

Aus der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
der Universität Würzburg

Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnmedizin
Vorstand: Professor Dr.-Ing., Dr.rer.nat. Roger Thull

**Wachstumsverhalten von Kulturzellen auf gestrahlten Oberflächen
in Abhängigkeit von Kontaminationen durch Strahlgut**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Iris Kraus
aus Karlstadt

Würzburg, April 2008

Referent: Prof. Dr.-Ing. R. Thull
Koreferent: Prof. Dr. med. dent. A. Renk
Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2008

Die Promovendin ist Zahnärztin.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

| | |
|---|---|
| 1.1 Geschichte der Zahnimplantate | 1 |
| 1.2 Wahl des geeigneten Implantatmaterials | 2 |
| 1.3 Titan und Titanlegierungen als Werkstoff Nr. 1 für Implantate | 3 |
| 1.4 Biokompatibilität | 4 |
| 1.5 Gezielte Oberflächenmodifikation | 5 |
| 1.6 Zielsetzung | 6 |

2. Material und Methode

| | |
|---|----|
| 2.1 Prüfkörper | 8 |
| 2.1.1 Form | 8 |
| 2.1.2 Herstellung | 8 |
| 2.1.3 Reinigung und Vorbereitung | 9 |
| 2.1.4 Oberflächencharakteristik | 9 |
| 2.1.5 Polystyrol als Referenzmaterial | 10 |
| 2.2 Puffer und Medien | 10 |
| 2.3 Zelllinien | 12 |
| 2.3.1 Humane Fibroblastenzelllinie 84-9 | 13 |
| 2.3.2 Fibroblastenzelllinie Maus L-929 | 13 |
| 2.3.3 Osteoblastenzelllinie MG-63 | 13 |
| 2.4 Zellkultivierung | 14 |
| 2.5 WST-1 Zellaktivitätstest | 14 |
| 2.6 Zellzahlbestimmung mit dem CASY-1 Zellanalysesystem | 15 |
| 2.7 Proteinbestimmung nach LOWRY | 16 |
| 2.8 Testalgorithmus und Plattenbelegung | 17 |
| 2.9 Statistik | 18 |

| | |
|---|----|
| 3. Ergebnisse | |
| 3.1 Oberflächen und Zellwachstum | 19 |
| 3.1.1 Verwendete Oberflächen | 19 |
| 3.1.2 Energiedispersive Röntgenanalytik (EDX-Analyse) | 19 |
| 3.1.3 Elektronenmikroskopische Analyse des Zellwachstums auf den Oberflächen | 21 |
| 3.2 Messreihe mit der humanen Fibroblastenlinie 84-9 | 23 |
| 3.2.1 Bestimmung der Zellaktivität | 23 |
| 3.2.2 Bestimmung der Zellzahl | 24 |
| 3.2.3 Proteinbestimmung nach LOWRY | 25 |
| 3.3 Messreihe mit der Fibroblastenzelllinie L-929 | 26 |
| 3.3.1 Bestimmung der Zellaktivität | 26 |
| 3.3.2 Bestimmung der Zellzahl | 27 |
| 3.3.3 Proteinbestimmung nach LOWRY | 28 |
| 3.4 Messreihe mit der Osteoblastenlinie MG-63 | 29 |
| 3.4.1 Bestimmung der Zellaktivität | 29 |
| 3.4.2 Bestimmung der Zellzahl | 30 |
| 3.4.3 Proteinbestimmung nach LOWRY | 31 |
| 4. Diskussion | 33 |
| 5. Zusammenfassung | 42 |
| 6. Literaturverzeichnis | 44 |

1. Einleitung

1.1 Geschichte der Implantate

Die Geschichte der Zahnimplantate reicht zurück bis zur Zeit der Ägypter, welche Stücke von Muschelschalen verwendeten und diese buchstäblich in den Kiefer „hämmerten“. Auf diese Weise wurden damals verlorengegangene Zähne ersetzt (Toellner, 2000).

Die erste Anwendung metallischer Implantate ist im 18. Jahrhundert verwurzelt. Mittels Versuchen mit unterschiedlichen Metallen wurden die jeweiligen Vor- und Nachteile der Materialien herausgestellt, wobei Gold und Silber beispielsweise äußerst korrosionsstabil, jedoch von den mechanischen Eigenschaften her unzureichend waren. Diese erwiesen sich bei Messing, Kupfer und Eisen als sehr gut, allerdings waren die drei Metalle weder korrosionsbeständig noch biokompatibel (Hench & Ethridge, 1982, Judet & Judet, 1949, Wintermantel & Ha, 1996).

Die modernere Geschichte der Zahnimplantation beginnt vor ca. 35 - 40 Jahren, wobei hier zwei verschiedene Denkweisen zu unterscheiden sind. In Amerika fanden klingenförmige Implantate Verwendung, auf denen die Pfosten für die spätere prothetische Versorgung angebracht wurden, wohingegen Dr. I. P. Branemark in Schweden die Anwendung zylinderförmiger Implantate erforschte, die allerdings 3 - 6 Monate zur knöchernen Einheilung benötigten. Erst im Anschluss daran wurden die Suprakonstruktionen (Kronen, Brücken, etc.) eingegliedert. Um 1980 wurde diese Methode schließlich auch in den USA eingeführt (Arizona Implant Dentist, 2000 - 2005).

Mitte des 20. Jahrhunderts wurde erstmals Titan, sowohl aufgrund seiner guten mechanischen Eigenschaften, als auch wegen seiner hohen Korrosionsbeständigkeit, als Implantatmaterial in Betracht gezogen (Römpf Chemielexikon, Thieme, 1998).

1.2 Wahl des geeigneten Implantatmaterials

Die bedeutendste unerwünschte Komplikation bei der dentalen Implantation ist die postoperative Infektion, wobei v. a. in Hinblick auf die Gewebeverträglichkeit die verschiedenen Implantatmaterialien hierbei natürlich eine wichtige Rolle spielen.

Verglichen werden im Folgenden rostfreier Edelstahl (V4A-Stahl), Reintitan und diverse Titanlegierungen, wie zum Beispiel Titan-Aluminium-Niobium.

Die Forderung an eine möglichst gute Biokompatibilität besagt, dass keine Irritation des lokalen oder ortsfremden Gewebes bewirkt werden soll. Hierbei erweist sich Implantatstahl im Gegensatz zu Reintitan als weniger korrosionsresistent (Römpp Chemielexikon, 1998, Dt. Ärzteblatt 95, 1998).

Darüber hinaus ist die Zell- und Gewebsadhärenz an Titanoberflächen deutlich höher als an Edelstahloberflächen, wobei Edelstahl die Ausbildung einer bindegewebigen Kapsel begünstigt, die die Einlagerung und Vermehrung von bakteriellen Keimen ermöglicht. Des Weiteren kann die Bindegewebskapsel zu einer aseptischen Lockerung des Implantats führen, was bedeutet, dass keine Kraftübertragung mehr stattfinden kann. Dies wiederum führt schließlich zu einer Revision des Implantats (Jennissen, 2000). Der häufigste an Metallimplantaten angetroffene Keim ist *Staphylococcus aureus*, ein grampositives Bakterium, welches sowohl in der Natur als auch auf der Haut vorkommt. Inzwischen gibt es eine Vielzahl an *Staphylococcus-aureus*-Stämmen, die eine Multiresistenz gegen verschiedene Antibiotika entwickelt haben und somit schwer zu behandeln sind, was zu nosokomialen Infektionen führen kann (Rajan et al., 2007).

Ein weiteres Problem in diesem Zusammenhang stellt das Risiko einer allergischen Reaktion auf nickel- und chromhaltige Implantate dar (Prävalenz in der Bevölkerung beträgt ca. 4-6 %). Dieses Risiko einer solchen Allergisierung kann bei Verwendung von Titanimplantaten vernachlässigt werden.

Des Weiteren ist Reintitan durch sein niedriges Elastizitätsmodul etwa doppelt so elastisch wie Stahl, was eine wesentlich bessere Konturierung und

Anpassung an die anatomischen Gegebenheiten des Knochens ermöglicht (Arens & Hansis, 1998).

1.3 Titan und Titanlegierungen als Werkstoff Nr. 1 für Implantate

Titan wurde erstmals 1791 in England von William Gregor, einem Geistlichen und Amateurchemiker, im Titaneisen entdeckt, wobei der deutsche Chemiker Heinrich Klapproth diese Entdeckung 1795 durch einen Fund im Rutilerz bestätigte. Ein neues Element wurde benannt: Titan.

Zwischen 1940 und 1950 wurde Titan erstmals als Implantatwerkstoff durch den Forscher Leventhal erprobt und auch angewendet, wobei seine hervorragende Korrosionsbeständigkeit im Vergleich zu anderen Metallen hervorgehoben werden muss (Leventhal, 1951).

Darüber hinaus zeigt der Werkstoff eine hohe mechanische Festigkeit und ein geringes Elastizitätsmodul. Bis heute gibt es bis zu 20 verschiedene Titanlegierungen, welche die gleichen positiven Eigenschaften aufweisen. Im Kontakt mit Wasser, Luft oder Körperflüssigkeiten bildet Titan eine Oxidschicht an der Oberfläche aus, die für das Verhalten an den Grenzflächen verantwortlich ist und bei Verletzung schnell wieder repariert werden kann (Peters et al., 1996, Schott, 2000, Sibum, 1996).

In der chirurgischen Orthopädie bei metallischen Beinprothesen (künstl. Hüftendoprothesen) und auch bei Kniegelenkersatz wird es mittlerweile routinemäßig eingesetzt (Ring, 2000).

1.4 Biokompatibilität

Biokompatibel = griech. Bios = Leben, kompatibel = verträglich

Die Biokompatibilität entspricht der Eigenschaft eines Werkstoffes, mit Hilfe von Proteinen und Zellen Gewebeverträglichkeit zu erreichen (Hoffmann-Axthelm, 1995). Das biologische Gewebe soll also durch bestimmte Oberflächen- und Materialeigenschaften in seiner Funktion beeinflusst werden. Sowohl Oberfläche als auch Material sollen so gewählt werden, dass der Organismus eine angemessene Reaktion zeigt.

Die Biokompatibilität ist weitestgehend verantwortlich für die Einheilung eines Implantates ins Gewebe und ist abhängig von der Adsorption von Proteinen und folgender Anhaftung der Zellen an der Oberfläche des Werkstoffes und der resultierenden Reaktion des Organismus (Horbett, 1996, Thull, 1994).

Der Einsatz von Implantaten beim Menschen nimmt beständig zu, wobei die Weiterentwicklung der eingesetzten Materialien nicht nur die klassischen Bereiche wie Osteosynthese und Gelenkersatz betrifft, sondern immer mehr auch HNO-ärztliche sowie dentale Implantation und Stents zur Gefäßlumenerhaltung (Thomas et al., 2001).

Jedes Einbringen von metallischen Implantatmaterialien führt durch die Reaktion auf das Fremdmaterial zu einer Entzündungsantwort, welche folgende Ursachen hat:

1. Denaturierung körpereigener Proteine durch Interaktion mit der Implantatoberfläche,
2. Physikalische und elektrochemische Eigenschaften der Oberflächenstruktur,
3. Freisetzung von Metallionen (Thomas et al., 2001).

Normalerweise bildet sich die Entzündung zurück, und das Gewebe zeigt guten Implantatkontakt. In einigen Fällen jedoch wurden lokale oder ausgedehnte Ekzeme und Schwellungsreaktionen beobachtet.

Eine andere Komplikation ist gegebenenfalls die aseptische Lockerung, wobei sich eine Bindegewebskapsel um das Implantat bildet.

Als Ursachen für aseptische Lockerung und Wundheilungsstörungen können auch immunologisch-allergologische Reaktionen in Betracht gezogen werden (Thomas et al., 2001).

Um eine bessere Einheilung des Materials zu erzielen, können Implantate mit verschiedenen Proteinen beschichtet werden (=Oberflächenkompatibilität). Das Grundmaterial jedoch sollte an sich schon biokompatibel sein (Thull, 2002).

Implantate aus Titanwerkstoffen zeigen in den bisherigen Studien eine relativ hohe Biokompatibilität, trotzdem stellt auch das Titanimplantat einen Fremdkörper im menschlichen Gewebe dar, dessen biologische Auswirkung bis heute noch nicht vollständig geklärt ist (Taheri et al., 2005). Die ständig wachsende Bedeutung der Titanbasiswerkstoffe als Implantatwerkstoffe wird auf zahlreichen Fachtagungen hervorgehoben (Deutsche Titan, 2000).

Wie später belegt wird, hängt die Integration von Implantaten stark von der Oberflächenrauigkeit ab (Lange et al., 2002, Rosa & Beloti, 2003).

1.5 Gezielte Oberflächenmodifikation

Die Einheilung von Implantaten in den Knochen hängt im Wesentlichen von deren Zusammensetzung sowie der Oberflächenrauigkeit ab, wobei durch das Anrauen sowohl die Verankerung als auch die biomechanische Stabilität verbessert werden (Thull, 2003).

Die Ergebnisse früherer Studien bezüglich des Effektes der Oberflächenrauigkeit auf die Zelladhäsion und -proliferation sind jedoch teilweise widersprüchlich (Qu et al., 1996, Korovessis et al., 2002, Mustafa et al., 2000, Lumbikanonda et al., 2001). Einige Studien zeigten, dass eine erhöhte Oberflächenrauigkeit die Knochenheilung stimuliert, wohingegen andere Studien keine Stimulierung feststellen konnten (Castellani et al., 1999). Die Verwendung einer Vielzahl von Zelllinien sowie Primärzellen, aber auch unterschiedliche Kultivierungsbedingungen könnten zu diesen widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich der Differenzierung von Primärzellen

zu Knochenzellen auf rauen Oberflächen beigetragen haben (Leven et al., 2004).

