

## Verbund I: Laseroptische Methode zur Biokompatibilitätsprüfung dentaler Legierungen



Klaus Liefeth<sup>1</sup>, Ronald Schade<sup>1</sup>, Gerhard Hildebrand<sup>1</sup>, Karl-Otto Greulich<sup>2</sup>, Birgit Perner<sup>2</sup>, Lutz Pfeiffer<sup>3</sup>, Carsten Stein<sup>3</sup>, Roland Strietzel<sup>4</sup>



<sup>1</sup>Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik (iba), Heiligenstadt

<sup>2</sup>Institut für Molekulare Biotechnologie (IMB), Jena

<sup>3</sup>Innovative Optische Messtechnik GmbH (IOM), Berlin

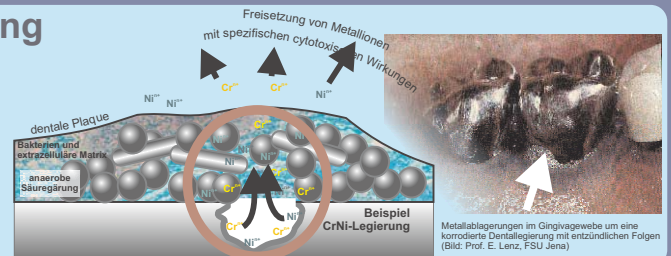
<sup>4</sup>Bremer Goldschlägerei Wilh. Herbst GmbH & Co. (BEGO), Bremen



### Einleitung

Unverträglichkeitsreaktionen beim Einsatz metallischer Zahnersatzmaterialien stellen ein nicht zu unterschätzendes Gesundheitsrisiko für den Patienten dar. Die Prüfung der Biokompatibilität der in der Dentalpraxis eingesetzten metallischen Dentalmaterialien basiert auf einschlägigen in vitro-Tests entsprechend der Norm EN/DIN/ISO 10993 und umfasst Zellkulturtests im Dead-end-Verfahren. Diese Testungen weisen gegenüber modernen optischen Verfahren der Zellanalytik Nachteile auf. Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeiten wurde ein in vitro-Prüfverfahren auf der Basis zweier sich ergänzender laseroptischer Messprinzipien entwickelt:

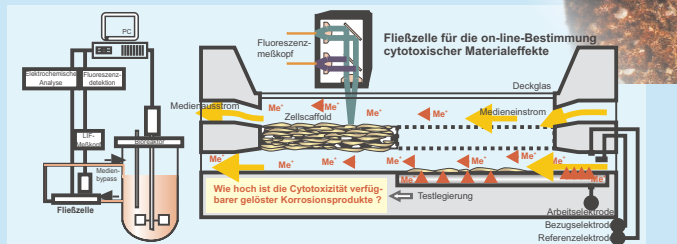
- Laserinduzierte Fluoreszenz-Detektion (LIF) und
- Laseroptische Pinzette an nichtdurchstrahlbaren Materialoberflächen.



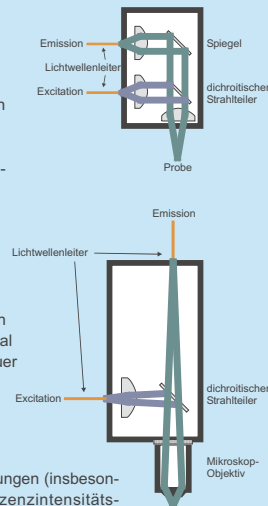
### LIF-Detektion

Die Vitalität von Zellen im Kontakt mit Materialoberflächen bzw. ihren Korrosionsprodukten wird vom Grad der Toxizität der Materialien bestimmt. Der Gehalt an reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) als Elektronenüberträger vom Citratsäurezyklus in die Atmungskette korreliert dabei mit der Zellstoffwechsellaktivität. Die reduzierte Form NADH weist gegenüber dem oxidierten Molekül NAD eine autonome Fluoreszenz bei 460 nm nach Anregung mit 337 nm Laserlicht auf. Die Fluoreszenzsignalintensität in Abhängigkeit des Gehaltes an NADH wird als Basis für die Bestimmung der Zellvitalität bei Kontakt mit potentiell zytotoxischen metallischen Zahnersatzmaterialien genutzt.

