

Einfluss von zur Parodontaltherapie verwendeten Substanzen auf Zellen des equinen Parodontiums

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Hannah Ringeisen

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie

Betreuer: Prof. Dr. Carsten Staszky

Einfluss von zur Parodontaltherapie verwendeten Substanzen auf Zellen des equinen Parodontiums

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Hannah Ringeisen

Tierärztin aus Düsseldorf

Gießen 2017

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:

Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Carsten Staszyk

Prof. Dr. Michael Röcken

Tag der Disputation: 01.11.2017

*Meiner Familie,
insbesondere meinem Vater,
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.*

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
1.1	Abkürzungen	1
1.2	Maßeinheiten	2
2	Einleitung und Fragestellung	3
2.1	Einleitung	3
2.2	Frage- und Aufgabenstellung	4
3	Literaturübersicht	5
3.1	Parodontium	5
3.1.1	Allgemeine Definition des Parodontiums	5
3.1.2	Das Parodontium brachyodonter Zähne	6
3.1.3	Besonderheiten des equinen Parodontiums	6
3.2	Parodontalerkrankungen	7
3.2.1	Parodontalerkrankungen bei Mensch und Hund	7
3.2.2	Besonderheiten von equinen Parodontalerkrankungen	9
3.3	Parodontaltherapien	12
3.3.1	Parodontaltherapie beim Menschen	12
3.3.2	Parodontaltherapie beim Hund	13
3.3.3	Parodontaltherapie beim Pferd	14
3.3.4	Medikamente und Substanzen in der Parodontaltherapie	15
3.3.5	Einsatz von Substanzen bei der equinen Parodontaltherapie	18
3.4	Biokompatibilitätsstudien für zahnmedizinische Materialien	19
3.4.1	Methodik	19
3.4.2	Prüfung von Materialien für die Anwendung bei Menschen	20
3.4.3	Umwidmung von Arzneimitteln	21

3.5	Genexpression parodontaler Zellen	22
3.5.1	Physiologische Genexpression	22
3.5.2	Genexpression im Entzündungsmodell.....	23
4	Material und Methoden	25
4.1	Material	25
4.1.1	Zahnmedizinische Materialien	25
4.1.2	Chemikalien.....	27
4.1.3	Geräte.....	28
4.1.4	Verbrauchsmaterialien	29
4.1.5	Software	30
4.2	Methoden	31
4.2.1	Zellkultur der equinen parodontalen Fibroblasten	31
4.2.2	Herstellung des Zell-Substanz-Kontaktes	33
4.2.3	Zeitlicher Ablauf der Versuche	34
4.2.4	Mikroskopische Analyse.....	34
4.2.5	MTT-Test.....	34
4.2.6	RNA-Isolierung und RT-qPCR	36
4.3	Statistik	43
4.3.1	Viabilitätsvergleich.....	43
4.3.2	Expressionsvergleich	43
5	Ergebnisse	45
5.1	Zellkultur	45
5.2	Mikroskopische Analyse	45
5.3	Viabilitätstest	47

5.4	Markergen-Expression	49
5.4.1	Standard RT-PCR	49
5.4.2	Positiv- und Negativkontrollen	50
5.4.3	Eluate der zahnmedizinischen Materialien	53
6	Diskussion	57
6.1	Auswahl des Untersuchungsmaterials	57
6.2	Auswahl der zahnmedizinischen Materialien	58
6.3	Eluate	61
6.4	Testverfahren	61
6.5	Markergene	63
6.6	Entzündungssituation	64
6.7	Übertragbarkeit der <i>in-vitro</i> -Ergebnisse auf <i>in-vivo</i> -Situationen	65
6.8	Ausblick	66
7	Zusammenfassung	67
8	Summary	69
9	Anhang	71
9.1	Publikation und Vorträge	71
10	Danksagung	72
11	Erklärung	73
12	Literaturverzeichnis	74

1 Abkürzungsverzeichnis

1.1 Abkürzungen

ANOVA	Analysis of variance
β -Actin	Beta-Aktin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
cDNA	komplementäre DNA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EPF	Equine Parodontale Fibroblasten
FBS	Fetales Bovines Serum
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphate-Dehydrogenase
IL-1 β /-6/-8/-10	Interleukin-1 beta/-6/-8/-10
LPS	Lipopolysaccharide
MEM	Minimum Essential Medium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MNC	Mononukleäre Zellen
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NEAA	Non Essential Amino Acids
NTC	No Template Control
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDL	parodontales Ligament
PTGS2	Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2
RNA	Ribonucleic Acid
RT-qPCR	Quantitative Reverse Transkriptase PCR
SRP	Scaling and Root Planing
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha

1.2 Maßeinheiten

°C	Grad Celsius
cm ²	Quadratcentimeter
g	Gramm
h	Stunde(n)
IE	internationale Einheiten
l	Liter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
min	Minute(n)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
nm	Nanometer
OD	optical density = optische Dichte
sec	Sekunde(n)
U	units = Einheiten
× g	Maßeinheit für die Beschleunigung

2 Einleitung und Fragestellung

2.1 Einleitung

Trotz fortschreitender Entwicklungen in der Pferde Zahnmedizin stellen parodontale Erkrankungen weiterhin eine Herausforderung für die behandelnden Tierärzte dar. Abnorme Erweiterungen der Interdentalspalten zwischen den Backenzähnen führen häufig zum Einschluss von Futterpartikeln. In einem progredienten Krankheitsverlauf kommt es zu Irritationen der interdentalen Gingiva und schließlich zu entzündlichen Prozessen, die in die Tiefe des Parodontalspaltes absteigen. Hochgradig entzündetes Gewebe und die Bildung von interdentalen und parodontalen Taschen wird in klinischen Untersuchungen beobachtet. Abhängig von dem Schweregrad der Erkrankung werden verschiedene Therapiemethoden in der Literatur beschrieben.

Nach gründlicher Reinigung mit Entfernung der Futterpartikel und des nekrotischen Gewebes wird häufig eine Füllung angeraten, die das entzündete Gewebe zur besseren Heilung abdecken und vor dem erneuten Eindringen von Futter schützen soll. Ziel ist es eine vollständige Regeneration der natürlichen Zahnumgebung zu fördern. Verschiedene zahnmedizinische Materialien werden für diese Füllungen beschrieben, die jedoch aus der humanen Zahnmedizin umgewidmet werden müssen, da es hierfür bisher keine für Pferde zugelassenen Substanzen auf dem Markt gibt. In den meisten Fällen sind sie außerdem für ein gänzlich anderes Anwendungsgebiet vorgesehen. Es gilt dabei zu bedenken, dass equine parodontale Zellen deutliche Unterschiede in ihrer Produktivität und Regenerationsfähigkeit im Vergleich zu parodontalen Zellen nicht-equiner Spezies aufweisen. Dabei kommt natürlich die Frage auf, welche konkreten Auswirkungen die verwendeten Materialien auf parodontale Pferdezellen haben und ob die Ergebnisse humaner Zulassungsstudien uneingeschränkt übertragen werden können.

Die Überprüfung der zu verwendenden zahnmedizinischen Materialien in einem pferdespezifischen *in-vitro*-Modell kann folglich dazu beitragen, gezielt die vielversprechendsten Substanzen auszuwählen und Substanzen, die nachteilige Effekte auf equine Zellen haben, von weiteren klinischen Therapieversuchen auszuschließen.

Zu diesem Zweck wurden equine parodontale Zellen *in vitro* kultiviert und mit einer Auswahl von Füllmaterialien konfrontiert. Geeignete Testverfahren geben Auskunft über die Vitalität und Proliferationsfähigkeit der Zellen. Darüber hinaus wurde untersucht, ob und in welchem Umfang die Zellen mit Entzündungsreaktionen auf die Applikation der zu testenden Füllmaterialien reagieren.

2.2 Frage- und Aufgabenstellung

In konsekutiver Weise wurden folgende Forschungsfragen /-aufgaben bearbeitet:

- 1) Etablierung eines geeigneten pferdespezifischen Modells zur Überprüfung der Biokompatibilität von zahnmedizinischen Materialien auf equine parodontale Zellen
- 2) Vergleich verschiedener zahnmedizinischer Materialien in ihrer Wirkung auf die Viabilität und Genexpression equiner parodontaler Fibroblasten

3 Literaturübersicht

3.1 Parodontium

3.1.1 Allgemeine Definition des Parodontiums

Das Parodontium, im Deutschen auch Zahnhalteapparat genannt, besteht aus vier Anteilen (Schröder, 2000; Nanci, 2012):

- Zahn- oder Wurzelzement
- Ligamentum periodontale sive parodontales Ligament (PDL), auch als Desmodont bezeichnet
- Alveolarknochen
- Gingiva

Das PDL stellt die Verbindung zwischen dem Zahn und der Alveole her. Seine Aufgaben bestehen darin, den Zahn in seiner Position zu halten, multidirektionalen Kräften beim Kauen standzuhalten und gleichzeitig als Stoßdämpfer zu wirken (Lekic und McCulloch, 1996). Zu diesem Zweck besteht die Matrix größtenteils aus elastischen Kollagenfaser-Bündeln, auch Sharpey-Fasern genannt (Lekic und McCulloch, 1996; Schröder, 2000). Gebildet werden diese wiederum von Fibroblasten, die neben Zementoblasten, Osteoblasten und -klasten, Malassez-Zellresten, endothelialen Zellen und Makrophagen den Hauptanteil des zellulären Anteils des parodontalen Ligaments ausmachen (Lekic und McCulloch, 1996; Beertsen et al., 1997).

Charakteristisch für das PDL ist vor allem eine hohe Turnover- und Remodeling-Rate (Beertsen et al., 1997). Turnover bezeichnet die stetige Aufrechterhaltung eines Gewebes, bestehend aus Zelltod und Proliferation neuer Zellen, während Remodeling die Umbauprozesse mit denen sich ein Gewebe den aktuellen Anforderungen anpasst beinhaltet (Beertsen et al., 1997). Eine weitere wichtige Aufgabe des PDL ist es den Ausschub der Zähne aus dem Zahnfach in die Mundhöhle zu gewährleisten (Beertsen et al., 1997; Schröder, 2000).

3.1.2 Das Parodontium brachyodonter Zähne

Die meisten Säugetiere, wie auch Menschen und Hunde, besitzen brachy(o)donte, „niederkronige“, Zähne (Thomé, 2004). Hier liegt die relativ kurze Krone vollständig außerhalb des Zahnfachs und wird mit einer dementsprechend längeren Wurzel innerhalb der Alveole fortgesetzt. Der Vorschub der Zähne in die Maulhöhle ist mit der endgültigen Ausbildung des Dauergebisses abgeschlossen (Thomé, 2004; Evans und Lahunta, 2013). Das PDL hat ab diesem Zeitpunkt also nur noch eine Haltefunktion.

3.1.3 Besonderheiten des equinen Parodontiums

Hypsodonte, „hochkronige“, Zähne finden sich im Gebiss der Equiden (Wissdorf et al., 2010; Dixon und Du Toit, 2011). In der deutschen Literatur wird noch häufig der Begriff hypselodont verwendet (Thomé, 2004), der jedoch im eigentlichen Sinn zeitlebens wachsende, wurzellose Zähne bezeichnet, wie die Incisivi von Nagern (Tummers und Thesleff, 2003). Hypsodonte Zähne hingegen zeigen nur ein zeitlich begrenztes Längenwachstum über die Zeit ihres Erscheinens in der Mundhöhle hinaus. Daher verkürzen sich hypsodonte Zähne, im Gegensatz zu hypselodonten Zähnen, mit fortschreitendem Alter aufgrund des stetigen Abriebs an der Okklusalfäche (Wissdorf et al., 2010).

Die Zahnkrone hypsodonter Zähne wird aufgeteilt in eine klinische Krone, die in der Maulhöhle sichtbar ist, und eine intraalveolär verborgene Reservekrone (Dixon und Du Toit, 2011). Die verhältnismäßig kurzen Zahnwurzeln bilden sich apikal als echte Wurzeln erst ungefähr 5 Jahre nach dem erstmaligen Erscheinen in der Maulhöhle (Wissdorf et al., 2010). Der ständige Zahnabrieb von durchschnittlich 3 bis 4 mm pro Jahr (Wissdorf et al., 2010; Dixon und Du Toit, 2011) wird kompensiert durch eine stetige Eruption des Zahns, sodass die Länge der klinischen Krone recht konstant 15 bis 20 mm beträgt (Thomé, 2004), während die Reservekrone sich zunehmend verkürzt. Wenn schließlich die Reservekrone vollständig aufgebraucht ist, werden die Wurzelanteile in die Okklusionsebene vorgeschoben; man spricht ab dann von einem senilen Gebiss (Wissdorf et al., 2010). Als weitere Besonderheit ist der equine Zahn vollständig von Zement überzogen, wodurch es keinen Zement-Schmelz-Übergang zur Markierung der Grenze zwischen Krone und Wurzel gibt (Wissdorf et al., 2010).

Das Parodontium selbst unterscheidet sich in seinem anatomischen Aufbau nicht von dem brachyodonte Zähne. Jedoch kommt dem parodontalen Ligament des hypsodonten Gebisses wegen der lebenslangen Zahneruption eine bedeutende Aufgabe zu. Ausschlaggebend für den gleichmäßigen Ausschub ist die herausragende Aktivität der equinen parodontalen Fibroblasten (EPF) (Warhonowicz et al., 2006). Frühere Studien konnten zeigen, dass EPF eine hohe Rate an Proliferation und osteogener Differenzierung aufweisen (Mensing, 2009). Daher wird das equine Parodontium von Warhonowicz et al. (Warhonowicz et al., 2006) auch bezeichnet als "continuously remodeling system". Dies ist notwendig um gleichzeitig Zahnbefestigung und Zahnausschub zu gewährleisten (Staszuk und Gasse, 2007).

3.2 Parodontalerkrankungen

3.2.1 Parodontalerkrankungen bei Mensch und Hund

In der humanen Zahnmedizin umfasst die Parodontologie einen eigenständigen Fachbereich. Der wissenschaftliche Stand der Forschung ist dem der Tiermedizin dementsprechend ein großes Stück voraus. Einige Erkenntnisse können übernommen werden, andere müssen aufgrund der unterschiedlichen Anatomie, Ernährungs- und Verhaltensgewohnheiten der Tiere entsprechend evaluiert und angepasst werden. Die Bedeutsamkeit parodontaler Erkrankungen in der Gesellschaft wird deutlich in der Betrachtung aktueller Zahlen einer deutschlandweiten Studie (Jordan und Micheelis, 2016): Bei den jüngeren Erwachsenen (35- bis 44- Jährige) leiden demnach 48 % unter moderater Parodontitis (Sondierungstiefen der Zahnfleischtaschen 4 bis 5 mm) und weitere 10 % unter schwerer Parodontitis (Sondierungstiefen der Zahnfleischtaschen ab 6 mm). Bei den jüngeren Senioren (65- bis 74- Jährige) wurde bei 51 % moderate Parodontitis und bei 25 % schwere Parodontitis diagnostiziert.

Der Begriff Parodontalerkrankungen wird zunächst eingeteilt in alleinige entzündliche Erkrankungen der Gingiva (Gingivitis) und entzündliche Erkrankungen des gesamten Parodontiums (Parodontitis) (Kinane, 2001). Eine Gingivitis muss nicht immer zu einer Parodontitis führen, aber einer Parodontitis geht stets eine Gingivitis voraus (Brown und Loe, 1993). Wie zahlreich dokumentiert wurde, beginnt die Ätiologie der parodontalen Erkrankung bei Menschen in den meisten Fällen mit der übermäßigen Ablagerungen von Plaque und Zahnstein am Zahn (Loe et al., 1965).

Plaque ist ein Biofilm, bestehend aus Bakterienkolonien in einer Matrix aus Polysacchariden und (Glyko-) Proteinen aus dem Speichel (Marsh und Bradshaw, 1995). Die Mikroflora umfasst grampositive und -negative Bakterien, darin sind auch fakultative und obligate Anaerobier enthalten (Marsh und Bradshaw, 1995). Zahnstein ist die kalzifizierte Form von Plaque. Beide gestalten sich vor allem dann als problematisch, wenn sie sich subgingival ansammeln, also im gingivalen Sulkus (Kinane, 2001).

Im Zusammenspiel mit verschiedenen Risikofaktoren wie Alter, genetischer Prädisposition und systemischen Erkrankungen kommt es dann zur Manifestierung einer klinischen Parodontitis (Kinane, 2001). Auch ein mikrobiologischer Shift, also eine veränderte bakterielle Zusammensetzung der Plaque mit pathogenen Spezies, wird häufig verantwortlich gemacht (Zambon, 1996; Kinane, 2001). Im Zusammenhang mit Parodontalerkrankungen werden vor allem gehäuft gramnegative, häufig anaerobe Bakterien nachgewiesen wie *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* und *Tannerella forsythia* (ehemaliger Name *Bacteroides forsythus*) (Marsh und Bradshaw, 1995; Zambon, 1996; Slots und Ting, 1999).

Im weiteren Verlauf können verschiedene Enzyme wie Kollagenasen und Proteasen, die sowohl von den pathogenen Bakterien als auch durch Makrophagen und Fibroblasten als körpereigene Immunantwort produziert werden, den Zahnhalteapparat kontinuierlich zerstören (Kinane, 2001; Pihlstrom et al., 2005). Von besonderer Bedeutung sind dabei Matrix-Metallo-Proteasen (MMP), die von verschiedenen Zellen des parodontalen Gewebes sezerniert werden (Cavalla et al., 2017). Klinisch lässt sich neben den typischen Anzeichen eine Entzündung der Gingiva, wie Rötung, Schwellung und Schmerzhaftigkeit, ein Zahnfleischrückgang nach apikal mit Bildung von Parodontaltaschen erkennen (Kinane, 2001). Bei ausbleibender Therapie besteht die Gefahr des Zahnverlustes durch Zerstörung des parodontalen Ligaments und Resorption des Alveolarknochens (Kinane, 2001).

Die diagnostischen Möglichkeiten sind vielfältig und diverse Indizes zur Einteilung des Schweregrades finden Anwendung. Beurteilt werden, je nach Autor, das Ausmaß der Plaque-Anlagerung, der Zustand der Gingiva, eventuelle Sulkusblutungen bei der Sondierung oder ein Attachmentverlust (Brown und Loe, 1993). Letzteres beschreibt das Ausmaß der gingivalen Rezession, gemessen vom apikalen Taschenboden bis zur Schmelz-Zement-Grenze. Häufig wird auch die Tiefe des gingivalen Sulkus oder,

im Falle einer Parodontitis, der Parodontaltasche herangezogen. Sulkustiefen bis 3 mm werden hier als physiologisch zu betrachten (Brown und Loe, 1993), während weitere Kategorisierungen der Taschentiefe in milde, moderate und schwere Formen der Parodontitis variieren.

Parodontalerkrankungen bei Hunden sind denen von Menschen sehr ähnlich (Gad, 1968). Sie werden deshalb gerne als Tiermodell für die humane Parodontalforschung herangezogen (Giannobile et al., 1994). Experimentell konnte bei Hunden Parodontitis allein durch die Anlagerung von Plaque herbeigeführt werden (Lindhe et al., 1973). In einer molekularbiologischen Studie konnten viele verschiedene Bakterien identifiziert werden, die vermutlich parodontitis-assoziiert sind, wie *Actinomyces canis* und *Desulfomicrobium orale* (Riggio et al., 2011). Die parodontale Diagnostik wurde in vielen Teilen aus der Humanmedizin übernommen. So wird beispielsweise die Sulkustiefe beurteilt und bis 3 mm als physiologisch betrachtet (Cleland, 2000).

3.2.2 Besonderheiten von equinen Parodontalerkrankungen

Parodontale Erkrankungen bei Pferden sind in der Literatur vielfach beschrieben. Sie werden mit unterschiedlich hoher Prävalenz vorgefunden, die je nach Autor zwischen 22,3 % und 60 % variiert (Baker, 1979; Walker et al., 2012; Chinkangsadarn et al., 2015). Mit zunehmendem Alter steigt die Prävalenz, sodass die beschriebenen 60 % bei Tieren über 15 Jahren ausgezählt wurden (Baker, 1979) und in einer Studie mit Pferden über 30 Jahren sogar 75 % betroffen waren (Ireland et al., 2012).

Gemäß Klugh (Klugh, 2005) definiert der Begriff der „parodontalen Erkrankung“ sowohl den akut veränderlichen Zustand des Parodontiums, als auch den bestehend veränderten. „Parodontitis“ hingegen bezeichne nur den aktiven, entzündeten Zustand, „Gingivitis“ nur die Entzündung der Gingiva. Nach Tremaine (Tremaine, 2013) umfasst eine parodontale Erkrankung Gingivitis, Parodontitis, Alveolarknochenrückgang und in einigen Fällen auch peripheren subgingivalen Karies.

Im Gegensatz zu Menschen und Kleintieren gibt es bei Pferden nur sehr selten primäre oder klassische parodontale Erkrankungen durch Ansammlung von Plaque und Zahnstein (Dixon et al., 2000; Klugh, 2005). Üblicherweise entstehen sie sekundär im Zusammenhang mit erweiterten Interdentalspalten (Little, 1913; Baker, 1979), welche häufig als *Diastemata* bezeichnet werden (Collins und Dixon, 2005; Cox et al., 2012;

Walker et al., 2012; Kennedy und Dixon, 2016). Korrekterweise wäre hier der Zusatz „pathologisch“ angebracht, zur Abgrenzung vom „physiologischen“ Diastema, auch als Margo interalveolaris oder „Lade“ bezeichnet, das den zahnfreien Bereich zwischen den Vorder- und Backenzähnen bei Equiden darstellt (Thomé, 2004; Wissdorf und Otto, 2010). Pathologische Diastemata können angeboren oder erworben sein. Letzteres kann durch natürlichen oder traumatischen Zahnverlust oder durch Zahnextraktion entstehen. Ebenso kann ein ungleichmäßigen Abrieb der Zähne zu einer Malokklusion führen und durch die veränderten Scherkräfte ein Auseinanderdriften der Zähne bewirken (Greene und Basile, 2002; Klugh, 2005). Zumeist sind die Prämolaren und Molaren betroffen, die Incisivi seltener (Collins und Dixon, 2005; Dixon und Dacre, 2005).

Eine Korrelation des Vorkommens von Diastemata und parodontalen Erkrankungen, gekennzeichnet durch das Vorfinden von Parodontaltaschen, wurde sowohl in klinischen (Simhofer et al., 2008; Walker et al., 2012) als auch in pathologischen Studien (Baker, 1979; Chinkangsadarn et al., 2015) festgestellt. In vielen Fällen besteht okklusal nur ein schmaler Spalt zwischen den benachbarten Zähnen, während die klinischen Kronen in apikaler Richtung allerdings deutlich auseinanderweichen, sodass sogenannte Ventildiastemata, „valve diastemata“ im Englischen, entstehen (Carmalt, 2003). Formbedingt kann in solchen Fällen einmal in den Zahnzwischenraum eingearbeitetes Futter wie bei einem Ventil nur hinein-, aber nicht mehr herausbefördert werden.

Der permanente Einschluss von Futterpartikeln bringt eine Akkumulation von pathogenen Bakterien mit sich, welche wiederum Prozesse wie Fermentation und Fäulnis hervorrufen (Kennedy und Dixon, 2016). Ein verändertes Mikrobiom bei an Parodontitis erkrankten Pferden konnte im Vergleich zu klinisch gesunden Pferden festgestellt werden (Kennedy et al., 2016). Es entsteht zunächst eine Gingivitis durch die mechanische Reizung der Futterpartikel als Fremdkörper, sowie durch bakterielle und körpereigene Enzyme und Entzündungsmediatoren (Kennedy und Dixon, 2016). Schließlich wird das angrenzende Oberflächenepithel der interdentalen Gingiva erfasst und die einsetzende entzündliche Reaktion führt zu schmerzhaften Schädigungen der Gingiva und des Saumepithels (Klugh, 2005). So gelangen schließlich Bakterien in subgingivale Parodontalbereiche. Im weiteren Verlauf zieht sich das Gingivaepithel in apikale Richtung zurück (Easley und Odenweller, 2015), was zu einer Bildung von

parodontalen Taschen führt (Little, 1913; Klugh, 2005; Tremaine, 2013). Diese sind im Gegensatz zu Menschen und Kleintieren nicht nur bukkal und lingual beziehungsweise palatinal, sondern vor allem interdental zu finden (Cox et al., 2012).