Calcium-Phosphat-Beschichtungen scheinen sich beispielsweise begünstigend sowohl auf Knocheneinheilung als auch –wachstum auszuwirken (Le Guehenec et al., 2006). Ebenso bewirken Hydroxylapatit-Beschichtungen eine Beschleunigung des Knochenwachstums. Die Anwesenheit von HA scheint die Reifung von Kollagenfasern zu unterstützen, die das Titanimplantat umgeben und die Knochenbildung anregen. Darüber hinaus erfolgt die Knochenneubildung erheblich schneller, wenn die Implantatoberfläche mit Hydroxylapatit vorbehandelt wurde (Allegrini et al., 2006).

Mehrere Untersuchungen beschäftigen sich darüber hinaus mit der Fragestellung, ob das Implantat komplett oder nur teilweise beschichtet sein sollte (Sun et al., 2001), und wie hoch die Rauigkeit bzw. Porosität sein sollte (Vercaigne et al., 1998, Borsari et al., 2005).

Um mikrobielle Infektionen und somit eine Periimplantitis zu verhindern, ist eine Interaktion zwischen Implantatoberfläche und Weichgewebe unabdingbar (Keller, 1998).

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, das Wachstumsverhalten von Kulturzellen unterschiedlicher Organismen auf gestrahlten Oberflächen zu untersuchen, wobei die Abhängigkeit des Wachstums von einer Kontamination der Oberfläche durch unterschiedliche Arten von Strahlgut herausgestellt werden sollte.

Wie schon andere Studien bewiesen haben, spielt die Rauigkeit der entsprechenden Oberfläche eine ausschlaggebende Rolle, sowohl bei der Primärstabilität der Implantate (Hayakawa et al., 2002, Giavaresi et al., 2002), der beschleunigten Besiedlung mit Blutzellen, als auch bei der Anlagerung von neuem Knochengewebe (Boyan et al., 1998, Martin et al., 1999, Brunette, 1998). Diese wurde daher nicht verändert.

Für die Versuchsreihen wurden in Hinblick auf die Anwendung als Implantatwerkstoff u.a. Osteoblasten gewählt. Um Vergleiche zu erstellen, wurden jedoch ebenfalls menschliche Fibroblasten sowie Fibroblasten von Mäusen herangezogen.

Die Untersuchungen wurden hinsichtlich der Parameter Zellaktivität, Zellzahl, sowie Gesamtbioasse durchgeführt.

2. Material und Methode

2.1 Prüfkörper

2.1.1 Form

Die Prüfkörper sind Rundproben aus Titan-Grade 2 (ASTM-Nr. B 265-95, Grade 2, Zapp, Düsseldorf, Germany) als Grundmaterial. Der Durchmesser beträgt 15,5 mm und die Höhe 0,1 cm (passend für 24-Well-Zellkulturplatten), und sie sind versehen mit einem kleinen randständigen Bohrloch.

An der Rückseite wurden die Plättchen mit einer X-förmigen Markierung gekennzeichnet.

2.1.2 Herstellung

Die Titanplättchen wurden sandgestrahlt, wobei der Druck 3 bar und der Bestrahlungsabstand 3 cm betrug. Die Korngröße des Strahlgutes belief sich auf 110 μm .

Folgende vier Plättchensorten wurden für die Versuchsdurchführung angefertigt:

1. unbehandelte Titanplättchen
2. mit Korund gestrahlte Titanplättchen:
Strahlgut: Korox 110 μm (BEGO, Bremen)
3. mit Hydroxylapatit (HA) beschichtetem Korund gestrahlte Titanplättchen:
Herstellung des Strahlguts: 100 g HA wurden in 400 ml Wasser suspendiert; 330 g Korox 110 μm wurden zugegeben; Flüssigkeit wurde gut verrührt; anschließend wurde das Wasser im Trockenschrank bei 40-60 °C verdampft; dann wurde das Substrat bei 900 °C ca. 1 h gesintert
4. mit Korund, welches mit Titanoxid (Titan-IV-Oxid, Merck, Darmstadt) beschichtet wurde, gestrahlte Titanplättchen:

Herstellung des Strahlguts: 100 g Titan-IV-Oxid wurden in 400 ml Wasser suspendiert. Zum weiteren Verfahren s. Punkt 3. (cave: Substrat hier bei 1200 °C gesintert).

2.1.3 Reinigung und Vorbereitung

Um mit den Prüfkörpern arbeiten zu können, mussten diese vor Versuchsbeginn gereinigt und sterilisiert werden. Zunächst wurden die Plättchen mit einer Pinzette an einer Aufhängevorrichtung befestigt und berührungsfrei in ein Becherglas eingehängt. Anschließend erfolgte der Waschvorgang wie folgt:

10 min in 2 %ige SDS-Lösung bei 40 °C im Ultraschallbad

10 min in Reinstwasser bei 40 °C im Ultraschallbad

10 min in 5 %iger Extranlösung bei 40 °C im Ultraschallbad

2 x 10 min in Reinstwasser bei 40 °C im Ultraschallbad

10 min in Isopropanol bei 40 °C im Ultraschallbad

10 min in Reinstwasser bei 40 °C im Ultraschallbad

20 min autoklavieren bei 121 °C

2.1.4 Oberflächencharakteristik

Mit den gestrahlten Plättchen wurde nun eine EDX-Analyse (=energiedispersive Röntgenanalytik) durchgeführt. EDX (QX 2000-System, Link, England) ist ein klassisches Verfahren, das zur Analyse der oberflächennahen Bereiche von Festkörpern oder zur Charakterisierung von dünnen Schichten eingesetzt wird. Die Informationstiefe des Verfahrens (μm) liegt dabei wesentlich höher als bei den elektronen- und massenspektrometrischen Verfahren (nm).

Es wurde die Oberflächenzusammensetzung bestimmt, um die Wirksamkeit der Beschichtung des Strahlgutes mit HA bzw. TiO_2 zu überprüfen. Die Spektren wurden mit der ZAF-Software ausgewertet.

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie (Zeiss DSM 940, Zeiss, Oberkochen) wurde die Struktur der gestrahlten Oberflächen der Titanplättchen analysiert. Mit einer Beschleunigungsspannung zwischen 1 und 30 kV und einer maximal 50.000-fachen Vergrößerung wurden die Präparate dargestellt und repräsentative Fotografien in verschiedenen Vergrößerungen angefertigt.

2.1.5 Polystyrol als Referenzmaterial

Als Negativkontrolle wurde das Zellkultur-Polystyrol (Firma Nunc A/S Denmark) verwendet.

Diese Referenzoberfläche wurde direkt als Zellkulturplatte (Fa. Nunc A/S Denmark) mit 24 Vertiefungen verwendet, welche gebrauchsfertig geliefert wurde.

2.2 Puffer und Medien

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von der Firma Merck AG, Darmstadt bezogen. Das Reinstwasser wurde mit Hilfe der Wasseraufbereitungsanlage (USF PURELAB PLUS) hergestellt.

PBS-Puffer

ad 1000 ml Reinstwasser

8,0 g NaCl,

0,2 g KH_2PO_4 ,

2,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$,

0,2 g KCl

autoklavieren bei 121 °C (20 min)

DMEM-Kulturmedium

440 ml Dulbecco`s Mod Eagle Medium mit 0,11 g/l Na Pyr. Mit Pyridoxine, Fa. Invitrogen GmbH

50,0 ml Foetal Bovine Serum (FCS), EU approved origin (South America), Mycoplasma und virus screened, performance tested, Fa. Invitrogen GmbH (inaktiviert durch 30 min Inkubation bei 56 °C) zupipettieren

5,0 ml Penicillin-Streptomycin 10.000 IU/l – 10.000 IU/ml, Fa. Invitrogen GmbH

5,0 ml Hepes Buffer (Solution 1 M), Fa. Invitrogen GmbH

Accutase

Zum enzymatischen Ablösen der Zellen von Zellkulturoberflächen

PAA Laboratories GmbH

Proliferations-Reagent WST-1 (Fa. Boehringer, Mannheim)

Farbstoff WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolium]-1,3-Benzendisulfonat), angesetzt nach Angaben des Herstellers

WST-1 ist ein wasserlösliches Tetrazoliumsalz und dient der Bestimmung der Zellaktivität. Es wird durch metabolisch aktive Zellen gespalten. In den Mitochondrien wird es mittels Dehydrogenasen zu farbigem Formazan umgewandelt und ist somit ein Marker für die Zellaktivität. Des Weiteren scheinen auch Superoxide an einer Reduktion von WST-1 beteiligt zu sein.

Proteinbestimmung nach LOWRY

DC Protein Assay (Fa. Bio-Rad, München)

20 % NaOH (Fa. Merck)

20 % HCl (Fa. Merck)

Durchgeführt nach Angaben des Herstellers

Isoton-Pufferlösung

Natriumsulfat 9,7 g/l

Natriumchlorid 4,0 g/l

Dimethylolharnstoff 1,0 g/l

Procainhydrochlorid 0,1 g/l

Isotone, phosphatgepufferte Lösung wurde gebrauchsfertig geliefert (Fa. Beckmann/Coulter GmbH, Krefeld)

2.3 Zelllinien

Zum Einsatz kamen drei unterschiedliche Zelllinien: zum einen die humane Fibroblastenlinie 84-9, die murine Fibroblastenlinie L-929 und schließlich die humane Osteoblastenlinie MG-63.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie unten beschrieben.

Vor ihrer Verwendung wurden alle Zellen auf das Vorhandensein von Mycoplasmen hin untersucht. Belastete Zellkulturen wurden verworfen.

2.3.1 Humane Fibroblastenzelllinie 84-9

Es handelt sich hierbei um Fibroblasten der menschlichen Haut, wobei als Spender Hämophilie-Patienten herangezogen wurden. Die Zellen weisen eine „normale“ Morphologie auf.

Die Kultivierung verläuft wie folgt:

Konfluent gewachsene Zellen wurden mit Accutase gelöst, und 50.000 Zellen pro ml wurden auf die Oberfläche ausgesät. Die Zellen wurden bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert.

Als Kulturmedium wird DMEM+1 % L-Glutamine+15 % FCS (Foetal Calf Serum) verwendet.

2.3.2 Fibroblastenzelllinie Maus L-929

Die Fibroblastenzelllinie L-929 (auch als NCTC Klon 929 bezeichnet) wurde erstmals im März 1948 isoliert und war eine der ersten Zelllinien, von der fortlaufende Kulturen erstellt wurden und auch die erste geklonte Zelllinie.

Die ursprünglichen Zellen wurden aus normalem subkutanem Lungen- und Fettgewebe einer 100-Tage-alten männlichen Maus entnommen.

Die Zellkultivierung erfolgt bei einer Temperatur von 37 °C und einer wasserdampfgesättigten, 5 %igen CO₂-Begasung.

Als Kulturmedium wird DMEM verwendet.

2.3.3 Osteoblastenzelllinie MG-63

Ursprünglich stammen die Zellen aus dem menschlichen Knochen, wobei es sich bei dem Spender um einen Osteosarkom-Patienten handelte. Als zelluläres Produkt wird Interferon exprimiert. Die fungierenden Rezeptoren sind TGF-beta (transforming growth factor beta) R I und TGF-beta R II. Auch bei dieser Zelllinie fand die Kultivierung bei einer Temperatur von 37 °C und in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ statt. Als Kulturmedium wurde DMEM verwendet (siehe 2.2).

2.4 Zellkultivierung

Die Kultivierung der jeweiligen Zelllinien erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C in 75 cm² großen Zellkulturflaschen (Falcon, Heidelberg) mit dem jeweils entsprechenden Medium.

Für die nachfolgenden Versuchsansätze wurden Zellsuspensionen von 50.000 Zellen/ml benötigt. Hierzu wurde das entsprechende Medium aus einer konfluent bewachsenen Zellkulturflasche mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette abgezogen und die adhärennten Zellen zweimal mit je 10 ml PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 2 ml Accutase abgelöst. Um die Wirkung von Accutase aufzuheben, wurden nach 5 - 7 min. 10 ml entsprechenden Mediums hinzupipettiert. Die gelösten Zellen wurden durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. An der erhaltenen Zellsuspension wurde eine Zellzählung durchgeführt.

Um die gewünschten 50.000 Zellen/ml zu erreichen, wurde eine Verdünnung mit dem entsprechenden Medium vorgenommen. Nach einer erneuten Zellzählung wurde je 1 ml der Zellsuspension auf die Wells mit den entsprechenden Prüfkörpern verteilt.

Pro Messtag wurde jeweils eine Platte für den WST-Zellaktivitätstest, für die Bestimmung der Zellzahl und die Proteinbestimmung nach Lowry benötigt.

Je Oberfläche wurden vier Proben angesetzt.

Zur Veranschaulichung der Beschichtungen wurde außerdem mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie die Struktur der angerauten Oberfläche analysiert und repräsentative Fotografien in verschiedenen Vergrößerungen hergestellt (siehe 3.1.2).

2.5 WST-1 Zellaktivitätstest

Dieser Versuch beruht auf der Umsetzung des Farbstoffes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolium]-1,3-Benzendisulfonat) durch

die Succinatdehydrogenase in den Mitochondrien der stoffwechselaktiven Zellen zum farbigen Formazan.

