

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

**Zytotoxizitätsprüfung verschiedener Silbertitanlegierungen
auf Titanbasis mittels humaner Osteoblasten**

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

vorgelegt von
Susanne Karola Glückermann
aus Meiningen

Würzburg, Juni 2004

Referent: Prof. Dr.-Ing. R. Thull
Koreferent: Prof. Dr. med. dent. A. Renk
Dekan: Prof. Dr. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2004

Die Promovendin ist Zahnärztin.

In Liebe,
Hochachtung und tiefer Dankbarkeit gewidmet:

Meiner Mutti
Meinem Papa
Meiner Schwester

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
	1.1 Geschichte der Implantate.....	1
	1.2 Titan und Titanlegierungen.....	1
	1.3 Silber als Biomaterial.....	2
	1.4 Biokompatibilität.....	3
	1.5 Zielsetzung.....	3
2	Material und Methode	
	2.1 Prüfkörper.....	5
	2.1.1 Form	5
	2.1.2 Herstellung.....	5
	2.1.3 Reinigung und Vorbereitung.....	6
	2.1.4 Oberflächencharakteristik.....	6
	2.1.5 Polystyrol als Referenzmaterial.....	7
	2.2 Puffer und Medien.....	7
	2.3 Zelllinien.....	10
	2.3.1 Osteoblastenzelllinie hFOB 1.19.....	10
	2.3.2 Epithelzelllinie.....	10
	2.4 Zellkultivierung.....	11
	2.5 CASY 1 Zellanalysesystem.....	11
	2.6 Zellzahlbestimmung.....	12
	2.7 WST-1 Zellvitalitätstest.....	12
	2.8 Bestimmung der alkalischen Phosphatase.....	13
	2.9 Proteinbestimmung nach Bradford.....	14
	2.10 Testalgorithmus und Plattenbelegung.....	15
	2.11 Statistik.....	16

3	Ergebnisse	
3.1	Oberflächen und Zellwachstum.....	17
3.1.1	PVD- Beschichtung mit Silber auf Titanbasis.....	17
3.1.2	Elektronenmikroskopische Analyse des Zellwachstums auf den Oberflächen.....	18
3.2	Meßreihe mit der Osteoblastenzelllinie hFOB 1.19.....	20
3.2.1	Bestimmung der Zellzahl.....	20
3.2.2	Bestimmung der Zellvitalität.....	22
3.2.3	Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität mit ausgewählten Proben	23
3.2.4	Bestimmung der alkalischen Phosphatase.....	24
3.2.5	Proteinbestimmung nach Bradford.....	25
3.3	Meßreihe mit der Epithelzelllinie HBE 16.....	26
3.3.1	Zellvitalitätstest	27
3.3.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	27
3.4	Abschlußmessung.....	28
4	Diskussion	31
5	Zusammenfassung	39
6	Literaturverzeichnis	41

1 Einleitung

1.1 Geschichte der Implantate

Die Geschichte der Anwendung von Implantaten reicht bis zur Zeit der Mayas (ca. 600 v. Chr.) zurück. Sie implantierten nicht nur post mortem, sondern setzten auch anorganische Substanzen, zum Beispiel Muschelstücke, bei lebenden Menschen ein [106].

Amadeo Bobbio, ein Experte für Implantate, erbrachte den röntgenologischen Beweis fester Knochenstrukturen um die "Muschelimplantate" im Jahre 1970 [75]. Die erste Anwendung von metallischen Implantaten geht bis ins 18. Jahrhundert zurück. Es wurden viele Versuche mit unterschiedlichen Materialien durchgeführt und dabei Vor- und Nachteile von Metallen entdeckt. Während Gold, Silber und Platin zwar Korrosionsbeständigkeit besaßen, waren die mechanischen Eigenschaften unzureichend. Messing, Kupfer und Eisen hatten einerseits hervorragende mechanische Eigenschaften, andererseits waren sie wegen ihrer geringen Korrosionsbeständigkeit und Biokompatibilität ungeeignet [33,45,119].

Anfang des 20. Jahrhunderts wurde mit der Entwicklung des V₂A-Stahls, einer CrCo- Gusslegierung mit guten mechanischen Eigenschaften und hoher Korrosionsbeständigkeit, ein revolutionärer Schritt in der Implantatgeschichte und in der Osteosynthese- und Hüftendoprothesenforschung getan [75].

Erst in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde Titan als Implantatwerkstoff näher in Betracht gezogen, da es im Vergleich zu allen anderen Metallen ein geringeres Elastizitätsmodul besitzt und gleichzeitig eine hohe Korrosionsbeständigkeit und mechanische Festigkeit aufweist [78].

1.2 Titan und Titanlegierungen

Entdeckt von Gregor 1791 und Klaproth 1795 ist Titan ein noch junger Werkstoff. Erstmals zwischen 1940 und 1950 wurde Titan und seine Legierungen als Material für Implantatwerkstoffe durch den Forscher Leventhal untersucht und

industriell angewendet [51]. Titan ist im Vergleich zu anderen Metallen sehr korrosionsbeständig, mechanisch fest und hat ein geringes Elastizitätsmodul. Seine Legierungen zeichnen sich durch geringe Dichte, hohe spezifische Festigkeit und ebenfalls Korrosionsbeständigkeit aus. Bis heute gibt es rund 20 verschiedene Titanlegierungen. Das reaktive Metall bildet im Kontakt mit Luft, Wasser oder Körperflüssigkeiten auf seiner Oberfläche spontan eine sehr resistente Oxidschicht, die maßgeblich für das Verhalten des Titans an seinen Grenzflächen verantwortlich ist und die bei Verletzung sofort wieder repariert werden kann [70,85,91]. Als Schutzschicht bewahrt sie das Metall vor chemischen Einflüssen und sorgt dafür, daß Titan kaum in Lösung geht. Dieses Verhalten wurde durch Korrosionsprüfungen nach ISO 10271 belegt. Korrosion tritt nur an Stellen fehlerhafter oder verunreinigter Oxidschicht auf. Der Einfluß von Dicke und Konfiguration der Oxidschicht auf das Biomaterial ist umstritten. Titan wurde bei *in vivo*-Untersuchungen als geeignetes Material zur besseren Osseointegration des Implantates ermittelt [10,50,51,84]. Der Nachteil dieses Metalls ist die geringe Verschleißfestigkeit und die daraus resultierende hohe Anfälligkeit auf Reibkorrosion [117,118].

1.3 Silber als Biomaterial

Die Verwendung alloplastischer Materialien reicht weit zurück. Silber war schon sehr frühzeitig bekannt (5000 v. Chr.). Als meistgefördertes und meistgebrauchtes Edelmetall wird es in vielen verschiedenen Bereichen eingesetzt. In der Zahnmedizin wurde Silber erstmals Anfang des 19. Jahrhunderts in Verbindung mit Porzellan zur Rekonstruktion zerstörter Zähne benutzt.

Das chemische Element Silber mit dem Symbol Ag (Argentum) wird charakterisiert durch ein Atomgewicht von 107,8 und einen Schmelzpunkt von 961 °C. Es ist ein weißes, sehr dehnbares Metall, und wird zur Steigerung der Festigkeit häufig mit Kupfer legiert. Wegen seiner starken Neigung sich mit Schwefelwasserstoff zu schwarzem Schwefelsilber zu verbinden, ist es nicht mundbeständig [39,75,80].

In der Zahnheilkunde wird es zur Herstellung von Amalgamen und Wurzelstiften verwandt. Obwohl Amalgam, eine der bekanntesten Silberlegierungen, bereits seit dem Mittelalter existiert, fand es erst Mitte des 19. Jahrhunderts Anwendung. Es war eine 1833 von dem Franzosen Crawcour entwickelte Form des Amalgams, welches aus Silberabfällen der Münzherstellung und Quecksilber bestand. Durch mechanische Beanspruchung der Amalgamfüllung kommt es zu Korrosion, Volumenveränderungen und Schwarzfärbung durch die Ausfällung von Silber. Akzeptable Qualitätsstandards gibt es seit der ADA-Spezifikation Nr. 1 von 1960, die einen Silbergehalt von mindestens 65% festlegt, doch die Verträglichkeit hinsichtlich des Quecksilbergehalts sind weiterhin umstritten [71,78]. Durch weitere Forschung kam man zu der Erkenntnis, daß das Silber einen toxischen Einfluß auf Bakterien hat. Es wirkt stark antiseptisch, da die in der Oxidschicht der Metalloberfläche enthaltenen Silberionen in den Mikroorganismen eine blockierende Wirkung auf die Thiol-Enzyme ausüben. Besonders Silberionen sind stark fungizid und bakterizid [78].

1.4 Biokompatibilität

Per definitionem beschreibt die Biokompatibilität die Eigenschaft eines Werkstoffes mit Hilfe von Proteinen und Zellen Gewebeverträglichkeit zu erreichen [39]. Definiertes Ziel ist es, das biologische Gewebe durch exakt beschriebene Material- und Oberflächeneigenschaften in seiner Funktion zu beeinflussen. Die dauerhafte Integration eines Implantates im Körper ist sowohl von dem Gesundheitszustand des Patienten und dem Verlauf der Operation als auch von der Biokompatibilität abhängig. Diese steht in Abhängigkeit zu der Adsorption der Zellen an der Werkstoffoberfläche und der Reaktion des Organismus auf diese [41,99].

1.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Zytotoxizität verschiedener Silber-Titan-Legierungen mit unterschiedlichen Silberanteilen zu ermitteln.

Andere Studien hatten bereits einen zytotoxischen Effekt von Titanhartstoffschichten auf Zellkulturebene ausgeschlossen. Es sollte der Einfluß verschiedener Silberkonzentrationen auf die Proliferation und die Stoffwechselaktivität unterschiedlicher Zelllinien gezeigt und untersucht werden, ob die bakterio-statische Wirksamkeit mit der Zytotoxizität von Silber korreliert ist. Hierfür wurden in Hinblick auf die Anwendung als Implantatwerkstoff Osteoblasten als Modellsystem gewählt. Um die Ergebnisse und Vermutungen zu unterstreichen und die Wirkung im Bezug auf das Einsatzgebiet der Katheter zu beleuchten, wurde der gleiche Versuch mit Epithelzellen durchgeführt.

Mit standardisierten Untersuchungsmethoden sollte die Reaktion der Zellen mittels der Parameter Proliferationsrate, Vitalität, Bildung von alkalischer Phosphatase und Biomasse auf die verschiedenen Silberkonzentrationen vergleichend dargestellt werden.

2 Material und Methode

2.1 Prüfkörper

2.1.1 Form

Die Prüfkörper sind Rundproben bestehend aus Titan- Grade 2 als Grundmaterial mit einem Durchmesser von 15,5 mm und einer Höhe von 0,1 cm (passend für die Zellkulturplatten mit 24 wells) und versehen mit einer randständigen Bohrung. An der Rückseite wurden diese mit einer Ritzmarkierung in X- Form gekennzeichnet.

2.1.2 Herstellung

In einem Hochvakuumlaborsystem, der sogenannten PVD (physical vapor deposition)- Anlage, wurde die Oberfläche der Proben mit verschiedenen Silberkonzentrationen modifiziert. Dieses Gerät (PVD- Anlage Balzers PLS 570) bedient sich der Kathodenzerstäubung, auch "sputtern" genannt. Hierbei wird die Oberfläche eines festen Targetmaterials (Kathode) durch hoch energetische, positiv geladene Ionen eines durch Glimmentladung erzeugten Plasmas abgetragen. Die herausgeschlagenen Atome bewegen sich in Richtung auf das gegenüberliegende Substrat zu und kondensieren dort. Die Gasentladung erfolgt in einem Gasmedium, meist Argon, bei einem Druck zwischen 0,1- 1 Pa durch Anlegen einer Hochfrequenzwechselfeldspannung (HF) oder einer hohen Gleichspannung (DC) [22,77]. Beim PVD-Verfahren werden ionisierte Teilchen durch Steuerung des elektrischen Feldes und der anliegenden Spannung unterschiedlich stark auf das Substrat aufgebracht. Somit kann ein unterschiedlicher Gehalt von ionisierten Plasmen auf dem Empfängermaterial erreicht werden. Diese Vakuumverdampfung besitzt die höchste Abscheidrate (bis zu 20 $\mu\text{l/s}$), eine große Verdampferfläche (bis 0,3 m^2) und erzeugt dünne Schichten. Weitere Vorteile des Hochvakuumlaborsystems sind die hohe Umweltverträglichkeit und die große Vielfalt abscheidbarer Schichtmaterialien (Metall, Metalllegierungen,

Verbindungen, metastabile Gradientenschicht) [74]. Vor Beginn des Sputterprozesses wurden die Probenoberflächen grobmechanisch in Extran gereinigt, 15 min in Extran und 15 min in Isopropanol Ultraschall behandelt, sowie bei einem Druck von ca. $6,4 \times 10^{-1}$ Pa einer Argon-Plasmareinigung unterzogen. Sputter-Prozess-Quellen waren HF-Magnetron mit Silber-Target und magnetgesteuerter Lichtbogen ARC[®] mit Titan-Target.

Man erhielt Plättchen mit 0,7%-, 1%-, 3%-, 4%-, 5%-, 7,5%-, 9%-, 18%-, 20%igem Silberanteil der aufgesputterten TiAg-Legierung. Daneben wurden auch einige Plättchen als Positivkontrolle mit 100% Silber beschichtet.

2.1.3 Reinigung und Vorbereitung

Um mit den Prüfkörpern arbeiten zu können, wurden sie für den Versuch einem spezifischen Reinigungs- und Sterilisationsvorgang unterzogen. Zunächst wurden die Plättchen mit einer Kunststoffpinzette an einer Aufhängevorrichtung befestigt und berührungsfrei in ein Becherglas eingelegt. Anschließend erfolgte die Waschprozedur.

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
1 x 10 min	in Reinstwasser bei 40 °C im Ultraschallbad
20 min	Autoklavieren bei 121 °C

2.1.4 Oberflächencharakteristik

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie (Zeiss DSM 940, Zeiss, Oberkochen) wurde die Struktur der aufgesputterten Oberfläche der Prüfkörper in Augenschein genommen.

Mit einer Beschleunigungsspannung zwischen 1 und 30 kV und einer maximal 50.000 fachen Vergrößerung wurden die Präparate analysiert und repräsentative Photographien in verschiedenen Vergrößerungen hergestellt. Zum Vergleich der Oberflächen mit und ohne Zellen, wurden auch Prüfkörper mit Osteoblasten bzw. mit Epithelzellen bewachsen mikroskopiert, um zu zeigen, wie die Zellen auf der PVD- beschichteten Oberfläche anwachsen.

