

# **Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer-, und Gesichtschirurgie

Prof. Dr. Martin Gosau

## ***In vitro*-Untersuchungen an „Direct Laser Interference Patterning“ - behandelten Titanprüfkörpern**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin /Zahnmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Vorgelegt von:

Thiago Gundelwein Silva  
aus Marburg

Hamburg 2018

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 13.07.2020**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Martin Gosau**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Florian Barvencik**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. ARBEITSHYPOTHESE</b> .....	<b>5</b>
<b>2. EINLEITUNG</b> .....	<b>6</b>
2.1 DAS ZAHNIMPLANTAT.....	6
2.2 TITAN ALS IMPLANTATMATERIAL.....	8
2.3 OSSEOINTEGRATION UND OBERFLÄCHENMODIFIKATION.....	8
<i>Osseointegration</i> .....	8
<i>Direct laser interference patterning</i> .....	9
2.4 WISSENSCHAFTLICHE ANREGUNG .....	17
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>18</b>
3.1 MATERIALIEN UND GERÄTE.....	18
<i>Titanprüfkörper und Oberflächenbearbeitung</i> .....	18
<i>Positivkontrolle, toxische Kontrolle und andere Kontrollen</i> .....	18
<i>Geräte und Chemikalien</i> .....	19
<i>Medium, Serum und Antibiotika</i> .....	21
<i>Zelllinie, Begründung der Auswahl und Bezugsquelle(n) der Zellen</i> .....	21
3.2 DURCHFÜHRUNG DER VERSUCHE .....	22
3.2.1 <i>Vorbereitung der Zellkultur und Reagenzien</i> .....	23
3.2.2 <i>Extrakt-Analysen</i> .....	24
Herstellung der Extrakte .....	24
Vorbereitung der Zellen .....	24
Auftragen der Extrakte auf die Zellen.....	25
LDH Assay .....	25
XTT Assay.....	25
BrdU Assay .....	25
3.2.3 <i>Direkte Analysen</i> .....	26
Live-dead-staining .....	26
<i>Direkte LDH-, XTT- und BrdU-Assays</i> .....	27
LDH Assay .....	28
XTT Assay.....	28
BrdU Assay .....	28
3.2.4 <i>Statistische Auswertung</i> .....	29
<b>4. ERGEBNISSE</b> .....	<b>30</b>
4.1 INDIREKTE EFFEKTE .....	30
4.2 ZELL-ADHÄSION.....	32
4.3 DIREKTE EFFEKTE.....	36

<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>37</b>
ASSAYS UND METHODEN .....	37
INDIREKTE EFFEKTE DER TITAN-PRÜFKÖRPER.....	37
ZELL-ADHÄSION.....	37
DIREKTE EFFEKTE.....	37
<i>Adhäsionsvariabilitäten der L929- und MC3T3 Zellen.....</i>	<i>38</i>
<i>Fehlende Überlegenheit der DLIP modifizierten Oberflächen .....</i>	<i>38</i>
5.5 LITERATURVERGLEICH.....	38
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>42</b>
<b>7. ABSTRACT.....</b>	<b>43</b>
<b>8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>44</b>
<b>9. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>46</b>
<b>10. DANKSAGUNG.....</b>	<b>49</b>
<b>11. LEBENS LAUF .....</b>	<b>50</b>
<b>12. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>50</b>

# 1. Arbeitshypothese

Die Hypothese dieser Arbeit lautet:

„Direct Laser Interference Patterning“ (DLIP) – behandelte Titanprüfkörper haben im Vergleich zu unbehandelten Titanprüfkörpern verbesserte Eigenschaften hinsichtlich der Zelladhäsion und Zellproliferation von direkt auf den Prüfkörpern kultivierten Zellen.

Diese Hypothese wird *in vitro* mit L929-Fibroblasten und MC3T3-Präosteoblasten getestet. Hierfür wird die Toxizität mittels LDH-Assay, die Proliferation mittels BrdU-Assay und die Vitalität mittels XTT-Assay gemessen. Des Weiteren werden Adhäsion und Morphologie der Zellen mittels Live-dead-staining geprüft.