Dieser Farbumsatz kann im ELISA-Reader (Fa. Tecan, Crailsheim) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden. Je mehr vitale Zellen gewachsen sind, desto intensiver ist der Farbumschlag, bzw. desto höher ist die Extinktion. Diese ist proportional der Stoffwechselaktivität der Zellen.

Versuchsbeginn war Tag 3 nach Aussaat, die weiteren Messungen erfolgten an den Tagen 5, 7 und 10.

Zur Durchführung des Tests wurde zunächst aus jeder Kavität der 24-Well-Platten das Medium abgezogen und die verbleibenden Mediumreste durch dreimaliges Spülen mit je 1 ml PBS-Puffer entfernt. Danach wurden 500 µl entsprechenden Mediums und 50 µl WST-1-Reagenz genau zupipettiert und bei 37 °C und 5 %iger CO₂-Atmosphäre für 30 min inkubiert.

Anschließend wurden je 2 x 200 µl des Gemisches in 2 Wells einer 96-Well-Platte für die Doppelbestimmung überpipettiert und der Farbumschlag im ELISA-Reader mit einem Meßfilter von 450 nm und einem Referenzfilter von 690 nm ermittelt.

Als Leerwert für diese Messung bediente man sich eines Gemisches aus 500 µl entsprechenden Mediums und 50 µl des Proliferations-Reagents WST-1.

Anschließend wurden die Ergebnisse mittels HARVARD GRAPHICS graphisch dargestellt.

2.6 Zellzahlbestimmung mit dem CASY-1 Zellanalysesystem

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde mit dem Zellzähler CASY-1, Modell TTC Cell Counter und Analyser (Schärfesystem GmbH, Reutlingen) gearbeitet.

Das Messprinzip besteht in der Widerstandsmessung in Verbindung mit einer Signalauswertung. Die Zellsuspension wird in eine Kapillare definierter Geometrie gesaugt, in der während der Messung eine Spannung angelegt ist. Ihrem Volumen entsprechend verdrängen die Zellen eine bestimmte Menge an Elektrolytlösung.

Dadurch entsteht entlang der Kapillarstrecke ein entsprechender Widerstand, über den der Zellzähler die Zellzahl und deren Volumen ermitteln kann.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte ab Tag 3 nach Zellaussaat und wurde an Tag 5, Tag 7 und Tag 10 nach Aussaat jeweils wiederholt.

Dafür wurde zunächst das Medium abgezogen und die Zellschicht mit je 1 ml PBS-Puffer 2 x gewaschen. Anschließend pipettierte man 500 μ l Accutase zu und gab nach ca. 7 min Inkubationszeit 500 μ l Medium zum Stoppen der Reaktion hinzu.

Nach 15- bis 20-maligem Aufziehen der Suspension zur Durchmischung wurden 100 μ l in 10 ml isotonische Lösung gegeben und im Zellzähler gemessen.

Auch hier wurden die Ergebnisse mittels HARVARD GRAPHICS graphisch dargestellt.

2.7 Proteinbestimmung nach LOWRY

Mit dieser Methode lässt sich der Gesamtproteingehalt der Zellen quantitativ bestimmen. Über diesen kann auf das Wachstumsverhalten der Zellen geschlossen werden.

Je höher die Biomasse ist, desto weniger zytotoxisch ist das Material. Das verwendete Folin-Reagenz interagiert mit dem Zellprotein, und das Reaktionsprodukt, welches sich in einem Farbausschlag äußert, wird im Fotometer bei einer Wellenlänge von 750 nm bestimmt.

Um falsch positive Werte der Testoberflächen auszuschließen, wurden von allen Materialien Leerwerte ermittelt.

Auch hier erfolgte die Auswertung an den Tagen 3, 5, 7 und 10, jeweils nach Aussaat.

Bei diesem Versuch wurde zuerst eine Zellyse durchgeführt. Nach Abzug des Mediums mittels steriler Pasteurpipette und dreimaligem Waschen mit je 1,0 ml PBS-Puffer wurden die Prüfkörper mit je 300 μ l PBS-Puffer überschichtet. Danach wurden je 30 μ l 20 %iges NaOH zur Zellyse hinzugegeben, die

Zellkulturplatte mit selbstklebender Folie (MT-Folie, Fa. Tecan, Crailsheim) versiegelt und für eine Stunde bei 80 °C inkubiert. Nach einer Abkühlungszeit von 10 min wurden je 30 µl 20 %iges HCl hinzupipettiert und gemischt.

Für die Proteinbestimmung wurde zunächst, nach Angaben des Herstellers, das Arbeitsreagenz aus 20 µl Reagenz S zu je 1,0 ml Reagenz A hergestellt. Für die Standards wurden aus einer BSA-Stammlösung folgende Konzentrationen hergestellt:

1000 µg/ml; 800 µg/ml; 600 µg/ml; 400 µg/ml; 200 µg/ml; 100 µg/ml; 50 µg/ml

Diese Lösungen wurden zwischen den Versuchstagen bei 4 °C gelagert.

Anschließend wurden 20 µl des Leerwertes, bestehend aus 300 µl PBS-Puffer, 30 µl 20 % NaOH und 30 µl 20 % HCl, sowie je 20 µl der Standards und je 20 µl der Proben in je eine Kavität einer 24-Well-Platte pipettiert.

Zum Leerwert, den Standards und den Proben wurden nun jeweils 100 µl des Arbeitsreagenz und anschließend jeweils 800 µl Reagenz B zugegeben.

Dieses wurde 5 Sekunden lang gemischt und danach 15 Minuten inkubiert.

Zur Bestimmung im ELISA-Reader wurden einmal vom Leerwert und den Standards je 200 µl in eine Kavität einer 96-Well-Platte überpipettiert. Zur Doppelbestimmung der Proben wurden je 2 mal 200 µl des Gemisches in Kavitäten einer 96-Well-Platte pipettiert.

Anschließend wurde diese 96-Well-Platte bei einer Wellenlänge von 750 nm fotometrisch vermessen und mittels HARVARD GRAPHICS graphisch dargestellt.

2.8 Testalgorithmus und Plattenbelegung

Durchgeführt wurden der WST-1-Zellaktivitätstest, die Ermittlung der Zellzahl, sowie die Proteinbestimmung nach LOWRY.

Jede Messreihe wurde über einen 10-tägigen Zeitraum kultiviert und die erste Messung nach 3 Tagen vorgenommen. Die folgenden Messungen wurden alle 2 Tage durchgeführt, an Tag 5, Tag 7 und Tag 10.

Während der Inkubationszeit wurde an jedem Messtag ein Mediumwechsel vorgenommen.

Die gesamte Testserie wurde in 24-Well-Zellkulturplatten angelegt.

Pro Strahlgut (siehe 2.1.2) wurden vier Proben hergestellt, die in je vier Wells einer Platte eingelegt wurden.

Vorbereitend wurde die Anzahl an Prüfkörpern so verteilt, dass jeweils 16 Kavitäten der 24-Well-Platten mit den entsprechenden Prüfkörpern belegt waren und 4 Kavitäten ohne Belegung als Polystyrolkontrollreferenz eingesetzt wurden.

Pro Zellreihe (humane Fibroblasten 84-9, Fibroblasten Maus L-929, Osteblasten MG-63) und Testart wurden je 2 Messreihen durchgeführt.

2.9 Statistik

Für alle Messwerte der drei Zelllinien wurden die Mittelwerte berechnet und auf die Referenz Polystyrol normiert.

Die Standardabweichungen wurden ebenfalls berechnet und in den Grafiken durch Fehlerbalken dargestellt.

Bei sichtbaren Abweichungen der Fehlerbalken wurde eine Signifikanzberechnung durchgeführt. Dazu wurde der 2-Stichproben-T-Test herangezogen (p wurde $\leq 0,05$ gesetzt).

3. Ergebnisse

3.1 Oberflächen und Zellwachstum

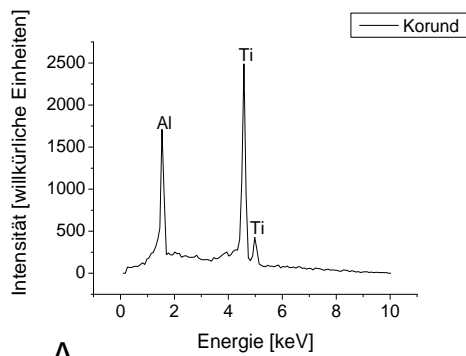
3.1.1 Verwendete Oberflächen

In den folgenden Versuchen wurden die vier unter 2.1.2 beschriebenen Oberflächen verwendet.

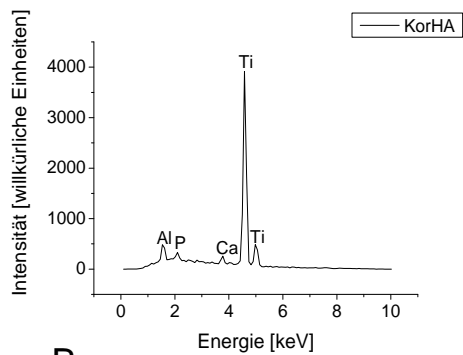
Dazu wurden die Oberflächen von reinen Titanplättchen mit verschiedenartigem Strahlgut modifiziert (genaue Herstellung siehe Kapitel 2.1.2).

3.1.2 Energiedispersive Röntgenanalytik (EDX-Analyse)

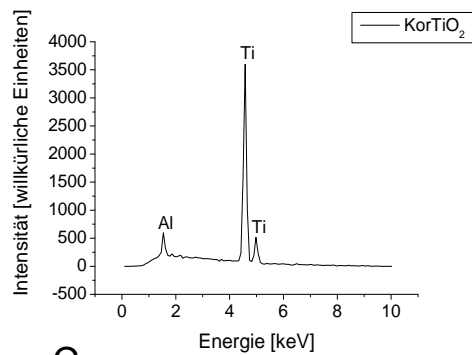
Der Eintrag von Aluminium, Calcium, Phosphat und Titan in die Probenoberfläche wurde mittels der EDX-Analyse bestimmt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Aluminiumkontamination nach Beschichtung des Strahlgutes an den Oberflächen deutlich (ca. 70%) reduziert werden konnte (Abb. 3.1.2 A-C). In die Kor/HA-gestrahlten Oberflächen wurde Calcium und Phosphat eingebaut (Abb. 3.1.2 B). Beschichtung mit Titandioxid zeigte ebenfalls eine deutliche Reduktion des Aluminium-Peaks, konnte aber nicht vom Titan der Probe differenziert werden (Abb. 3.1.2 C).



A



B



C

Abb. 3.1.2 EDX-Analyse der gestrahlten Oberflächen.

A: Korund-gestrahelte Oberfläche

B: Kor/HA-gestrahelte Oberfläche mit gesenkter Al-Kontamination
und eingebautem Calcium und Phosphat

C: Kor/TiO₂-gestrahelte Oberfläche mit gesenkter Al-Kontamination

Durch Beschichtung der Oberfläche konnte die Aluminium-
Kontamination der Oberflächen deutlich reduziert werden.

3.1.3 Elektronenmikroskopische Analyse des Zellwachstums auf den Oberflächen

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie wurde hier die Morphologie der Zellen auf den sandgestrahlten Oberflächen analysiert und repräsentative Fotografien hergestellt.

Abb. 3.1.3 A zeigt das Zellwachstum auf einem unbehandelten Titanplättchen. Die Zellen sind gut ausgebreitet und bedecken nahezu die gesamte Oberfläche. Im Gegensatz dazu zeigt Abb. 3.1.3 B, dass die Zellen auf der rein mit Korund gestrahlten Oberfläche um einiges kleiner und schmaler sind. In den zellfreien Arealen wird der angeraute Untergrund sichtbar.

In Abb. 3.1.3 C und D ist ein ähnliches Wachstum zu verzeichnen wie in Abb. 3.1.3 A. Abb. C zeigt meist große und gut ausgebreitete Zellen, in Abb. D sind die Zellen etwas kleiner als in der Kontrolle. Das bedeutet, dass die Beimischung von TiO_2 bzw. HA zum Strahlgut begünstigend auf das Zellwachstum einwirkt und die Zellen gut auf der Oberfläche adhären.

