer IZ von 2 Tagen deutlichen Effekt auf das Wachstumsverhalten aller drei Zell-Linien, d.h. es kam zu einer signifikanten Minderung der Zellzahl. Die V-79 Zellen zeigten zudem auch eine verminderte Proliferation bei 378-tägiger Inkubation bei einer Verdünnung von 1:10.



**Tab. 5:** Vitale Zellen (Absolutwerte) und die sich daraus ergebende Wachstumsrate (WR) nach 72-stündiger Exposition mit Fusayama-SEL.

*Zell-Linie V-79*

Probe	Vitale Zellen IZ <sub>378</sub>				Vitale Zellen IZ <sub>2</sub>			
	Mittelwert	SEM	WR	n	Mittelwert	SEM	WR	n
t=0	23.889	4.608	-	3	35.417	4.270	-	2
Kontrolle	1.882.500	159.633	2,100	3	2.504.167	70.483	2,050	2
KF 1:80	1.957.500	296.675	2,120	3	2.320.000	100.623	2,010	2
KF 1:40	2.010.000	235.648	2,130	3	2.328.125	56.001	2,010	2
KF 1:20	2.046.667	173.086	2,140	3	2.562.500	106.985	2,060	2
KF 1:10	1.939.167	251.737	2,110	3	2.397.500	146.586	2,030	2

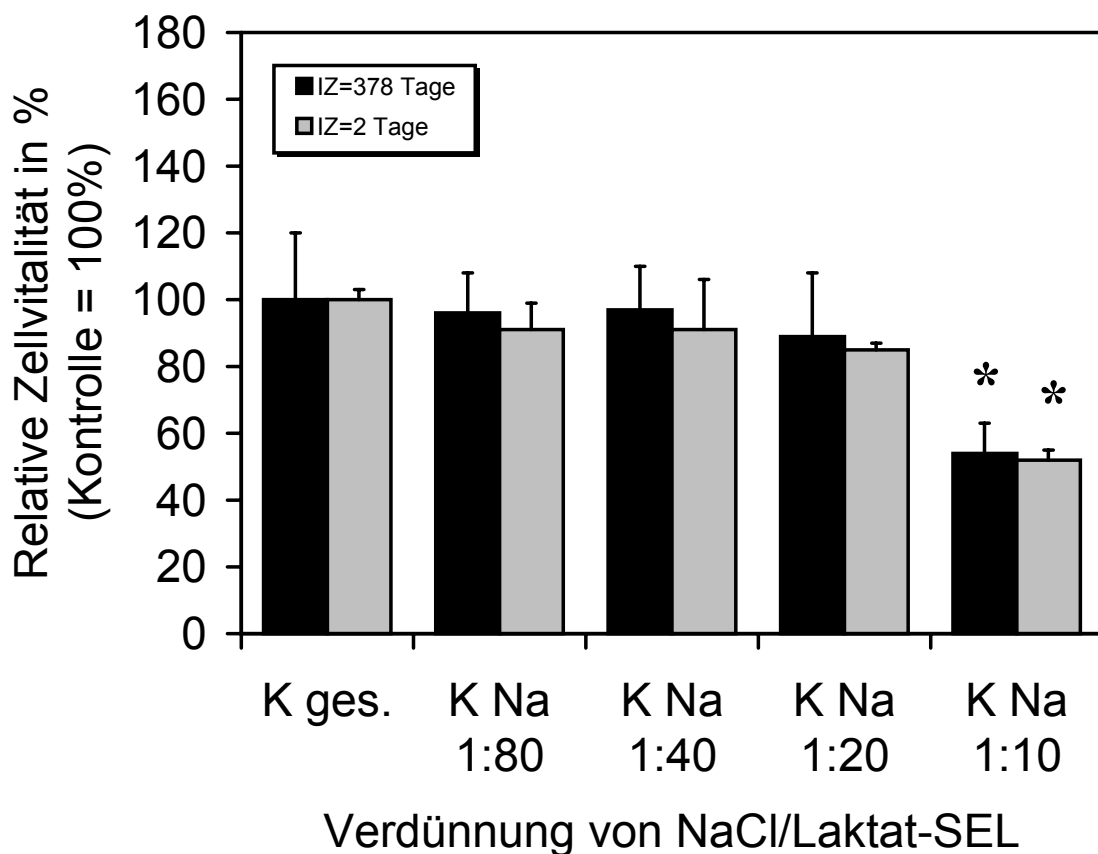


**Abb. 5:** Darstellung der relativen Zellvitalität von Zellen der Zell-Linie V-79 nach 72-stündiger Exposition in Abhängigkeit von der IZ und der SEL – Verdünnung. Angegeben ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM.

**Tab. 6:** Vitale Zellen (Absolutwerte) und die sich daraus ergebende Wachstumsrate (WR) nach 72-stündiger Exposition mit Fusayama-SEL.

*Zell-Linie V-79*

Probe	Vitale Zellen IZ <sub>378</sub>				Vitale Zellen IZ <sub>2</sub>			
	Mittelwert	SEM	WR	n	Mittelwert	SEM	WR	n
K Na 1:80	1.810.833	218.430	2,080	3	2.282.500	202.351	2,000	2
K Na 1:40	1.817.500	241.507	2,080	3	2.280.000	365.182	2,000	2
K Na 1:20	1.674.167	364.492	2,040	3	2.116.250	55.330	1,970	2
K Na 1:10	1.010.000	172.463	1,800	3	1.306.250	68.761	1,730	2



**Abb. 6:** Darstellung der relativen Zellvitalität von Zellen der Zell-Linie V-79 nach 72-stündiger Exposition in Abhängigkeit von der IZ und der SEL – Verdünnung. Angegeben ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM.; \*  $p < 0,05$ ; Student's  $t$ -Test, bezogen auf den Wert der unbehandelten Kontrolle.

### 3.3 Einfluß der Prüfkörper-Extrakte auf die Zellvitalität

Wie in Kapitel 3.2 dargestellt, zeigten die SEL in unterschiedlichen Konzentrationen bereits einen Einfluß auf die Zellvitalität. Daher wurde nachfolgend die entsprechende SEL<sub>pur</sub> als Kontrolle = 100 % gesetzt. Nur so ist es möglich, die Gesamtwirkung der aus den Prüfkörpern solubilisierten Ionen zu evaluieren

#### 3.3.1 Wirkung auf L-929

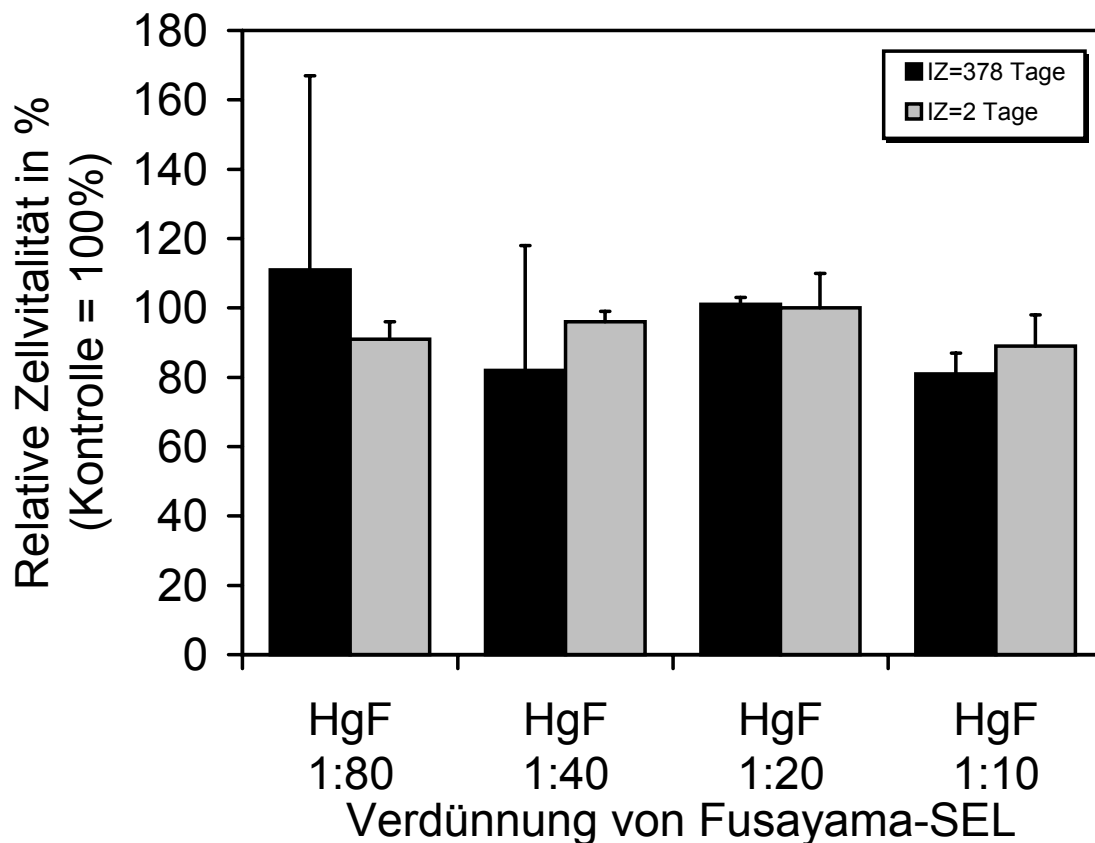
Der Fusayama-Extrakt des Amalgams (HgF) bewirkte bei einer Inkubationszeit von IZ = 378 Tagen in Verdünnung von 1:80 und 1:20 im Vergleich zur Fusayama-SEL Verdünnung (KF) gering proliferationsfördernd auf die L-929 Zellen, in einer Verdünnung von 1:40 und 1:10 gering proliferationhemmend. Der Extrakt mit nur 2-tägiger Inkubationszeit hatte einen hemmenden Einfluß auf das Wachstum in allen Konzentrationen (Tab. 7 und Abb. 7).

Der NaCl/Laktat-Extrakt des Amalgams (HgNa) hatte bei einer Inkubationszeit von 378 Tagen einen ausgeprägten Einfluß auf die Vitalität der Zellen (Tab. 8 und Abb. 8). Mit steigender Konzentration des Extraktes kam es zu einer deutlichen Hemmung der Zellproliferation, ab einer Verdünnung von 1:20 starben die Zellen ab, d.h. die Zellzahl war am Ende des Versuches geringer als vor Expositionsbeginn ( $N_1 > N_2$ ). Für IZ = 2 Tage ergab sich im Wachstumsverhalten der Zellen kein Unterschied zur Kontrolle, die relative Zellvitalität lag bei allen Konzentrationen um 100%. Der Effekt auf die Zellvitalität war somit bei  $IZ_{378} > IZ_2$ .

**Tab. 7:** Vitale Zellen (Absolutwerte) und die sich daraus ergebende Wachstumsrate (WR) nach 72-stündiger Exposition mit Fusayama-SEL.

