

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

**Untersuchungen zur Zytotoxizität
von dentalen Füllungsmaterialien
am Beispiel von Amalgam und Gallium-alloy**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Sebastian Steffen Ungerer
aus
Sindelfingen
2004**

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Professor Dr. C. D. Claussen

Professor Dr. P. C. Dartsch

Professor Dr. J. Geis-Gerstorfer

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. P.C. Dartsch möchte ich mich herzlich dafür bedanken, dass er mir das interessante Thema überlassen hat, für die immer offene Tür bei Fragen und Schwierigkeiten, für die konstruktive Kritik, die lehrreichen Anregungen und die kostbare Zeit die er mir gewidmet hat.

Herrn Prof. Dr. F.W. Schmahl danke ich für die Durchführung der vorliegenden Dissertation am Institut für Arbeits- und Sozialmedizin der Universität Tübingen.

Frau Heilig und Frau Rittgarn möchte ich für die sehr gute Einarbeitung und die netten Gespräche bei der Anfertigung dieser Arbeit danken.

Meinen Eltern möchte ich für ihr intensives Interesse und ihre Aufmunterung für den Fortgang der Arbeit danken.

Und bei Kristina Rückert möchte ich mich ganz besonders für ihre pragmatische Unterstützung, ihre Geduld, und ihre humorvolle Motivation bedanken.

Inhaltsverzeichnis

A Einleitung	1
1 Amalgam in der Zahnheilkunde	1
1.1 Geschichte des Amalgams	1
1.2 Toxizität von Amalgam	2
1.3 Vorteile und Nachteile des Amalgams	5
2 Gallium-alloy in der Zahnheilkunde	6
2.1 Geschichte des Gallium-alloy	6
2.2 Toxizität von Gallium-alloy	7
2.3 Physikalische Eigenschaften des Gallium-alloy	9
3 Aufgabenstellung dieser Arbeit	10
B Material und Methoden	12
1 Probekörper und Extraktherstellung	12
1.1 Herstellung der Amalgam Probekörper	12
1.2 Herstellung der Gallium-alloy Probekörper	13
1.3 Extraktherstellung	13
1.4 Speichelersatzlösungen	14
1.5 Sterilfiltration	15
2 Zellmaterial und Routinekultivierung	15
2.1 Zellmaterial	15
2.2 Kulturmedien und Kulturbedingungen	15
2.3 Routinekultivierung	16
3 Zellbiologische Testassays	16
3.1 Bestimmung der Zellvitalität	16
3.2 Berechnung der zellulären Wachstumsrate	17

4 Lichtmikroskopie	18
5 Statistische Auswertung	18
C Ergebnisse	19
1 Legierungen und Probekörper	19
1.1 Handhabung und Verarbeitung	19
1.2 Makroskopische Veränderungen der Probekörper durch künstlichen Speichel	20
2 Wachstum und Morphologie der Zelllinien	22
3 Beeinflussung des basalen Zellwachstums durch exogene Faktoren	24
3.1 Unbehandelte Kontrollkulturen	24
3.2 Inkubationsperiode und Speichellersatzlösung	26
4 Wirkung der Amalgamextrakte auf die Zellvitalität	29
5 Wirkung der Gallium-alloy Extrakte auf die Zellvitalität	34
6 Konzentration der solubilisierten Metallionen in den Extrakten	39
7 Korrelation von Zellvitalität und Metallionen- konzentration	42
8 Zusammenfassung der Ergebnisse	47
D Diskussion	49
1 Zellkulturen in der Toxikologie	49
2 Vor- und Nachteile der hier vorliegenden Untersuchung	51
3 Toxizität von Amalgam	53

4 Toxizität von Gallium-alloy	57
5 Schlussfolgerung	60
E Zusammenfassung	61
F Literaturverzeichnis	63

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
CaCl ₂	Calciumchlorid
CO ₂	Kohlendioxid
Cu ₆ Sn	Kupfer-Zinn-Verbindung
DIN	Deutsches Institut für Normung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Ethylendiamintetraacetic-Acid)
FCS	Fötales Kälberserum
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'- ethansulfonsäure
Hg	Quecksilber
H ₂ O	Wasser
ISO	Internationale Standardisierungs- organisation
KCl	Kaliumchlorid
MEM	Modifikation von Eagle Medium
MTT	3-(4,5-dimethylthiazole-2yl) 2,5-diphenyl- tetrazolium bromide
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
NEAA	Nicht essentielle Aminosäuren (Non-Essential-Amino-Acid)
PBS	phosphatgepufferte Saline
PD	Populationsverdopplungen
PD/Tag	Populationsverdopplungen pro Tag

S.D.	Standardabweichung
SEL	Speichelersatzlösung
S.E.M.	Standardfehler des Mittelwertes
Sn ₆ Hg	Zinn-Quecksilber-Verbindung
Tab.	Tabelle
WHO	Weltgesundheitsorganisation

A Einleitung

1 Amalgam in der Zahnheilkunde

1.1 Geschichte des Amalgams

Amalgam wird in der Zahnheilkunde als Füllungsmaterial eingesetzt. Es wird verwendet um durch Karies verlorengegangene Anteile der Zahnhartsubstanz zu ersetzen. Amalgam ist das erste Füllungsmaterial in der Zahnheilkunde, das den Anforderungen, die an ein im Mundraum zum Einsatz kommenden Material, wie Kau-, Formstabilität, Modellierbarkeit, gute Verarbeitbarkeit, gerecht wurde. Die Biokompatibilität des Amalgams wurde lange Jahre nicht oder nur wenig beachtet.

Das erste Amalgam wurde bereits im Jahr 1819 entwickelt. Es setzte sich aus einer Metallspannung, mit mindestens 65 % Silber, mindestens 25 % Zinn, maximal 6 % Kupfer und maximal 2 % Zink, die mit reinem Quecksilber vermischt wurde, zusammen (Ziff et al., 1990). Die Zusammensetzung und die Verarbeitung von Amalgam haben sich bis heute nicht wesentlich geändert.

In den 1980er Jahren begann man damit eine Reihe von Krankheitsbildern mit vorhandene Amalgamfüllungen in Verbindung zu bringen. Zu nennen wären hierzu Gaumenbluten, metallischer Geschmack, erhöhter Speichelfluss, Gesichtslähmungen, Depressionen, und Sehstörungen. Auch die Öffentlichkeit begann in den 1980er Jahren ein starkes Interesse an dieser Problematik zu entwickeln. Die Krankheitsbilder führte man vor allem auf die korrosionsbedingte Freisetzung von Sn_6Hg (Ziff et al., 1990), also auf die vermehrte Freisetzung von Quecksilber zurück. Dieser Sachverhalt führte zur Entwicklung der heute hauptsächlich verwendeten non-gamma-2 Amalgame. Bei den non-gamma-2 Amalgamen wurde die unedelste Phase, die gamma-2 Phase, die am stärksten von chemischer und elektrochemischer Korrosion betroffen war, durch die

eta-Phase ersetzt. Die gamma-2 Phase, bestehend aus Sn_6Hg , wird durch Korrosion zersetzt und Zinn und Quecksilber freigesetzt. Bei den non-gamma-2 Amalgamen ist die nun unedelste Phase die eta-Phase, die aus Cu_6Sn besteht, was somit zur Freisetzung von Kupfer und Zinn führen soll (Geurtsen, 1990).

1.2 Toxizität von Amalgam

Aber auch die Freisetzung von Kupfer und Zinn birgt bei den non-gamma-2 Amalgamen ein toxisches Potential in sich. Um die möglichen schädlichen Effekte, die von einem toxischen Potential der Amalgamfüllungen ausgehen, zu klassifizieren, werden sie in zwei Kategorien eingeteilt. Zum Einen die Toxizität, die direkt von Quecksilber im Füllungs-material Amalgam ausgeht, zum anderen die lokalen und systemischen Nebenwirkungen, die mit einer Amalgamfüllung einhergehen können, wie zum Beispiel orale lichenoiden Reaktionen, Allergisierung auf Amalgam oder seine Bestandteile, sowie andere lokale Gewebsreaktionen, wie die Amalgamtätowierung der Mundschleimhaut.

Für die Toxizität, die direkt vom Quecksilber in der Amalgamfüllung ausgeht, sind allerdings nur das elementare Quecksilber und seine anorganischen Salze relevant. Quecksilber und seine anorganischen Salze können gelöst im Speichel im Magen-Darm-Trakt resorbiert werden. Als Reaktion auf die systemische Toxizität ist das unspezifische vegetativ-asthenische Syndrom zu nennen, das auch unter der Bezeichnung Mikromerkuralismus bekannt ist. Die wichtigsten Symptome bei diesem Krankheitsbild sind Schwächeanfälle, rasche Ermüdbarkeit, Appetitmangel, Nervosität und gastrointestinale Störungen. Bei ausgeprägtem Mikromerkuralismus tritt auch ein Intentionstremor der Finger, Lippen und Augenlider auf (Geurtsen, 1990).

Da das Quecksilber für eine mögliche Toxizität des Amalgams verantwortlich zu sein schien, wurde seine Aufnahme in den Körper, sowie seine Anreicherung in den Organen im Zusammenhang mit Amalgamfüllungen genau dokumentiert. So wurde festgestellt, dass anorganisches Quecksilber aus den Amalgamfüllungen in den Körper; zum einen in Form von Ionen, zum anderen in Form von Quecksilberdampf aufgenommen wird. Die enterale Resorption von ionisiertem Quecksilber erreicht 15 %, die Aufnahme von Quecksilberdampf über die Lunge erreicht bei Mundatmung ca. 80 %. Quecksilber wird im Gesamtorganismus in Blut und Urin nachgewiesen. Der mittlere Blutspiegel liegt zwischen 0,3 µg/Liter und 0,7 µg/Liter. Bei der Quecksilberausscheidung im Urin liegt der mittlere Wert zwischen 1,2 µg/Liter und 9 µg/Liter. Die Quecksilberkonzentration in Blut und in Urin steigt abhängig von der Füllungsfläche an.

Die von der WHO 1988 festgelegten Schwellenwerte für die Quecksilberkonzentration in Blut und Urin betragen im Blut maximal 20 µg/Liter und im Urin maximal 50 µg/Liter (Deutsche Gesellschaft für Toxikologie und Pharmakologie, 1990). Um zu beweisen, dass es zu einer Anreicherung von Quecksilber aus Amalgamfüllungen in den Organen Niere und Hirn kommen kann, wurde neben der Quecksilberkonzentration in Blut und Urin auch der Quecksilbergehalt von Niere und Hirn bestimmt und zwischen Amalgamträgern und amalgamfreien Probanden verglichen. Es wurde eine Untersuchung der Quecksilberkonzentration in der grauen und weißen Hirnsubstanz bei Verstorbenen durchgeführt. Dabei wurde die Konzentrationen von Quecksilber in der grauen und weißen Hirnsubstanz bei Amalgamträgern und Nicht-Amalgamträgern analysiert und die Konzentrationen miteinander verglichen. Hierbei ergab sich ein statistisch signifikant positiver Zusammenhang zwischen der Zahl der okklusalen Amalgamflächen und dem Quecksilbergehalt im Hirn. In der

weißen Hirnsubstanz war die Quecksilberkonzentration bei Amalgamträgern dreifach höher, in der grauen Hirnsubstanz zweieinhalbfach höher als bei den Nicht-Amalgamträgern (Egglestone und Nylander, 1987). Bei einer Untersuchung der Nierenrinde wurde festgestellt, dass die Quecksilberkonzentration in der Nierenrinde von Amalgamträgern im Durchschnitt neunfach höher ist als bei Nicht-Amalgamträgern. Bei beiden Studien wurde vorwiegend anorganisches Quecksilber in den Organen entdeckt, was den Zusammenhang mit den Amalgamfüllungen unterstreicht, da aus der Nahrung hauptsächlich Methylquecksilber aufgenommen wird (Nylander et al., 1987).

Doch auch lokale Nebenwirkungen von Amalgamfüllungen sind bereits klinisch mehrfach dokumentiert worden. Shiloah et al. (1988) stellten fest, dass in der Mundschleimhaut eingelagertes Amalgam zu chronischen Entzündungsreaktionen führt. Dabei wird das eingelagerte Amalgam durch körpereigene Enzyme in seine Bestandteile zerlegt, Quecksilber und Zinn werden über die Blutbahn abtransportiert, und Silber bleibt korrodiert zurück, oder wird von multinukleären Riesenzellen phagozytiert. Oft werden an ein dadurch bereits vorhandenes Depot von Silberpartikeln noch weitere Silberpartikel angelagert, und das betroffene Pigment wächst noch weiter an.

Dies führt zu den sogenannten Amalgampigmentierungen oder auch Amalgamtätowierungen. Lind et al. (1986) untersuchten 52 Patienten, bei denen ein Lichen ruber planus in enger räumlicher Beziehung zu einer Amalgamfüllung stand. Bei 18 Patienten wurde die entsprechende Amalgamfüllung entfernt und durch andere Materialien ersetzt. Bei 16 der 18 Patienten beobachteten sie eine vollständige Remission der Läsionen innerhalb von 1 bis 12 Monaten. Als systemische Nebenwirkung von Amalgam ist die Allergie gegen Quecksilber und andere Amalgambestandteile

zu nennen. Bei einer Allergie gegen Quecksilber handelt es sich meist um eine Allergie der verzögerten Reaktion, zu klassifizieren als eine Allergie vom Typ IV nach Coombs und Gell (Klaschka und Matzick, 1988). Die Verifizierung einer Quecksilberallergie erfolgt mittels Epi-kutantest. Die klinische Symptomatik einer Allergie gegen Quecksilber ist durch Dermatiden, Ekzemschübe, urtikarielle Reaktionen, und seltener durch periorale entzündliche ekzematöse Erscheinungen, Stomatiden und Gastroenteriden gekennzeichnet. Meist treten diese Krankheitsbilder in klarem zeitlichen Zusammenhang mit dem Legen oder dem Entfernen einer Amalgamfüllung auf. In den allermeisten Fällen verschwinden sowohl die meist zeitlich früher auftretenden Hautreaktionen als auch die später in Erscheinung tretenden Schleimhautreaktionen innerhalb von 2 bis 3 Wochen, ohne dass die korrespondierende Amalgamfüllung entfernt wurde (Geurtsen, 1990).

1.3 Vorteile und Nachteile des Amalgams

Der maßgebliche Faktor für die Freisetzung von Quecksilber und anderer Amalgambestandteile ist die Korrosion der Füllung. Die Korrosion der Amalgame wird durch mehrere Faktoren beeinflusst. Der pH-Wert der Mundhöhle, bzw. des Speichels spielt dabei eine wichtige Rolle, zudem sind die Mundpflegegewohnheiten des Amalgamträgers von Bedeutung. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die elektrochemische Korrosion, die dann auftritt, wenn in direktem Kontakt zu Amalgamrestorationen Versorgungen aus edlerem Material, wie z. B. Goldkronen, vorhanden sind. Dann korrodiert das unedlere Material, in diesem Falle das Amalgam, es kommt zur Entstehung eines galvanischen Elements, wobei der Speichel als Transmitter fungiert.

Des weiteren hängt die Korrosionsanfälligkeit des Amalgams auch von der vorschriftsmäßigen Verarbeitung durch den Zahnarzt ab. Die Richt-

linien zur Amalgamverarbeitung sind genau einzuhalten. Amalgamfüllungen sollten nie im direkten Kontakt zu edleren Metallen verwendet werden, um eine elektrochemisch begünstigte Korrosion durch ein galvanisches Element zu verhindern (Geurtsen, 1990).

Für die Zahnärzte und auch für die Patienten besitzen die Amalgame aber auch Vorteile. Amalgame sind schnell und einfach zu verarbeiten, sie sind feuchtigkeitstolerant und können präzise in eine Kavität eingebracht werden. Die Feuchtigkeitstoleranz ist bei Patienten von Vorteil, bei denen keine absolute Trockenlegung des Arbeitsfeldes möglich ist, etwa bei Patienten mit Hypersalvie, oder bei Patienten mit Behinderung. Amalgame haben eine längere Haltbarkeit als die häufig verwendeten Komposite, was an ihrer bakterio-statischen Wirkung liegt. Dabei handelt es sich um eine Medikamentfunktion der Amalgame auf die Kariesbakterien durch Freisetzung von entsprechend wirkenden Substanzen, beispielsweise Zink oder Quecksilber. Ein weiterer Vorteil für den Patienten ist ökonomischer Natur. Da die Krankenkassen die kompletten Kosten für Amalgamrestaurationen übernehmen, muss der Patient keine Zuzahlung leisten.

2 Gallium-alloy in der Zahnheilkunde

2.1 Geschichte des Gallium-alloy

Um einer möglichen Toxizität durch das Quecksilber aus den Amalgamrestaurationen zu begegnen, wurde bereits in den zwanziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts nach alternativen Lösungen gesucht. Gallium-alloy als Ersatzmaterial für quecksilberhaltige Amalgame wurden das erste Mal 1928 von Puttkammer vorgeschlagen (Puttkammer, 1928). Smith und Caul entdeckten 1956 eine galliumhaltige Legierung, die den Anforderung, die in der Zahnmedizin an einen Werkstoff gestellt werden, wie beispielsweise die Verarbeitbarkeit und die physikalischen Eigen-

schaften, gerecht wurde. Somit produzierten sie das erste Gallium-alloy für zahnmedizinische Zwecke (Smith und Caul, 1956).

In der heutigen Zusammensetzung besteht die flüssige Komponente des Gallium-alloy aus Gallium, Indium und Zinn, die feste Komponente besteht aus Silber, Palladium, Zinn, Kupfer und Zink. Die flüssige und die feste Komponente werden zur Herstellung der Legierung miteinander vermischt (Horibe et al., 1986; Okamoto und Horibe, 1991). In Japan wurde von der Firma Tokuriki Honten ein Gallium-alloy entwickelt und auf den Markt gebracht, die Metallspannung entspricht dabei im wesentlichen der von hoch kupferhaltigen Amalgamen bis auf den Zusatz von 9 % Palladium. Gallium besitzt einen Schmelzpunkt von 29,8 °C (Weast, 1985); um diesen Schmelzpunkt auf unter 10 °C zu reduzieren beinhaltet der flüssige Anteil des Gallium-alloys 19 % Indium und 16 % Zinn. Seit der Einführung der auf Gallium basierenden Legierungen wurde wiederholt ihre Biokompatibilität fokussiert betrachtet und diskutiert (Waterstrat und Longton, 1964; Waterstrat, 1969). Des weiteren wurden Untersuchungen hinsichtlich ihrer physikalischen Eigenschaften, wie Korrosionsbeständigkeit, Druckstabilität, und Verarbeitbarkeit durchgeführt (Kim et al., 1988; Yamashita et al., 1989; Den et al., 1991; Navarro et al., 1993; Sakai et al., 1993; Eley et al., 1997).

2.2 Toxizität von Gallium-alloy

Reines Gallium ist relativ ungiftig und in der Onkologie schon seit längerem bekannt, da Galliumionen den Zellmetabolismus unterbrechen (Aoki et al., 1990; Wataha et al., 1991). Dieser Effekt wird für Medikamente, die Gallium als Wirkstoff besitzen, zur Bekämpfung von Krebs genutzt. Diese Medikamente wirken allerdings deutlich toxisch auf den Gesamtorganismus und hier vor allem auf die Nieren (Foster et., 1986). In akuten und subakuten Toxizitätstests wurde Gallium-alloy eine gute

Bioverträglichkeit nachgewiesen (Masuhara et al., 1987a; Masuhara et al., 1987b; Yoshida et al., 1988). Auch für die Mutagenität von Gallium-alloy bestanden keine Anhaltspunkte (Kaminishi et al., 1990). Lyon et al. (1966) untersuchten die Gewebsreaktionen, die sich bei einer sechsmonatigen subkutanen Implantation von Gallium-alloy und Amalgam Probekörpern bei Laborratten entwickelten. Für die Gallium-alloy Probekörper wurde eine schwere Fremdkörperreaktion des umliegenden Gewebes, auch Fibrosis genannt, festgestellt. Für die Amalgam Probekörper konnte nur eine minimale Weichgewebsreaktion nachgewiesen werden.

Auch Kaga et al. (1992) untersuchten die Biokompatibilität der Restaurationmaterialien Amalgam und Gallium-alloy und verglichen die beiden Materialien hinsichtlich ihrer Toxizität miteinander. Es wurden sowohl zinkhaltige, als auch zinkfreie Amalgame und Gallium-alloy an menschlichen Gingivafibroblasten über einen Inkubationszeitraum von 24 Stunden mittels Filtertest untersucht. Dabei kamen sie zu dem Ergebnis, dass von Gallium-alloy nur eine geringfügige Toxizität ausgeht, vergleichbar mit der Toxizität, die von zinkfreiem Amalgam ausgeht.

Zinkhaltiges Amalgam zeigte eine wesentlich stärkere toxische Wirkung auf die Gingivafibroblasten als zinkfreies Amalgam oder Gallium-alloy. Um festzustellen von welcher Substanz in den Füllungsmaterialien die Toxizität ausgeht führten Kaga et al. (1992) zusätzliche Versuche mit den Substanzen Silber, Indium, Quecksilber, Kupfer, Zink, Zinn, Palladium, und Gallium durch. Dabei stellte sich heraus, dass von Zinn und Palladium keine Toxizität, von Gallium eine geringe Toxizität, von Silber, Indium und Quecksilber eine höhere Toxizität ausgeht, die aber zwei bis dreimal kleiner ist als die von Zink und Kupfer freigesetzte Toxizität.

Wataha et al. (1994) untersuchten die Toxizität von Gallium-alloy, zinkhaltigem und zinkfreiem Amalgam im Vergleich zum Kontrollmaterial Teflon an Balb/c 3T3 Mäusefibroblasten. Die Toxizität wurde über die Aktivität der Succinatdehydrogenase (SDH) gemessen und mittels MTT-Test dargestellt. Die Ergebnisse zeigten, dass zinkfreies Amalgam im Vergleich zu Teflon nicht toxisch wirkte. Zinkfreies Amalgam setzte geringe Mengen an Quecksilber und Silber, allerdings signifikante Mengen an Kupfer frei. Geringe Mengen von Quecksilber, Silber und Kupfer wurden vom zinkhaltigen Amalgam freigesetzt. Gallium-alloy verursachte geringe Mengen an Silber und Kupfer und setzte zusätzlich mehr als 7000 ppm Gallium frei. Die freigesetzte Menge an Gallium reicht aus, um 100% Toxizität zu verursachen. Die vom Gallium-alloy freigesetzte Menge an Gallium nahm bei längerer Zeitdauer zu. Wataha et al. (1994) beschrieben weiterhin eine Korrosion der Gallium-alloy Probekörper, des weiteren Oberflächenrauigkeiten, und Verfärbungen. Die Biokompatibilität von Gallium-alloy Restaurationen bleibt also fraglich.

2.3 Physikalische Eigenschaften des Gallium-alloy

Auch die physikalischen Eigenschaften von galliumhaltigen Legierungen werden nach wie vor in Frage gestellt. Die mechanischen Eigenschaften von Gallium-alloy entsprechen denen der hoch kupferhaltigen Amalgame (Okabe et al., 1991). Allerdings stellten Okabe et al. (1992) fest, dass die Werte für die Abbindeexpansion von Gallium-alloy deutlich über den vorgegebenen Werten der ISO Norm 1559 von 1986 liegen.