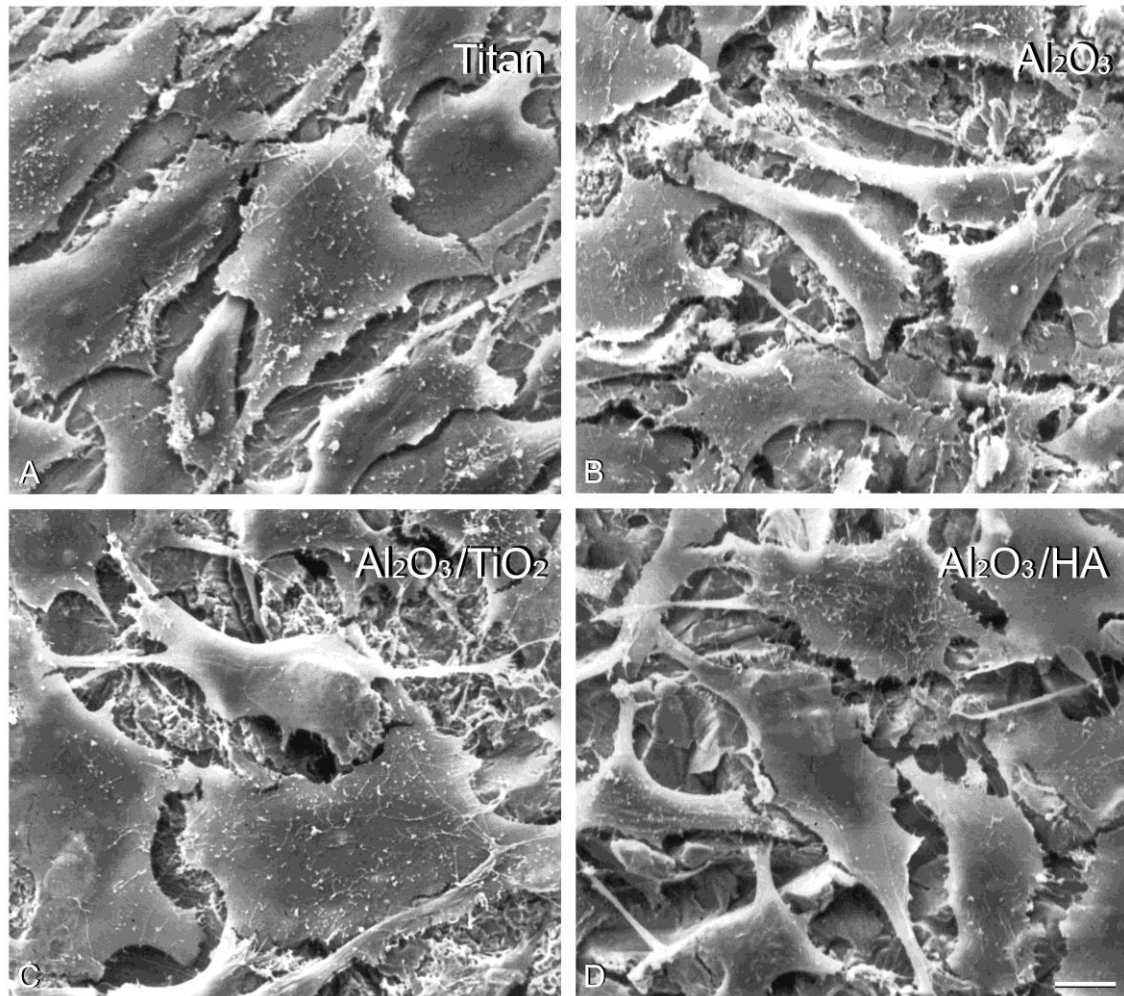


Abb. 3.1.3 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von L-929-Zellen, kultiviert auf den unterschiedlich gestrahlten Oberflächen.
 A: unbehandeltes Titan, die Zellen sind gut ausgebreitet;
 B: mit Korund gestrahltes Titan, die Zellen sind etwas kleiner;
 C: $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{TiO}_2$, die Zellen sind meist groß und gut ausgebreitet;
 D: $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{HA}$, die Zellen sind etwas kleiner als in der Kontrolle.

3.2 Messreihe mit der humanen Fibroblastenzelllinie 84-9

Alle Messreihen wurden jeweils zweifach durchgeführt, wobei die Ergebnisse des ersten Durchgangs im Großen und Ganzen im jeweils zweiten Versuch bestätigt wurden.

Für jede Oberfläche gab es vier Versuchsansätze, so dass die Biokompatibilität an Tag 3, 5, 7 und 10 nach Aussaat der Zellen bestimmt werden konnte.

Die Standardabweichungen wurden in der Grafik mittels Fehlerbalken dargestellt. Bei größeren Abweichungen bezüglich der verschiedenen Oberflächen wurden Signifikanzberechnungen durchgeführt. Der Unterschied gilt bei $p \leq 0,05$ als signifikant.

3.2.1 Bestimmung der Zellaktivität

Bei der Untersuchung der Zellaktivität auf den Prüfkörpern konnte festgestellt werden, dass die Aktivität auf allen Oberflächen innerhalb der ersten 7 Tage zunimmt, an Tag 10 jedoch bis auf die TiO₂-beschichtete Oberfläche deutlich absinkt (Abb.3.2.1).

Generell lässt sich sagen, dass auf Polystyrol (PS) die Zellaktivität höher ist, wobei die Aktivität auf PS signifikant größer ist als auf TiO₂, und an Tag 7 ist auch die Aktivität auf Titan (Ti) signifikant höher als auf TiO₂ (signifikante Werte sind in der Abbildung mit * markiert).

Mittels Signifikanzberechnung ließ sich Folgendes ermitteln:

An Tag 7 erwiesen sich die Werte von PS als signifikant höher als die Werte von Titan, Korund und HA, außerdem waren die Werte von Titan, Korund und HA signifikant höher als die von TiO₂. An Tag 10 war PS im Vergleich zu TiO₂ signifikant kleiner.

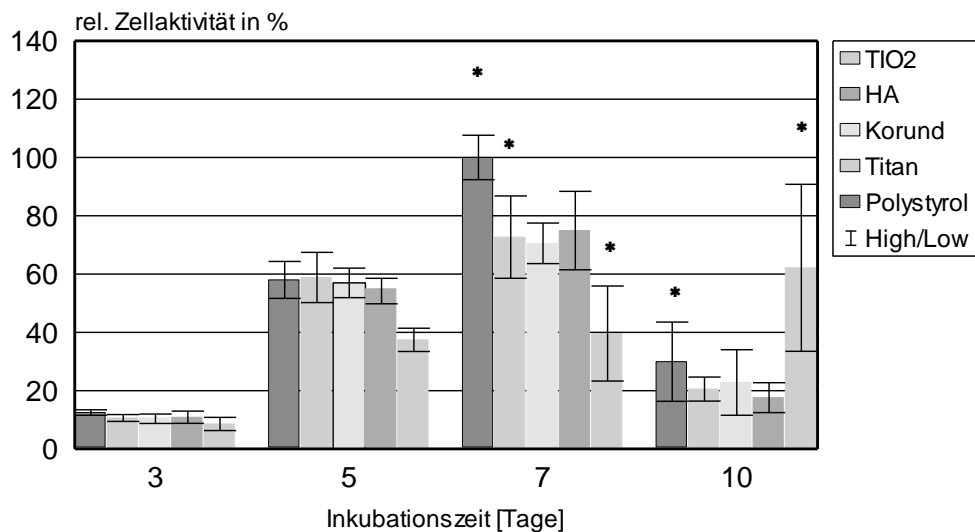


Abb. 3.2.1 Zellaktivität der 84-9 Fibroblasten über einen 10-tägigen Kultivierungszeitraum (n=4 pro Oberfläche)

3.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Bei der Ermittlung der Zellzahl konnte eine Vermehrung bis Tag 5 festgestellt werden. An Tag 7 sind annähernd gleiche Ergebnisse festzustellen, wohingegen an Messtag 10 fast alle Zellen abgelöst waren (Abb.3.2.2).

Generell kann auch hier gesagt werden, dass die Zellzahl auf den ungestrahlten Oberflächen (PS, Titan) erhöht ist. Im Vergleich zum Zellaktivitätstest erscheinen die Ergebnisse hier sogar meist signifikant erhöht.

Die signifikant höheren Werte sind in Abb. 3.2.2 mit * markiert.

Die Signifikanzberechnung ergab Folgendes:

An Tag 3 waren die Werte von PS signifikant höher als die von HA bzw. TiO_2 , außerdem waren die Werte von Ti im Vergleich zu denen von HA bzw. TiO_2 signifikant erhöht. An Tag 5 waren die Werte bei PS und Ti signifikant höher als die bei HA bzw. TiO_2 . An Tag 7 weist PS signifikant höhere Werte auf als Korund, HA und TiO_2 .

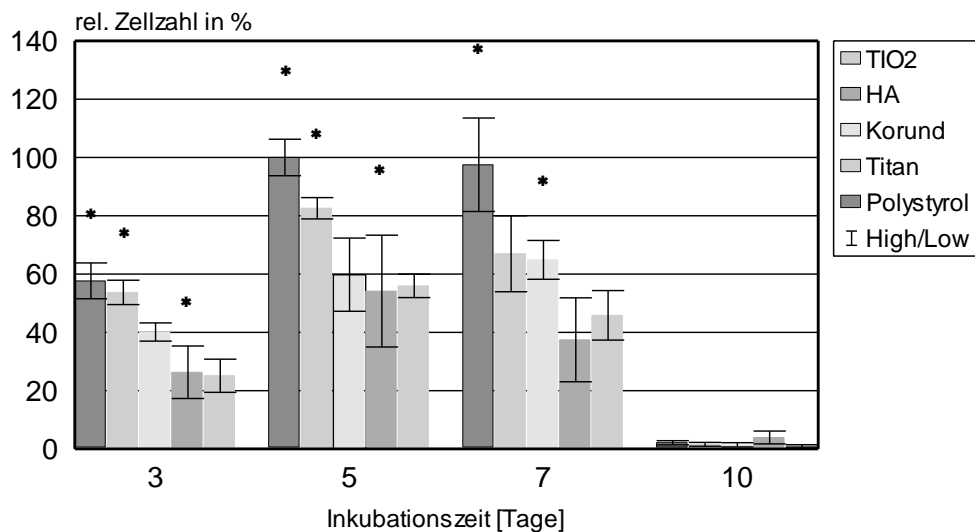


Abb. 3.2.2 Zellzahlermittlung der 84-9 Fibroblasten über einen 10-tägigen Kultivierungszeitraum (n=4 pro Oberfläche)

3.2.3 Proteinbestimmung nach LOWRY

Die Bestimmung des Proteingehalts zeigt einen relativ gleichmäßigen Anstieg bis Tag 7. An Tag 10 scheinen die Zellen nahezu abgelöst zu sein. Dennoch ist Protein nachzuweisen, was dadurch erklärt werden kann, dass bei der Methode nach LOWRY auch totes, noch an der Oberfläche haftendes Zellmaterial erfasst wird (Abb.3.2.3).

Der Proteingehalt auf den einzelnen Oberflächen innerhalb eines Messtages ist nur geringen Schwankungen unterworfen, was bedeutet, dass auf allen Oberflächen der gleiche Proteingehalt zu finden ist.

Die signifikanten Werte sind in Abb.3.2.3 mittels * markiert.

Die Signifikanzberechnungen ergaben hier Folgendes:

An Tag 5 erwiesen sich die Werte von PS als signifikant niedriger als die von Korund, an Tag 7 jedoch niedriger als die von HA.

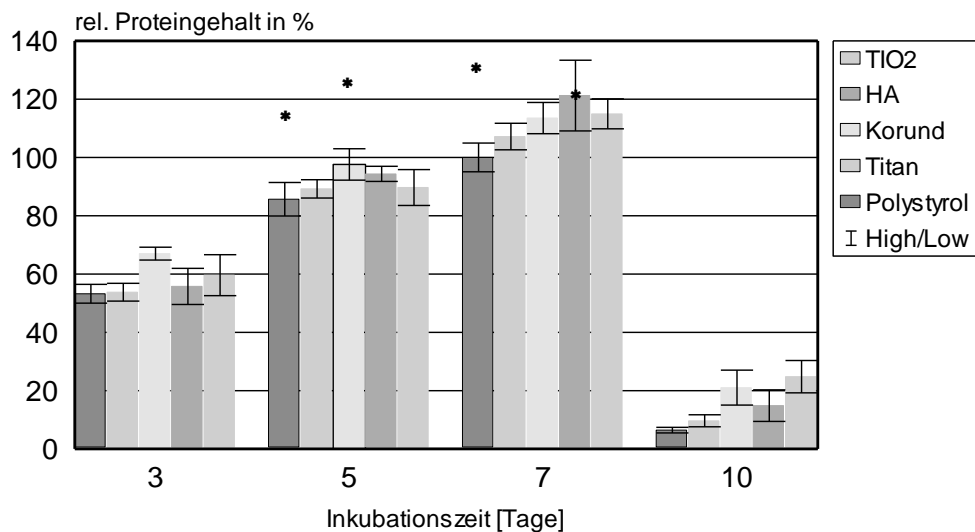


Abb. 3.2.3 Rel. Proteingehalt der 84-9 Fibroblasten über einen 10-tägigen Kultivierungszeitraum (n=4 pro Oberfläche)

3.3 Messreihe mit der Fibroblastenzelllinie L-929

Die beiden durchgeführten Messreihen lieferten vergleichbare Ergebnisse. Ebenso wurden pro Oberfläche vier Proben gemessen.

Die Signifikanzberechnungen erfolgten wie bei der humanen Fibroblastenzelllinie 84-9. Die Werte wurden bei $p \leq 0,05$ als signifikant unterschiedlich betrachtet.

3.3.1 Bestimmung der Zellaktivität

Die Messung der Zellaktivität ergab einen deutlichen Anstieg der Werte bis Tag 7. An Tag 10 war ein starkes Absinken aller Werte zu vermerken. Die Zellen schienen nahezu abgelöst zu sein (Abb.3.3.1).

Keine der Oberflächen kann als bevorzugt herausgestellt werden. Polystyrol weist allerdings bis auf Tag 10 durchgehend die höchsten Werte auf.

Die signifikant unterschiedlichen Werte sind in der Abbildung mit * gekennzeichnet.

Die Signifikanzberechnung ergab Folgendes:

An Tag 3 war PS im Vergleich zu Ti signifikant erhöht, an Tag 10 war HA verglichen mit Korund signifikant höher.