#### Messprinzip

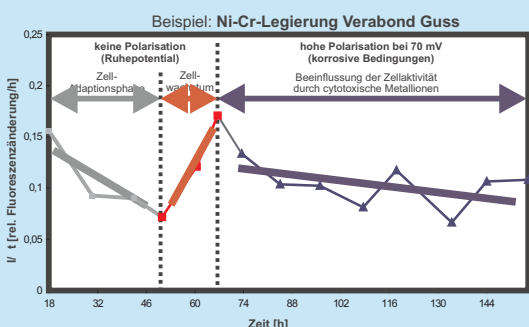


- Bioreaktorgekoppelte Fließkammer mit Zellscaffolds zur 3D-Kultivierung von Fibroblasten (L-929) für Untersuchungen im indirekten Materialkontakt (Korrosionsprodukte)
- Bioreaktorgekoppelte Fließkammer mit Materialproben für Untersuchungen an Zellen im direkten Materialkontakt
- Biokompatibilitätsprüfung unter definierten und reproduzierbaren korrosiven Bedingungen
- Lasersondentechnik mit hoher Selektivität und Tiefenschärfe für die nichtinvasive online-LIF-Detektion der zellulären NADH-Fluoreszenz (siehe rechts)
- Inkubationsunabhängige Messung der NADH-Fluoreszenz zu jedem beliebigen Zeitpunkt
- Simultane Detektion von zwei Fluoreszenzwavelengthen
- Getorter Integrator zur zeitaufgelösten Detektion spektral überlappender Fluoreszenzsignale (Laserimpulsdauer 350 ps) zur verbesserten Selektivität (z.B. NADH- und FAD-Fluoreszenz)



#### Ergebnisse

Die toxischen Effekte von biokompatiblen Dentallegierungen (insbesondere Ni-Basis-Legierungen) konnten mit Fluoreszenzintensitätsänderungen des zellulären NADH-Gehaltes korreliert werden.



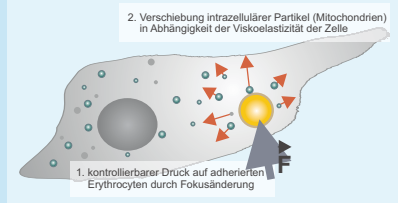
### Laseroptische Pinzette

Die Laseroptische Pinzette nutzt fokussiertes Laserlicht zur Fixierung von Zellen im Laserfokus. Durch eine Fokussänderung kann die Zelle mechanisch manipuliert werden. Auf nichtdurchstrahlbaren Materialoberflächen (u.a. Dentalmaterialien) sind besondere Arbeitsschritte zur Kontrastierung der Zellen erforderlich. Es wurden die Voraussetzungen für die gezielte Zellmanipulation auf Dentalmaterialien zur Korrelation viskoelastischer Zellparameter mit potentiell toxischen Materialeffekten geschaffen.

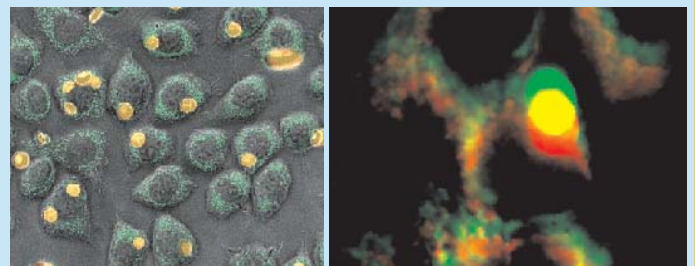
#### Messprinzip

Zytotoxische Materialeffekte wirken sich auf viskoelastische Zellparameter aus. Dazu gehören die Elastizität der Zellmembran und des Zytoskeletts sowie die Viskosität des Zytoplasmas. Das entwickelte Verfahren beruht auf der kontrollierbaren Kräfteinleitung auf die Oberfläche von Einzelzellen sowie der mikroskopischen online-Kontrolle der Ortsveränderung intrazellulärer Partikel (Mitochondrien) in Abhängigkeit der viskoelastischen Zellparameter.

- Färbung fibroblastärer Mitochondrien (L-929) mittels DiOC<sub>2</sub>
- Fixierung humaner Erythrocyten und Bindung an Fibroblasten nach Cy3-Färbung
- Videokontrolle der Manipulationsschritte am CLSM
- Überlagerung von Bildsequenzen zur Analyse der Ortsveränderung von Mitochondrien



#### Ergebnisse



DiOC<sub>2</sub>-gefärbte Mitochondrien (grün) mit anhaftenden Cy3-gefärbten Erythrocyten (gelb) als "Kraftübertragungswerkzeuge" (Überlagerung mit Phasenkontrast)

### Zusammenfassung

- Entwicklung einer laserbasierten in vitro-Methodik zur Biokompatibilitätsprüfung metallischer wie auch nichtmetallischer Zahnersatzmaterialien
- Methodische Kopplung der LIF-Detektion zur Bestimmung des Vitalitätszustandes von Zellkulturen mit der Laseroptischen Pinzette zur Bestimmung viskoelastischer Zellparameter
- Entwicklung einer hochauflösenden Fasersondentechnik zur quantitativen Bestimmung zellulärer autogener Fluoreszenzsignale
- Entwicklung eines Verfahrens zur gezielten Zellmanipulation mittels der Laseroptischen Pinzette auf nichtdurchstrahlbaren Materialoberflächen
- Nichtinvasive online-Zellanalytik
- Möglichkeit zum Einsatz in der grundlagenorientierten Erforschung von Stoffwechselerkrankungen und Diagnose von Zytoskelettschädigungen