*Zell-Linie L-929*

Probe	Vitale Zellen IZ <sub>378</sub>				Vitale Zellen IZ <sub>2</sub>			
	Mittelwert	SEM	WR	n	Mittelwert	SEM	WR	n
HgF 1:80	988.333	497.660	1,820	3	2.167.500	112.306	2,010	2
HgF 1:40	872.500	379.933	1,770	3	2.058.750	62.208	1,980	2
HgF 1:20	1.896.667	32.998	2,140	3	1.970.000	197.547	1,960	2
HgF 1:10	1.550.833	107.245	2,040	3	1.745.000	169.484	1,900	2

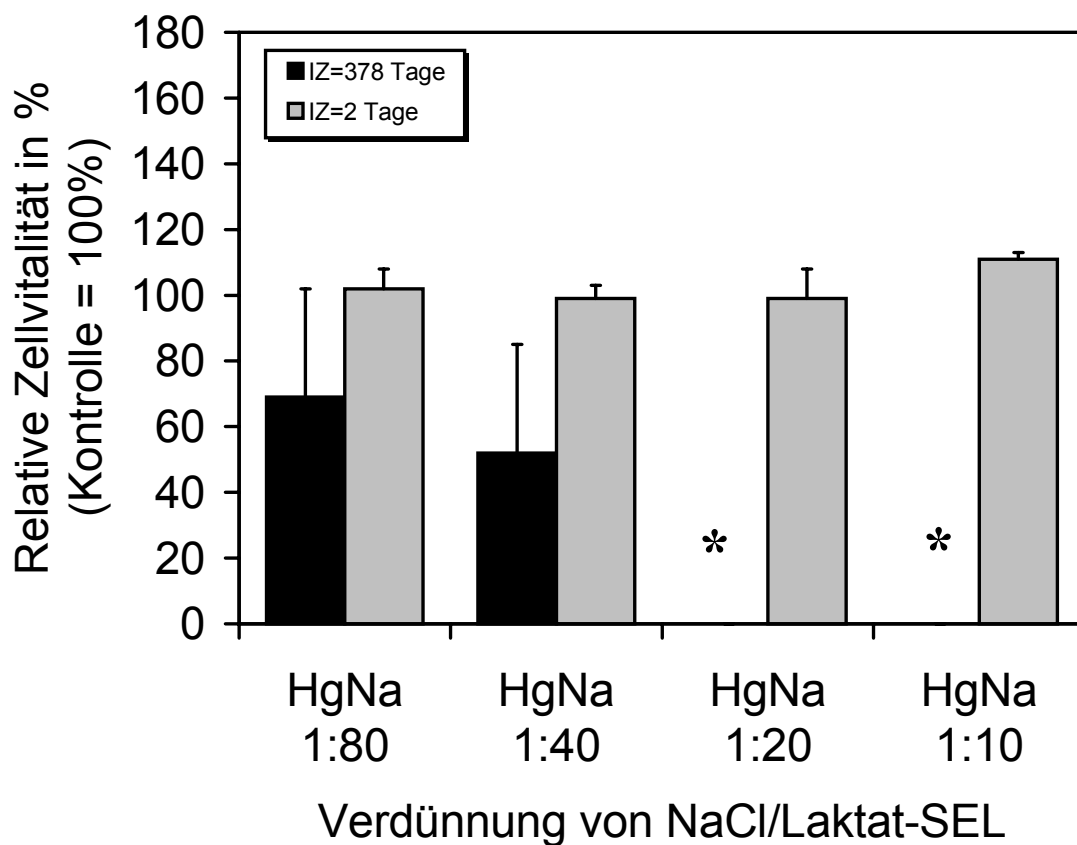


**Abb. 7:** Darstellung der relativen Zellvitalität von Zelle der Zell-Linie L-929 nach 72-stündiger Exposition in Abhängigkeit von der IZ und der SEL – Verdünnung. Angegeben ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM.

**Tab. 8:** Vitale Zellen (Absolutwerte) und die sich daraus ergebende Wachstumsrate (WR) nach 72-stündiger Exposition mit NaCl/Laktat-SEL.

*Zell-Linie L-929*

Probe	Vitale Zellen IZ <sub>378</sub>				Vitale Zellen IZ <sub>2</sub>			
	Mittelwert	SEM	WR	n	Mittelwert	SEM	WR	n
HgNa 1:80	620.000	296.457	1,600	3	2.180.000	134.939	2,010	2
HgNa 1:40	545.000	345.953	1,540	3	1.828.750	75.629	1,930	2
HgNa 1:20	-	-	-	3	1.532.500	139.179	1,840	2
HgNa 1:10	-	-	-	3	1.081.250	18.343	1,670	2



**Abb. 8:** Darstellung der relativen Zellvitalität von Zellen der Zell-Linie L-929 nach 72-stündiger Exposition in Abhängigkeit von der IZ und der SEL – Verdünnung. Angegeben ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ ; Student's  $t$ -Test, bezogen auf die SEL-Verdünnung.

### 3.3.2 Wirkung auf 3T3

Die 3T3 Zell-Linien reagierten auf die Fusayama-Extrakte unterschiedlich. Für IZ = 378 Tage lag ein hemmender Effekt im Vergleich zur entsprechenden Fusayama-SEL Kontrolle vor (siehe Tab. 9 und Abb. 9).

Für IZ = 2 Tage kam es bei einer Verdünnung 1:80 zu einer sehr geringen Steigerung der Proliferation, in den anderen Konzentrationen zu einer Hemmung.

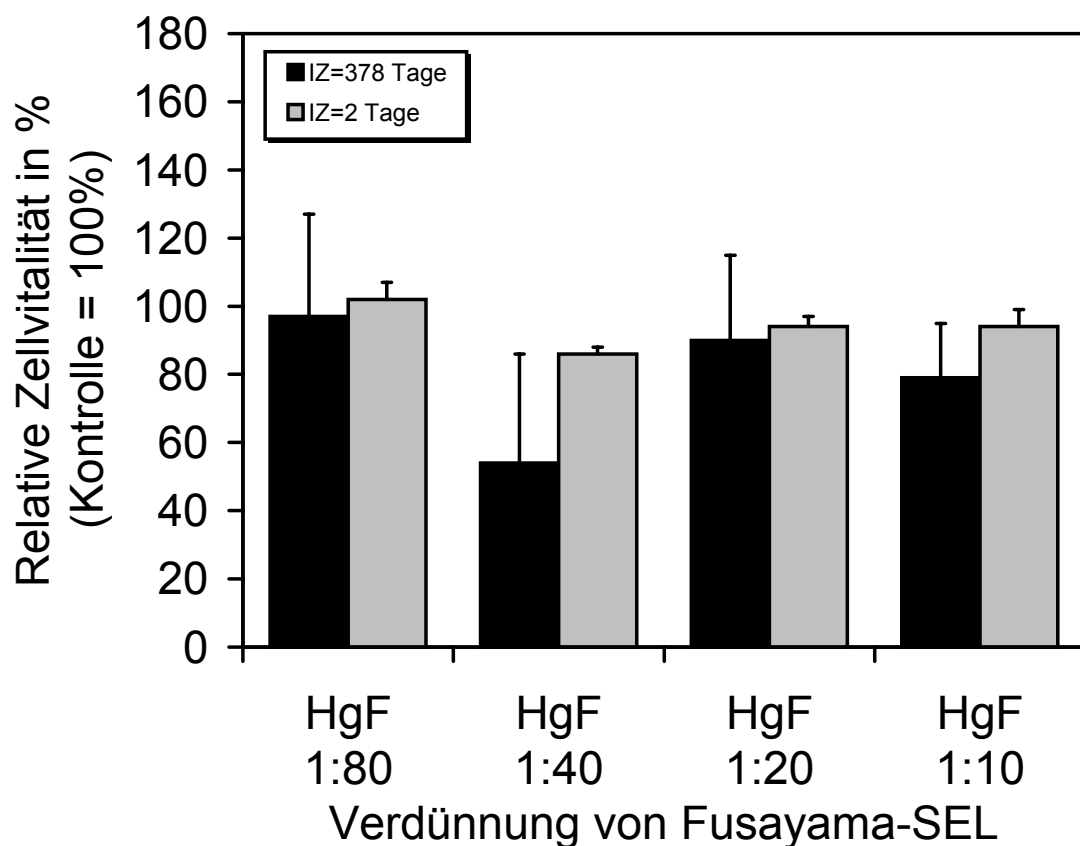
Der NaCl/Laktat-Extrakt hatte für IZ<sub>2</sub> und IZ<sub>378</sub> hemmenden Effekt auf die Zellvitalität. In Verdünnungen von 1:20 und 1:10 kam es bei 378-tägiger Inkubation zum Absterben der Zellen (siehe Tab. 10 und Abb. 10).

Bei 2-tägiger Inkubation war der proliferationshemmende Einfluß nicht signifikant, die Zellvitalität in allen Konzentrationen war praktisch unverändert zur Kontrolle. Der Effekt auf die Zellvitalität war somit bei IZ<sub>378</sub> > IZ<sub>2</sub>.

**Tab. 9:** Vitale Zellen (Absolutwerte) und die sich daraus ergebende Wachstumsrate (WR) nach 72-stündiger Exposition mit Fusayama-SEL.

*Zell-Linie 3T3*

Probe	Vitale Zellen IZ <sub>378</sub>				Vitale Zellen IZ <sub>2</sub>			
	Mittelwert	SEM	WR	n	Mittelwert	SEM	WR	n
HgF 1:80	915.000	284.658	1,790	3	2.470.000	112.583	2,110	2
HgF 1:40	501.500	294.640	1,500	3	2.156.250	53.180	2,050	2
HgF 1:20	1.562.500	429.732	2,050	3	2.038.750	72.823	2,020	2
HgF 1:10	1.425.833	281.682	2,000	3	1.843.750	104.935	1,970	2