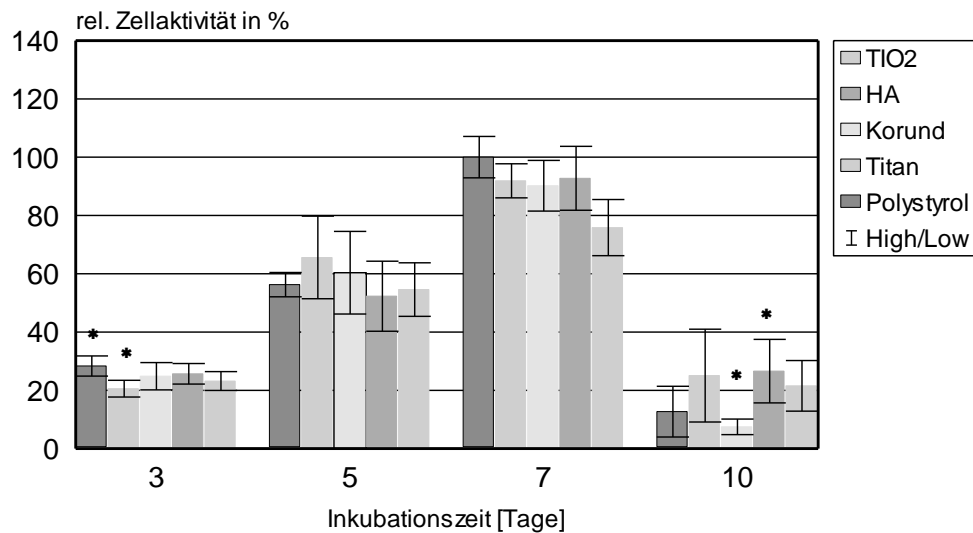


Abb. 3.3.1 Zellaktivität der L-929 Fibroblasten über einen 10-tägigen Kultivierungszeitraum (n=4 pro Oberfläche)

3.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Ergebnisse weisen ebenfalls einen auffallenden Anstieg der Werte bis Tag 7 auf. An Tag 10 waren kaum noch Zellen nachweisbar (Abb.3.3.2).

Tendenziell lässt sich sagen, dass die Zellzahl auf Polystyrol am höchsten ist, wohingegen korund-gestrahlte Oberflächen keine guten Voraussetzungen zu bieten scheinen.

Die signifikant unterschiedlichen Werte sind in Abb.3.3.2 mit * markiert.

Mittels Signifikanzberechnung ließ sich das Folgende ermitteln:

Tag 3 ließ erkennen, dass die Werte von PS signifikant höher waren als die von Korund, Tag 5, dass PS signifikant höher war als HA, und an Tag 7 zeigten sich erneut höhere Werte bei PS als bei Korund.

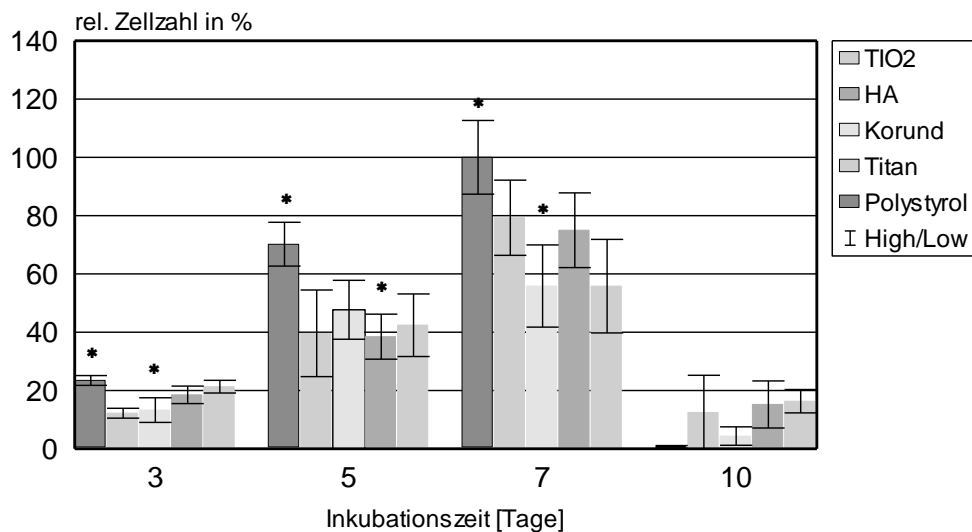


Abb. 3.3.2 Zellzahlermittlung der L-929 Fibroblasten über einen 10-tägigen Kultivierungszeitraum (n=4 pro Oberfläche)

3.3.3 Proteinbestimmung nach LOWRY

Bei der Ermittlung des relativen Proteingehalts nach LOWRY stellte sich ein leichter Anstieg der Werte an Tag 5 heraus, der jedoch an Tag 7 wieder abzufallen schien. An Tag 10 war ein weiterer, wenn auch nur leichter, Abfall festzustellen (Abb.3.3.3).

Die nur geringe Abnahme an Tag 10 ist dadurch zu erklären, dass auch Proteinreste aus abgestorbenen Zellen an der Oberfläche haften, deren Protein auch detektiert wurde.

Die einzelnen Werte innerhalb der jeweiligen Messtage waren nur leichten Schwankungen unterworfen. Man kann jedoch feststellen, dass die korundgestrahlten Oberflächen durchgehend viel Protein aufweisen.

Die signifikanten Werte sind in der Abbildung mit * gekennzeichnet.

Die Signifikanzberechnung ergab hier Folgendes:

An Tag 3 erwiesen sich die Werte von Ti als signifikant niedriger als die von Korund, an Tag 5 waren die Werte von PS niedriger als die von Korund, und an Tag 10 zeigte HA niedrigere Werte als Korund.

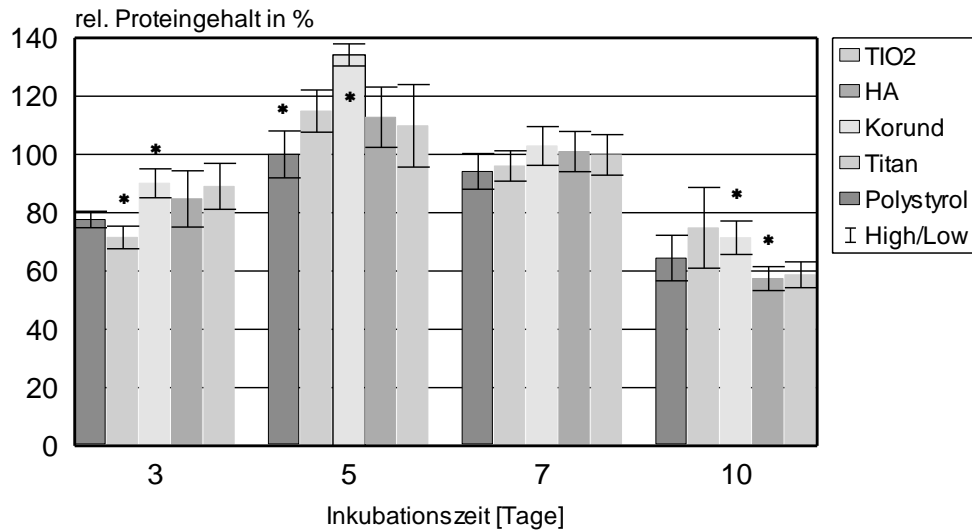


Abb. 3.3.3 Rel. Proteingehalt der L-929 Fibroblasten über einen 10-tägigen Kultivierungszeitraum (n=4 pro Oberfläche)

3.4 Messreihe mit der Osteoblastenzelllinie MG-63

Auch hier wurden die Ergebnisse durch eine zweite Messreihe bestätigt.

Die Biokompatibilität wurde an den Tagen 3, 5, 7 und 10 bestimmt.

Ebenso wurden Standardabweichungen bestimmt und Signifikanzberechnungen durchgeführt.

Die Werte wurden bei $p \leq 0,05$ als signifikant unterschiedlich eingestuft.

3.4.1 Bestimmung der Zellaktivität

Die Messung der relativen Zellaktivität zeigt einen deutlichen Anstieg der Werte bis Tag 5. An Tag 7 ist bereits wieder ein Abfallen bis fast auf das Niveau des 3. Tages festzustellen.

An Tag 10 hat die Aktivität der Zellen weiter abgenommen, da die Oberflächen bereits zu dicht besiedelt waren (Abb.3.4.1).

Bis auf Polystyrol zeigt sich bei den Osteoblasten eine höhere Aktivität auf den gestrahlten Oberflächen, jedoch unabhängig von der Art des Strahlguts.

Diese Tendenz ist besonders an Tag 5 festzustellen, am Höhepunkt der Zellaktivität.

Die signifikanten Werte sind in der Abbildung mit * markiert.

Die Signifikanzberechnungen ergaben Folgendes:

Tag 5 ließ erkennen, dass die Werte von Ti signifikant niedriger waren als die von Korund, an Tag 10 war Ti niedriger als TiO₂.

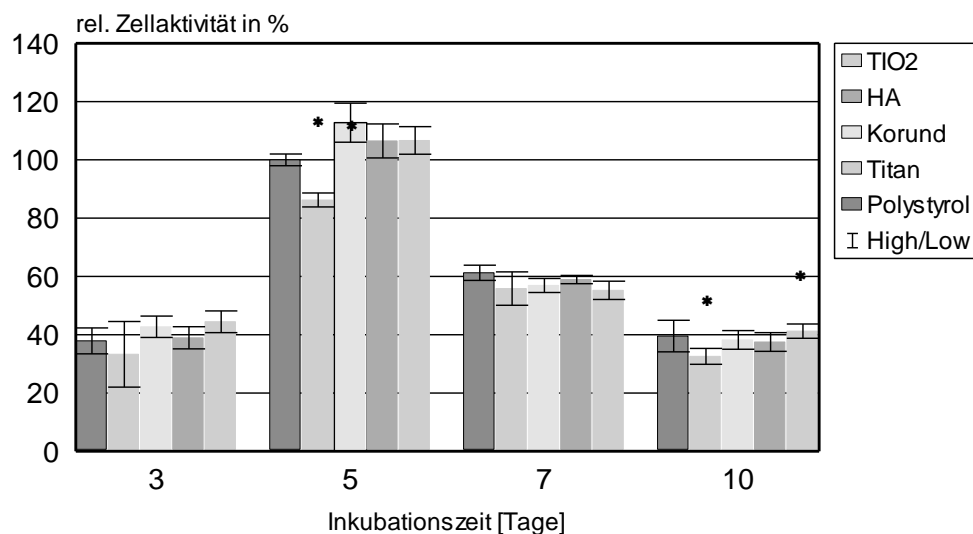


Abb. 3.4.1 Zellaktivität der MG-63 Osteoblasten über einen 10-tägigen Kultivierungszeitraum (n=4 pro Oberfläche)

3.4.2 Bestimmung der Zellzahl

Anders als bei den Messungen zur Zellaktivität, ist hier nun eine allgemeine Vermehrung der Zellen bis Tag 7 zu erkennen, und sogar an Tag 10 scheinen die Werte nur leicht abgesunken zu sein. Die leichte Abnahme lässt sich durch die Ablösung einiger Zellen von der Oberfläche erklären (Abb.3.4.2).

Im Gegensatz zur Zellaktivität zeigt sich hier eher eine Tendenz zur Bevorzugung der ungestrahlten Oberflächen.

Die signifikanten Werte sind in Abb. 3.4.2 mit * markiert.

Durch Signifikanzberechnungen ließ sich Folgendes ermitteln:

An Tag 3 sowie an Tag 5 war ein signifikanter Unterschied zwischen Ti und TiO₂ festzustellen, wobei an Tag 3 Ti die niedrigeren Werte zu verzeichnen hatte, an Tag 5 jedoch TiO₂. An den Tagen 7 und 10 waren jeweils die Werte von PS im Vergleich zu Korund signifikant erhöht.

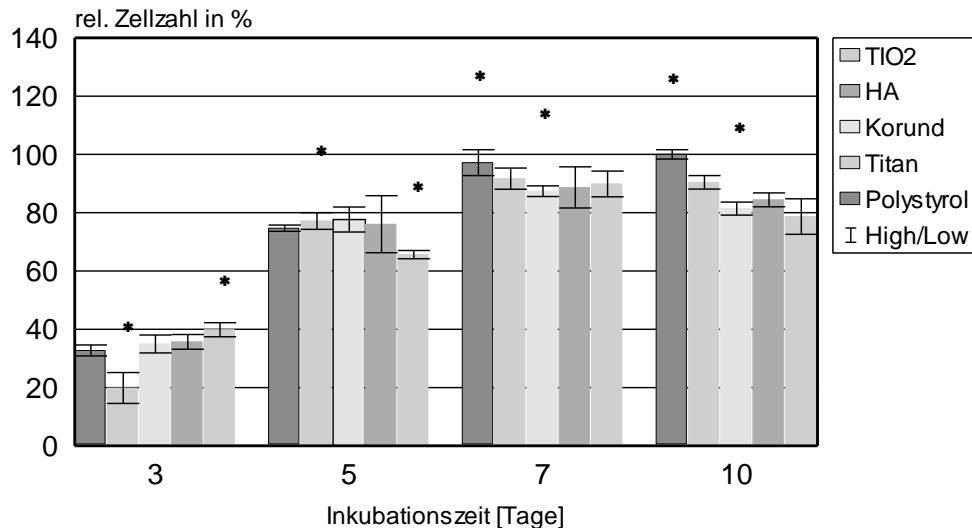


Abb. 3.4.2 Zellzahlermittlung der MG-63 Osteoblasten über einen 10-tägigen Kultivierungszeitraum (n=4 pro Oberfläche)

3.4.3 Proteinbestimmung nach LOWRY

Die Proteinmenge der Osteoblasten zeigt auch hier, wie schon bei den Messungen zur Zellzahl, einen Anstieg bis Tag 7. Die Werte sind an Tag 10 noch ebenso hoch. Dies lässt sich damit begründen, dass, wie schon zuvor erwähnt, bei der Proteinbestimmung nach LOWRY auch bereits totes, abgelöstes Zellmaterial mit gemessen wird (Abb.3.4.3).