2.1.5 Polystyrol als Referenzmaterial

Als Negativkontrolle wurde das Zellkultur-Polystyrol (Firma Nunc A/S Denmark) benutzt. Diese Referenzoberfläche wurde direkt als Zellkulturplatte 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 nach VA EZM ChemBio 964802

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 für Osteoblasten

Dulbecco's MEM / NUT MIX F-12 (HAM) (500 ml) mit L-Glutamin, 15 MM Hapes, Pyridoxine; Fa. Invitrogen GmbH 55,0 ml entnehmen

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

150 mg Genitacin G-418 Sulphate, Fa. Invitrogen GmbH

das Genitacin in Penicillin-Streptomycin lösen und steril filtriert zugeben
50,0 ml Foetal Bovine Serum (FCS), EU approved origin (South Amerika), Myco-
plasma und virus screened, performance tested, Fa. Invitrogen GmbH; (inaktiviert
durch inkubieren 30 min bei 56°C) zupipettieren
nach erster Subkultivierung in kleinen Kulturflaschen wird die Zellkultur auf
Mycoplasmenbefall untersucht
belastete Zellkulturen werden verworfen


DMEM- Kulturmedium für Epithelzellen

Dulbecco´s Mod Eagle Medium (500ml) mit 0,11 g/l Na Pyr, mit Pyridoxine, Fa.
Invitrogen GmbH 60,0 ml entnehmen
5,0 ml Penicillin-Streptomycin 10.000 IU/l -10.000 IU/ml, Fa. Invitrogen GmbH
5,0 ml Hapes Buffer (Solution 1M), Fa. Invitrogen GmbH
50,0 ml Foetal Bovine Serum (FCS), EU approved origin (South Amerika),
Mycoplasma und virus screened, performance tested, Fa. Invitrogen GmbH;
(inaktiviert durch inkubieren 30 min bei 56 °C) zupipettieren
nach erster Subklutivierung in kleinen Kulturflaschen wird die Zellkultur auf
Mycoplasmenbefall untersucht
belastete Zellkulturen werden verworfen

Accutase

zum schonenden Ablösen von Zellkulturoberflächen
PAA Laboratories GmbH

Proliferations- Reagent WST-1(FA Boehringer, Mannheim)

Farbstoff WST-1 (4-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolium^a1,3
Benzendisulfonat)

Waschpuffer zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase

150 mM NaCl = 8,766 g/l

1 mM Tris (Trishydroxymethylaminomethan) = 0,1211 g/l

pH 7,4

Lysepuffer zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase

0,75 M 2-Amino-2methyl-1-Propanol = 7,19 g/ 100 ml

2 mg/ml p-Nitrophenylphosphat

pH 10,3

Puffer für Standards zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase

100 mM Glyzin = 7,507 g/l

1 mM ZnCl₂ = 0,13639 g/l

1 mM MgCl₂ = 0,2033 g/l

pH 9,6

Proteinbestimmung

DC Protein Assay (Fa. Bio- Rad)

20% NaOH (Fa. Merck)

20% HCl (Fa. Merck)

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

2.3.1 Osteoblastenzelllinie hFOB 1.19

Mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. Thomas Spelsberg, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota wurde uns die Osteoblastenzelllinie hFOB 1.19 zur Verfügung gestellt. Erstmals beschrieben wurde sie von Steven A. Harris 1995 [29,30]. Diese Zelllinie ist ein Klon humaner, fetaler Osteoblasten, der durch eine temperaturempfindliche Mutante des SV-40 large T Antigens (tsA58) konditionell immortalisiert wurde. Das large T Antigen forciert bei der sogenannten permissiven Temperatur von 33,5 °C eine hohe Zellteilungsrate [7,8,34,35]. Die Differenzierungsleistung der Osteoblasten mit hoher alkalischer Phosphatasereaktion und anschließender Kalzifizierung der extrazellulären Matrix bleibt erhalten [76]. Bei der sogenannten restriktiven Temperatur von 39,5 °C hingegen wird das Antigen inaktiviert und somit die terminale Differenzierung der hFOB 1.19 - Osteoblasten eingeleitet. Für eine stetige Kultivierung *in vitro* eignet sich Osteoblastenzelllinie hFOB 1.19 sehr gut. Die Zellkultivierung erfolgte bei der permissiven Temperatur von 34 °C unter einer 5%igen CO₂- Begasung. Als Kulturmedium wurde ein Gemisch aus Dulbecco's MEM / NUT MIX F-12 (HAM) verwendet. (genaue Maßangaben siehe Punkt 2.2)

2.3.2 Epithelzelllinie

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um bronchiale Epithelzellen, die auch als HBE 16 bezeichnet werden. Sie wurde gemeinsam mit anderen Epithelzellen des Respirationstraktes (A 549 - eine alveolar typ 2 Zelllinie; 9 HTE₀ - tracheale Epithelzelllinie; Calu 3 - eine aus Lungenkarzinom-Zellen entnommenen pleurale Zelllinie) schon in einigen Studien getestet [24,46,89]. Die Zelllinie HBE 16 wurde aus einem gesunden bronchialen Tubusteilstück entnommen.

Humane bronchiale Epithelzellen sind bekannt dafür, daß sie entzündliche Zytokine wie TNF α (Tumornekrosefaktor alpha) und Interleukin 4 exprimieren, welche vielleicht eine Rolle bei der Immunantwort von Lungenkrankheiten

spielen [38]. In Studien mit Bakterien, z.B. *Porphyromonas aeruginosa*, wurde die antimikrobielle Eigenschaft von HBE- 16 Zellen untersucht und dabei festgestellt daß unter dem Einfluß dieser Zellen die bakterielle Proliferationsrate sinkt [5,31].. Der antientzündliche TGF β (transforming-growth-factor- β) spielt bei der Reparatur eine wichtige Rolle, jedoch sind die regulatorischen Mechanismen bei der Produktion bestimmter Zytokine weitgehend unklar.

Die Zellkultivierung erfolgt bei der permissiven Temperatur von 37 °C unter einer 5%igen CO₂- Begasung. Als Kulturmedium wurde DULBECCO`S MOD EAGLE MEDIUM (500ml) verwendet. (genaue Maßangaben siehe Punkt 2.2)

2.4 Zellkultivierung

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte bei einer Temperatur von 34 °C bzw. 37°C in 75 cm² großen Zellkulturflaschen (Falcon, Heidelberg) mit dem jeweils entsprechendem Medium. Für die nachfolgenden Versuchsansätze wurden Zellsuspensionen von 50.000 Zellen/ml benötigt. Hierzu wurde das entsprechende Medium in der Zellkulturflasche mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette abgezogen und die adhärennten Zellen zweimal mit je 10 ml PBS- Puffer gespült. Daran anschließend wurden die Zellen nach einer Inkubationszeit von 5 min mit Accutase abgelöst. Um die Wirkung von Accutase aufzuheben, wurden nun 10 ml entsprechendes Medium hinzupipettiert. Die so gewonnene Zellsuspension wurde homogenisiert und eine Zellzählung durchgeführt.

Um die gewünschten 50000 Zellen/ml zu erreichen, wurde eine Verdünnung mit dem entsprechenden Medium durchgeführt. Nach einer erneuten Zellzählung wurde je 1ml der Zellsuspension auf die Wells mit den entsprechenden Prüfkörpern verteilt.

2.5 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 das Volumen ermitteln kann.

2.6 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte ab Tag 3 nach Zellaussaat und wurde im Anschluß jeden zweiten Tag der 14tägigen Meßreihe wiederholt.

Zunächst wurde das Medium abgezogen und die Zellschicht mit je 1 ml PBS-Puffer 2 x gewaschen. Anschließend wurden 500 µl Accutase zupipettiert und nach 7 min Inkubationszeit 500 µl Medium zum Stoppen der Reaktion dazugegeben. Nach 10 maligem Aufziehen der Suspension zur Durchmischung wurden 100 µl in 10 ml isotonische Lösung gegeben und im Zellzähler gemessen.

2.7 WST-1 Zellvitalitätstest

Dieser Versuch beruht auf der Umsetzung des Farbstoffes WST-1 (4-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolium^a1,3-Benzendisulphonat) 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 beziehungsweise desto höher ist die Extinktion. Diese ist proportional der Stoffwechselaktivität der Zellen.

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 entsprechendes Medium und 50 µl WST-1-Reagenz genau zupipettiert und bei 34 °C bzw. 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 die Konzentration im ELISA-Reader bei 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 entsprechendem Medium und 50 µl des Proliferations- Reagents WST-1.

2.8 Bestimmung der alkalischen Phosphatase

Grundprinzip dieser Methode ist es, die Differenzierungsleistung der Zellen zu untersuchen. Die genaue Funktion der alkalischen Phosphatase bei der Osteogenese ist letztlich unklar, jedoch zeigt sie als erstes Leitenzym in der Osteoblastendifferenzierung den Übertritt von der rein proliferativen Phase hin zur Differenzierungsphase.

Die alkalische Phosphatase erhöht durch ihre Aktivität die lokale Konzentration an organischem Phosphat in der Region kalzifizierenden Gewebes. Gleichzeitig fördert sie durch Dephosphorylierung die Aktivität extrazellulärer Proteine. Die alkalische Phosphatase setzt dabei zugeführtes p-Nitrophenylphosphat zu p-Nitrophenol um. Der sich daraus ergebende Farbumschlag ist bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch im ELISA- Reader (Fa. Tecan, Crailsheim) meßbar.

Bei der Durchführung dieses Versuchs wird nach Abziehen des Mediums jede Kavität der 24 Well Platte mit je 1 ml Waschpuffer gesäubert.

Anschließend werden je 500 µl Lysierungspuffer zupipettiert. Nach einer Stunde bei 37 °C Inkubationszeit auf dem Elisa- Titerplattenschüttler (GLW, Würzburg) wurden je 500 µl 50 mM NaOH zupipettiert und durch mehrfaches Aufziehen mit der Eppendorfpipette durchmischt. Der gesamte Inhalt jedes einzelnen Wells wird jetzt in je ein Eppendorfreaktiongefäß überführt und 5 min zentrifugiert. Daran anschließend wird zur Doppelbestimmung je 2 x 200 µl des Zentrifugats in 2 Wells einer 96 Well Platte pipettiert und die alkalische Phosphatase anhand einer Eichkurve im Elisa- Reader bei 405 nm ermittelt.

Die Eichkurve setzt sich aus folgenden Konzentrationen zusammen:

1 mM Stammlösung = 1000 µmol Stammlösung

10 µmol; 20 µmol; 40 µmol; 80 µmol; 120 µmol; 160 µmol; 200 µmol

Als Leerwert wurde ein 1:1 Gemisch aus Lysierungspuffer und 50 mM NaOH benutzt.

2.9 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford ist ein weiterer Parameter zur Bestimmung der Zytotoxizität. Inhalt dieser Methodik ist die Bewertung der Gesamtbio­masse. Je höher die Biomasse ist, desto weniger zytotoxisch ist das Material. Der Farbstoff Coomassie blau G interagiert mit dem Zellprotein und das Reaktionsprodukt, welches sich in einem Farbausschlag äußert wird im Photometer bei einer Wellenlänge von 750 nm bestimmt. Um falsch positive Werte der Testoberflächen auszuschließen, wurden von allen Materialien Leerwerte ermittelt.

Bei diesem Versuch wurde zuerst eine Zellyse durchgeführt. Jede Vertiefung der 24 Well Zellkulturschale wurde mit 50.000 Zellen/ml a 1,0 ml ausgesät und bei 37°C und 5%igem CO₂ Partialdruck mit entsprechendem Medium inkubiert. Nach Abzug des Mediums mittels steriler Pasteurpipette und dreimaligem Waschen mit je 1,0 ml PBS-Puffer wurde der gesamte Versuchsansatz mit 300 µl PBS-Puffer überschichtet. Danach wurden je 30 µl 20%iges NaOH zur Zellyse hinzugeben, die Zellkulturplatte mit selbstklebender Folie (MT- Folie) versiegelt und für eine Stunde bei 80 °C inkubiert. Nach einer Abkühlzeit von 10 min wurden je 30 µl 20%iges HCl hinzupipettiert und gemischt.

Für die Proteinbestimmung wurde zunächst das Arbeitsreagenz aus 20 µl Reagenz S zu je 1,0 ml Reagenz A hergestellt. Für die Standards wurde BSA-Pulver mit 20,0 ml PBS- Puffer aufgelöst, aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Verschiedene Mischungsverhältnisse wurden 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 eingefroren.

Anschließend wurden je 20 µl des Leerwerts, bestehend aus 300 µl PBS-Puffer, 30 µl 20% NaOH und 30 µl 20% HCl, in je eine Kavität einer 24 Well Platte pipettiert, je 20 µl der Standards in je eine Kavität einer 24 Well Platte pipettiert und je 20 µl der Proben (siehe Zelllyse) 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 mußte danach 15 Minuten reagieren. Zur Bestimmung im Elisa-Reader wurden jetzt 1 mal 200 µl des Leerwerts in eine Kavität einer 96 Well Platte und 1 mal 200 µl eines jeden Standards in eine Kavität einer 96 Wellplatte überpipettiert. Zur Doppelbestimmung der Proben wurden je 2 mal 200 µl des Gemisches in eine 96 Well Platte pipettiert. Anschließend wurde diese 96 Well Platte bei einer Wellenlänge von 750 nm photometrisch gemessen und danach mittels Harvard Graphics graphisch dargestellt.

2.10 Testalgorithmus und Plattenbelegung

Durchgeführt wurden der WST-1- Zellvitalitätstest, die Bestimmung der alkalischen Phosphatase und die Proteinbestimmung nach Bradford, sowie die Ermittlung der Zellzahl.

Jede Meßreihe wurde über einen 14-tägigen Zeitraum kultiviert und die erste Messung nach 3 Tagen vorgenommen, folgende Messungen wurden alle 2 Tage durchgeführt.

Während der Inkubationszeit wurde jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel vorgenommen. Die gesamte Testserie wurde in 24-well Zellkulturplatten angelegt. Sofern nicht anders angegeben wurden je 4 Oberflächen pro % Silberanteil verwendet.