Als Besonderheit des equinen Gebisses beschreibt Klugh (Klugh, 2005) eine sehr dünne interdendale Papille, die durch eine parodontale Entzündungen leicht zerstört werden kann. In diesen großen, kontaminierten Räumen der Parodontaltaschen zieht der bakterielle Metabolismus eine lokal erhöhte Enzymkonzentration nach sich, welche, in Verbindung mit der Entzündungsreaktion, weitere Nekrosen des Gewebes induziert (Kennedy und Dixon, 2016). Die zunehmende Tiefe der Taschen begünstigt wiederum die weitere Ansammlung von Futter. Es entsteht ein Teufelskreis, der unbehandelt fortschreitende Schädigungen am Parodontium und gewebeübergreifend am Alveolarknochen und dem Zahnzement bewirkt. Eine Lockerung der Zähne im Zahnfach bis hin zum Zahnverlust mit massiven funktionellen Störungen ist in diesem Fall unvermeidlich (Kennedy und Dixon, 2016).

In einer histopathologischen Studie an Pferden mit klinisch diagnostizierter Parodontalerkrankung wurden Stanzproben aus den betroffenen, interdentalen Bereichen entnommen (Cox et al., 2012). Als Befunde wurden vor allem Erosionen und Ulzerationen des Gingivaepithels, Exsudation von neutrophilen Granulozyten und assoziierte Bakterien im Zusammenhang mit interdentalen Futterpartikeln erhoben. In wenigen Fällen wurden Entzündungen im PDL mit zerrissenen Kollagenfasern vorgefunden.

Typische klinische Symptome, bedingt durch mittlere bis schwere orale Schmerzen werden von Tremaine (Tremaine, 2013) wie folgt beschrieben: langsames Fressen, Dysmastikation, orale Dysphagie (Wickelkauen), selektiver Appetit, Hypersalivation und Gewichtsverlust. Die Häufung der Prävalenz im höheren Alter erklären Greene und Basile (Greene und Basile, 2002) mit der Morphologie der Reservekrone. Da die mesiodistale Länge der Zähne im Alter deutlich kleiner ist, bieten die größer werdenden Zwischenräume mehr Platz für die Ansammlung von Futter. Außerdem entstehen häufiger Zahnlücken durch natürlichen Zahnverlust.

Einheitliche Schemata zur Abstufungen des Krankheitsgrades gibt es für Pferde bisher nicht. Häufig werden sie in Anlehnung an die humane Zahnmedizin nach der Tiefe der Parodontaltaschen (Klugh, 2005; Rucker, 2006; Casey, 2013) oder der Beweglichkeit

der Zähne (Klugh, 2005) eingeteilt. Ein Zahnfleischrückgang kann wegen des fehlenden Zement-Schmelz-Übergangs nur im Vergleich zu benachbarten Zähnen festgestellt werden (Klugh, 2005).

Aufgrund der zuvor beschriebenen außerordentlichen Regenerationsfähigkeit des equinen Parodontiums (Warhonowicz et al., 2006), das auch als „aktiv“ und mit hoher Vaskularisierung beschrieben wurde (Easley und Odenweller, 2015), besteht bei Pferden eine gute Prognose zur vollständigen Regeneration bei frühzeitiger Diagnose und adäquater Therapie (Greene und Basile, 2002; Easley und Odenweller, 2015). Etwas vorsichtiger wird eine gute Prognose für einen positiven Heilungsverlauf von anderen Autoren beschrieben (Carmalt et al., 2004; Collins und Dixon, 2005; Dixon und Dacre, 2005; Klugh, 2005). Dixon und Dacre (Dixon und Dacre, 2005) beschreiben, dass equine parodontale Erkrankungen nicht notwendigerweise irreversibel sind, da sich mit weiterem Zahnausschub ein neues parodontales Ligament entwickeln wird.

3.3 Parodontaltherapien

3.3.1 Parodontaltherapie beim Menschen

In der humanen Zahnmedizin liegt das Hauptaugenmerk auf der Parodontitisprävention. Eine regelmäßige und gründliche Mundhygiene beseitigt Plaque sehr zuverlässig (Löe et al., 1965). Im Falle einer klinischen Parodontitis gibt es eine große Anzahl etablierter nicht-invasiver und invasiver Therapieverfahren. Die am häufigsten angewandte nicht-invasive Behandlung ist das sogenannte „Scaling and Root Planing“ (SRP) (Deas et al., 2016). Scaling (Normierung) bezeichnet dabei die Entfernung von Plaque und Zahnstein von der Zahnoberfläche sowohl supra- als auch subgingival, während Root Planing (Wurzelglättung) die Entfernung von Zahnzement und Oberflächendentin beinhaltet, das sich rau, beschichtet mit Zahnstein oder kontaminiert mit Toxinen und Bakterien darstellt (American Academy of Periodontology, 2001). Die Kürettagen können mit Handinstrumenten, Schall- oder Ultraschallinstrumenten oder auch mit einem Laser durchgeführt werden (Krishna und Stefano, 2016). Der Behandlungserfolg wird gemessen an dem Attachementgewinn, also der wieder zunehmenden Anheftung von PDL und Saumepithel am Zahn, und der Reduktion der Taschentiefe und ist in seinem Ausmaß stark abhängig von der Ausgangssituation (Greenstein, 1992; Cugini et al., 2000).

Des Weiteren gibt es diverse invasive Operationsmethoden, die in der Literatur beschrieben werden und vor allem bei tiefen Taschen sowie ausbleibendem Erfolg des SRP Anwendung finden (Caffesse et al., 1986). Die Parodontaltaschen werden dabei chirurgisch geöffnet, um eine tiefe Kürettage durchzuführen. Zusätzlich können die Taschen reduziert oder vollständig eliminiert werden (Deas et al., 2016). In einer direkten Vergleichsstudie der therapeutischen Effekte von Wurzelglättung gegenüber Operationstechniken konnte gezeigt werden, dass mit den verwendeten OP-Methoden flachere Taschen erreicht wurden, jedoch der Attachmentgewinn mit einfacher Wurzelglättung am höchsten war (Isidor et al., 1984).

Die Prognose zu vollständiger Regeneration nach einer Schädigung des Parodontiums durch Parodontitis ist schlecht, üblicherweise kommt es lediglich zu einer Reparatur (Lekic und McCulloch, 1996). Histologisch lässt sich dabei häufig nur die Ausbildung eines langen Verbindungs- oder Saumepithels ohne vorhersehbare Neubildung von Wurzelzement, PDL und Alveolarknochen nachweisen (Wikesjö und Selvig, 1999).

3.3.2 Parodontaltherapie beim Hund

Die Therapiemethoden in der Kleintiermedizin entsprechen zum Großteil denen in der Humanmedizin. Präventiv kann eine angepasste Fütterung, durch Anbieten von Trockenfutter und Knochen, eine unkomplizierte Möglichkeit darstellen, aber auch orale Hygienemaßnahmen, wie Zähneputzen durch den Besitzer, sind möglich (Niemic, 2008). Liegt jedoch bereits eine Parodontalerkrankung vor, steht die Entfernung von Plaque und Zahnstein im Vordergrund (Cleland, 2000; Niemic, 2008). Dies geschieht für gewöhnlich in Allgemeinanästhesie, da die Behandlung recht schmerzhaft sein kann und bei den meisten Tieren die Kooperationsbereitschaft hierfür nicht genügt. Eine Maulspülung mit antiseptischer Lösung wird zur Senkung des bakteriellen Drucks angeraten (Niemic, 2008). Zunächst werden supragingivale Plaque und Zahnstein entfernt, dann subgingivale (Cleland, 2000; Niemic, 2008). Dabei ist der zweite Teil von größerer Bedeutung, weil etwaige zurückgelassene Reste zu einer erneuten Progression der Parodontalerkrankung beitragen können (Cleland, 2000). Die Zahnoberfläche wird im Anschluss poliert (Niemic, 2008). Auch für die Kleintierchirurgie werden Operationsmethoden als Parodontaltherapie beschrieben, die aus der Humanmedizin übernommen wurden (Anthony, 2000).

3.3.3 Parodontaltherapie beim Pferd

Es gibt viele verschiedene Ansätze zur Behandlung parodontaler Erkrankungen, die bis dato noch auf keinen Konsens gebracht werden konnten. Einig sind sich die Autoren aber darüber, dass eine gründliche Reinigung der Parodontaltaschen mit Entfernung der Futterpartikel an erster Stelle stehen sollte (Greene und Basile, 2002; Collins und Dixon, 2005; Dixon und Dacre, 2005; Johnson und Porter, 2006; Rucker, 2006; Tremaine, 2013; Easley und Odenweller, 2015). Dies kann mit Wasser- oder Luftdruck und zahnmedizinischen Instrumenten geschehen (Tremaine, 2013). Collins und Dixon (Collins und Dixon, 2005) empfehlen eine Hochdruck-Reinigung mit Natriumbicarbonat-Lösung. Ein Débridement des nekrotischen Gewebes kann folgen (Klugh, 2005; Tremaine, 2013).

Als Nächstes muss der erweiterte Interdentalspalt entweder vollständig verschlossen oder so stark erweitert werden, dass es nicht zu einer permanenten Ansammlung von Futterpartikeln kommt. Nur so kann der Teufelskreis aus Futtereinsprießungen und Entzündungsproliferation durchbrochen werden. Einige Autoren empfehlen nach Reinigung und Débridement eine Füllung der Parodontaltaschen, zur Abdeckung des entzündeten Gewebes und zur Verhinderung des erneuten Eindringens von Futterpartikeln (Greene und Basile, 2002; Collins und Dixon, 2005; Johnson und Porter, 2006; Du Toit, 2012; Tremaine, 2013; Easley und Odenweller, 2015). Andere Autoren empfehlen ein Ausfräsen des Interdentalspaltes (Odontoplastik) zur Erweiterung des pathologischen Diastemas, teilweise auch in Kombination mit einer Füllung (Carmalt et al., 2004; Collins und Dixon, 2005; Dixon und Dacre, 2005; Rucker, 2006; Easley und Odenweller, 2015).

Zusätzlich, neben diätetischen Maßnahmen wie kurzfaserigem Raufutter (Collins und Dixon, 2005; Dixon und Dacre, 2005; Easley und Odenweller, 2015), sollte die Malokklusion des Gebisses beseitigt werden (Collins und Dixon, 2005; Klugh, 2005; Rucker, 2006; Easley und Odenweller, 2015) oder auch die gegenüberliegenden Zähne zur Druckentlastung gekürzt werden (Collins und Dixon, 2005; Dixon und Dacre, 2005). Zusätzlich kann ein benachbarter Zahn extrahiert oder eine orthodontische Korrektur in Form einer Art Zahnspange vorgenommen werden (Collins und Dixon, 2005; Easley und Odenweller, 2015). Stark gelockerte Zähne haben eine schlechte Prognose und sollten daher extrahiert werden, um einer anhaltenden

Reizung des Parodontiums und der Gingiva vorzubeugen (Klugh, 2005; Rucker, 2006; Easley und Odenweller, 2015).

Die Erfolgsraten verschiedener Parodontalbehandlungen beim Pferd, gemessen an der Reduktion der Taschentiefe nach 2 und 6 Monaten, wurde in einer Studie von Jackson et al. (Jackson et al., 2016) untersucht. Darin wurden vier Behandlungsmethoden verglichen: 1. Entfernung von Futterpartikeln und Reinigung der Taschen mit einer Chlorhexidin-Lösung sowie Anwendung einer Chlorhexidin-haltigen Mundspüllösung, 2. Zusätzlich zu 1 Eingabe einer Metronidazoltablette in den Taschenfundus, 3. Zusätzlich zu 1 und 2 Füllung der Tasche mit Vinylpolysiloxan, 4. Diastema-Erweiterung mit anschließender Füllung. Obwohl die Reduktion der Taschentiefe mit Behandlung 2, 3 und 4 größere Erfolge brachte als bei Behandlung 1, waren die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht statistisch signifikant.

3.3.4 Medikamente und Substanzen in der Parodontaltherapie

3.3.4.1 Antiseptika

Antiseptika wie Chlorhexidin, Povidon-Iod oder Natriumhypochlorit werden bei Menschen (Slots, 2012) und Hunden (Cleland, 2000; Niemiec, 2008) zur Mundspülung oder Sulkuslavage eingesetzt. Dabei werden die Bakterien in der Plaque abgetötet und das Entzündungsgeschehen gemildert, sodass vor allem in Kombination mit SRP die Repopulation mit pathogenen Keimen gehemmt wird (Slots, 2012). Auch wenn als alleinige Therapie Sulkuslavagen mit Chlorhexidin (in einer Konzentration von 0,2 %) durchgeführt wurden, konnten damit Therapieerfolge erzielt werden (Soh et al., 1982).

3.3.4.2 Antibiotika

Im Voraus muss an dieser Stelle differenziert werden zwischen der systemischen und der lokalen Darreichung von Antibiotika. Jepsen und Jepsen (Jepsen und Jepsen, 2016) definieren die jeweiligen Vor- und Nachteile sowie die unterschiedlichen Indikationen: Systemische Antibiotika wirken im gesamten Körper und daher auch in allen Bereichen der Mundhöhle. Andererseits kann es auch zu unerwünschten systemischen Nebenwirkungen kommen und Resistenzen werden hervorgerufen. Daher sollte eine systemische Anwendung ausschließlich bei schweren Fällen stattfinden oder bei solchen, die trotz vorausgegangener Therapie weiter voranschreiten (Jepsen und Jepsen, 2016). Eine Keimbestimmung in der gingivalen

Plaque, mit Anfertigung eines Antibiogramms, sollte im Vorfeld vorgenommen werden, um unzureichende Wirksamkeit und eine damit einhergehende Ausbildung von Resistenzen zu vermeiden (Slots, 2012). Lokale Antibiotika müssen sehr gezielt appliziert werden, um dann an der betroffenen Lokalisation genügend hohe Wirkstoffspiegel erreichen zu können. Durch entsprechende Formulierungen der Präparate, wie Gele oder Chips, kann sichergestellt werden, dass diese an Ort und Stelle verbleiben (Slots, 2012).

3.3.4.3 Calciumhydroxid

Calciumhydroxid ist seit vielen Jahrzehnten ein fester Bestandteil der humanen Zahnmedizin. Ein Großteil der Anwendungen findet im Wurzelkanal statt und stellt seit Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts den Behandlungsstandard für die direkte Pulpenüberkappung dar (Damaschke, 2008). Auch in der Parodontaltherapie kommt es vermehrt zum Einsatz. Die Haupteigenschaften, die Calciumhydroxid dabei so attraktiv machen, sind die bakterizide Wirkung und eine hypothetische Anregung der Wundheilung. Die Abwägung zwischen Wirksamkeit und Schädlichkeit wird jedoch kontrovers diskutiert.

In erster Linie sind die Eigenschaften abhängig von der Komposition des Calciumhydroxids. Gemäß Staehle et al. (Staehle et al., 1989) können folgende Gruppen unterschieden werden: Pulver, wässrige Lösung, ölige Suspension (Paste) und gebunden in Zementen, Lacken (Linern) oder Kunststoffpräparaten. In wässriger Lösung ist die Freisetzung von Calcium- und Hydroxidionen am höchsten, weniger wird freigesetzt von Zement, und bei Pasten, Linern und Kunststoffen geht kaum etwas in Lösung (Staehle et al., 1989). Die Hydroxidionen führen zu einer pH-Wert Steigerung auf 12 bis 13. Diese starke Alkalinisierung ist verantwortlich für die bakterizide Wirkung (Bystrom et al., 1985; Staehle et al., 1989; Dietz und Bartholmes, 1998). Sie zerstört die bakterielle Zellmembran, denaturiert Proteine und bewirkt DNA-Strangbrüche (Farhad und Mohammadi, 2005). Der bakterizide Effekt ist daher ebenfalls abhängig von der Komposition des Calciumhydroxids (Staehle et al., 1989). Wird Calciumhydroxid also zum Beispiel in einem öligen Medium aufgenommen, ist die Alkalinität deutlich geringer und ebenso geringer ist die bakterizide Wirksamkeit (Eick et al., 2014). Es gilt allerdings zu bedenken, dass der hohe pH-Wert auch toxisch für andere Zellen des Organismus ist und zu lokalen Gewebnekrosen führen kann (Dietz und Bartholmes, 1998; Eick et al., 2014).

Andererseits konnte eine Neubildung von Tertiärdentin in der Zahnpulpa nach Pulpenüberkappung mit wässriger Calciumhydroxid-Lösung bei *in vivo*-Versuchen nachgewiesen werden (Zander, 1939; Schröder, 1985). Aufgrund dieses proliferationsstimulierenden Potenzials, wurde die Verwendung in der Parodontaltherapie beim Menschen mehrfach untersucht (Kasaj et al., 2006; Schwarz et al., 2006; Kasaj et al., 2007; Kindermann, 2013). Dabei liegt der Fokus auf öligen Suspensionen (Pasten), die in Parodontaltaschen appliziert werden, wo sie eine hohe Verweildauer aufweisen und ihre Bestandteile langfristig als Depot abgeben. Kasaj et al. (Kasaj et al., 2007) konnten in einer *in-vitro*-Studie zeigen, dass eine ölige Suspension von Calciumhydroxid, Osteoinductal[®] (Osteoinductal Dietz GmbH, München), proliferationsfördernd auf Zellen des humanen PDL wirkt. Eine klinische Studie von Kasaj et al. (Kasaj et al., 2006) mit Osteoinductal[®], sowie eine Studie von Kindermann (Kindermann, 2013) mit der öligen Calciumhydroxid-Suspension Intradossal[®] (Merz-Dental, Lütjenburg), belegen eine Unterstützung der Heilung des parodontalen Weichgewebes bei subgingivaler Applikation nach SRP-Behandlung. Auch knöcherner parodontale Defekte konnten in einer Pilotstudie mit Osteoinductal[®] zur Heilung gebracht werden (Schwarz et al., 2006).

3.3.4.4 Zukunftsweisende Therapeutika

Als hoffnungsvoller Ansatz zur Parodontitisprophylaxe gilt eine Impfung gegen *Porphyromonas gingivalis*, die aber bislang nur in präklinischen Studien im Tiermodell getestet wurde (Jong und van der Reijden, 2010). Es gibt außerdem diverse Ansätze zur regenerativen Parodontaltherapie. Bei Defekten des Alveolarknochens werden häufig Knochen- und Knochenersatzmaterialien eingesetzt (Reynolds et al., 2003). Die gesteuerte Geweberegeneration, „guided tissue regeneration“, bewirkt durch den Einsatz von Barrieremembranen eine Hemmung des Tiefenwachstums des Saumeithels und ermöglicht damit eine Regeneration statt lediglich einer Reparatur (Karring et al., 1993). Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von mesenchymalen Stammzellen, gewonnen aus dem Knochenmark, dem PDL oder der Gingiva, die autolog, allogon oder xerogen sein können und in einen parodontalen Defekt appliziert werden (Bright et al., 2015; Zhu und Liang, 2015). Vor allem die Stammzelltherapie wird als sehr vielversprechend angesehen und ist daher Inhalt vieler aktueller Studien.

3.3.4.5 Spezielle Substanzen zugelassen für Hunde

Es gibt wenige Substanzen, die speziell zur Parodontaltherapie beim Hund zugelassen sind. Eine davon ist das Doxycyclin-haltige Gel Doxirobe[®] (Zoetis, Parsippany, New Jersey, USA), das nach Applikation in der Parodontaltasche aushärtet und den Wirkstoff langsam an die Umgebung abgibt (Niemiec, 2008). Die Wirksamkeit wurde in einer klinischen Studie bestätigt (Zetner und Rothmueller, 2002).

Des Weiteren gibt es Oravet[®] (Merial, Lyon, Frankreich), zugelassen für Hunde und Katzen, eine wachsartige Substanz die zur Versiegelung von Parodontaltaschen und Zahnoberflächen nach der Zahnreinigung, zur Prävention der Neubildung von Plaque und Zahnstein angewandt wird (Niemiec, 2008).

3.3.5 Einsatz von Substanzen bei der equinen Parodontaltherapie

Die Verwendung von zahnmedizinischen Materialien aus der humanen Zahnmedizin im equinen Parodontium ist vielfach beschrieben, wobei vor allem Abdruckmaterialien Anwendung finden (Greene und Basile, 2002; Collins und Dixon, 2005; Johnson und Porter, 2006; Du Toit, 2012; Easley und Odenweller, 2015; Jackson et al., 2016). Einige Autoren empfehlen die kombinierte Anwendung eines Füllmaterials mit einer darunterliegenden Schicht eines Antibiotikum-haltigen Gels (Collins und Dixon, 2005; Johnson und Porter, 2006; Easley und Odenweller, 2015). Du Toit (Du Toit, 2012) hingegen bezeichnet die Anwendung lokaler Antibiotika beim Pferd, wie sie für Hunde zugelassen sind, als sinnlos, da sie zu kurz in den Parodontaltaschen verbleiben und enorme Kosten aufgewendet werden müssen aufgrund der benötigten Mengen.

Easley und Odenweller (Easley und Odenweller, 2015) beschreiben die möglichen Materialien zur Überbrückung von Diastemata und deren Eigenschaften genauer: harte Materialien (Knochenzement, Acrylharzen), halbfeste (Abdruckmaterialien) oder weiche (Dentalwachs). Harte Materialien bewahren die okklusale Oberfläche und stabilisieren benachbarte Zähne. Problematisch sind die Abnutzung der Materialien und die Verschiebung über die Zeit, wodurch es zu Verletzungen der Wange oder Zunge kommen kann. Für tiefe Parodontaltaschen mit Knochenverlusten sollten zusätzlich knochenwachstumsfördernde Materialien verwendet werden, wie Knochenespäne oder absorbierbarer Knochenzement (Easley und Odenweller, 2015).

Die Kontrolle der eingebrachten Füllungen sollte nach jeweils 2 Wochen durchgeführt werden (Johnson und Porter, 2006; Du Toit, 2012). Collins und Dixon (Collins und Dixon, 2005) beschreiben, dass viele Pferde nach der Anwendung von parodontalen Füllungen mit Abdruckmaterialien eine gute Heilung der Parodontitis mit Linderung der parodontalen Schmerzen zeigten. Die Verbesserung könne bestehen bleiben, auch nachdem die Füllung herausgefallen sei, was meistens nach einigen Wochen geschehe. Ohne weitere Behandlung des Diastemas würde das Problem aber wiederkehren (Collins und Dixon, 2005).

3.4 Biokompatibilitätsstudien für zahnmedizinische Materialien

3.4.1 Methodik

Der Begriff Biokompatibilität beschreibt die Eigenschaften eines Materials mit seiner Umwelt zu interagieren (Williams, 1999). Nach der Applikation des Materials soll in einem Körper eine adäquate biologische Antwort hervorgerufen werden. Auch beschreibt es die Qualität keine toxischen oder verletzenden Effekte auf biologische Systeme zu besitzen (Williams, 1999). Um die Biokompatibilität von zahnmedizinischen Materialien zu evaluieren, werden üblicherweise zunächst *in-vitro*-Studien durchgeführt. *In-Vitro*-Testverfahren werden außerhalb des lebenden Organismus durchgeführt. Zellen, Enzymen oder andere isolierte, biologische Systeme werden hierfür mit den zu testenden Materialien in Kontakt gebracht. Dabei kann dieser Kontakt direkt mit dem Material stattfinden oder indirekt über dessen Extrakte (Harmand, 1992). Eine Möglichkeit zur indirekten Exposition der Zellen, kann über vorhergehende Elutionen vorgenommen werden. Der Elutionsprozess beinhaltet die Aufnahme löslicher Komponenten einer Festsubstanz in einem Lösungsmittel (Ferracane, 1994). Das zu testende Material wird hierfür in Kulturmedium platziert und dort für eine festgelegte Zeit, bei festgelegter Temperatur belassen, bis das resultierende sogenannte Eluat zur Applikation auf die Zellkultur verwendet werden kann.

Die verwendeten Zellen für die Versuche können primären Ursprungs sein, also einem Organismus entnommen und kultiviert worden sein, oder sie gehören zu einer transformierten, permanent wachsenden Zelllinie (Pizzoferrato et al., 1994). Primäre Zellen sind spezialisierter in ihrer Funktionalität, haben jedoch häufiger

Einschränkungen in ihrer Kultivierbarkeit und den Wachstumseigenschaften gegenüber permanenten Zellen (Pizzoferrato et al., 1994).

Die Zytotoxizität eines Materials kann schnell und einfach über die Untersuchung der Permeabilität der Zellmembran mittels Färbemethoden gemessen werden (Ferracane und Mitchell, 2012). Sie überschneidet sich in den Ergebnissen zum Teil mit den Testverfahren zum Zellmetabolismus und -funktion, in denen über Enzymaktivitäten die zytotoxische Antwort gemessen wird.