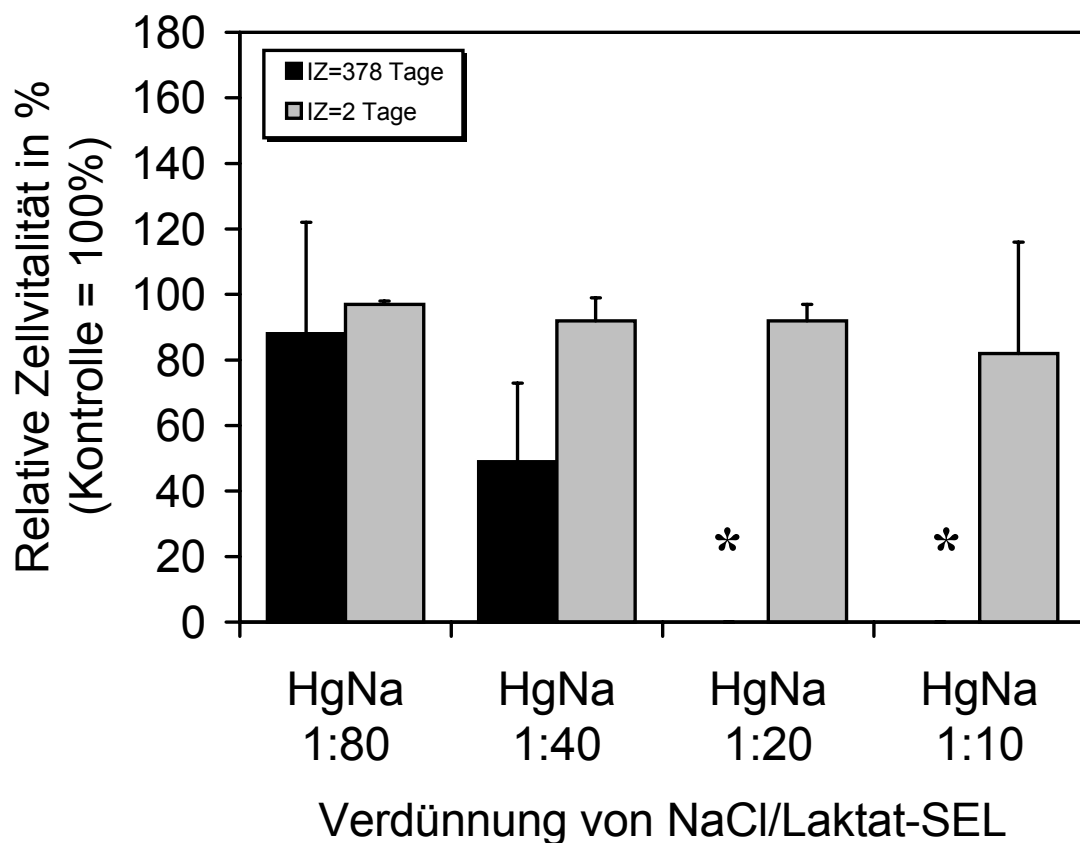


**Abb. 9:** Darstellung der relativen Zellvitalität von Zellen der Zell-Linie 3T3 nach 72-stündiger Exposition in Abhängigkeit von der IZ und der SEL – Verdünnung. Angegeben ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM.

**Tab. 10:** Vitale Zellen (Absolutwerte) und die sich daraus ergebende Wachstumsrate (WR) nach 72-stündiger Exposition mit NaCl/Laktat-SEL.

*Zell-Linie 3T3*

Probe	Vitale Zellen IZ <sub>378</sub>				Vitale Zellen IZ <sub>2</sub>			
	Mittelwert	SEM	WR	n	Mittelwert	SEM	WR	n
HgNa 1:80	796.667	304.415	1,720	3	2.308.750	18.791	2,080	2
HgNa 1:40	472.500	234.427	1,470	3	1.955.000	151.190	2,000	2
HgNa 1:20	-	-	-	3	1.703.750	86.956	1,930	2
HgNa 1:10	-	-	-	3	872.500	361.173	1,610	2



**Abb. 10:** Darstellung der relativen Zellvitalität von Zellen der Zell-Linie 3T3 nach 72-stündiger Exposition in Abhängigkeit von der IZ und der SEL – Verdünnung. Angegeben ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ ; Student's *t*-Test, bezogen auf die SEL-Verdünnung.



### 3.3.3 Wirkung auf V-79

In Bezug auf den Fusayama-Extrakt wurde für die V-79 Zell-Linien sowohl bei 2, als auch bei 378-tägiger Inkubation ein überhaupt kein Einfluß auf das Wachstum der Zellen in alle Konzentrationen / Verdünnungen festgestellt ( Tab. 11 und Abb. 11).

Der NaCl/Laktat-Extrakt bewirkte bei einer Inkubation von 378 Tagen eine signifikante Verminderung der Zellzahl, bei einer Verdünnung von 1:10 konnte kein Zellwachstum mehr nachgewiesen werden (Tab 12 und Abb. 12). Bei einer Inkubation von 2 Tagen war der hemmende Effekt auf die Proliferation nicht vorhanden. Der Effekt auf die Zellvitalität war somit bei  $IZ_{378} > IZ_2$ .

### 3.3.4 Zusammenfassender Überblick

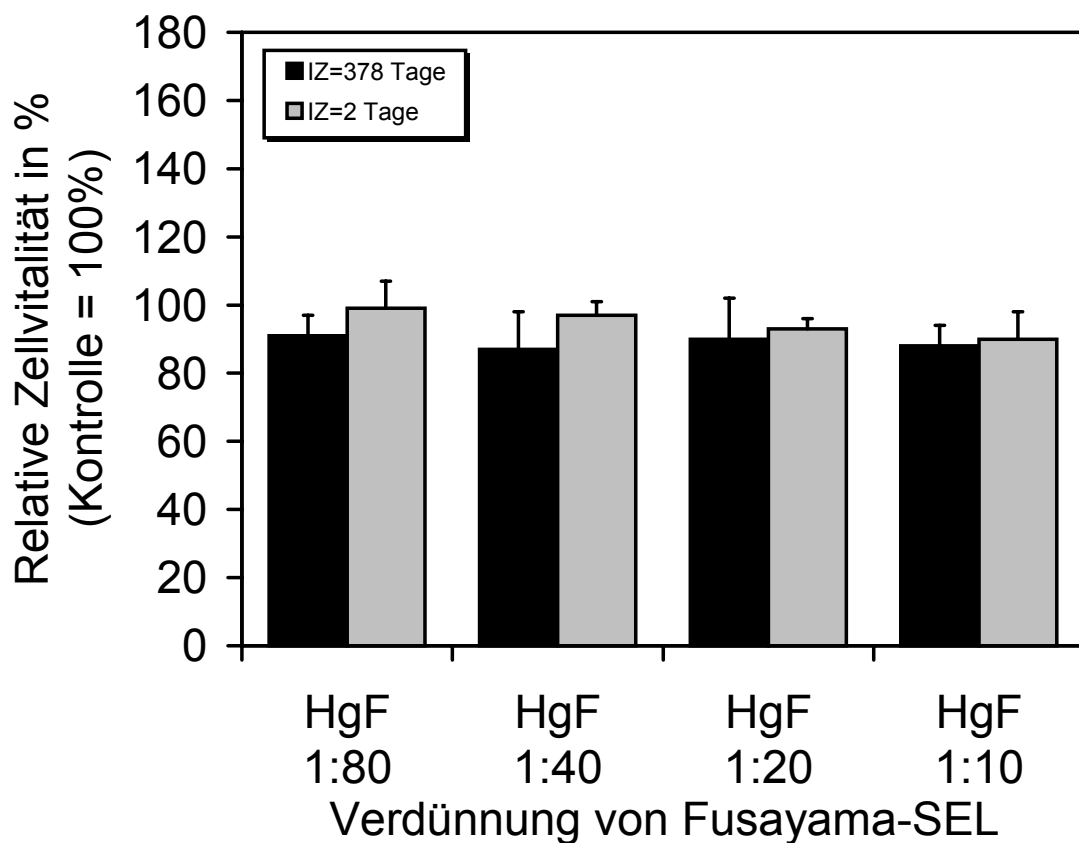
Die Extraktion des Amalgams mit Fusayama-SEL hatte in allen Konzentrationen sowohl bei  $IZ_2$  als auch  $IZ_{378}$  keinen signifikanten Einfluß auf die Vitalität der verwendeten Zellen.

Die Proliferation von L-929, 3T3 und V-79 verminderte sich jedoch signifikant mit steigender Konzentration des NaCl/Laktat-Extraktes bei 378-tägiger Inkubationszeit. Ab einer Konzentration von 1:20 kam es zum Absterben der Zellen aller drei Zell-Linien. Die V-79 Zellen zeigten bereits ab einer Konzentration von 1:80 bei  $IZ_{378}$  eine signifikante Minderung der Zellzahl, was darauf hindeutet, dass V-79 am sensitivsten im Vergleich zu den anderen Zell-Linien reagiert. Der Einfluß bei nur 2-tägiger Inkubationszeit des NaCl/Laktat-Extraktes war nicht signifikant auf die Vitalität der verwendeten Zellen.

**Tab. 11:** Vitale Zellen (Absolutwerte) und die sich daraus ergebende Wachstumsrate (WR) nach 72-stündiger Exposition mit Fusayama-SEL.

*Zell-Linie V-79*

Probe	Vitale Zellen IZ <sub>378</sub>				Vitale Zellen IZ <sub>2</sub>			
	Mittelwert	SEM	WR	n	Mittelwert	SEM	WR	n
HgF 1:80	1.785.000	120.000	2,070	3	2.288.750	175.080	2,000	2
HgF 1:40	1.743.333	216.346	2,060	3	2.260.000	87.417	2,000	2
HgF 1:20	1.835.000	239.409	2,090	3	2.371.250	78.442	2,020	2
HgF 1:10	1.699.167	110.505	2,050	3	2.168.750	194.302	1,980	2

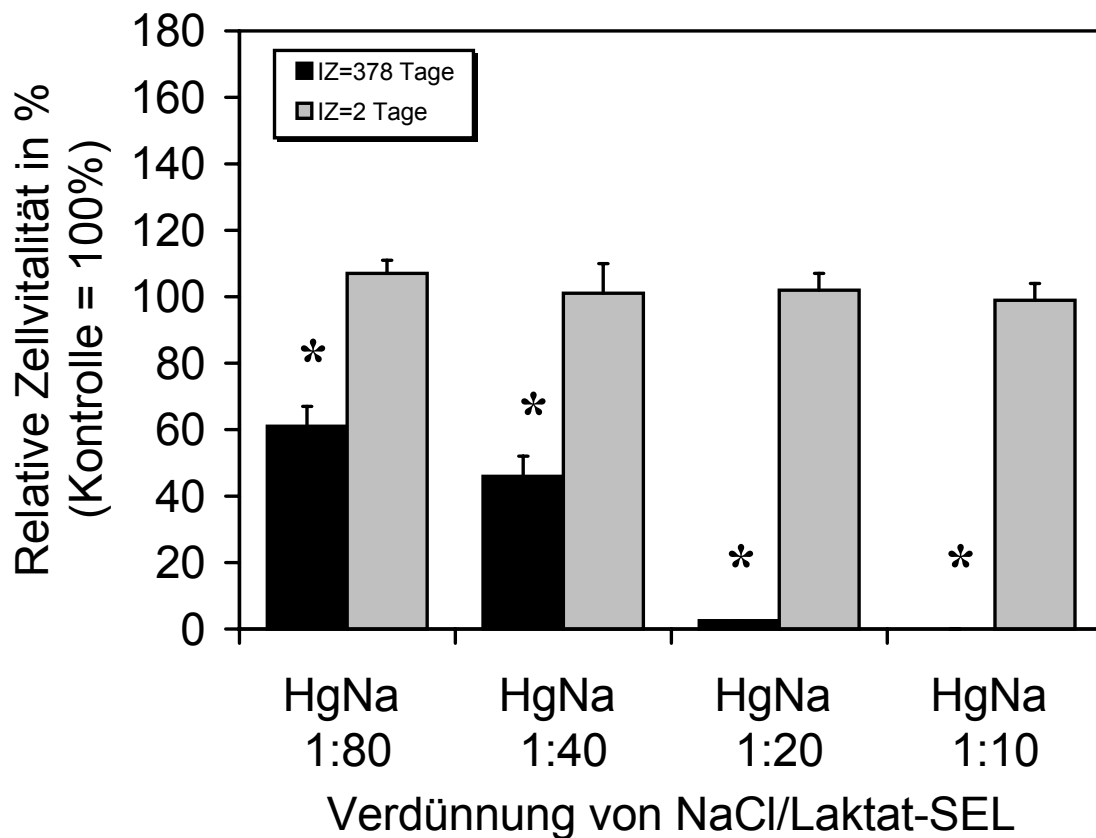


**Abb.11:** Darstellung der relativen Zellvitalität Von Zellen der Zell-Linien V-79 nach 72-stündiger Exposition in Abhängigkeit von der IZ und der SEL – Verdünnung. Angegeben ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM.