Jedoch treten auch hier wieder die gestrahlten Oberflächen in den Vordergrund, was bedeutet, dass sich auf diesen Oberflächen mehr Protein befindet (siehe Messungen der Zellaktivität Punkt 3.4.1).

Korund weist ab Tag 5 die höchsten Werte auf. Die signifikanten Werte sind in der Abbildung mittels * markiert. Die Signifikanzberechnung ergab Folgendes:

Tag 7 ließ erkennen, dass die Werte von Ti signifikant niedriger waren als die von Korund bzw. TiO_2 . An Tag 10 waren die Werte von Ti im Vergleich zu denen von HA signifikant niedriger.

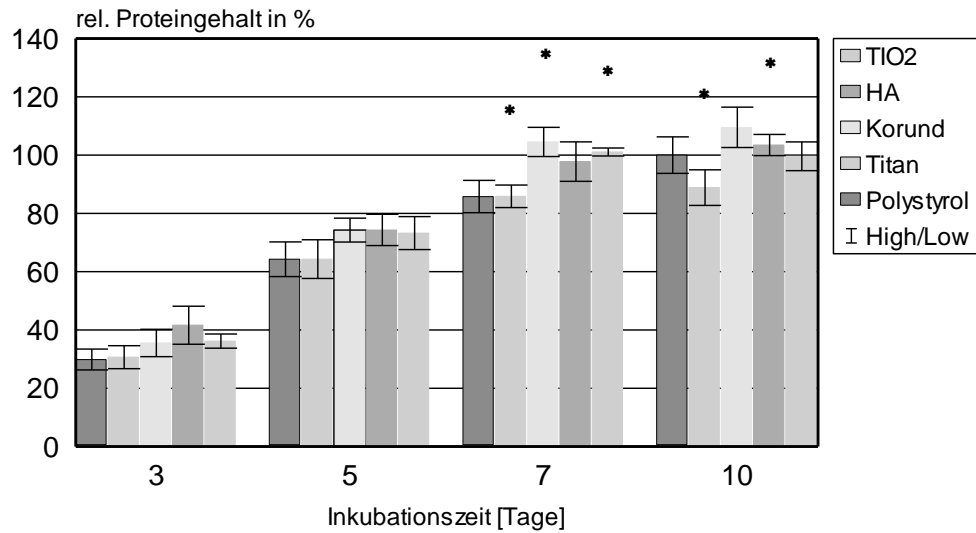


Abb. 3.4.3 Rel. Proteingehalt der MG-63 Osteoblasten über einen 10-tägigen Kultivierungszeitraum (n=4 pro Oberfläche)

4. Diskussion

Zwischen 1940 und 1950 wurde erstmals Titan als Werkstoff für Implantate eingesetzt und erwies sich als besonders biokompatibel.

Trotzdem sollten alle medizinischen Implantate in regelmäßigen Abständen einer spezifischen Normierung unterzogen werden, damit sie Mindeststandards genügen und als medizinische Produkte international Anwendung finden können.

Mit Fortschritten in der Entwicklung der Wissenschaft müssen diese Normen ständig überarbeitet werden (Kutz, 2006), und für die Zulassung im medizinischen Bereich müssen Implantate auch biologisch bewertet werden, was nach einer DIN-Norm (DIN EN ISO 10993) erfolgt (Deutsches Institut für Normung e.V., 1994).

In der Bundesrepublik werden pro Jahr bis zu 120.000 metallische Großimplantate (Großgelenke) im orthopädischen Bereich eingesetzt. Eine schwedische Studie über Hüftarthroplastiken beschreibt den Verlauf nach Implantation über einen Zeitraum von 10 Jahren, wobei zu vermerken ist, dass es bei rund 7 % der Patienten zum Implantatversagen mit anschließender Revision kam (Malchau et al., 1993).

Bis heute ist das Rätsel der Bioverträglichkeit von Fremdmaterialien noch nicht vollständig gelöst (Jennissen, 2000).

Durch Modifikationen der Oberflächen soll versucht werden, sowohl Biokompatibilität als auch mechanische Eigenschaften von Implantaten zu verbessern.

Dies wurde zunächst anhand von orthopädischen Implantaten herausgestellt, wonach sich beispielsweise Hydroxylapatit (HA-) -Beschichtungen für eine engere Einbindung von Fixierungskomponenten im Hartgewebe bewährt haben sollen (Thull, 2003).

Um eine gute Einheilung des Implantates zu gewährleisten, ist man auf Bioverträglichkeit, mechanische Festigkeit, Korrosions-, Abrieb-, und

Verschleißfestigkeit, und schließlich auf gute Verarbeit- und Sterilisierbarkeit angewiesen (Thull, 2003). Bis auf die Sterilisation sind alle anderen Faktoren veränderbar. Diese ist durch spezielle Vorschriften geregelt (Breme et al., 1998).

Auch die Konstruktion der Implantate selbst stellt ein wichtiges Element dar. Beispielsweise haben verschiebbare Gelenkimplantate eine Einscheidung der Verankerungselemente mit Bindegewebe zur Folge, was sich auf physikalisch-chemische und auch biologische Ursachen zurückführen lässt. Dieses Bindegewebe vermindert jedoch unerwünschterweise die Krafterleitung.

Spezielle Schichtwerkstoffe sollen daher die Gewebeadhäsion verbessern, die Einscheidung mit Bindegewebe soll verhindert werden, und funktionelle Gewebszellen sollen herangeführt werden (Thull, 2003).

Für großflächige Implantate, wie zum Beispiel Hüftgelenkkugeln, haben sich jedoch Beschichtungen mit Einschränkungen bewährt. Besser eignen sich hier Verankerungen von Modifikationen in der Gitterstruktur eines Werkstoffes, wie beispielsweise Metallionen (Ti^{4+} , Ti^{5+} , etc.).

Im orthopädischen Gelenkersatz werden vorwiegend HA-Beschichtungen zur „stimulierten“ Verbindung von Implantatkomponenten und Knochen verwendet (Thull, 2003).

Wie bereits zuvor erwähnt, besitzt Titan als Implantatwerkstoff hervorragende Eigenschaften, wie Korrosionsfestigkeit, gute Biokompatibilität und Osseointegrationseigenschaften, sowie auch gute mechanische Eigenschaften. Darüber hinaus wurde bereits vielfach herausgestellt, dass durch gezielte Modifikation der Implantatoberfläche, wie beispielsweise durch Anrauen, die oben genannten Eigenschaften noch verbessert werden können (Allegrini et al., 2006, Butz et al., 2006, Le Guehennec et al., 2006, De Maeztu et al., 2003, Citeau et al., 2005).

Titan und seine Legierungen sind mittlerweile als Implantatmaterial mit Knochenkontakt weit verbreitet (Kim et al., 2006, Albrektsson et al., 1981).

Die Verbesserung der Einheilung von Titan ins Knochengewebe stellt jedoch nach wie vor eine Herausforderung im Bereich der Biomaterialien dar. Eine wesentliche Rolle bei der Osseointegration spielt, wie schon zuvor erwähnt, sicherlich die Oberflächenstruktur des Implantates (Wennerberg, 2003, Biggerelle et al., 2002).

Mittlerweile wurden mehrfach die Effekte von Oberflächenmodifikationen auf die Biokompatibilität eines Implantates *in vitro* und *in vivo* hervorgehoben (Li et al., 2004, Xavier et al., 2003, Schwartz et al., 1999, Carinci et al., 2003). Die Oberflächenrauigkeit ist somit erwiesenermaßen ein wichtiger Faktor für die Osseointegration.

Um Titanoberflächen zu modifizieren, stehen mittlerweile mehrere Techniken zur Verfügung. Zu nennen sei beispielsweise die Behandlung mit einem YAG-Laser, wobei hier gute Ergebnisse bezüglich der Osseointegration und der Knochenheilung zu verzeichnen sind (Kesler et al., 2006). Der YAG-Laser (=Yttrium-Aluminium-Granat-Laser) ist ein Festkörperlaser, der infrarote Strahlung emittiert und sich aufgrund seiner möglichen hohen Ausgangsleistung u.a. gut für die Materialbearbeitung von Metallen eignet (Schwarz et al., 2005). Auch die Säure-Ätz-Technik wurde bereits mit Erfolg eingesetzt (Butz et al., 2006, Le Guehennec et al., 2006).

In der hier vorgestellten Untersuchung sollen jedoch verschiedene Arten von Strahlgut, ebenfalls zur Oberflächenmodifikation verwendet, verglichen werden. Eine herkömmliche Methode zur Reinigung, Anrauhung und Aktivierung von metallischen Oberflächen, die in zahnärztlichen und orthopädischen Bereichen eingesetzt werden sollen, ist das Sandstrahlen mit Korund (Wintermantel et al., 1996, Tiller et al., 1985).

Das verwendete Strahlgut ist eine Komposit-Keramik-Mischung, bestehend aus einem Aluminium-Kern, der als Trägermaterial dient (Gbureck et al., 2003).

Je nach Aufprallgeschwindigkeit kann es zum vollständigen Einschluss der Strahlkörner kommen. Dabei wird Aluminiumoxid (Al_2O_3) teilweise in der

Metalloberfläche eingeschlossen (Böhler et al., 2002, Ricci et al., 1992, Darvell et al., 1995).

Diese Kontamination mit Korund bzw. Aluminiumoxid kann durch eine Beschichtung des Strahlgutes mit TiO₂ bzw. Hydroxylapatit nachweislich vermieden werden. Wie mittels EDX-Analyse herausgestellt wurde, zeigen die Beschichtungen eine hohe Adhärenz zu metallischen Oberflächen und sind nahezu unempfindlich gegenüber Ultraschallreinigung (Gbureck et al., 2003).

Kürzliche Untersuchungen zeigten sogar einen eventuellen Zusammenhang zwischen dem Einschluss von Restpartikeln im Metall und frühzeitiger Lockerung der Implantate (Schuh et al., 2005, Grübl et al., 2002, Moberg et al., 1989, Piatelli et al., 1998, Witt et al., 1991).

Darüber hinaus verlangt die EU-Norm EN 12010 von Restpartikeln freie Oberflächen (Schuh et al., 2005), welche zur Produktion osteolytischer Zytokine und somit zur periprosthetischen Osteolyse führen könnten (Catelas et al., 1998, 1999, Hatton et al., 2003, Petit et al., 2002).

Durch Hinzufügen einer Hydroxylapatit- bzw. Tricalcium-Phosphat-Ummantelung kann die postoperative Einheilung jedoch verbessert werden, was auch in einigen Studien bereits belegt werden konnte (Dhert et al., 1993, Goldberg et al., 1995, Negre et al., 1995).

Die Hydroxylapatitbeschichtungen beispielsweise weisen eine erhöhte Beständigkeit und Homogenität auf (Gbureck et al., 2003).

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Strahlgut auf das Wachstumsverhalten von Kulturzellen auf einer Titanbasis zu untersuchen.

Hierfür wurden mit Hilfe von standardisierten Untersuchungsmethoden die Aktivität und die Vermehrung der Zellen verzeichnet. Auch eine Proteinbestimmung wurde an den Zelllinien durchgeführt.

Im Vergleich wurden die humane Fibroblastenzelllinie 84-9, die murine Fibroblastenzelllinie L-929 und die humane Osteoblastenzelllinie MG-63 herangezogen.

Untersucht wurden vier verschiedene Prüfkörper: Reintitan, Titan mit Korund gestrahlt, Titan mit Hydroxylapatit-beschichtetem Korund gestrahlt und Titan mit Titandioxid-beschichtetem Korund gestrahlt.

Als Referenzoberfläche diente Polystyrol.

Um die Ergebnisse zu verifizieren, wurden jeweils in einer zweiten Messreihe die Versuche nochmals durchgeführt.

Einen weiteren Untersuchungsparameter stellte die Verwendung dreier unterschiedlicher Zelllinien dar, wobei hierbei die Verwendung der Zelllinie MG-63, einer osteoblastären Linie, isoliert von einem Osteosarkom-Patienten, von besonderem Interesse war (Kim et al., 2006, Martin et al., 1999, Montanaro et al., 2002).

Durch Beschichtung des Strahlgutes mit Hydroxylapatit bzw. TiO_2 sollen also sowohl die Einheilung in das Knochengewebe verbessert als auch die frühzeitige Lockerung der Implantate vermieden werden (Dhert et al., 1993, Goldberg et al., 1995, Negre et al., 1995, Gbureck et al., 2003).

Dies soll mit Hilfe der Versuche dieser Studie herausgestellt werden.

Bezüglich der relativen Zellaktivität konnte bei allen drei untersuchten Zelllinien ein Anstieg bis Tag 5 festgestellt werden. Bei der Fibroblastenlinie 84-9 und der Fibroblastenlinie L-929 stiegen die Werte bis Tag 7 weiter an, wobei die Aktivität bei den MG-63-Osteoblasten bereits nach Tag 5 wieder abfiel.

An Messtag 10 waren die Werte aller drei Linien deutlich abgefallen. Dies lässt sich damit erklären, dass die Zellen sich aufgrund zu dichter Besiedelung bereits teilweise von den Oberflächen abgelöst hatten.

Bei der Fibroblastenlinie 84-9 war ein insgesamt besseres Wachstum auf den ungestrahlten Oberflächen, sprich Polystyrol und Titan, zu verzeichnen.

Bei den Fibroblasten L-929 konnte in Bezug auf die Zellaktivität keine der Oberflächen als bevorzugt herausgestellt werden. Die Referenzoberfläche Polystyrol jedoch wies durchgehend gute Ergebnisse auf.