Die meisten Verfahren funktionieren mittels kolorimetrischer Umsetzung von Tetrazoliumsalzen, wie der MTT-Test. Dieser basiert auf der enzymatische Metabolisierung von MTT (3 (4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) und wurde zuerst beschrieben von Mosmann (Mosmann, 1983). Das gelbe Tetrazoliumsalz wird in den Mitochondrien, im Zytoplasma und an nicht-mitochondrialen Membranen durch NADPH zu dunkelviolettem Formazan reduziert (Berridge et al., 2005). Diese Kristalle sind wasserunlöslich, können aber mit einem geeigneten Solvens in Lösung gebracht und ihre Konzentration photometrisch quantifiziert werden. Dabei ist die Absorption, gemessen als optische Dichte (OD), proportional zur Anzahl metabolisch aktiver Zellen. Andererseits kann die Enzymaktivität auch über einen Fluoreszenz-Indikator ermittelt werden, wie den Alamar Blue Test (Nakayama et al., 1997).

Weiterführende Auskunft über Gewebsreaktionen bieten Testverfahren, mit denen die Zytokin-Produktion gemessen wird (Ferracane und Mitchell, 2012). Hierfür gibt es wiederum die Möglichkeit auf Proteinebene mit Immunassays zu arbeiten oder die RNA-Ebene mittels PCR-Techniken zu betrachten. Jedoch sind die synthetisierten Zytokine in vielen Fällen nicht äquivalent mit der RNA-Expression, weshalb die Ergebnisse mit verschiedenen Testmethoden nicht direkt vergleichbar sind (Agarwal et al., 1995). Des Weiteren bewerten Mutagenitätstests das Potenzial einer Substanz Mutationen in der zellulären DNA hervorzurufen.

3.4.2 Prüfung von Materialien für die Anwendung bei Menschen

In der humanen Zahnmedizin wurden bereits unzählige Studien durchgeführt, in denen die *in-vitro*-Biokompatibilität von zahnmedizinischen Materialien untersucht wurde, wie beispielsweise von Kunstharzen für Zahnfüllungen (Geurtsen et al., 1998; Labban et

al., 2008), Wurzelkanalversiegelungsmaterialien (Huang et al., 2002; Scelza et al., 2012; da Silva et al., 2013) oder Abdruckmaterialien (Sydiskis und Gerhardt, 1993; Ciapetti et al., 1998; Tiozzo et al., 2003; Boraldi et al., 2009). Dabei wird häufig mit Zellkulturen aus primären humanen Fibroblasten der Gingiva (Geurtsen et al., 1998; Labban et al., 2008; Scelza et al., 2012) oder dem PDL (Lai et al., 2004; Kasaj et al., 2007) gearbeitet. Ebenso häufig werden auch verschiedene permanente Zelllinien eingesetzt (Sydiskis und Gerhardt, 1993; Ciapetti et al., 1998; da Silva et al., 2013). Vielfach wird die Zytotoxizität von Materialien mittels MTT-Tests bewertet (Lai et al., 2004; Scelza et al., 2012; da Silva et al., 2013).

Weiterhin gibt es Studien, die die Genexpression von Zellen unter dem Einfluss verschiedener Materialien untersucht haben. Dabei wurden für einige zahnmedizinische Materialien oder deren Bestandteile erhöhte Expressionswerte von proinflammatorischen Markergenen gemessen (Noda et al., 2003; Di Nisio et al., 2013; Miron et al., 2016).

Eine internationale Standardisierung zur „Beurteilung der Biokompatibilität von in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukten“ bildet die Norm ISO 7405:2017 (ISO Internationale Organisation für Normung, 2017). Hierin wird unter anderem erläutert, welche Testmethode abhängig von der Anwendungsart und der Expositionsdauer eines zahnmedizinischen Materials vorgeschrieben ist. Die Bewertung der *in-vitro*-Zytotoxizität über direkte Kontakt- oder Extraktionstests sind einsortiert in Gruppe I mit einem Verweis an die ISO-Norm Nr. 10993-5. Diese wiederum beschäftigt sich innerhalb der „biologischen Beurteilung von Medizinprodukten“ mit der Prüfung auf *in-vitro*-Zytotoxizität (ISO Internationale Organisation für Normung, 2009). Die Zellschädigung wird demnach nach morphologischen Kriterien und quantitativ mittels Messverfahren bewertet, ebenso wie das Zellwachstum und der Zellstoffwechsel.

3.4.3 Umwidmung von Arzneimitteln

„Gemäß § 56a (1) Nr. 3 Arzneimittelgesetz (AMG) darf der Tierarzt Arzneimittel grundsätzlich nur anwenden oder abgeben, wenn sie nach der Zulassung für dieses Anwendungsgebiet bei der behandelten Tierart zugelassen sind. Im Falle des Therapienotstandes ist die Umwidmungskaskade des § 56a (2) AMG zu beachten“ (Deutscher Bundestag, 1978; Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES), 2016). Für die Verwendung von

zahnmedizinischen Materialien im equinen Parodontium heißt das im Speziellen, dass aufgrund fehlender zugelassener Produkte zu Therapiezwecken umgewidmet werden muss. In Anbetracht der Kaskade kommen auf erster Stufe Substanzen infrage, die für Pferde, aber für ein anderes Anwendungsgebiet zugelassen sind. Findet sich auch hier keine adäquate Alternative werden Substanzen betrachtet, die für andere Tierarten zugelassen sind. Erst wenn auch in diesem Bereich die Möglichkeiten fehlen, darf auf humanmedizinische Arzneimittel zurückgegriffen werden.

3.5 Genexpression parodontaler Zellen

3.5.1 Physiologische Genexpression

Bis dato gibt es keine Publikation über die Expression von Entzündungs-Markergenen von equinen parodontalen Zellen. Die Genexpression von verschiedenen Zellen des humanen Parodontiums wurde hingegen schon mehrfach mit PCR-Methoden analysiert. Gene, die dabei häufig detektiert wurden, werden im Folgenden erläutert:

Interleukin-1 beta (IL-1 β) ist ein Zytokin mit starken proinflammatorischen Eigenschaften und wird produziert von mononukleären Phagozyten, Fibroblasten, Keratinozyten sowie T- und B-Zellen (Feghali und Wright, 1997). Durch IL-1(β) wird im parodontalen Gewebe die Knochenresorption gesteigert und die Produktion von MMP stimuliert (Okada und Murakami, 1998). Die Expression wurde bei humanen gingivalen und parodontalen Fibroblasten nachgewiesen (Agarwal et al., 1995; Yamamoto et al., 2006; Scheres et al., 2010; Gölz et al., 2015).

Interleukin-6 (IL-6) gehört ebenfalls zu den proinflammatorischen Zytokinen und wird unter anderem produziert von mononukleären Phagozyten, Fibroblasten und T-Zellen. Eine IL-6 Expression wurde für humane gingivale und parodontale Fibroblasten bestätigt (Agarwal et al., 1995; Kent et al., 1998; Yamamoto et al., 2006). Bei an Parodontitis erkrankten Menschen wurden erhöhte Mengen an IL-6 im parodontalen Gewebe gefunden (Dongari-Bagtzoglou und Ebersole, 1998). Die Freisetzung von IL-6 führt dabei, neben einer gesteigerten Knochenresorption, zu einer B-Zell-Aktivierung und damit zu einer IL-1 Produktion (Okada und Murakami, 1998).

Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) zählt nicht zu den Interleukinen, ist aber ebenfalls ein hoch aktives Zytokin, das von aktivierten Makrophagen und Monozyten ebenso produziert wird, wie von Fibroblasten, Mastzellen und natürlichen Killerzellen (Feghali

und Wright, 1997). Auch ohne externen Stimulus wird TNF- α von humanen gingivalen Fibroblasten exprimiert (Herath et al., 2011; Di Nisio et al., 2013). Durch einen synergistischen Effekt mit IL-1 führt TNF- α zu einer Steigerung der Knochenresorption bei einer parodontalen Erkrankung (Okada und Murakami, 1998).

Die Cyclooxygenase-2 (COX-2) ist ein Schlüsselenzym für die Metabolisierung von Arachidonsäure zu Prostaglandinen und wird von diversen Zelltypen vermehrt exprimiert durch proinflammatorische Stimuli, Zytokine und Mitogene (Gilroy et al., 2001). Die Expression von COX-2 wurden bei humanen gingivalen Fibroblasten gefunden (Chang et al., 2003; Di Nisio et al., 2013).

Auch eine Interleukin-8 (IL-8) Expression wurde häufig in humanen parodontalen Fibroblasten untersucht und nachgewiesen (Yamaji et al., 1995; Yamamoto et al., 2006; Scheres et al., 2010). Bei parodontalen Erkrankungen soll IL-8 Neutrophile Granulozyten anlocken und aktivieren (Okada und Murakami, 1998).

3.5.2 Genexpression im Entzündungsmodell

Zellen können *in vitro* mit verschiedenen Methoden dazu stimuliert werden Markergene zu exprimieren, wie sie bei Entzündungsreaktionen gemessen werden. Für die Genexpression equiner parodontaler Fibroblasten in einer simulierten Entzündung liegen bisher keine veröffentlichten Daten vor. Umso mehr Studien wurden zu diesem Thema bereits in der Humanmedizin durchgeführt. Dabei gibt es verschiedene Ansätze der Zell-Stimulation, die in den nachfolgenden Absätzen beschrieben werden.

3.5.2.1 Bakterien

Die Simulation einer Entzündung lässt sich mit Bakterien in der Zellkultur durchführen. Für Parodontalstudien bietet sich die Verwendung Parodontitis-assoziiierter Spezies wie *Porphyromonas gingivalis* aus der Gruppe der Bakterien des roten Komplexes an. Diese wurden nicht nur bei Menschen (Slots und Ting, 1999) sondern auch bei Pferden (Sykora et al., 2014) nachgewiesen. In *in-vitro*-Versuchen mit *Porphyromonas gingivalis* Bakterien konnte in humanen PDL Zellen (Yamamoto et al., 2006) und in parodontalen Fibroblasten (Scheres et al., 2010) die Expression von IL-1 β , IL-6 und TNF- α stimuliert werden.

3.5.2.2 Lipopolysaccharide (LPS)

LPS sind Bestandteile bakterieller Zellwände, die als Virulenzfaktoren der Bakterien auch isoliert in vielen Organismen Entzündungsreaktionen hervorrufen können. Häufig werden für Parodontalstudien LPS von *Porphyromonas gingivalis* verwendet, die kommerziell erhältlich sind. Für die Arbeit in einer sterilen Zellkultur bietet die isolierte Verwendung der reaktiven Bestandteile, anstatt der Bakterien, viele Vorteile. In einer Studie mit humanen parodontalen Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass LPS von *Porphyromonas gingivalis* erhöhte Expressionswerte von IL-6 erzeugt (Yamaji et al., 1995), während bei humanen PDL Zellen die Expression von IL-1 β anstieg (Gölz et al., 2015).

3.5.2.3 Zytokine

Zytokine sind als Entzündungsmediatoren der körpereigenen Immunabwehr Teil des molekularen Mechanismus einer Entzündung (Feghali und Wright, 1997). Die Applikation in Zellkulturen kann zur Expression von weiteren inflammatorischen Markergenen führen (Agarwal et al., 1995; Kent et al., 1998). *In vivo* wird durch die Freisetzung von Zytokinen eine Entzündungsreaktion fortgeführt und verstärkt.

3.5.2.4 Hypoxie

Durch Reduktion der Sauerstoffzufuhr in Zellkulturen (Hypoxie) kann ebenfalls eine Entzündung simuliert werden (Wu et al., 2015). Auch in klinischen Fällen kann sich eine lokale Hypoxie über sezernierte Entzündungsmediatoren zu einer Entzündung entwickeln (Eltzschig und Carmeliet, 2011). Bei humanen PDL Zellen konnten hypoxische Konditionen eine Expressionssteigerung von IL-1 β bewirken (Gölz et al., 2015). Vor allem aber wird der Effekt von LPS auf die Expression von Entzündungsmarkern durch Hypoxie potenziert (Gölz et al., 2015; Jiang et al., 2015).

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Zahnmedizinische Materialien

Tabellarische Auflistung der in den Versuchen verwendeten zahnmedizinischen Materialien:

Produkt	Hersteller	Anwendungsgebiet	Inhaltsstoffe
PeriCare®	Merz Dental, Lütjenburg, Deutschland	Behandlung von parodontalen Defekten	Calciumhydroxid in öliger Suspension (Jojoba-Öl)
Provicol®	Voco, Cuxhaven, Deutschland	Temporärer Befestigungszement	Dimethacrylate, Silikate, Calciumhydroxid, Zinkoxid
Calxyl® (röntgendicht)	OCO-Präparate, Dirmstein, Deutschland	Zahnwurzelbehandlung und -füllung	Calciumhydroxid, Bariumsulfat
Honigum (Pro Mono)	Dental Milestones Guaranteed DMG, Hamburg, Deutschland	Monophasen- Abformungsmaterial	Vinylpolysiloxane, Siliciumdioxid, Pigmente, Additive, Platinkatalysator

PeriCare®

PeriCare® ist eine Paste für die Behandlung von parodontalen Defekten. Laut Hersteller lindert diese Paste die Symptome nach parodontalen Eingriffen, wie Schmerzen, Ödeme und Entzündungen, und fördert außerdem die natürliche Geweberegeneration. Das enthaltene Calciumhydroxid in öliger Suspension soll am Applikationsort, durch eine über mehrere Stunden anhaltende Steigerung der Alkalisierung bis zu einem pH-Wert von 10,5, die Keimzahl reduzieren und den antiinflammatorischen Prozess positiv beeinflussen. Die pastöse Konsistenz erhöht dabei die Verweildauer in der Parodontaltasche.

Provicol®

Provicol® wird als „temporärer Befestigungszement mit Calciumhydroxid“ beschrieben. Indikationen in der humanen Zahnmedizin sind die temporäre oder definitive Befestigung von Kronen, Brücken, Inlays und Onlays sowie der temporäre Verschluss von kleinen, einflächigen Kavitäten. Neben technischen Inhaltsstoffen wie Dimethacrylaten und Silikaten enthält Provicol® Calciumhydroxid und Zinkoxid. Calciumhydroxid fördert laut Hersteller die Bildung von Tertiärdentin und wirkt bakteriostatisch, während Zinkoxid bekannt ist für seine antibakterielle Wirkung.

Calxyl®

Calxyl® ist eine Calciumhydroxidpaste zur Zahnwurzelbehandlung und -füllung, speziell zur Vitalüberkappungen und Vitalamputationen. Calciumhydroxid ist in wässriger Suspension mit höchstem Wirkstoffgehalt enthalten, sodass ein pH-Wert von über 12,6 erreicht wird. Es handelt sich, laut Aussage des Herstellers, um ein international anerkanntes Pulpenschutzmittel zur Überkappung und Lebenderhaltung artifizuell eröffneter, infizierter Pulpen. Das Calciumhydroxid soll einen optimalen Schutz gegen Reinfektionen und eine gesicherte Anregung zur Ossifikation und Bildung von Sekundärdentin bewirken. Die blaue Formulierung enthält Bariumsulfat als Kontrastzusatz und ist damit röntgensichtbar.

Honigum

Honigum Pro Mono ist ein Monophasen-Abformungsmaterial auf der Basis von additionsvernetzenden Silikonen. Angewendet wird es zur Abformungen aller Art wie für Kronen, Brücken, Inlays und Onlays. Die Inhaltsstoffe sind Vinylpolysiloxane und Siliciumdioxid sowie Pigmente, Additive und ein Platinkatalysator.

4.1.2 Chemikalien

Tabellarische Auflistung der in den Versuchen verwendeten Chemikalien:

Produktname und ggf. Inhaltsstoffe	Hersteller
AmpliTaq Gold 5 U/μl	Applied Biosystems Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
DMEM (high glucose) 4,5 g/l D-Glucose + L-Glutamine + Pyruvate + Phenolrot	gibco® Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
DMSO	AppliChem GmbH, Darmstadt
DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
DNase I + Incubation buffer	Roche Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
dNTP Mix	Applied Biosystems Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Easycoll®	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Ethanol (100 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
GeneRuler Low Range DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Isopropanol (100 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
LPS (von <i>Porphyromonas gingivalis</i>)	InvivoGen, San Diego, Kalifornien (USA)
MEM NEAA (100×)	gibco® Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
MgCl ₂ Solution	Applied Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
MultiScribe Reverse Transcriptase	Applied Biosystems Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
NucleoZOL	Macherey-Nagel, Düren
PBS	gibco® Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
PCR Gold Buffer	Applied Biosystems Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
PeqGold Universal Agarose	VWR PeqLab GmbH, Erlangen
PeqGreen DNA/RNA Dye	VWR PeqLab GmbH, Erlangen
Pen Strep Penicillin 10.000 IE/ml + Streptomycin 10.000 μg/ml	gibco® Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Primer-Oligos	Eurofins MWG Synthesis GmbH, Ebersberg
Random hexamers	Invitrogen Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
RNase-freies Wasser	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
RNase Inhibitor 20 U/μl	Applied Biosystems Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
RNase Inhibitor 40 U/μl	Ambion Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
RPMI-1640	gibco® Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

RT ² qPCR Primer Assays	Qiagen GmbH, Hilden
RT ² SYBR Green Mastermix	Qiagen GmbH, Hilden
TAE Puffer (aus TRIS, Acetat und EDTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TrypLE™ Express	gibco® invitrogen™ Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

4.1.3 Geräte

Tabellarische Auflistung der in den Versuchen verwendeten Geräte:

Gerät	Modell	Hersteller
Abzug	2-453-GAND nach EN 14175	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze-Hänigsen
Computer	OptiPlex 7020	Dell GmbH, Frankfurt am Main
Einfriergerät	Mr. Frosty	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Flowbench	Hera safe™ nach EN12469:2000	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Inkubator	Heracell™ 150	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Mikroskop 1	CM E	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Mikroskop 2	AE 21	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar
Mikrotiterplatten-Reader	Sunrise™	Tecan Trading AG, Männedorf (Schweiz)
Mikrovolumen-Messzelle	µCuvette G1.0	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrowellengerät		LG Electronics, Seoul (Südkorea)
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten	Research	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Schüttler	KS 130 basic	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Stromquelle für Gelelektrophorese	Power Pac 200	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
Thermocycler 1	T3	Biometra GmbH, Göttingen
Thermocycler 2	C1000™ CFX96 Real-Time System	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
Transilluminator + Monitor + Bedienfeld	UVsolo UVIdoc	Biometra GmbH, Göttingen Biometra GmbH, Göttingen UVItec Limited, Cambridge (UK)
Vakuumpumpe	Laboport	KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Wasserbad	WB7	Memmert GmbH, Schwabach

Zählkammer	Neubauer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Zentrifuge 1	Centrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 2	Centrifuge 5702R	Eppendorf AG, Hamburg

4.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabellarische Auflistung der in den Versuchen verwendeten Verbrauchsmaterialien:

Materialien	Hersteller
6-Well-Platten	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
24-Well-Platten	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
96-Well-PCR-Platten Hard-Shell [®]	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
96-Well-Platten	Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe
Adhäsiv-Folie Microseal [®] für PCR-Platten	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
Blutprobengefäße 1,3 ml mit Lithium-Heparin (25 IE/ml Blut)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Mikro-Schraubröhren (2 ml)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Pipettenspitzen (10 µl; 20 µl; 100 µl; 200 µl; 1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Reagiergefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Reagiergefäße schwarz (1,5 ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Serologische Pipetten (10 ml; 30 ml)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Spritzenvorsatzfilter PES Membrane 0,2 µm	Laborbedarf Sachse GmbH, Westerstetten
Zellsiebe BD Falcon cell strainer 70 µm Nylon	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm ² ; 75 cm ²)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg

4.1.5 Software

Tabellarische Auflistung der in den Versuchen verwendeten Software:

Software	Hersteller
CFX Manager™ Version 3.0	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
BMDP/Dynamic Release 8.1	Statistical Solutions Ltd., Cork (Irland)
Magellan™	Tecan Trading AG, Männedorf (Schweiz)
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
Microsoft Word	Microsoft Corporation, Redmond (USA)

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur der equinen parodontalen Fibroblasten

4.2.1.1 Herkunft der EPF

Für die Versuche wurden equine parodontale Fibroblasten (EPF) verwendet, die im Rahmen vorangegangener Projekte der Arbeitsgruppe generiert worden sind (Staszyk und Gasse, 2007; Mensing, 2009). Diese wurden nach einem selbst entwickelten Protokoll aus dem Ligamentum periodontale extrahierter Pferde-Backenzähne gewonnen, kultiviert und die Fibroblasten selektiert. Die Zellen in Reinkultur wurden dann bei $-156\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgekühlt gelagert. Für die anstehenden Versuche wurden EPF verwendet, die aus dem apikalen Bereich des PDL des Zahns 708 eines euthanasierten 1-jährigen, männlichen Warmblutpferdes gewonnen wurden. Die 708 steht im Triadan-System zur Bezeichnung der Zähne im Gebiss, für den 4. Prämolaren des Milchgebisses im linken Unterkiefer.

4.2.1.2 Auftauen und Anzucht der EPF

Zellen einer frühen Passage wurden zunächst zur Vermehrung aufgetaut und angezüchtet. Vor dem Aussäen wurden die Zellen zunächst mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, um Reste des Einfriermediums zu entfernen. Dann wurden die Zellen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und in 25 cm^2 Zellkulturflaschen mit Kulturmedium ausgesät. In mehreren Vorversuchsreihen wurde das Zellwachstum mit verschiedenen Zusammensetzungen des Kulturmediums getestet. Dabei bewährte sich als Standardmedium DMEM high glucose ergänzt mit 20 % FBS, 1 % MEM-NEAA sowie 1 % Penicillin/Streptomycin. Die Zellen wurden im Inkubator bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5 % CO_2 angezüchtet. Alle 2-3 Tage wurden die adhärennten Zellen mit PBS gewaschen und neues Medium hinzugegeben.

4.2.1.3 Passagieren und Anzucht für die Versuche

Wenn die Zellen eine Konfluenz von ungefähr 70 % erreicht hatten, wurden sie passagiert. Dazu wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Dann wurden sie mit TrypLE überschichtet und für 5 Minuten in den Inkubator verbracht. Hatten sich die Zellen vollständig abgelöst, was mit dem Auflichtmikroskop beobachtet werden konnte, wurde die Reaktion mit

FBS-substituiertem Medium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen übertragen und für 5 Minuten bei $300 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde dann vorsichtig abgenommen, das Pellet in PBS resuspendiert und eine Probe von 10 μ l zur Zellzählung entnommen. Nach erneuter Zentrifugation der restlichen Zellsuspension wurde der Überstand wieder vorsichtig abgenommen und das Pellet in einem definierten Volumen des Kulturmediums resuspendiert. Die Zellsuspension mit bekannter Konzentration konnte nun auf mehrere Kulturflaschen (25 cm^2 oder 75 cm^2) aufgeteilt werden. Auf diese Weise wurden die Zellen vermehrt. Für die Versuche wurden ausschließlich Zellen in Passage 6 bis 8 verwendet. Diese wurden auf zwei verschiedenen Typen von Zellkultur-Multiwell-Platten für adhärenente Zellen ausgesät:

- 24-Well-Platten: je Well 5×10^4 Zellen in 500 μ l Kulturmedium
- 6-Well-Platten: je Well 2×10^5 Zellen in 2 ml Kulturmedium

Die angegebenen Zellzahlen ergaben sich aus den Ergebnissen von Vorversuchen, die durchgeführt wurden, um Zelldichten zu ermitteln, die mit möglichst schnell und homogen wachsende Zellrasen vergleichende Analysen zulassen. Die eigentlichen Versuche wurden dann durchgeführt, wenn die Zellen auf den Multiwell-Platten eine Zuwachsdichte von mindestens 50 % erreicht hatten. Dies konnte üblicherweise nach 24 Stunden beobachtet werden.

4.2.1.4 Kryokonservierung

Um Zellen für spätere Versuche aufzuheben, bestand die Möglichkeit sie in einzelnen Portionen erneut zu kryokonservieren. Dazu wurden die Zellen nach dem Ablösen und Waschen anstatt in Kulturmedium in Einfriermedium resuspendiert und in kleinen Volumina (1,5 - 2,0 ml) in Kryoröhrchen aliquotiert. Diese Röhrchen wurden dann in einem Einfriergerät platziert und für 24 Stunden bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. In diesem Behältnis wird eine schrittweise Abkühlung um $1 \text{ }^\circ\text{C}$ pro Minute gewährleistet. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen zur langfristigen Lagerung in eine Gefriertruhe mit $-156 \text{ }^\circ\text{C}$ verbracht.