**Tab. 12:** Vitale Zellen (Absolutwerte) und die sich daraus ergebende Wachstumsrate (WR) nach 72-stündiger Exposition mit NaCl/Laktat-SEL.

*Zell-Linie V-79*

Probe	Vitale Zellen IZ <sub>378</sub>				Vitale Zellen IZ <sub>2</sub>			
	Mittelwert	SEM	WR	n	Mittelwert	SEM	WR	n
HgNa 1:80	1.105.000	113.740	1,840	3	2.445.000	82.310	2,040	2
HgNa 1:40	841.667	101.286	1,710	3	2.308.750	213.627	2,010	2
HgNa 1:20	1.667	1.491	-	3	2.157.500	99.016	1,980	2
HgNa 1:10	-	-	-	3	1.288.750	66.481	1,730	2



**Abb.12:** Darstellung der relativen Zellvitalität von Zellen der Zell-Linie V-79 nach 72-stündiger Exposition in Abhängigkeit von der SEL – Verdünnung. Angegeben ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM.; \*  $p < 0.05$ ; Student's *t*-Test, bezogen auf die SEL-Verdünnung.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Aktuelle Amalgamkontroverse in Deutschland**

In Deutschland verschärfte sich die Amalgamdebatte 1995 mit Veröffentlichung des sogenannten „Kieler Amalgam-Gutachten“ von Wassermann et al. (1997) aus dem Institut für Toxikologie der Universität Kiel, das dem Landgericht Frankfurt am Main zum Thema Amalgam vorgelegt wurde. Die sehr ablehnende Haltung der Autoren diesem zahnärztlichen Material gegenüber führte zu einer großen Verunsicherung und veranlasste die Bundesärztekammer (BZÄK), Fachleute aus dem Bereich der Toxikologie, der Arbeits- und Umweltmedizin sowie der Zahnmedizin und zahnärztlichen Werkstoffkunde um die Abgabe einer Stellungnahme zu bitten. Mit dem Buchband „Amalgam im Spiegel kritischer Auseinandersetzung“ von Halbach et al. (1999) des Institutes Deutschen Zahnärzte (IDZ) erfolgte diese Gegendarstellung, die den Kieler Autoren wissenschaftlich-methodische Mängel nachweist. In einer aktuell vorgelegten Replik lasten hingegen Wassermann et al. (2000) dem IDZ-Band fachliche Fehler an, woraufhin sich die Autoren des IDZ-Bandes genötigt sahen, erneut der Replik 2001 zu entgegnen (Halbach et al. 2001).

### **4.2 Stellenwert von Zellkulturen**

Vor dem Hintergrund dieser aktuellen Kontroverse und den offensichtlichen Vorteilen von Zytotoxizitätstests an Zellkulturen macht es umso mehr Sinn, sich nicht direkt an der Amalgamdiskussion zu beteiligen, sondern sich der Grundlagenforschung zuzuwenden. Amalgam und seine Bestandteile wurde bereits in vielen wissenschaftlichen in vitro Studien untersucht, doch ist nach wie vor die Anzahl der Arbeiten, die Speichelkorrosionsversuche mit Zellkulturen kombiniert, gering (siehe Kapitel 1.7.2).

Die zellbiologische Untersuchung von arbeits- und umweltmedizinisch relevanten Gefahrstoffen bewährt sich schon lange als eine sehr zuverlässige wissenschaftliche Methode. Bei der zellbiologischen Methode bietet sich die Möglichkeit, mit biologischem Material zu experimentieren und gleichzeitig - mit Ausnahme der Manipulation an der Keimbahn - die ethische Problematik der Tierversuche zu umgehen.

Die Kulturbedingungen, die Testzeiten und der Versuchsablauf können bei Zellkulturen sehr gut standardisiert und die Ergebnisse können bei etablierten Tests gut reproduziert werden. Gleichzeitig bedeutet diese Methode eine beträchtliche Reduktion von Zeit und Materialaufwand im Vergleich zu Tierversuchen. Darüber hinaus kann für eine gezielte Fragestellung eine große Anzahl von methodisch verschiedenen Ansätzen durchgeführt und die Wirkung der Testsubstanzen auf die Zellen ermittelt werden.

In Reinkulturen können einzelne, organspezifische Zellstämme isoliert werden und somit zelltypspezifische und organspezifische Wirkungen besser beobachtet werden. Eine Schädigung wird schneller an der Einzelzelle als im Gesamtorganismus oder an komplexen Organsystemen erkannt. Aus diesem Grund spricht man auch von einer höheren Sensitivität der Zellkulturuntersuchungen. Jedoch sind auch diesem Modell Grenzen gesetzt. Die komplexen Wechselwirkungen von Geweben, die innerhalb des Gesamtorganismus zusammenwirken, werden bei der Verwendung von Reinkulturen nicht berücksichtigt.

### **4.3 Einfluß der Speichellersatzlösungen auf die Zellvitalität**

Sowohl die Fusayama-SEL als auch die NaCl/Laktat-SEL sind standardisierte Lösungen, die sich in wissenschaftlichen Arbeiten bewährt haben. Die Zusammensetzung der Fusayama-SEL geht auf den japanischen Wissenschaftler Fusayama zurück, der 1963 mit dieser Lösung Kontaktkorrosionen zwischen Gold- und Amalgamprüfkörpern untersuchte (Fusayama et al. 1963). Diese Lösung wurde in ihrer Zusammensetzung nur geringfügig im Laufe der Zeit modifiziert und in

elektrochemischen Korrosionsversuchen (Lappalainen et al. 1987) oder in in vitro-Studien. (Berglund 1993) eingesetzt. Bei der NaCl/Laktat-SEL handelt es sich um eine ISO-Korrosionslösung, die in ihrer Zusammensetzung ebenfalls standardisiert ist (Geis-Gerstorfer et al. 1987, International Organisation for Standardization 1993, 1996). Ein direkter proliferationsbeeinflussender Effekt dieser Lösungen auf Zellen wurde aber noch nicht beschrieben.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind kontrovers zu diskutieren: zum einen zeigt sich die zytotoxische Wirkung der hergestellten Extrakte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der Konzentration nur bedingt, auf der anderen Seite beeinflussen die verwendeten SEL bereits für sich allein das Wachstumsverhalten der Zellen deutlich. Besonders die NaCl/Laktat-SEL vermindert die Zellproliferation aller verwendeten Zellen in höherer Konzentration (1:10) resp. niedriger Verdünnung (siehe Kap. 3.2.7). Nur für den NaCl/Laktat-Extrakt ergibt sich eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Konzentration des Extraktes und der Zellvitalität bzw. der Inkubationszeit und der Zellvitalität (siehe Kap. 3.3.7). Für die Fusayama-SEL fehlt diese dosisabhängige Korrelation völlig, sowohl für die SEL als auch den Extrakt ergeben sich für die unterschiedlichen Konzentrationen resp. Inkubationszeiten keine signifikanten Änderungen in der Vitalität der verwendeten Zellen (Kap. 3.2.7 und 3.3.7).

Eine mögliche Erklärung dieser Ergebnisse ist in der Zusammensetzung der SEL und ihrem spezifischen pH-Wert zu suchen. Die NaCl/Laktat-SEL ist mit einem pH-Wert von 2,3 deutlich saurer als die Fusayama-SEL mit einem pH-Wert zwischen 5,0 und 5,25. Somit unterscheiden sich die Lösungen sehr deutlich einerseits hinsichtlich ihrer korrodierenden Eigenschaften und andererseits in ihrer Abweichung vom physiologischen pH-Wertes der verwendeten Zellen (ca. 7,36). Um eine direkte Zellschädigung durch den sauren NaCl/Laktat-Extrakt zu verhindern, wurde dem Kulturmedium eine FCS Puffersystem zugesetzt, um Änderungen des pH-Wertes abzufangen. Es ist dennoch anzunehmen, dass nach Zugabe des NaCl/Laktat-Extraktes die Zellen einem saureren Milieu ausgesetzt sind

als nach Zugabe des Fusayama-Extraktes. Diese Annahme wird auch durch die Beobachtung bestätigt, dass sich der Indikatorfarbstoff (Phenolrot) nach Zugabe des NaCl/Laktat-SEL resp. -Extraktes zu dem Kulturmedium in der höchsten Konzentration (1:10) gelb färbte.

Zudem ist die Konzentration an gelösten Metallionen in dem NaCl/Laktat-Extrakt aufgrund des stärkeren Korrosionspotentials des sauren NaCl/Laktat-Extraktes deutlich höher als in dem Fusayama-Extrakt. Die Konzentration an Quecksilberionen war in einer Probenbestimmung in dem NaCl/Laktat-Extrakt dreifach erhöht gegenüber dem Fusayama-Extrakt, die Konzentration an Kupferionen sogar 1680fach höher als im Fusayama-Extrakt (siehe Kapitel 4.5). Eine Abhängigkeit der Konzentration an Metallionen von der Zeit konnte für den NaCl/Laktat-Extrakt auch deutlich gemacht werden (siehe Kapitel 4.5). Dafür spricht auch die Tatsache, dass beim NaCl/Laktat-Extrakt bei einer IZ von 2 Tagen kein signifikanter zellschädigender Einfluß erkennbar ist, sondern dieser erst bei einer IZ von 378 Tagen deutlich wird.

#### **4.4 Zytotoxizität von Quecksilber**

Die Möglichkeiten der Zellschädigung durch die Extrakte können vielfältig sein. Neben der Schädigung durch das saure Milieu kommt der zytotoxische Effekt der gelösten Metallionen hinzu. Um die Wirkung der SEL von der Extraktwirkung resp. der gelösten Metallionen trennen zu können, wurde der Einfluß der SEL auf die Zellvitalität getrennt untersucht und diese Ergebnisse mit der Extraktprüfung korreliert. Die Ergebnisse der Extraktprüfung wurden mit der SEL-Untersuchung verglichen, wobei die SEL-Werte als Kontrolle dienten. (siehe Kapitel 3.3).