Dagegen stellten Yada et al. (1989) fest, dass bei einer Legierung von Ga-Sn-In, bzw. Ga-Sn-In-Ag und hochkupferhaltiger Metallspannung sofort nach dem Mischen eine Expansion durch die Veränderung der Dimension sichtbar wurde. Mit einem Amalgam verglichen war eine überlegene Stabilität auf Kaudruck festzustellen. Der Gewichtsverlust durch Korro-

sion lag in 0,05 % HCL-Lösung und in 1 % Milchsäurelösung ein wenig höher als beim Amalgam, in 1 % NaCl und Speichelersatzlösung war der Gewichtsverlust durch Korrosion mit dem vom Amalgam vergleichbar. Dies zeigt, dass beim Gallium-alloy eine stärkere Expansion und Korrosion auftritt als beim Amalgam. Es wurden klinische Untersuchungen durchgeführt, um die beiden Materialien Amalgam und Gallium-alloy hinsichtlich ihrer Eigenschaften direkt miteinander zu vergleichen.

Osborne et al. (1999) untersuchten 30 Klasse I Restaurationen bei 9 Patienten über einen Zeitraum von 3 Jahren. Über einen Zeitraum von 18 Monaten war Gallium-alloy klinisch unauffällig. Nach 21 Monaten wurde die erste Zahnfraktur an einem mit Gallium-alloy gefüllten Zahn diagnostiziert, innerhalb der nächsten 12 Monate wurde an zwei weiteren Molaren eine Zahnfraktur diagnostiziert. Die drei frakturierten Zähne wurden mit Amalgam restauriert und waren seitdem unauffällig. Bei fast allen Restaurationen mit Gallium-alloy stellten Osborne et al. raue Oberflächen, Frakturen an den Füllungsrandern, und Verfärbungen der Füllungen fest. Sie kamen zum Schluss, dass die klinischen Eigenschaften von Gallium-alloy noch weiter verbessert werden müssen, bevor es als Füllungsmaterial empfohlen werden kann.

3 Aufgabenstellung dieser Arbeit

Die überwiegende Zahl der Veröffentlichungen, die sich mit der Toxizität des Füllungswerkstoffes Amalgam beschäftigten, konzentrieren sich auf die Schäden die durch eine Quecksilberaufnahme aus dem Füllungswerkstoff in den Organismus entstehen können. Auch die Rolle des Speichels bei der Korrosion von Füllungswerkstoffen wird bei den meisten Versuchsansätzen nicht ausreichend berücksichtigt. Durch klinische Beobachtungen ist jedoch bekannt, welche wichtige Rolle der Speichel bei der Korrosion von Metallen im Mundraum spielt. Des weiteren dient

der Speichel den Substanzen, die aus den Füllungswerkstoffen herausgelöst wurden, als Transportmedium zur enteralen Resorption. Zudem ist auch der pH-Wert bei den meisten Arbeiten nur wenig berücksichtigt worden. Die Hauptspeicherorgane für die aus den Füllungsmaterialien Amalgam und Gallium-alloy abgesonderten toxischen Substanzen sind Leber, Nieren und Gehirn. Eine vergleichende Untersuchung zur Wirkung der aus den Füllungswerkstoffen Amalgam und Gallium-alloy herausgelösten toxischen Substanzen auf die Zellen der hauptsächlichlichen Speicherorgane Leber und Niere ist bisher noch nicht durchgeführt worden.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde daher das toxische Potential von Amalgam und Gallium-alloy an Leber- und Nierenzellen untersucht. Um die besondere Rolle des Speichels zu berücksichtigen, wurden zwei Speichelersatzlösungen mit unterschiedlichem pH-Wert verwendet. Damit die Füllungsmaterialien hinsichtlich ihres toxischen Potentials direkt miteinander verglichen werden können, wurden für diese Arbeit einheitliche Probekörper der beiden Füllungswerkstoffe hergestellt. Es wurde zudem der zeitliche Zusammenhang zwischen der Verweildauer der Füllungsmaterialien im künstlichen Speichel und ihrer toxischen Wirkung untersucht.

B Material und Methoden

1 Probekörper und Extrakterstellung

1.1 Herstellung der Amalgam Probekörper

Die Amalgam Probekörper wurden entsprechend der DIN-Vorschrift zur Probekörperherstellung von Legierungen zum Herstellen von Amalgam mit der Nummer 13904 vom Juli 1990, Ersatz für Teil 1 vom November 1981, hergestellt.

Auszug: 7.3 Herstellung der Probekörper:

Quecksilber und Legierung in ausreichender Menge zur Herstellung eines Probekörpers werden nach der 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 abzupressen. Anschließend wird der Stempel eingesetzt und die Herstellung des Probekörpers nach folgendem Zeitplan durchgeführt:

Ende des Mischens (Trituration).....	00 sec.
Belastung mit 14 N/mm ²	30 sec.
Entlastung und Entfernung des unteren Platzhalters.....	45 sec.
Erneute Belastung.....	50 sec.
Entlastung.....	90 sec.
Wegbürsten des abgepressten Hg und Ausdrücken des Probekörpers mit dem Stempel.....	120 sec.

Probekörper 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 Prüfcylinder wurden nach einer siebentägigen, trockenen Lagerung bei Raumtemperatur mit einem Schleifpapier der Körnung 1200 bei 150 U/min des Poliermotors unter Wasserkühlung poliert.

1.2 Herstellung der Gallium-alloy Probekörper

Die Herstellung der Gallium-alloy Probekörper erfolgte ebenfalls entsprechend der DIN-Vorschrift zur Probekörperherstellung von Legierungen zum Herstellen von Amalgam (Nummer:13904 vom Juli 1990, Ersatz für DIN-Vorschrift vom November 1981). Beim verwendeten Material handelte es sich um Gallium-alloy in Kapselform (GF II; Tokuriki Hon-ten CO, Tokyo, Japan) mit der Kapselgröße small. Das Anmischen erfolgte nach der Packungsbeilage, die Kapsel wurde aufgedreht, dadurch kam es zur Vermischung der Metallspanung mit dem Gallium. Danach wurde das Gemisch auf einem Rüttler (Silamat) für Amalgam für 8 Sekunden gerüttelt. Nach Zugabe eines Tropfen Ethanol, das für ein erleichtertes Ablösen des Materials aus der Kapsel benötigt wurde, wurde erneut für weitere 2 Sekunden gerüttelt.

1.3 Extraktherstellung

Aufgrund der Gewichts- und Größendifferenz zwischen den Gallium-alloy und den Amalgam Probekörpern wurden immer 4 Gallium-alloy Probekörper zu einer Probe zusammengefasst. Das Gesamtgewicht der Proben wurde durch Abwiegen bestimmt. Dabei ergab sich bei den zusammengefassten vier Gallium-alloy Probekörpern ein durchschnittliches Gewicht der Proben von $1,383 \pm 0,099$ g (Mittelwert \pm S.D.). Das durchschnittliche Gewicht der Amalgam Probekörper betrug $1,618 \pm 0,043$ g (Mittelwert \pm S.D.). Die Probekörper wurden zur Desinfektion für 2 Tage in 70 % Ethanol eingelegt.

Die Probekörper aus Amalgam und Gallium-alloy wurden nun unter sterilen Bedingungen in die Speichelersatzlösungen eingelegt, wobei das Verhältnis von Probekörpergewicht zu Volumen Speichelersatzlösung 1 : 10 entsprach. Somit wurde eine Standardisierung der Metallmenge pro Volumen Speichelersatzlösung erreicht.

Beim Amalgam und beim Gallium-alloy wurden jetzt 2 Gruppen der Probekörper zu je 7 Proben gebildet. Eine Gruppe wurde mit der Speichelerersatzlösung nach Fusayama und eine zweite Gruppe mit der Speichelerersatzlösung NaCl/Laktat inkubiert. Diese Proben, bestehend aus den Probekörpern und den zwei verschiedenen Speichelerersatzlösungen, wurden nun über verschieden lange Zeiträume ($t= 0, 2, 4, 7, 14, 28, 56$ Tage) im Brutschrank bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre inkubiert. Die Begasung lag ebenfalls bei 6% CO_2 und 94% Luft. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Probekörper aus den Speichelerersatzlösungen entfernt. Die Speichelerersatzlösungen wurde nun in zwei Zentrifugenröhrchen (Greiner, Frickenhausen) aufgeteilt, von denen eines im Kühlschrank bei $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$, und eines im Gefrierschrank bei $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt wurde. Als Kontrollen wurden zu denselben Zeitpunkten ebenfalls Proben mit den beiden Speichelerersatzlösungen, jedoch ohne die Prüfkörper, angesetzt und gemeinsam mit den anderen Proben inkubiert und aufbewahrt.

1.4 Speichelerersatzlösungen

Die Fusayama Speichelerersatzlösung hatte einen pH-Wert, der zwischen pH 5,0 und pH 5,25 lag. Als Bestandteile wurden im Einzelnen verwendet:

- NaCl 0,400 g/l
- KCl mit 0,400 g/l
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,690 g/l
- Harnstoff 1,000 g/l
- $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ in modifizierter Form 0,005 g/l

Bei der Speichelerersatzlösung NaCl/Laktat handelte es sich um ein ISO-Elektrolyt (ISO 10271) für Korrosionstests mit einem pH von ca. 2,3. Die Bestandteile waren:

- NaCl 9,008 g/l
- Milchsäure 5,844 g/l

1.5 Sterilfiltration

Die Sterilfiltration der Extrakte wurde mit einem sterilen Einmalfilter (Schleicher & Schnell, Einmalfilterhalter, 7 bar max., 0,2 µm, pyrogenfrei, FP 030/3) durchgeführt. Die Probekörper wurden nun zweimal mit je 25 ml entmineralisiertem H₂O gewaschen und anschließend luftgetrocknet, aufbewahrt.

2 Zellmaterial und Routinekultivierung

2.1 Zellmaterial

In der vorliegenden Arbeit wurden epitheliale Zellen der Zell-Linien Chang-Liver und A-498 verwendet. Es handelt sich hierbei um adhärent wachsende, menschliche Karzinom-Zellen von Leber und Niere.

Die Chang-Liver Zellen wurden von der European Collection of Animal Cell Cultures (Centre for Applied Microbiology and Research; Salisbury, UK) bezogen; die A-498 Zellen von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig).

2.2 Kulturmedium und Kulturbedingungen

Bei beiden Zelllinien wurde als Kulturmedium Earle's MEM-Medium, supplementiert mit 10 % FCS sowie 1 % NEAA und 100 Units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin verwendet. Bezogen wurden die Zellkulturreagenzien von GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe.

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

Die Zellkulturen wurden im Brutschrank bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre inkubiert. Der Brutschrank wurde mit

6 % CO₂ und 94 % Luft begast. Durch den CO₂-Partialdruck wurde das CO₂/Bikarbonat-Puffersystem des Zellkulturmediums auf den pH-Wert von 7,2-7,4 eingestellt und konstant gehalten.

2.3 Routinekultivierung

Um die zur Aussaat benötigte Menge von Zellen vorrätig zu haben, wurden sowohl die A-498 als auch die Chang-Liver Zellen routinemäßig als Massenkulturen in Kulturflaschen (75 cm² Cellstar; Greiner, Frickenhausen) ausgesät. Sowohl die A-498 als auch die Chang-Liver Zellen wurden vor der Zellaussaat mit steriler gepufferter Saline (PBS; GibcoBRL, Life Technologies, Eggenstein) gewaschen und danach mit einer sterilen Trypsin/EDTA Lösung (mit 0,5 g/l Schweinetrypsin und 0,2 g/l EDTA; Sigma Aldrich Chemie Deisenhofen) vom Kulturflaschenboden abgelöst und suspendiert. Einmal pro Woche wurde ein Transfer der Massenkulturen in neue Kulturflaschen vorgenommen, um den Zellen ein neues Substrat und neue Nährstoffe zu bieten. Dazu wurden 5000 Zellen/cm² Wachstumsfläche in 20 ml Kulturmedium ausgesät.

3 Zellbiologische Testassays

3.1 Bestimmung der Zellvitalität

Für die Untersuchung der Wirkung von Amalgam und Gallium-alloy auf die Zellvitalität proliferierender Zellen wurden die aus der Massenkultur stammenden A-498 und Chang-Liver Zellen in einer Dichte von 5000 Zellen/cm² oder 50.000 Zellen pro 2 ml Routinekulturmedium in 6-Loch-Platten (9,6 cm² pro Vertiefung, Greiner, Frickenhausen) ausgesät.

Innerhalb von 24 Stunden nach der Aussaat setzten sich die Zellen ab, und breiteten sich vollständig aus. Danach wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, und anschließend die Extrakte der beiden Dentallegierungen

gen in den Verdünnungen von 1:10 (200 μ l) und 1:20 (100 μ l) zugegeben. Zuvor wurde das entsprechende Volumen Kulturmedium entfernt, um das Gesamtvolumen konstant zu halten. Die Extraktzugabe erfolgte mittels Eppendorfpipetten.

Die Inkubation der Zellen mit den Extrakten dauerte 72 Stunden. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Kulturmedium mit den Extrakten abgezogen und einmal mit PBS zur Entfernung von Zelldebris gespült. Um die Zellen abzulösen, erfolgte nun die Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA Lösung auf die vitalen Zellen mit anschließender Aufbewahrung im Brutschrank für 10 min. Die vitalen, abgelösten Zellen wurden mit Hilfe der Zählkammer nach Neubauer (jede gezählte Zelle pro großem Quadrat der Zählkammer entspricht 10000 Zellen) unter dem Inversmikroskop (Nikon, Düsseldorf) ausgezählt. Als Referenz wurde jeweils eine Kontrolle mit den, über die verschieden lange Inkubationszeiträume ($t= 0, 2, 4, 7, 14, 28, 56$ Tage) inkubierten, Speichelersatzlösungen Fusayama und NaCl/Laktat angesetzt. Zusätzlich wurde noch eine Kontrolle ohne weitere Zusätze im Kulturmedium angesetzt.

3.2 Berechnung der zellulären Wachstumsrate

Ausgehend von der Zellzahl zum Zeitpunkt $t = 24$ Stunden nach der Aussaat und unmittelbar vor der Extraktzugabe ($= N_0$) und der am Versuchsende, nach 72 Stunden Inkubation mit den Extrakten, gezählten Zellzahl ($= N_1$) wurde mit den Formeln (1) und (2) die Anzahl der Populationsverdopplungen über den gesamten Inkubationszeitraum und daraus die Wachstumsrate in Populationsverdopplungen pro Tag berechnet.

Im Gegensatz zur Endpunktbestimmung (Kapitel B.3.2) konnte anhand der Wachstumsrate in Populationsverdopplungen pro Tag konnte der kontinuierliche Einfluss der zu testenden Extrakte auf die Proliferation der Zellen ermittelt werden.

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

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

4 Lichtmikroskopie

Zur Untersuchung der Zellmorphologie nach Exposition und zur Zählung der Zellen wurde ein Nikon Inversmikroskop TMS (Nikon, Düsseldorf) verwendet. Beim verwendeten Objektiv handelte es sich um Plan 10 / 0,30 DL. Die Zählung erfolgte mittels einer Zählkammer nach Neubauer (jede gezählte Zelle pro großem Quadrat der Zählkammer entspricht 10.000 Zellen).

5 Statistische Auswertung

In der vorliegenden Arbeit wurden Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) angegeben. Die Signifikanzberechnungen der erhaltenen Messergebnisse erfolgten nach dem Student's *t*-Test. Die Anzahl der unabhängigen Versuche betrug $n=3$.

C Ergebnisse

1 Legierungen und Probekörper

1.1 Handhabung und Verarbeitung

Beide Legierungen wurden als Kapselsysteme verwendet. Eine Kapsel der verwendeten Materialien enthielt zum einen die Metallspanung und durch eine Membran getrennt die flüssige Legierungskomponente. Die Kapseln wurden in eine Mischmaschine eingebracht. Beim Mischvorgang wurde die Membran zerstört und die beiden Komponenten konnten sich zu der entsprechenden Metallegierung vermischen. Dieses System funktionierte beim Anmischen von Amalgam (Amalcap, non gamma 2, Vivadent, Schaar, FL) sehr gut, da die Handhabung des Amalgam-Systems sehr einfach war. Beim verwendeten Gallium-alloy (GF II, Tokuriki Honten CO, Tokyo, Japan) war die Handhabung wesentlich komplizierter. Laut Packungsbeilage musste der maschinelle Mischvorgang unterbrochen werden, um nach 5 Sekunden 1 Tropfen Ethanol in die Kapsel einzubringen. Dies sollte das bessere Ablösen der Legierung von den Kapselwänden garantieren. Es war allerdings schwierig, das Ethanol richtig zu dosieren, was zur Folge hatte, dass nicht bei jeder Kapsel das Herauslösen der Legierung gleich gut vonstatten ging. Zusätzlich dazu war das verwendete Gallium-alloy in der Konsistenz nach dem Mischen noch wesentlich weicher als das Amalgam. Außerdem wurde der Messingzylinder mit dem dazugehörigen Stempel bei der Herstellung der Gallium-alloy Probekörper von diesem Material angegriffen. Dies zeigte sich in einer Veränderung der Oberfläche von messingfarben glänzend bis hin zu mattem Grau.

Durch die weichere Konsistenz des Gallium-alloys ergaben sich bei der Probekörperherstellung - im Gegensatz zu den Amalgam Probekörpern - kleinere Probekörper, die sich in ihrer Größe und Oberflächenbeschaffenheit oftmals unterschieden. Dieser Tatsache wurde allerdings bei der

Herstellung der zu inkubierenden Proben Rechnung getragen (vgl. Kapitel B, 1.2).

1.2 Makroskopische Veränderungen der Probekörper durch künstlichen Speichel

Bei der makroskopischen Betrachtung wurden Veränderungen der Probekörper während der Inkubation in den SEL Fusayama und NaCl/Laktat zu den jeweiligen Zeitpunkten der Inkubationsperiode ($t = 0, 2, 4, 7, 14, 28, 56$) beobachtet (Tab. 1).

Tab. 1: Makroskopisch sichtbare Veränderungen der Probekörper durch künstlichen Speichel
 Erläuterung: - keine makroskopisch erkennbaren Veränderungen

Inkubationsperiode in Tagen	Gallium-alloy Probekörper		Amalgam Probekörper	
	SEL Fusayama	SEL NaCl/Laktat	SEL Fusayama	SEL NaCl/Laktat
0	-	-	-	-
2	-	-	-	-
4	partikuläre, sichtbare Bestandteile im Überstand	-	-	Oxidation der Oberfläche des Probekörpers
7	weisser, flockiger Belag fester Konsistenz	-	-	stumpfe Oberfläche des Probekörpers
14	massiver weisser Belag der Probekörper umhüllt	beginnende Oxidation und Gasentwicklung	beginnende Oxidation der Probekörper	stumpfe Oberfläche des Probekörpers
28	massiver weisser Belag der Probekörper umhüllt	beginnende Oxidation und Gasentwicklung	beginnende Oxidation der Probekörper	komplette Oxidation und schwarze, poröse Stellen
56	massiver weisser Belag und schwarze Verfärbung	beginnende Oxidation und Gasentwicklung	beginnende Oxidation der Probekörper	komplette Oxidation und schwarze, poröse Stellen

2 Wachstum und Morphologie der Zelllinien

Die verwendeten Leber- und Nierenzellen sind epitheliale und adhären wachsende Zellen. Sie breiten sich in Kultur flächenmäßig unter Bildung von unregelmäßigen Ausläufern in einer Schicht (Monolayer) aus. Sowohl Chang-Liver Zellen, als auch A-498 Zellen sind in ihrer Zellgestalt polygonal, wobei die Chang-Liver Zellen sich etwas kleiner und elongierter darstellen. Chang-Liver Zellen besitzen einen großen ovalen Kern mit zahlreichen Nukleoli, das Plasma ist zur Mitte hin stark granuliert; zusätzlich dazu ist ihre „ruffling membrane“ stärker ausgeprägt. Diese gefaltete Zytoplasmamembran stülpt sich am Zellrand aus und dient in erster Linie der Fortbewegung der Zellen. Bei den A-498 Zellen tritt das Phänomen der sogenannten „Dome“-Bildung auf.

Die physiologische Aufgabe der A-498 Zellen im proximalen Nierentubulus besteht darin, Wasser von ihrer apikalen zur basolateralen Seite zu transportieren und somit einen Konzentrationsgradienten aufzubauen. Da die Flüssigkeit im Kulturbedebehälter jedoch nicht abfließen kann, kommt es an einigen Stellen zu einer Anhebung des Zellrasens, die zu einer kuppelartigen Ausstülpung des Zellrasens (= Dome) führt.