Für das erste Screening und damit der Bestimmung der Zellzahl und des WST-1-Zellvitalitätstestes, wurde die gesamte Anzahl an Prüfkörpern auf so viele 24-well-Platten verteilt, daß jeweils 16 Kavitäten der einzelnen 24-well-Platten mit den Prüfkörpern belegt waren und 4 Kavitäten ohne Belegung Polystyrolkontrollreferenz eingesetzt wurden. An jedem Meßtag wurden demnach 3 Platten untersucht. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden dann die anderen oben genannten Messungen durchgeführt, hier jedoch, aufgrund der Ergebnisse der ersten Meßreihe nur noch mit ausgewählten Oberflächen. Schließlich wurde der WST-1-Test und die Proteinbestimmung nach Bradford noch mit der zweiten Zelllinie (Epithelzellen HBE 16) durchgeführt. Als Unterschied zur vorangegangenen Meßreihe wurde hier kein kompletter Mediumwechsel sondern nur eine Mediumzugabe (Tag 3 100 µl, Tag 7 und Tag 10 200 µl) vorgenommen, um sicher zu gehen, daß beim Mediumwechsel keine Zellen verloren gehen.

Zur Sicherstellung der Ergebnisse aus den vorangegangenen Untersuchungen und zum direkten Vergleich zwischen einer mittleren Silber-Titan-Legierung (7,5% Silberanteil), reinem Silber auf Titan und Titan auf Titan wurde eine letzte Meßreihe mit Osteoblasten als Hauptzelllinie dieser Arbeit durchgeführt. Dabei wurde auch hier auf einen kompletten Mediumwechsel verzichtet und es erfolgte eine Mediumzugabe von 100 µl pro Well.

2.11 Statistik

Für alle Meßwerte wurden für die beiden Zelllinien hFOB 1.19 und 16 HBE die Mittelwerte berechnet und zur Referenz Polystyrol angegeben. Die Standardabweichungen wurden durch Fehlerbalken dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Oberflächen und Zellwachstum

3.1.1 PVD- Beschichtung mit Silber auf Titanbasis

In der vorliegenden Arbeit wurden Prüfkörper bestehend aus Titan- Grade 2 als Grundmaterial verwendet. Mittels des PVD- Verfahrens wurden die Oberflächen der Proben mit verschiedenen Silberkonzentrationen modifiziert. (genaue Herstellung siehe 2.1.2) Um diese neuartige PVD- Beschichtung mit Silber auf Titanbasis zu veranschaulichen, wurde mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie die Struktur der aufgesputterten Oberfläche analysiert und repräsentative Photographien in verschiedenen Vergrößerungen hergestellt.

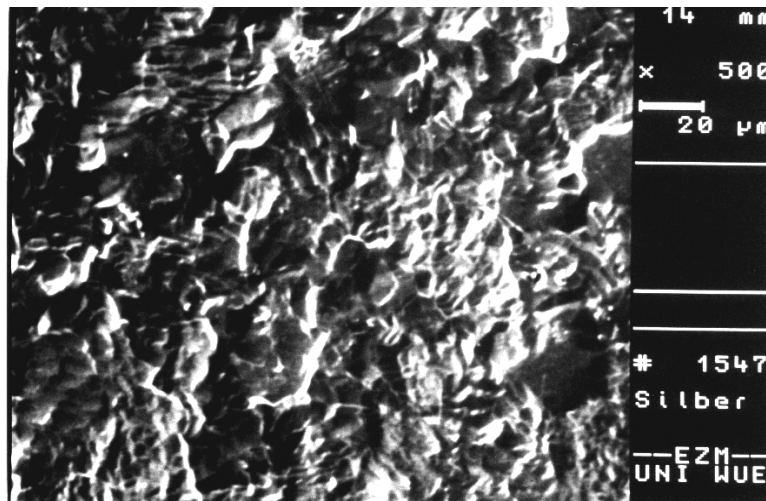


Abb. 3.1.1 REM- Aufnahme einer PVD- Beschichtung mit Silber auf Titanbasis (500 fache Vergrößerung)

3.1.2 Elektronenmikroskopische Analyse des Zellwachstums auf den Oberflächen

In dieser Arbeit kamen zwei Zelllinien zur Anwendung. Hauptsächlich wurde mit der humanen Osteoblastenzelllinie hFoB 1.19 gearbeitet, welche ein Klon humaner, fetaler Osteoblasten ist, der durch eine temperaturempfindliche Mutante des SV-40 Antigens konditionell immortalisiert wurde. Diese Zellen haben sich für die Untersuchung von Biomaterialien bewährt, da die Osteoblastendifferenzierung von der Stufe des Präosteoblasten bis zu einem reifen osteoid-mineralisierenden Osteoblasten reproduzierbar ist [16,61,64]. Ihre Kultivierung erfolgt unter einer 5%igen CO₂- Begasung bei einer Temperatur von 34°C. Abbildung 3.1.2 a zeigt die Morphologie dieser Zellen nach Kultivierung auf den unter 3.1.1 beschriebenen Oberflächen.

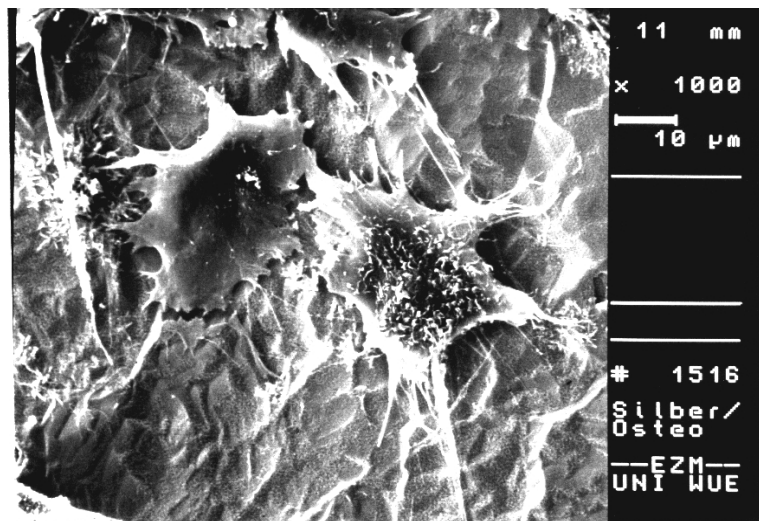


Abb. 3.1.2 a REM- Aufnahme einer PVD-Beschichtung mit Silber auf Titanbasis mit Osteoblasten (1000 fache Vergrößerung)

Die zweite verwendete Zelllinie war die bronchialen Epithelzelllinie HBE 16. Sie entstammt einem gesunden bronchialen Teilstück und wurde zusammen mit anderen Epithelzellen des Respirationstraktes schon in einigen Studien getestet [24,46,89]. In Studien mit Bakterien, z. B. *Porphorymonas aeruginosa*, wurde festgestellt, daß unter Einfluß dieser Zellen die bakterielle Proliferationsrate sinkt [5,31]. Auch die Exprimierung von entzündlichen Zytokinen ist bekannt [38]. Die bronchialen Epithelzellen wurden bei 5%iger CO₂- Begasung und einer Temperatur von 37 °C kultiviert. In Abbildung 3.1.2 b ist die Morphologie dieser Zellen nach Kultivierung auf den unter 3.1.1 beschriebenen Oberflächen gezeigt.

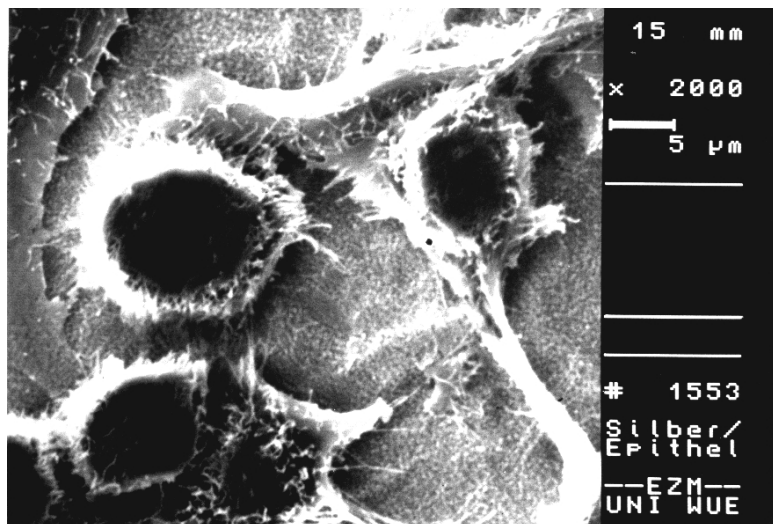


Abb. 3.1.2 b REM- Aufnahme einer PVD- Beschichtung mit Silber auf Titanbasis mit Epithelzellen (2000 fache Vergrößerung)

3.2 Meßreihe mit der Osteoblastenzelllinie hFOB 1.19

3.2.1 Bestimmung der Zellzahl

In einem ersten Versuchsansatz wurden unterschiedliche Silber-Titan-Legierungen in aufsteigender Ag-Konzentration mit humanen Osteoblastenzellen getestet. Über einen 14-tägigen Kultivierungszeitraum wurde jeden zweiten Tag die Zellzahlmessung durchgeführt. Es konnte nicht gezeigt werden, dass das Zellwachstum auf den unterschiedlichen Silber-Titan-Legierungen in Abhängigkeit zu den verschiedenen Silberkonzentrationen stand. Während sich am 3. und 5. Meßtag die Zellzahl ähnlich verhielt wie bei der Referenz Polystyrol, war an den darauffolgenden Tagen kein Trend zu erkennen. Es wurde beobachtet, dass die Zellzahl von 5% Silberanteil an den Tagen 3,7 und 9 unter der von Polystyrol lag. An den Meßtagen 5,11 und 13 lag die Zellzahl jedoch über der, der Kontrolle. Insgesamt unterlagen die Zellzahlmessungen von Osteoblastenzellen auf Silber-Titan-Prüfkörpern starken Schwankungen.

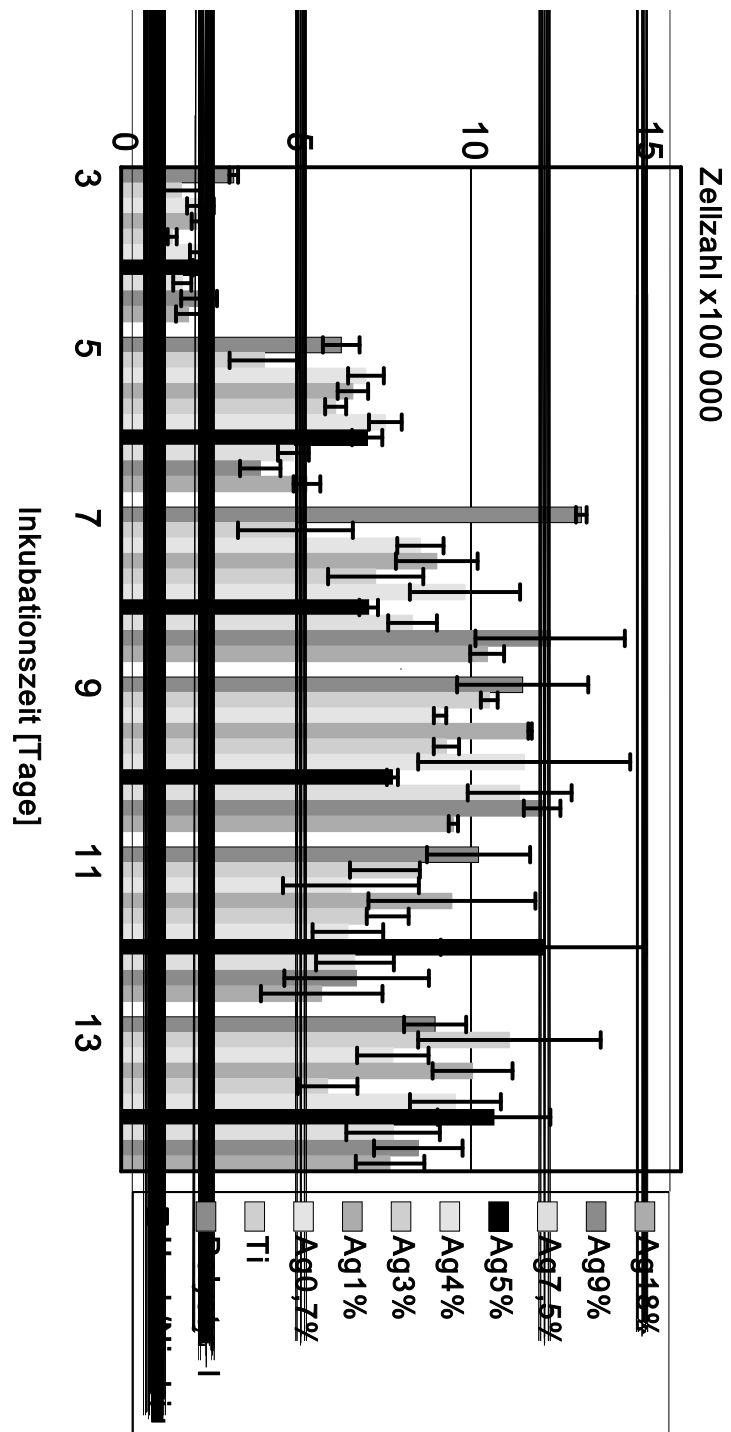


Abb.3.2.1 Zellzahlermittlung der Osteoblasten auf Silber/Titan- Prüfkörpern über 14-tägigen Kultivierungszeitraum (n= 4 pro Oberfläche)

3.2.2 Bestimmung der Zellvitalität

Auch bei der Untersuchung der Vitalität der Zellen auf den Prüfkörpern, konnten ähnliche Resultate wie bei der Zellzahlbestimmung erzielt werden. Die Aktivität der Zellen auf den verschiedenen Oberflächen schwankte auch hier sehr stark. Die unterschiedlichen Ag- Konzentrationen hatten, genauso wie oben festgestellt, keinen wesentlichen Einfluß auf die Zellvitalität. Bei der Darstellung zeigte sich mit steigender Silberkonzentration nur an Tag 9 eine Proliferationshemmung. An Meßtag 11 wurde jedoch wieder ein Zellaktivitätsanstieg auf dieser Oberfläche beobachtet. Insgesamt konnten bei Legierung mit 18%-igem Silberanteil und darunter kaum Proliferationsunterschiede festgestellt werden.