Die Hauptkomponenten der Amalgamlegierung (Ag, Cu, Sn) haben bis auf das Zinn stark zellschädigenden Wirkung (Kawahara et al. (1968) (Kawahara et al. (1975). Kaga et al. (1988, 1991) zeigten, dass reines Kupfer und Zink eine sehr ausgeprägte Zytotoxizität aufwiesen, die signifikant höher war als die von reinem Silber und Quecksilber. Schmalz et al. (1998) unterstrichen erneut die zellschä-

digende Wirkung von Kupferionen und betonten ebenso wie Nelson et al. (1999), Wataha et al. (1999), dass die zellschädigende Wirkung der Extrakte nicht nur auf spezifische Metallionen zurückzuführen ist, sondern dass unterschiedliche Metallionen einen additiven Effekt in bezug auf die Toxizität haben. Die in allen öffentlichen Diskussionen stets zentrale Frage nach der Toxizität des in Amalgam enthaltenem Quecksilber sollte somit kritisch beleuchtet werden. Bei der Untersuchung der Zytotoxizität des Amalgams muss insbesondere die Tatsache berücksichtigt werden, dass es sich bei diesem Material um eine Legierung handelt. Eine einseitige Fokussierung auf das Quecksilber unter Außerachtlassung der übrigen Legierungsbestandteile wird der Komplexität des Themas nicht gerecht. Eine besonderen Bedeutung kommt dabei sicher dem im Amalgam enthaltenem Kupfer zu.

#### **4.5 Zytotoxizität von Kupfer**

In der Arbeits- und Umweltmedizin ist die Toxizität von Kupfer gut dokumentiert. Tödliche Kupfervergiftungen bei Kleinkindern über das Trinkwasser im Zusammenhang mit der Installation von Kupferrohren sind beschrieben worden (Spitalny et al. 1984). Die deutsche Trinkwasserverordnung nennt Richtwerte für Kupfer, die im Trinkwasser nicht überschritten werden sollten. Beurteilungsmaßstab war dabei der EG-Richtwert von 3 mg/l nach 12stündiger Standzeit, der WHO-Richtwert liegt bei 1,5 mg/l nach 16stündiger Standzeit.

Analog der in dieser Arbeit experimentell ermittelten Abhängigkeit der Konzentration an gelösten Metallionen vom pH-Wert der Speichellersatzlösungen und der Inkubationszeit wird auch in der Literatur ein Zusammenhang zwischen dem pH-Wert des Leitungswassers in Kupferrohrleitungen und seiner Kontamination mit Kupferionen beschrieben. Ein erniedrigter pH-Wert macht das Wasser aggressiv, so dass nach nächtlicher Verweilzeit (Standwasser) Kupferkonzentrationen von mehr als 3 mg/l vorkommen. Die Kupferkontamination entstammte also nicht dem Grundwasser.



Arbeiten von Eife et al. (1999) beschrieben die toxischen Wirkungen von Kupfer und wiesen einen immunschädigenden Effekt von Kupferionen nach.

#### **4.6 Einfluß der Inkubationszeit auf die Toxizität der Extrakte**

Die Resultate dieser Arbeit zeigen nur für den NaCl/Laktat-Extrakt einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Inkubationszeit des Amalgamprüfkörpers und der Toxizität des Extraktes, wobei auch nur der 378 Tage lang inkubierte Extrakt signifikant zellschädigend war. Dieses Ergebnis belegt sowohl die immense Bedeutung der Korrosionsdauer als auch die Abhängigkeit vom pH-Wert in bezug auf die Toxizität der Extrakte. Wie die Bestimmung der Konzentration an gelösten Metallionen in den beiden unterschiedlich verwendeten Extrakten über einen Zeitraum von 2,4,7,28 und 56 Tagen zeigte (Geis-Gerstorfer, persönliche Mitteilung), ergab sich nur für den NaCl/Laktat-Extrakt eine sehr deutliche Abhängigkeit der Konzentration an gelösten Kupfer- und Quecksilberionen von der Zeit. Die Konzentration an gelösten Kupferionen stieg dabei im Vergleich zu den Quecksilberionen sehr stark an. Lag die Anfangskonzentration von Kupfer bei 7,4 µg/ml, so stieg sie im Verlauf der Zeit auf 840 µg/ml an, also über eine Verhundertfachung des Ausgangswertes. Die Quecksilberwerte hingegen verdreifachten sich nur von unter 0,5 µg/ml (Nachweisgrenze) auf 1,6 µg/ml. Die Konzentration an Silberionen blieb über den Verlauf der Zeit konstant unter 0,5 µg/ml. Im Fusayama-Extrakt dagegen kam es zu keiner Veränderung der Konzentrationen an Metallionen; sowohl für Kupfer, Quecksilber und Silber blieb die Konzentration zu Beginn als auch am Ende der Bestimmungen stets unter 0,5 µg/ml. Eine sehr starke Solubilisierung von Metallionen im Säuren in Abhängigkeit vom Alterungsprozeß des Amalgams wird nur für den NaCl/Laktat-Extrakt deutlich.

(Fritz et al. 1991) zeigten mit einer NaCl/Laktat-SEL identischer Zusammensetzung wie die hier verwendete SEL, dass die Abgabe von Quecksilber aus Amalgamprüfkörpern am ersten Tag am höchsten ist. Nach 7 Tagen reduzierte sich die

Quecksilberabgabe auf 1/9 des Ausgangswertes. Gravimetrische Korrosionstests an NEM-Legierungen zeigen ebenfalls, dass nach einem hohen Massenverlust zu Beginn die Werte danach stark abfallen (Geis-Gerstorfer et al. 1986). Diese Ergebnisse wurden so interpretiert, dass sich sowohl bei den NEM-Legierungen als auch beim Amalgam eine Passivierungsschicht ausbildet.

Arbeiten von Marshall et al. (1980, 1982) zeigten, dass Silberamalgame beim Kontakt mit Speichel von einem etwa 0,2 µm dicken Niederschlag überzogen werden, der hauptsächlich aus Zinnoxiden ( $\text{SnO}$ ,  $\text{SnO}_2$ ), Zinnhydroxychloriden ( $\text{Sn}_4(\text{OH})_6\text{Cl}_2$ ) und Kupferchloriden ( $\text{CuCl}_2 \times 3\text{Cu}(\text{OH})_2$ ) besteht. Diese Passivierungsschicht macht das Amalgam reaktionsträge und inhibiert weitere elektrochemische Reaktionen. Die Passivierungsschicht wird durch Abrasion – z.B. beim Zähneputzen – oder durch pH-Änderungen zerstört, baut sich aber ständig wieder neu auf (Brune 1986).

Die Ausbildung einer Passivierungsschicht, wie sie Fritz et al. (1991) beschrieben haben, die die Lösung von Metallionen hemmt, konnte in dieser Arbeit für den NaCl/Laktat-Extrakt weder für Quecksilber, noch für Kupfer beobachtet werden. Ganz im Gegenteil stieg die Konzentration an Metallionen nahezu proportional mit der Zeit (siehe oben). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen die Schlussfolgerung zu, dass nicht die gelösten Quecksilberionen, sondern andere Metallionen, die während der langen Inkubationszeit in Lösung gingen (z.B. Kupfer), entscheidender zur Toxizität des Extraktes beitragen als das Quecksilber.

Eine Zytotoxizität des im Amalgam enthaltenem Kupfers und seine gute Löslichkeit in Kulturmedien wurde bereits von mehreren Autoren beschrieben, so z. B. von (Leirskar 1974), der schon 1973 feststellte, dass Metallionen, die aus Amalgamprüfkörpern in Lösung gingen, unterschiedliche Zytotoxizität aufwiesen. Folgende Reihenfolge stellte er dabei in seinen Versuchen fest:  $\text{Cd}^{2+} > \text{Ag}^+ > \text{Hg}^{2+}/\text{Hg}^+ > \text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Sn}^{2+} > \text{Sn}^{4+}$ . Ab einer Konzentration von 50 µg  $\text{Cu}^{2+}$  pro ml Kulturmedium stellte er eine Reduktion der Zellzahlen um 75% bei

einer Expositionszeit von 24 Stunden fest. Bei 72-stündiger Exposition bewirkte bereits eine Konzentration von 25  $\mu\text{g Cu}^{2+}$  pro ml Kulturmedium denselben toxischen Effekt. Nakajima et al. (1997) untersuchten die Zytotoxizität von Amalgam an Zellkulturen und stellten dabei fest, dass Kupfer das Element mit der höchsten Löslichkeit in das Kulturmedium war. Wataha et al. (2001) und Chandler et al. (1994) ermittelten Metallkonzentrationen, die aus Amalgam herausgelöst werden müssten, um eine Zell-Letalität von 50% zu erreichen. Für  $\text{Cu}^{2+}$  gaben sie eine Konzentration von 15  $\mu\text{g/ml}$ , für  $\text{Hg}^{2+}$  eine Konzentration von 70,2  $\mu\text{g/ml}$  an. Solche Konzentrationen fand Nakajima jedoch nicht in seinen Versuchen. Bumgardner et al. (1993, 1996), Kawahara et al. (1975), Nakamura et al. (1979) zeigten in in vitro Versuchen an Epithel- und Gingivazellen, dass sich die Vitalität und Proliferation dieser Zellen reduzierte, wenn sie in Kontakt mit Kupfersalzen, kupferhaltigen Amalgamen oder kupferhaltigen Dentallegierungen kamen.

Die gewonnenen Daten dieser Arbeit bestätigen den zytotoxischen Effekt der Kupferionen. Überträgt man die ermittelte Kupferkonzentration in der NaCl/Laktat-SEL-Probe von 840  $\mu\text{g/ml}$  nach 56tägiger Inkubation einmal auf oben genannte Ergebnisse, so ergibt sich in der höchsten Verdünnung (1:10) eine Kupferkonzentration von 84  $\mu\text{g/ml}$ . Bei dieser Konzentration starben alle Zellen der drei verwendeten Zell-Linien ab. Eine Reduktion der Zellzahl um 50% ergab sich in dieser Arbeit in etwa ab einer Verdünnung von 1:40 und entspräche einer Konzentration von ungefähr 20  $\mu\text{g/ml}$  bei einer Expositionszeit von 72 Stunden. Dieser Wert stimmt mit den von Leirskar ermittelten Werten nahezu überein.

Überträgt man weiterhin die gefundene Konzentration an Kupferionen beispielhaft auf eine fiktive Trinkwasserbelastung, so ergäbe sich bei einer Verdünnung von 1:10 ein Wert von 84  $\text{mg/l}$  und somit eine Übersteigerung des maximalen EG-Richtwertes für Trinkwasser um fast das 30fache. Ein zytotoxischer Effekt des Extraktes verwundert daher kaum.

Die mögliche Ausbildung einer Passivierungsschicht auf dem Amalgamprüfkörper, die vor weiterer Korrosion schützt, kann daher lediglich für die Inkubation in Fusayama-SEL vermutet werden.

#### **4.7 Einfluß des pH-Wertes auf die Vitalität der Zellen**

Zelluläre Reaktionen auf Extrakte von Dentallegierungen hängen von den freien Metallionen ab, die von der Legierungen freigesetzt werden und somit von der Korrosionsrate (Brune 1986). Die Korrosionsrate ist eine Funktion der Korrosionsbedingungen, z.B. des pH-Wertes (Klötzer 1985, Pfeiffer et al. 1991). Niedrige pH-Werte können in der Kavität aufgrund säurehaltiger Nahrung und des Stoffwechsels einiger Mundbakterien und Zahnplaque auftreten sowie aufgrund Spaltkorrosion (Wirz et al. 1987b, 1987a). Aus diesem Grund wurden Standardkorrosionslösungen vorgeschlagen, die einen pH-Wert bis zu 2,3 haben (Geisgerstorfer et al. 1987, International Organisation for Standardization 1993, 1996) um Lösungen zu gewinnen, deren pH-Wert diese Bedingungen imitiert und ein genügend hohes Korrosionspotential besitzen, um Metall-Legierungen chemisch zu zersetzen.