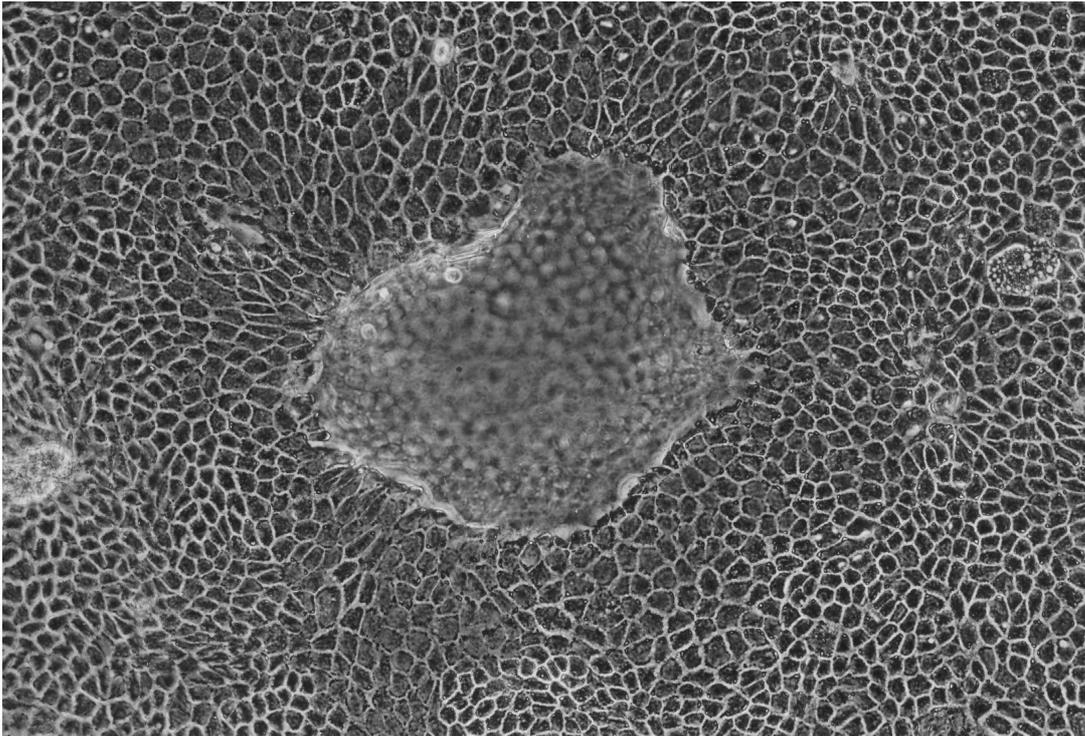


Abb. 1: Wachstumsmuster der Nierenzelllinie (A-498) nach Erreichen der Konfluenz. Zentral ist ein charakteristischer Dome dargestellt (nähere Erläuterungen im Text). Phasenkontrastverfahren

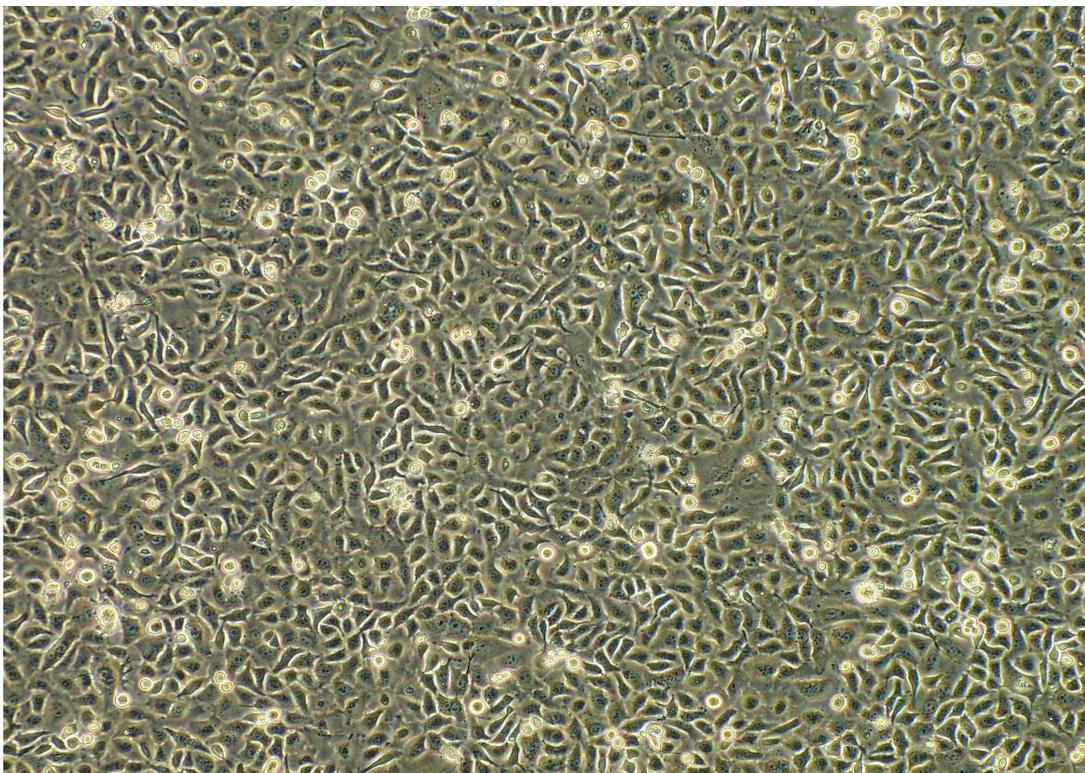


Abb. 2: Wachstumsmuster der Leberzelllinie (Chang-Liver) nach Erreichen der Konfluenz. Phasenkontrastverfahren

3 Beeinflussung des basalen Zellwachstums durch exogene Faktoren

3.1 Unbehandelte Kontrollkulturen

Bei Abb. 3 und Abb. 4 handelte es sich um eine kontinuierliche Kontrolle des Zellwachstums der A-498 Zellen und der Chang-Liver Zellen. Diese Kontrollen wurden bei jeder Aussaat von A-498 und Chang-Liver Zellen zu der jeweiligen Inkubationsperiode 0 - 56 Tage zusätzlich in die 6-Lochplatten mit ausgesät. Dabei wurden diese Kontrollen gänzlich unbehandelt, also ohne SEL und ohne Extrakt 72 Stunden lang inkubiert. Durch den Vergleich des Zellwachstums ohne Extraktzugabe mit den Zellen, die in der entsprechenden Konzentration mit den Extrakten behandelt worden waren, konnte somit eine Beeinflussung des Zellwachstums durch exogene Faktoren ausgeschlossen werden.

Wie aus Abb. 3 ersichtlich, war bei den A-498 Zellen nur eine geringe Schwankung des basalen Zellwachstums zu bemerken. Dies verdeutlicht auch die Trendlinie in Abb. 3.

Die Werte der Chang-Liver Zellen lassen sich aus Abb. 4 ablesen. Auch hier waren keine außergewöhnlichen Schwankungen beim Zellwachstum während der gesamten Versuchsdauer festzustellen.

Somit ist bei beiden Zelllinien über die gesamte Versuchsdauer eine hohe Konstanz der Wachstumsrate vorhanden. Weder die Passagenzahl noch der zeitliche Abstand von 3 Monaten zwischen K1 und K7 hatte einen Einfluss auf die Wachstumskonstanz der verwendeten Zelllinien.

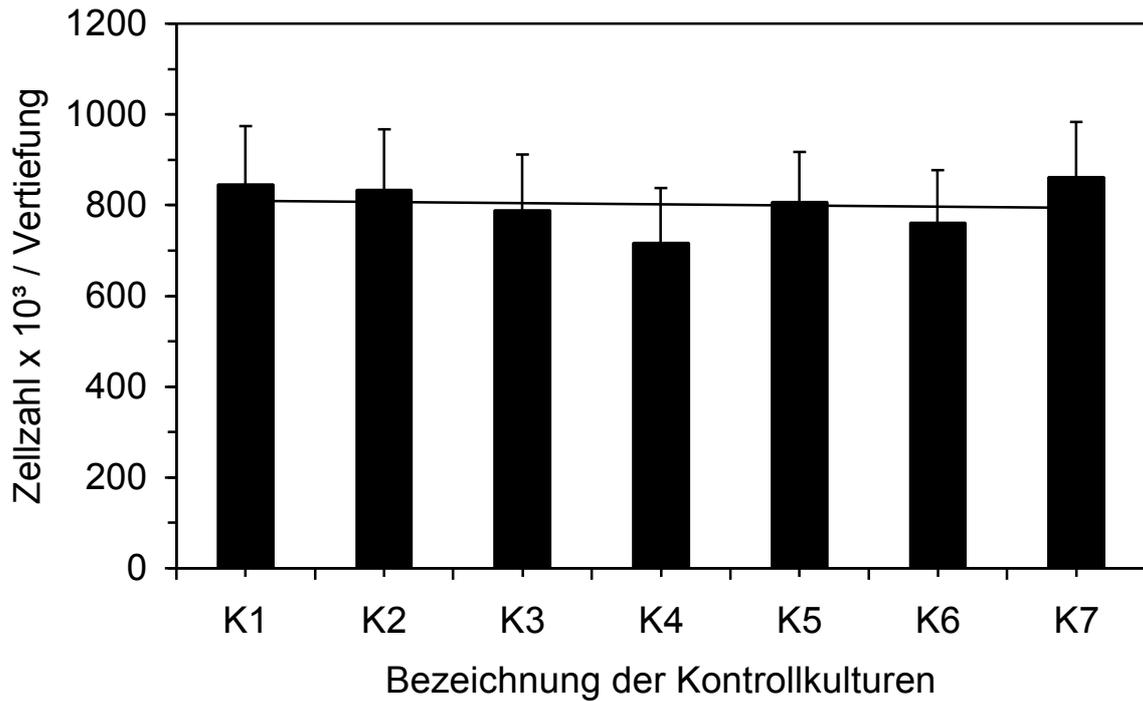


Abb. 3: Darstellung der absoluten Zellzahl von A-498 Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationsperiode. Die durchgezogene Linie repräsentiert die Gerade der linearen Regression. Angegeben ist der Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen Versuchen.

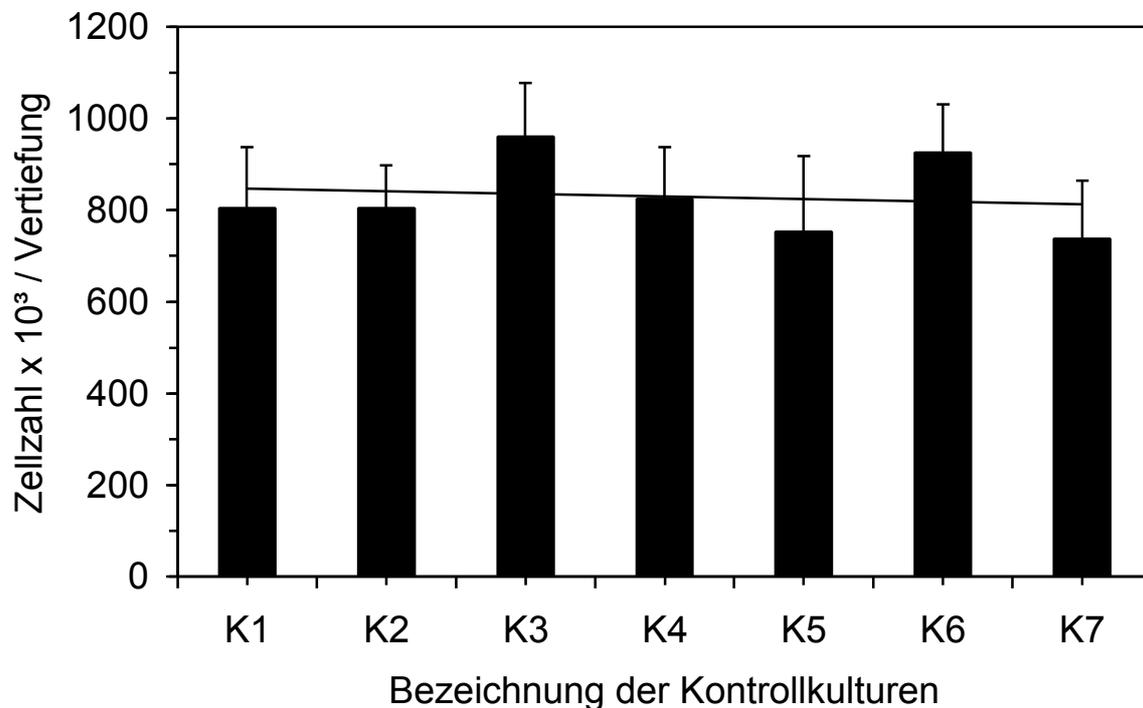


Abb. 4: Darstellung der absoluten Zellzahl $\times 10^3$ von Chang-Liver Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationsperiode. Die durchgezogene Linie repräsentiert die Gerade der linearen Regression. Angegeben ist der Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen Versuchen.

3.2 Inkubationsperiode und Speichellersatzlösung

In Abb. 5 und Abb. 6 wurde die relative Zellzahl von A-498 Zellen und Chang-Liver Zellen nach Zugabe der reinen SEL Fusayama nach 0 – 56 Tagen Inkubation bei 37°C dargestellt. Die relative Zellzahl bezog sich auf die unbehandelten Kontrollen K1 - K7, die jeweils als 100 % gesetzt wurden. Wie zu ersehen, hatte die reine SEL Fusayama nur einen geringen Einfluss auf die Zellvitalität der beiden Zelllinien. Eine geringe Hemmung der Zellvitalität war festzustellen, doch diese Hemmung, die durch den geringfügig sauren pH-Wert von 5,25 der SEL Fusayama verursacht wurde, konnte sowohl vom Kulturmedium weitgehend abgepuffert, als auch von den beiden Zellstämmen toleriert werden.

Analog zu Abb. 5 und Abb. 6, wurden in Abb. 7 und Abb. 8 die relativen Zellzahlen der beiden Zelllinien nach Zugabe der reinen SEL NaCl/Laktat nach 0 – 56 Tagen Inkubation bei 37 °C dargestellt. Die Bezugspunkte für die relative Zellzahl waren die jeweils unbehandelten Kontrollen K1 - K7. Es ist zu ersehen, dass die Zugabe der SEL NaCl/Laktat zu einer Reduktion der Zellvitalität der beiden Zelllinien führte. Die hier ausgeprägte Reduktion der Zellvitalität um bis zu 45 % war auf den sauren pH-Wert von 2,3 der SEL NaCl/Laktat zurückzuführen. Vor allem bei den Chang-Liver Zellen verursachte der saure pH-Wert, der vom Kulturmedium nicht mehr abgepuffert werden konnte, eine starke Hemmung der Zellvitalität. Zudem geben die Zellen während des Wachstums saure Metabolite ins Kulturmedium ab, woraus eine weitere Säuerung resultiert.

Da die Zugabe von insbesondere der SEL NaCl/Laktat bei beiden Zelllinien zu einer starken Reduktion der Zellvitalität führte, wurde die relative Zellzahl der nachfolgenden Graphiken stets auf die in Abb. 5 –8 dargestellten Werte der reinen Extraktionslösungen bezogen.

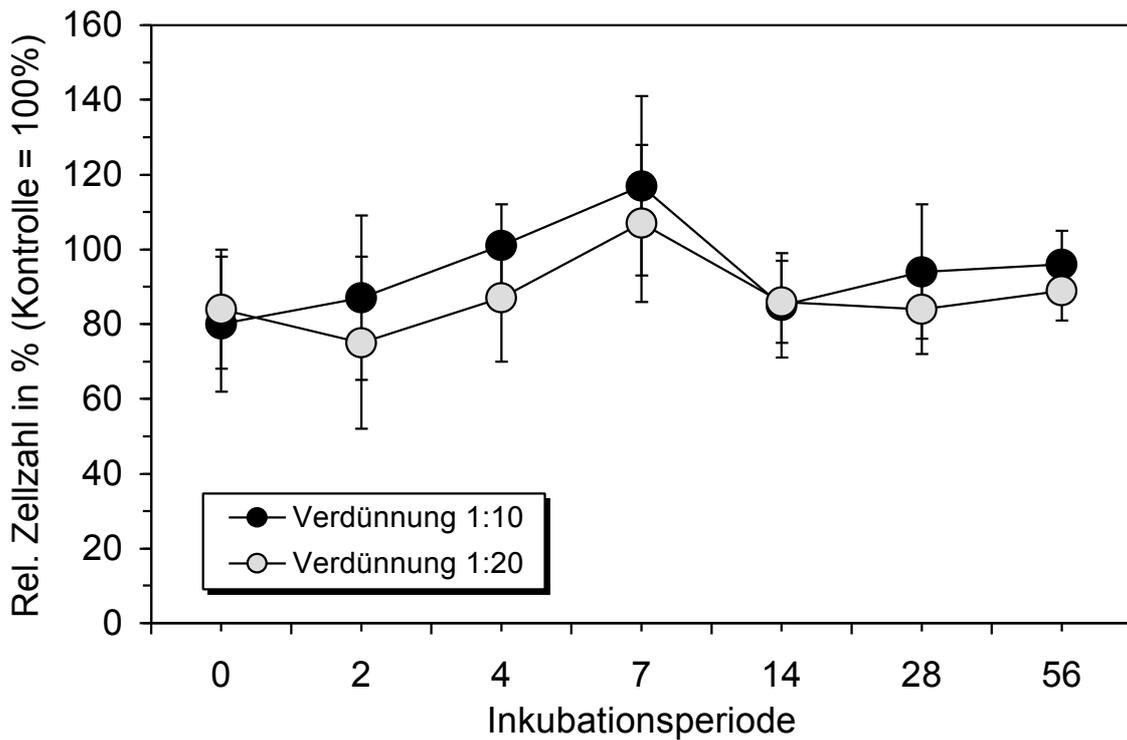


Abb. 5: Relative Zellzahl von A-498 Zellen in Abhängigkeit von Inkubationsperiode und SEL Fusayama. Angegeben ist der Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen Versuchen.

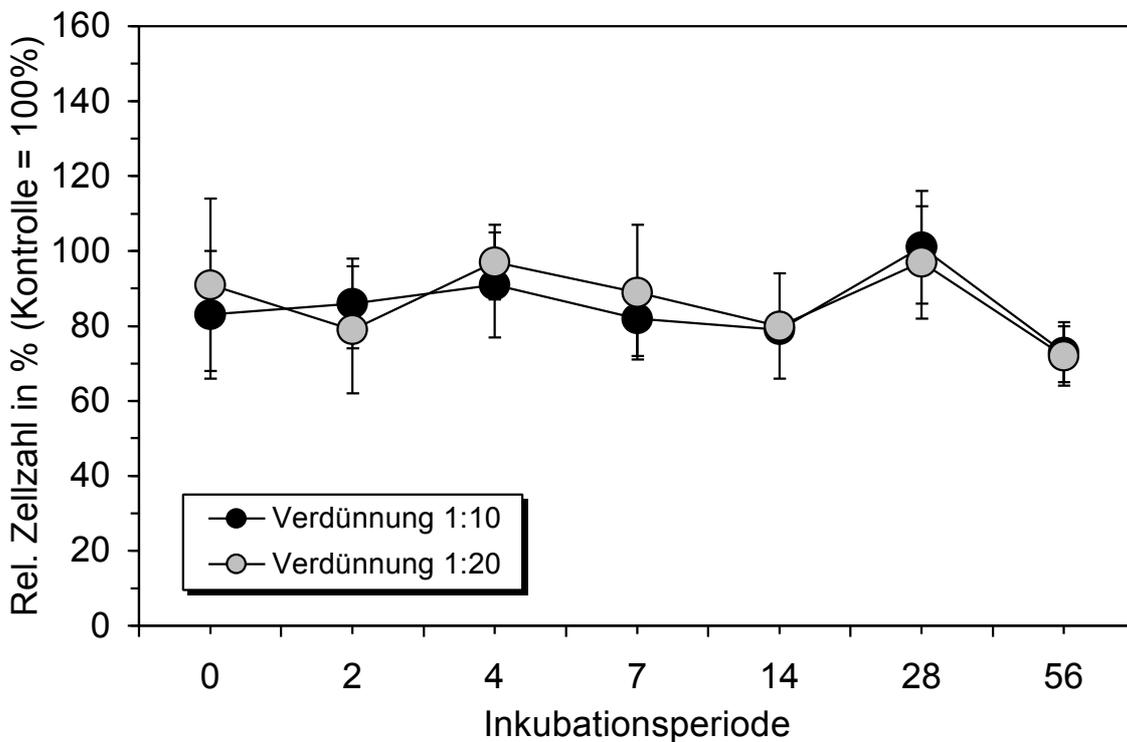


Abb. 6: Relative Zellzahl von Chang-Liver Zellen in Abhängigkeit von Inkubationsperiode und SEL Fusayama. Angegeben ist der Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen Versuchen.

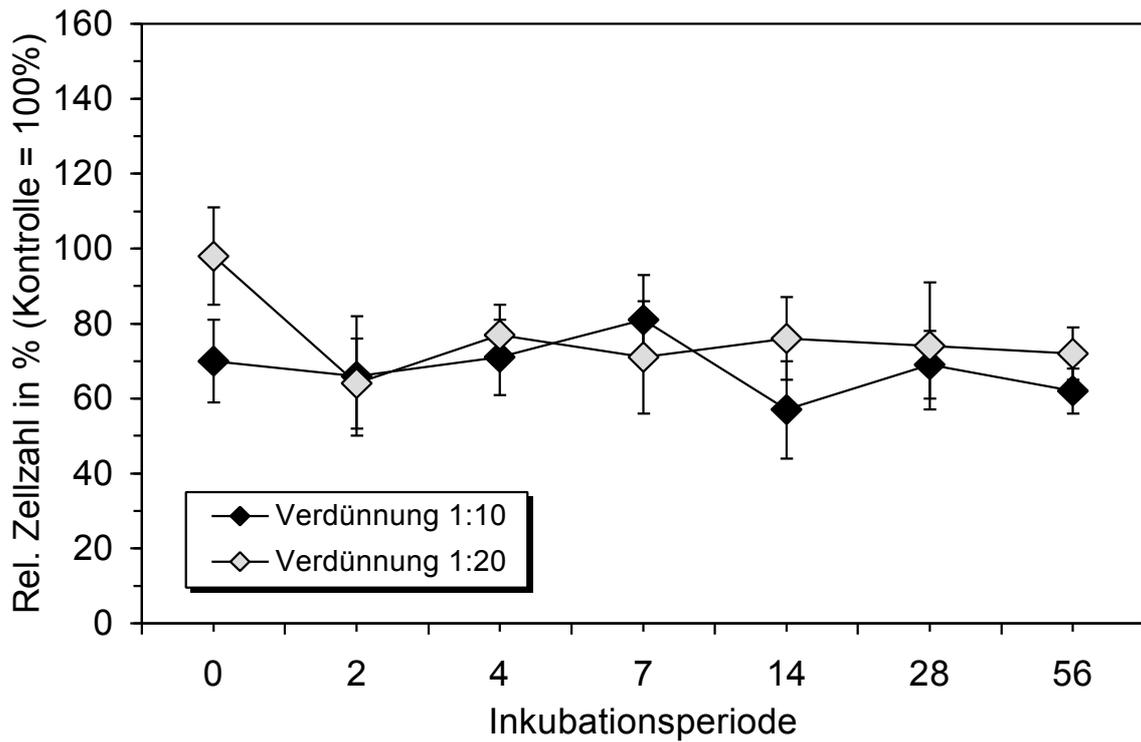


Abb. 7: Relative Zellzahl von A-498 Zellen in Abhängigkeit von Inkubationsperiode und SEL NaCl/Laktat. Angegeben ist der Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen Versuchen.

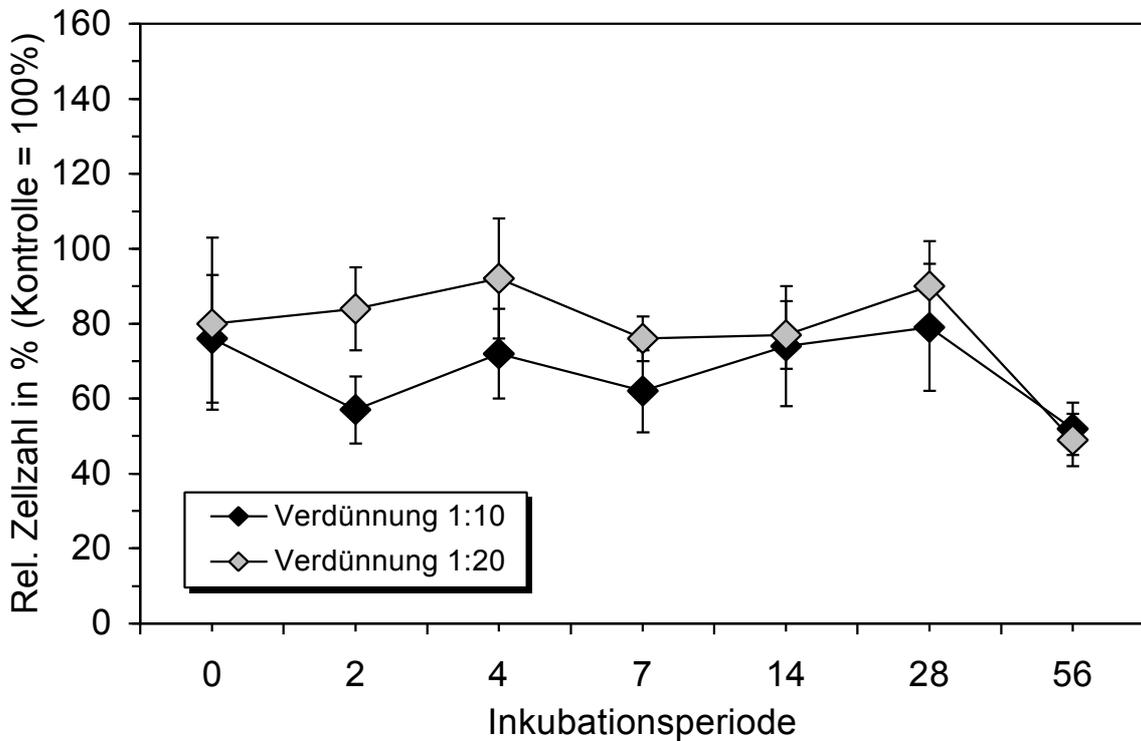


Abb. 8: Relative Zellzahl von Chang-Liver Zellen in Abhängigkeit von Inkubationsperiode und SEL NaCl/Laktat. Angegeben ist Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen Versuchen.