Die MG-63-Osteoblasten hingegen schienen auf den gestrahlten Oberflächen, Korund, Hydroxylapatit und Titanoxid, besser zu wachsen, wobei aber keine der

drei Oberflächen im Vordergrund stand. Diese Tendenz war besonders an Messtag 5 zu beobachten.

In anderen Studien schienen bereits gerade Osteoblasten bzw. osteoblasten-ähnliche Zellen Hydroxylapatit in Bezug auf das Knochenwachstum reinem Titan als Implantatmaterial vorzuziehen (Block et al., 1987, Block et al., 1989, Buser et al., 1991).

Die Zelladhäsion und -vermehrung basiert auf einem Zwischenspiel von Integrinen und extrazellulärer Matrix (Friedl et al., 1998), was in vielerlei Hinsicht das „Verhalten“ der Zellen reguliert, wie zum Beispiel Proliferation, Differentiation oder Apoptose (Schwartz et al., 1995, Danen et al., 1998, Kononen et al., 1992, Lauer et al., 2001, Mustafa et al., 2001).

In einer Studie wurde ein eventueller Zusammenhang zwischen einer speziellen Interaktion von alpha-V-Integrin und Fibronectin, und dem Wachstum von sog. HOS-Zellen, osteoblasten-ähnlichen Zellen, auf HA, nicht aber auf Titan, herausgestellt (Matsuura et al., 2000).

Während also in der vorliegenden Studie die humanen Fibroblasten 84-9 eher die glatten Oberflächen bevorzugten, war bei den MG-63-Osteoblasten das Wachstum eindeutig auf den gestrahlten Oberflächen höher.

Im Großen und Ganzen konnten diese Ergebnisse in einem jeweils zweiten Durchgang der Versuchsreihen bestätigt werden.

Bei der Bestimmung der Zellzahl konnte man sowohl bei der Fibroblastenlinie L-929 als auch bei der Osteoblastenlinie MG-63 einen Anstieg der Werte bis Tag 7 verzeichnen. Bei den Osteoblasten blieben sie sogar bis zum 10. Messtag relativ stabil.

Bei den humanen Fibroblasten 84-9 war an Tag 7 bereits ein leichter Abfall der Werte zu vermerken, an Tag 10 waren die Werte kaum noch messbar, die Zellen größtenteils bereits abgelöst.

Wie schon zuvor beim Zellaktivitätstest schienen auch hier die humanen Fibroblasten auf den glatten Oberflächen wesentlich besser zu wachsen als auf den gestrahlten. Die Werte sind hier meist signifikant erhöht.

Die Maus-Fibroblasten vermehrten sich am Besten auf der als Referenz dienenden Oberfläche Polystyrol, wobei Korund die niedrigsten Messwerte zu verzeichnen hatte.

Bei den MG-63-Osteoblasten war die Vermehrung insgesamt sehr hoch, wobei keine der Oberflächen generell bevorzugt wurde. Die Tendenz ging jedoch hier, anders als beim Zellaktivitätstest, nun auch zu den glatten Oberflächen, besonders an den Meßtagen 7 und 10. Auf den gestrahlten Oberflächen war also die Anzahl der Zellen reduziert, jedoch die Aktivität erhöht, was auf eine höhere Stoffwechselrate auf den gestrahlten Oberflächen hindeutet.

In Bezug auf die Bestimmung der Zellzahl wurden tendenziell die glatten Oberflächen bevorzugt, auch wenn die Unterschiede nur teilweise signifikant waren.

Die Osteoblasten schienen als einzige Zelllinie auf allen Oberflächen annähernd gleich gut zu wachsen.

Auch hier wurden die Ergebnisse weitgehend durch eine zweite Versuchsreihe bestätigt.

Die Proteinbestimmung nach LOWRY zeigte bei allen drei Zelllinien relativ hohe Werte, die bei den beiden Fibroblastenlinien schon an Tag 3 sehr weit angestiegen waren.

Bei der humanen Linie war ein starker Anstieg bis Tag 7 zu vermerken, bei der Maus-Linie L-929 hingegen fielen die Werte nach Tag 5, wenn auch nur leicht, bereits ab.

Während an Messtag 10 bei den 84-9 Fibroblasten, wie auch zuvor bei der Messung der Zellzahl, kaum noch Werte zu messen waren, waren die Messwerte bei der Linie L-929 immer noch sehr hoch.

Da bei der Proteinbestimmung die Möglichkeit besteht, auch totes Zellmaterial zu messen, kann man dieses Ergebnis erklären. Die Werte an Tag 10 bezüglich Aktivität und Zellzahl hingegen waren sehr niedrig, was die Vermutung hinsichtlich des toten Zellmaterials bestätigt.

Bei den MG-63-Osteoblasten stieg der Proteingehalt der Zellen bis Tag 10 an, wo die Werte am höchsten waren. Dies lässt sich ebenfalls mit der Messung toten Zellmaterials erklären.

Bei der Bestimmung des Proteingehaltes der Zellen wurden bei allen drei Linien, also sowohl bei den Fibroblasten als auch bei den Osteoblasten, auf den gestrahlten Oberflächen die höchsten Werte gemessen. Die Werte auf den korund- und HA-gestrahlten Plättchen lagen hierbei meist leicht höher als die auf den TiO₂-gestrahlten Plättchen.

Wieder waren die Messergebnisse vergleichbar mit denen der zweiten Versuchsdurchführung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zelllinie der humanen Fibroblasten, 84-9, sowohl in Bezug auf die Zellaktivität als auch auf die Zellzahl, die ungestrahlten Oberflächen, sprich Polystyrol und Titan, bevorzugt hat.

Nur in Hinblick auf die Bestimmung des Proteingehaltes der Zellen waren die Werte auf den gestrahlten Oberflächen besser.

Die Linie der L-929 Fibroblasten der Maus schien sich relativ unabhängig vom Untergrund, ob glatt oder gestrahlt, zu vermehren, lediglich bei der Proteinbestimmung zeigten sich auch hier höhere Werte auf den gestrahlten Oberflächen.

Interessanterweise schienen lediglich die MG-63-Osteoblasten die gestrahlten Oberflächen zu bevorzugen. Hinsichtlich der Zellzahl konnte jedoch auch auf den glatten Plättchen eine relativ gute Vermehrung verzeichnet werden.

Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass bei Bevorzugung der angerauten Oberflächen durch eine Zelllinie, Korund keine höheren Werte zu verzeichnen hatte als HA oder TiO₂. Lediglich bei der Proteinbestimmung nach LOWRY hatten die korund- und HA-gestrahlten Oberflächen gegenüber den TiO₂-gestrahlten Oberflächen leicht bessere Ergebnisse erzielt.

Ausblickend lässt sich sagen, dass durch die Bestrahlung von Titanoberflächen die Osseointegration von Implantaten generell verbessert werden kann.

Die Beschichtung der Oberflächen mit Hydroxylapatit oder Titandioxid senkt nachweislich die Aluminiumkontamination des Gewebes.

Anhand weiterer Untersuchungen könnte beispielsweise die Genexpression in Abhängigkeit von den unterschiedlich gestrahlten Oberflächen untersucht werden, was die Frage aufwirft, ob knochenspezifische Gene auf den jeweiligen Oberflächen unterschiedlich exprimiert werden.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Wachstumsverhalten von Kulturzellen unterschiedlicher Organismen auf gestrahlten Oberflächen zu untersuchen, wobei gezeigt werden sollte, inwiefern das Zellwachstum von einer Kontamination der Oberfläche durch unterschiedliche Arten von Strahlgut abhängt.

Die verwendeten Zelllinien, die murinen Fibroblasten L-929, die humanen Fibroblasten 84-9 und die humanen Osteoblasten MG-63, wurden hinsichtlich der Parameter relative Zellaktivität, Zellzahl und Proteingehalt untersucht.

Für die Aussaat wurden fünf verschiedene Oberflächen verwendet: Titan, Titan gestrahlt mit Korund, Titan gestrahlt mit hydroxylapatit-beschichtetem Korund und gestrahlt mit TiO_2 -beschichtetem Korund. Als Referenzoberfläche diente konventionelles Zellkultur-Polystyrol.

Jede Messreihe wurde über einen 10-tägigen Zeitraum kultiviert. Die Messungen erfolgten jeweils an den Tagen 3, 5, 7 und 10 nach Aussaat. Während der Inkubationszeit wurde an jedem Messtag ein Mediumwechsel vorgenommen. Für die Testserien wurden 24-Well-Kulturplatten verwendet. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden alle Messreihen zweifach durchgeführt.

Bei der Auswertung der Ergebnisse zeigte sich unter Einbeziehung aller drei Zellgruppen keine eindeutige Bevorzugung einer bestimmten Oberfläche.

Bei näherer Betrachtung der einzelnen Zelllinien jedoch konnte interessanterweise festgestellt werden, dass lediglich die Osteoblastenlinie MG-63 auf gestrahltem Untergrund besser zu wachsen schien.

Bei Untersuchung des Parameters Proteingehalt aber, boten die gestrahlten Oberflächen für alle drei Linien die besseren Voraussetzungen.

Abschließend lässt sich sagen, dass man die Problematik, die bisher im Zusammenhang mit der reinen Korund-Bestrahlung diskutiert wurde (siehe Kapitel 4.), umgehen könnte, indem der Strahlsand mit Hydroxylapatit bzw. Titanoxid beschichtet wird.

Laut der Ergebnisse dieser Studie war auf den korund-gestrahnten Oberflächen kein besseres Wachstum der Zellen zu verzeichnen als auf den HA- bzw. TiO_2 -gestrahnten Oberflächen.

6. Literaturverzeichnis

1. Albrektsson T., Branemark P.I., Hansson H.A., Lindstrom J., (1981) Osseointegrated titanium implants: Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand* 52; 155-170
2. Allegrini S. Jr., Rumpel E., Kauschke E., Fanghanel J., König B. Jr., (2006) Hydroxyapatite grafting promotes new bone formation and osseointegration of smooth titanium implants. *Ann Anat* 2; 143-151
3. Arens S., Hansis M., (1998) Osteosynthese mit Titan - Indikationen für die Wahl des geeigneten Implantatmaterials. *Deutsches Ärzteblatt* 95, Heft 24; 32-34
4. Arizona Implant Dentist (2000-2005): History of Dental Implants
5. Bigerelle M., Anselme K., Noel B., Ruderman I., Hardouin P., Iost A., (2002) Improvement in the morphology of Ti-based surfaces: A new process to increase In vitro human osteoblast response. *Biomaterials* 23; 1563-1577
6. Block M.S., Finger I.M., Fontenot M.G., Kent J.N., (1989) Loaded hydroxyapatite-coated and grit-blasted titanium implants in dogs. *Int J Oral Maxillofac implants* 4; 219-225
7. Block M.S., Kent J.N., Kay J.F., (1987) Evaluation of hydroxyapatite-coated titanium dental implants in dogs. *J Oral Maxillofac Surg* 45; 601-607
8. Böhler M., Kanz F., Schwarz B., Stefan I., Walter A., Plenck H., Knahr K., (2002) Adverse tissue reactions to wear particles from Co-alloy articulations, increased by alumina-blasting particle contamination from cementless Ti-based total hip implants. *J. Bone Jt. Surg.* 84-B; 128-136
9. Borsari V., Giavaresi G., Fini M., Torricelli P., Salito A., Chiesa R., Chiusoli L., Volpert A., Rimondini L., Giardino R., (2005) Physical characterisation of different-roughness titanium surfaces, with and without hydroxyapatite coating, and their effect on human osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 75B; 359-368
10. Boyan B.D., Batzer R., Kieswetter K., Liu Y., Cochran D.L., Szmuckler-Moncler S., Dean D.D., Schwartz Z., (1998) Titanium surface roughness

- alters responsiveness of MG-63 osteoblast-like cells... J Biomed Mater Res 39; 77-85
11. Breme H. J., Barbosa M. A., Rocha L. A., (1998) Adhesion to Ceramics. In: Helsen J. A., Breme H. J. (Hrsg.), Metals as biomaterials. Wiley and Sons, NY, 219-290
 12. Brunette B.M., (1998) The effect of implant surface topography on the behaviour of cells. Int J Oral Maxillofac Implants 3; 231-246
 13. Buser D., Schenk R.K., Steinemann S., Fiorellini J.P., Fox C.H., Stich H., (1991) Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. J Biomed Mater Res 25; 889-902
 14. Butz F., Aita H., Wang C.J., Ogawa T., (2006) Harder and stiffer bone osseointegrated to roughened titanium. J Dent Res 6; 560-565
 15. Carinci F., Pezzetti F., Volinia S., Francioso F., Arcelli D., Marchesini J., Scapoli L., Piattelli A., (2003) Analysis of osteoblastic-like NG 63 cells`response to a rough implant surface by means of DANN microarray. J Oral Implantol 29; 215-220
 16. Castellani R., de Ruyter A., Renggli H., Jansen J., (1999) Response of rat bone marrow cells to differently roughened titanium discs. Clin Oral Implants Res 10; 369-378
 17. Catelas I., Huk O.L., Petit A., Zukor D.J., Marchand R., Yahia L., (1998) Flow cytometric analysis of macrophage response to ceramic and polyethylene particles: effects of size, concentration, and composition. J Biomed Mater Res 41; 600-607
 18. Catelas I., Petit A., Marchand R., Zukor D.J., Yahia L., Huk O.L., (1999) Cytotoxicity and macrophage cytokine release induced by ceramic and polyethylene particles in vitro. J Bone Joint Surg 81-B; 516-521
 19. Catelas I., Petit A., Zukor D.J., Marchand R., Yahia L., Huk O.L., (1999) Induction of macrophage apoptosis by ceramic and polyethylene particles in vitro. Biomaterials 20; 625-630