Vitale Zellen mit einem derart gewonnenen Extrakt zu testen ist ein Problem, da der pH-Wert dieses Extraktes nicht kompatibel ist mit den physiologischen Bedingungen eines biologischen Testsystems. Um einen physiologischen pH-Wert dennoch zu erreichen, ist die Verwendung eines Puffersystems notwendig. In hohen Konzentrationen sind jedoch auch diese Pufferlösungen toxisch (z.B. HEPES- Puffer).

Schmalz et al. (1998) untersuchten die Zytotoxizität dentaler NEM-Legierungen-Extrakte und korrespondierender Metallsalzlösungen und trennten aufgrund oben genannter pH-Problematik die Extraktion (Korrosion) und das Testen an vitalen Zellkulturen. Dazu wurde in einem ersten Schritt die Metallionen enthaltende Korrosionslösung chemisch analysiert und in einem zweiten Schritt eine korres-

pondierende Metallsalzlösung bei physiologischem pH-Wert hergestellt, die die gleiche Konzentration an Metallionen enthielt.

In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Problem durch die Zugabe eines Puffersystems zum Zellmedium gelöst, dennoch ergibt sich die Frage, inwiefern trotz Puffersystem eine Belastung und Schädigung der Zellen durch den sauren Extrakt vorliegen. Eine solche pH-Wert bedingte Schädigung der Zellen ist anzunehmen, da die NaCl/Laktat-SEL bereits für sich in höheren Konzentrationen alle drei Zell-Linien signifikant im Wachstum hemmt.

## **4.8 Organspezifische Wirkung**

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zell-Linien sind etablierte, standardisierte Zell-Linien (ISO-Norm 10933-5; 2. Fassung des Medizinproduktegesetzes vom 15. Mai 1999), die sich in zahlreichen in vitro Untersuchungen zur Biokompatibilität von unterschiedlichsten Werkstoffen bewährt haben. Eine Vielzahl von zahnärztlichen Materialien wie z.B. endodontische Materialien, Dentallegierungen und Kunststoffe wurden in Lösungen mit L-929, 3T3 und V-79 Zellen in Kontakt gebracht (vgl. Geurtsen et al. 1998, Osorio et al. 1998, Zhu et al. 1999).

Insbesondere diese Zell-Linien eignen sich zur Ermittlung organspezifische Belastungen wie z.B. der Haut (L-929 bzw. 3T3) oder der Lunge (V-79). Auswirkungen einer dermale bzw. pulmonale Exposition durch Amalgam können so abgeschätzt werden. Eine solche Belastung zu überprüfen ist sinnvoll, da es bei der Verarbeitung, Inkorporation und Entfernen des Amalgams zu einer besonderen Belastung dieser Organe kommt.

### **4.8.1 Belastungssituationen durch Amalgam**

Eine direkte dermale und pulmonale Exposition, wie sie in der Vergangenheit beim Anmischen des Amalgams mit Mörser und Pistill auftreten konnte, ist seit der Etablierung maschineller Verfahren (Kapselsysteme und Amalgamator) deutlich zurückgegangen. Auch das Kneten des plastischen Amalgams und Heraus-

drücken von Quecksilberüberschüssen mit den Fingern gehört der Vergangenheit an. Dennoch besteht nach wie vor die Möglichkeit, mit dem noch plastischen Amalgam während des Einbringens und Stopfens in die Kavität in direkten Kontakt zu kommen. Bei der Kondensation des Amalgams in der Kavität entsteht eine Oberflächenschicht mit sehr hohem Quecksilbergehalt, so dass noch immer eine, wenngleich auch kurzfristige, hohe Belastungssituation der Atemluft mit Quecksilberdampf sowohl für den Patienten, als auch den Zahnarzt und die Helferin besteht.

Eine Amalgamfüllung kann in direkten Schleimhautkontakt im Mund des Patienten stehen. Durch Amalgamfüllungen verursachte Läsionen der Mundschleimhaut sind selten. Sie können auf Überempfindlichkeitsreaktionen vom Typ IV (Kontaktallergie) oder auf toxische Reaktionen auf aus dem Füllungsmaterial freigesetzte Substanzen zurückzuführen sein (Hörsted-Bindslev et al. 1993).

Quecksilber kann auf mehreren Wegen aus Amalgamfüllungen freigesetzt werden: Abrasion, Abgabe von Hg-Dampf, Diffusion in benachbarte Gewebe und elektrochemische Korrosion. Die dominanten Eintragswege in den Organismus sind die Aufnahme über die Lunge und die Resorption von organischen Quecksilber in den Verdauungstrakt. Fundierte Hochrechnungen zur Aufnahme von Hg-Dampf über die Lunge gehen von Werten zwischen 1 – 10 µg/Tag aus, wobei die niedrigeren Werte plausibler erscheinen (Visser 1993).

Wenn man alte Amalgamfüllungen entfernt, ohne einen wassergekühlten Bohrer und ein leistungsfähiges Absauggerät zu benutzen, entsteht eine hohe Quecksilberkonzentration in der Luft. Besonders bei Verwendung einer Turbine bilden sich im Atembereich des Zahnarztes, der Helferin und des Patienten hohe Quecksilberkonzentrationen. Es wurden Werte von mehr als dem Zehnfachen des Kurzzeit-MAK (maximale Arbeitsplatzkonzentration für Expositionszeiten von bis zu 15 Minuten) gemessen (Richards et al. 1985).

## 4.9 Umweltproblematik von Amalgam und Quecksilber

Neben der Belastung des Menschen durch den Umgang, Kontakt und die Inkorporation von Amalgam und seinen Bestandteilen als Füllmaterial kommt Amalgam und besonders dem darin enthaltenem Quecksilber auch eine ökologische Bedeutung zu.

Eine Belastung der Umwelt findet durch natürlichen Quecksilberemissionen z.B. durch vulkanische Aktivitäten oder Verwitterung der Erdkruste statt. Je nach der chemischen Verbindung, in der das Quecksilber verfügbar ist, sammelt es sich in verschiedenen Ökosystemen an. In der Nahrungskette im Meer ist das Plankton die erste Stufe, auf der Quecksilberverbindungen aufgenommen und konzentriert werden. Berichten zufolge beträgt der biologische Konzentrationsfaktor von der Stufe der Alge bis zum Raubfisch (z.B. Hecht, Thunfisch und Hai) bis zu 1:100000 (Kaiser et al. 1980). Es ist dennoch nicht zu erwarten, dass sich natürliche Emissionen von Quecksilber nennenswert auswirken, aber es kann zu Einwirkungen auf das lokale Ökosystem kommen, wenn industriell hergestelltes Quecksilber unkontrolliert in die Umwelt freigesetzt wird. Die bisher schlimmste Umweltkatastrophe, eine von der Industrie verursachte Quecksilberverseuchung der Umwelt, ereignete sich durch die Einleitung quecksilberverseuchter Abwässer in die Bucht von Minamata in Japan im Zeitraum zwischen 1950 und 1960 (siehe Kapitel 1.1.4).

Aufgrund der Quecksilberakkumulation in Ökosystemen ist die Reduzierung von Quecksilberabfällen von immenser Bedeutung. Eine deutliche Abnahme der industriellen Quecksilberfreisetzung führte dazu, sich der Entsorgungsproblematik bei im Dentalbereich anfallendem Amalgam und Quecksilber zuzuwenden.

Insgesamt entfällt etwa 5% des Gesamt-Quecksilberverbrauchs auf seinen Einsatz in der Zahnmedizin (Kaiser et al. 1980). Beim Legen neuer Amalgamfüllungen werden die Überschüsse an tituriertem Amalgam und der größte Teil der beim Schneiden der Füllungen anfallenden Amalgamspäne entweder direkt oder durch Grobfiltrierung gesammelt (Amalgamabfälle). Kleinere Partikel, die beim

Legen neuer Füllungen oder beim Entfernen alter Füllungen anfallen, werden vom zentralen Absaugsystem erfasst. Wenn die zahnärztliche Praxis über einen wirksamen Amalgamabscheider verfügt, dann wird der Amalgamschlamm gesammelt und sollte sachgerecht als chemischer Sondermüll entsorgt und letztlich wiederaufbereitet werden, um das Metall zurückzugewinnen. Amalgamteilchen aus dem Absaugsystem können sich zum Teil in den Schläuchen und Ableitungsröhren festsetzen. Senkpiel et al. (1989) und andere haben die Löslichkeit von Amalgamresten im Abwasser gemessen, und bestimmten auch die Freisetzungsgeschwindigkeit von Quecksilber aus Amalgam. Es wurden etwa 0,004% des gesamten Quecksilbers freigesetzt. Das deutet darauf hin, dass die Löslichkeit der im Amalgam enthaltenen Metalle in Wasser gering ist. Eine Anzahl von Bakterien, besonders bestimmte Enterobacter-, Streptococcus- und Staphylokokkus-Spezies besitzen die Eigenschaft, eine Methylierung zu bewirken, und können aus anorganischen Quecksilberverbindungen hochtoxische Methylquecksilberverbindungen synthetisieren (Jensen et al. 1969). Methylquecksilberverbindungen verbinden sich im Abwasser mit organischen Substanzen und entrichten daher leichter der Sedimentierung als die erhärteten Amalgampartikel.

Extrahierte bzw. verlorene Zähne mit Amalgamfüllungen sowie Amalgamfüllungen bei Toten stellen eine nicht zu vernachlässigende Belastungsquelle der Umwelt dar. Bei der Feuerbestattung von Toten mit Amalgamfüllungen gelangt das Quecksilber in Dampfform an die Luft. Ein schwedischer Bericht kommt zu der Schätzung, dass schwedische Krematorien im Jahr 1986 etwa 200 kg Quecksilber als Dampf freisetzen. Das entspricht etwa 10% der geschätzten gesamten Freisetzung in die Luft im Berichtsjahr. Die Autoren stellten fest, dass nach den Prognosen zur Mundgesundheit und zum Anteil der Feuerbestattungen die Krematorien bald die Hauptursache der Quecksilberfreisetzung in die Atmosphäre in Schweden sein werden (Mörner et al. 1986).



## 5 Schlussfolgerungen

Die gewonnenen Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die zytotoxische Wirkung von Amalgam und seinen Bestandteilen. Alle drei Zell-Linien reagierten auf eine Belastung mit dem NaCl/Laktat-Extrakt des Amalgams mit einer deutlichen Wachstumsminde rung. Diese war am ausgeprägtesten bei den V-79 Zellen. Im Gegensatz zu den L-929 und 3T3 Zellen zeigten diese Zellen auch eine signifikante Einschränkung der Zellvitalität bei Exposition mit der NaCl/Laktat-SEL in einer Konzentration von 1:10 bei 378-tägiger Inkubation. Deutlich abweichend von diesem Ergebnis wiesen die anderen Zell-Linien keine Hemmung der Proliferation bei einer IZ von 378 Tagen auf.