4 Wirkung der Amalgamextrakte auf die Zellvitalität

Bei Tab. 2 und Abb. 9 wurden die Werte der A-498 Zellen dargestellt, die mit dem aus den in der SEL Fusayama inkubierten Amalgam Probekörpern entstandenen Extrakt 72 Stunden lang inkubiert worden sind. Es ließ sich bei keiner der verwendeten Verdünnungen eine signifikante Vitalitätsminderung der Zellen erkennen. Die Chang-Liver Zellen, deren Werte in Tab. 3 und Abb. 10 abzulesen sind, wurden mit dem aus den in der SEL Fusayama inkubierten Amalgam Probekörpern entstandenen Extrakt 72 Stunden lang inkubiert. Es ließ sich ebenfalls bei keiner der verwendeten Verdünnung eine signifikante Vitalitätsminderung erkennen.

In Tab. 4 und 5 und Abb. 11 und 12 sind die Werte für A-498 und Chang-Liver Zellen dargestellt, die mit dem aus den in der SEL NaCl/Laktat inkubierten Amalgam Probekörpern entstandenen Extrakt 72 Stunden lang inkubiert wurden. Bei den A-498 Zellen (Tab. 4 und Abb. 11) war eine Vitalitätsminderung der Zellen erkennen, die bei der Verdünnung von 1 : 10 ab einer Inkubationsperiode von $t = 4$ signifikant wurde. Bei der Verdünnung von 1 : 20 trat eine signifikante Reduktion der Zellvitalität erst ab $t = 14$ ein. Bei der Verdünnung von 1 : 10 ab $t = 28$ und bei der Verdünnung von 1 : 20 ab $t = 56$ kam es zum Absterben der Zellen, weil die Zellzahl nach Versuchsende kleiner war als die bei Versuchsanfang ausgesäte Zellzahl. In Tab. 5 und Abb. 12 sind die Werte für die Chang-Liver Zellen dargestellt. Bei einer Verdünnung von 1 : 10 wurde die Reduktion der Zellvitalität ab einer Inkubationsperiode von $t = 14$ signifikant, und ab $t = 28$ kam es zum Absterben der Zellen, weil die Zellzahl zu Versuchsende kleiner war als die Zellzahl am Versuchsanfang. Eine signifikante Vitalitätsminderung war bei der Verdünnung von 1 : 20 ab $t = 28$ zu erkennen, und bei $t = 56$ kam es zum Absterben der Zellen.

Tab. 2: Wirkung der Extrakte aus den Amalgam Probekörpern und der SEL Fusayama auf die Zellvitalität von A-498 Zellen. Aufgeführt sind die Absolutwerte für die Zahl der vitalen Zellen, sowie die sich daraus ergebenden Wachstumsraten in Abhängigkeit von der Inkubationsperiode. IP = Inkubationsperiode; WR = Wachstumsrate; PD = Populationsverdopplungen; SD = Standardabweichung.

IP in Tagen	Verdünnung 1:10			Verdünnung 1:20		
	Zellzahl/Vert.	SD	WR in PD/Tag	Zellzahl/Vert.	SD	WR in PD/Tag
0	602.000	100.000	1,2	698.000	142.000	1,27
2	697.000	105.000	1,44	732.000	92.000	1,46
4	800.000	130.000	1,3	760.000	92.000	1,28
7	860.000	99.000	1,29	715.000	147.000	1,21
14	737.000	131.000	1,33	628.000	115.000	1,25
28	742.000	115.000	1,25	523.000	87.000	1,08
56	690.000	121.000	1,16	680.000	141.000	1,15

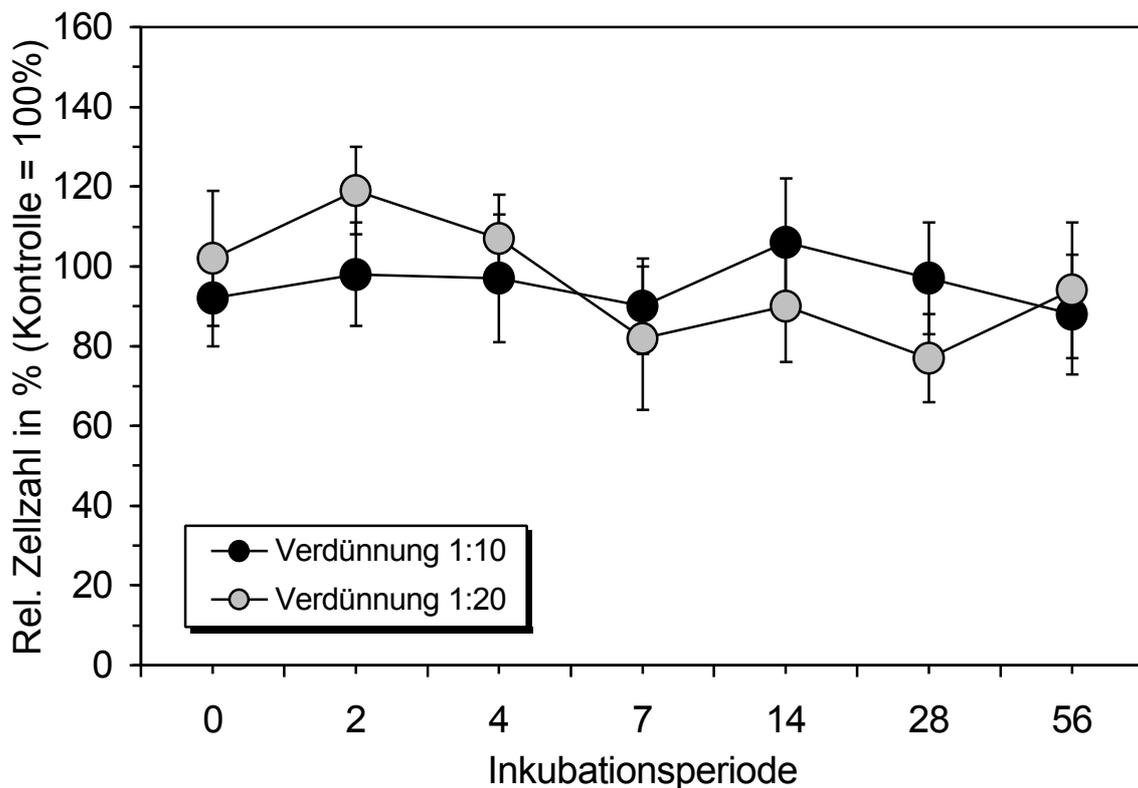


Abb. 9: Relative Zellzahl von A-498 Zellen nach 72-stündiger Exposition in Abhängigkeit von der Inkubationsperiode der Amalgam Probekörper in der SEL Fusayama. Angegeben ist der Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen Versuchen.

Tab. 3: Wirkung der Extrakte aus den Amalgam Probekörpern und der SEL Fusayama auf die Zellvitalität von Chang-Liver Zellen. Aufgeführt sind die Absolutwerte für die Zahl der vitalen Zellen, sowie die sich daraus ergebenden Wachstumsraten in Abhängigkeit von der Inkubationsperiode. IP = Inkubationsperiode; WR = Wachstumsrate; PD = Populationsverdopplungen; SD = Standardabweichung.

IP in Tagen	Verdünnung 1:10			Verdünnung 1:20		
	Zellzahl/Vert.	SD	WR in PD/Tag	Zellzahl/Vert.	SD	WR in PD/Tag
0	690.000	61.000	1,2	655.000	115.000	1,18
2	688.000	102.000	1,25	685.000	91.000	1,24
4	885.000	162.000	1,21	688.000	86.000	1,09
7	737.000	150.000	1,28	678.000	116.000	1,24
14	716.000	99.000	1,26	633.000	100.000	1,2
28	848.000	210.000	1,26	828.000	119.000	1,25
56	557.000	123.000	1,13	520.000	101.000	1,1

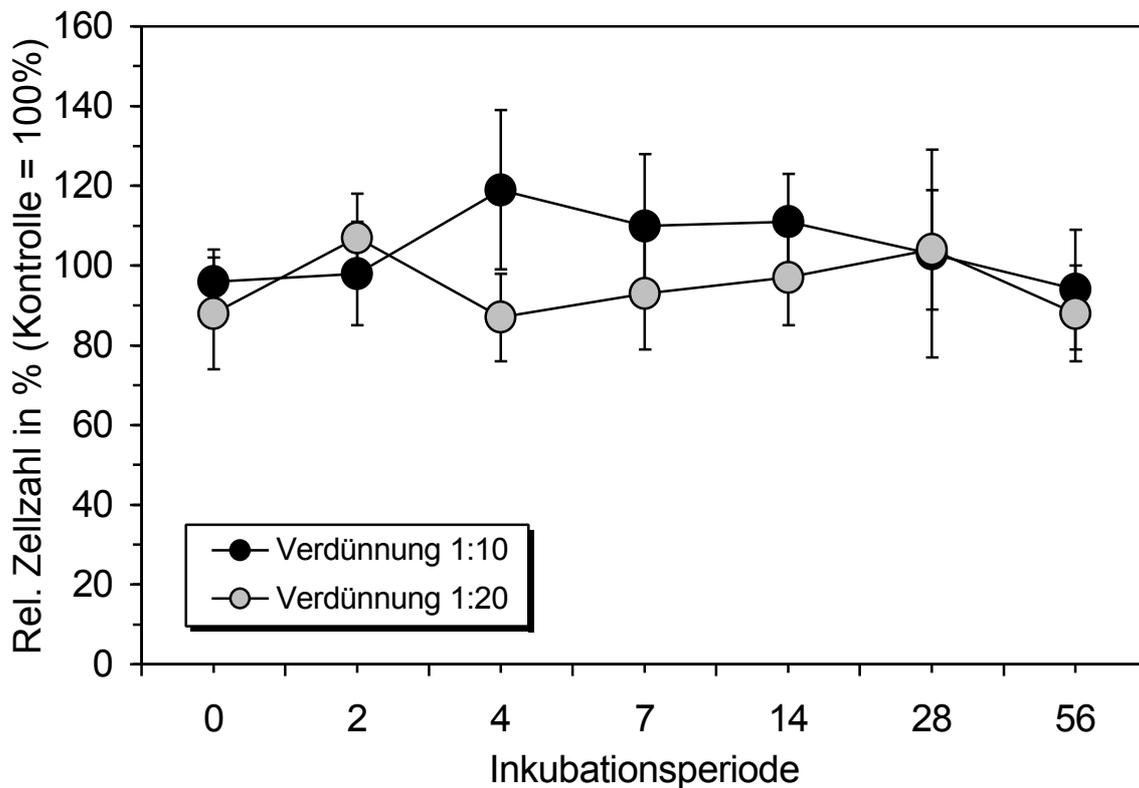


Abb. 10: Relative Zellzahl von Chang-Liver Zellen nach 72-stündiger Exposition in Abhängigkeit von der Inkubationsperiode der Amalgam Probekörper in der SEL Fusayama. Angegeben ist der Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen Versuchen.

Tab. 4: Wirkung der Extrakte aus den Amalgam Probekörpern und SEL NaCl/Laktat auf die Zellvitalität von A-498 Zellen. Aufgeführt sind die Absolutwerte für die Zahl der vitalen Zellen, sowie die sich daraus ergebenden Wachstumsraten in Abhängigkeit von der Inkubationsperiode. IP = Inkubationsperiode; WR = Wachstumsrate; PD = Populationsverdopplungen; SD = Standardabweichung.

IP in Tagen	Verdünnung 1:10			Verdünnung 1:20		
	Zellzahl/Vert.	SD	WR in PD/Tag	Zellzahl/Vert.	SD	WR in PD/Tag
0	667.000	152.000	1,25	655.000	124.000	1,24
2	463.000	95.000	1,24	525.000	81.000	1,3
4	362.000	86.000	0,92	492.000	77.000	1,07
7	397.000	72.000	0,92	573.000	85.000	1,1
14	257.000	190.000	0,82	350.000	134.000	0,97
28	7.000	11.000	-0,99	200.000	53.000	0,62
56	7.000	13.000	-1,05	18.000	17.000	-0,59

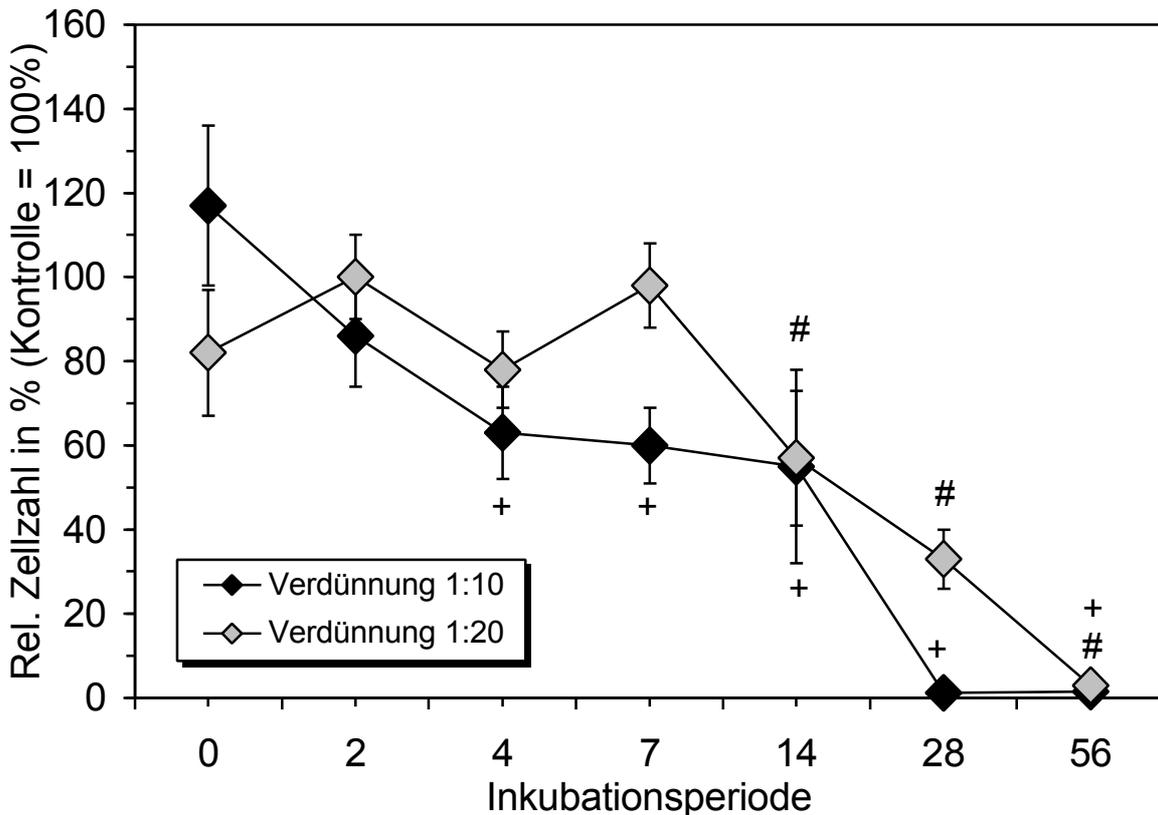


Abb. 11: Relative Zellzahl von A-498 Zellen nach 72-stündiger Exposition in Abhängigkeit von der Inkubationsperiode der Amalgam Probekörper in der SEL NaCl/Laktat. Angegeben ist der Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen Versuchen; #+p < 0,05 (Student's *t*-Test, bezogen auf die Kontrolle).

Tab. 5: Wirkung der Extrakte aus den Amalgam Probekörpern und der SEL NaCl/Laktat auf die Zellvitalität von Chang-Liver Zellen. Aufgeführt sind die Absolutwerte für die Zahl der vitalen Zellen, sowie die sich daraus ergebenden Wachstumsraten in Abhängigkeit von der Inkubationsperiode. IP = Inkubationsperiode; WR = Wachstumsrate; PD = Populationsverdopplungen; SD = Standardabweichung.

IP in Tagen	Verdünnung 1:10			Verdünnung 1:20		
	Zellzahl/Vert.	SD	WR in PD/Tag	Zellzahl/Vert.	SD	WR in PD/Tag
0	537.000	61.000	1,08	613.000	115.000	1,15
2	510.000	100.000	1,1	513.000	65.000	1,1
4	515.000	92.000	0,95	725.000	109.000	1,11
7	437.000	126.000	1,03	507.000	75.000	1,1
14	256.000	84.000	0,77	481.000	107.000	1,07
28	5.000	7.000	-1,21	237.000	69.000	0,65
56	5.000	10.000	-1,14	13.000	15.000	-0,68

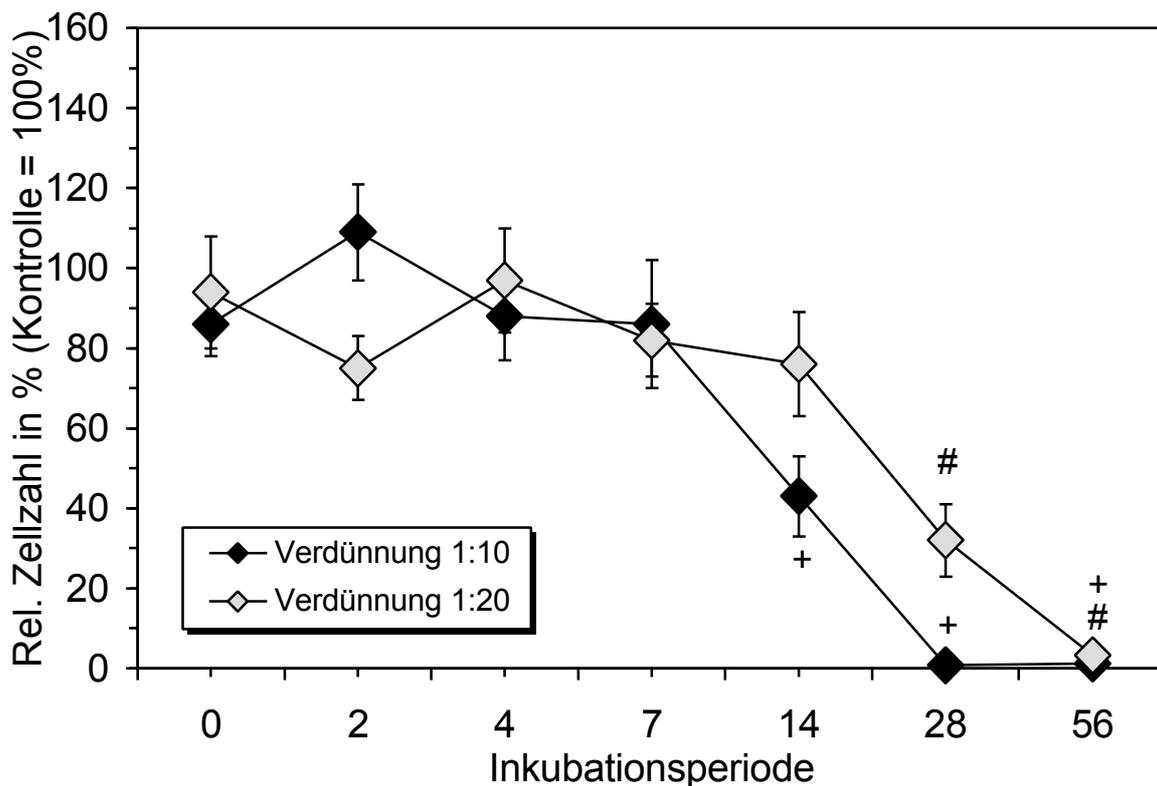


Abb. 12: Relative Zellzahl von Chang-Liver Zellen nach 72-stündiger Exposition in Abhängigkeit von der Inkubationsperiode der Amalgam Probekörper in der SEL NaCl/Laktat. Angegeben ist der Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen Versuchen; #+p < 0,05 (Student's *t*-Test, bezogen auf die Kontrolle).

5 Wirkung der Gallium-alloy Extrakte auf die Zellvitalität

Die A-498 Zellen wurden mit dem Extrakt aus der SEL Fusayama und den Gallium-alloy Probekörpern 72 Stunden lang inkubiert. Es ließ sich bei keiner der verwendeten Verdünnungen eine Vitalitätsminderung der Nierenzellen erkennen (Tab. 6 und Abb. 13). Bei Tab. 7 und Abb. 14 wurden die Ergebnisse mit Chang-Liver Zellen dargestellt, die ebenfalls mit dem Extrakt aus der SEL Fusayama und den Gallium-alloy Probekörpern 72 Stunden lang inkubiert worden sind. Bei den Chang-Liver Zellen ließ sich ebenfalls bei keiner der verwendeten Verdünnungen eine signifikante Vitalitätsminderung feststellen.

Bei Tab. 8 und 9 und Abb. 15 und 16 handelte es sich um die Darstellung der Ergebnisse mit A-498 und Chang Liver Zellen, die mit dem aus der SEL NaCl/Laktat und den Gallium-alloy Probekörpern entstandenen Extrakt 72 Stunden lang inkubiert wurden. Klar zu erkennen ist an Tab. 8 und Abb. 15, dass bei einer Verdünnung von 1 : 10 bereits ab $t = 2$ eine signifikante Vitalitätsminderung der A-498 Zellen stattgefunden hat. Ab $t = 7$ kam es zu einem massiven Absterben der Zellen, weil die zu Versuchsanfang vorhandene Zellzahl größer war als die Zellzahl zu Versuchsende. Bei der Verdünnung 1 : 20 war eine signifikante Vitalitätsminderung erst ab $t = 4$ zu bemerken. Ein Absterben der Zellen fand ab $t = 14$ statt. In Tab. 9 und Abb. 16 war bei den Chang-Liver Zellen bei der Verdünnung von 1 : 10 schon ab $t = 2$ von einer signifikante Reduktion der Zellvitalität zu erkennen, ab $t = 7$ hat ein Absterben der Zellen stattgefunden. Des weiteren war bei der Verdünnung von 1 : 20 ab $t = 2$ eine signifikante Vitalitätsminderung zu beobachten, die bei $t = 7$ in ein Absterben der Zellen überging.

Tab. 6: Wirkung der Extrakte aus den Gallium-alloy Probekörpern und der SEL Fusayama auf die Zellvitalität von A-498 Zellen. Aufgeführt sind die Absolutwerte für die Zahl der vitalen Zellen und die sich daraus ergebenden Wachstumsraten in Abhängigkeit von der Inkubationsperiode. IP = Inkubationsperiode; WR = Wachstumsrate; PD = Populationsverdopplungen; SD = Standardabweichung.