## 2. Einleitung

### 2.1 Das Zahnimplantat

Implantate kommen in vielen Fachrichtungen der Medizin vor, in diesem Fall beschränkt sich der kurze Ausblick aufgrund der Relevanz der vorliegenden Untersuchung nur auf das Zahnimplantat.



*Abb. 1: Darstellung der Implantatlokalisierung [1]*

Ein Zahnimplantat kann als künstlicher Zahnstamm gesehen werden. Zahnimplantate sind meist wie Schrauben gestaltet und werden dort in den Ober- oder Unterkiefer implantiert, wo vorher die Zahnwurzel gesessen hat, und bilden als lasttragender Pfeiler die Basis für Prothesen, Kronen oder Brücken. Neben Titan existieren noch weitere Implantatmaterialien, wie beispielsweise Zirkonium oder Keramiken [2].

Das Zahnimplantat ist eine individuelle Lösung und kann eine ausgezeichnete Alternative zum herkömmlichen Zahnersatz, wie z. B. Brücken, herausnehmbare Voll- oder Teilprothesen, darstellen. Zahnimplantate können eine langfristig verbesserte Lebensqualität bieten [3-8]. Die konventionelle Versorgung, beispielsweise mittels Brücken oder Vollprothesen, bringt negative Aspekte mit sich, wie z. B. das Abschleifen gesunder Zähne beim Einsatz einer Brücke oder die Rückbildung des Kieferknochens beim Tragen einer Vollprothese, welche bei der implantologischen Versorgung nicht auftreten [2, 9]. Allerdings birgt der Einsatz eines Implantats auch Risiken. Neben den klassischen kieferchirurgischen OP-Risiken, wie z. B. Blutungen, Nachblutungen, Beschädigung anderer gesunder Zähne oder Nervenläsionen und

Kieferbrüchen, kann es außerdem zu Einheilungsproblemen kommen, beispielsweise im Rahmen einer Infektion, was zu einer Implantatlockerung führen kann. Dies würde wiederum zu einer weiteren Sanierungs-OP führen, welche wieder neue Risiken birgt. Nichtsdestotrotz ist die implantologische Versorgung über die Jahre komfortabler [2-8].



#### Die Vorteile von Zahn-Implantaten im Überblick

- gesunde Zähne müssen nicht abgeschliffen werden
- Kronen, Brücken oder Prothesen sitzen fest im Kiefer
- Kaufunktion und Ästhetik werden wieder hergestellt
- vorzeitiger Knochenabbau durch fehlende Druckstimulation wird verhindert
- Erweiterung der prothetischen Möglichkeiten; kein Fremdkörpergefühl
- Sprechen, Essen und Schmecken wie mit den eigenen Zähnen
- Zugewinn an Lebensqualität viele Jahre lang

*Abb. 2: Die Vorteile von Zahn-Implantaten im Überblick [2]*

Der Behandlungsablauf des Implantats besteht grundlegend aus fünf Schritten:

- „Einsetzen des Implantats in den Kieferknochen
- Einheilung in den Knochen (2-9 Monate)
- Abdrucknahme der Gebissituation
- Einprobe des Zahnersatzes
- Einsetzen des endgültigen Zahnersatzes“ [1]

Der zweite Schritt steht im Fokus dieser Arbeit. Das Ziel der Modifikation der Implantatoberfläche ist, die Einheilung in den Knochen zu verbessern und zu beschleunigen.



1 Implantat und Pfosten 2 Krone

Abb. 3: Einzelzahnersatz [2]

## 2.2 Titan als Implantatmaterial

Aktuell ist Titan eines der populärsten Implantatmaterialien und ist infolge zahlreicher Studien Goldstandard geworden [3-6, 10-12]. In der Natur existiert es als Element in der Erdkruste und macht einen Masseanteil von 0,41% aus. Es liegt in Form verschiedener Verbindungen vor ( $\text{TiO}_2$ ,  $\text{FeTiO}_3$ ) und wird mittels spezieller Extraktionsverfahren gewonnen.