Somit erscheinen gerade die V-79 Zellen besonders geeignet, um eine Belastung mit Gefahrstoffen, die Bestandteile von Amalgam enthalten, zu überprüfen. Der besonders sensiblen Reaktion der Lungenfibroblasten (V-79) auf Quecksilber bzw. Amalgambestandteile kommt eine besondere Bedeutung zu: unter den unterschiedlichen Formen, in denen Quecksilber auftreten kann, ist das Hauptaugenmerk in der Zahnmedizin auf Quecksilberdampf zu richten, da etwa 80% des inhalierten Quecksilberdampfes über das Lungengewebe in das Blut absorbiert werden (WHO, 1991). Eine Schädigung des sensibel reagierenden Lungengewebes durch weitere Bestandteile des Amalgams (z. B. Kupfer) ist darüber hinaus nach Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit wahrscheinlich.

## 6 Zusammenfassung

Vor dem Hintergrund der aktuellen Amalgamkontroverse wurde anhand organspezifischer Zell-Linien die Toxizität von Amalgam untersucht. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag dabei jedoch nicht auf einer Bewertung der Amalgambelastung oraler Gewebe oder der Anreicherung im Gesamtorganismus, sondern die Belastung des zahnärztlichen Personals und des Patienten durch Amalgam wurde in den Vordergrund gestellt. Dabei sind besonders die Haut als auch die Lunge Organe, die vornehmlich exponiert sind (z.B. durch das Einatmen von Quecksilberdämpfen oder durch direkten Hautkontakt).

Zytotoxizitätstests wurden an entsprechenden Zell-Linien (Fibroblasten der Haut bzw. der Lunge) durchgeführt. Dabei wurden unterschiedliche Amalgamextrakte auf Basis zweier standardisierter Speichelerersatzlösungen (Fusayama-SEL und NaCl/Laktat-SEL) hergestellt.

Das Versuchsprotokoll berücksichtigte bei der Extraktion der Amalgambestandteile sowohl die Korrosionsdauer als auch den pH-Wert der SEL auf die Zellvitalität. Die Inkubationszeit der Amalgamprüfkörper in den SEL betrug 2 resp. 378 Tage; der pH-Wert der Fusayama-SEL lag zwischen 5,0-5,25; der pH-Wert der NaCl/Laktat-SEL bei ca. 2,3.

Vor der Prüfung der Amalgamextrakte wurde untersucht, inwieweit bereits die zur Extraktion verwendeten SEL das Wachstumsverhalten der Zellen beeinflussen. Die Exposition der Zell-Linien erfolgte über 72 Stunden mit den beiden SEL in Verdünnungen von 1:10 – 1:80 nach einer Inkubationsdauer der SEL von 2 resp. 378 Tagen. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt, um einen möglichen Einfluß der SEL auf die Zellproliferation bewerten zu können.

Die Ergebnisse zeigen einen proliferationshemmenden Effekt der NaCl/Laktat-SEL in einer Verdünnung von 1:10 bei einer Inkubationsdauer von 2 Tagen auf alle Zell-Linien. Dieser Effekt war am ausgeprägtesten bei den V-79 Zellen.

Mit den Amalgam-Extrakten wurden dann in analoger Weise in Verdünnungen von 1:10 – 1:80 Toxizitätstests an den Zell-Linien durchgeführt. Untersucht wurde die Zellvitalität anhand der Zellzahl nach 72-stündiger Exposition.

Für die Extraktprüfung ergab sich ein dosisabhängiger toxischer Effekt nur für den NaCl/Laktat-Extrakt des Amalgams bei einer Inkubationsdauer von 378 Tagen. Die Toxizität dieses Extraktes zeigte sich an allen Zell-Linien, war aber auch hier am ausgeprägtesten bei den V-79 Zellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Toxizität von Amalgam und seinen Bestandteilen. Es zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit von den Korrosionsbedingungen, unter denen die Amalgamprüfkörper inkubiert wurden. Nur der Extrakt auf Basis der stark sauren NaCl/Laktat-SEL bei 378-tägiger Inkubation war zellschädigend. Eine Bestimmung der Konzentration an gelösten Metallionen in den Extrakten über einen Zeitraum 56 Tagen bestätigt diese Ergebnisse: nur in dem NaCl/Laktat-Extrakt des Amalgams stieg die Konzentration der Metallionen an. Neben Quecksilber ging Kupfer besonders stark in Lösung.

Unter den verwendeten Zell-Linien L-929, 3T3 und V-79 reagierten die V-79 Zellen am deutlichsten mit einer Wachstumsminde rung nach Exposition mit den Amalgamextrakten. Eine toxische Wirkung am Lungengewebe nach pulmonaler Aufnahme von Amalgam und seinen Bestandteilen ist folglich anzunehmen. Aus Amalgam löst sich Kupfer am ausgeprägtesten unter den gegebenen Korrosionsbedingungen. Der zytotoxische Effekt des NaCl/Laktat-Extraktes beruht somit wahrscheinlich auf den additiven Wirkungen von Quecksilber und Kupfer, wobei keine Aussage über den Anteil des jeweiligen Metalls an diesem Effekt getroffen werden kann.

## 7 Literaturverzeichnis

- Aldinger, F., Schuler, P., Pitt-Ford, T-R (1976)  
Reaktionsmechanismen beim Erhärten von Silber-Zinn-Amalgamen  
Zahnärztl. Mitt. **67**, 625-632
- Aronsson, A. M., Lind, B., Nylander, M., Nordberg, M. (1989)  
Dental amalgam and mercury  
Biol. Metals **2**, 25-30
- Baader, E. W. (1961)  
Quecksilbervergiftung, 158-176  
In: Baader, E.W.: Handbuch der gesamten Arbeitsmedizin  
Urban & Schwarzenberg, Berlin
- Berglund, A. (1993)  
An in vitro and in vivo study of the release of mercury vapor from different types  
of amalgam alloys  
J. Dent. Res. **72**, 939-946
- Berlin, M. (1986)  
Mercury, 387-445  
In: Friberg, L., Nordberg, G.F., Vouk, V.B.: Handbook on the Toxicology of met-  
als  
Elsevier Amsterdam
- BGA (1992a)  
Amalgame in der zahnärztlichen Therapie. bga-Informationsschrift, bga-Berlin  
Zahnärztl. Mitt. **82**, 70-75
- BGA (1992b)  
Amalgame - Nebenwirkungen und Bewertung der Toxizität  
Zahnärztl. Mitt. **19**, 36-41
- Bird, D. J. (1972)  
The amalgam war: an historical review  
N. Y. State. Dent. J. **38**, 5-8
- Brune, D. (1986)  
Metal release from dental biomaterials  
Biomaterials 1163-1175

Bumgardner, J. D., Johansson, B. I. (1996)  
Galvanic corrosion and cytotoxic effects of amalgam and gallium alloys coupled to titanium  
Eur. J. Oral. Sci. **104**, 300-308

Bumgardner, J. D., Lucas, L. C., Alverson, M. W., Tilden, A. B. (1993)  
Effects of copper-based dental casting alloys on two lymphocyte cell lines and the secretion of interleukin 2 and IgG  
Dent. Mater. **9**, 85-90

Chandler, J. E., Messer, H. H., Ellender, G. (1994)  
Cytotoxicity of gallium and indium ions compared with mercuric ion  
J. Dent. Res. **73**, 1554-1559

Dauderer, M. (1990)  
Amalgam, 1-128  
In: Dauderer, M.: Handbuch der Umweltgifte  
Ecomed Verlag, Landsberg

Eichner, K., Viohl, J. (1971)  
Klinische und werkstoffkundliche Untersuchungen von Füllungsmaterialien (Einführung)  
Dtsch. Zahnärztl. Z. **26**, 610-619

Eife, R., Weiss, M., Barros, V., Sigmund, B., Goriup, U., Komb, D., Wolf, W., Kittel, J., Schramel, P., Reiter, K. (1999)  
Chronic poisoning by copper in tap water: I. Copper intoxications with predominantly gastrointestinal symptoms  
Eur. J. Med. Res. **4**, 219-223

Eley, B. M. (1997)  
The future of dental amalgam: a review of the literature. Part 5: Mercury in the urine, blood and body organs from amalgam fillings  
Br. Dent. J. **182**, 413-417

Ewers, U. (1990)  
Toxikologische Beurteilung der Schwermetallaufnahme  
Öffentl. Gesundheitswesen **52**, 380-386

Fredin, B. (1987)  
The distribution of mercury in various tissues of guinea-pigs after application of dental amalgam fillings (a pilot study)  
Sci. Total. Environ. **66**, 263-268

- Fritz, U., Zellmann, M. (1991)  
Quecksilberabgabe aus Amalgamprüfkörpern  
Dtsch. Zahnärztl. Z. **46**, 553-554
- Fusayama, T., Katayori, T., Nomoto, S. (1963)  
Corrosion of gold and amalgam placed in contact with each other  
J. Dent. Res. 1183-1197
- Geis-Gerstorfer, J., Sauer, K. H., Weber, H. (1986)  
In-vitro-Korrosions-Untersuchungen zum Massenverlust von Nichtedelmetall-  
gierungen  
Dtsch. Zahnärztl. Z. 519-524
- Geis-Gerstorfer, J., Weber, H. (1987)  
In vitro corrosion behaviour of four Ni-Cr dental alloys in lactic acid and sodium  
chloride solutions  
Dent. Mater. **3**, 289-295
- Geurtsen, W., Lehmann, F., Spahl, W., Leyhausen, G. (5-9-1998)  
Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3  
and three human primary fibroblast cultures  
J. Biomed. Mater. Res. **41**, 474-480
- Hahn, L. J., Kloiber, R., Vimy, M. J., Takahashi, Y., Lorscheider, F. L. (1989)  
Dental "silver" tooth fillings: a source of mercury exposure revealed by whole-  
body image scan and tissue analysis  
FASEB J. **3**, 2641-2646
- Halbach, S. (1994)  
Amalgam tooth fillings and man's mercury burden  
Hum. Exp. Toxicol. **13**, 496-501
- Halbach, S. (1995)  
Estimation of mercury dose by a novel quantitation of elemental and inorganic  
species released from amalgam  
Int. Arch. Occup. Environ. Health. **67**, 295-300
- Halbach, S., Hickel, R., Meiners, H., Ott, K., Reichel, F. X., Schiele, R.,  
Schmalz, G, Staehle, H. J. (1999)  
Amalgam im Spiegel kritischer Auseinandersetzungen. Interdisziplinäre Stel-  
lungnahme zum "Kieler Amalgam-Gutachten"  
Institut Der Deutschen Zahnärzte

Halbach, S., Hickel, R., Meiners, H., Ott, K., Reichel, F. X., Schiele, R., Schmalz, G., Staehle, H. J. (2001)

Entgegnungen der Autoren des Materialbandes "Amalgam im Spiegel kritischer Auseinandersetzungen"

Institut Der Deutschen Zahnärzte

Hörsted-Bindslev (1993)

Schlussfolgerungen, 79-79

In: Hörsted-Bindslev, P., Magos, L., Holmstrup, P., Arentholt-Bindslev, D.: Amalgam-eine Gefahr für die Gesundheit?

Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, Köln

Hursh, J. B., Clarkson, T. W., Miles, E. F., Goldsmith, L. A. (1989)

Percutaneous absorption of mercury vapor by man

Arch. Environ. Health. **44**, 120-127

International Organisation for Standardization (1993)

ISO 1562: Dental casting alloys. Geneva

International Organisation for Standardization (1996)

ISO/CD10271: Dental metallic materials-corrosion test methods. Geneva

Jensen, S., Jernelöv, A. (1969)

Biological methylation of mercury in aquatic organisms.

Nature 753-754

Kaga, M., Seale, N. S., Hanawa, T., Ferracane, J. L., Okabe, T. (1988)

Cytotoxicity of amalgams

J. Dent. Res. **67**, 1221-1224

Kaga, M., Seale, N. S., Hanawa, T., Ferracane, J. L., Waite, D. E., Okabe, T. (1991)

Cytotoxicity of amalgams, alloys, and their elements and phases

Dent. Mater. **7**, 68-72

Kaiser, G., Tölg, G. (1980)

Mercury, 134-136

In: Hutzinger, O.: The Handbook of Environmental Chemistry

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg

Kawahara, H., Nakamura, M., Yamagami, A., Nakanishi, T. (1975)

Cellular responses to dental amalgam in vitro

J. Dent. Res. **54**, 394-401

- Kawahara, H., Yamagami, A., Nakamura, M. (1968)  
Biological testing of dental materials by means of tissue culture  
*Int. Dent. J.* **18**, 443-467
- Khayat, A., Dencker, L. (15-9-1983)  
Interactions between selenium and mercury in mice: marked retention in the lung after inhalation of metallic mercury  
*Chem. Biol. Interact.* **46**, 283-298
- Klötzer, W. T. (1985)  
Biologische Aspekte der Korrosion  
*Dtsch. Zahnärztl. Z.* 1141-1145
- Kropp, R. (1986)  
Die Non-gamma-2-Amalgame der ersten und der zweiten Generation  
*J. Restaur. Zahnmed.* **3**, 114-120
- Langworth, S., Elinder, C.G., Gothe, C. J., Vesterberg, O. (1991)  
Biological monitoring of environmental and occupational exposure to mercury  
*Int. Arch. Occup. Environ. Health* **63**, 161-167
- Lappalainen, R., Yli-Urpo, A. (1987)  
Release of elements from some gold alloys and amalgams in corrosion  
*Scand. J. Dent. Res.* **95**, 364-368
- Leirskar, J. (1974)  
On the mechanism of cytotoxicity of silver and copper amalgams in a cell culture system  
*Scand. J. Dent. Res.* **82**, 74-81
- MAK (1980)  
Quecksilber, 1-13  
In: Henschler, D.: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten (Maximale Arbeitsplatzkonzentration)  
5. Aufl. VCH-Verlag, Weinheim
- Marshall, S. J., Lin, J. H., Marshall, G. W. (1982)  
Cu<sub>2</sub>O and CuCl<sub>2</sub>. 3 Cu(OH)<sub>2</sub> corrosion products on copper rich dental amalgams  
*J. Biomed. Mater. Res.* **16**, 81-85
- Marshall, S. J., Marshall, G. W. (1980)  
Sn<sub>4</sub>(OH)<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub> and SnO corrosion products of amalgams  
*J. Dent. Res.* **59**, 820-823



- Meryon, S. D. (1984)  
The effect of zinc on the biocompatibility of dental amalgams in vitro  
*Biomaterials* **5**, 293-297
- Milleding, P., Wennberg, A., Hasselgren, G. (1985)  
Cytotoxicity of corroded and non-corroded dental silver amalgams  
*Scand. J. Dent. Res.* **93**, 76-83
- Molin, M. (1990)  
Mercury release from dental amalgam in man. Influences on selenium, glutathione peroxidase and some other blood and urine components  
*Swed. Dent. J. Suppl.* **711**, 122
- Mörner, S., Nielson, T. (1986)  
Kviksilverutsläpp från Göteborgs krematorier  
Rapport Göteborgs Kommun
- Nakajima, H., Wataha, J. C., Rockwell, L. C., Okabe, T. (1997)  
In vitro cytotoxicity of amalgams made with binary Hg-In liquid alloys  
*Dent. Mater.* **13**, 168-173
- Nakamura, M., Kawahara, H. (1979)  
Cellular responses to the dispersion amalgams in vitro  
*J. Dent. Res.* **58**, 1780-1790
- Nelson, S. K., Wataha, J. C., Neme, A. M., Cibirka, R. M., Lockwood, P. E. (1999)  
Cytotoxicity of dental casting alloys pretreated with biologic solutions  
*J. Prosthet. Dent.* **81**, 591-596
- Nylander, M., Friberg, L., Eggleston, D., Bjorkman, L. (1989)  
Mercury accumulation in tissues from dental staff and controls in relation to exposure  
*Swed. Dent. J.* **13**, 235-243
- Nylander, M., Friberg, L., Lind, B. (1987)  
Mercury concentrations in the human brain and kidneys in relation to exposure from dental amalgam fillings  
*Swed. Dent. J.* **11**, 179-187
- Nylander, M., Weiner, J. (1991)  
Mercury and selenium concentrations and their interrelations in organs from dental staff and the general population  
*Br. J. Ind. Med.* **48**, 729-734

- Olstadt, M. L., Holland, R. I., Wandel, N., Hensten-Pettersen, A. (1987)  
Correlation between amalgam restorations and mercury concentrations in urine  
*J. Dent. Res.* **6**, 1607-1609
- Osorio, R. M., Hefti, A., Vertucci, F. J., Shawley, A. L. (1998)  
Cytotoxicity of endodontic materials  
*J. Endod.* **24**, 91-96
- Pfeiffer, P., Schwickerath, H. (1991)  
Nickelabgabe von Dentallegierungen in Abhängigkeit vom pH-Wert der Korrosionslösung  
*Dtsch. Zahnärztl. Z.* **46**, 753-756
- Richards, J.M., Warren, P.J. (1985)  
Mercury vapour released during the removal of old amalgam restorations  
*Br. Dent. J.* **159**, 231-232
- Saekel, R. (1997)  
Paradigmenwechsel in der zahnmedizinischen Versorgung  
*Gesundheitswesen* **59**, 150-158
- Schiele, R. (1991)  
Die Amalgamfüllung - Verträglichkeit  
*Dtsch. Zahnärztl. Z.* **46**, 515-518
- Schmalz, G., Langer, H., Schweikl, H. (1998)  
Cytotoxicity of dental alloy extracts and corresponding metal salt solutions  
*J. Dent. Res.* **77**, 1772-1778
- Senkpiel, K., Pasch, J., Ohgke, H., Beckert, J. (1989)  
Zur ionogenen Freisetzung von Quecksilber aus Dentalamalgam im Abwasser und Klärschlamm  
*Zentralbl. Hyg. Umweltmed.* **188**, 254-261
- Spitalny, K. C., Brondum, J., Vogt, R. L., Sargent, H. E., Kappel, S. (1984)  
Drinking-water-induced copper intoxication in a Vermont family  
*Pediatrics* **74**, 1103-1106
- Tsutsumi, S., Nakamura, M., Ferracane, J. L., Schiller, T. L., Hanawa, T., Okabe, T. (1988)  
Thermal analysis of amalgams  
*Dent. Mater.* **4**, 307-311

- Vimy, M. J., Takahashi, Y., Lorscheider, F. L. (1990)  
Maternal-fetal distribution of mercury (203Hg) released from dental amalgam fillings  
Am. J. Physiol. **258**, 939-945
- Visser, Heiko (1993)  
Hg- Exposition durch Amalgamfüllungen, 91-92  
In: Visser, H.:Quecksilberexposition durch Amalgamfüllungen  
Hütig Buch Verlag GmbH, Heidelberg
- Wassermann, O., Weitz, M., Alsen-Hinrichs, C. (1997)  
Kieler Amalgam-Gutachten 1997  
Internationale Gesellschaft für Ganzheitliche Zahnmedizin
- Wassermann, O., Weitz, M., Alsen-Hinrichs, C. (2000)  
Replik zum IDZ Band "Amalgam im Spiegel kritischer Auseinandersetzungen"  
Internationale Gesellschaft für Ganzheitliche Zahnmedizin
- Wataha, J. C., Lockwood, P. E., Nelson, S. K., Bouillaguet, S. (1999)  
Long-term cytotoxicity of dental casting alloys  
Int. J. Prosthodont. **12**, 242-248
- Wataha, J. C., Nelson, S. K., Lockwood, P. E. (2001)  
Elemental release from dental casting alloys into biological media with and without protein  
Dent. Mater. **17**, 409-414
- Wennberg, A., Hasselgren, G., Tronstad, L. (1979)  
A method for toxicity screening of biomaterials using cells cultured on millipore filters  
J. Biomed. Mater. Res. **13**, 109-120
- WHO (Hrsg.) (1991)  
Inorganic Mercury. Environmental Health Criteria 118, World Health Organisation Geneva
- Willershausen-Zönnchen, B., Zimmermann, M., Defregger, A., Schramel, P., Hamm, G. (1992)  
Quecksilberkonzentration der Mundschleimhaut bei Patienten mit Amalgamfüllungen  
Dtsch. Med. Wochenschr. **117**, 1743-1747

- Wirz, J., Jager, K., Schmidli, F. (1987a)  
Klinische Korrosion. Spaltwirkung auf eine nicht kompatible NEM-Kronenlegierung  
Schweiz. Monatsschr. Zahnmed. **97**, 1151-1158
- Wirz, J., Schmidli, F., Steinemann, S., Wall, R. (1987b)  
Aufbrennlegierungen im Spaltkorrosionstest  
Schweiz. Monatsschr. Zahnmed. **97**, 571-590
- Zander, D., Ewers, U., Freier, I., Brockhaus, A. (1992)  
Untersuchungen zur Quecksilberbelastung der Bevölkerung. IV. Quecksilberbelastung von Zahnärzten, Zahnärztinnen und Zahnarzhelferinnen  
Zentralbl. Hyg. Umweltmed. **193**, 318-328
- Zhu, Q., Safavi, K. E., Spangberg, L. S. (1999)  
Cytotoxic evaluation of root-end filling materials in cultures of human osteoblast-like cells and periodontal ligament cells  
J. Endod. **25**, 410-412

## 8 Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name: Stephan Haarmann  
Geburtsdatum: 02.01.1975  
Geburtsort: Gronau

### Schulbildung

1981-1985: Walburgisgrundschule in Werl  
1985-1994: Mariengymnasium in Werl

### Zivildienst

1994-1995: Marienkrankenhaus in Wickede-Wimbern

### Studium

1995-2001: Zahnmedizinstudium an der  
Eberhard-Karls-Universität Tübingen (Staatsexamen)  
seit 1997: Medizinstudium an der  
Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
März 1998: Physikum  
März 1999: Erstes Staatsexamen  
März 2002: Zweites Staatsexamen  
15.05.2003: Drittes Staatsexamen