IP in Tagen	Verdünnung 1:10			Verdünnung 1:20		
	Zellzahl/Vert.	SD	WR in PD/Tag	Zellzahl/Vert.	SD	WR in PD/Tag
0	560.000	46.000	1,16	775.000	83.000	1,32
2	722.000	110.000	1,46	652.000	82.000	1,41
4	848.000	183.000	1,33	738.000	151.000	1,2
7	828.000	116.000	1,28	913.000	74.000	1,32
14	752.000	140.000	1,34	790.000	134.000	1,36
28	697.000	103.000	1,22	650.000	102.000	1,19
56	820.000	71.000	1,24	710.000	67.000	1,18

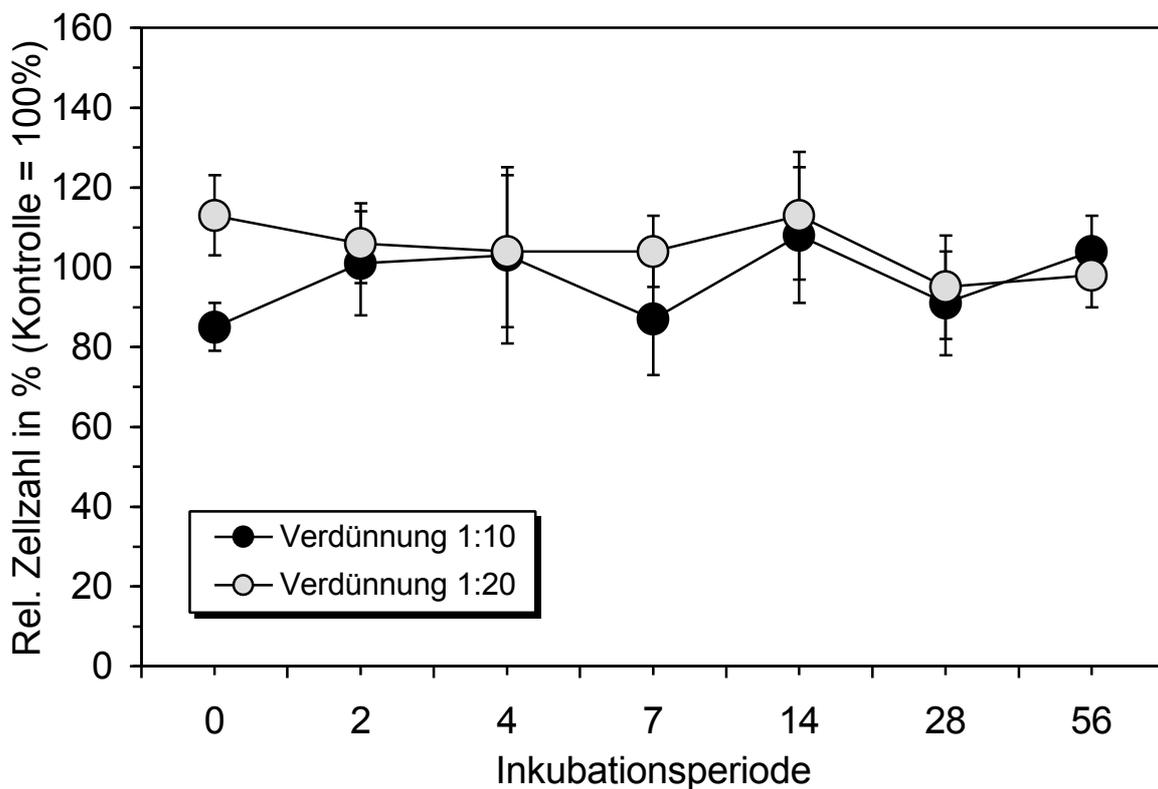


Abb. 13: Relative Zellzahl von A-498 Zellen in Abhängigkeit nach 72-stündiger Exposition von der Inkubationsperiode der Gallium-alloy Probekörper in der SEL Fusayama. Angegeben ist der Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen Versuchen.

Tab. 7: Wirkung der Extrakte aus den Gallium-alloy Probekörpern und der SEL Fusayama auf die Zellvitalität von Chang-Liver Zellen. Aufgeführt sind die Absolutwerte für die Zahl der vitalen Zellen und die sich daraus ergebenden Wachstumsraten in Abhängigkeit von der Inkubationsperiode. IP = Inkubationsperiode; WR = Wachstumsrate; PD = Populationsverdopplungen; SD = Standardabweichung.

IP in Tagen	Verdünnung 1:10			Verdünnung 1:20		
	Zellzahl/Vert.	SD	WR in PD/Tag	Zellzahl/Vert.	SD	WR in PD/Tag
0	735.000	63.000	1,23	830.000	98.000	1,29
2	693.000	120.000	1,25	632.000	140.000	1,2
4	827.000	76.000	1,18	743.000	145.000	1,12
7	698.000	90.000	1,26	663.000	154.000	1,23
14	745.000	122.000	1,28	661.000	120.000	1,23
28	792.000	97.000	1,23	800.000	134.000	1,23
56	653.000	75.000	1,2	608.000	56.000	1,17

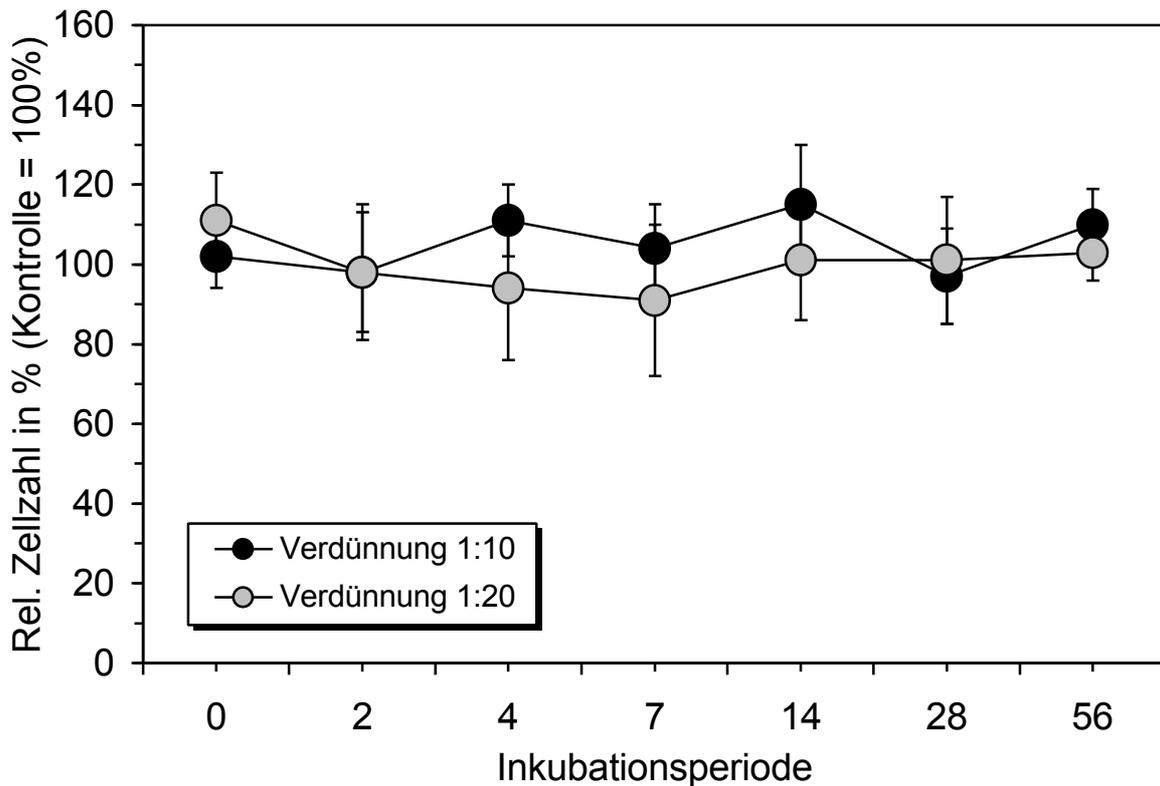


Abb. 14: Relative Zellzahl von Chang-Liver Zellen nach 72-stündiger Exposition in Abhängigkeit von der Inkubationsperiode der Gallium-alloy Probekörper in der SEL Fusayama. Angegeben ist der Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen Versuchen.

Tab. 8: Wirkung der Extrakte aus den Gallium-alloy Probekörpern und der SEL NaCl/Laktat auf die Zellvitalität von A-498 Zellen. Aufgeführt sind die Absolutwerte für die Zahl der vitalen Zellen und die sich daraus ergebenden Wachstumsraten in Abhängigkeit von der Inkubationsperiode. IP = Inkubationsperiode; WR = Wachstumsrate; PD = Populationsverdopplungen; SD = Standardabweichung.

IP in Tagen	Verdünnung 1:10			Verdünnung 1:20		
	Zellzahl/Vert.	SD	WR in PD/Tag	Zellzahl/Vert.	SD	WR in PD/Tag
0	678.000	144.000	1,25	723.000	107.000	1,28
2	193.000	55.000	0,82	380.000	110.000	1,15
4	82.000	23.000	0,21	368.000	67.000	0,93
7	25.000	20.000	-0,41	162.000	28.000	0,49
14	17.000	15.000	-0,49	20.000	14.000	-0,41
28	5.000	7.000	-1,15	10.000	14.000	-0,82
56	0	0	n.d.	5.000	10.000	-1,2

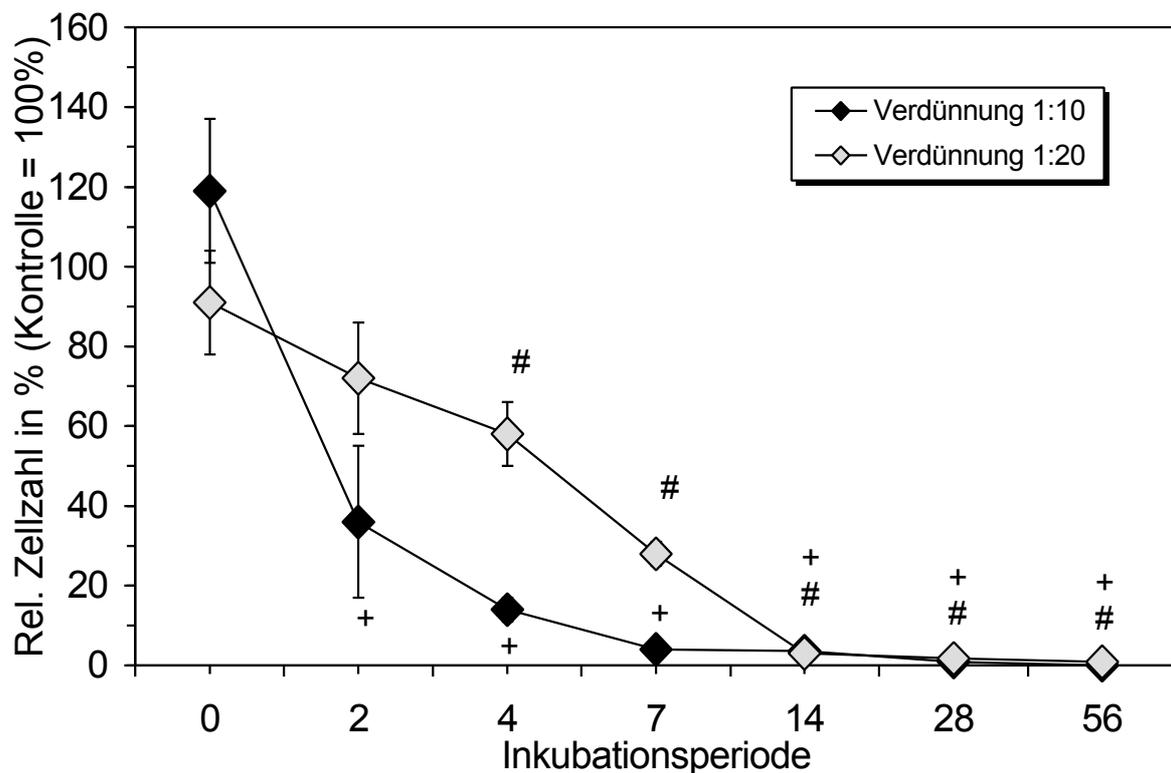


Abb. 15: Relative Zellzahl von A-498 Zellen nach 72-stündiger Exposition in Abhängigkeit von der Inkubationsperiode der Gallium-alloy Probekörper in der SEL NaCl/Laktat. Angegeben ist der Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen Versuchen; #+p < 0,05 (Student's *t*-Test, bezogen auf die Kontrolle).

Tab. 9: Wirkung der Extrakte aus den Gallium-alloy Probekörpern und der SEL NaCl/Laktat auf die Zellvitalität von Chang-Liver Zellen. Aufgeführt sind die Absolutwerte für die Zahl der vitalen Zellen und die sich daraus ergebenden Wachstumsraten in Abhängigkeit von der Inkubationsperiode. IP = Inkubationsperiode; WR = Wachstumsrate; PD = Populationsverdopplungen; SD = Standardabweichung.

IP in Tagen	Verdünnung 1:10			Verdünnung 1:20		
	Zellzahl/Vert.	SD	WR in PD/Tag	Zellzahl/Vert.	SD	WR in PD/Tag
0	517.000	63.000	1,06	625.000	98.000	1,15
2	243.000	45.000	0,74	457.000	100.000	1,05
4	143.000	61.000	0,33	432.000	72.000	0,86
7	25.000	25.000	-0,34	80.000	30.000	0,22
14	11.000	10.000	-0,74	35.000	1.000	-0,19
28	12.000	13.000	-0,79	20.000	21.000	-0,54
56	0	0	n.d.	3.000	7.000	-1,38

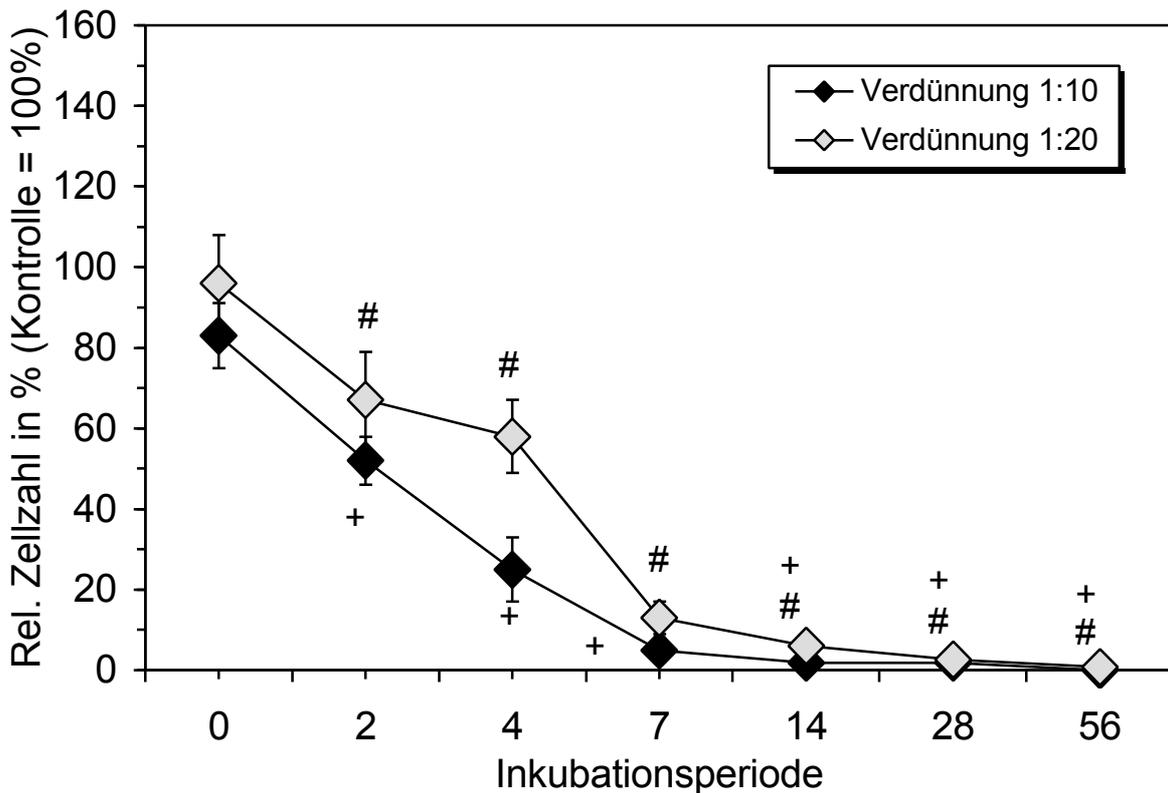


Abb. 16: Relative Zellzahl von Chang-Liver Zellen nach 72-stündiger Exposition in Abhängigkeit von der Inkubationsperiode der Gallium-alloy Probekörper in der SEL NaCl/Laktat. Angegeben ist der Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen Versuchen; #+p < 0,05 (Student's *t*-Test, bezogen auf die Kontrolle).

6 Konzentration der solubilisierten Metallionen in den Extrakten

Eine Analyse der Extrakte von Amalgam und Gallium-alloy wurde von Prof. Dr. Geis-Gerstorfer mittels ICP durchgeführt. Dabei wurden die Konzentrationen der durch Korrosion aus den Probekörpern in Lösung gegangenen Metallionen bestimmt.

Wie in Tab. 10 und Abb. 17 dargestellt, war bei den in der SEL NaCl/Laktat inkubierten Amalgam Probekörpern bei zunehmender Dauer der Inkubationsperiode eine zunehmende Konzentration der Metallionen Quecksilber und Kupfer festzustellen; dahingegen nahm die anfänglich sehr hohe Konzentration von Zinn mit zunehmender Dauer ab. Die Konzentrationen der analysierten Metalle zeigten bei den in der SEL Fusayama inkubierten Amalgam Probekörper, dass alle Metallionenkonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze lagen.

Bei den in der SEL NaCl/Laktat inkubierten Gallium-alloy Probekörpern stiegen die Konzentrationen von Gallium und Indium mit zunehmender Dauer der Inkubationsperiode an (Tab. 11 und Abb. 18). Bei den in der SEL Fusayama inkubierten Gallium-alloy Probekörpern waren Konzentrationsveränderungen der nachgewiesenen Metallionen mit zunehmender Dauer der Inkubationsperiode feststellbar; alle Metallionenkonzentrationen lagen unterhalb der Nachweisgrenze.

Der saure pH-Wert der SEL NaCl/Laktat führte somit zur verstärkten Freisetzung von Metallionen aus den beiden Füllungsmaterialien Gallium-alloy und Amalgam, Kupfer und Quecksilber im Falle des Amalgams, und Gallium und Indium im Falle des Gallium-alloys.

Tab. 10: Konzentration der solubilisierten Metallionen aus den Amalgam Probekörpern in den SEL NaCl/Laktat und Fusayama. IP = Inkubationsperiode; Konz = Konzentration

IP in Tagen	Konz. der nachgewiesenen Metalle in µg/ml						Probekörper in SEL
	Ga	Ag	Sn	Cu	In	Hg	
2		<0,5	16	7,4		<0,5	NaCl/Laktat
4		<0,5	25	18		0,55	
7		<0,5	28	33		0,61	
14		<0,5	20	140		0,74	
28		<0,5	9	570		<0,5	
56		<0,5	7	840		1,6	
2		<0,5	<0,5	<0,5		<0,5	Fusayama
4		<0,5	<0,5	<0,5		<0,5	
7		<0,5	<0,5	<0,5		<0,5	
14		<0,5	<0,5	<0,5		<0,5	
28		<0,5	<0,5	<0,5		<0,5	
56		<0,5	<0,5	<0,5		<0,5	

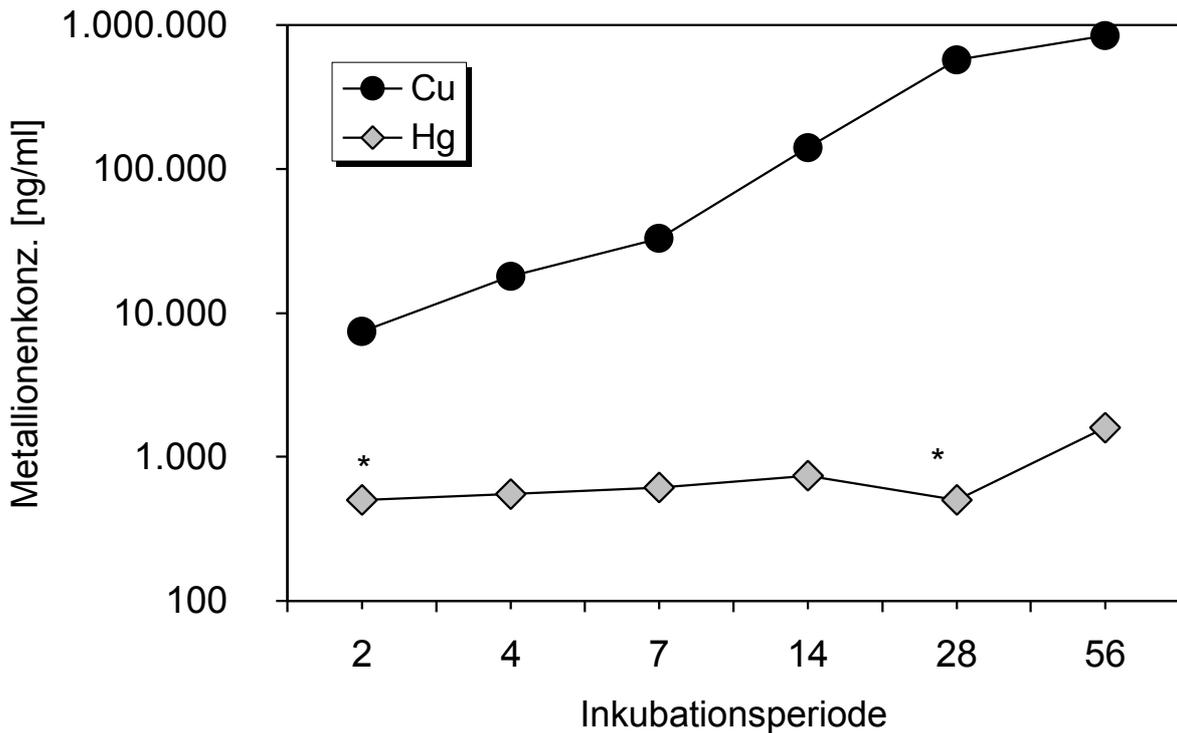


Abb. 17: Solubilisierter Hg- und Cu- Ionen aus Amalgam Probekörpern in der SEL NaCl/Laktat. In der SEL Fusayama liegen die solubilisierten Metallionen unterhalb der Nachweisgrenze und wurden deshalb nicht graphisch dargestellt. Mit * gekennzeichnete Werte lagen unter der Nachweisgrenze.

Tab. 11: Konzentration der solubilisierten Metallionen aus den Gallium-alloy Probekörpern in den SEL NaCl/Laktat und Fusayama. IP = Inkubationsperiode; Konz = Konzentration.