Titan hat eine Dichte von  $4,51 \text{ g/cm}^3$ , es ist sehr Hitzeresistent und besitzt einen hohen Härtegrad im Vergleich zu anderen Metallen. Außerdem besitzt Titan eine sehr gute Korrosionsbeständigkeit, aufgrund einer Oxidschicht, welche auf der Oberfläche ausgebildet wird [13]. Da die Oxidschicht maßgeblich an der Osseointegration beteiligt ist, wurden Oberflächenmodifikationen entwickelt, welche die Oxidschicht erweitern.

## 2.3 Osseointegration und Oberflächenmodifikation

### Osseointegration

Die Definition der Osseointegration ist die strukturelle und funktionelle Verbindung zwischen Knochen und Implantatoberfläche [14, 15].

Osseointegration ist vergleichbar mit der direkten Knochenheilung. Hierbei ist das Gewebe zwischen zwei Knochenenden Knochenmatrix, ohne fibröse oder fibrocartiläre Vorstufen. Der klare Unterschied zwischen primärer oder direkter Knochenheilung und Osseointegration ist, dass keine Knochen-zu-Knochen-Verbindung entsteht, sondern eine Knochen-zu-Implantatoberflächen-Verbindung [16]. Basierend auf diesem Konzept werden dentale als auch orthopädische Implantate entwickelt.

### **Direct laser interference patterning**

Die Oberfläche eines Implantats steht in unmittelbarem Kontakt zum Knochen. Sie ist das entscheidende Glied, welche die Osseointegration ermöglicht. Die Oberfläche des Implantats dahingehend zu modifizieren, eine verbesserte Osseointegration und Stabilität zu erreichen, ist daher Gegenstand der Forschung.

Eine Methode zur Modifikation der Oberfläche ist das „Direct laser interference patternig“ (DLIP). Zur Laserstrukturierung der in dieser Arbeit untersuchten Prüfkörper-Oberflächen diente ein Nanosekunden gepulster Nd:YAG Festkörperlaser. Auf Abb. 4 ist eine schematische Darstellung des DLIP Verfahren gezeigt [17].

Das vom Fraunhofer IWS entwickelte DLIP System zur Mikrostrukturierung von Oberflächen und Bearbeitung von 3D Bauteilen arbeitet mit zwei überlagerten Laserstrahlen. Das gewünschte Muster entsteht innerhalb des Interferenzvolumens der Laserstrahlen. Mit einem Laserimpuls ist es möglich, mehrere  $\text{cm}^2$  mit dem gewünschten Interferenzmuster zu strukturieren. Die Interferenzstrukturtiefe lässt sich im Bereich von  $\mu\text{m}$  bis  $\text{cm}$  variieren.