20. Citeau A., Guicheux J., Vinatier C., Layrolle P., Nguyen T.P., Pilet P., Daculsi G., (2005) In vitro biological effects of titanium rough surface obtained by calcium phosphate grid blasting. *Biomaterials* 26; 157-165
21. Danen E.H.J., Lafrenie R.M., Miyamoto S., Yamada K.M., (1998) Integrin signaling: cytoskeletal complexes, MAP kinase activation, and regulation of gene expression. *Cell Adhes Commun* 6; 217-224
22. Darvell B.W., Samman N., Luk W.K., Clark R.K., Tideman H., (1995) Contamination of titanium castings by aluminium oxide blasting. *J. Dent.* 23; 319-322
23. De Maeztu M.A., Alava J.I., Gay-Escoda C., (2003) Ion implantation: Surface treatment for improving the bone integration of titanium and Ti6Al4V dental implants. *Clin. Oral Impl. Res.* 14; 57-62
24. Deutsche Titan GmbH, (2000) Biokompatibilität von Titan und Titanlegierungen
25. Deutsches Ärzteblatt 95, (1998) Heft 24; 1516-1518
26. Deutsches Institut für Normung e. V. (1994) Biologische Beurteilung von Medizinprodukten Deutsche Fassung EN 30993-6: 1994
27. Dhert W.J., Klein C.P., Jansen J.A., van der Velde E.A., Vriesde R.C., Rozing P.M., de Groot K., (1993) A histological and histomorphometrical investigation of fluorapatite, magnesiumwhitlockite, and hydroxylapatite plasma-sprayed coatings in goats. *J Biomed Mater Res* 27; 127-138
28. Friedl P., Bröcker E.B., Zänker K.S., (1998) Integrins, cell matrix interactions and cell migration strategies: fundamental differences in leukocytes and tumor cells. *Cell Adhes Commun* 6; 225-236
29. Gbureck U., Masten A., Probst J., Thull R., (2003) Tribochemical structuring and coating of implant metal surfaces with titanium oxide and hydroxyapatite layers. *Materials Science and Engineering C* 23; 461-465
30. Giavaresi G., Fini M., Chiesa R., Rimondini L., Rondelli G., Borsari V., Martini L., Nicoli Aldini N., Guzzardella G.A., Giardino R., (2002) Osteointegration of sand-blasted or anodised hydrothermally treated titanium implants: mechanical, histomorphometric, and bone hardness measurements. *Int J Artif Organs* 25; 806-813

31. Goldberg V.M., Stevenson S., Feighan J., Davy D., (1995) Biology of gritblasted titanium alloy implants. *Clin Orthop* 319; 122-129
32. Grübl A., Kolb A., Reinisch G., Gottsauner-Wolf F., (2002) REM-Analyse von korundgestrahlten Hüft-TEP-Schäften. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 140 (Suppl.); 16
33. Hatton A., Nevelos J.E., Matthews J.B., Fisher J., Ingham E., (2003) Effects of clinically relevant alumina ceramic wear particles on TNF-alpha production by human peripheral blood mononuclear phagocytes. *Biomaterials* 24; 1193-1204
34. Hayakawa T., Yoshinari M., Kiba H., Yamamoto H., Nemoto K., Jansen J.A., (2002) Trabecular bone response to surface roughened and calcium phosphate (Ca-P) coated titanium implant. *Biomaterials* 23; 1025-1031
35. Hench L.L., Ethridge E.C., (1982) *An interfacial approach*. Academic Press. *Biomaterials*; 1-389
36. Hoffmann-Axthelm (1995) *Lexikon der Zahnmedizin*
37. Horbett T.A., (1996) Structure, properties and adsorption to surfaces. In: Ratner B.D., Hoffmann A.S., Schoen F.J., Lemons J.E. (eds) *Biomaterials Science*. Academic Press, San Diego; 133-140
38. Jennissen H. P., (2000) *Verträglichkeit groß geschrieben*. *Essener Unikate* 13; 78-93
39. Judet I., Judet R., (1949) Essais de reconstruction prothetique de la hanche apres resection de la tete femorale. *J Chir.* 65; 17-29
40. Keller J.C., (1998) Tissue compatibility to different surfaces of dental implants: In vitro studies. *Implant Dent* 4; 331-337
41. Kesler G., Romanos G., Koren R., (2006) Use of Er:YAG-Laser to improve osseo-integration of titanium alloy implants-a comparison of bone healing. *Int J Oral Maxillofac Implants* 21 (3); 375-379
42. Kim M.J., Kim C.W., Lim Y.J., Heo S.J., (2006) Microrough titanium surface affects biologic response in MG 63 osteoblast-like cells. *Journal of Biomedical Materials/Research Part A*.

43. Kononen M., Hormia M., Kivilahti J., Hautaniemi J., Thesleff I., (1992) Effect of surface processing on the attachment, orientation, and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. *J Biomed Mater Res* 26; 1325-1341
44. Korovessis P.G., Deligianni D.D., (2002) Role of surface roughness of titanium versus hydroxyapatite on human bone marrow cells response. *J Spinal Discord Tech* 15; 175-183
45. Kutz, Dr. K.-H., (2006) Normen für weltweit passgerechte Implantate. Informationsdienst Wissenschaft
46. Lange R., Lüthen F., Beck U., Rychly J., Baumann A., Nebe B., (2002) Cell-extracellular matrix interaction and physico-chemical characteristics of titanium surfaces depend on the roughness of the material. *Biomolecular Engineering* 19; 255-261
47. Lauer G., Wiedmann-Al-Ahmad M., Otten J.E., Hubner U., Schmelzeisen R., Schilli W., (2001) The titanium surface texture effects adherence and growth of human gingival keratinocytes and human maxillar osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials* 22; 2799-2809
48. Le Guehennec L., Soueidan A., Layrolle P., Amouriq Y., (2006) Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater* Aug 2006
49. Leven R.M., Viridi A.S., Sumner D.R., (2004) Patterns of gene expression in rat bone marrow stromal cells cultured on titanium alloy discs of different roughness. Wiley InterScience/ Wiley Periodicals, Inc.; 391-401
50. Leventhal J., (1951) Titanium-a metal for surgery. *Bone Jt. Surg* 33A; 473.34
51. Li L.H., Kong Y.M., Kin H.W., Kim Y.W., Kim H.E., Heo S.J., Koak J.Y., (2004) Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation. *Biomaterials* 25; 2867-2875
52. Lumbikanonda N., Sammons R., (2001) Bone cell attachment to dental implants of different surface characteristics. *Int J Oral Maxillofac Implants* 16; 627-636
53. Malchau H., Herberts P., Ahnfelt L., (1993) Prognosis of Total Hip Replacement in Sweden. Follow-up of 92.675 Operations performed 1978-1990. *Acta Orthop Scand* 64; 497-506

54. Martin J.Y., Dean D.D., Cochran D.L., Simpson J., Boyan B.D., Schwartz Z., (1999) Proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63) cultured on previously used titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res* 7; 27-37
55. Matsuura T., Hosokawa R., Okamoto K., Kimoto T., Akagawa Y., (2000) Diverse mechanisms of osteoblast spreading on hydroxyapatite and titanium. *Biomaterials* 21; 1121-1127
56. Moberg L.E., Nordenram A., Kjellman O., (1989) Metal release from plates used in jaw fracture treatment. A pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 18; 311-314
57. Montanaro L., Arciola C.R., Campoccia D., Cervellati M., (2002) In vitro effects on MG63 osteoblast-like cells following contact with two roughness-differing hydroxylapatite-coated titanium alloys. *Biomaterials* 23; 3651-3659
58. Mustafa K., Wennerberg A., Wroblewski J., Hultenby K., Lopez B.S., Arvidson K., (2001) Determining optimal surface roughness of TiO₂ blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clin Oral Implants Res* 12; 515-525
59. Mustafa K., Wroblewski J., Hultenby K., Lopez B.S., Arvidson K., (2000) Effects of titanium surfaces blasted with TiO₂ particles on the initial attachment of cells derived from human mandibular bone. A scanning electron microscopic and histomorphometric analysis. *Clin Oral Implants Res* 11; 116-128
60. Negre J., Henry F., (1995) Bone reaction to contact with a granulated titanium surface. Apropos of 101 total hip prostheses with six years follow-up. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 81; 106-113
61. Peters M., Hemptenmacher J., Kumpfert J., Leyens C., (1996) Struktur, Gefüge und Eigenschaften von Titan und Titanlegierungen (1); 3-39
62. Petit A., Catelas I., Antoniou J., Zukor D.J., Huk O.L., (2002) Differential apoptotic response of J774 macrophages to alumina and ultra-high-molecular-weight polyethylene particles. *J Orthop Res* 20; 9-15

63. Piattelli A., Manzon L., Scarano A., Paolantonio M., Piattelli M., (1998) Histologic and histomorphometric analysis of the bone response to machined and sand-blasted titanium implants. An experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 13; 805-810
64. Qu J., Chehroudi B., Brunette D.M., (1996) The use of micromachined surfaces to investigate the cell behavioural factors essential to osseointegration. *Oral Dis* 2; 102-115
65. Rajan L., Smyth E., Humphreys H., (2007) Screening for MRSA in ICU patients. How does PCR compare with culture? *J Infect* Aug 6;
66. Ricci J.L., Kummer F.J., Alexander H., Casar R.S., (1992) Technical note: embedded particulate contaminants in textured metal implant surfaces. *J. Appl. Biomater.* 3; 225-230
67. Ring M.E., (2000) *Geschichte der Zahnmedizin*. Könenmann
68. Römpp Chemielexikon (1998) Thieme; 4154-4158
69. Rosa A. L., Beloti M. M., (2003) Effect of cp Ti Surface Roughness on Human Bone Marrow Cell Attachment, Proliferation, and Differentiation. *Braz Dent J* 14 (1); 16-21
70. Schott H., (2000) *Chronik der Medizin*. Chronik Verlag
71. Schuh A., Uter W., Holzwarth U., Kachler W., Göske J., Raab B., Knetsch T., (2005) Residual particle free rough surfaces after rough blasting with steel grit in total hip arthroplasty. *Biomed Techn (Berlin)*; (in press)
72. Schuh A., Uter W., Kachler W., Göske J., Zeiler G., Lill C., (2005) Comparative surface examinations on corundum blasted titanium implants and explants in total hip arthroplasty. *Arch Orthop Trauma Surg* 125; 676-682
73. Schwartz M.A., Schaller M.D., Ginsberg M.H., (1995) Integrin: emerging paradigms of signal transduction. *Ann Rev Cell Dev Biol* 11; 549-599
74. Schwartz Z., Lohmann C.H., Oefinger J., Bonewald L.F., Dean D.D., Boyan B.D., (1999) Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells in the osteoblastic lineage. *Adv Dent Res* 13; 38-48
75. Schwarz F., Becker J., Sculean A., Aoki A., Folwaczny M., Jepsen S., (2005) Therapie der Parodontitis und Periimplantitis mit dem Er:YAG-Laser. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 60; 135-147

76. Sibum H., (1996) Titan und Titanlegierungen – vom Rohstoff bis zum Halbfabrikat. Titan und Titanlegierungen 2; 29-49
77. Sun L., Berndt C.C., Gross K.S., Kucuk A., (2001) Materials fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: a review. J Biomed Mater Res 58; 570-592
78. Taheri D., Müller R., Kujat R., Angele P., (2005) Die erfolgreiche Biologisierung von Implantatoberflächen. Wissenschaft und Praxis 4, Jul/Aug 2005
79. Thomas P., Summer B., Przybilla B., (2001) Allergische Reaktionen auf Metallimplantate. Deutsches Ärzteblatt, Heft 30; 1971-1974
80. Thull R., (1994) Werkstoffkundliche Oberflächeneigenschaften knochenimplantierbarer Biomaterialien. Jahrbuch für orale Implantologie; 55-69
81. Thull R., (2002) Physicochemical principles of tissue material interactions. Biomolecular Engineering 19; 43-50
82. Thull R., (2003) Oberflächenmodifikationen zur Verbesserung von Biokompatibilität und mechanischen Eigenschaften von orthopädischen Implantaten. Orthopädie 32; 51-59
83. Tiller H.-J., Magnus B., Göbel R., Musil R., Garschke A., (1985) Der Sandstrahlprozess und seine Auswirkungen auf den Oberflächenzustand von Dentallegierungen (I). Quintessenz 36 (10); 1927-1934
84. Tiller H.-J., Magnus B., Göbel R., Musil R., Garschke A., Lockowandt P., Oden A., (1985) Der Sandstrahlprozess und seine Auswirkungen auf den Oberflächenzustand von Dentallegierungen (II). Quintessenz 36 (11); 2151-2158
85. Toellner R., (2000) Illustrierte Geschichte der Medizin. Bechtermünz Verlag
86. Vercaigne S., Wolke J.G.C., Naert I., Jansen J.A., (1998) Histomorphometrical and mechanical evaluation of titanium plasma-spray-coated implants placed in the cortical bone of goats. J Biomed Mater Res 41; 41-48
87. Wennerberg A., (2003) Implant design and surface factors. Int J prosthodont 16 (suppl); 45-51

88. Wintermantel E., Ha S.W., (1996) Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen. Springer Verlag Berlin; 1-423
89. Witt J.D., Swann M., (1991) Metal wear and tissue response in failed titanium alloy total hip replacements. J Bone Joint Surg 73-B; 559-563
90. Xavier S.P., Carvalho P.S., Beloti M.M., Rosa A.L., (2003) Response of rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatments. J Dent 31; 173-180