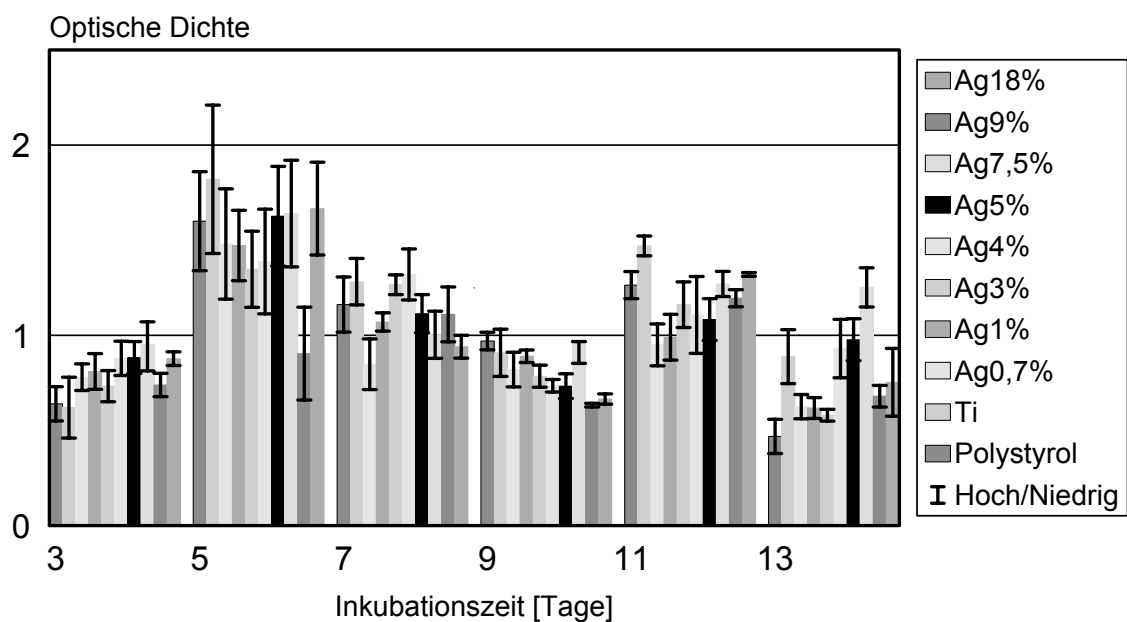


Abb.3.2.2 Zellvitalität der Osteoblasten auf Silber/Titan- Prüfkörpern über einen 14-tägigen Kultivierungszeitraum (n=4 pro Oberfläche)

3.2.3 Zellzahlermittlung und Zellvitalität mit ausgewählten Proben

In einer zweiten Versuchsreihe wurden auf ausgewählten Plättchen mit niedriger (1%iger Silberanteil), einer mittleren (7,5%iger Silberanteil) und einer hohen Silberkonzentration (20%iger Silberanteil) erneut Osteoblasten ausgesät.

Das Ergebnis für die Zellzahl und die Zellvitalität der vorangegangenen Untersuchung konnte bestätigt werden. Obwohl am Tag 7 die Zellzahl umgekehrt proportional der aufsteigenden Silberkonzentration ist, differieren an allen anderen Meßtagen die Werte sehr deutlich. Auch beim WST- Test konnte nur an Meßtag 11 eine Vitalitätseinschränkung mit steigender Silberkonzentration beobachtet werden.

Um zu überprüfen, wie sich Osteoblasten auf reinem Silber verhalten, wurden an Meßtag 5 Osteoblasten auf 100% Silber mit in die Messung einbezogen. Das Ergebnis zeigt ein halbmaximales Wachstum gegenüber Polystyrol.

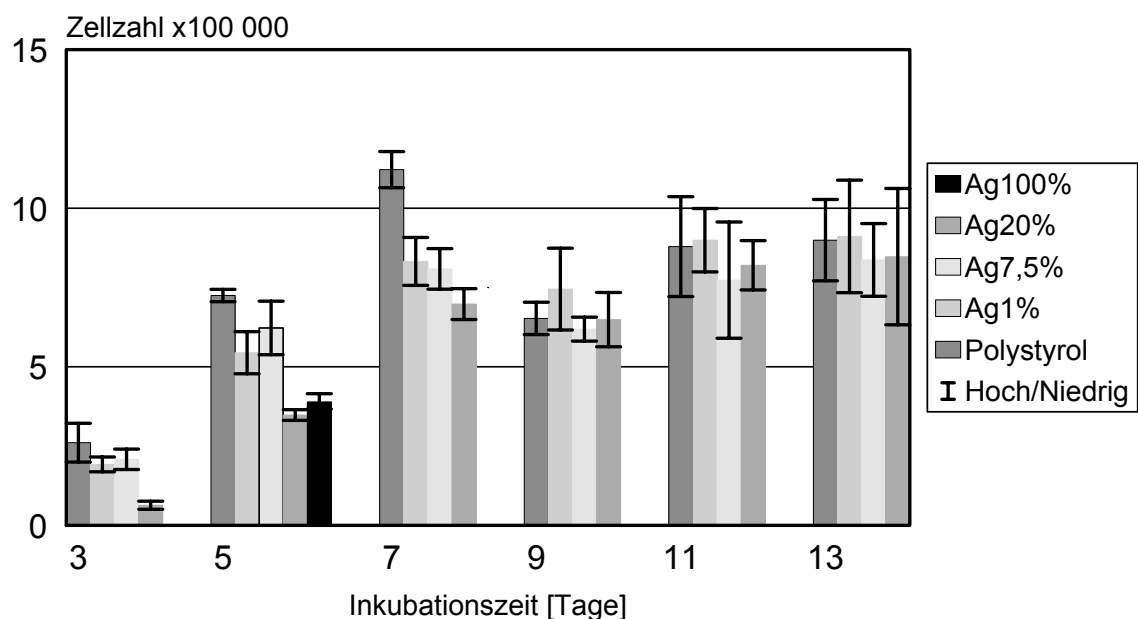


Abb.3.2.3 a Zellzahlermittlung der Osteoblasten auf ausgewählten Silber/Titan-Prüfkörpern über 14-tägigen Kultivierungszeitraum (n= 4 pro Oberfläche)
An Tag 5 Positivkontrolle mit 100% Silber zusätzlich

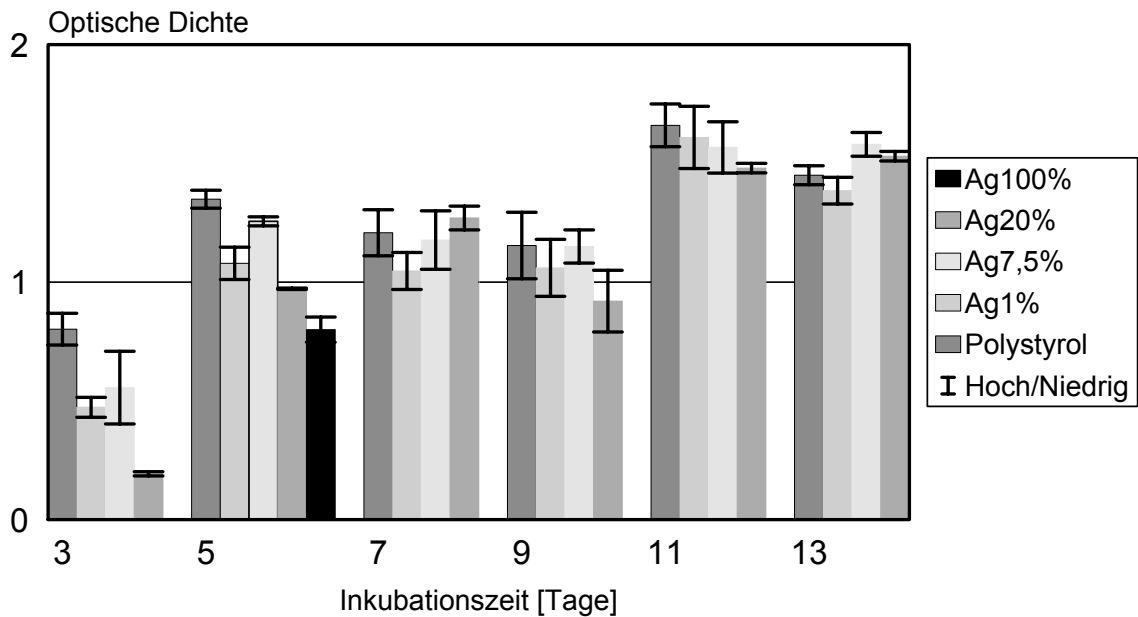


Abb.3.2.3 b Zellvitalität der Osteoblasten auf ausgewählten Silber/Titan-Prüfkörpern über 14-tägigen Kultivierungszeitraum (n= 4 pro Oberfläche)
An Tag 5 Positivkontrolle mit 100% Silber zusätzlich

3.2.4 Bestimmung der alkalischen Phosphatase

Im Vergleich werden Prüfkörper mit 1% Ag, 7,5% Ag und 20% Ag zur Bestimmung der Differenzierungsleistung mittels alkalischer Phosphatase getestet. Es zeigte sich, dass die Differenzierungsleistung der Zellen anstieg. Sie verdoppelte sich von Meßtag 5 zu Meßtag 9 mit Ausnahme von Polystyrol, und blieb, ausgenommen bei den Prüfkörpern mit 20%igem Silberanteil, welche am 13. Tag leicht zurückgingen, bis zum letzten Meßtag annähernd auf diesem Niveau. Es konnte keine Hemmung der Differenzierungsleistung beobachtet werden.

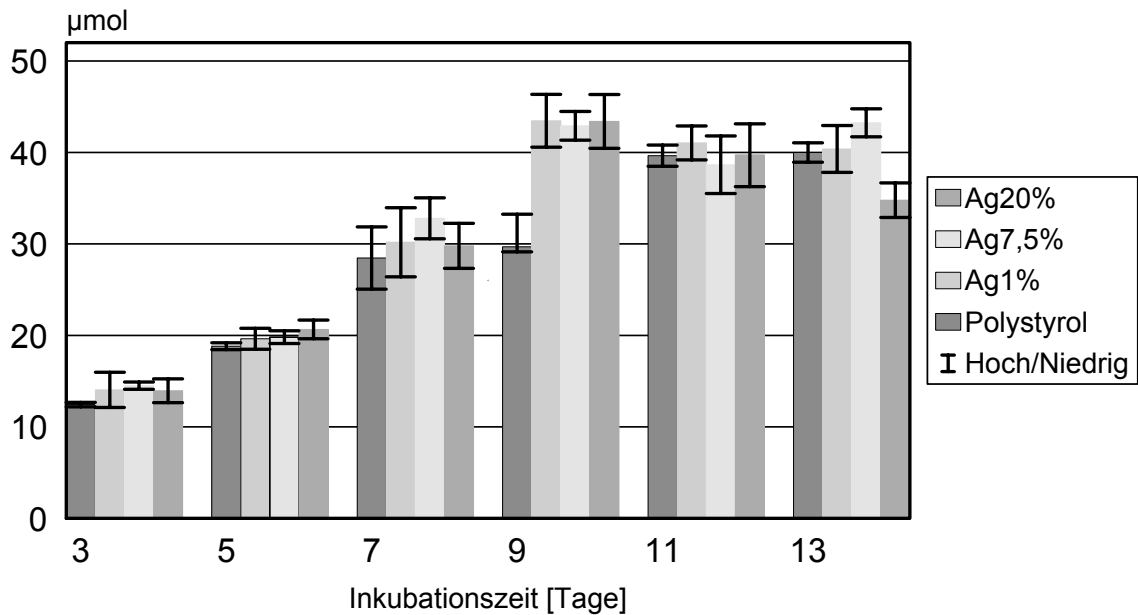


Abb.3.2.4 Spezifische Aktivität der alkalischen Phosphatase.
auf Silber/Titan-Prüfkörpern über 14-tägigen Kultivierungszeitraum
(n= 4 pro Oberfläche)

3.2.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Als weitere Methode zur Bestimmung der Zytotoxizität von Prüfkörpern wurde der Proteingehalt der Zellen mittels der Bradfordmethode bestimmt. Es konnte beobachtet werden, dass der Proteingehalt kontinuierlich anstieg. An Meßtag 7 dagegen konnte ein zelltoxischer Effekt mit steigender Silberkonzentration beobachtet werden. Im Vergleich von Tag 3 mit Tag 13 konnte ein 5-facher Anstieg der Biomasse festgestellt werden.

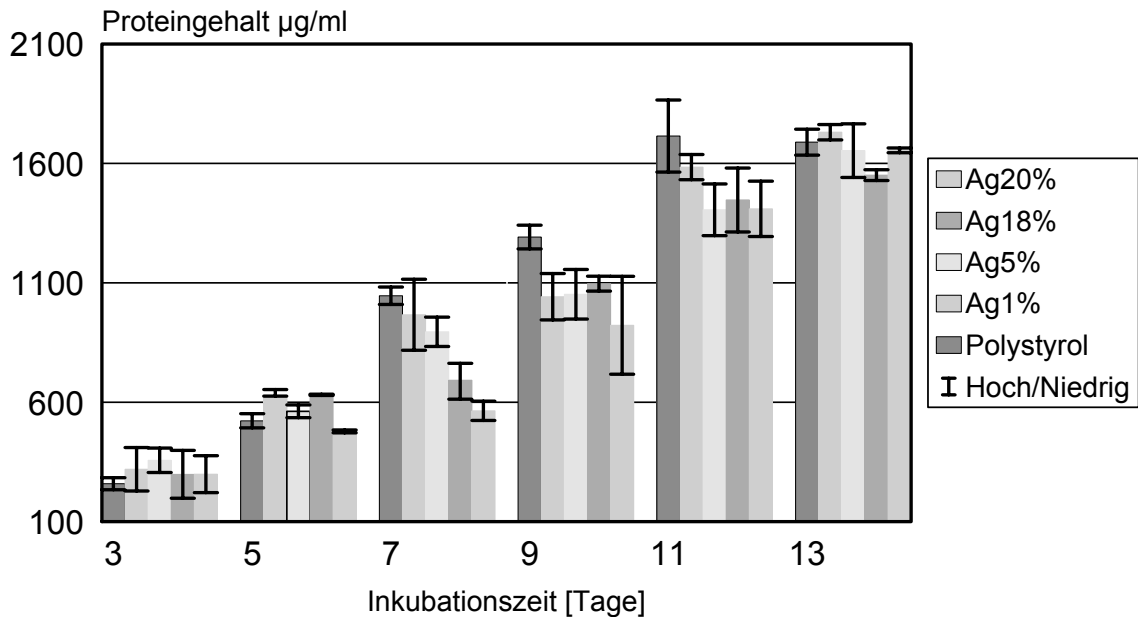


Abb.3.2.5 Proteinbestimmung der Osteoblasten auf Silber/Titan-Prüfkörpern über 14-tägigen Kultivierungszeitraum (n= 4 pro Oberfläche)

3.3 Meßreihe mit der Epithelzelllinie HBE 16

Die Zellen wurden 14 Tage kultiviert und ausgewählte Silbertitanlegierungen (3%iger -, 5%iger -, 9%-iger -, 18%iger Silberanteil) getestet. Zum Vergleich wurde reines Silber und zusätzlich Ti/Ti beschichtete Proben mit inkubiert.