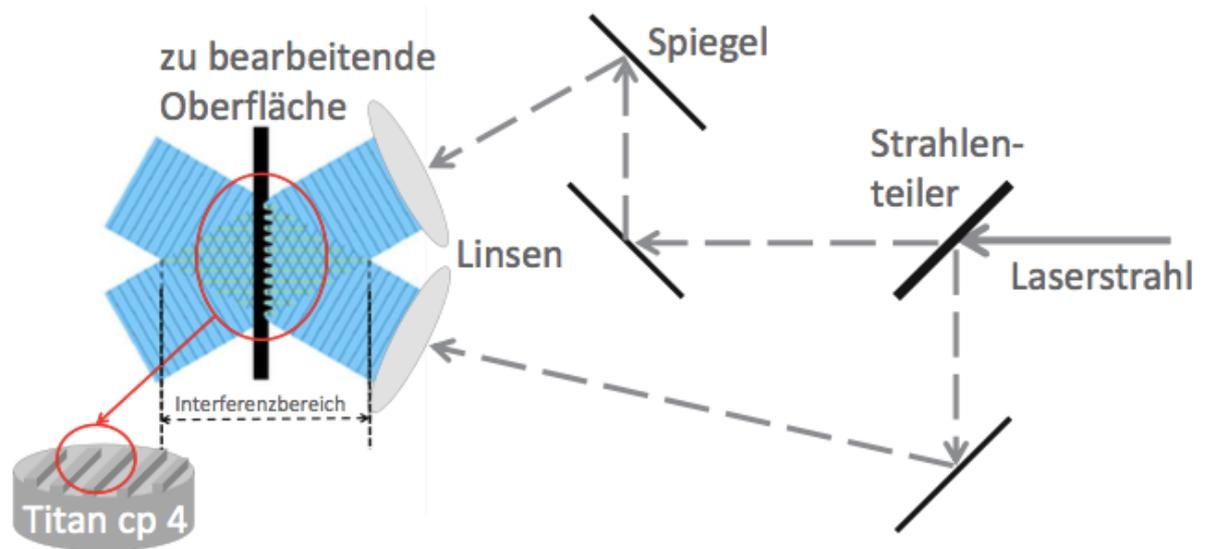


Abb. 4: Schematische Darstellung des DLIP („Direct Laser Interference Patterning“) Verfahren zur Erzeugung von Linienstruktur [17]