4.2.2 Herstellung des Zell-Substanz-Kontaktes

Für die ersten Evaluierungen wurden die zahnmedizinischen Materialien direkt auf die in Konfluenz wachsenden Zellen appliziert (Abb. 1a). Für die weiteren Experimente wurden Elutionen durchgeführt (Abb. 1b). Nach unserem Protokoll wurden eine Standardkonzentration für die Eluate festgelegt von 0,05 g der Substanz/ml Zellmedium. Für die praktischere Durchführung wurden in ein Zentrifugenröhrchen, das zuvor mit 30 ml Kulturmedium bestückt wurde, 1,5 g des Zahnmaterials appliziert. Dieser Ansatz wurde im Inkubator für 24 Stunden bei 37 °C gelagert. Danach wurde das konditionierte Kulturmedium, möglichst ohne Partikel des Zahnmaterials, in ein anderes Gefäß überführt. Das alte Kulturmedium wurde von den Zellen abgenommen und gegen ein entsprechendes Volumen eines Eluats ausgetauscht. Bis zu den Auswertungen nach 2, 24 oder 48 Stunden wurden die Zellen dann weiter im Brutschrank inkubiert.

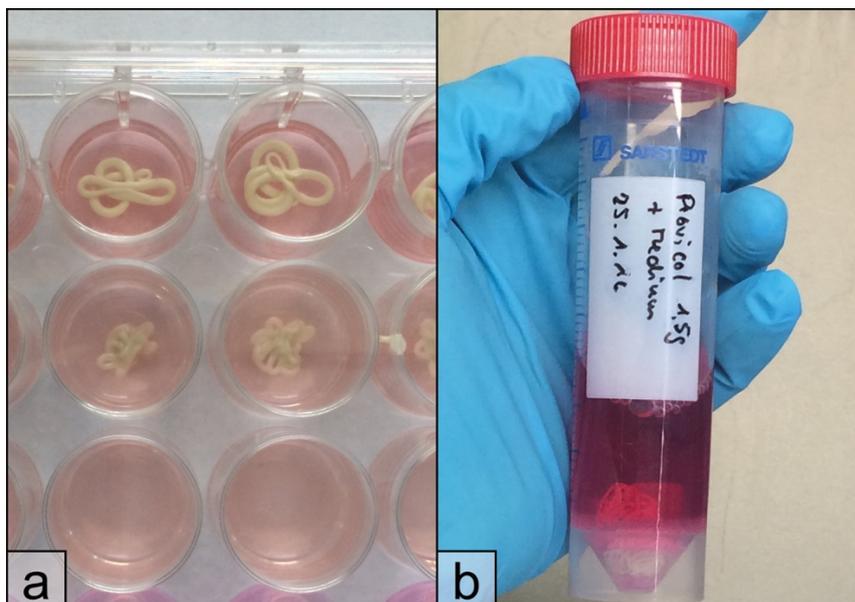


Abb. 1: Zell-Substanz-Kontakt

(a) direkte Applikation auf die adhären wachsenden Zellen

(b) Herstellung eines Eluats

4.2.3 Zeitlicher Ablauf der Versuche

Zur Gewährleistung eines wiederholbaren Ablaufs der Versuche wurde ein zeitliches Schema festgelegt (Abb. 2). Die Gesamtzeit von der Aussaat der Zellen auf Multiwell-Platten bis zur letzten Auswertung betrug 72 Stunden. Zuvor wurden die Zellen kultiviert und vermehrt, danach wurden die PCR-Analysen durchgeführt.

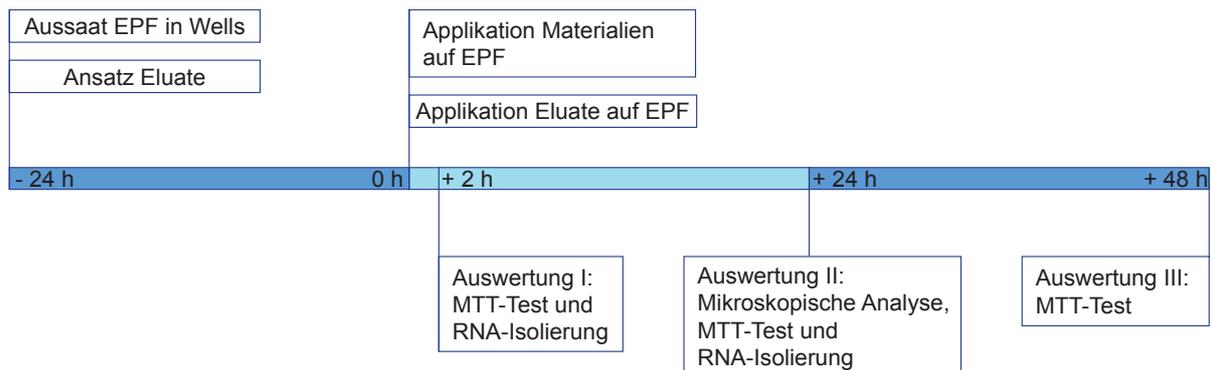


Abb. 2: Schema des Versuchsablaufs.

4.2.4 Mikroskopische Analyse

Die adhärent wachsenden EPF wurden mit den applizierten zahnmedizinischen Materialien für 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden mikroskopische Bilder der Zellkulturen aufgenommen und diese nach zellmorphologischen Aspekten beurteilt.

4.2.5 MTT-Test

Die Auswirkungen der zahnmedizinischen Materialien auf die Zellviabilität wurden mithilfe des MTT-Tests evaluiert. Die MTT-Stammlösung wurde zu Beginn der Versuchsreihe hergestellt als Lösung von MTT in PBS mit einer Konzentration von 5 mg/ml. Die Lösung wurde filtriert und in gebrauchsfertigen Volumina von 1,5 ml aliquotiert. Die einzelnen Portionen konnten bis zu 6 Monate bei -20 °C gelagert werden. Für die Durchführung des MTT-Tests wurden die Zellen auf den 24-Well-

Platten in einer entsprechenden Anzahl von Wells angezuchtet, dass jede Messung im vierfachen Ansatz durchgeführt werden konnte.

Zur Auswertung wurden zuerst die Eluate oder das Kulturmedium aus allen Wells entfernt. Dann wurde in jedem Well 300 µl frisches Standardmedium vorgelegt und 30 µl MTT-Lösung hinzugefügt. Durch gleichmäßiges Schwenken der Platten wurde eine homogene Lösung hergestellt, die eine End-Konzentration an MTT von 0,5 mg/ml enthielt. Schließlich folgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37 °C für 3 Stunden. Nach Ablauf der Zeit wurde der Überstand aus jedem Well abgenommen und verworfen. Die Formazan-Kristalle, die sich intrazellulär in den adhären Zellen befanden, konnten dann in jeweils 200 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst werden. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurden die Platten für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler platziert. Zuletzt wurden die Lösungen auf 96-Well-Platten übertragen, um die Absorption als optische Dichte (OD) im Mikrotiterplatten-Lesegerät messen zu können. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 570 nm mit einem Referenzfilter von 630 nm. Die Ergebnisse wurden mit dem Computerprogramm Magellan Data Analysis Software ausgewertet. Es wurden mindestens drei unabhängige Versuche je Material, Zeitpunkt und Konzentration durchgeführt. Die Wells wurden jeweils im Vierfachansatz bestückt, sowohl für die Test- als auch für die Kontrollzellen. Zusätzlich liefen zwei verschiedene Test-interne Kontrollen mit, zum einen mit Zellen, ohne MTT-Lösung, zum anderen ohne Zellen, aber mit MTT-Lösung. Während erstere lediglich zur Überprüfung des Testablaufs herangezogen wurden, wurde mit den zweitgenannten eine Angleichung der Werte vorgenommen. Die Hintergrund-Störungen durch anhaftende MTT-Partikel konnten durch Subtraktion von den gemessenen Testwerten eliminiert werden. Die Viabilität, also der Anteil lebender, metabolisch aktiver Zellen an der erwarteten Gesamtzellzahl, wurde mit folgender Formel rechnerisch bestimmt:

- Zell-Viabilität (%) = $[\text{OD der Testzellen} / \text{OD der Kontrollzellen}] \times 100 \%$

Eine Viabilität von etwa 100 % stellte demnach eine Zellkultur mit unbeeinträchtigtem Wachstum dar. Werte, die über 100 % lagen, zeigten eine erhöhte Proliferation an, während Werte, die unter 100 % lagen, eine verringerte Proliferation oder ein Absterben der Zellen bedeuteten.

4.2.6 RNA-Isolierung und RT-qPCR

4.2.6.1 RNA-Isolierung

Für die RNA-Extraktion wurden die Zellen, die, wie zuvor beschrieben, auf 6-Well-Platten für 24 Stunden angezüchtet wurden, mit den Eluaten bestückt und für weitere 2 oder 24 Stunden inkubiert. Zellen, die mit dem Standardmedium inkubiert wurden, dienten als Negativkontrolle. Zum Auswertungszeitpunkt wurde dann zuerst das Eluat oder Kulturmedium entfernt und die Zellen direkt im Well mit 1 ml NucleoZOL lysiert. Nach Zugabe von 400 µl RNase-freien Wassers wurde die Lösung in Mikroreaktionsgefäße übertragen und gut geschüttelt. Das Ganze wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann für 15 Minuten bei $12.000 \times g$ zentrifugiert. Es bildeten sich zwei Phasen, von denen die obere gelöste RNA und die untere DNA und Proteine enthielt. Von dem Überstand wurde dann ein Volumen von 1 ml in ein neues Reaktionsgefäß gebracht und dort mit 1 ml 100 %-igem Isopropanol gemischt. Dieses wurde erneut für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach für 10 Minuten bei $12.000 \times g$ zentrifugiert. Nach diesen Schritten sollte sich die durch Isopropanol ausgefällte RNA, zu einem Pellet geformt, an der Wand des Reaktionsgefäßes abgelagert haben. Die flüssige Phase wurde daher vorsichtig und möglichst vollständig entfernt. Zum Waschen der RNA wurde dann das Reaktionsgefäß mit 500 µl 75 %-igem Ethanol bestückt und anschließend für 2 Minuten bei $6.000 \times g$ zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde in gleicher Form wiederholt. Zuletzt wurde das RNA Pellet in 22 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die gewonnene RNA wurde für die weitere Verwendung bei $-156 \text{ }^\circ\text{C}$ tiefgekühlt gelagert.

4.2.6.2 Messung der RNA-Konzentration

Die Konzentration der RNA wurde mit einem Photometer gemessen und durch Verdünnung mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 100 ng/µl eingestellt. Um die Reinheit der Probe beurteilen zu können, wurden außerdem verschiedene Absorptionswerte hinzugezogen. Relevant sind hierfür die Werte bei einer Wellenlänge von 260 nm (A_{260}) als Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren und 280 nm (A_{280}) als Absorptionsmaximum von Proteinen und Phenole. Der Quotient aus A_{260} und A_{280} , auch als Ratio bezeichnet, sollte für RNA in etwa bei 2,0 liegen um eine Verunreinigung mit Proteinen ausschließen zu können (Teare et al.,

1997). Für die Versuche wurden ausschließlich Proben mit Messwerten innerhalb des angegebenen Referenzwertes verwendet.

4.2.6.3 DNase-Verdau

Für die weitere Verarbeitung folgte als Nächstes ein Schritt zur Entfernung von DNA-Kontaminationen. Der DNase-Verdau wurde vorbereitet durch eine Mischung von 6,65 µl der RNA-Probe mit 3,25 µl eines Verdauansatzes aus DNase I, RNase Inhibitor (40 U/µl), DNase Puffer und Magnesiumchlorid. Mithilfe eines Thermocyclers wurde das Ganze auf 37 °C für 25 Minuten erwärmt, dann erhitzt auf 75 °C für 5 Minuten und zuletzt zur Erhaltung der RNA-Qualität heruntergekühlt auf 4 °C.

Tabellarische Auflistung der verwendeten Substanzen zum DNase-Verdau:

Substanzen	Volumen [µl] / Probe
MgCl ₂ Solution	1,00
DNase Puffer	1,00
DNase 1	1,00
RNase Inhibitor 40 U/µl	0,25
Gesamtmix	3,25
+ RNA	6,65

Tabellarische Auflistung der Thermocycler-Einstellungen für den DNase-Verdau:

Temperatur [°C]	Dauer [min]
37	25
75	5
4	hold

4.2.6.4 cDNA-Synthese

Zur weiteren Auswertung wurde die RNA nach der Aufreinigung durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. 8 µl der RNA wurden mit 42,5 µl der folgenden Mischung versetzt: PCR Puffer, Nukleotid-Mix (dNTP), Magnesiumchlorid, Random Hexamers, RNase Inhibitor (20 U/µl), Reverse Transkriptase und RNase-freies Wasser. Als Kontrolle wurde von jeder Probe eine Anfertigung des Mixes ohne Reverse Transkriptase, die sogenannte Minus-RT angefertigt. Hierfür wurde 1 µl RNA

mit 8 µl des Mixes angesetzt. Der Thermocycler wurde wie folgt programmiert: 21 °C für 8 Minuten, 42 °C für 15 Minuten, 99 °C für 5 Minuten und dann die Temperatur auf 5 °C abgesenkt und gehalten.

Tabellarische Auflistung der verwendeten Substanzen zur Reversen Transkription:

Substanzen	Volumen [µl] / Probe	Volumen [µl] / Probe Minus-RT
PCR Gold Buffer	1,00	0,50
Nucleotide Mix (dNTP)	1,00	0,50
MgCl ₂ Solution	2,00	1,00
Random Hexamers	0,50	0,25
RNase Inhibitor 20 U/µl	0,50	0,25
Reverse Transkriptase	0,50	0
RNase-freies Wasser	3,00	1,50
Gesamtmix	8,50	4,00
Volumen mal x	42,5 (für x = 5)	8,00 (für x = 2)
+ DNase Verdau	8,00	1,00

Tabellarische Auflistung der Thermocycler-Einstellungen für die Reverse Transkription:

Temperatur [°C]	Dauer [min]
21	8
42	15
99	5
5	hold

4.2.6.5 Standard RT-PCR

Vor der RT-qPCR wurde mit einer Standard RT-PCR überprüft ob eine erfolgreiche Transkription stattgefunden hatte und die Minus-RT frei von genomischer DNA war. Als Primer wurde GAPDH verwendet. Für die Standard PCR wurden dann 5 µl der cDNA oder Minus-RT mit 20 µl des PCR Master Mixes, bestehend aus PCR Gold Puffer, Magnesiumchlorid, Nucleotid Mix (dNTP), Primer vorwärts, Primer rückwärts, AmpliTaq Gold und RNase-freies Wasser, gemischt. Mit demselben Mix wurden auch immer eine Positivkontrolle mit zuvor getesteter cDNA und eine Negativkontrolle mit RNase-freies Wasser als Template (NTC) mitlaufen gelassen. Das Programm des

Thermocyclers bestand aus folgenden Schritten: zuerst 95 °C für 9 Minuten, 35 Zyklen aus jeweils 45 Sekunden 94 °C dann 60 °C dann 72 °C, und zuletzt 72 °C für 7 Minuten vor dem endgültigen Abkühlen auf 5 °C.

Tabellarische Auflistung der verwendeten Substanzen für die PCR:

Substanzen	Volumen [µl] / Probe
PCR Gold Buffer	2,50
Nucleotide Mix (dNTP)	2,00
MgCl ₂ Solution	1,00
Primer for.	1,00
Primer rev.	1,00
Ampli TaqGold	0,15
RNase-freies Wasser	12,35
Gesamtmix	20,00
+ cDNA	5,00

Tabellarische Auflistung der Thermocycler-Einstellungen für die PCR:

Temperatur [°C]	Dauer [min]	
95	9	
94	0:45	35 Zyklen
60*	0:45	
* variabel, Primer-abhängig		
72	0:45	
72	7	
5	hold	

4.2.6.6 Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden in Gelelektrophoresen mit 1,5 %-igem Agarose-Gel ausgewertet. Die Proben wurden hierfür mit DNA/RNA Dye gefärbt und in die Geltaschen eingebracht. Eine parallel mitlaufende definierte DNA-Leiter zeigte die Produktgröße an. Uniforme Banden der cDNA Proben und der Positivkontrolle, sowie keine Banden der Minus-RT und NTC zeigten, dass die Transkription erfolgreich war. Die cDNA war damit geeignet um in der quantitativen RT-PCR analysiert zu werden.

4.2.6.7 Quantitative RT-PCR

Aus Literaturrecherchen sind folgende Gene für die hier skizzierte Fragestellung als besonders relevant identifiziert worden: als proinflammatorische Marker Interleukin-1 beta (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), Cyclooxygenase-2 (COX-2) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α); als antiinflammatorischer Marker Interleukin-10 (IL-10). Als Housekeeping Gene wurden Glyceraldehyd-3-phosphate-Dehydrogenase (GAPDH) und Beta-Aktin (β -Actin) gewählt. Für die RT-qPCR wurde je Probe und Marker 1 μ l cDNA auf einer 96-Well-PCR-Platte vorgelegt, jeweils im dreifachen Ansatz. Hinzugefügt wurden 24 μ l eines Primer-Mixes aus SybrGreen Mix, Primer Assay und RNase-freiem Wasser. Zusätzlich wurde auch jede Platte eine Standard-cDNA pipettiert, die als einheitliches Protokoll der Arbeitsgruppe aus equinen mesenchymalen Stammzellen (MSC) gewonnen wurde. Außerdem wurden immer 2 Proben von jedem Primer-Mix ohne cDNA als NTC zur Erkennung von Kontaminationen mitlaufen gelassen. Der gesamte Pipettiervorgang wurde gekühlt auf Eis durchgeführt. Zuletzt wurde die Platte mit einer Adhäsiv-Folie verschlossen und im Thermocycler platziert. Das Protokoll für den Cycler war wie folgt: zu Beginn 10 Minuten 95 °C, dann folgten 40 Zyklen mit je 15 Sekunden bei 95 °C, gefolgt von 1 Minute bei 60 °C. Nach Abschluss der Messzyklen wurde der Schmelzpunkt ermittelt, über eine stufenweise Erhöhung der Temperatur von 1 °C alle 5 Sekunden, von 60 °C auf 95 °C. Die Analysen wurden berechnet mit der Bio-Rad CFX Manager™ Software in $\Delta\Delta$ Ct-Methode. Für jedes Material, in jeder Konzentration wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt.

Tabellarische Auflistung der verwendeten Substanzen für die RT-qPCR:

Substanzen	Volumen [μ l] / Probe
SybrGreen Mix	12,50
qPCR Primer-Assay	10,50
RNase-freies Wasser	1,00
Gesamtmix	24,00
+ cDNA	1,00

Tabellarische Auflistung der Thermocycler-Einstellungen für die RT-qPCR:

Temperatur [°C]	Dauer [min]	
95	10	
95	0:15	40 Zyklen
60	1	
60-95	0:05 (je 1 °C)	
5	hold	

Tabellarische Auflistung der getesteten Markergene mit Gene ID und Katalognummer:

Gene	Gene ID	Katalognummer Qiagen
β-Actin	100033878	PPE00105A
COX-2 [PTGS2]	791253	PPE00021A
GAPDH	100033897	PPE00120A
IL-1β	100034237	PPE00403A
IL-6	100034196	PPE00372A
IL-10	100034187	PPE00364A
TNF-α	100033834	PPE00070A

4.2.6.8 Kontrollen

4.2.6.8.1 Entzündungsmodell

Als Positivkontrolle wurde eine entzündliche Reaktion in den Zellkulturen durch die Zugabe von LPS von *Porphyromonas gingivalis* simuliert. Für EPF ist hierfür bisher kein Protokoll etabliert. Daher war der erste Schritt ein solches zu evaluieren. Ebenso wie die Eluate, wurden auch die in Standardmedium gelösten LPS den Zellen nach einer Anwuchszeit von 24 Stunden zugegeben. Endkonzentrationen von 1 µg/ml und 2 µg/ml wurden angewendet. Die RNA-Extraktionen wurden auch hier nach 2 Stunden und 24 Stunden durchgeführt.

4.2.6.8.2 Equine Monozyten

Für Markergene, die von den EPF nicht sicher exprimiert wurden, mussten Positivkontrollen generiert werden. Eine Möglichkeit dafür stellen equine Monozyten dar (Giguère und Prescott, 1999; Sun et al., 2010). Aus verschiedenen Publikationen wurde ein angepasstes Protokoll erarbeitet. Zu Beginn wurde von einem klinisch gesunden, adulten Pferd 23 ml Vollblut in Heparinröhrchen (25 IE/ml Blut) entnommen. Easycoll® wurde zum Erreichen der notwendigen Dichte von 1,077 g/ml mit PBS verdünnt und Zentrifugenröhrchen mit 10 ml dieser Lösung beschickt. Das Blut wurde zunächst durch einen Zellfilter filtriert, zu gleichen Teilen mit RPMI-1640 verdünnt und schließlich 10 ml davon vorsichtig über die Trennlösung geschichtet. Die Röhrchen wurden dann zur Dichteseperation zentrifugiert (400 × g für 30 min, ohne Bremse). Danach wurde die Schicht aus mononukleären Zellen (MNC), die sich als schmaler, trüber Ring zwischen Plasma und Trennlösung abzeichnete, vorsichtig in ein neues Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde dann zu gleichen Teilen mit Kulturmedium verdünnt und erneut zentrifugiert (300 × g für 10 min, mit Bremse). Das entstandene Zellpellet wurde noch zwei weitere Male wie beschrieben mit Kulturmedium gewaschen und die Zellen ausgezählt. Zuletzt wurden die Zellsuspension auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml in RPMI-1640 mit 10 % FBS und 1 % Pen/Strep eingestellt und je 2 ml/Well auf einer 6 Well-Platte ausgesät. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank wurde LPS in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugefügt und eine weitere Stunde inkubiert. Nun konnte die RNA nach dem zuvor beschriebenen Protokoll extrahiert und nach Transkription in der RT-qPCR ausgewertet werden.

4.3 Statistik

4.3.1 Viabilitätsvergleich

Die errechneten Viabilitätswerte wurden mithilfe des statistischen Softwarepaketes BMDP (Dixon, 1993) analysiert. Konzentrations- und Zeiteffekte sowie mögliche Wechselwirkungen zwischen diesen Einflussfaktoren wurden in einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Programm BMDP 7D untersucht. Danach wurden die Substanzeffekte durch paarweisen Vergleich mit der Kontrolle in einem multiplen Einstichproben-t-Test auf ihre statistische Signifikanz überprüft. Zur Erhöhung der Freiheitsgrade und einer damit einhergehenden Steigerung der statistischen Power dieser Vergleiche wurde dabei das mittlere Abweichungsquadrat aus der zweifaktoriellen ANOVA im t-Test miteinbezogen und die „familywise error rate“ (Fehlerwahrscheinlichkeit erster Art) mithilfe der Bonferroni-Holm-Methode kontrolliert. Generell wurde ein statistisches Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ angenommen.

- **Substanzeffekt** = Vergleich der Viabilität der Testzellen mit der Viabilität der Kontrollzellen (festgesetzt als 100 %).
- **Konzentrationseffekt** = Vergleich der Viabilität der Zellen mit zwei verschiedenen Eluat-Konzentrationen einer Substanz.
- **Zeiteffekt** = Vergleich der zeitlichen Viabilitäts-Verläufe bei Betrachtung der zwei verschiedenen Eluat-Konzentrationen.
- **Wechselwirkung** = Konzentrationseffekt in Abhängigkeit vom Zeitverlauf.

4.3.2 Expressionsvergleich

Die Expressionswerte der verschiedenen Markergene wurden ebenfalls mit dem Software Programm BMDP 7D analysiert. Aufgrund der rechtsschiefen Verteilung der positiven, quantitativen Merkmale wurden zunächst alle Zielgrößen logarithmisch transformiert, um näherungsweise eine Normalverteilung zu erreichen. Globale Unterschiede der Expressionswerte der Proben zu einem Auswertungszeitpunkt innerhalb eines Markergens wurden durch einfaktorielle ANOVA ermittelt.

Mit einer zweifaktoriellen ANOVA wurden die Proben im Paarvergleich mit der Positiv- und der Negativkontrolle verglichen und dabei Substanz- und Zeiteffekte sowie Wechselwirkungen geprüft. Im Falle, dass eine Substanz nur zu einem Zeitpunkt gemessen werden konnte (Calxyl[®]), reduzierte sich das Verfahren auf eine einfaktorielle ANOVA mit anschließendem multiplen t-Test mit α -Kontrolle nach Bonferroni-Holm. Konzentrationseffekte (für Honigum und LPS) wurden mit einer zweifaktoriellen ANOVA ausgewertet. Auch hier wurde ein statistisches Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ angenommen.