Anders als bei den vorherigen Meßreihen wurde hier kein kompletter Mediumwechsel, sondern nur eine Mediumzugabe (Tag 3 100 µl, Tag 7 und Tag 10 200 µl) durchgeführt, um ein Ablösen von Zellen beim Mediumwechsel auszuschließen.

Die Ergebnisse aus den vorangegangenen Tests wurden auch hier untermauert.

3.3.1 Zellvitalitätstest

Beim WST- Test konnte an Tag 3 und 10 keine Hemmung der Vitalität durch verschiedene Silber/Titan- Legierungen (3 - 100% Silber) gezeigt werden. Die Ti/Ti- beschichteten Proben lagen an den Meßtagen 3 und 5 deutlich unter denen von Polystyrol. Eine mögliche Erklärung wäre, daß die Zellen zu dicht auf den Oberflächen lagen und sich wieder abgelöst haben.

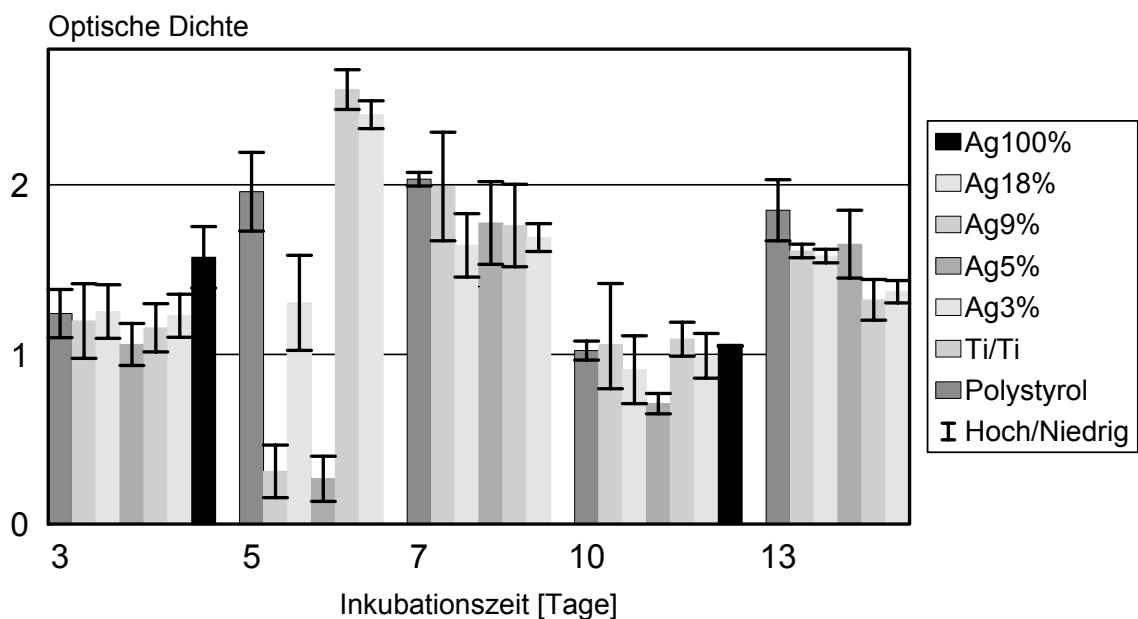


Abb.3.3.1 Zellvitalität der Epithelzellen auf Silber/Titan-Prüfkörpern über 14-tägigen Kultivierungszeitraum (n= 4 pro Oberfläche)
An Tag 5 ist eine deutliche Verminderung der Zellen auf Ti/Ti und Ag 5% zu beobachten.

3.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Auch bei diesem Versuch hatten die verschiedenen Silberkonzentrationen keinen Einfluß auf die Biomasse. Obwohl die Werte der Plättchen mit 100%igem Silberanteil am Meßtag 3 und 10 deutlich unter den anderen lagen, waren die Abweichungen der einzelnen Proben untereinander nicht proportional den unterschiedlichen Silberkonzentrationen.

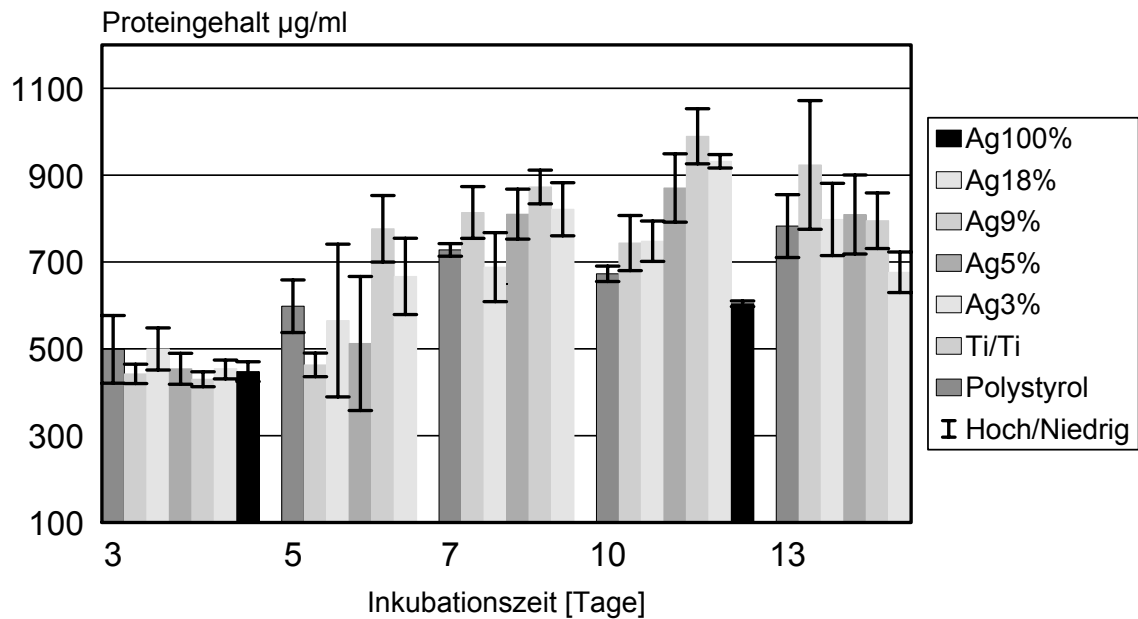


Abb. 3.3.2 Proteinbestimmung der Epithelzellen über 14-tägigen Kultivierungszeitraum (n= 4 pro Oberfläche)

3.4 Abschlußmessung

Zur Verifizierung der ersten Ergebnisse wurde erneut eine Messung mit Osteoblasten durchgeführt. WST-Test und Bradfordmethode wurde an zwei Tagen (Tag 3 und Tag 7), mit den Konzentrationen 7,5%iger Silberanteil, 100%iger Silberanteil und Ti/Ti getestet, wobei auch hier während der Inkubationszeit kein kompletter Mediumwechsel sondern nur eine Mediumzugabe von 100 μl am Meßtag 3 vorgenommen wurde.

Das Resultat zeigte sowohl bei der Bradfordmethode als auch beim Vitalitätstest am 1. Meßtag (Tag 3) eine Proliferationshemmung von Ti/Ti bis hin zu den Plättchen mit 100%igem Silberanteil, am 2. Meßtag (Tag 7) jedoch einen Anstieg der Werte, wobei Ti/Ti rapide und 7,5% Ag sowie 100% Ag verzögert wachsen.

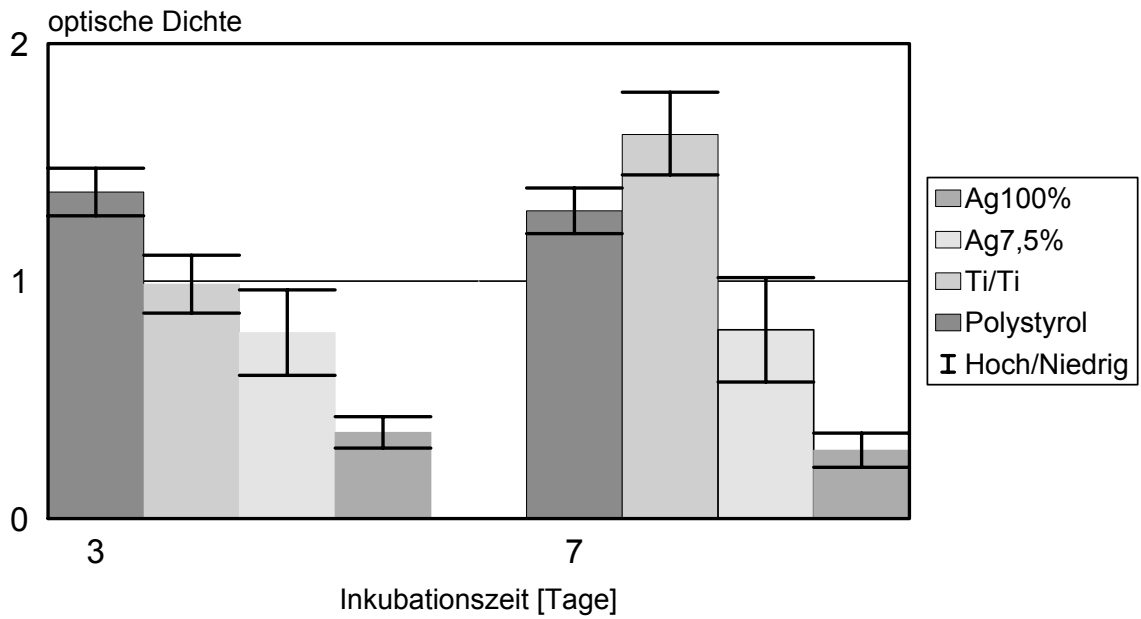


Abb. 3.4 a Zellvitalität der Osteoblasten (n= 4 pro Oberfläche)

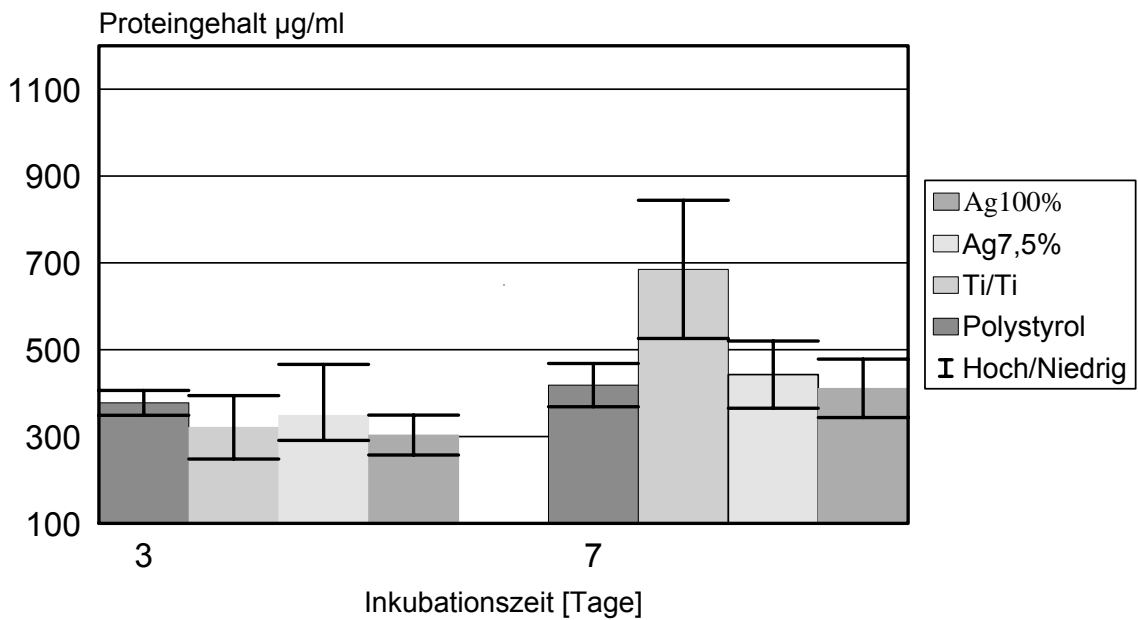


Abb. 3.4 b Proteinbestimmung der Osteoblasten (n= 4 pro Oberfläche)

Ergebnisse

Insgesamt zeigten die unterschiedlichen Ag- Konzentrationen keine zytotoxische Wirksamkeit. Die Silberanteile der Beschichtung wurden von den getesteten Zelllinien weitgehend toleriert. Die Zellproliferation, die Zellaktivität und die Biomasse sind zu den verschiedenen Silberkonzentrationen nicht umgekehrt proportional.

4 Diskussion

Für die Zulassung eines Implantates als medizinisches Produkt wird es nach bestimmten Vorschriften (EM- Richtlinie 93/42 EWG) geprüft und nach einer DIN-Norm (DIN EN ISO 10993) biologisch bewertet [15,35,60]. Der Zytotoxizitätsausschluß mit Zellkulturen stellt die Basis dieses hierarchischen Testkonzepts dar, zu welchem Testverfahren für Zytotoxizität (Zellkultur), Mutagenität (z.B. AMES-Test), Sensibilisierung (Hamster- Versuch) und Langzeit-Implantationsstudien (Versuche mit Ratten; < 90 Tage in situ) gehören. Man versucht eine Aussage über die biologische Wirkung eines Materials am Implantatort, dem Knochen, zu treffen [66,87]. Dies kann man über den Agardiffusionstest mit Fibroblastenzelllinien durchführen, wobei hier die Schwierigkeit in der Umsetzung und Quantifizierung der Ergebnisse aufgrund der hohen Standardabweichungen im Einzelversuch liegt, oder alternativ das Zellwachstum mittels eines Proliferationstestes beurteilen [15,62]. Hierzu werden komplex geformte Testkörper mit Nährmedium und Zellen versehen, nach einer Inkubationszeit das Zellwachstum bestimmt und anschließend können Aussagen über kurzfristig auftretende zytotoxische Substanzen getroffen werden.