IP in Tagen	Konz. der nachgewiesenen Metalle in µg/ml						Probekörper in SEL
	Ga	Ag	Sn	Cu	In	Hg	
2	140	<0,5	6	<0,5	1,1		NaCl/Laktat
4	180	<0,5	8	<0,5	1,8		
7	360	<0,5	4	<0,5	1,1		
14	660	<0,5	4	<0,5	4,3		
28	1300	<0,5	2	<0,5	12		
56	1900	<0,5	4	<0,5	51		
2	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5		Fusayama
4	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5		
7	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5		
14	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5		
28	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5		
56	<0,5	<0,5	34	<0,5	<0,5		

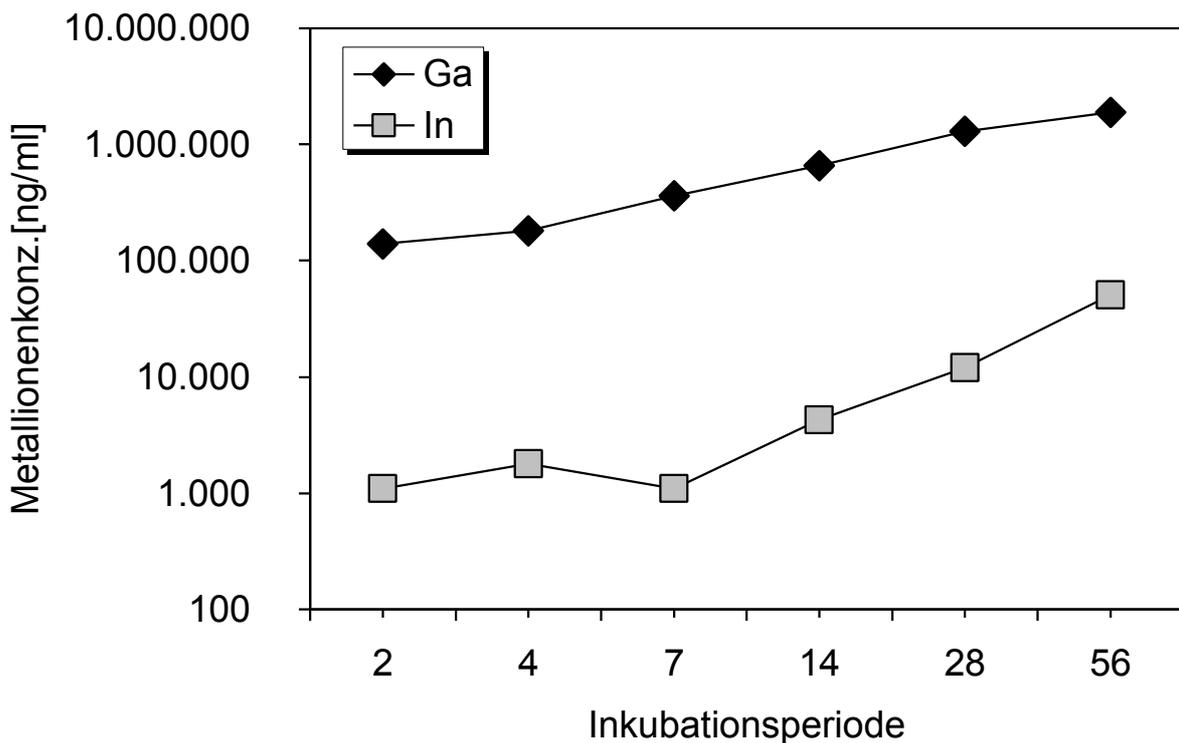


Abb. 18: Solubilierte Ga- und In- Ionen aus Gallium-alloy Probekörpern in der SEL NaCl/Laktat. In der SEL Fusayama liegen die solubilisierten Metallionen unterhalb der Nachweisgrenze und wurden deshalb nicht graphisch dargestellt.

7 Korrelation von Zellvitalität und Metallionenkonzentration

Bei Abb. 19, Abb. 20, Abb. 21, Abb. 22 ist die Korrelation zwischen den Hg- und Cu-Ionen aus dem Extrakt der mit der SEL NaCl/Laktat inkubierten Amalgam Probekörpern und der Vitalität der A-498 Zellen, sowie der Chang-Liver Zellen dargestellt. Dabei zeigt sich, dass bei höheren Konzentrationen von Hg-Ionen im Extrakt die Zellvitalität abnahm (Abb. 19 und Abb. 20). Bei den Werten, die unterhalb der Nachweisgrenze lagen (graphisch mit * gekennzeichnet), ließ sich dagegen keine Veränderung bei der Abnahme der Zellvitalität feststellen. Der Trend zur Reduktion der Zellvitalität blieb bestehen. Eine Toxizität der Hg-Ionen auf die A-498 Zellen und die Chang-Liver Zellen war zwar zu beobachten, doch schien sie die Reduktion der vitalen Zellen nicht maßgeblich zu beeinflussen. In Abb. 21 und Abb. 22 war der Zusammenhang zwischen der Konzentration der Cu-Ionen und der Reduktion der Zellvitalität der A-498 und Chang-Liver Zellen zu erkennen. Der Anstieg der Cu-Ionen scheint hier einen direkten Einfluss auf die Reduktion der Zellvitalität zu nehmen.

In Abb. 23, Abb. 24, Abb. 25, Abb. 26 ist die Korrelation zwischen Ga- und In-Ionen aus dem Extrakt der mit der SEL NaCl/Laktat inkubierten Gallium-alloy Probekörper und der Vitalität der A-498 Zellen und Chang-Liver Zellen dargestellt. Es war festzustellen, dass der Unterschied zwischen der Reduktion der Zellvitalität und dem Verlauf des Konzentrationsanstiegs für Ga- und In-Ionen keinen so großen Unterschied aufwies wie bei den in Abb. 19 bis Abb. 22 dargestellten Hg- und Cu-Ionen. Die toxische Wirkung sowohl der Ga-Ionen als auch der In-Ionen auf die A-498 Zellen war zu beobachten. Eine Differenzierung der Wirkung war nicht möglich. Die Ga-Ionen wiesen jedoch eine wesentlich höhere Konzentration im Extrakt auf als die In-Ionen.

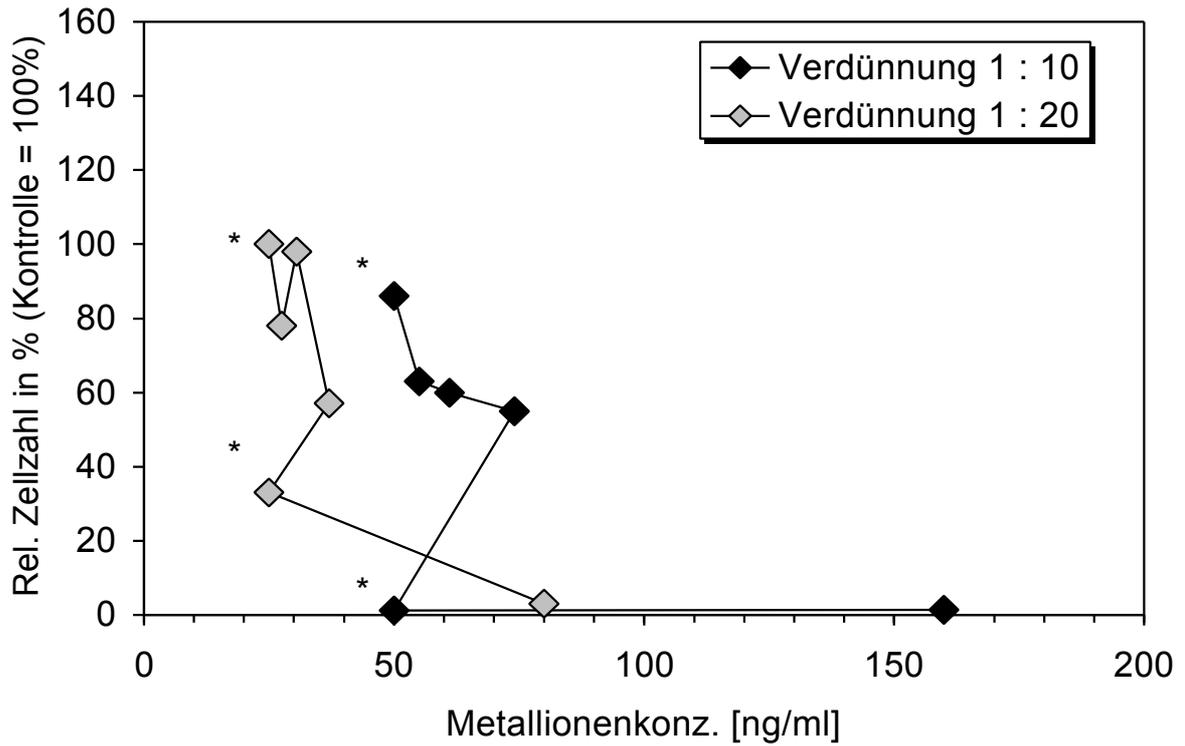


Abb. 19: Konzentration von solubilisierten Hg-Ionen in Korrelation zur Zellvitalität von A-498 Zellen. Amalgam Probekörper in der SEL NaCl/Laktat. Die mit * gekennzeichneten Werte lagen unterhalb der Nachweisgrenze.

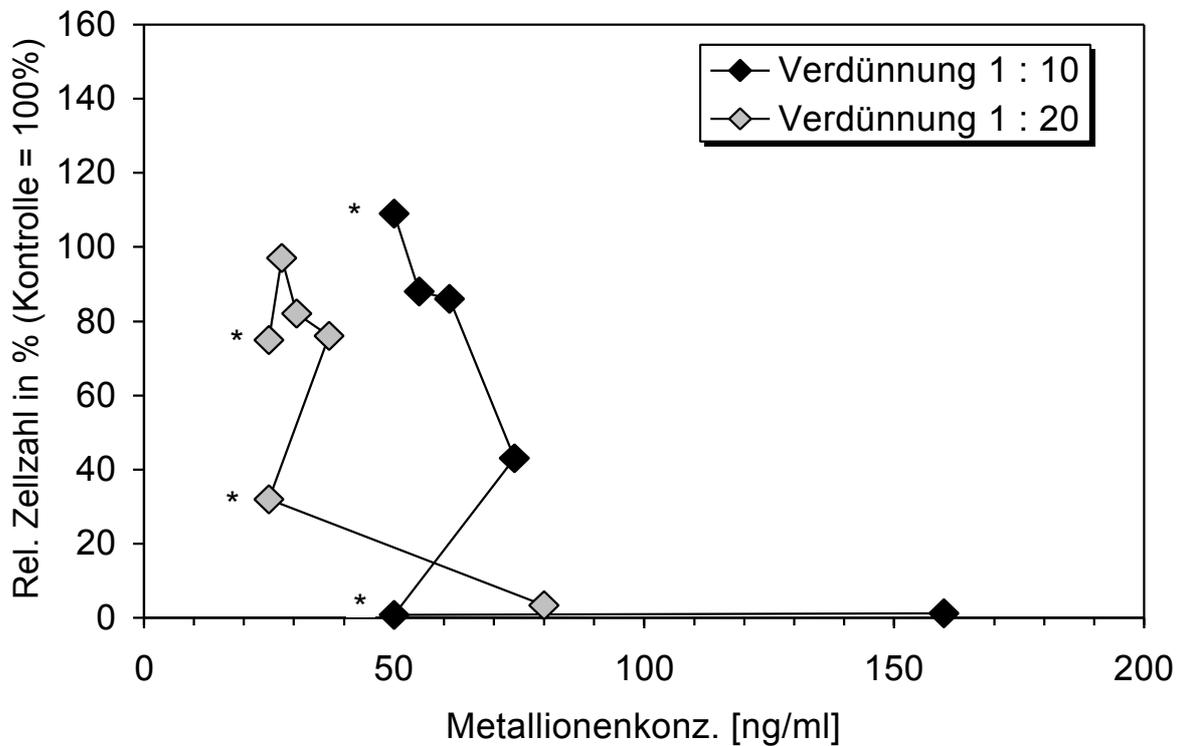


Abb. 20: Konzentration von solubilisierten Hg-Ionen in Korrelation zur Zellvitalität von Chang-Liver Zellen. Amalgam Probekörper in der SEL NaCl/Laktat. Mit * gekennzeichneten Werte lagen unterhalb der Nachweisgrenze.

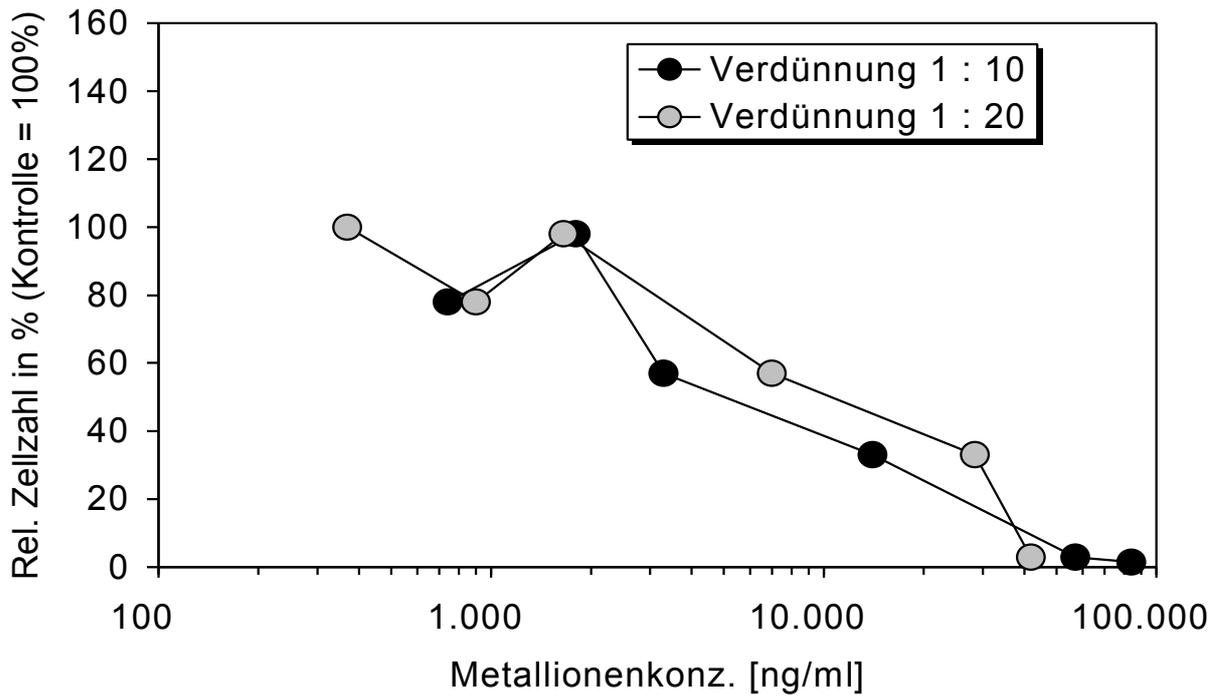


Abb. 21: Konzentration von solubilisierten Cu-Ionen in Korrelation zur Zellvi-
talität von A-498 Zellen. Amalgam Probekörper in der SEL NaCl/Laktat.

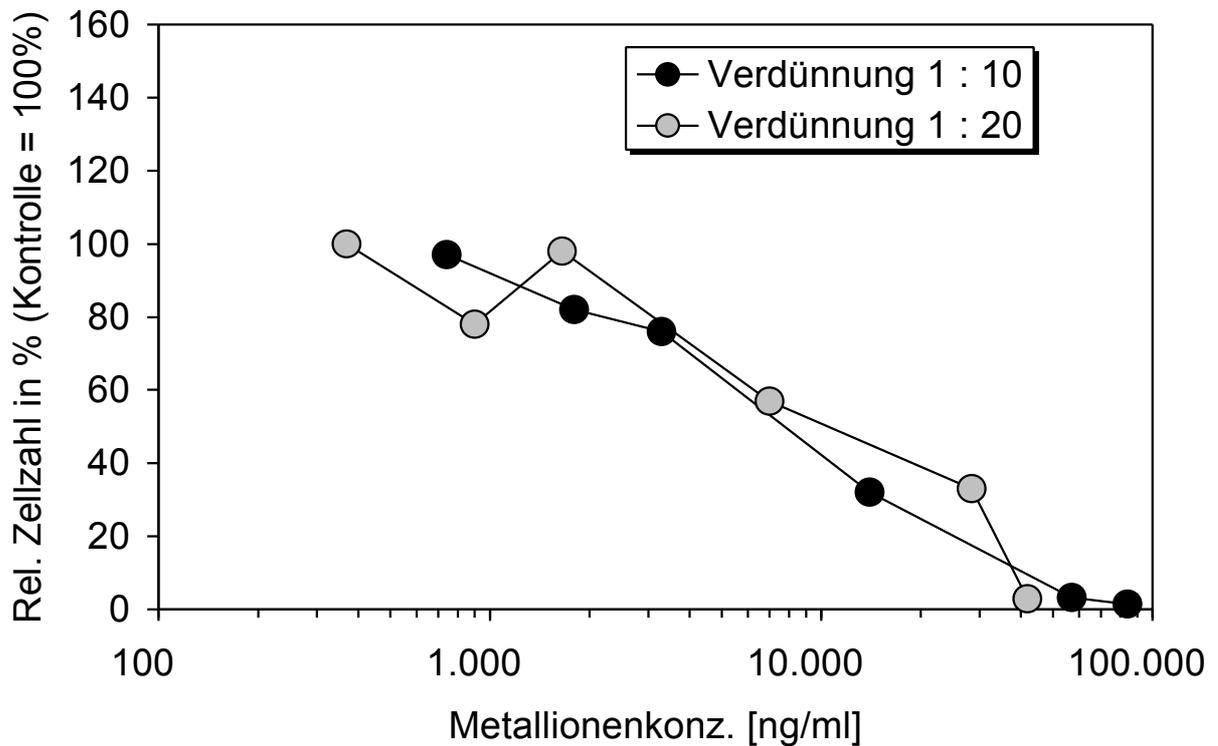


Abb. 22: Konzentration von solubilisierten Cu-Ionen in Korrelation zur Zellvi-
talität von Chang-Liver Zellen. Amalgam Probekörper in der SEL NaCl/Laktat.

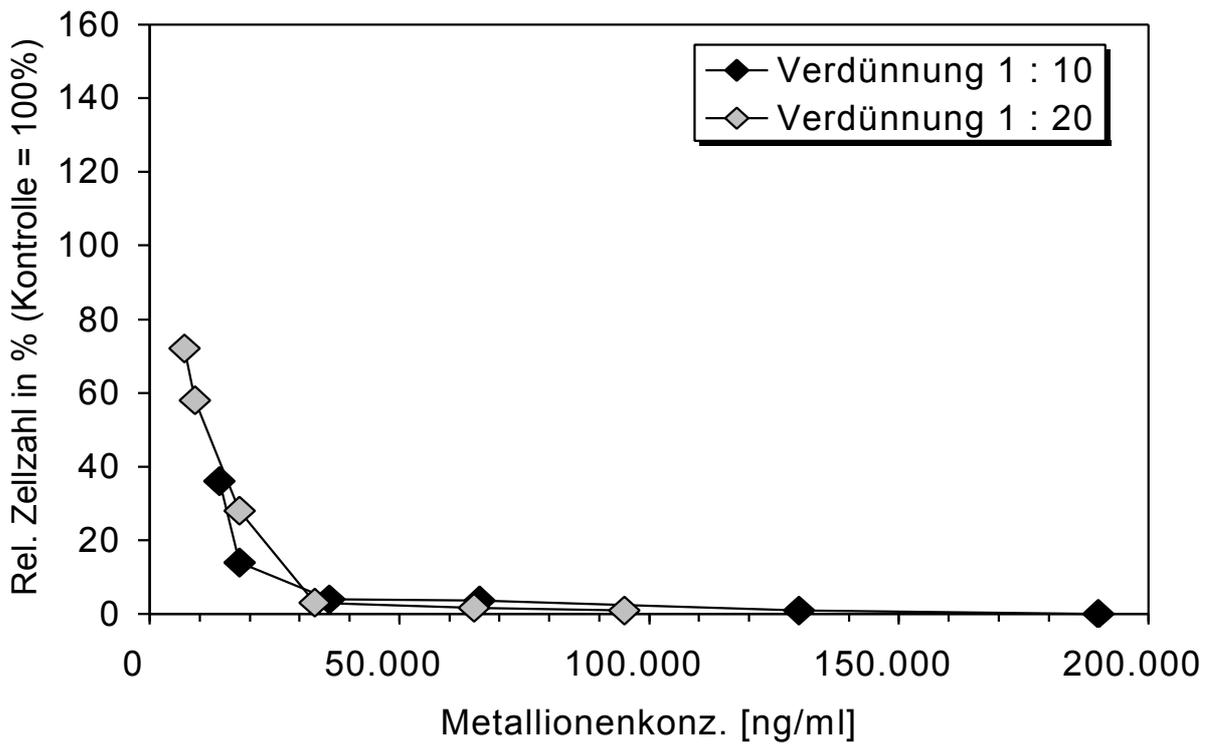


Abb. 23: Konzentration von solubilisierten Ga-Ionen in Korrelation zur Zellvi-
talität von A-498 Zellen. Gallium-alloy Probekörper in der SEL NaCl/Laktat.

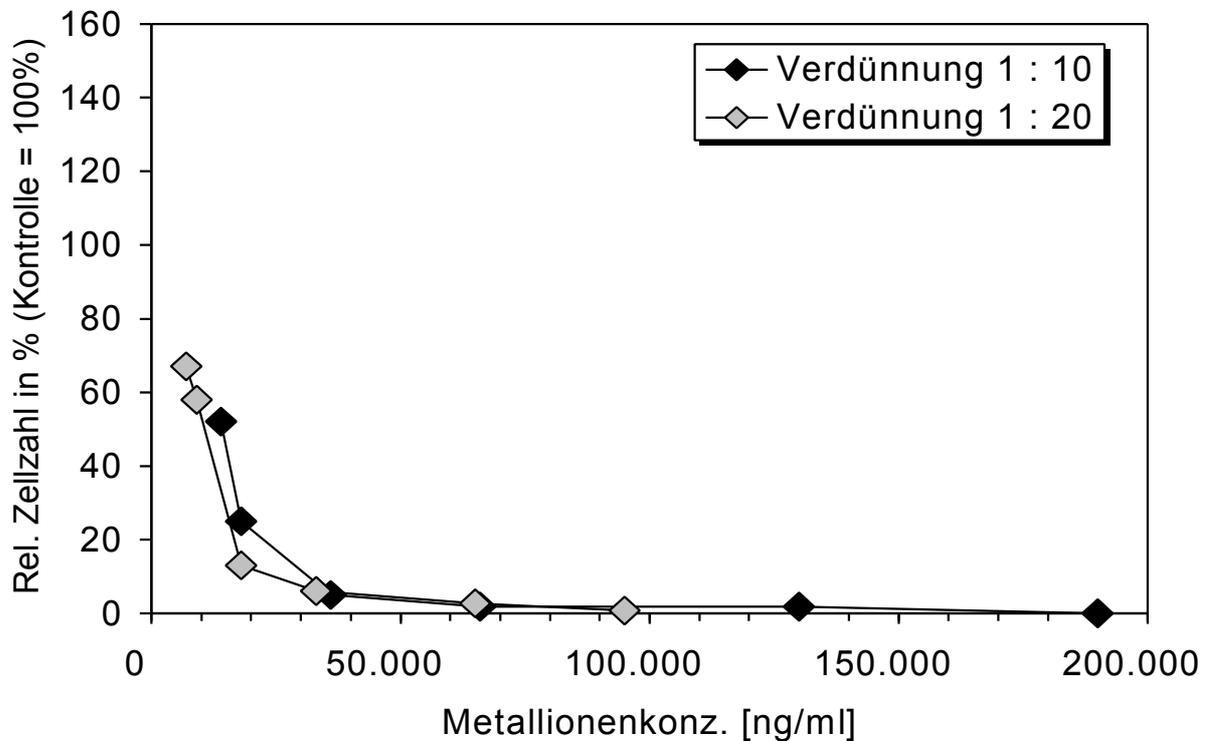


Abb. 24: Konzentration von solubilisierten Ga-Ionen in Korrelation zur Zellvi-
talität von Chang-Liver Zellen. Gallium-alloy in der SEL NaCl/Laktat.