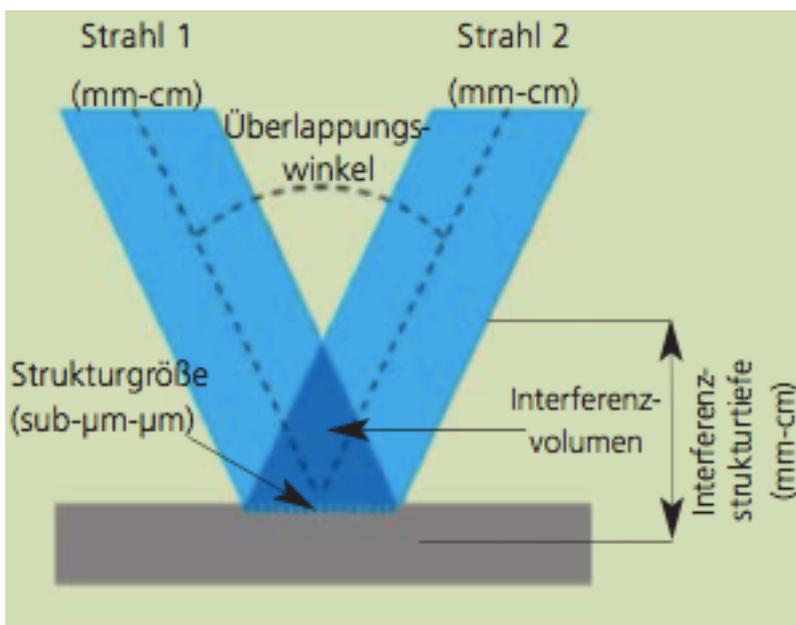
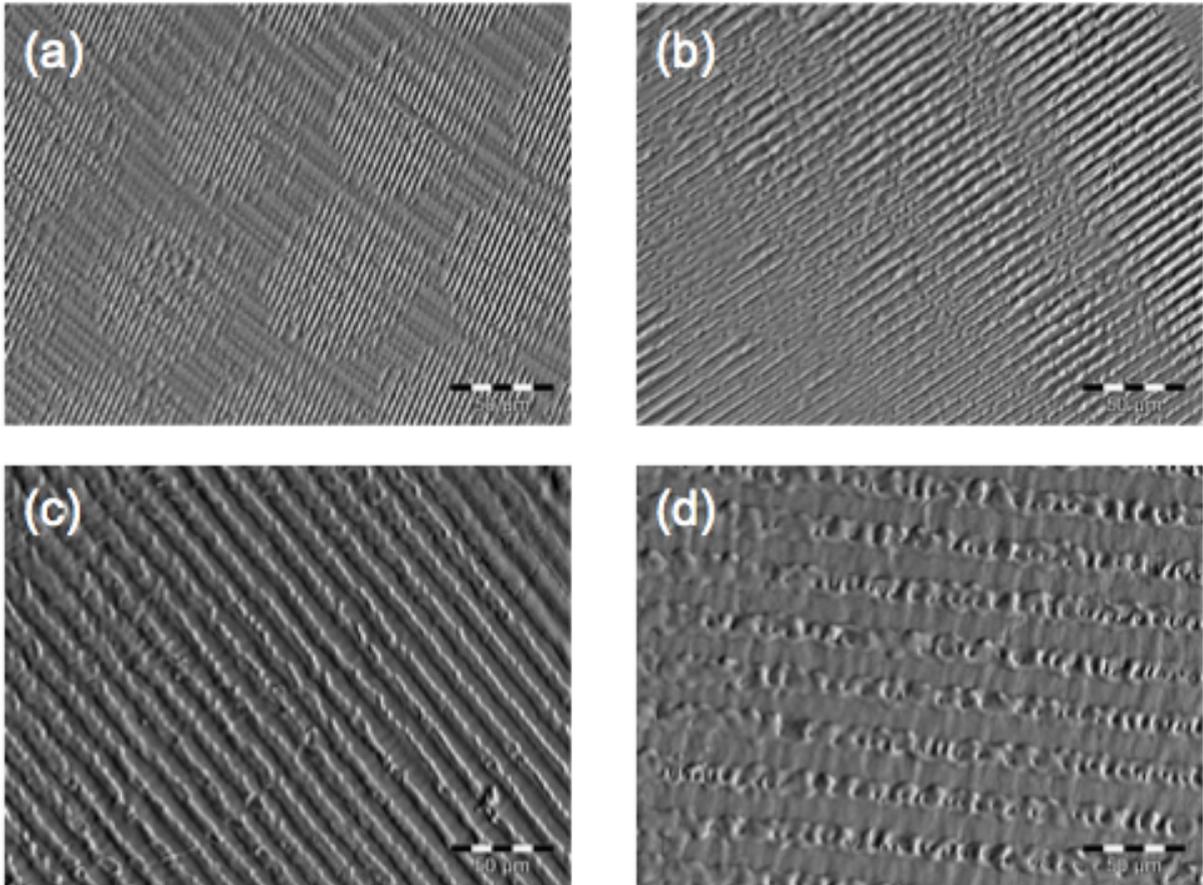
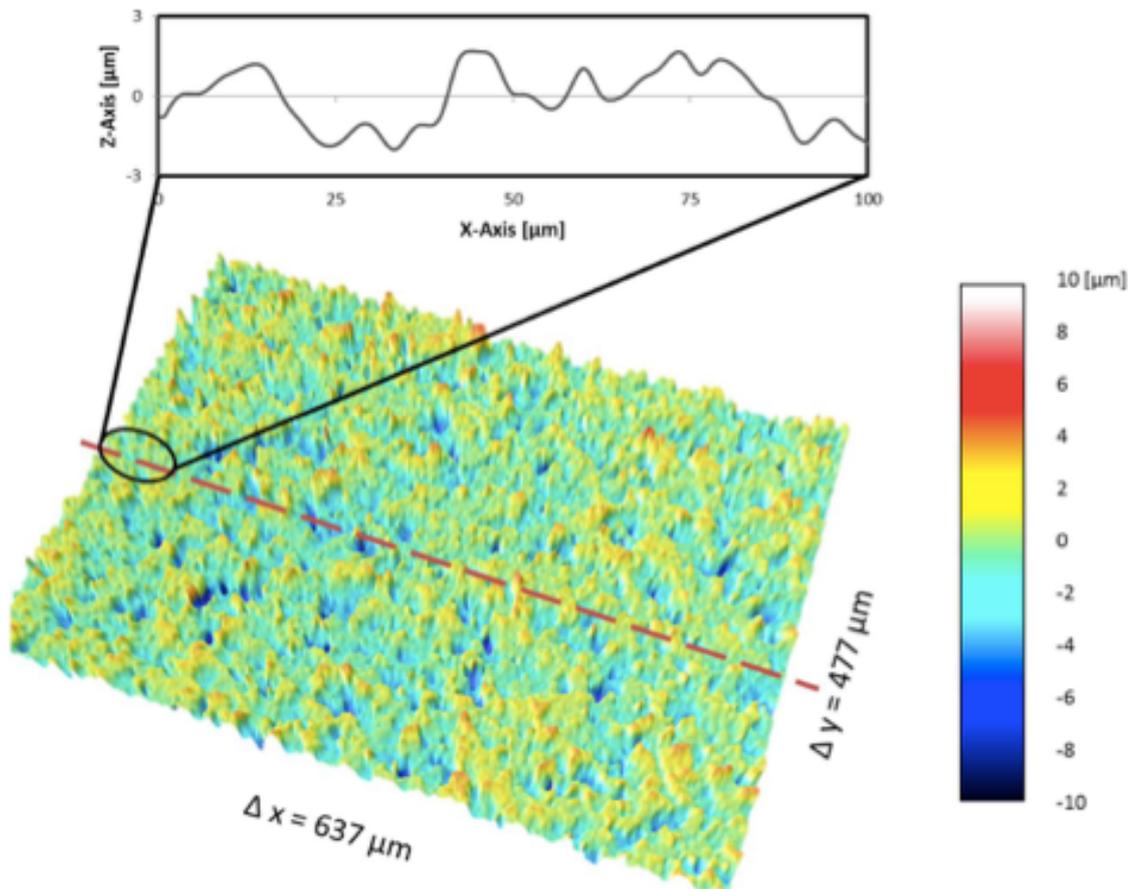