Das Produkt darf die Sicherheit und die Gesundheit des Patienten und der Anwender nicht gefährden. Entsprechend der DIN- Norm wird für die Tests ein dem Zielgewebe angepaßtes Zellkultursystem erlaubt, obwohl die Möglichkeiten, das Verhalten eines Materials im Zielgewebe vorherzusagen, begrenzt sind [18,36].

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von unterschiedlichen Silberkonzentrationen auf einer Titanbasis mittels standardisierter Zellkultursysteme.

Hierfür wurde mit Hilfe von standardisierten Untersuchungsmethoden die

Wirkung des Biomaterials auf die Proliferations- und Differenzierungsleistung der humanen Osteoblastenzelllinie hFOB 1.19 untersucht. Außerdem wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase und die Biomassebestimmung vorgenommen. Anhand von genau definierten Silberkonzentrationen, die auf die Titanbasis mittels der PVD-Hartstoffbeschichtung aufgetragen wurden, sollte die Zytotoxizität von Silber in Verbindung mit den humanen Osteoblasten getestet werden. Um die Ergebnisse und Vermutungen zu untermauern, wurde in einer zweiten Messreihe der gleiche Versuch mit der bronchialen Epithelzelllinie HBE 16 durchgeführt.

Daß Titan und seine Legierungen eine gute Biokompatibilität, Korrosionsbeständigkeit, Osseointegration und hervorragende mechanische Eigenschaften besitzt, ist bekannt und konnte in mehrere Studien gezeigt werden [11,12, 21,108]. Nachdem das Metall auf die Verträglichkeit zu Osteoblasten und deren Differenzierung in Abhängigkeit von unterschiedlichen Implantatwerkstoffen getestet, sowie die Auswirkung der Rauigkeitstiefe der Oberfläche auf das Wachstum der Zellen untersucht wurde, hat es sich als Implantat im Knochenkontakt bewährt [6,17,61,67,72,108].

Die vorliegende experimentelle Studie beschäftigt sich mit Silber-Titan beschichteten Oberflächen unterschiedlicher Silberkonzentrationen und deren Wechselwirkung mit knochenbildenden Osteoblasten.

Hierfür hat sich bereits die Osteoblastenzelllinie hFOB 1.19, ein, durch eine temperaturempfindliche Mutante des SV-40 large T- Antigens, konditionell immortalisierter Klon humaner fetaler Osteoblasten, für normgerechte Prüfungen von Biomaterialien bewährt [13,30,34,98]. Diese Zelllinie ist besonders unempfindlich gegen externe Proliferationssignale. Die Osteoblastendifferenzierung ist von der Stufe des Präosteoblasten bis zu einem reifen Osteoid-mineralisierenden Osteoblasten genau reproduzierbar [16,61,64]. Somit kann eine Aussage

über die Biokompatibilität im Bezug zum verwendeten Material gemacht werden [100,101]. Osteoblasten in Kontakt mit Titanoberflächen zeigen hohe Proliferations- und Differenzierungsleistungen [61,80,81,86]. Eine erfolgreiche Osseointegration, das heißt die morphologisch nachweisbare direkte funktionelle und strukturelle Verbindung zwischen dem organisierten vitalem Knochengewebe und der Oberfläche eines belasteten Implantates, ist jedoch von der Art des Werkstoffes und dessen Oberflächentopographie abhängig [64,80,81,86]. Die wiederum maßgeblichen Einfluß auf die Ausrichtung der Zellen und die Organisation des Zytoskelettes nimmt. Zum Abgrenzen des Effekts der mechanischen Oberflächengestaltung auf das Differenzierungsverhalten der Osteoblasten wurde in Studien mit unterschiedlichen Metallen und glatten sowie rauhen Oberflächen festgestellt, daß bei glatten Oberflächen zwar zu Beginn eine höhere Proliferation feststellbar war, später jedoch auf den rauhen Materialien im Gesamten betrachtet in vitro mehr Zellen vorhanden waren [35,60,67,90,101, 108]. Definierte Aussagen über die Wirkung des Materials im direkten Knochenkontakt sind jedoch nicht möglich, obgleich man auch hier der Meinung ist, daß der Einsatzort und die daraus resultierende mechanische Belastung großen Einfluß auf das Einheilen des Implantates hat. Außerdem wurde über Konformationsänderungen und Deformation adsorbierter Proteine als Grund für Abwehrreaktionen des Körpers gegen das Implantat diskutiert [100,101,102].

Die zweite Zelllinie, die in dieser Arbeit Anwendung fand, war die bronchiale Epithelzelllinie HBE 16, welche aus einem gesunden bronchialen Tubusstück entnommen wurde. Sie sollte in Hinblick auf die Bildung eines bindegewebig-epithelialen Attachments bei Implantaten und in Hinblick auf Katheter beleuchtet werden. Epithelzellen bilden eine Barriere für Fremdkörper, da sie durch tight junctions verbunden sind [110]. Außerdem bilden sie Entzündungsmarker, wie TNF α und Interleukin 4, die eine Rolle bei der Immunantwort spielen, sowie einen Kinin- B -2 -Rezeptor zur Freisetzung von Calciumionen. Sogar antimikrobielle Eigenschaften dieser Zelllinie werden diskutiert [5,38,47]. Bei der Testung

von Epithelzellen mit reinem Titan und Titanlegierungen, zum Beispiel Ti6Al4V und Ti5Al25Fe, wurde keine Beeinflussung des Wachstumsverhaltens und der Zellmorphologie dieser Zelllinie festgestellt. Es konnte kein Unterschied in der Biokompatibilität der Titanlegierungen im Vergleich zu Reintitan beobachtet werden, was mit der Ausbildung der Titanoxidschicht und der damit verbundenen außerordentlichen Korrosionsresistenz begründet wurde [30].

Im Vergleich zu reinem Titan weisen Titanlegierungen eine erhöhte Festigkeit und verbesserte Ermüdungseigenschaften auf [23,70]. Diskutiert wird jedoch ein erhöhter Abrieb kleiner Partikel bei mechanischer Belastung. Um die biologischen Eigenschaften der verwendeten Werkstoffe zu verbessern oder zu beeinflussen, steht die Erzeugung von Hartstoffschichten zur Oberflächenmodifikation zur Verfügung. Die Anwendung dieser Beschichtung bei Implantaten oder in der Zahntechnik ist jedoch noch in der Erprobungsphase [26]. Zunächst wurde ein zytotoxischer Effekt der Titanhartstoffschichten ausgeschlossen, und belegt, daß die PVD-Hartstoffbeschichtung neben der Abriebminderung auch die Gefahr von Metallallergien mindert und eine signifikant höhere Korrosionsfestigkeit aufweist [74,90,100,101].

In der hier vorgestellten Untersuchung sollte eine PVD-Titan-Silber-Beschichtung mit verschiedenen Silberkonzentrationen auf ihre Biokompatibilität getestet werden. Tatsache ist, dass die Mehrzahl der Studien dem Werkstoff Titan im Knochenkontakt eine besonders hohe Biokompatibilität zuschreibt. Die Topographie der Metalloberfläche, insbesondere die physikochemischen Eigenschaften des Werkstoffes, spielen eine Rolle bei der Osseointegration [60].

Silber besitzt von allen Metallen die höchste Leitfähigkeit für Wärme und Elektrizität und ist nach Gold das dehnbarste Metall. Es ist bekannt für seine exzellenten antimikrobiellen Eigenschaften. Durch die in der Oxidschicht der Metalloberfläche enthaltenen Silberionen wirkt es stark antiseptisch, da die Ionen in den Mikroorganismen eine Blockierung der Thiol-Enzyme verursachen und somit

stark fungizid und bakterizid wirken. In der Vergangenheit wurde Silber meist mit Kupfer legiert um seine Härte zu steigern oder mit Palladium, Zink, Kobalt oder Nickel für Dentallegierungen zusammengebracht [78,115]. Silber ist regelmäßig Mittelpunkt der Diskussionen in Hinblick auf den Einsatz als Implantatmaterial in der Knochenchirurgie [48]. Es wurden eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt, um den antibakteriellen Effekt von Silber nachzuweisen. Man demonstrierte einen toxischen Effekt bei chronischer Osteomyelitis, Infektionen im Harntrakt, Infektionen bei zentralen Venenkathetern und bei Verbrennungen [1, 3, 19, 48, 65, 88]. Hier zum Beispiel wurde Nylon als Wundverband mit Silberchlorid beschichtet und die antibakterielle Eigenschaft bei einem sehr großen Bakterienspektrum (*Escherichia coli*, *Porphyrromonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus equi subspecies zooepidermicus*) getestet [1]. Das Resultat war eine signifikante Reduktion der Bakterienzahl. Weiterhin wurden Versuche eines antibakteriellen Keramikmaterials mit Silber, basierend auf Hydroxyapatit, durchgeführt, bei dem sich ein exzellenter antibakterieller Effekt zeigte. Außerdem wurde beschrieben, daß die Inkorporation von Silberionen in Hydroxyapatit als bioaktives Liefersystem für eine langsame Antibiotikafreisetzung benutzt werden kann [19]. Auch in der Augenheilkunde spielt Silber eine Rolle. Es wurden silberbeschichtete Augenhydrogellinsen auf ihre antimikrobielle Wirksamkeit getestet, und auch hier eine deutliche Keimzahlverminderung im Vergleich zur Zahl auf unbeschichteten Linsen anhaftenden Bakterien beobachtet [65]. Des weiteren wurde Silber auch als Konservierungs- und Desinfektionsmittel für Kontaktlinsen für gut befunden. Sowohl bei der Verwendung von Silberwolle in Kontaktlinsenbehältern als auch von versilberten Behältern wurden die Testorganismen (*Candida albicans*) genügend schnell abgetötet und gezeigt, daß die bislang verwendeten Neutralisationsmittel eine geringere Wirkung auf die Absterberate aufwiesen [88].

Auch in anderen Bereichen, zum Beispiel bei Kathetern oder Endotrachealtuben, was in Bezug zu den verwendeten Epithelzellen von Bedeutung ist, wurde Silber

als Beschichtungsmaterial verwendet und auch hier ein deutlicher zytotoxischer Effekt festgestellt [52,53,68,69]. Mit dem in vitro getesteten Erlanger Silber-Katheter , einem mit Silberpulver beschicktem Polyurethankatheter, wurde ein neuer intravenöser Katheter auf seine Biokompatibilität getestet. Es konnte eine deutliche Zytotoxizität bei Anwesenheit von Silber im Vergleich zu unbehandeltem Polyurethan beobachtet werden [25].

Um sich den inhibitorischen Effekt von Silberionen auf Bakterien zu erklären, wurden mehrere Vorschläge entwickelt in denen man davon ausging, daß das Metall durch Bindung der Thiol- Gruppe eine Reaktion mit den Proteinen der Bakterien eingeht, und es dadurch zur Inaktivierung der Proteine kommt. Das Zusammenspiel zwischen toxischem Effekt des Silbers und hydrogenen Peroxiden scheint in Verbindung mit der Zerstörung der zellulären Proteine zu stehen [19, 20, 82]. So wurde bei der Untersuchung der antibakteriellen Wirkung von Silberionen auf gram negative (*Escherichia coli*) und gram positive Bakterien (*Staphylococcus aureus*) ein signifikanter Unterschied zwischen der Morphologie der Bakterienwände vor und nach Silberaddition festgestellt. Nach Silberionenzugabe wurde eine deutliche Kluft zwischen der Zytoplasmamembran und der Zellwand beider Bakterientypen beobachtet, was auf die Kondensation der bakteriellen DNA- Moleküle und dem damit verbundenen Verlust der Replikationsfähigkeit zurückzuführen war. Die Silberionen wirkten bakterizid [19].

Der Mechanismus des antimikrobiellen Effekts von Silber ist jedoch noch nicht gänzlich geklärt.

Silber und Titan sind bis dato nur sehr selten legiert wurden. Für die Zahnmedizin, insbesondere die Implantatprothetik, wurden Versuche durchgeführt, bei denen man sich die Kenntnis über die hervorragende Gewebeverträglichkeit von Titan und die Zytotoxizität von Silber zu Nutze machen wollte. So wurden zum Beispiel für Dentalrestorationen Prototypen von niedrigschmelzender Titangußlegierungen entwickelt. Hierbei handelt es sich um eine neue Titan-Kobalt-Legie-

rung (Titan 81,4%; Kobalt 18,6%) und eine Titan-Silber-Legierung (Titan 75%, Silber 25%). An Fibroblasten wurde die Mutagenität mit dem Ames-Test, die Zytotoxizität und das Zellwachstum getestet. Die Ergebnisse zeigten keine Mutagenität der verwendeten Legierungen, keine löslichen, die Zellyse verursachenden Komponenten, und keinen signifikanten Unterschiede in der Zellzahl auf beiden Oberflächen. Die entwickelten Prototypen waren nicht zytotoxisch [111]. Eine weitere neue Titan-Silberlegierung (Ti-5Ag) wurde für speziell angefertigte Prothesen untersucht. Zunächst stellte man fest, daß diese Legierung viel härter war als reines Titan. Auch gute korrosive Eigenschaften konnten beobachtet werden. Daß die Oberflächeneigenschaften von Silber einen Einfluß auf die Oxidschicht des Titans nimmt, wurde ebenfalls nachgewiesen, jedoch nicht als Legierungsbestandteil sondern als Feststoff. Hier konnte nachgewiesen werden, daß sich mit steigender Silberkonzentration eine große kritische Oberflächenspannung bildete [40].

In der vorliegenden Studie wurde festgestellt, daß die verschiedenen Silberlegierungen der PVD hartstoffbeschichteten Silber-Titanoberflächen keinen Einfluß auf die Proliferation der verwendeten Zelllinien hatte. Deutlich erkennbar war die Wachstumshemmung bei hundert Prozent Silberanteil, was den zytotoxischen Effekt von Silber beweist. Die Annahme, daß mit steigender Prozentanzahl des Silberanteils in der Legierung die Differenzierungsleistung der Zellen abnimmt, hat sich nicht bestätigt. Die Silberanteile der Legierung hatten weder einen zytotoxischen Effekt auf die verwendete Osteoblastenzelllinie HFOB 1.19, noch auf die bronchiale Epithelzelllinie HBE 16.