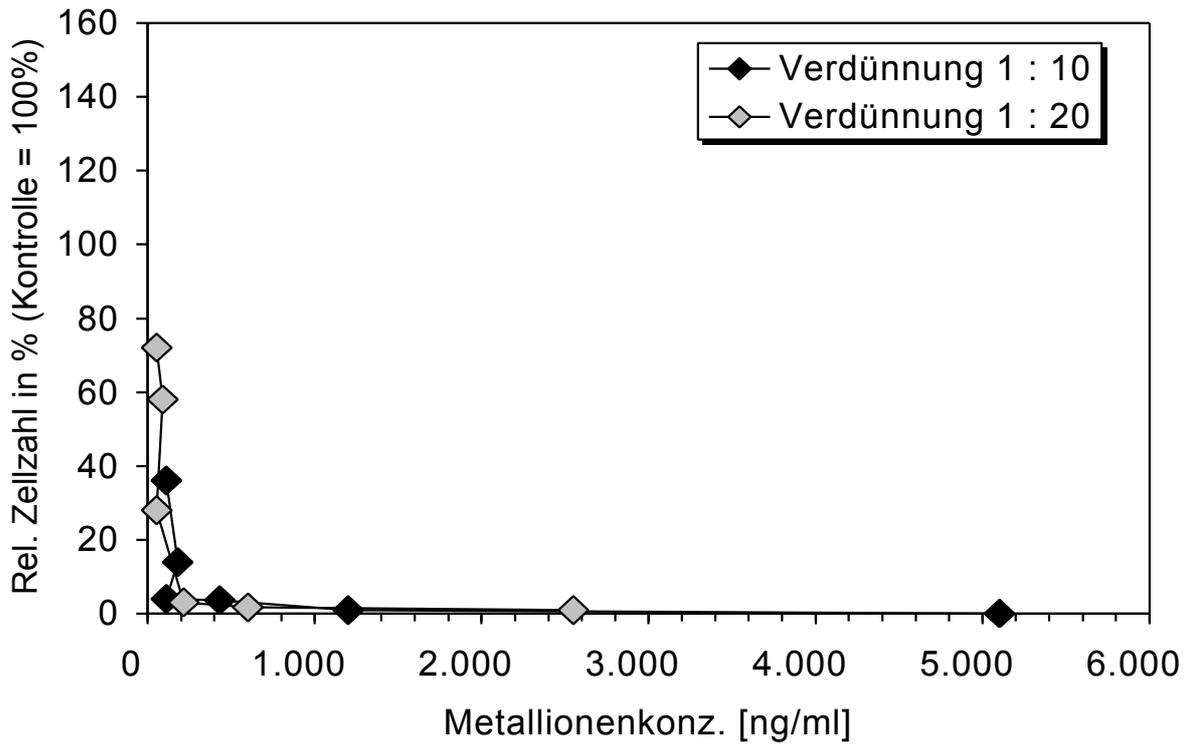


Abb. 25: Konzentration der solubilisierten In-Ionen in Korrelation zur Zellvi-
talität von A-498 Zellen. Gallium-alloy Probekörper in der SEL NaCl/Laktat.

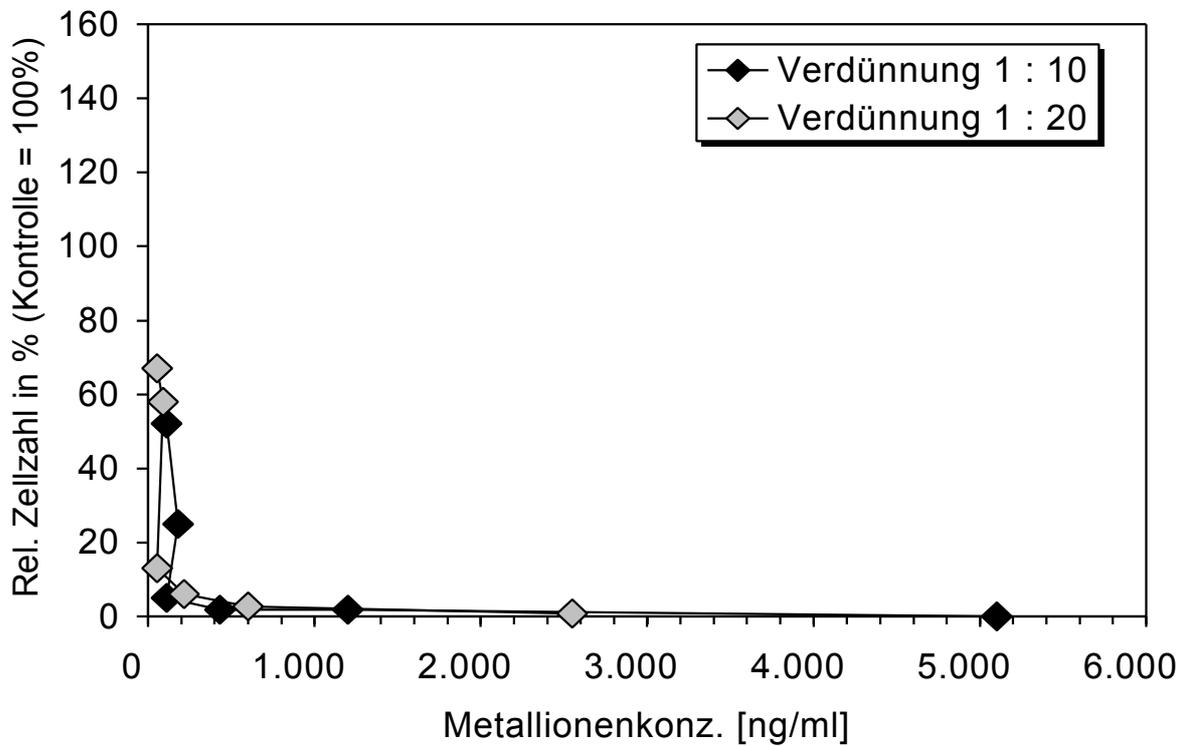


Abb. 26: Konzentration der solubilisierten In-Ionen in Korrelation zur Zellvi-
talität von Chang-Liver Zellen. Gallium-alloy Probekörper in der SEL NaCl/-
Laktat.

8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Während die SEL NaCl/-Laktat bei A-498 Zellen und Chang-Liver Zellen zu einer nicht signifikanten Reduktion der Zellvitalität führte, hatte die SEL Fusayama keine Wirkung auf das Wachstum der beiden Zelllinien. Aufgrund der unbehandelten Kontrollkulturen konnten äußerer Einflüsse auf das Testsystem ausgeschlossen werden.

- **Amalgam Probekörpern:** Die in SEL NaCl/Laktat inkubiert wurden, reagierten die A-498 bei einer Verdünnung von 200 μl ab einer Inkubationsperiode von $t = 4$, bei einer Verdünnung von 100 μl ab einer Inkubationsperiode von $t = 14$ mit einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität. Bei einer Verdünnung von 200 μl ab $t = 28$ und bei einer Verdünnung von 100 μl ab $t = 56$ war die Zahl der Zellen zu Versuchsende geringer als die Zellzahl zu Versuchsanfang. Die Chang-Liver Zellen zeigten bei beiden Verdünnungen eine Reduktion der Zellvitalität, die bei 200 μl ab einer Inkubationsperiode von $t = 14$, bei 100 μl ab $t = 28$ signifikant wurde. Ein Absterben der Zellen fand bei der Verdünnung von 200 μl ab $t = 28$, und bei einer Verdünnung von 100 μl ab $t = 56$ statt.
- **Gallium-alloy Probekörper:** In der SEL NaCl/Laktat wirkte auf die A-498 Zellen bei einer Verdünnung von 200 μl ab der Inkubationsperiode $t = 2$ signifikant vitalitätsmindernd und ab $t = 7$ war die Zellzahl geringer als die zu Versuchsbeginn ausgesäte Zahl. Bei einer Verdünnung von 100 μl war eine signifikante Vitalitätsminderung ab der Inkubationsperiode $t = 4$ und ein Absterben der Zellen ab $t = 14$ festzustellen. Bei den Chang-Liver Zellen war eine signifikante Reduktion der Zellvitalität bei der Verdünnung von 200 μl , als auch bei der Verdünnung von 100 μl ab einer Inkubationsperiode von $t = 2$ gegeben, ein Absterben der Zellen war bei beiden Verdünnungen ab $t = 7$ gegeben.

Zusammenfassend betrachtet, stieg bei Gallium-alloy für die SEL NaCl/Laktat mit zunehmender Inkubationsperiode die Toxizität auf A-498 und Chang-Liver Zellen an. Dies gilt ebenfalls für das mit der SEL NaCl/Laktat inkubierte Amalgam. In beiden Fällen trat bei geringeren Konzentrationen der Extrakte bezüglich der Inkubationsperiode die toxische Wirkung verzögert und vermindert ein. Bei den in der SEL NaCl/Laktat inkubierten Amalgam Probekörpern war im Vergleich zu den Gallium-alloy Probekörpern eine geringer ausgeprägte Toxizität festzustellen.

Die Extrakte der in der SEL Fusayama inkubierten Probekörper der beiden Füllungsmaterialien führten bei keiner der beiden Zelllinien zu einer Reduktion der Zellvitalität.

Es wurde bei den in der SEL NaCl/Laktat inkubierten Amalgam Probekörpern ein Zusammenhang zwischen der ansteigenden Konzentration von Kupferionen im Extrakt und der Reduktion der Zellvitalität beider Zelllinien beobachtet. Auch der Anstieg der Quecksilberionen war dabei von Bedeutung.

Bei den in der SEL NaCl/Laktat inkubierten Gallium-alloy Probekörpern stieg die Konzentration der Gallium- und Indiumionen mit zunehmender Inkubationsperiode im Extrakt an. Auch hier ließ sich ein Zusammenhang zwischen der Reduktion der Zellvitalität beider Zelllinien und dem Anstieg der Galliumionen im Extrakt herstellen.

D Diskussion

1 Zellkulturen in der Toxikologie

In der experimentellen Forschung lässt sich das toxische Potential einer Substanz auf verschiedene Arten untersuchen. In Tierversuchen bietet sich beispielsweise die Möglichkeit, die Auswirkungen eines Gefahrstoffes auf den Körper als Gesamtorganismus zu beobachten, zu untersuchen und zu dokumentieren. Eine weitere Möglichkeit ist das sogenannte Biomonitoring, dabei werden Gefahrstoffe oder deren Metabolite im Blut und/oder Urin bei exponierten Personen ermittelt und überwacht.

Als weitere wichtige Möglichkeit der Untersuchung von arbeits- und umweltmedizinisch relevanten Gefahrstoffen ist die zellbiologische Untersuchung dieser Gefahrstoffe zu nennen. Die Forschung auf der zellbiologischen Ebene hat sich nun schon seit etlichen Jahren bewährt und kommt auch in anderen Fachbereichen zum Einsatz. Sie bietet den Vorteil, mit biologischem Material zu experimentieren, ohne dabei die ethische Problematik von Tierversuchen zu berühren. Davon ausgenommen sind Manipulationen an der Keimbahn.

Ein weiterer Vorteil der zellbiologischen Methoden besteht darin, dass sich die Kulturbedingungen, die Testzeiten und der Versuchsablauf bei Zellkulturen sehr gut standardisieren lassen und die Ergebnisse sehr gut zu reproduzieren sind. Im Vergleich zu Tierversuchen bedeutet die zellbiologische Untersuchung eine beträchtliche Reduktion von Zeit- und Materialaufwand. Zudem kann für eine gezielte Fragestellung eine große Anzahl von methodisch verschiedenen Ansätzen durchgeführt und die Wirkung der Testsubstanz auf die Zellen ermittelt werden. Darüber hinaus lässt sich anhand der Wirkung verschiedener Testsubstanzen auf eine Zelllinie ein Vergleich der Ergebnisse ziehen und somit Rückschlüsse auf die unterschiedliche Toxizität einzelner Substanzen zu.

Zusätzlich dazu lassen sich einzelne Zellstämme in Reinkulturen isoliert untersuchen und somit kann die zellspezifische Wirkung einer toxischen Substanz besser beobachtet werden. Eine Schädigung wird schneller an der Einzelzelle als im Gesamtorganismus oder an isolierten Organsystemen erkannt.

Deshalb kann man von einer höheren Sensitivität bei der zellbiologischen Untersuchung von Reinkulturen sprechen. Allerdings werden dabei die komplexen Wechselwirkungen von Geweben und Organen, die in einem Organismus zusammenwirken, nicht berücksichtigt. Ihr Zusammenspiel und ihre Reaktion auf eine toxische Substanz kann nicht beobachtet und untersucht werden.

Ein Versuch, diesen erheblichen Nachteil auszugleichen, ist die gleichzeitige Kultivierung mehrerer Zellstämme im gleichen Kulturgefäß in verschiedenen Kompartimenten (z.B. Kokulturen), um dadurch eine Immitierung der gewebsspezifischen zellulären Interaktionen zu erreichen. Wichtig bei der Bewertung zellbiologischer Untersuchungen ist, ob die Versuche an einer Primärkultur oder an bereits etablierten Zelllinien durchgeführt wurden.

Es sind auch Unterschiede zwischen Tumorzellen und Normalzellen bekannt. Hierbei ist einer der charakteristischsten biochemischen Unterschiede der Normalzelle zur rasch proliferierenden Tumorzelle der hohe Anteil der aeroben Glykolyse am Energiestoffwechsel der Tumorzelle (Schneider, 1981). Für die vorliegende Arbeit hat der Unterschied zwischen Tumorzelle und Normalzelle hinsichtlich der aeroben Glykolyse keine Bedeutung, da sie keinen Einfluss auf die toxische Wirkung der untersuchten Substanzen hat. Ein weiterer Unterschied der Biochemie der Tumorzelle im Vergleich zur Normalzelle ist das Abnehmen langket-

tiger Glykolipide im Tumorgewebe mit steigender Tumorigenität und damit mit steigender Entdifferenzierung (Hanfland et al., 1977). Auch dieser Unterschied hat keine Bedeutung für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

2 Vor- und Nachteile der hier vorliegenden Untersuchung

Bei jeder in vitro Untersuchung müssen im Hinblick auf die realen Verhältnisse Kompromisse eingegangen werden. Bei der hier vorliegenden Untersuchung wurden standardisierte Probekörper der Versuchsmaterialien Amalgam und Gallium-alloy in zwei verschiedene Speichelersatzlösungen, Fusayama und NaCl/Laktat, eingebracht und über die festgelegten Zeiträume von 0 - 56 Tagen bei 37 °C inkubiert.

Die Extrakte wurden nun auf die Zellen der Zelllinien A-498 und Chang-Liver inkubiert und anschließend die Zellvitalität mittels Mikroskop gezählt. Eine denkbare Problematik ist hierbei, dass die im Mundraum durch Kontakt der Füllungsmaterialien mit dem Speichel entstandenen Extrakte nicht direkt in Kontakt zu Leber- und Nierenzellen treten. Für den Füllungswerkstoff Amalgam bestätigt dies die Stellungnahme der Deutsche Gesellschaft für Toxikologie und Pharmakologie unter Prof. Dr. Bolt zur Amalgamproblematik (1990). Sie nennt folgende Formen der Aufnahme von anorganischem Quecksilber aus den Amalgamfüllungen in den Körper; zum einen in Form von Ionen, zum anderen in Form von Quecksilberdampf. Hierbei handelt es sich um anorganisches Quecksilber. Die enterale Resorption von ionisiertem Quecksilber erreicht 15 %, die Aufnahme von Quecksilberdampf über die Lunge erreicht bei Mundatmung ca. 80 %. Da aber die toxischen Elemente in Leber und Niere angereichert werden ist eine Untersuchung der Schäden, die durch die toxischen Elemente dieser Füllungsmaterialien bei den Zellen der entsprechenden Organe verursacht werden, sinnvoll.

Untersuchungen hinsichtlich der Biokompatibilität der Restaurationsmaterialien Amalgam und Gallium-alloy wurde 1992 von Kaga et al. angestellt, und die beiden Materialien hinsichtlich ihrer Toxizität miteinander verglichen. Es wurden sowohl zinkhaltige, als auch zinkfreie Amalgame und Gallium-alloy an menschlichen Gingivafibroblasten über einen Inkubationszeitraum von 24 Stunden mittels Filtertest untersucht. 1994 untersuchten Wataha et al. die Toxizität von Gallium-alloy, zinkhaltigem und zinkfreiem Amalgam im Vergleich zum Kontrollmaterial Teflon an Balb/c 3T3 Mäusefibroblasten. Die Toxizität wurde über die Aktivität der Succinatdehydrogenase (SDH) gemessen und mittels MTT-Test dargestellt. Somit ist die toxische Wirkung der Füllungsmaterialien Amalgam und Gallium-alloy im lokalen Bereich des Mundraumes, die Wirkung auf Gingivafibroblasten und Mäusefibroblasten bereits eingehend untersucht worden. Doch eine vergleichende Untersuchung einer systemischen toxischen Wirkung der aus den Füllungsmaterialien herausgelösten Metalle auf die Hauptspeicherorgane wurde bisher nicht durchgeführt.

Der Vorteil der vorliegenden Arbeit liegt in der Untersuchung der durch die systemische Toxizität der Füllungsmaterialien am stärksten betroffenen Organe, wodurch auf die Folgen für den Gesamtorganismus geschlossen werden kann. Bestätigt wird die Notwendigkeit dieses Versuchsansatzes auch durch die Untersuchung von Nylander et al. (1987) zur Quecksilberkonzentration in der Nierenrinde von Amalgamträgern. Diese ist im Durchschnitt neunfach höher als bei Nicht-Amalgamträgern. Es wurde vorwiegend anorganisches Quecksilber in den Organen entdeckt, was den Zusammenhang mit den Amalgamfüllungen unterstreicht, da aus der Nahrung hauptsächlich Methylquecksilber aufgenommen wird.

Durch die Herstellung der benötigten einheitlichen Probekörper war es möglich die Verarbeitbarkeit und die Handhabung der verwendeten Restaurationmaterialien zu beurteilen und miteinander zu vergleichen. Die Verarbeitung von Gallium-alloy ist der Verarbeitung des Amalgam unterlegen. Es lässt sich, im Vergleich zum Amalgam nur schwierig stopfen und bleibt an den Verarbeitungsinstrumenten kleben, außerdem werden diese bei der Verarbeitung angegriffen und wirken oxidiert. Bestätigt werden diese Beobachtungen von Marsh et al., (1992).

Das von Yamashita et al., (1995) empfohlene Einbringen von Alkohol vor der Trituration verbessert die Verarbeitbarkeit des Gallium-alloys zwar wesentlich, trotzdem ist es in der Verarbeitung einem Amalgam immer noch deutlich unterlegen.

3 Toxizität von Amalgam

Bis in die heutige Zeit hinein wurden eine Vielzahl von Arbeiten publiziert, die sich mit der Toxizität des Füllungswerkstoffes Amalgam beschäftigen. Die gesundheitliche Gefährdung durch Amalgam wird hierbei vom im Amalgam vorhandenen Quecksilber und der Exposition mit demselben abgeleitet.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Amalgam Probekörper über 0 - 56 Tage in den Speichelersatzlösungen Fusayama und NaCl/Laktat inkubiert. Der pH-Wert der Fusayama Speichelersatzlösung lag dabei zwischen pH 5,0 und pH 5,25 , der pH-Wert für die NaCl/Laktat Speichelersatzlösung bei ca. pH 2,3. Nach Entnahme der Amalgam Probekörper aus der NaCl/Laktat Speichelersatzlösung war bereits nach vier Tagen Inkubation eine Oxidation der Oberfläche des Probekörpers zu erkennen, ab dem 28. Tag der Inkubation wirkte die Oberfläche des Probekörpers komplett oxidiert und zeigte schwarze, porös wirkende Stellen. In der

Fusayama Speichelersatzlösung zeigte sich erst ab dem vierzehnten Tag der Inkubation eine beginnende Oxidation des Amalgam Probekörpers. Hierbei ist der Zusammenhang zwischen dem pH-Wert der Speichelersatzlösung, der Inkubationsdauer und den Veränderungen der Oberfläche der Amalgam Probekörper zu erkennen. Es findet eine stärkere Korrosion der Amalgam Probekörper in der SEL NaCl/Laktat mit dem sauren pH-Wert von 2,3 als in der SEL Fusayama mit dem pH-Wert von 5,25 statt. Diese Korrosion von Probekörpern in SEL ist auch von Psarras et al. (1992) festgestellt worden. Sie verwendeten für ihre Untersuchung Probekörper von zinkfreiem und zinkhaltigem Amalgam, sowie Galliumalloy, die in Kontakt zu L-929 gebracht wurden. Diese wurden über einen Zeitraum zwischen 1 und 10 Wochen in 0,9 % NaCl mit einem pH 6 eingelegt, um eine den realen Bedingungen entsprechende Korrosion zu erhalten. Die Korrosion des Restaurationsmaterials ist für einen großen Teil der freigesetzten Substanzen verantwortlich. Dieser Sachverhalt wurde bereits erkannt, was zur Entwicklung der korrosionsbeständigeren non-gamma-2 Amalgame führte.

Der Zusammenhang der bei der Inkubation der Probekörper in der SEL NaCl/Laktat und den durch den sauren pH-Wert freigesetzten toxischen Substanzen und der verstärkten Korrosion der Probekörper wird von den Ergebnissen der zellbiologischen Untersuchung bestätigt. Sowohl für die Zellen der Zelllinie A-498 als auch für die Zellen der Zelllinie Chang-Liver, die mit dem aus den in der SEL NaCl/Laktat inkubierten Amalgam Probekörpern entstandenen Extrakt 72 Stunden lang inkubiert wurden, lässt sich eine Reduktion der Zellvitalität feststellen. Bei den A-498 Zellen war die Reduktion der Zellvitalität bei einer Verdünnung von 1 : 10 ab einer Inkubationsperiode von $t = 4$ signifikant; bei einer Verdünnung von 1 : 20 erst ab $t = 14$. Bei der Verdünnung von 1 : 10 ab $t = 28$ und bei der Verdünnung von 1 : 20 ab $t = 56$ war ein Absterben der Zellen fest-

zustellen. Die Reduktion der Zellvitalität war ebenfalls bei den Chang-Liver Zellen festzustellen. Bei einer Verdünnung von 1 : 10 war sie ab einer Inkubationsperiode von $t = 14$ signifikant und ab $t = 28$ war ein Absterben der Zellen sichtbar. Die Signifikanz der Reduktion der Zellvitalität war bei der Verdünnung von 1 : 20 ab $t = 28$ zu erkennen und bei $t = 56$ war auch hier ein Absterben der Zellen zu erkennen. Dahingegen war bei den in der SEL Fusayama inkubierten Amalgam Probekörpern zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Minderung der Zellvitalität festzustellen. Dies trifft sowohl für die mit Chang-Liver Zellen, als auch für die mit A-498 Zellen inkubierten Amalgam Probekörper zu.

Die in der SEL NaCl/Laktat inkubierten Amalgam Probekörper führten zu einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität, sowohl bei den Chang-Liver Zellen, als auch bei den A-498 Zellen. Mit zunehmender Dauer der Inkubationsperiode wurde die toxische Wirkung auf die Zellen beider Zellstämme stärker, die Zellvitalität wurde nicht mehr gemindert, es hat ein Absterben der Zellen stattgefunden. Die Untersuchung zeigt den direkten Zusammenhang zwischen dem sauren pH-Wert der SEL NaCl/Laktat, der Zeitdauer der Inkubationsperiode und den Folgen auf die Zellen der A-498 und Chang-Liver Zellstämme. Offensichtlich induziert der saure pH-Wert eine Freisetzung von Substanzen, die mit der Inkubationsdauer zunimmt, und bei der die freigesetzten Substanzen eine toxische Wirkung auf die Zellen in der vorliegenden Untersuchung haben. Bei den freigesetzten Substanzen handelt es sich um das zur eta-Phase gehörenden Zinn, das zwar zu Anfang verstärkt freigesetzt wird, aber im Laufe der Inkubationsdauer abnimmt. Dagegen steigen die Werte für Kupfer und Quecksilber mit Zunahme der Inkubationsdauer an. Vor allem Kupfer schien die Zellvitalität beider Zelllinien stark zu reduzieren, so dass die Zahl der Zellen zu Versuchsanfang größer war als die

Zellzahl zu Versuchsende. Doch auch Quecksilber schien die Zellvitalität negativ zu beeinflussen.