Abb. 5: Prinzip der DLIP, Überlagerung von zwei Laserstrahlen [18]



*Abb. 6: Beispiele für laserstrukturierte Oberflächen (a) 3  $\mu\text{m}$ , (b) 5  $\mu\text{m}$ , (c) 10  $\mu\text{m}$ , (d) 20  $\mu\text{m}$  [19]*



*Abb. 7: Referenz-Material Oberflächenanalyse [19]*

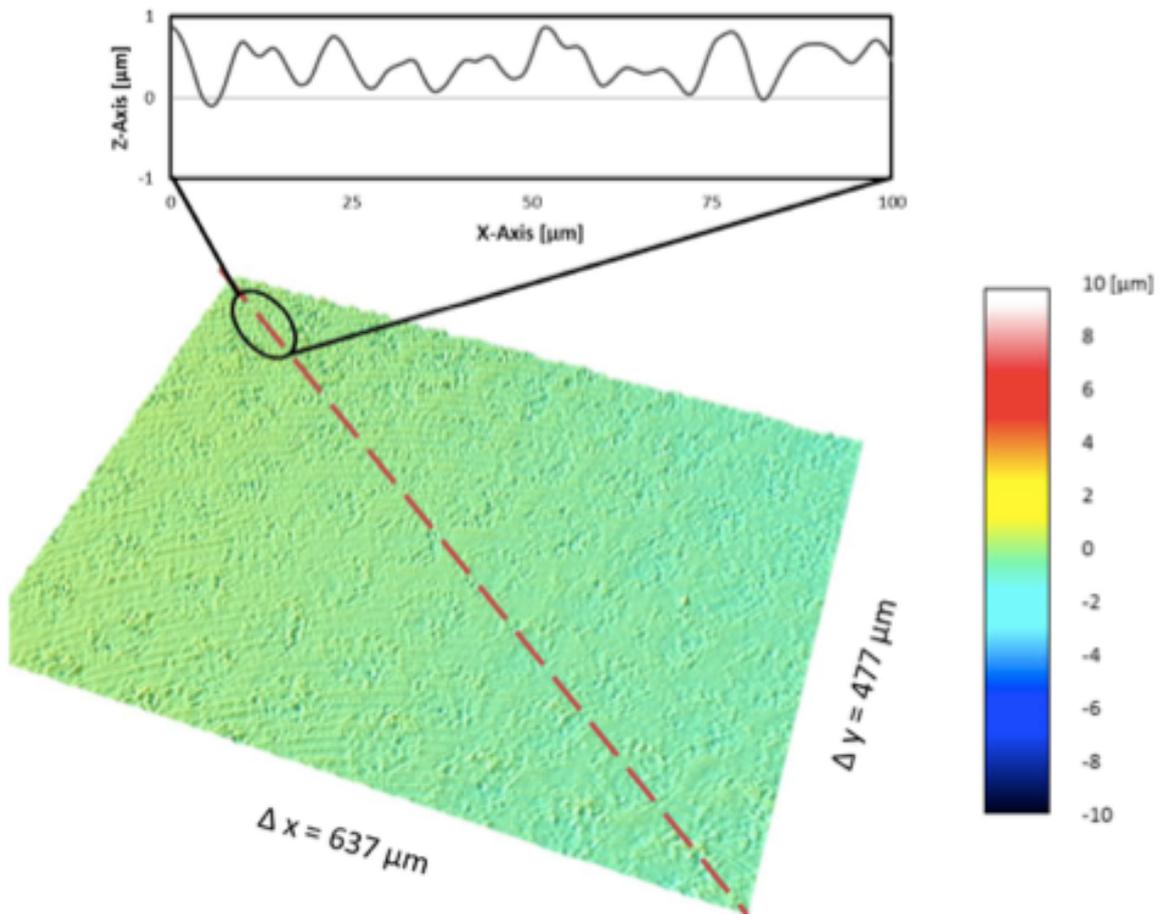


Abb. 8: DLIP 3µm Oberflächenanalyse [19]