Somit wäre diese Silber-Titan beschichtete Hartstoffoberfläche für Implantate im Knochengewebe gut geeignet, da sie ungehindert knochenbildende Zellen wachsen läßt. Zu klären wäre noch, ob Silber in dieser Art von Legierung einen ähnlichen bakteriziden Effekt hat, wie in anderen Legierungen schon festgestellt wurde. Ist dies der Fall wäre der Grundstein gelegt für eine Legierung, die

schädliche Bakterien um das Implantat herum eliminiert und trotzdem ein ungehindertes Einwachsen des Implantats in den Knochen erlaubt.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zytotoxizität verschiedener Schichten bestehend aus Silber-Titanlegierungen auf Titanbasis mittels der humanen Osteoblastenzelllinie hFOB 1.19 geprüft. Es sollte der Einfluß des Silberanteils in der Beschichtung (0,7%, 1%, 3%, 4%, 5%, 7,5%, 9%, 18%, 20% Silberanteil) auf die Zellen getestet werden. Hierbei wurde die Wirkung der mit Hilfe des PVD-Verfahrens beschichteten Oberflächen auf die Proliferations- und Differenzierungsleistung der Zellen mit standardisierten Untersuchungsmethoden getestet. Des Weiteren wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase und die Biomassebestimmung vorgenommen. Als Kontrolluntersuchung wurde in einer zweiten Meßreihe der gleiche Versuch mit der bronchialen Epithelzelllinie HBE 16 durchgeführt.

Die Zellkultivierung erfolgte über einen 14-tägigen Zeitraum. Als Referenzoberfläche wurde konventionelles Zellkultur-Polysterol verwendet. Die Zellvitalität wurde mit Hilfe des WST-1-Tests, der Differenzierungsstatus anhand der Aktivität der alkalischen Phosphatase und der Proteingehalt mittels der Proteinbestimmung nach Bradford erfaßt.

Es zeigten sich bei allen Messungen starke Schwankungen der Zellzahl, Zellvitalität, der spezifischen Aktivität der alkalischen Phosphatase und des Proteingehalts auf den Oberflächen. Die verschiedenen Silberanteile der Silbertitanlegierung wirkten auf die getesteten Zelllinien nicht zytotoxisch. Eine Proportionalität zwischen den verschiedenen Silberkonzentrationen und den Proliferationszahlen war nicht zu beobachten.

Mit dem Wissen über die hervorragende Biokompatibilität von Titan und der nachgewiesenen bakteriostatischen Wirkung von Silber ist dies ein

interessantes Ergebnis. Denn der Silbergehalt in der Legierung schränkt das Wachstum der Zellen nicht ein. Für weitere Studien wäre das Verhalten von Bakterien auf dieser Oberfläche von Interesse, um die bakteriziden Eigenschaften der Legierung zu dokumentieren. Würde sich eine Zytotoxizität gegenüber Bakterien zeigen, wäre dies ein hervorragender Ausgangspunkt auf dem Weg zu einem neuen Biomaterial für die Knochenchirurgie und Implantologie. Hier könnten die das Implantat umgebenden Zellen auf der Basis von Titan ungehindert proliferieren, während die das Einheilen störenden Bakterien eliminiert werden würden.

6 Literaturverzeichnis

1. Adams A. P., Santschi E. M., Mellencamp M. A., (1999) Antibacterial properties of a silver chloride-coated nylon wound dressing. *Vet Surg* 28 (4); 219-25
2. Ahearn D. G., May L. L., Gabriel M. M., (1995) Adherence of organisms to silver-coated surfaces. *J Ind. Microbiol.* 15 (4); 372-376
3. Akiyama H., Okamoto S., (1979) Prophylaxis of indwelling urethral catheter infection. Clinical experience with a modified Foley Catheter and drainage system. *J Urol.* 121(1); 40-42
4. Aspenberg P., Goodman S. B., Wang J., (1996) Influence of callus deformation time: Bone chamber studies in rabbits. *Clin. Orthop.* 322; 253-261
5. Baird R. M., Brown H., Smith A. W., Watson M. L., (1999) Burkholderia cepacia is resistant to the antimicrobial activity of airway epithelial cells. *Immunopharmacologie* 44 (3); 267-272
6. Bardos D. C.: Titanium and Titanium alloys. In: Williams D. F (ed.) (1990) Concise encyclopedia of medical and dental materials. Pergamon Press Oxford; 360-365
7. Bodine P. V. N., Vernon S. K., Komm B., (1996) Establishment and hormonal regulation of conditionally transformed preosteolytic cell line from adult human bone. *Endocrinology* 137 (11) 4592-4604
8. Bodine P. V. N., Trailsmith M., Komm B., (1996) Development and characterization of a conditionally transformed adult human osteoblastic cell line.

J. Bone miner. Res. 11(6); 806-819

9. Borenfreund E., Puerner J. A., (1985) Toxicity determination in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicol Lett 24; 119-124
10. Brown D., (1997) All you want to know about titanium, but were afraid to ask. British Dental Journal 182; 393-394
11. Buchhorn G. H., Willert H. G., Semlitsch M., Schön R., Steinemann S., Schmidt M., (1992) Preparation, characterization and animal testing for biocompatibility of metal particles of Iron-, Cobalt- and Titanium based implant alloys; In: John K.R., (ed) Particulate Debris from medical Implants. Mechanisms of formation and biological consequences. American society for testing materials 177-188
12. 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
13. Chon J. Y., (1989) Differentiated mammalian cell lines immortalized by temperature-sensitive tumor viruses. Mol. Endocrinol. 3; 1511-1514
14. Cook J. A., Mitchell J. B., (1989) Viability measurements in mammalian cell systems. Anal Biochem 179; 1-7
15. Deutsches Institut für Normung e. V. (1994) Biologische Beurteilung von Medizinprodukten Deutsche Fassung EN 30993-5

16. Davies J. E., Lowenberg B., Shiga A.,(1990) The bone-titanium interface in vitro. *J Biomed Mater Res* 24; 1289-1306
17. Evans E. J., (1994) Cell damage in vitro following direct contact with fine particles of titanium, titanium alloy and Co-Cr-Mo-alloy. *Biomaterials* 15; 713-717
18. Feigal R. J., Yesiloy C., Messer H. H., Nelson J. (1985) Differential sensitivity of normal pulp and transformed mouse fibroblasts to cytotoxic challenge. *Arch oral biol.* 30; 609-613
19. Feng Q.L., Wu J., Chen G.Q., Cui F.Z., Kim T.N., Kim J.O., (2000) A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res* 52; 662-668
20. Feng Zhang, Wolf G. K., Xianghui Wang, Xianghuai Liu. (2001) Surface properties of silver doped titanium oxide films. *Issue 1*; 65-70
21. Galante J., Rostoker W., Lueck R., Ray R. D., (1971) Sintered metal composites as a basis for attachment of implants to bone. *J Bone Jt Surg Am* 53; 101-114
22. Geis- Gerstorfer J., Weber H., (1992) Lasergasnitrieren von Titan. Alternative zur PVD- Beschichtung. *Dental Labor (Munch)* Aug 40(8); 1337-9
23. Geis- Gerstorfer J., (2003) Titan und Titanlegierungen *ZM* 93 (7); 828-832
24. Godding V., Sibille Y., Vaerman J. P., Langendries A., Van der Maelen C.,(1996) SC expression by human respiratory epithelial cells. *Christian de Duve Institute of Cellular Pathology*

25. Greil J., Spies T., Böswald M., Bechert T., Lugauer S., Regenfus A., Guggenbichler J. P., (1999) Analysis of the acute cytotoxicity of Erlanger silver catheter. *Infection* 27 Suppl 1; 34-37
26. Grohmann F., (1990) Die PVD-Beschichtung in der Zahntechnik. Werdegang und Zukunftsperspektiven. *Dental-Labor* XXXVIII (2); 209-212
27. Grill V., Sandrucci M. A., Di- Lenarda R., Basa M., Narducci P., Martelli A. M., Bareggi R., (2000) In vitro evaluation of the biocompatibility of dental alloys: fibronectin expression patterns and relationship to cellular proliferation rates. *Quintessence- Int.* 31 (10); 741-747
28. Hanawa T., Kaga M., Itoh Y., Echizenya T., Oguchi H., Ota M., (1992) Cytotoxicities of oxides, phosphates and sulphides of Metal. *Biomaterials* 13 (1); 20-24
29. Harris S. A., Tan K. R., Enger R. J., Toft D. O., Riggs B. L., Spelsberg T. C., (1995) Estrogen response in the hFOB 1.19 human fetal osteoblastic cell line stably transfected with the human estrogen receptor gene. *J cell biochem*; 193-201
30. Harris S. A., Enger R. J., Riggs B. L., Spelsberg T. C., (1995) Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res* 10; 178-186
31. Hehner B., Heidemann D., (1989) Vergleich der biologischen Verträglichkeit von Titan- und Titanlegierungen in der Zellkultur menschlicher Gingiva. *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir.* 13; 394-400
32. Hemmerlein J. B., Trerotola S. O., Kraus M. A., Mendonca M. S.,

- Desmond L. A., (1997) In vitro cytotoxicity of silver-impregnated collagen cuffs designed to decrease infection in tunneled catheters. *Radiology* 204(2); 363-367
33. Hench L. L., Ethridge E. C., (1982) *An interfacial Approach*. Academic Press. *Biomaterials*; 1-389
 34. Hendrich C., Geyer M., Scheddin D., Schutze N., Eulert J., Thull R., (1996) Ein neues Osteoblasten-Zellkultursystem zur normgerechten Prüfung von Biomaterialien. *Biomed. Tech. Berlin* 41; 278-283
 35. Hendrich C., Noth U., Stahl U., Merklein F., Rader C. P., Thull R., Eulert J., Schutz N., (2002) Testing of skeletal implant surfaces with human fetal osteoblasts. *Clin- Orthop.* 394; 278- 289
 36. Hensten-Pettersson A., (1988) Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *Int. Endod. J* 21; 89-99
 37. Hille G. H., (1966) Titanium for surgical Implants. *Journal of materials*; 373-383
 38. Hodge S., Hodge G., Holmes M., Flower R., Scicchitano R., (2001) Interleukin-4 and tumour necrosis factor α inhibit transforming growth factor β production in a human bronchial epithelial cell line. Possible relevance to inflammatory mechanism in chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology* 6 (3); 205-211
 39. Hoffmann- Axthelm (1995) *Lexikon der Zahnmedizin*
 40. Hong S. B., Eliaz N., Leisk G. G., Sach E. M., Latanision R. M., Allen S.M., (2001) A new Ti-5 Ag alloy for customized protheses by

threedimensional printing (3DP). *J Dent Res.*, 80 (3); 860-863

41. 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
42. Hunter A., Archer S. W., Walker P.S., Blunn G. W., (1995) Attachment and proliferation of osteoblasts and fibroblasts on biomaterials of orthopaedic use. *Biomaterials* (1995), 16 (4), 287-295
43. Jakobs J. J., Sumner D. R., Urban R. M., Galante J. O., (1993) Retrieval: Successful uncemented implants. In: Morrey B. F. (ed) *Biological, material and mechanical considerations of joint replacement*. Raven Press NY, 185-196
44. Josset Y., Oum` hamed Z., Zarrinpour A., Lorenzato M., Adnet J. J., Laurent- Maquin D., (1998) DNA image cytometry and Ag- NORs- staining application in biocompatibility studies on human osteoblast cells in vitro. *Biomaterials* 19 (19); 1791-1798
45. Judet I., Judet R., (1949) Essais de reconstruction prthetique de la hanche apres resection de la tete femorale. *J Chir.* 65; 17-29
46. Kaschke O., Gerhardt H-J., Bohm K., Wenzel M., Planck H., (1995) Epithelialisation of porous biomaterials with isolated respiratory epithelial cells in vivo. *HNO* 43(2); 80-88
47. Klueh U., Wagner V., Kelly S., Johnson A., Bryers J.D., (2000) Efficacy of silver-coated fabric to prevent bacterial colconization and subsequent device-based biofilm formation. *J Biomed Mater Res* 53 (6); 621-631

48. Kraft C. N., Hansis M., Arens S., Menger M. D., Vollmar B., (2000) Striated muscle microvascular response to silver implants: A comparative in vivo study with titanium and stainless steel. *J Biomed Mater Res* 49 (2); 192-199
49. Larsson C., Thomsen P., Lansmaa J., Rodahl M., Kasemo B., Ericson L. E., (1994) Bone response to surface modified titanium implants: studies on electropolished implants with different oxid thickness and morphology. *Biomaterials* 15; 1062-1074
50. Lemous J. E., Lucas L. C., (1986) Properties of biomaterials. *J. Arthroplasty* 12; 143-147
51. Leventhal J., (1951) Titanium a metal for surgery. *Bone Jt. Surg* 33A; 473.34
52. Liedberg H., Lundeberg T., (1989) Assessment of silver-coated urinary catheter toxicity by cell culture. *Urolog. Res* 17 (6); 359-360
53. Liedberg H., Lundeberg T., (1989) Silver coating of urinary catheters prevents adherence and growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Urolog. Res.* 17 (6) 357-358
54. Locci P., Marinucci L., Lilli C., Belcastro S., Staffolani N., Bellocchio S., Damiani F., Becchetti E., (2000) Biocompatibility of alloy used in orthodontics evaluated by cell culture tests. *J Biomed Mater Res* 51(4); 561-568
55. Lynch M. P., Stein J. L., Stein G. S., Lian J. B., (1995) The influence of type I collagen in the development and maintenance of the osteoblast

phenotype in primary and passaged rat calvariae osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion and extracellular matrix mineralisation. *Exp. Cell Res.* 216; 35-45

56. Marks S. C., Popoff S. N., (1988) The regulation of development, structure and function in the skeleton. *Am J Anat* 183; 1-44
57. Masse A., Bruno A., Bosetti M., Biasibetti A., Cannas m., Gallinaro P., (2000) Prevention of Pin Track Infection in external fixation with silver coated pins: Clinical and Microbiological Results. *J Biomed Mater Res.* 53; 600-604
58. Mathieu E., Merregaert J., (1994) Characterization of the stromal osteogenic cell line MN7: mRNA steady-state level of selected osteogenic markers depends on cell density and is influenced by 17-beta-estradiol. *J. Bone Miner. Res* 9; 183-192
59. Merkel M., Thomas K. H., (1994) Taschenbuch der Werkstoffkunde. Fachbuchverlag. Leipzig- Köln
60. Merklein F., Hendrich C., Nöth U., Kochinski G., Rader C. P., Schütze N., Thull R., Eulert J., (1998) Standardised Testing of Bone-implant surfaces using an osteoblast cell culture system. Part I: Standard materials in orthopaedic surgery. *Biomed. Tech* 43; 354-359
61. Merklein F., Dimmler A., Steinert A., Schütze N., Nöth U., Papadopoulos T., Eulert J., Thull R., Hendrich C., (2002) Standardisierte Testung von Skelett- Implantatoberflächen mit einem Osteoblastenzellkultursystem. IV. Spezifische Genexpression während der Differenzierung. *Biomed. Tech* (47); 26-31