Eine starke toxische Wirkung von zinkhaltigem Amalgam und eine geringfügige toxische Wirkung von zinkfreiem Amalgam wurde bereits nachgewiesen (Kaga et al., 1992). Diese Untersuchung wurde an menschlichen Gingivafibroblasten über einen Inkubationszeitraum von 24 Stunden durchgeführt. Um die toxischen Substanzen, die aus den Füllungs-materialien freigesetzt wurden, zu identifizieren erfolgte eine Analyse der Extrakte. Zusätzlich wurden die nachgewiesenen Substanzen hinsichtlich ihrer Toxizität miteinander verglichen mit dem Ergebnis, dass von Zinn keine Toxizität, von Silber und Quecksilber eine höhere Toxizität ausgeht, die aber zwei bis dreimal kleiner ist als die bei Zink und Kupfer festgestellte Toxizität (Kaga et al., 1992). Die Freisetzung der hier festgestellten Metalle wird auch von Wataha et al. (1994) bestätigt. Sie stellten fest, dass zinkfreies Amalgam geringe Mengen an Quecksilber und Silber, allerdings signifikante Mengen an Kupfer freisetzte. Geringe Mengen von Quecksilber, Silber und Kupfer wurden vom zinkhaltigen Amalgam freigesetzt. Die Menge an Zink war in den Zeiträumen 0-8 und 8-48 Stunden signifikant hoch.

Da in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine erhöhte Freisetzung von Quecksilber und Kupfer in der Analyse nachgewiesen wurde, könnten diese Substanzen für die toxische Wirkung in den Versuchen verantwortlich sein. Bei $t = 56$ wurde Kupferionen in einer Konzentration von $840 \mu\text{g/ml}$ Extrakt freigesetzt. Bei Quecksilberionen betrug die Konzentration zu selben Zeitpunkt $1,6 \mu\text{g/ml}$ Extrakt.

Lokale Nebenwirkungen, die von korrodierten Amalgamfüllungen ausgehen sind Amalgampigmentierungen und orale lichenoiden Läsionen

(Geurtsen 1990). Die Einlagerung von Amalgampartikeln, oder der durch Korrosion freigesetzten Substanzen, wie Quecksilber, Zinn, oder Silber können zu chronischen Entzündungsreaktionen der Mundschleimhaut führen, die letztendlich eine Pigmentierung der Mundschleimhaut zur Folge haben (Shiloah et al., 1998). Auch beim Lichen ruber planus wurde eine enge räumliche Beziehung zu einer Amalgamfüllung nachgewiesen (Lind et al., 1986). Diese Untersuchungen bestätigen die lokale Wirkung des Amalgams bzw. seiner Abbauprodukte, doch auch seine systemische Wirkung ist dokumentiert (Egglestone und Nylander, 1987; Nylander et al., 1987). Diese Untersuchungen bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und verdeutlichen die toxische Wirkung des Amalgams und seiner Korrosionsprodukte.

4 Toxizität von Gallium-alloy

Um einer möglichen Toxizität vor allem durch das Quecksilber aus den Amalgamrestorationen zu begegnen, wurde nach alternativen Lösungen gesucht, was zur Entwicklung von Gallium-alloy führte.

Als Ergebnis der hier vorliegenden Arbeit lässt sich sowohl für die Zellen der Zelllinie A-498 als auch für die Zellen der Zelllinie Chang-Liver, die mit dem aus den in der SEL NaCl/Laktat inkubierten Gallium-alloy Probekörpern entstandenen Extrakt 72 Stunden lang inkubiert wurden, eine Reduktion der Zellvitalität feststellen. Bei einer Verdünnung von 1 : 10 (200 µl) trat bereits ab $t = 2$ eine signifikante Reduktion der Zellvitalität der A-498 Zellen auf. Klar zu erkennen war ab $t = 7$ ein massives Absterben der Zellen. Bei der Verdünnung 1 : 20 (100 µl) war eine signifikante Minderung der Zellvitalität erst ab $t = 4$ zu bemerken. Ein Absterben der Zellen fand ab $t = 14$ statt. Bei den Chang-Liver Zellen war bei einer Verdünnung von 1 : 10 ab $t = 2$ eine signifikante Reduktion der Zellvitalität sichtbar, ab $t = 7$ hat ein Absterben der Zellen stattgefunden. Bei der

Verdünnung von 1 : 20 war bei den Chang-Liver Zellen ab $t = 2$ eine signifikante Minderung der Zellvitalität zu sehen, die bei $t = 7$ in ein Absterben der Zellen überging.

Die toxische Wirkung des Gallium-alloys trat, wie auch schon beim Amalgam bei den in der SEL NaCl/Laktat inkubierten Probekörper auf. Da hier die Reduktion der Zellvitalität für beide Zellstämme, A-498 und Chang-Liver Zellen, signifikant war und in einen massive Zelltod überging, war eine toxische Wirkung der in Lösung gegangenen Substanzen offensichtlich. Hierfür sprach auch die Korrelation zwischen den Konzentration der zugegebenen Extrakte und der toxischen Wirkung auf die A-498 Zellen. Die beobachteten Vorgänge zwischen den Gallium-alloy Probekörpern und der SEL Fusayama und der SEL NaCl/Laktat belegen, sowohl bei den in der SEL Fusayama, als auch bei den in der SEL NaCl/Laktat inkubierten Probekörpern, ablaufende Reaktionen.

Eine starke Oxidation des Gallium-alloys wurde auch schon bei klinischen Untersuchungen von Osborne et al. (1999) festgestellt. Sie untersuchten 30 Klasse I Restaurationen bei 9 Patienten über einen Zeitraum von 3 Jahren. Bei fast allen Restaurationen mit Gallium-alloy stellten Osborne et al. raue Oberflächen, Frakturen an den Füllungsrandern, und Verfärbungen, bzw. Oxidation der Füllungen fest. Der von Yada et al. (1989) gemessene Gewichtsverlust durch Korrosion lag in 0,05 % HCL-Lösung und in 1 % Milchsäurelösung ein wenig höher als beim Amalgam, in 1 % NaCl und Speichersatzlösung war der Gewichtsverlust durch Korrosion mit dem vom Amalgam vergleichbar. Auch Wataha et al. (1994) beschrieben eine Korrosion der Gallium-alloy Probekörper, des weiteren Oberflächenrauigkeiten, eine stumpfe und glanzlose Oberfläche sowie Verfärbungen. Dies stellten auch Kim et al. (1988); Yamashita

et al. (1989); Den et al. (1991); Navarro et al. (1993); Sakai et al. (1993) bei ihren Untersuchungen fest.

Um festzustellen welche Substanzen sich aus den Gallium-alloy Probekörpern während der Inkubation in den SEL Fusayama und NaCl/Laktat herauslösen, wurde auch hier eine Analyse der Extrakte durchgeführt. Dabei war festzustellen, dass nur bei den in der SEL NaCl/Laktat inkubierten Probekörpern eine zunehmende Freisetzung von Gallium und Indium, und eine abnehmende Freisetzung von Zinn stattgefunden hat. Bei Gallium stieg der Wert bei $t = 56$ bis auf $1900 \mu\text{g/ml}$ Extrakt, bei Indium bis auf $51 \mu\text{g/ml}$ Extrakt. Auch hier lässt sich ein direkter Zusammenhang zwischen der Reduktion der Zellvitalität beider Zelllinien und dem Anstieg der Konzentration von Gallium und Indium im Extrakt belegen.

Es ist seit längerem bekannt, dass Galliumionen den Zellmetabolismus unterbrechen (Aoki et al., 1990; Wataha et al., 1991). Dieser Effekt wurde dazu genutzt Medikamente zu entwickeln, die Gallium als Wirkstoff besitzen. Diese Medikamente werden in der Onkologie zur Bekämpfung von Krebs genutzt. Eine deutlich toxische Wirkung auf den Gesamtorganismus und vor allem auf die Nieren wurde bereits dokumentiert (Foster et al., 1986). Dies belegt auch die in der vorliegende Arbeit nachgewiesene stark toxische Wirkung der in der SEL NaCl/Laktat inkubierten Gallium-alloy Probekörper auf Leber- und Nierenzellen. Somit kann man von einer deutlichen toxischen Belastung des Gesamtorganismus durch das Restaurationsmaterial Gallium-alloy sprechen. Zwar wurde für Gallium-alloy keine mutagene Wirkung nachgewiesen (Kaminishi et al., 1990), und auch für eine Irritation der Pulpa durch das Füllungsmaterial Gallium-alloy ließen sich keine Belege erbringen (Motokawa et al., 1987), doch die Biokompatibilität für den Gesamtorganismus bleibt weiter fraglich.

5 Schlussfolgerungen

Aus der hier vorliegenden Untersuchung geht hervor, dass sowohl Amalgam als auch Gallium-alloy bei einer Inkubation in künstlichem Speichel mit saurem pH-Wert, eine Reduktion der Zellvitalität beider Zelllinien zur Folge haben.

Beim Amalgam lässt sich die zytotoxische Wirkung auf die Zellen der beiden Zelllinien auf die zunehmende Konzentration von Kupfer und Amalgam im Extrakt zurückführen. Dieser Vorgang hängt direkt mit der Korrosion der Probekörper im künstlichen Speichel mit saurem pH-Wert zusammen. Somit kann auch den neueren hochkupferhaltigen non-gamma-2 Amalgamen keine unbedenkliche Biokompatibilität bescheinigt werden.

Gallium-alloy ist als Alternative zum Amalgam fragwürdig. Auch hier führt die Inkubation der Probekörper in künstlichem Speichel mit saurem pH-Wert zur Korrosion der Probekörper. Das hat beim Gallium-alloy eine ansteigende Konzentration von Gallium und Indium im Extrakt zur Folge. Somit tritt auch beim Gallium-alloy eine zytotoxische Wirkung auf, was zur Reduktion der Zellvitalität bei beiden Zelllinien führt. Die Biokompatibilität des Gallium-alloy ist also ebenfalls in Frage zu stellen.

E Zusammenfassung

Amalgam wird in der Zahnheilkunde schon seit 1819 als Füllungsmaterial eingesetzt. Die problematische Biokompatibilität des Amalgams wurde jahrzehntelang nicht oder nur wenig beachtet. Doch erst in den 1920-er Jahren wurde wegen der möglichen toxischen Reaktion auf das im Amalgam vorhandene Quecksilber nach einer Alternative gesucht. Gallium und Indium wurden in den 1950-er Jahren als Ersatz für Quecksilber verwendet und ein Füllungswerkstoff, Gallium-alloy, entwickelt, der mit dem konventionellen Amalgam vergleichbar war. Die klinischen Untersuchungen bezogen sich dabei auf einen Vergleich der Verarbeitbarkeit, der Haltbarkeit und der direkten Auswirkungen der beiden Füllungswerkstoffe auf den Zahn. Die *in vitro* Untersuchungen zum Vergleich der Biokompatibilität wurden in den 1990-er Jahren in erster Linie an Fibroblasten durchgeführt. Dabei war jedoch die Versuchsdauer meist zu kurz, um klinisch bedeutsame Aussagen treffen zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurde das toxische Potential von Amalgam und Gallium-alloy an Zellen der Organe Leber (Zelllinie Chang-Liver) und Niere (Zelllinie A-498) anhand zellbiologischer Testverfahren untersucht. Dabei wurde die toxische Wirkung anhand der Reduktion der Vitalität der Zellen untersucht und bei beiden Füllungsmaterialien miteinander verglichen. Auch der Zusammenhang zwischen pH-Wert des Speichels und der Verweildauer des Füllungsmaterials im künstlichen Speichel wurde bei der Untersuchung durch Verwendung von zwei Speichelerersatzlösungen, NaCl/Laktat und Fusayama, mit einem pH-Wert von 2,3 und 5,25 berücksichtigt. Die maximale Inkubationsperiode lag bei 56 Tagen. Die toxische Wirkung der beiden Füllungsmaterialien auf die Zelllinien kam aber nur bei den in der Speichelerersatzlösung NaCl/Laktat inkubierten Probekörper zustande, was sich hier auf die korrosionsbeding-

te Freisetzung von Füllungsbestandteilen, beim pH-Wert von 2,3, zurückführen lässt.

Bei den Zellen beider Zelllinien, die mit den Extrakten von den in der Speichelersatzlösung NaCl/Laktat inkubierten Amalgam Probekörpern behandelt wurden, war eine signifikante Reduktion der Zellvitalität zu beobachten, die bei der geringeren Verdünnung der Extrakte zum Zelltod führte. Im Gegensatz dazu war bei beiden Zellstämmen, die mit den Extrakten der in der Speichelersatzlösung Fusayama inkubierten Amalgam Probekörper behandelt wurden, keine signifikant vitalitätsvermindernde Wirkung der Extrakte festzustellen.

Das Extrakt der in der Speichelersatzlösung NaCl/Laktat inkubierten Gallium-alloy Probekörper führten mit zunehmender Inkubationsperiode zu einer Reduktion der Zellvitalität von A-498 und Chang-Liver Zellen. In der Speichelersatzlösung Fusayama hatten die Gallium-alloy Probekörper keine signifikant vitalitätsvermindernde Wirkung die beiden Zellstämme. Eine höhere Verdünnung verzögerte und verminderte bei beiden Zellstämmen die toxische Wirkung, doch eine dosisabhängige Reduktion der Zellvitalität bis hin zum Absterben der Zellen fand trotzdem statt.

Zusammenfassend zeigte sich, dass bei den Amalgam Probekörper im Vergleich zu den Gallium-alloy Probekörpern die toxische Wirkung der Extrakte erst verzögert und auch vermindert auftritt. Somit besitzen die Amalgam Extrakte eine geringer ausgeprägte Toxizität als die Gallium-alloy Extrakte.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass von Amalgam und Gallium-alloy eine toxische Wirkung auf A-498 und

Chang-Liver Zellen ausgeht. Dabei scheint im Falle des Amalgam vor allem die hohe Konzentration von Kupferionen und beim Gallium-alloy die hohe Konzentration von Galliumionen für diese Wirkung verantwortlich zu sein. Diese toxische Wirkung war bei beiden Restaurationsmaterialien und bei beiden Zelllinien sowohl dosis-abhängig, als auch abhängig von der Verweildauer im künstlichen Speichel. Sie war charakterisiert durch eine Reduktion der Zellvitalität (bei hoher Verdünnung des Extrakts) beziehungsweise durch Zelltod (bei niedriger Verdünnung des Extrakts). Im direkten Vergleich hinsichtlich der Toxizität von Amalgam und Gallium-alloy auf die beiden Zelllinien ließ sich eine stärkere toxische Wirkung des Gallium-alloy feststellen, so dass in der hier vorliegenden Untersuchung das Füllungsmaterial Gallium-alloy als Amalgamerersatz nicht empfohlen werden kann.

F Literatur

- Aoki Y, Lipsky MM, Fowler BA (1990).** Alteration in protein synthesis in primary cultures of rat kidney proximal tubule epithelial cells by exposure to gallium, indium and arsenite. *Toxicol Appl Pharmacol* 106:462-468
- Den M, Fujii H, Machida Y (1991).** Clinical study of gallium alloy restoration for children. *Shikwa Gakuho* 91:947-953
- Bolt HM, Greim H, Marquart H, Neumann HG, Oesch F, Ohnesorge FK, (Beratungskommission Toxikologie der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie) (1990).** Stellungnahme der Beratungskommission Toxikologie der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie zur Toxizität von Zahnfüllungen aus Amalgam. *Med Klin* 85:350-352
- Eggleston DW, Nylander M (1987).** Correlation of dental amalgam with mercury in brain tissue. *J Prosthet Dent* 58:704-707
- Eley BM (1997).** The future of dental amalgam: a review of the literature, Part 7: Possible alternative materials to amalgam for the restoration of posterior teeth. *Br Dent J* 183:11-14
- Foster BJ, Clagett-Carr K, Hoth D, Leyland-Jones B (1986).** Gallium nitrate: The second metal with clinical activity. *Cancer Treat Rep* 70:1311-1319
- Geurtsen W (1990).** Amalgam in der Diskussion. Zur Frage der Amalgamtoxizität und -allergie. *Philip Journal* 90:121-128
- Hanfland P, Uhlenbruck G (1977).** Einige Aspekte zur Biochemie der Tumorzelle. *Internist* 18:269-276
- Horibe T, Okamoto Y, Naruse S (1986).** Gallium-alloys for dental restorations. Part 1. Physical properties of gallium alloys. *J Fukuoka Dent Coll* 12:198-204

- Kaga M, Sakai T, Fujita M, Oguchi H (1992).** Comparative cytotoxic evaluation of gallium alloys and amalgams in cell culture. *Pediatric Dent J* 2:109-114
- Kaminishi H, Hagihara Y, Horibe T, Naruse S (1990).** Test of a gallium alloy for dental restorations for mutagenicity. *Medicine and Biology* 121:213-215
- Kim HW, Yada I, Ozaki M, Tsukamoto S, Toshida Y, Okamoto Y, Horibe T (1988).** The clinical observation of gallium alloy as a new dental restoration material for primary teeth. *J Fukuoka Dent Coll* 14:395-400
- Klaschka F, Matzick R (1988).** Allergologische Probleme bei mit Amalgamfüllungen versorgten Patienten. Amalgam – Pro und Contra. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln
- Lind PO et al (1986).** Amalgam related oral lichenoid reaction. *Scand J Dent Res* 94:448-451
- Lyon HW, Waterstrat RM, Paffenbarger GC (1966).** Soft tissue response to implant of gallium alloys and silver amalgam alloys. *J Am Dent Assoc* 72:659-664
- Mash LK, Miller BH, Nakajima H, Collard SM, Okabe T (1992).** The handling characteristics of a gallium alloy. *J Dent Res* 71:520
- Mash LK, Miller BH, Nakajima H, Guo IY, Okabe T (1997).** Handling characteristics of a gallium alloy triturated with alcohol. *Am J Dent* 10:199-202
- Masuhara T, Nakamura Y, Kuwashima H (1987a).** Study on toxicity of a new gallium alloy for dental restorations. Acute oral toxicity test of gallium alloy in rats and mice. *J Dent Health* 37:361-371
- Masuhara T, Nakamura Y, Kuwashima H (1987b).** Study on toxicity of a new gallium alloy for dental restorations. Subacute oral toxicity test of gallium alloy in rats. *J Dent Health* 37:372-378

- Motokawa W, Kubo Y, Soejima Y, Joujima H, Yoshida Y (1987).** Studies on biological evaluation of gallium alloy. 1. Pulp irritation in primary teeth. *J Fukuoka Dent Coll* 14:249-257
- Navarro MF, Franco EB, Bastos PA, Teixeira LC, Carvalho RM (1996).** Clinical evaluation of gallium alloy as a posterior restorative material. *Quintessence Int* 27:315-320
- Nylander M, Friberg L, Lind B (1987).** Mercury concentrations in the human brain and kidney in relation to exposure from dental amalgam fillings. *Swed Dent J* 11:179-187
- Okabe T, Woldu MK, Nakajima H (1991).** Characterization of a gallium alloy for dental restoration. *J Dent Res* 70:343
- Okabe T, Woldu MK, Nakajima H, Miller BH, Mash LK (1992).** Gallium alloys made from alloy powders for dental amalgam. *J Dent Res* 71:252
- Okamoto Y, Horibe T (1991).** Liquid gallium alloys for metallic plastic fillings. *Br Dent J* 170:23-26
- Osborne JW, Summitt JB (1999).** Direct placement gallium restorative alloy: a 3-year clinical evaluation. *Quintessence int* 30:49-53
- Psarras V, Wennberg A, Dérand T (1992).** Cytotoxicity of corroded gallium and dental amalgam alloys. *Acta Odontol Scand* 50:31-36
- Puttkammer A (1928).** Mercury free amalgam? *Zahnärztl Rundsch* 35:1450-1454
- Schneider F (1981).** Die aerobe Glykolyse der Tumorzelle. *Naturwissenschaften* 68:20-27
- Shiloah J, Covington JS, Schuman NJ (1988).** Reconstructive mucogingival surgery: the management of amalgam tattoo. *Quintessence Int* 19:489-492
- Smith DL, Caul HJ (1956).** Alloys of gallium with powdered metals as possible replacement for dental amalgams. *J Am Dent Assoc* 53:315-324

- Wataha JC, Hanks CT, Craig RG (1991).** The in vitro effects of metal cations on eukaryotic cell metabolism. *J Biomed Mater Res* 25:1133-1149
- Wataha JC, Hanks CT, Craig RG (1993).** The effect of cell monolayer density on the cytotoxicity of metal ions which are released from dental alloys. *Dent Mater* 9:172-176
- Wataha JC, Nakajima H, Hanks CT, Okabe T (1994).** Correlation of cytotoxicity with elemental release from mercury- and gallium-based dental alloys in vitro. *Dent Mater* 10:298-303
- Waterstrat RM (1969).** Evaluation of a gallium-palladium-tin alloy for restorative dentistry. *J Am Dent Assoc* 78:536-541
- Waterstrat RM, Longton RW (1964).** Gallium-palladium alloys as dental filling material. *Pub Health Rep* 79:638-642
- Weast RC (1985).** Handbook of Physics and Chemistry. 66. Edn. CRC Press Inc., Boca Raton FL/USA.
- Yada I (1989).** A basic study on gallium alloys for dental restorations. Improvement of liquid gallium alloy. *J Fukuoka Dent Coll* 16:97-117
- Yamashita T, Itoh K, Wakumoto S (1989).** Clinical study of an experimental gallium containing alloy. *Dent Mater J* 8:135-140
- Yamashita T, Nakajima H, Okabe T (1995).** Physical and mechanical properties of gallium alloy triturated with alcohol. *J Dent Res* 74:103-108
- Yoshida H, Tsuji M, Chang H, Higashimura S, Tominaga Y (1988).** The basic study on gallium alloy for restoration. Pulpal responses following restoration. *J J Conserv Dent* 31:1004-1012
- Ziff S, Till T (1985).** Amalgam- Die toxische Zeitbombe. Felicitas Hübner Verlag, Waldeck

Lebenslauf

Name: Sebastian Steffen Ungerer
Adresse: Forststr. 211
70193 Stuttgart

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 20. Oktober 1974
Geburtsort: Sindelfingen Kreis Böblingen
Nationalität: deutsch
Eltern: Rolf Ungerer
Ursula Ungerer
Geschwister: Dorothee Bauer, geb. Ungerer

Ausbildungsweg

Sommer 1981: Einschulung an der Schlehengäu-Schule in Gechingen
Kreis Calw
Sommer 1985: Übertritt an das Hermann-Hesse-Gymnasium in Calw
Sommer 1988: Übertritt an das Albert-Einstein-Gymnasium in Böb-
lingen
17. Juni 1994: Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife
1994- 2002: Studium der Zahnheilkunde an der Eberhard-Karls-
Universität in Tübingen
26. März 2002: Staatsexamen an der Eberhard-Karls-Universität in
Tübingen
01. Juli 2002: Approbation als Zahnarzt
Seit Juli 2002: angestellt als Assistenz Zahnarzt