- **Substanzeffekt** = Vergleich der Expressionswerte der Testzellen mit der Expression der Kontroll- oder LPS-Zellen.
- **Konzentrationseffekt** = Vergleich der Expressionswerte der Zellen mit zwei verschiedenen Konzentrationen einer Substanz.
- **Zeiteffekt** = Vergleich der zeitlichen Expressionsverläufe bei Betrachtung der zwei verschiedenen Eluat-Konzentrationen.
- **Wechselwirkung** = Substanzeffekt in Abhängigkeit vom Zeitverlauf.

5 Ergebnisse

5.1 Zellkultur

Die kryokonservierten Zellen wurden aufgetaut und angezüchtet. Bei einer Zellaussaat von $2-3 \times 10^4$ Zellen/cm² bildeten die Zellen innerhalb von 1 bis 2 Tagen einen subkonfluenten Zellrasen, der etwa 50 % der Oberfläche des Kulturgefäßes bedeckte. Weiterhin war es möglich die Zellen in einzelnen Zusatzversuchen bis zu Passage 12 zu kultivieren. Mikroskopisch betrachtet zeigten die EPF eine fibroblastentypische, spindelförmige Zellmorphologie und fischzugartiges Wachstum (Abb. 3).

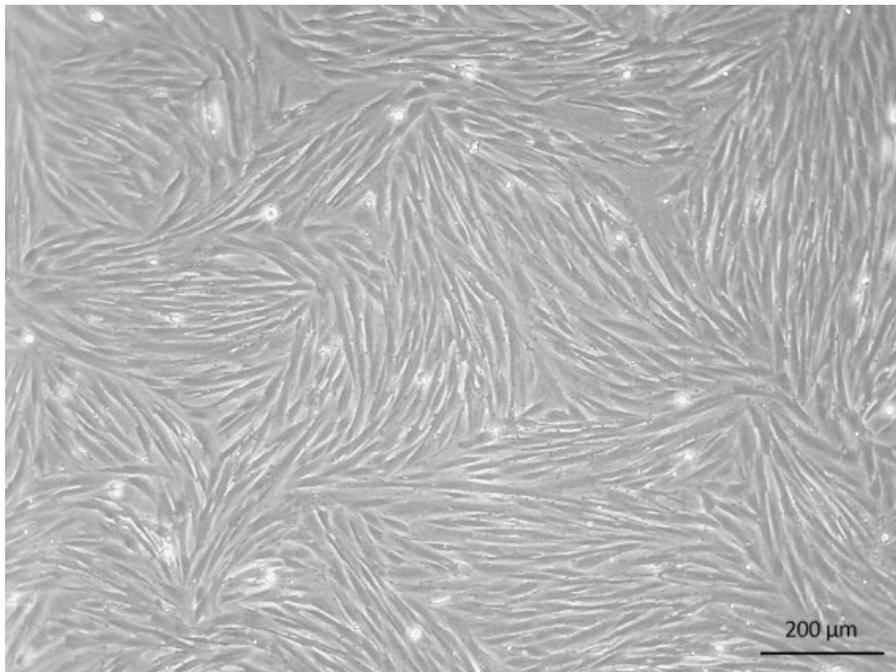


Abb. 3: Morphologie equiner parodontaler Fibroblasten (EPF) in Kultur
Konfluentes Wachstum am 4. Tage nach der Aussaat.

5.2 Mikroskopische Analyse

In den fotografischen Darstellungen der Abbildungen 4a bis 4d können die Morphologie und das Wachstumsverhalten der Zellen in direktem Kontakt zu den applizierten Materialien beurteilt werden. Bei PeriCare[®] (Abb. 4a) und Provicol[®] (Abb. 4b) behielten die Zellen die zuvor beschriebene, fibroblastentypische

Morphologie. Es wurde außerdem eine direkte Anlagerung der Zellen an der Materialoberfläche mit dazu paralleler Ausrichtung beobachtet. Bei Honigum (Abb. 4c) fiel ein zellfreier Raum im direkten Umkreis des Materials auf. Etwas weiter in der Peripherie befanden sich Zellen, die ungleichmäßig abgerundete Formen aufwiesen und sich gegenseitig überlagerten. Calxyl® (Abb. 4d) war im Unterschied zu den anderen Materialien weniger kompakt, sondern vielmehr löslich. Im Blickfeld dominierten deshalb Substanzpartikel, die im Medium flotierten. Zellen waren nur isoliert zu finden. Diese zeigten die physiologische Spindelform.

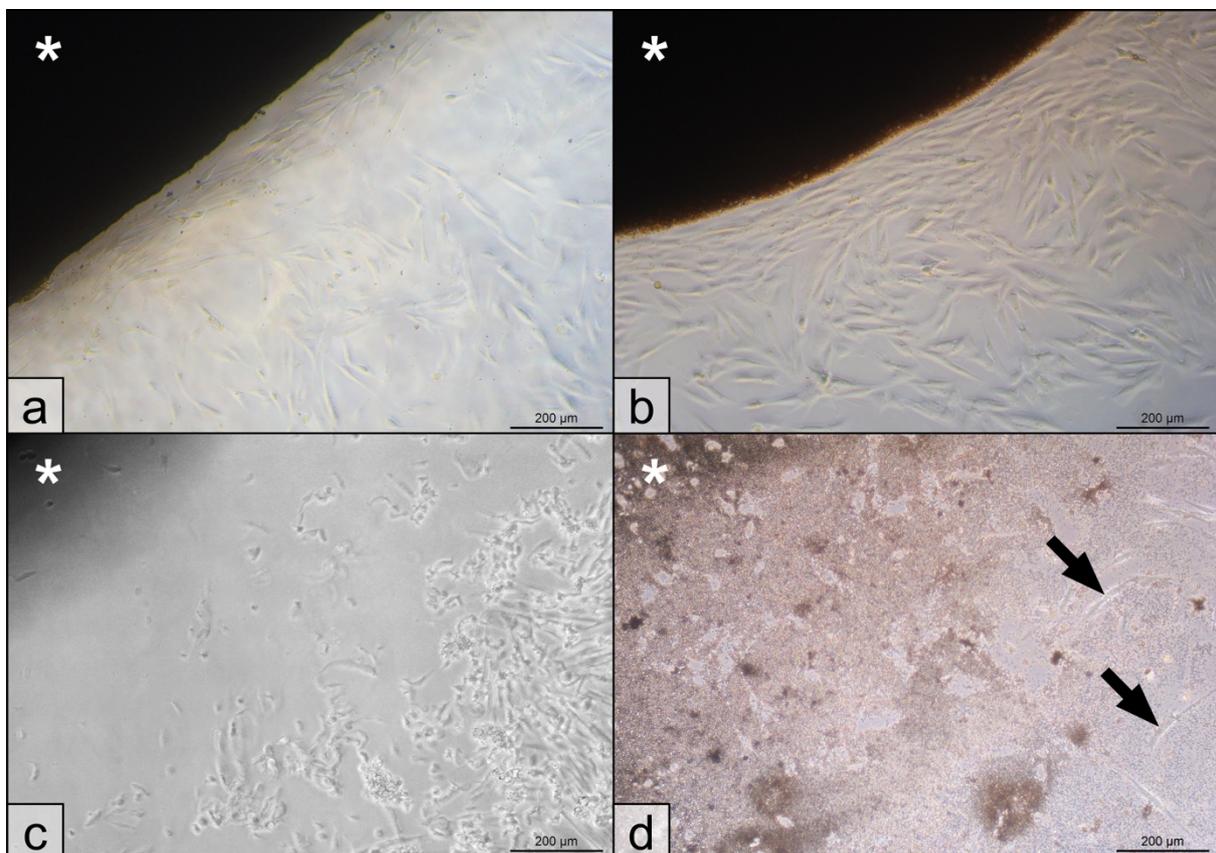


Abb. 4: Morphologie und Wachstumsverhalten der EPF in Kultur unter direktem Einfluss der zahnmedizinischen Materialien

Nach 24 Stunden in Kontakt mit den verschiedenen Materialien (jeweils oben links im Bild, gekennzeichnet durch *). PeriCare® (a) und Provicol® (b) zeigten keine negative Beeinflussung der Zellen. Bei Honigum (c) folgte einem zellfreien Bereich eine Zone mit abgerundeten, morphologisch veränderten Zellen. Calxyl® (d) zeigte sich als teilweise löslich mit flotierenden Substanzpartikeln. Lediglich einzelne spindelförmige Zellen waren zu erkennen (Pfeile).

5.3 Viabilitätstest

Die Viabilität der Zellen, die mit den Eluaten in Standard-Konzentration inkubiert wurden, wurden nach 2, 24 und 48 Stunden ausgewertet (Abb. 5). PeriCare[®] und Provicol[®] hatten keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Zellviabilität. Honigum hatte nur bei den Auswertungen nach 24 und 48 Stunden einen signifikanten Effekt auf die Zellen ($p < 0,001$). Im Diagramm zeigt sich die kontinuierliche Abnahme der Viabilität. Der Effekt von Calxyl[®] war hingegen zu allen drei Messzeitpunkten signifikant ($p < 0,001$). Nach 2 Stunden Inkubation waren nur noch wenige Zellen vital und auch später wurden keine höheren Werte erreicht.

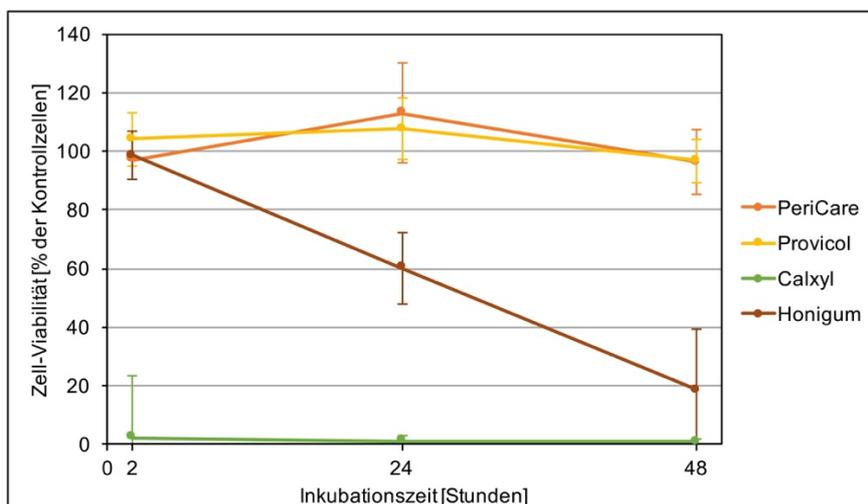


Abb. 5: Zell-Viabilität nach 2, 24, und 48 Stunden Inkubation mit den Eluaten der zahnmedizinischen Materialien

Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen

(für Calxyl[®]: geometrische Mittelwerte und Fehlerwerte der Streufaktoren).

Im weiteren Verlauf wurden Konzentrations-abhängige Effekte der Eluate ermittelt (Abb. 6). Hierzu wurde die Konzentration von PeriCare[®] und Provicol[®] verdoppelt (0,1 g/ml) sowie die von Calxyl[®] und Honigum halbiert (0,025 g/ml). Die Verdopplung der Konzentration hatte keinen signifikanten Substanzeffekt, weder bei PeriCare[®] noch bei Provicol[®] (Abb. 6a und b) und auch der Konzentrationseffekt war nicht signifikant. PeriCare[®] zeigte lediglich einen geringen Zeiteffekt im Vergleich der beiden Konzentrationen ($p < 0,05$). Honigum (Abb. 6c) in halber Konzentration zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollzellen. Verglichen mit der

Standardkonzentration nahm die Viabilität über den Beobachtungszeitraum hinweg weniger stark ab, genauer gesagt, die Abnahme der Viabilität startete später und fiel langsamer ab. Statistisch waren hier sowohl Konzentrations- als auch Zeiteffekt signifikant ($p < 0,001$). Calxyl® (Abb. 6d) hatte in halber Konzentration ebenso einen Substanzeffekt wie in der Standardkonzentration ($p < 0,001$). Daher gab es keinen signifikanten Unterschied beim Vergleich der beiden Konzentrationen. Auch der Zeiteffekt war nicht signifikant.

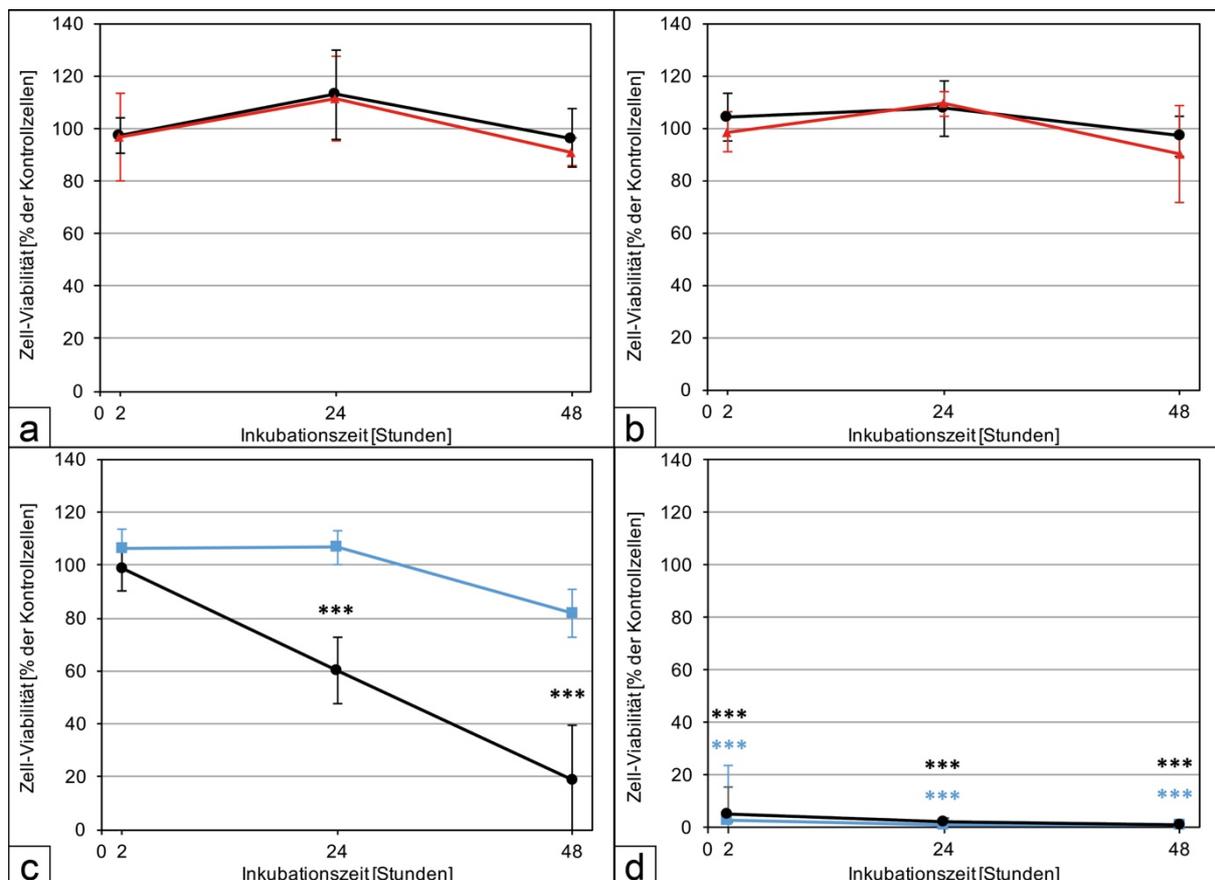


Abb. 6: Zell-Viabilität nach 2, 24, und 48 Stunden Inkubation mit jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen der Eluate

(a) PeriCare®, (b) Provicol®, (c) Honigum und (d) Calxyl®. Schwarz = Standardkonzentration (0,05 g/ml), rot = doppelte Konzentration (0,1 g/ml), blau = halbe Konzentration (0,025 g/ml). Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen (a-c) oder geometrische Mittelwerte und Fehlerwerte der Streufaktoren (d). *** zeigt statistisch signifikante Substanzeffekte mit $p < 0,001$.

5.4 Markergen-Expression

5.4.1 Standard RT-PCR

Nur Proben, die photometrisch ausreichend hohe Konzentrationen an RNA aufwiesen, wurden weiterverarbeitet. Alle cDNA Proben wurden dann zunächst in einer Standard RT-PCR mit GAPDH-Primern und anschließender Gelelektrophorese getestet. Die exemplarische UV-Licht Aufnahme des Agarosegels (Abb. 7) zeigt eindeutig positive Ergebnisse der GAPDH-Expression in den cDNA Proben und der positiven Kontrollprobe. Fehlende Banden in den Minus-RT Kontrollen und der NTC zeigen, dass es keine Anzeichen von Kontaminationen gibt.

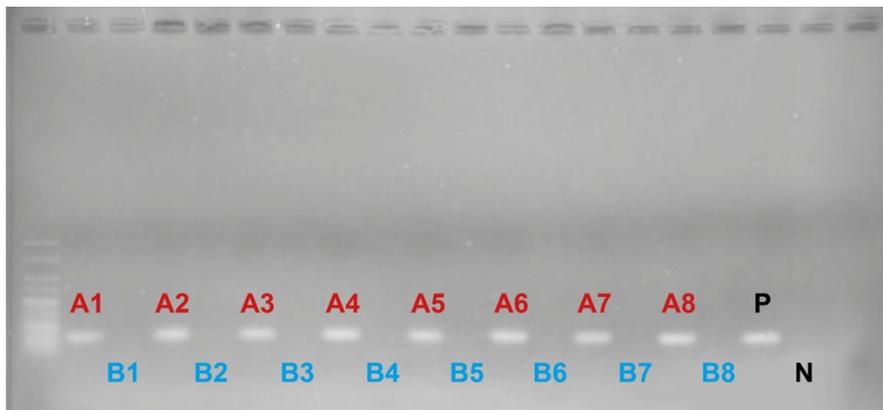


Abb. 7: UV-Licht Aufnahme der PCR-Produkte nach Gelelektrophorese

Gleichförmige Banden der cDNA Proben (A1-A8), dazwischen Minus-RT Kontrollen (B1-B8) und zusätzlich eine positive Probe (P) und eine NTC (N).

5.4.2 Positiv- und Negativkontrollen

5.4.2.1 Negativkontrolle

EPF, die als Negativkontrolle mit unkonditioniertem Kulturmedium inkubiert wurden, exprimierten COX-2, IL-1 β und IL-6 (Abb. 8 und Tab. 2). Gleichmäßige Expressionswerte konnten sowohl nach 2 als auch nach 24 Stunden gemessen werden. TNF- α und IL-10 wurden nicht exprimiert.

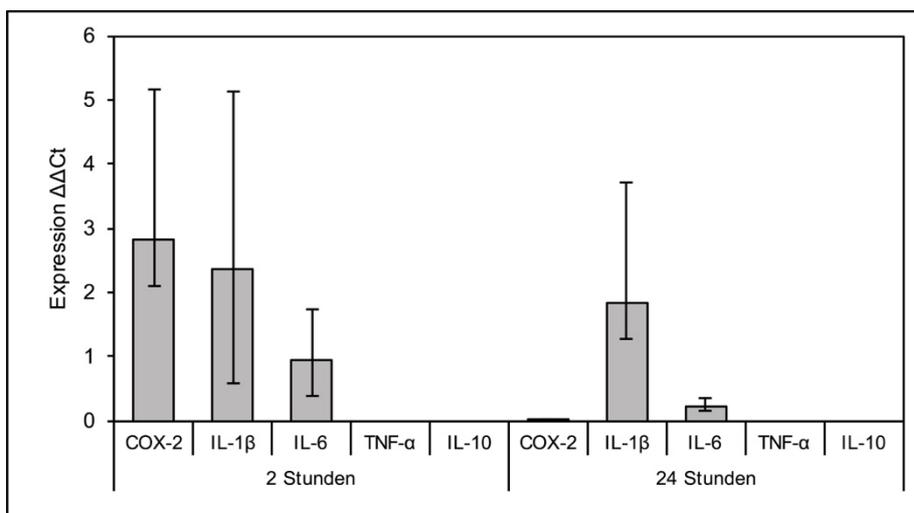


Abb. 8: Expression der Kontroll-EPF

Geometrische Mittelwerte und Fehlerbalken der Streufaktoren sind dargestellt.

5.4.2.2 Positivkontrolle einer Entzündung

Nach Stimulation der EPF mit LPS als Positivkontrolle einer Entzündung konnten ebenfalls COX-2, IL-1 β und IL-6 detektiert werden (Abb. 9 und Tab. 2). TNF- α und IL-10 wurden auch hier nicht exprimiert. Der Vergleich der Positiv- mit der Negativkontrolle zeigte vor allem für IL-6 einen statistisch signifikanten Effekt durch gesteigerte Expression, die bei COX-2 und IL-1 β nur in der niedrigeren LPS-Konzentration vorhanden war (Tab. 1). Im direkten Vergleich der beiden Konzentrationen zeigte die statistische Auswertung einen signifikanten Effekt für IL-1 β und IL-6.

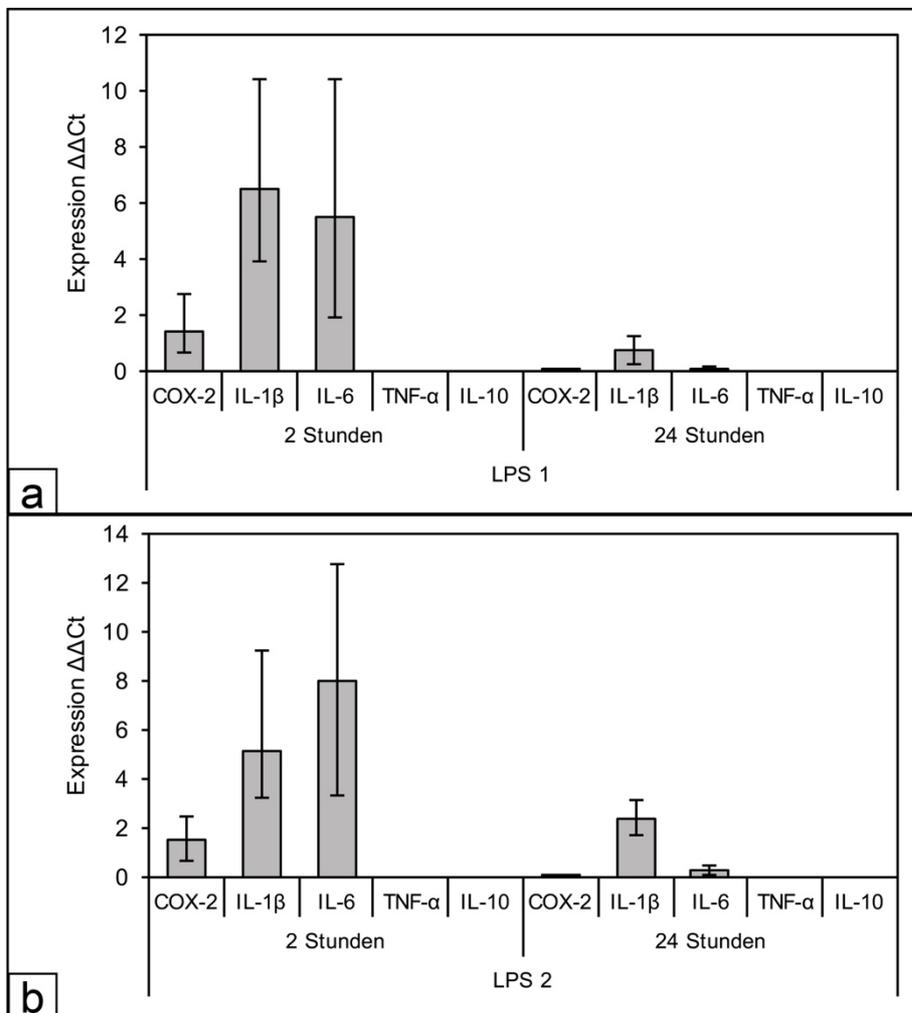


Abb. 9: Expression der LPS-stimulierten EPF

(a) LPS 1 = 1 $\mu\text{g/ml}$, (b) LPS 2 = 2 $\mu\text{g/ml}$

Geometrische Mittelwerte und Fehlerbalken der Streufaktoren sind dargestellt.