62. Mosmann T., (1983) Rapid colometric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65; 55-63

63. Mueller H. J., Hirthe R. W., (2001) Electrochemical characterization and immersion corrosion of a consolidated silver dental biomaterials. *Biomaterials* 22 (19); 2635-2646

64. Mundy G. R., (1995) Local control of bone formation by osteoblasts. *Clin Orthop* 313; 19-26

65. Nissen S., Furkert F. H., (2000) Antimikrobielle Wirksamkeit einer Silberbeschichtung von Hydrogellinsen? *Ophthalmologe* 97; 640-643

66. Northup S. J., (1996) In vitro assessment of tissue compatibility. In: Ratner B. D., Hoffmann A. S., Schoen F. J., Lemous J. E. (eds) *Biomaterials Science*. Academic Press San Diego; 215-220

67. Nöth U., Hendrich C., Merklein F., Altvater T., Rader C. P., Schütze N., Eulert T., Thull R., (1999) Standardisiertes Testen von Skelett-Implantatoberflächen mit einem Osteoblastenzellkultursystem. II. Titanoberflächen unterschiedlicher Rauigkeit. *Biomed. Tech* 44 (1-2); 6-11

68. Oloffs A., Grosse-Siestrupp C., Bisson S., Rinck M., Rudolph R., Gross U., (1994) Biocompatibility of silver-coated polyurethane catheters and silver coated Dacron materials. *Biomaterials* 15 (10); 753-758

69. Olson-Merle E., Harmon B-G., Kollef M. H., (2002) Silver-coated endotracheal tubes associated with reduced bacterial burden in the lungs of mechanically ventilated dogs. *Pulmol.* 121 (3); 863-870

70. Peters M., Hemptenmacher J., Kumpfert J., Leyens C., (1996) Struktur, Gefüge und Eigenschaften von Titan und Titanlegierungen (1); 3-39
71. Pschyrembel (2002) klinisches Wörterbuch. De Gruyter Verlag Berlin
72. Rader C. P., Baumann B., Sterner T., Rolf G., Hendrich C., Schütze N., Jakob F., (1999) TNF α - Sekretion durch Abriebpartikel im humanen Makrophagenmodell und deren Modulation durch Medikamente. Biomed. Tech 44 (5); 135-141
73. Ratner B. D., (1993) New ideas in Biomaterials science -a path to engineered biomaterials. J Biomed Mater. Res. 27; 837-850
74. Repenning D., Thull R., (1991) Verschleißfeste Implantatoberflächen durch Hartstoffbeschichtungen. In: Gierse H., Maaz B. (eds) Die Hüftendoprothetik. Ecomed. Landsberg; 193-202
75. Ring M. E., (2000) Geschichte der Zahnmedizin. Könenmann
76. Robey P. G., Termine T., (1985) Human bone cells in vitro. Calcif. Tissue Int. 37; 453-460
77. Rögner F. H., (2001) Vom Labor zur Industrieanwendung. MO-Beschichtung von Kunststoff und Metall. 52-57
78. Römpp Chemielexikon (1998) Thieme 4154-4158
79. Saint S., Elmore J. G., Sullivan S. D., Emmerson S. S., Koepsell T. D., (1998) The efficacy of silver alloy-soated urinary catheters in preventing

urinary tract infection: a meta-analysis. *Am J Med* 105 (3); 236-241

80. Schenk R. K., (1991) Reaktion des Knochens auf Implantate. Springer Berlin; 533-538
81. Schenk R. K., Willmenger H. R., (1977) Zur Histologie der primären Knochenheilung. *Unfallheilkunde* 80; 155-160
82. Schierholz J. M., Wachol-Drewek Z., Lucas L. J., Pulverer G., (1998) Activity of silver ions in different media. *Zentralbl. Bakteriol.* 287 (4); 411-20
83. Schliephake H., Reiss J., Neukamm F. W., Gynay H., (1991) Freisetzung von Titan aus Schraubenimplanaten. *Zahnärztliche Implantologie* 7
84. Schmitz H. J., Kettner R., Erens S., (1996) Implantatmaterialien und Implantologie. *Praxis der Zahnheilkunde* 2; 11-26
85. Schott H.,(2000) Chronik der Medizin. Chronik Verlag
86. Schwartz Z., Boyan B. D., (1994) Underlying mechanism at the bone-biomaterial interface. *J Cell Biochem* 56; 340-347
87. Schweikl H., Schmalz G., (1996) Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *Eur J. Oral Sci* 104; 292-299
88. Schweißfurth R., Wunn B., (1985) Silber als Konservierungs- und Desinfektionsmittel für Kontaktlinsen? *Contactologia* 7; 144-147
89. Scott E. S., Wiseman J W., Ewans M. J., (2001) Enhanced gene delivery to human airway epithelial cells using an integrin-targeting-lipoplex

Colledge WH 3(2); 125-134

90. Steinert A., Hendrich C., Merklein F., Rader C. P., Schütze N., Eulert J., Thull R., (2000) Standardisierte Testungen von Skelett-Implantatoberflächen mit einem Osteoblastenzellkultursystem. III. PVD-Beschichtung und Ti6Al4V. *Biomed Tech (Berlin)* 45 (12); 349-355
91. Sibum H., (1996) Titan und Titanlegierungen - vom Rohstoff bis zum halbfabrikat. *Titan und Titanlegierungen* 2; 29-49
92. Siggelkow H., Rebenstorff K., Kurre W., Niedhart C., Schulz H., Hübner M., (1997) Gene expression and proteinsynthesis in primary osteoblast like cells in vitro compared to the sarcoma cell line. *Bone* 20 (4); 7723
93. Sinha R. K., Morris F., Shah S. A., Tuan R. S., (1994) Surface composition of orthopaedic implant metals regulates cell attachment, spreading and cytoskeletal organization of primary human osteoblasts in vitro. *Clin orthop* 305; 258-272
94. Sinha R. K., Tuan R. S., (1996) Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopaedic implant materials. *Bone* 18; 451-457
95. Staffolani N., Damiani F., Lilli C., Guerra M., Staffolani N. J., Belcastro S., Locci P., (1999) I¹²⁵I release from orthodontic appliances. *J Dent.* 27 (6); 449-454
96. Stafford H. J., Roberts M T., Oni O. O. A., Hay J., Gregg P., (1994) Localisation of bone-forming cell during fracture healing by osteocalcin immunocytochemistry: An experimental study of the rabbit tibia. *J. orthop. Res.* 12: 29-39

97. Sumner D. R., Turner T. M., Purchio A. F., Gombotz W. R., Urban R. M., Galante J. O., (1995) Enhancement of bone ingrowth with transforming growth factor-beta. *J. Bone JT. Surg. Am* 77; 1135-1147
98. Tegtmeier P., (1975) Function of simian virus 40 gene A transforming infection. *J. Virol.* 15; 613-618
99. Thull R., (1994) Werkstoffkundliche Oberflächeneigenschaften knochenimplantierbarer Biomaterialien. *Jahrbuch für orale Implantologie* 55-69
100. Thull R., (1997) Implant tissue interaction. In: Breme I. (Ed) *Metals as Biomaterials*. (In press)
101. Thull R., (2000) Biokompatibilitätsbestimmende Eigenschaften der Grenzflächen. *Biomaterials* 1(1); 6-11
102. Thull R., (1998) Tissue-implant interaction. In: Helsen J. A., Breme H. J., *Metals as Biomaterials*. John Willey et sons Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto
103. Thull R., Repenning D., (1990) Verschleißfeste Implantatoberflächen durch Hartstoffbeschichtung. *Symposiumsband der orthopädischen Fachklinik, Krankenhaus Mörsenbroich- Rath GmbH Düsseldorf Daiserswerth*
104. Thull R., (1993) Hartstoffbeschichtungen für Zahnimplantate zur Verhinderung von Reibekorrosion bei Mikrobewegungen. *Z. Zahnärztl. Implantol.* 9; 275-280
105. Thompson G. J., Puleo D. A., (1995) Effekt of sublethal metal ion concentrations on osteogenic cells derived from bone marrow-stromal cells.

J. Applied Biomaterials 6; 249-258

106. Toellner R., (2000) Illustrierte Geschichte der Medizin. Bechtermünz Verlag
107. Tümmler H. P.,(1986) Oberflächeneigenschaften von Titan und Tantal für Implantate. Dissertation FAM Erlangen-Nürnberg
108. Ungersböck A., Perren S. M., Pohler O., (1994) Comparison of the tissue reaction to implants made of beta titanium alloy and pure titanium. Experimental study on rabbits. J. Mater Sci Mater Med 5; 788-792
109. Walivaara B., Askendal A., Elwing H., Lundstrom J., Tengvall P., (1992) Antisera binding onto metals immersed in human plasma in vitro. J Biomed Mater Res. 26 (9); 1205-1216
110. Wan H., Winton H. L., Soeller C., Stewart G. A., Thompson P. J., Gruene Canuell M. B., Garrod D. R., Robinson C., (2000) Tight junction properties of the immortalized human bronchial epithelial cell line Calu-3 and 16 HBE 14o. Eur. Respir. J. 15(6); 1058-68
111. Wang R.R., Ti Y., (1998) In vitro evaluation of biocompatibility of experimental titanium alloys for dental restorations. J Prothet Dent, 80 (4); 495-500
112. Wassall M. A., Santin M., Isalberti C., Cannas M., Denyer S. P., (1997) Adhesion of bacteria to stainless steel and silver-coated orthopedic external fixation pins. J Biomed Mater Res 36; 325-330
113. Wataha J.G., Malcom D.T., Hanks C.T., (1995) Correlation between cytotoxicity and the elements released by dental casting alloys.

Int. J Prosthodont., 8 (1); 9-14

114. Wataha J.C., Lockwood PE., Schedle A., (2000) Effect of silver, copper, mercury and nickel ions on cellular proliferation during extended, lowdose exposures. J Biomed Mater Res., 52 (2); 360- 364
115. Welsch G. E., Wang R. R., Cvetichan R., Hull D., Garlick R., Castro-Cedeno M., (1975) Ti-Ag-Co-Alloy for dental castings. J Dent Res 75; 336
116. Weinreb M., Shinar D., Rodan G.A., (1990) Different pattern of Alkaline Phosphatase, Osteopontin and Osteocalcin expression in developing rat bone visualized by in situ Hybridization. J of Bone and Mineral Res 5; 831-842
117. Williams D. F., (1981) Elektrochemical aspects to corrosion in the physiological environment. Fundamental aspects of biocompatibility. CRC press, Boca Raton 11-42
118. Williams R. L., Williams D. F., (1989) The spatial resolution of protein adsorption on surfaces of heterogeneous metallic biomaterials. J Biomed Mat Res 23; 339-350
119. Wintermantel E., Ha S. W., (1996) Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen. Springer Verlag Berlin; 1-423
120. Wisbey A., Gregson P. J., Tuhe M., (1987) Application of PVD TiN coating to CoCrMo based surgical implants. Biomaterials 8; 477-480

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die es mir neben dem zahnmedizinischen Studium ermöglicht haben, diese Arbeit in Ruhe und mit Bedacht in Worte zu fassen. Außerdem möchte ich meinen geliebten Eltern und meiner geliebter Schwester für die seelische und finanzielle Unterstützung, für Ihre Kraft und Ausdauer und Ihr stets offenes Ohr danken.

Sie haben mir immer wieder Mut gemacht nie den Glauben an mich selbst zu verlieren. Durch Ihre Liebe bin ich nun da, wo ich heute bin.

Außerdem möchte ich all meinen Freunden danken, die trotz der wenigen Zeit, die ich in den vergangenen Jahren für sie hatte, immer an mich geglaubt haben, mir zugehört und mich nicht vergessen haben.

Des weiteren bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr.- Ing. R. Thull für die Möglichkeit in einem hervorragenden zellbiologischen Labor promovieren zu dürfen, und mir damit die Möglichkeit zu geben Einblick in die tägliche Arbeit im experimentellen Bereich zu erhalten. Zusätzlich möchte ich mich auch bei Herrn Professor Dr. med. dent. A. Renk für die spontane Bereitschaft als Koreferent zu fungieren bedanken.

Ein ganz großes herzliches Dankeschön gilt allen Mitarbeitern der Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnmedizin der Klinik für Zahn- Mund- und Kieferkrankheiten, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Vor allem bedanke ich mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. A. Hauck, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre und sie auch nicht so effizient und zielstrebig zum Ende gekommen wäre.

Außerdem danke ich Frau U. Rummel dafür, daß sie mir immer mit Rat und Tat bei all meinen Fragen und Problemen zur Seite stand.

Last but not least möchte ich mich bei Frau J. Friedlein für die Herstellung der PVD- beschichteten Proben, ohne die die Versuchsreihen nicht möglich gewesen wären, und für die stets geduldige Erklärung aller Computerfragen bedanken.

Sie alle haben für mich viel Zeit geopfert und dafür danke ich Ihnen und Euch von ganzem Herzen.

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Susanne Karola Glückermann
Geburtsdatum: 30.10.1977
Geburtsort: Meiningen/ Thüringen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1984-1986 ehemalige Hans-Beimler-Oberschule, Meiningen
1986-1989 ehemalige Juri-Gagarin-Oberschule, Meiningen
1989-1990 ehemalige Martin-Luther-Oberschule, Meiningen
1990-1996 Henfling- Gymnasium, Meiningen
21.06.1996 Abschluß: allgemeine Hochschulreife

07/1996- 04/1997 Ausbildung zur Zahntechnikerin in der Meiningener Zahntechnik

Hochschulausbildung:

SS 1997 - WS 01/02 Studium der Zahnmedizin an der Julius-Maximilian-Universität Würzburg
06/2002 Abschluß: Staatsexamen

Beruflicher Werdegang:

10/2002 Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis Dres. Glückermann in Meiningen

Auslandsaufenthalt:

01/2003 - 04/2003 zahnärztliche Tätigkeit in Kenya über den Arzt- & Zahnarztthilfe Kenya e.V.