Genmarker	LPS	Substanzeffekt	Zeiteffekt	Wechselwirkung
COX-2	1 µg/ml	0,0216 *	<0,0001 ***	n.s.
	2 µg/ml	n.s.	<0,0001 ***	n.s.
IL-1β	1 µg/ml	n.s.	0,0092 **	0,0302 *
	2 µg/ml	n.s.	n.s.	n.s.
IL-6	1 µg/ml	n.s.	<0,0001 ***	0,0034 **
	2 µg/ml	0,0057 **	<0,0001 ***	0,0177 *

Tab. 1: Vergleich der Negativkontrolle mit den LPS-stimulierten Zellen

Statistische Signifikanzen (p-Werte) der Paarvergleiche in Substanz- und Zeiteffekten sowie Wechselwirkungen. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$, n.s. = nicht signifikant.

5.4.2.3 Positivkontrolle nicht-detektierter Markergene

Die cDNA Proben der LPS-stimulierten equinen Monozyten wurden speziell im Hinblick auf die Expression von TNF α und IL-10 getestet. Diese beiden Markergene wurden in gleichmäßigen Mengen detektiert (Abb. 10).

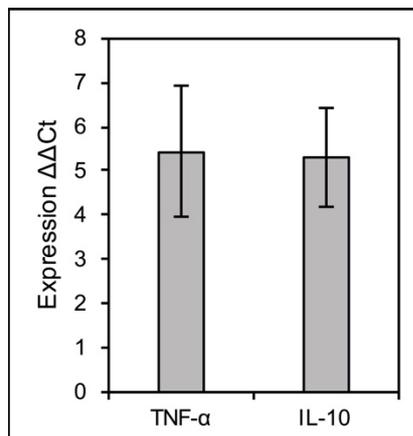


Abb. 10: Expression der equinen Monozyten

Gemessen wurden die TNF- α und IL-10 Expression nach Stimulation mit LPS. Mittelwerte und Standardabweichungen aus 4 Ansätzen sind dargestellt.

5.4.3 Eluate der zahnmedizinischen Materialien

EPF, die mit den Eluaten der zahnmedizinischen Materialien inkubiert wurden, zeigten in unterschiedlicher Ausprägung die Expression von COX-2, IL-1 β und IL-6 (Abb. 11 und Tab. 2). Auch hier wurden weder TNF- α noch IL-10 exprimiert. Calxyl[®] konnte nur nach 2 Stunden und auch dann nur mit halber Eluat-Konzentration analysiert werden, da bei den anderen Extraktionen keine auswertbaren RNA-Mengen erreicht werden konnten. Die globalen Unterschiede zwischen den gemessenen Proben waren für IL-6 bei beiden Auswertungen, für COX-2 und IL-1 β nur nach 24 Stunden signifikant (Abb. 11).

Des Weiteren wurden die Expressionswerte der Zellen nach Zusatz der Eluate mit denen der Negativ- und der Positivkontrolle verglichen (Tab. 3). Der Zeiteffekt war bei fast allen Proben signifikant und zeigte einen eindeutigen Expressionsunterschied zwischen den beiden Messzeitpunkten an. Die Substanzeffekte müssen detaillierter aufgeschlüsselt werden. Es gilt zu bedenken, dass eine signifikante Wechselwirkung zusammen mit einem signifikanten Zeiteffekt einen vorhandenen Substanzeffekt überdecken kann.

Im Vergleich mit der Negativkontrolle ergaben sich für PeriCare[®], Provicol[®] und Calxyl[®] keine signifikanten Substanzeffekten. Für Honigum in Standard-Konzentration wurden signifikante Substanzeffekte für COX-2, IL-1 β und IL-6 gemessen, in halber Konzentration nur für IL-6. Im Vergleich der beiden verschiedenen Konzentrationen von Honigum zeigte die statistische Auswertung einen signifikanten Effekt für COX-2, IL-1 β und IL-6.

Der Vergleich mit der LPS-Positivkontrolle in beiden Konzentrationen ergab für IL-6 signifikante Unterschiede zu allen Eluaten. Für COX-2 und IL-1 β zeigte vor allem Honigum in beiden Konzentrationen signifikante Unterschiede zu den LPS-Proben. Zusätzlich war LPS 1 signifikant unterschiedlich zu PeriCare[®] in COX-2 und LPS 2 zu PeriCare[®] in IL-1 β .

Inkubation	Gen	Wert	Kontrolle	PeriCare®	Provicol®	Honigum
2 Stunden	Cox-2	geometr. MW	2,825	3,508	5,248	1,574
		Min.-Max.	2,083-5,160	2,249-4,647	1,114-13,169	0,672-3,672
	IL-1 β	geometr. MW	2,350	2,355	5,495	0,577
		Min.-Max.	0,584-5,114	0,889-4,747	2,070-13,386	0,000-1,212
	IL-6	geometr. MW	0,946	0,512	0,215	0,049
		Min.-Max.	0,377-1,734	0,462-0,576	0,000-1,048	0,000-0,171
24 Stunden	Cox-2	geometr. MW	0,022	0,019	0,020	5,916
		Min.-Max.	0,013-0,034	0,009-0,039	0,004-0,036	4,893-7,772
	IL-1 β	geometr. MW	1,828	1,153	2,270	24,889
		Min.-Max.	1,281-3,709	0,601-1,771	1,368-4,476	12,814-37,306
	IL-6	geometr. MW	0,236	0,058	0,056	0,026
		Min.-Max.	0,166-0,338	0,000-0,286	0,000-0,257	0,000-0,103

Inkubation	Gen	Wert	Honigum hb	Calxyl® hb	LPS 1	LPS 2
2 Stunden	Cox-2	geometr. MW	1,936	0,705	1,429	1,552
		Min.-Max.	0,831-4,283	0,338-1,670	0,680-2,736	0,730-2,484
	IL-1 β	geometr. MW	1,291	3,062	6,546	5,152
		Min.-Max.	0,615-3,717	0,000-15,679	3,917-10,461	3,218-9,252
	IL-6	geometr. MW	0,410	0,124	5,483	8,035
		Min.-Max.	0,190-0,607	0,000-2,779	1,930-10,461	3,343-12,816
24 Stunden	Cox-2	geometr. MW	0,058	 	0,010	0,018
		Min.-Max.	0,047-0,077	 	0,006-0,012	0,010-0,029
	IL-1 β	geometr. MW	1,413	 	0,789	2,410
		Min.-Max.	0,747-2,228	 	0,289-1,261	1,699-3,124
	IL-6	geometr. MW	0,047	 	0,076	0,296
		Min.-Max.	0,000-0,151	 	0,000-0,197	0,124-0,514

Tab. 2: Absolute Expressionswerte der RT-qPCR

Daten der detektierbaren Markergene COX-2, IL-1 β und IL-6, jeweils geometrische Mittelwerte (geometr. MW) sowie Minimal- und Maximalwerte (Min., Max.). Auswertungen nach 2 und 24 Stunden. hb = halbe Konzentration, LPS 1 = 1 μ g/ml, LPS 2 = 2 μ g/ml.

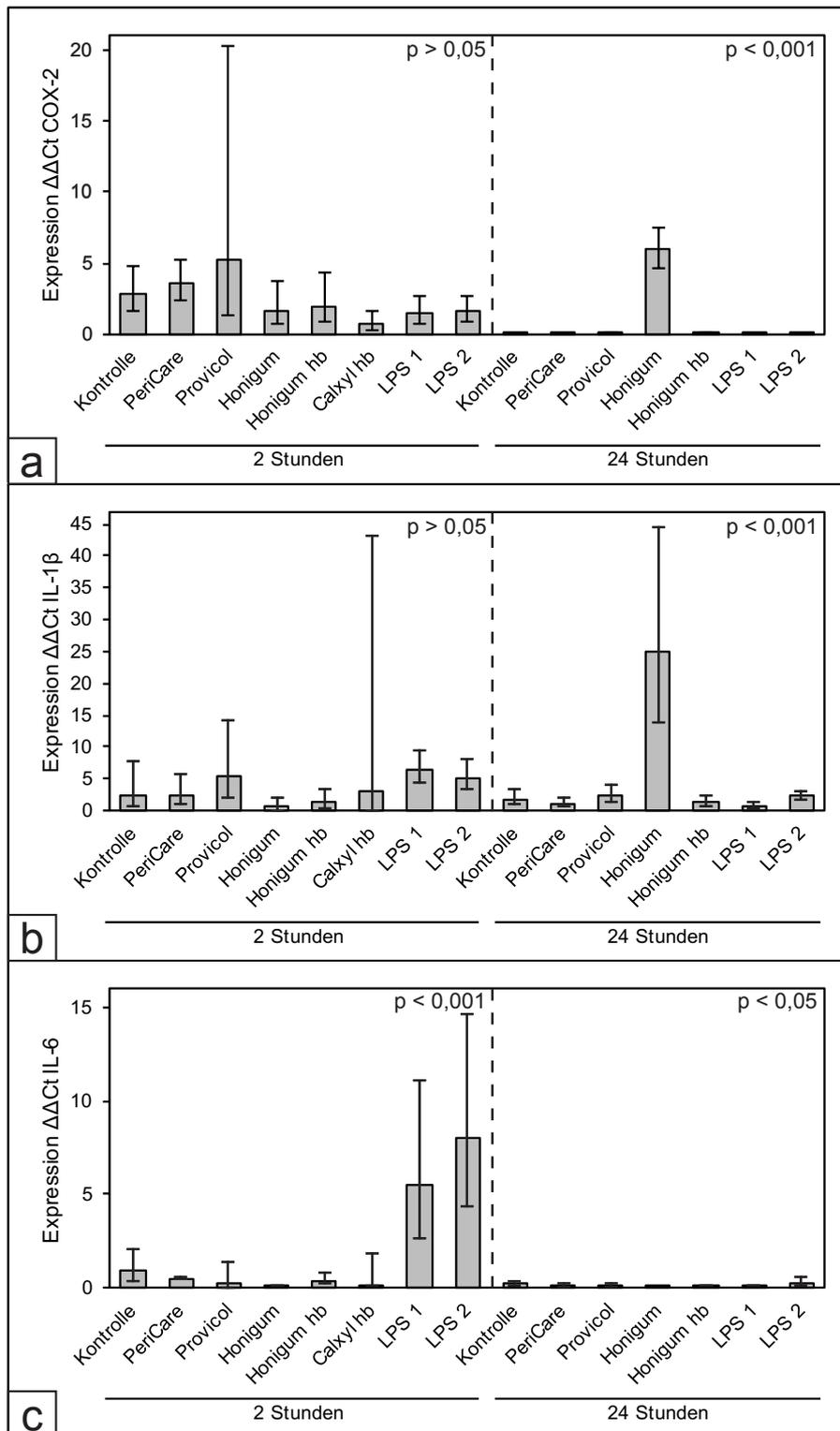


Abb. 11: Einzelübersicht der Expression der detektierten Markergene

(a) COX-2, (b) IL-1 β und (c) IL-6.

Auswertungen nach 2 und 24 Stunden Inkubation mit den verschiedenen Eluaten der zahnmedizinischen Materialien, mit unconditioniertem Medium als (Negativ-) Kontrolle oder mit LPS. Die angegebenen p-Werte zeigen Signifikanzen der globalen Unterschiede innerhalb einer Gruppe an. Geometrische Mittelwerte und Fehlerbalken der Streufaktoren sind dargestellt.

hb = halbe Konzentration, LPS 1 = 1 $\mu\text{g/ml}$, LPS 2 = 2 $\mu\text{g/ml}$.

Genmarker	Zahnmaterial	verglichen mit	Substanzeffekt	Zeiteffekt	Wechselwirkung
COX-2	PeriCare®	Kontrolle	n.s.	<0,0001 ***	n.s.
		LPS 1	0,0211 *	<0,0001 ***	n.s.
		LPS 2	n.s.	<0,0001 ***	n.s.
	Provicol®	Kontrolle	n.s.	<0,0001 ***	n.s.
		LPS 1	n.s.	<0,0001 ***	n.s.
		LPS 2	n.s.	<0,0001 ***	n.s.
	Honigum	Kontrolle	0,0001 ***	0,0006 ***	<0,0001 ***
		LPS 1	<0,0001 ***	0,0001 ***	<0,0001 ***
		LPS 2	<0,0001 ***	0,0004 ***	<0,0001 ***
	Honigum hb	Kontrolle	n.s.	<0,0001 ***	n.s.
		LPS 1	0,0052 **	<0,0001 ***	0,0327 *
		LPS 2	0,0386 *	<0,0001 ***	n.s.
	Calxyl® hb (nur 2h)	Kontrolle	n.s.		
		LPS 1	n.s.		
		LPS 2	n.s.		
IL-1β	PeriCare®	Kontrolle	n.s.	n.s.	n.s.
		LPS 1	n.s.	0,0010 ***	n.s.
		LPS 2	0,0268 *	0,0309 *	n.s.
	Provicol®	Kontrolle	n.s.	n.s.	n.s.
		LPS 1	n.s.	<0,0001 ***	n.s.
		LPS 2	n.s.	0,0240 *	n.s.
	Honigum	Kontrolle	n.s.	0,0125 *	0,0064 **
		LPS 1	n.s.	0,0484 *	<0,0001 ***
		LPS 2	n.s.	0,0017 **	0,0001 ***
	Honigum hb	Kontrolle	n.s.	n.s.	n.s.
		LPS 1	n.s.	0,0108 *	0,0066 **
		LPS 2	0,0104 *	n.s.	n.s.
	Calxyl® hb (nur 2h)	Kontrolle	n.s.		
		LPS 1	n.s.		
		LPS 2	n.s.		
IL-6	PeriCare®	Kontrolle	n.s.	0,0056 **	n.s.
		LPS 1	0,0148 *	<0,0001 ***	0,0415 *
		LPS 2	0,0004 ***	0,0001 ***	n.s.
	Provicol®	Kontrolle	n.s.	n.s.	n.s.
		LPS 1	0,0153 *	0,0008 ***	0,0366 *
		LPS 2	0,0016 **	0,0037 **	n.s.
	Honigum	Kontrolle	0,0002 ***	0,0371 *	n.s.
		LPS 1	<0,0001 ***	0,0001 ***	0,0010 ***
		LPS 2	<0,0001 ***	0,0003 ***	0,0047 **
	Honigum hb	Kontrolle	0,0222 *	0,0034 **	n.s.
		LPS 1	0,0045 **	<0,0001 ***	0,0322 *
		LPS 2	0,0001 ***	<0,0001 ***	n.s.
	Calxyl® hb (nur 2h)	Kontrolle	n.s.		
		LPS 1	0,0045 **		
		LPS 2	0,0047 **		

Tab. 3: Vergleich der Testgruppen mit den Kontrollen

Statistische Signifikanzen (p-Werte) der Paarvergleiche in Substanz- und Zeiteffekten sowie Wechselwirkungen.

hb = halbe Konzentration, LPS 1 = 1 µg/ml, LPS 2 = 2 µg/ml, * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001, n.s. = nicht signifikant.

6 Diskussion

6.1 Auswahl des Untersuchungsmaterials

Zur Evaluierung der Effekte von zahnmedizinischen Materialien für parodontale Füllungen wurden equine parodontale Fibroblasten als Testzellen gewählt. Die Fibroblasten des PDL sind für die Produktion der Kollagenfasern zuständig, die wiederum die Stabilität des Zahns in der Alveole sicherstellen. Im Falle einer parodontalen Erkrankung mit partieller Zerstörung des PDL ist als erster Schritt zur Regeneration eine Proliferation der Fibroblasten notwendig. Um die Anregung der Proliferation und die Genexpression dieser spezifischen Zellen betrachten zu können, wurden primäre Zellen verwendet. Zudem stammten die Zellen aus dem parodontalen Ligament eines einzigen Pferdezahns. Dieser Aspekt birgt die Gefahr, dass zellspezifische Reaktionen überinterpretiert werden, da individuelle Unterschiede von verschiedenen Zellpopulationen nicht in die Auswertung mit einfließen. Andererseits konnte die Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit der Einzelergebnisse somit gewährleistet werden. Dies entspricht einem häufiger angewendeten Studiendesign (Kasaj et al., 2007; Labban et al., 2008). Während in vielen Versuchsprotokollen die Limitierung bei der Verwendung primärer Zellen in der begrenzten Verfügbarkeit besteht (Pizzoferrato et al., 1994), bestand dieses Problem bei den von uns verwendeten EPF nicht. Eine große Anzahl an Zellen war verfügbar und diese ließen sich wiederum ohne Probleme vermehren.

Auch eine Verwendung gingivaler statt parodontaler Fibroblasten wäre möglich gewesen. Jedoch gibt es Unterschiede in den Aufgaben und Eigenschaften. Für humane gingivale Fibroblasten wird vor allem die Rolle der Produktion von extrazellulärer Matrix und Entzündungsregulierung hervorgehoben, während die parodontalen Fibroblasten vermehrt mechanischem Stress ausgesetzt sind und die Gewebemöostase in Regeneration und Remineralisierung aufrechterhalten müssen (McKnight et al., 2014). Da sich unsere Versuche auf das Geschehen im equinen Parodontium beziehen, war die Verwendung von EPF konsequenterweise notwendig.

6.2 Auswahl der zahnmedizinischen Materialien

Verschiedene zahnmedizinische Materialien wurden in unseren Versuchen in ihrer Auswirkung auf die EPF getestet. Ausgewählt wurden sie nach eingehenden Literaturrecherchen. Drei der verwendeten Materialien sind auf Basis von Calciumhydroxid, eine besteht aus dem A-Silikon Vinylpolysiloxan. Alle vier sind ausschließlich für die humane Zahnmedizin zugelassen. Mit Ausnahme von PeriCare® werden die anderen normalerweise nicht für die Behandlung von Parodontalerkrankungen verwendet. Alle Materialien wurden vor ihrer Zulassung bezüglich ihrer Ungefährlichkeit für die Anwendung im Menschen getestet. Allerdings beziehen sich diese Tests auf das spezifische Anwendungsgebiet. In der ISO-Norm 7405 gibt es für die Prüfung von Substanzen zur parodontalen Anwendung keine spezifischen Erläuterungen (ISO Internationale Organisation für Normung, 2017). Es ist jedoch erläutert, dass die Auswahl und Durchführungsweise der Testverfahren abhängig ist von der Anwendungsart und der entsprechenden Expositionsdauer. So sind Abdruckmaterialien nur für eine kurze Verweildauer in der Mundhöhle vorgesehen. Langzeiteffekte werden daher für gewöhnlich nicht getestet. Auch die Lokalisation der Applikation spielt eine Rolle, da verschiedene Zelltypen mit den Materialien in Kontakt kommen. Ein endodontisches Füllmaterial ist somit nur zur Anwendung in der Zahnpulpa vorgesehen.

Für die Pferde Zahnmedizin sind mehrfach kunststoffhaltige Füllmaterialien zur Parodontaltherapie beschrieben (Greene und Basile, 2002; Collins und Dixon, 2005; Johnson und Porter, 2006; Du Toit, 2012; Easley und Odenweller, 2015; Jackson et al., 2016). Bis dato sind jedoch keine Veröffentlichungen über die Verwendung von Calciumhydroxid-haltigen zahnmedizinischen Materialien beim Pferd zu finden. Die Ergebnisse aus humanmedizinischen Studien (Farhad und Mohammadi, 2005; Schwarz et al., 2006; Kasaj et al., 2007) lassen jedoch auf vielversprechende Behandlungsergebnisse hoffen, für die Kombination von Proliferations-stimulierendem Calciumhydroxid und einem in hohem Maße Proliferations-aktiven equinen Parodontium. Verwendet wurde PeriCare® als Exempel für eine ölige Suspension, Provicol® als Calciumhydroxid-haltiger Zement, sowie Calxyl® als wässrige Lösung mit zusätzlichem röntgendichtem Additiv.

In unseren Versuchen konnte mit keiner dieser Materialien eine signifikante Steigerung der Proliferation festgestellt werden. Allerdings zeigten Calxyl[®] und das Kunststoffmaterial Honigum einen zytotoxischen Einfluss auf die EPF. Für Calxyl[®] wurde dieser zytotoxische Effekt auf Zellen in Kultur bereits beschrieben und die hohe Alkalinität für das sofortige Absterben der Zellen verantwortlich gemacht (Dietz und Bartholmes, 1998). Im Gegensatz dazu zeigten PeriCare[®] und Provicol[®] keine negative Beeinflussung der Zellen. Dies lässt sich vermutlich auf die Art der Calciumhydroxid-Formulierung, als ölige Suspension und als Zement, mit geringerer Freisetzung von Hydroxidionen zurückführen (Staehele et al., 1989).

Unter Einfluss von Calxyl[®] wurden sehr niedrige Viabilitätswerte der EPF gemessen. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten ebenfalls nur vereinzelte Zellen, die jedoch eine physiologische Spindelform aufweisen. Dies lässt vermuten, dass einige wenige Zellen den pH-Anstieg unbeschadet überleben konnten. Die fehlende Expression von proinflammatorischen Zytokinen schreiben wir dem schnellen Zelltod zu, weshalb nicht mehr die Möglichkeit einer zwischenzeitlichen Zellreaktion auf Expressionsebene besteht. In der endodontischen Therapie wird gerade dieser desaströse zytotoxische Effekt ausgenutzt, da sich, neben der Abtötung von Mikroorganismen, die lokalen Nekrosen als durchaus sinnvoll erwiesen haben. So wird Calxyl[®] zur Pulpenüberkappung in nach oral eröffnete Pulpahöhlen auf das infizierte und entzündete Gewebe appliziert. Es entstehen in der Folge Gewebnekrosen und sowohl Zellen als auch Bakterien werden abgetötet. Als Zellreaktion wird unter anderem Tertiärdentin gebildet. Dieses sogenannte „Bridging“ bildet eine Barriere zur vitalen Pulpa (Zander, 1939). Zusätzlich kann auch das schnelle Abtöten der Zellen von Vorteil sein, wodurch ein Aussenden von Zytokinen und damit eine sich ausbreitende Entzündung verhindert werden. Desaströse Auswirkungen in Zellkulturen können also bei *in-vivo*-Applikationen auch vorteilhafte Effekte haben.

Über die möglichen Ursachen für die zytotoxische Wirkung von Honigum kann hier nur spekuliert werden. In einigen Studien wurden A-Silikone wie Vinylpolysiloxan häufig als nicht toxisch bezeichnet (Schmalz, 2008; Boraldi et al., 2009). Abdruckmaterialien verbleiben bei Anwendung in der Human-Zahnmedizin für gewöhnlich nur für wenige Minuten in Kontakt mit der Mundschleimhaut und werden dann wieder vollständig entfernt. Während und auch nach diesem kurzen Zeitraum dürfen sie natürlich keine toxischen Auswirkungen hervorrufen.

So wie sie in der Pferde Zahnmedizin zur Füllung von Interdentalräumen umgewidmet werden, ist die Expositionszeit allerdings um ein Vielfaches verlängert. Zytotoxizität kann nach einem Tag und später auftreten, wie es auch von Sydiskis und Gerhardt (Sydiskis und Gerhardt, 1993) für verschiedene Abdruckmaterialien beschrieben wurde, die unter anderem aus Vinylpolysiloxan bestanden. Parodontale Schäden können auch bei zurückgelassenen Resten der Abdruckmaterialien auftreten (Schmalz, 2008).

In unserer Studie konnten wir eine stetige Abnahme der Zellviabilität beobachten, die sich über den gesamten Beobachtungszeitraum erstreckte. Die Viabilität war nach 2 Stunden annähernd bei 100 %, während sie nach 24 Stunden nur noch 60 % und nach 48 Stunden 20 % betrug. Auch die mikroskopischen Aufnahmen nach 24 Stunden Inkubation mit dem Material zeigten Anzeichen des fortschreitenden Zelltods. Der Absterbeprozess bewirkte auch eine Expression von proinflammatorischen Markergenen. Die Genexpressionen nach 2 Stunden entsprachen der der Negativkontrolle. Nach 24 Stunden wurden deutlich erhöhte RNA-Werte für IL-1 β und COX-2 gemessen.

Durch die Halbierung der Substanzkonzentration des Honigum-Eluats wurde die Steigung der Viabilitätsabnahme gemildert. Im Gegensatz zur Standardkonzentration wurde hier vermehrt IL-6 exprimiert, während die Expression von IL-1 β und COX-2 unverändert blieb. Allerdings müssen die Interpretationen der Ergebnisse von Konzentrationsanpassungen mit Distanz betrachtet werden, da sie in der Praxis kaum Relevanz besitzen. Zur Behandlung einer parodontalen Erkrankung muss ein Volumen verwendet werden, das der betroffenen Fläche entspricht. Die Konzentration der Substanz, die eventuell die Zellvitalität negativ beeinflusst, muss außer Acht gelassen werden können.

Weder für Pferde noch für andere Tierarten ist ein medizinisches Produkt zugelassen, das ähnliche Eigenschaften aufweisen, wie die Substanzen, die in dieser Studie getestet wurden. Das zu Beginn beschriebene Doxirobo[®] für Hunde wirkt in erster Linie antibiotisch und stellt damit einen gänzlich anderen Therapieansatz dar. Oravet[®] hingegen wird zur Versiegelung des Zahns zum Schutz vor neuen Plaqueanlagerungen verwendet, was in der Therapie von equinen Parodontalerkrankungen nicht relevant ist. Ein adäquates Füllmaterial muss also aus der Humanmedizin umgewidmet werden.

6.3 Eluate

Zunächst stellte sich die Frage, wie der Kontakt zwischen Zellen und Substanz *in vitro* simuliert werden könnte. Ein direkter Kontakt zwischen den Zellen und dem Substanzmaterial erwies sich für die Durchführung der weiterführenden Versuche als technisch nicht durchführbar, da die mikrobiologischen Testverfahren von den flotierenden Substanzpartikeln gestört wurden. Mit Eluaten wird dieses Problem umgangen.

Zusätzlich bilden Eluate die Situation *in vivo* realitätsnah ab, da tatsächlich nur wenige Zellen des Parodontiums direkt mit den applizierten Substanzen in Kontakt kommen. Vielmehr kommt es zu einer Diffusion von Partikeln aus den applizierten Substanzen in das umgebende Gewebe und zu den Zellen. Eluate erlauben eine quantifizierbare und gleichmäßige Konfrontation aller Zellen mit der Testsubstanz (Harmand, 1992).

In unseren Versuchen waren die Ergebnisse der Versuche mit den Eluaten kompatibel mit denen des direkten Materialkontaktes, wie sich in Vorversuchen gezeigt hat. Bei der Anfertigung der Eluate galt es natürlich zu bedenken, dass ausgehärtete Materialien andere Löslichkeitseigenschaften haben können als im flüssigen Zustand. Entsprechende Vorversuche gaben darauf, für die von uns getesteten zahnmedizinischen Materialien, keinen Hinweis. Deshalb wurden in den Hauptversuchen die zahnmedizinischen Materialien ohne vorherige Aushärtung in das Kulturmedium appliziert. Dies entspricht der Anwendung bei der Behandlung von Pferden mit Parodontalerkrankungen, wo die Substanzen direkt in die erweiterten Zahnzwischenräume oder parodontalen Taschen appliziert werden, um dort auszuhärten.

6.4 Testverfahren

Wie zuvor beschrieben gibt es viele mögliche Testverfahren um die Biokompatibilität von Substanzen zu evaluieren. Dabei gehört der MTT-Test zu den Standard-Protokollen, während RT-qPCR zu den weiterführenden Methoden gezählt werden. Der MTT-Test stellt eine technisch einfach durchführbare und kosteneffiziente Möglichkeit dar, um das Proliferationsverhalten von Zellen zu beurteilen. Jedoch hat auch dieses Testverfahren Limitierungen. So kann zum Beispiel eine unzureichende Homogenität der Stammlösung zu Messungenauigkeiten führen, weshalb wir diese zu

Beginn der Versuche in ausreichendem Volumen angesetzt, filtriert und als Aliquots eingefroren haben. Aufgrund des zytotoxischen Charakters des MTT ist keine Mehrfachmessung einer Zellkultur möglich (Berridge et al., 1996). Daher mussten für jeden Auswertungszeitpunkt eigenständige Zellkulturen angesetzt werden.

RT-qPCR gewähren hochsensitive Aussagen über die Genexpression von Zellen. Dieses Verfahren ist jedoch zeit- und kostenintensiv und durch die vielen Schritte, begonnen mit der RNA-Extraktion, bis hin zur Auswertung der Expressionsdaten, durchaus fehleranfällig. Eine wichtige Rolle spielen daher die vorgenommenen Kontrollen zwischen den einzelnen Schritten, wie die Messung der RNA-Ausbeute, NTC und Minus-RT-Proben zur Überprüfung auf Kontaminationen, die Standard-PCR zur Bestätigung der erfolgreichen Transkription, sowie Dreifachansätze beim Pipettieren der RT-qPCR-Ansätze. In Hinblick auf eine effektive RNA-Ausbeute bei gleichzeitig hoher Qualität wurden für unsere Versuchsanordnung zunächst drei verschiedene Protokolle der RNA-Extraktion getestet. Neben NucleoZOL wurden ein RNA-Extraktionskit „MicroSpin Total RNA“ (ehemals PeqLab, jetzt VWR, Radnor, Pennsylvania) und ein Routine-Laborprotokoll unter Verwendung von „TriFast“ (ebenfalls PeqLab) getestet. In mehreren Vorversuchen wurden die besten Extraktionsergebnisse mit NucleoZol erreicht.

Da in keiner unserer Proben IL-10 oder TNF- α in messbaren Mengen detektiert wurde, musste außerdem eine Positivkontrolle, bestehend aus LPS-stimulierten equinen Monozyten generiert und evaluiert werden, um damit die Funktionalität der Primerassays zu bestätigen.

Anstatt einer Messung der Genexpression wäre auch eine Betrachtung der Proteine möglich gewesen. Mittels Immunblots oder ELISA können die sezernierten Proteine im Überstand der Zellen gemessen werden. Die Ergebnisse korrelieren jedoch nicht immer mit denen der exprimierten Gene, da häufig weitere inflammatorische und Umwelt-Stimuli zur Proteinsynthese benötigt werden (Agarwal et al., 1995; Götz et al., 2015). Die RT-qPCR der RNA liefert somit konkretere Aussagen über die frühe Zellreaktion als Proteinmessungen.

6.5 Markergene

Untersucht wurden Markergene für Zytokine, die eine Rolle in der Pathogenese parodontaler Erkrankungen spielen könnten und in zahnmedizinischen Studien mit humanen parodontalen oder gingivalen Fibroblasten detektiert wurden: IL-1 β (Agarwal et al., 1995; Yamamoto et al., 2006; Scheres et al., 2010; Gölz et al., 2015), IL-6 (Agarwal et al., 1995; Yamaji et al., 1995; Kent et al., 1998; Yamamoto et al., 2006), COX-2 (Chang et al., 2003; Di Nisio et al., 2013) und TNF- α (Yamamoto et al., 2006; Di Nisio et al., 2013). IL-10 wurde zusätzlich als antiinflammatorischer Marker ausgewählt aufgrund der Überlegung, dass eine Detektion auf einen entzündungshemmenden Effekt eines zahnmedizinischen Materials hinwiese.

Die Daten aus der Literatur für die Expression von Entzündungsmarkern sind nicht einheitlich. Eine Studie mit humanen parodontalen Fibroblasten zeigte, dass ohne Stimulation bereits geringe Mengen an IL-6, aber kein IL-1 β und TNF- α messbar waren (Yamaji et al., 1995). In einer anderen Studie konnten IL-1 β und IL-6 detektiert werden, aber kein TNF- α (Scheres et al., 2010). In humanen PDL Zellen, bestehend aus Fibroblasten, Osteoblasten und Osteoklasten, wurden weder IL-1 β noch IL-6 gefunden, aber dafür TNF- α (Yamamoto et al., 2006), während in einer anderen Studie mit ebensolchen Zellen IL-1 β gefunden wurde (Gölz et al., 2015).

Unsere Ergebnisse zeigten, dass die EPF, unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen, weder TNF- α noch IL-10 exprimieren. Die fehlende TNF- α Expression aller gemessener Proben ist zunächst überraschend, stimmt aber überein mit den Ergebnissen von Yamaji et al. (Yamaji et al., 1995). In dieser Studie mit humanen parodontalen Fibroblasten wurde ebenfalls weder vor noch nach einer Stimulation mit LPS TNF- α exprimiert.

Dass IL-10 nicht detektiert wurde, könnte bedeuten, dass keine der getesteten Substanzen einen antiinflammatorischen Effekt bewirken kann. Andererseits wäre eine andere mögliche Erklärung, dass sich IL-10 bei EPF nicht zum Nachweis einer Entzündungshemmung eignet.

Die drei Markergene IL-1 β , IL-6 und COX-2 konnten hingegen in fast allen Proben gemessen werden, auch in der Negativkontrolle. Dies lässt darauf schließen, dass basale Mengen dieser, eigentlich als proinflammatorisch bezeichneten Markergene,

von EPF auch ohne externe Stimulation *in vitro* exprimiert werden. Die Erklärung hierfür ist, dass diese eben nicht nur in entzündlichen Situationen exprimiert und sezerniert werden. Es gibt Nachweise darüber, dass in unterschiedlichen Fibroblastentypen COX-2 und IL-6 an der Regulierung des Zellzyklus (Eckes et al., 1992; Gilroy et al., 2001) und IL-1 β an der Kollagensynthese beteiligt sind (Lertchirakarn et al., 1998). In klinisch gesundem, humanem gingivalen Gewebe wurde beispielsweise RNA von IL-1, IL-6 und TNF- α detektiert, mit der Schlussfolgerung, dass viele Zytokine an der Unterstützung des parodontalen Turnover oder der Integrität des Gewebes beteiligt sind (Okada und Murakami, 1998).

IL-8 wurde in unseren Versuchen nicht untersucht. Wie zu Beginn erläutert, scheint auch dieses Zytokin am parodontalen Expressionsmuster beteiligt zu sein und wäre für nachfolgende Studien von Interesse.

6.6 Entzündungssituation

Wie schon in der Literaturübersicht beschrieben, gibt es verschiedene Möglichkeiten eine Entzündungssituation zu simulieren. Die Stimulation mittels LPS von *Porphyromonas gingivalis* hat sich als gut durchführbar herausgestellt. Für unsere induzierte Entzündungssituation war als Haupteffekt die erhöhte Expression von IL-6 nach 2 Stunden Inkubation detektierbar, was den Ergebnissen einer vergleichbaren Studie mit humanen parodontalen Fibroblasten entspricht (Yamaji et al., 1995).

Im Vergleich der Konzentrationen von 1 $\mu\text{g/ml}$ und 2 $\mu\text{g/ml}$ bei unseren LPS-stimulierten Proben war ein Konzentrationseffekt messbar. Bei der höheren LPS-Konzentration war auch die Expression von IL-6 stärker. Des Weiteren war die Expression, und damit auch der Effekt von LPS, nach 2 Stunden größer als nach 24 Stunden. Dies lässt auf einen zeitnahen Stimulationseffekt schließen.

Im Vergleich zur gesteigerten Expression von IL-1 β und COX-2 durch Honigum nach 24 Stunden Inkubationszeit, wird deutlich, dass das Gesamtbild nicht mit den Ergebnissen nach LPS-Stimulation vereinbar ist. Dies lässt vermuten, dass ein anderer intrazellulärer Mechanismus der Zellstimulation durch LPS und Honigum vorliegt. Mit unserem Versuchsaufbau ist eine genauere Betrachtung der verschiedenen intrazellulären Mechanismen jedoch nicht näher analysierbar.

Die durch Honigum gesteigerte Expression von IL-1 β und COX-2 könnte natürlich, wie zuvor beschrieben, statt auf ein proinflammatorisches Geschehen auch auf einen aktivierten Zellzyklus oder vermehrte Kollagensynthese hindeuten. In Anbetracht der gleichzeitig abnehmenden Zellviabilität ist dies jedoch unwahrscheinlich.

Für weiterführende Experimente sollte in Betracht gezogen werden, eine andere Entzündungs-Positivkontrolle zu verwenden. Wie zu Beginn erläutert, wäre zum Beispiel eine Stimulation mittels Hypoxie (Gölz et al., 2015; Jiang et al., 2015; Wu et al., 2015) oder durch Zusatz von Zytokinen (Bartold und Haynes, 1991; Chang et al., 2003) durchführbar. Eine Hypothese zur IL-6 Expression von parodontalen Zellen ist, dass es durch bakterielles LPS, ebenso wie durch körpereigene Zytokine, über eine autokrine Reaktion mit IL-6-Ausschüttung zu einer parodontalen Gewebeerstörung kommt (Yamaji et al., 1995).

6.7 Übertragbarkeit der *in-vitro*-Ergebnisse auf *in-vivo*-Situationen

Substanzen, die in der Behandlung von parodontalen Erkrankungen Anwendung finden, sollten zunächst eine hohe Biokompatibilität aufweisen. Des Weiteren ist eine antibakterielle, entzündungshemmende und im besten Fall auch eine regenerationsinduzierende Wirkung wünschenswert. In unseren Versuchen konnten wir eine realitätsnahe Situation schaffen, um den direkten Einfluss der Substanzen auf equine parodontale Zellen zu testen. Jedoch kann das gesamte, komplexe Zusammenspiel der verschiedenen Zellen des Parodontiums, der Einfluss des Speichels als Puffer sowie die physiologische und die pathologische bakterielle Besiedelung im Zusammenhang mit zahnmedizinischen Materialien hiermit nur in Ansätzen beleuchtet werden. Inwiefern eine zellabtötende Substanz wie Calxyl[®] einen antibakteriellen und damit vielleicht sogar heilungsfördernden Effekt hat, geht aus den *in-vitro*-Versuchen nicht hervor. Ebenso spielt die lokale Konzentration der Substanz im Gewebe eine Rolle. In der vorliegenden Studie wurde der Extremfall, also der direkte Kontakt getestet, wie auch die indirekte Applikation über Eluate. Es gilt zu bedenken, dass *in-vitro*-Versuche in ihrer Übertragbarkeit auf *in-vivo*-Situationen limitiert sind (Schmalz, 1994). Gelegentlich treten große Unterschiede zwischen den Ergebnissen von *in-vitro*-Versuchen, Tiermodellen und Anwendungstests auf (Mjör et al., 1977).

6.8 Ausblick

In weiterführenden Studien sollten Substanzen, die *in vitro* eine hohe Biokompatibilität aufweisen, in klinischen Studien an Pferden getestet werden. Aufgrund der vorliegenden *in-vitro*-Ergebnisse, kann von der Hypothese ausgegangen werden, dass PeriCare[®] und Provicol[®] weder zytotoxische Effekte aufweisen, noch proinflammatorische Effekte induzieren. Honigum und Calxyl[®] benötigen hingegen intensive Untersuchungen bezüglich ihrer Zytotoxizität und den proinflammatorischen Effekten. Ein möglicher Versuchsaufbau beinhaltet die Entnahme von Stanzproben aus dem parodontalem Gewebe nach einer Behandlung mit den Füllmaterialien. Die Proben können makroskopisch, mikroskopisch, histologisch, sowie immunologisch analysiert werden. Dabei werden Entzündungsanzeichen, Gewebezunahme- oder -abnahme, sowie die Struktur und Anordnung der Gewebestandteile im zeitlichen Verlauf beurteilt. Die Durchführbarkeit der Stanzbeprobung stellt eine Herausforderung dar, die es als ersten Schritt zu untersuchen gilt. Eine sinnvolle Lokalisation an der Gingiva, die Handhabung im Pferdemaul und die Durchführbarkeit, ohne erneut größere Schäden am Gewebe hervorzurufen, muss gründlich getestet werden. Die Ergebnisse einer solchen klinischen Studie wären in jedem Fall ein Meilenstein für die Therapie von Parodontalerkrankungen beim Pferd.

7 Zusammenfassung

Parodontalerkrankungen werden bei Pferden mit hoher Prävalenz vorgefunden. Ursächlich lassen sie sich in den meisten Fällen auf erweiterte Interdentalräume im Backenzahnbereich mit Einschluss von Futterpartikeln zurückführen. Im weiteren Verlauf kommt es zu hochgradigen Entzündungen des Parodontiums mit Bildung von interdentalen und parodontalen Taschen, die wiederum eine Ansammlung von Futter ermöglichen, sodass ein Teufelskreis entsteht. Als mögliche Therapiemethoden kann nach gründlicher Reinigung eine Füllung der Taschen und Zahnzwischenräume erfolgen, wodurch dem Parodontium die Möglichkeit zur Regeneration geboten wird. Hierfür sind bereits verschiedene Substanzen aus der humanen Zahnmedizin im Einsatz. Diese sind für den Gebrauch am Menschen zwar zugelassen, allerdings häufig für andere Anwendungsgebiete als die Applikation in parodontale Wundräume. Die Wirkungen dieser Substanzen auf die speziellen Zellen des equinen Parodontiums sind bisher nicht untersucht worden.

Die Studie soll ein pferdespezifisches *in-vitro*-Modell zur Evaluierung von zytotoxischen oder proinflammatorischen Substanzeffekten der Füllmaterialien hervorbringen. Vier verschiedene zahnmedizinische Materialien unterschiedlicher Zusammensetzung wurden dafür exemplarisch verglichen. PeriCare[®] ist eine Paste, bestehend aus Calciumhydroxid in öliger Suspension, die speziell für die Behandlung von parodontalen Defekten zugelassen ist. Provicol[®] ist ein Zahnzement mit Zusatz von Calciumhydroxid, der unter anderem zur Befestigung von Kronen und Brücken verwendet wird. Calxyl[®] ist eine wässrige Calciumhydroxid-Suspension zur Zahnwurzelbehandlung und -füllung. Durch Bariumsulfat als Kontrastzusatz ist die Substanz röntgensichtbar. Honigum Pro/Mono ist ein Abdruckmaterial auf Silikon-Basis.

Equine parodontale Fibroblasten wurden *in vitro* kultiviert und mit den Füllmaterialien für verschiedene Zeiträume inkubiert. Informationen über zytotoxische Effekte wurden mikroskopisch und durch MTT-Tests gewonnen. Darüber hinaus wurde mit RT-qPCR untersucht, ob und in welchem Umfang die Zellen pro- und antiinflammatorische Markergene exprimierten. Verglichen wurden die Ergebnisse mit den Expressionswerten von unbehandelten Zellen sowie von Zellen in einer, mit Lipopolysacchariden induzierten, Entzündungssituation.

PeriCare® und Provicol® hatten keinen unerwünschten Einfluss auf die Vitalität und Proliferation der parodontalen Zellen. Calxyl® und Honigum führten hingegen zu unterschiedlich starken Beeinträchtigungen der Zellen. Honigum zeigte konzentrations- und zeitabhängig zytotoxische Eigenschaften. Die Viabilität der Zellen nahm ab und proinflammatorische Markergene wurden in einigen Fällen exprimiert. Calxyl® tötete einen Großteil Zellen innerhalb kurzer Zeit ab.

Füllmaterialien, die in der Behandlung von parodontalen Erkrankungen Anwendung finden, sollten biokompatibel sein und im besten Falle regenerative Prozesse fördern. In unseren Versuchen konnten wir eine realitätsnahe Situation schaffen um den Einfluss verschiedener Substanzen auf equine parodontale Zellen zu testen. Allerdings konnte das gesamte, komplexe Zusammenspiel verschiedener Zellentypen und zahnmedizinischer Materialien, sowie der Einfluss von Bakterien, bei *in-vitro*-Versuchen nicht vollständig wiedergegeben werden. Somit lässt sich ohne die Ergebnisse klinischer Studien nicht sagen, ob negative Effekte, wie sie bei Honigum und Calxyl® gesehen wurden, auch *in vivo* auftreten.

In der Pferde Zahnmedizin finden Substanzen Verwendung, die im Humanbereich zwar zugelassen sind, häufig jedoch für ein anderes Anwendungsgebiet. Unsere Ergebnisse verdeutlichen die Relevanz, diese Substanzen zunächst auf ihre Verträglichkeit gegenüber Pferdezellen zu testen um negative Effekte zu vermeiden. PeriCare® und Provicol® scheinen ohne Einschränkungen im equinen Parodontium verwendbar zu sein, während bei Honigum und Calxyl® Vorsicht geboten ist. Es wird empfohlen, Substanzen, die *in vitro* eine hohe Biokompatibilität aufweisen, in klinischen Studien zu testen.

8 Summary

Influence of dental materials on cells of the equine periodontium

Periodontal diseases have a high prevalence in horses. Pathology commonly starts with widened interdental spaces between cheek teeth, where particles of food can become trapped. Subsequently, the periodontium becomes highly inflamed, with formation of interdental and periodontal pockets. In these pockets food particles can accumulate. As therapeutical approach to get out of this vicious circle, interdental and periodontal spaces might be filled with dental materials after cleaning to enable regeneration of the periodontium. These filling materials are usually adopted from human dentistry, where they are used for different fields of application. Their effects on cells of the equine periodontium have not yet been investigated.

This study will evaluate cytotoxic and proinflammatory effects of filling materials in a specific equine *in vitro* model. Four different dental materials have been tested and compared to each other. PeriCare[®] is a paste, consisting of an oily calcium hydroxide suspension, made specifically for the treatment of periodontal pockets. Provicol[®] is a temporary luting cement with calcium hydroxide which is used to affix crowns and bridges to teeth. Calxyl[®] radiopaque is a paste for endodontic treatments like pulp capping. It contains an aqueous suspension and barium sulfate as the radiopaque additive. Honigum (Pro/Mono), an impression material used to prepare implants, consists of monophasic silicone.

Equine periodontal fibroblasts were incubated with the dental materials for various periods of time. The possible cytotoxic effects were assessed microscopically and by MTT assay, and RT-qPCR analyses were performed to quantify the expression of pro- and anti-inflammatory marker genes. The data were compared to untreated controls and to cells in which inflammation was induced by lipopolysaccharide.

PeriCare[®] and Provicol[®] did not harm the cells, but Calxyl[®] and Honigum had a negative influence on the cells. Honigum was cytotoxic in concentration- and time-dependent manner, by showing decreasing viability and triggering expression of pro-inflammatory markers. Furthermore, Calxyl had disastrous effects on the viability of cells, killing nearly all of them immediately.

High biocompatibility of the applied material is a general requirement for the treatment of periodontal disorders. At best, proliferation is used as indicator for a regenerative process. In our *in vitro* experiments we tried to create a realistic situation to get first information about the effects of dental materials on equine periodontal cells. To investigate more complex interactions of applied material with the tissues of the periodontium and also with bacteria under *in vivo* conditions, subsequent clinical studies are recommended. Until now, we cannot say if the negative effects we have seen with Honigum and Calxyl[®] are also going to occur *in vivo*.

In equine dentistry, dental materials are used which are approved for the use in human dentistry, but for various fields of application. Our results show, that before adapting dental materials from human dentistry, it is crucial to initially test them in a specific equine model to investigate their biocompatibility on equine cells and to avoid negative effects. PeriCare[®] and Provicol[®] seem to be harmless, whereas Honigum and Calxyl[®] need careful further investigations. The results of this *in vitro* study need to be confirmed by clinical studies.

9 Anhang

9.1 Publikation und Vorträge

Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Publikation:

- **Ringeisen H, Pöschke A, Krähling B, Schröck C, Stoll M, Vogelsberg J, Failing K, Staszyk C (2017):** Influence of dental materials on cells of the equine periodontium.
Equine Veterinary Journal (akzeptiert: Oktober 2017)
DOI: 10.1111/evj.12768

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden auf folgenden Fachkongressen präsentiert:

- **Ringeisen H*, Krähling B, Pöschke A, Vogelsberg J, Stoll M, Staszyk C (2016):** Influence of dental materials on cells of the equine periodontium.
Zweiter internationaler Kongress der Gesellschaft für Pferdemedizin und der DVG-Fachgruppe "Pferdekrankheiten",
28. bis 29. Oktober 2016, Berlin
- **Ringeisen H*, Pöschke A, Krähling B, Vogelsberg J, Stoll M, Staszyk C (2017):** Einfluss von zur Parodontaltherapie verwendeten Substanzen auf Zellen des equinen Parodontiums.
IGFP-Kongress 2017,
10. bis 11. März 2017, Wiesbaden
- **Ringeisen H*, Pöschke A, Krähling B, Vogelsberg J, Stoll M, Failing K, Staszyk C (2017):** Influence of dental materials on cells of the equine periodontium.
26th European Veterinary Dental Forum,
8. bis 20. Mai 2017, Málaga

*Referentin

10 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Carsten bedanken, der mir ab dem Angebot zur Durchführung dieser Studie die beste Betreuung geboten hat, die ein Doktorand haben kann. Die Zusammenarbeit mit dir, begleitet von deinem enormen Fachwissen, war immer produktiv und unglaublich motivierend. Egal ob im Arbeitsalltag, bei Kongressreisen, Ausflügen mit der Arbeitsgruppe oder sogar bei Korrekturbesprechungen kam der Spaß nie zu kurz.

Ich danke der GPM (Gesellschaft für Pferdemedizin) für die Forschungsförderung ohne die dieses Projekt nicht zustande gekommen wäre.

Ich danke Manfred Stoll für die Anregung zu dieser Studie, die Mithilfe bei der Auswahl der Testsubstanzen sowie für seine klinische Expertise.

Ich danke Dr. Klaus Failing und Andreas Schaubmar für die Auswahl der statistischen Methoden, deren Berechnung und die Hilfe bei der Interpretation der Ergebnisse.

Ich danke der Klinik für Pferde der JLU Gießen für das Bereitstellen der Blutproben.

Ich danke Jörg für die Einführung in die Laborarbeit sowie seine ständige Unterstützung und Rat, wenn wieder einmal etwas nicht funktioniert hat.

Ich danke Antje, Basti und Carmen für ihre Hilfe bei der Ausarbeitung des Studiendesigns, Einführung in die Laborarbeit, wissenschaftliche Expertise bei der Durchführung und Auswertung der Versuche. Mit eurem Wissen und euren Ideen ließ sich am Ende jedes Problem lösen.

Ich danke auch den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Staszyk, Kathi, Lauritz, Kevin und Laura, für die tolle Zeit in Gießen, an die ich mich immer gerne zurückerinnern werde.

Ein großer und herzlicher Dank gehört meiner Familie, Mama, Papa und Dinah, und meiner besten Freundin Pia. Ohne euch und eure Unterstützung wäre ich niemals zu dem Menschen geworden, der ich nun bin. Danke an Mama und Dinah für das Korrekturlesen.

Zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank Daniel, der inzwischen seit 10 Jahren trotz Höhen und Tiefen an meiner Seite ist und mir immer Liebe und Rückhalt gibt. Du hast mir in den richtigen Momenten Ansporn oder Ablenkung geboten, um diese Arbeit fertigzustellen. Außerdem hätte ich die Abbildungen alleine nicht so schön gestalten können.

11 Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Arbeit, wie sie in der „Satzung der Justus- Liebig- Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den 07.11.2017

Hannah Ringeisen

12 Literaturverzeichnis

Agarwal S, Baran C, Piesco NP, Quintero JC, Lamgkamp HH, Johns LP, Chandra CS (1995): Synthesis of proinflammatory cytokines by human gingival fibroblasts in response to lipopolysaccharides and interleukin-1 β .

J Periodontal Res 30: 382-389.

American Academy of Periodontology (2001): Glossary of periodontal terms. American Academy of Periodontology, 4. Aufl., Chicago.

Anthony JM (2000): Advanced periodontic techniques.

Clin Tech Small An P 15: 237-242.

Baker GJ (1979): A study of dental disease in the horse. Glasgow, University of Glasgow, Dissertation.

Bartold PM, Haynes DR (1991): Interleukin-6 production by human gingival fibroblasts. J Periodontal Res 26: 339-345.

Beertsen W, McCulloch CAG, Sodek J (1997): The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. Periodontol 2000 13: 20-40.

Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wan R (1996): The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. Biochem 4: 14-19.

Boraldi F, Coppi C, Bortolini S, Consolo U, Tiozzo R (2009): Cytotoxic evaluation of elastomeric dental impression materials on a permanent mouse cell line and on a primary human gingival fibroblast culture. Materials 2: 934-944.

Bright R, Hynes K, Gronthos S, Bartold PM (2015): Periodontal ligament-derived cells for periodontal regeneration in animal models: a systematic review.

J Periodontal Res 50: 160-172.

Brown LJ, L oe H (1993): Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. Periodontol 2000 2: 57-71.

Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G (1985): The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. Endod Dent Traumatol 1: 170-175.

Caffesse RG, Sweeney PL, Smith BA (1986): Scaling and root planing with and without periodontal flap surgery. J Clin Periodontol 13: 205-210.

Carmalt JL (2003): Understanding the equine diastema. *Equine Vet Educ* 15: 34-35.

Carmalt JL, Rucker BA, Rach DJ (2004): Treatment of periodontitis associated with diastema formation in the horse-an alternative approach.

AAEP Proceedings 50: 37-40.

Casey M (2013): A new understanding of oral and dental pathology of the equine cheek teeth. *Vet Clin Equine* 29: 301-324.

Cavalla F, Hernandez-Rios P, Sorsa T, Biguetti C, Hernandez M (2017): Matrix metalloproteinases as regulators of periodontal inflammation. *Int J Mol Sci* 18: 1-12.

Chang Y-C, Tsai C-H, Yang S-H, Liu C-M, Chou M-Y (2003): Induction of cyclooxygenase-2 mRNA and protein expression in human gingival fibroblasts stimulated with nicotine. *J Periodontal Res* 38: 496-501.

Chinkangsadarn T, Wilson GJ, Greer RM, Pollitt CC, Bird PS (2015): An abattoir survey of equine dental abnormalities in Queensland, Australia.

Aust Vet J 93: 189-194.

Ciapetti G, Granchi D, Stea S, Savarino L, Verri E, Gori A, Savioli F,

Montanaro L (1998): Cytotoxicity testing of materials with limited in vivo exposure is affected by the duration of cell-material contact. *J Biomed Mater Res* 42: 485-490.

Cleland WP (2000): Nonsurgical periodontal therapy.

Clin Tech Small An P 15: 221-225.

Collins NM, Dixon PM (2005): Diagnosis and management of equine diastemata.

Clin Tech Equine Pract 4: 148-154.

Cox A, Dixon PM, Smith S (2012): Histopathological lesions associated with equine periodontal disease. *Vet J* 194: 386-391.

Cugini MA, Haffajee AD, Smith C, Kent RL, JR., Socransky SS (2000): The effect of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases: 12-month results. *J Clin Periodontol* 27: 30-36.

da Silva EJNL, Santos CC, Zaia AA (2013): Long-term cytotoxic effects of contemporary root canal sealers. *J Appl Oral Sci* 21: 43-47.

Dammaschke T (2008): The history of direct pulp capping. *J Hist Dent* 56: 9-23.

- Deas DE, Moritz AJ, Sagun RS[J], Gruwell SF, Powell CA (2016):** Scaling and root planing vs. conservative surgery in the treatment of chronic periodontitis. *Periodontol* 2000 71: 128-139.
- Deutscher Bundestag (1978):** Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln. AMG.
- Di Nisio C, Zara S, Cataldi A, Di Giacomo V (2013):** 2-Hydroxyethyl methacrylate inflammatory effects in human gingival fibroblasts. *Int Endod J* 46: 466-476.
- Dietz G, Bartholmes P (1998):** Calcium hydroxide and bone regeneration. *Odontological aspects of induced osteogenesis in experiment and clinical practice.* Isar-Post, 1. Aufl., Altheim.
- Dixon PM, Dacre I (2005):** A review of equine dental disorders. *Vet J* 169: 165-187.
- Dixon PM, Du Toit N (2011):** Dental anatomy. In: Easley J, Dixon PM, Schumacher J (Hrsg.), *Equine dentistry.* Saunders 3rd ed., Edinburgh, New York, 51-76.
- Dixon PM, Tremaine WH, Pickles K, Kuhns L, Hawe C, McCann J, McGorum BC, Railton DI, Brammer S (2000):** Equine dental disease part 3: a longterm study of 400 cases: disorders of wear, traumatic damage and idiopathic fractures, tumours and miscellaneous disorders of the cheek teeth. *Equine Vet J* 32: 9-18.
- Dixon WJ (1993):** BMDP Statistical Software Manual: Volume 1 and 2. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London.
- Dongari-Bagtzoglou AI, Ebersole JL (1998):** Increased Presence of Interleukin-6 (IL-6) and IL-8 Secreting Fibroblast Subpopulations in Adult Periodontitis. *J Periodontal Res* 69: 899-910.
- Du Toit N (2012):** The problem with equine cheek teeth diastemata. *Vet Rec:* 42–43.
- Easley J, Odenweller S (2015):** Is your practice diagnosing cheek teeth diastemata? *Equine Vet Educ* 27: 376-384.
- Eckes B, Hunzelmann N, Löms Ziegler-Heitbrock H-W, Urbanski A, Luger T, Krieg T, Mauch C (1992):** Interleukin-6 expression by fibroblasts grown in three-dimensional gel cultures. *FEBS Lett* 298: 229-232.
- Eick S, Strugar T, Miron RJ, Sculean A (2014):** In vitro-activity of oily calcium hydroxide suspension on microorganisms as well as on human alveolar osteoblasts and periodontal ligament fibroblasts. *BMC oral health* 14: 1-10.

- Eltzschig HK, Carmeliet P (2011):** Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med* 364: 656-665.
- Evans HE, Lahunta A de (2013):** Miller's anatomy of the dog. Elsevier, 4. Aufl., St. Louis, Missouri.
- Farhad A, Mohammadi Z (2005):** Calcium hydroxide: a review. *Int Dent J* 55: 293-301.
- Feghali CA, Wright TM (1997):** Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* 2: 12-26.
- Ferracane JL (1994):** Elution of leachable components from composites. *J Oral Rehabil* 21: 441-452.
- Ferracane JL, Mitchell JC (2012):** Biocompatibility and Tissue Reaction to Biomaterials. In: Sakaguchi RL, Powers JM (Hrsg.), *Craig's restorative dental materials*. Mosby 13. Aufl., St. Louis Missouri, 109-133.
- Gad T (1968):** Periodontal disease in dogs. *J Periodontal Res* 3: 268-272.
- Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G (1998):** Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res* 41: 474-480.
- Giannobile WV, Finkelman RD, Lynch SE (1994):** Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I. *J Periodontol* 65: 1158-1168.
- Giguère S, Prescott JF (1999):** Quantitation of equine cytokine mRNA expression by reverse transcription-competitive polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunop* 67: 1-15.
- Gilroy DW, Saunders MA, Wu KK (2001):** COX-2 expression and cell cycle progression in human fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: 188-194.
- Gölz L, Memmert S, Rath-Deschner B, Jäger A, Appel T, Baumgarten G, Götz W, Frede S (2015):** Hypoxia and *P. gingivalis* synergistically induce HIF-1 and NF- κ B activation in PDL cells and periodontal diseases. *Mediat Inflamm*: 1-12.
- Greene SK, Basile TP (2002):** Recognition and treatment of equine periodontal disease. *AAEP Proceedings* 48: 463-466.

Greenstein G (1992): Periodontal response to mechanical non-surgical therapy: a review. *J Periodontol* 63: 118-130.

Harmand MF (1992): Human cell culture and characterization of cell/biomaterial interface. *Clin Mater* 11: 145-150.

Herath TDK, Wang Y, Seneviratne CJ, Lu Q, Darveau RP, Wang C-Y, Jin L (2011): Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide lipid A heterogeneity differentially modulates the expression of IL-6 and IL-8 in human gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol* 38: 694-701.

Huang F-M, Tai K-W, Chou M-Y, Chang Y-C (2002): Cytotoxicity of resin-, zinc oxide–eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int Endod J* 35: 153-158.

Ireland JL, McGowan CM, Clegg PD, Chandler KJ, Pinchbeck GL (2012): A survey of health care and disease in geriatric horses aged 30 years or older. *Vet J* 192: 57-64.

Isidor F, Karring T, Attstrom R (1984): The effect of root planing as compared to that of surgical treatment. *J Clin Periodontol* 11: 669-681.

ISO Internationale Organisation für Normung (2009): Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität (EN ISO 10993-5:2009). Beuth Verlag.

ISO Internationale Organisation für Normung (2017): Zahnheilkunde - Beurteilung der Biokompatibilität von in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukten (ISO/DIS 7405:2017). Beuth Verlag.

Jackson K, Weber LM, Tennant M (2016): A retrospective study of the effectiveness of four different treatments of periodontal disease in equine cheek teeth. *J Vet Dent* 33: 83-89.

Jepsen K, Jepsen S (2016): Antibiotics/antimicrobials: systemic and local administration in the therapy of mild to moderately advanced periodontitis. *Periodontol* 2000 71: 82-112.

Jiang CM, Liu J, Zhao JY, Xiao L, An S, Gou YC, Quan HX, Cheng Q, Zhang YL, He W, Wang YT, Yu WJ, Huang YF, Yi YT, Chen Y, Wang J (2015): Effects of hypoxia on the immunomodulatory properties of human gingiva-derived mesenchymal stem cells. *J Dent Res* 94: 69-77.

Johnson TJ, Porter CM (2006): Dental conditions affecting the mature performance horse. *AAEP Proceedings* 52.

Jong RAM, van der Reijden WA (2010): Feasibility and therapeutic strategies of vaccines against *Porphyromonas gingivalis*. *Expert Rev Vaccines* 9: 193-208.

Jordan AR, Micheelis W (2016): Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V), 1. Aufl., Berlin/Köln.

Karring T, S., Nyman S, Gottlow J, Laurell L (1993): Development of the biological concept of guided tissue regeneration - animal and human studies. *Periodontol* 2000 1: 26-35.

Kasaj A, Willershausen B, Berakdar M, Tekyatan H, Sculean A (2006): Effect of an oily calcium hydroxide suspension on early wound healing after nonsurgical periodontal therapy. *Clin Oral Invest* 10: 72-76.

Kasaj A, Willershausen B, Jewszyk N, Schmidt M (2007): Effect of an oily calcium hydroxide suspension (Osteoinductal) on human periodontal fibroblasts. An in vitro study. *Eur J Med Res* 12: 1-5.

Kennedy R, Lappin DF, Dixon PM, Buijs MJ, Zaura E, Crielaard W, O'Donnell L, Bennett D, Brandt BW, Riggio MP (2016): The microbiome associated with equine periodontitis and oral health. *Vet Res* 47: 1-9.

Kennedy RS, Dixon PM (2016): The aetiopathogenesis of equine periodontal disease - a fresh perspective. *Equine Vet Educ*: 1-8.

Kent LW, Rahemtulla F, Hockett RD, JR., Gilleland RC, Michalek SM (1998): Effect of lipopolysaccharide and inflammatory cytokines on interleukin-6 production by healthy human gingival fibroblasts. *Infect Immun* 66: 608-614.

Kinane DF (2001): Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000 25: 8-20.

- Kindermann T (2013):** Einfluss eines subgingival applizierten Calciumhydroxidpräparates auf die inflammatorische Reaktion bei Parodontitis und dessen regenerativ/reparatives Vermögen auf die parodontalen Gewebe. Homburg/Saar, Universitätsklinikum des Saarlandes, Dissertation.
- Klugh DO (2005):** Equine periodontal disease. Clin Tech Equine Pract 4: 135-147.
- Krishna R, Stefano JAd (2016):** Ultrasonic vs. hand instrumentation in periodontal therapy: clinical outcomes. Periodontol 2000 71: 113-127.
- Labban N, Song F, Al-Shibani N, Windsor LJ (2008):** Effects of provisional acrylic resins on gingival fibroblast cytokine/growth factor expression. J Prosthet Dent 100: 390-397.
- Lai Y-L, Chen Y-T, Lee S-Y, Shieh T-M, Hung S-L (2004):** Cytotoxic effects of dental resin liquids on primary gingival fibroblasts and periodontal ligament cells in vitro. J Oral Rehabil 31: 1165-1172.
- Lekic P, McCulloch CAG (1996):** Periodontal ligament cell populations: The central role of fibroblasts in creating a unique tissue. Anat Rec 245: 327-341.
- Lertchirakarn V, Birner R, Messer HH (1998):** Effects of interleukin-1 beta on human pulpal fibroblast proliferation and collagen synthesis. J Endodont 24: 409-413.
- Lindhe J, Hamp S-E, Loe H (1973):** Experimental periodontitis in the Beagle dog. J Periodontal Res 8: 1-10.
- Little WL (1913):** Periodontal disease in the horse. J Comp Pathol Therap 26: 240-249.
- Löe H, Theilade E, Jensen SB (1965):** Experimental gingivitis in man. J Periodontol 36: 5-15.
- Marsh PD, Bradshaw DJ (1995):** Dental plaque as a biofilm. J Ind Microbiol 15: 169-175.
- McKnight H, Kelsey WP, Hooper DA, Hart TC, Mariotti A (2014):** Proteomic analyses of human gingival and periodontal ligament fibroblasts. J Periodontol 85: 810-818.
- Mensing N (2009):** Remodeling im Parodontium des Pferdes – In-vitro-Studien der Proliferationseigenschaften und der osteogenen Differenzierung parodontaler und subkutaner Zellen. Hannover, Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation.

Miron RJ, Shuang Y, Sculean A, Buser D, Chandad F, Zhang Y (2016): Gene array of PDL cells exposed to Osteogain in combination with a bone grafting material. Clin Oral Invest 20: 2037-2043.

Mjör IA, Hensten-Pettersen A, Skogedal O (1977): Biological evaluation of filling materials. A comparison of results using cell culture techniques, implantation tests and pulp studies. Int Dent J 27: 124-129.

Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z (1997): Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. J Immunol Methods 204: 205-208.

Nanci A (2012): Structure of the oral tissue. In: Nanci A (Hrsg.), Ten cate's oral histology. Elsevier 8. Aufl., Oxford, 1-13.

Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) (Hrsg.) (2016): Umwidmung von Arzneimitteln im Therapienotstand. Merkblatt.

Niemiec BA (2008): Periodontal therapy. Top Companion Anim M 23: 81-90.

Noda M, Wataha JC, Lockwood PE, Volkmann KR, Kaga M, Sano H (2003): Sublethal, 2-week exposures of dental material components alter TNF- α secretion of THP-1 monocytes. Dent Mater 19: 101-105.

Okada H, Murakami S (1998): Cytokine expression in periodontal health and disease. Crit Rev Oral Biol Med 9: 248-266.

Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW (2005): Periodontal diseases. Lancet 366: 1809-1820.

Pizzoferrato A, Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Arciola CR, Granchi D, Savarino L (1994): Cell culture methods for testing biocompatibility. Clin Mater 15: 173-190.

Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL, Gunsolley JC (2003): The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. A systematic review. Ann Periodontol 8: 227-265.

Riggio MP, Lennon A, Taylor DJ, Bennett D (2011): Molecular identification of bacteria associated with canine periodontal disease. Vet Microbiol 150: 394-400.

Rucker BA (2006): Treatment of equine diastemata. AAEP Proceedings 52.

Scelza MZ, Coil J, Alves GG (2012): Effect of time of extraction on the biocompatibility of endodontic sealers with primary human fibroblasts. Braz Oral Res 26: 424-430.

Scheres N, Laine ML, Vries TJ de, Everts V, van Winkelhoff AJ (2010): Gingival and periodontal ligament fibroblasts differ in their inflammatory response to viable *Porphyromonas gingivalis*. J Periodontal Res 45: 262-270.

Schmalz G (1994): Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials – advantages and limitations. J Dent 22: 6-11.

Schmalz G (2008): Materials for short-term application in the oral cavity. Impression materials. In: Schmalz G, Bindsvlev DA (Hrsg.), Biocompatibility of dental materials. Springer Science+Business Media 1. Aufl., Berlin Heidelberg, 294-299.

Schröder HE (2000): Orale Strukturbiologie. Entwicklungsgeschichte, Struktur und Funktion normaler Hart- und Weichgewebe der Mundhöhle und des Kiefergelenks. Thieme, 5. Aufl., Stuttgart.

Schröder U (1985): Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. J Dent Res 64: 541-548.

Schwarz F, Stratul S-I, Herten M, Beck B, Becker J, Sculean A (2006): Effect of an oily calcium hydroxide suspension (Osteoinductal) on healing of intrabony periodontal defects. A pilot study in dogs. Clin Oral Invest 10: 29-34.

Simhofer H, Griss R, Zetner K (2008): The use of oral endoscopy for detection of cheek teeth abnormalities in 300 horses. Vet J 178: 396-404.

Slots J (2012): Low-cost periodontal therapy. Periodontol 2000 60: 110-137.

Slots J, Ting M (1999): *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. Periodontol 2000 20: 82-121.

Soh LL, Newman HN, Strahan JD (1982): Effects of subgingival chlorhexidine irrigation on periodontal inflammation. J Clin Periodontol 9: 66-74.

Staehele HJ, Pioch T, Hoppe W (1989): The alkalizing properties of calcium hydroxide compounds. Dent Traumatol 5: 147-152.

Staszuk C, Gasse H (2007): Primary culture of fibroblasts and cementoblasts of the equine periodontium. Res Vet Sci 82: 150-157.

- Sun W-C, Moore JN, Hurley DJ, Vandenplas ML, Fortes B, Thompson R, Linden J (2010):** Differential modulation of lipopolysaccharide-induced expression of inflammatory genes in equine monocytes through activation of adenosine A2A receptors. *Vet Immunol Immunop* 134: 169-177.
- Sydiskis RJ, Gerhardt DE (1993):** Cytotoxicity of impression materials. *J Prosthet Dent* 69: 431-435.
- Sykora S, Pieber K, Simhofer H, Hackl V, Brodesser D, Brandt S (2014):** Isolation of *Treponema* and *Tannerella* spp. from equine odontoclastic tooth resorption and hypercementosis related periodontal disease. *Equine Vet J* 46: 358-363.
- Teare JM, Islam R, Flanagan R, Gallagher, S., Davies, M.G., Grabau, C. (1997):** Measurement of nucleic acid concentrations using the DyNA Quant and the GeneQuant. *Biotechniques* 22: 1170-1174.
- Thomé H (2004):** Mundhöhle und Schlundkopf. Zähne und Gebiß. In: Nickel R, Schummer A, Seiferle E, Frewein J (Hrsg.), *Eingeweide*. Parey 9. Aufl., Stuttgart, 79-102.
- Tiozzo R, Magagna F, Boraldi F, Croce MA, Bortolini S, Consolo U (2003):** Study of the potential cytotoxicity of dental impression materials. *Toxicol In Vitro* 17: 657-662.
- Tremaine H (2013):** Advances in the treatment of diseased equine cheek teeth. *Vet Clin Equine* 29: 441-465.
- Tummers M, Thesleff I (2003):** Root or crown. A developmental choice orchestrated by the differential regulation of the epithelial stem cell niche in the tooth of two rodent species. *Development* 130: 1049-1057.
- Walker H, Chinn E, Holmes S, Barwise-Munro L, Robertson V, Mould R, Bradley S, Shaw DJ, Dixon PM (2012):** Prevalence and some clinical characteristics of equine cheek teeth diastemata in 471 horses examined in a UK first-opinion equine practice (2008 to 2009). *Vet Rec* 171: 44-47.
- Warhonowicz M, Staszuk C, Rohn K, Gasse H (2006):** The equine periodontium as a continuously remodeling system: morphometrical analysis of cell proliferation. *Arch Oral Biol* 51: 1141-1149.

Wikesjö UME, Selvig KA (1999): Periodontal wound healing and regeneration. *Periodontol* 2000 19: 22-39.

Williams DF (1999): The Williams Dictionary of Biomaterials. Liverpool University Press, 1. Aufl., Liverpool.

Wissdorf H, Bartmann CP, Staszyc C, Otto B, Gerhards H (2010): Zähne und ihr Halteapparat. In: Wissdorf H, Gerhards H, Huskamp B, Deegen E (Hrsg.), *Praxisorientierte Anatomie und Propädeutik des Pferdes*. Schaper 3. Aufl., Hannover, 157-189.

Wissdorf H, Otto B (2010): Kopf-Hals-Bereich. Kopfskelett einschließlich Zungenbein und Kiefergelenk mit Kaumuskulatur. In: Wissdorf H, Gerhards H, Huskamp B, Deegen E (Hrsg.), *Praxisorientierte Anatomie und Propädeutik des Pferdes*. Schaper 3. Aufl., Hannover, 55-73.

Wu J, Stefaniak J, Hafner C, Schramel JP, Kaun C, Wojta J, Ullrich R, Tretter VE, Markstaller K, Klein KU (2015): Intermittent hypoxia causes inflammation and injury to human adult cardiac myocytes. *Anesth Analg*: 1-8.

Yamaji Y, Kubota T, Sasaguri K, Sato S, Suzuki Y, Kumada H, Umemoto T (1995): Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharides. *Infect Immun* 63: 3576-3581.

Yamamoto T, Kita M, Oseko F, Nakamura T, Imanishi J, Kanamura N (2006): Cytokine production in human periodontal ligament cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res* 41: 554-559.

Zambon JJ (1996): Periodontal diseases: microbial factors. *Ann Periodontol* 1: 879-925.

Zander HA (1939): Reaction of the pulp to calcium hydroxide. *J Dent Res* 18: 373-379.

Zetner K, Rothmueller G (2002): Treatment of periodontal pockets with doxycycline in beagles. *Vet Ther* 3: 441-452.

Zhu W, Liang M (2015): Periodontal ligament stem cells: current status, concerns, and future prospects. *Stem Cells Int*: 1-11.