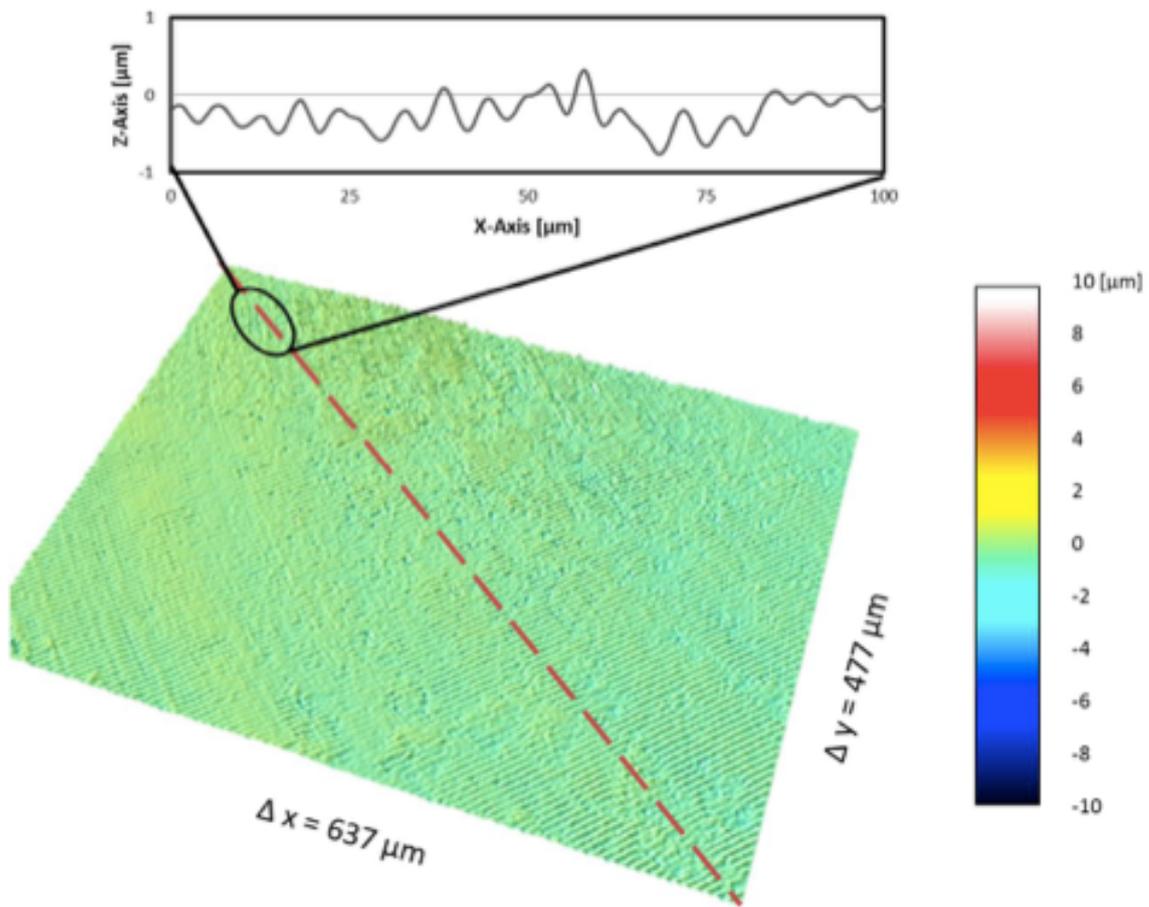


Abb. 9: DLIP 5µm Oberflächenanalyse [19]

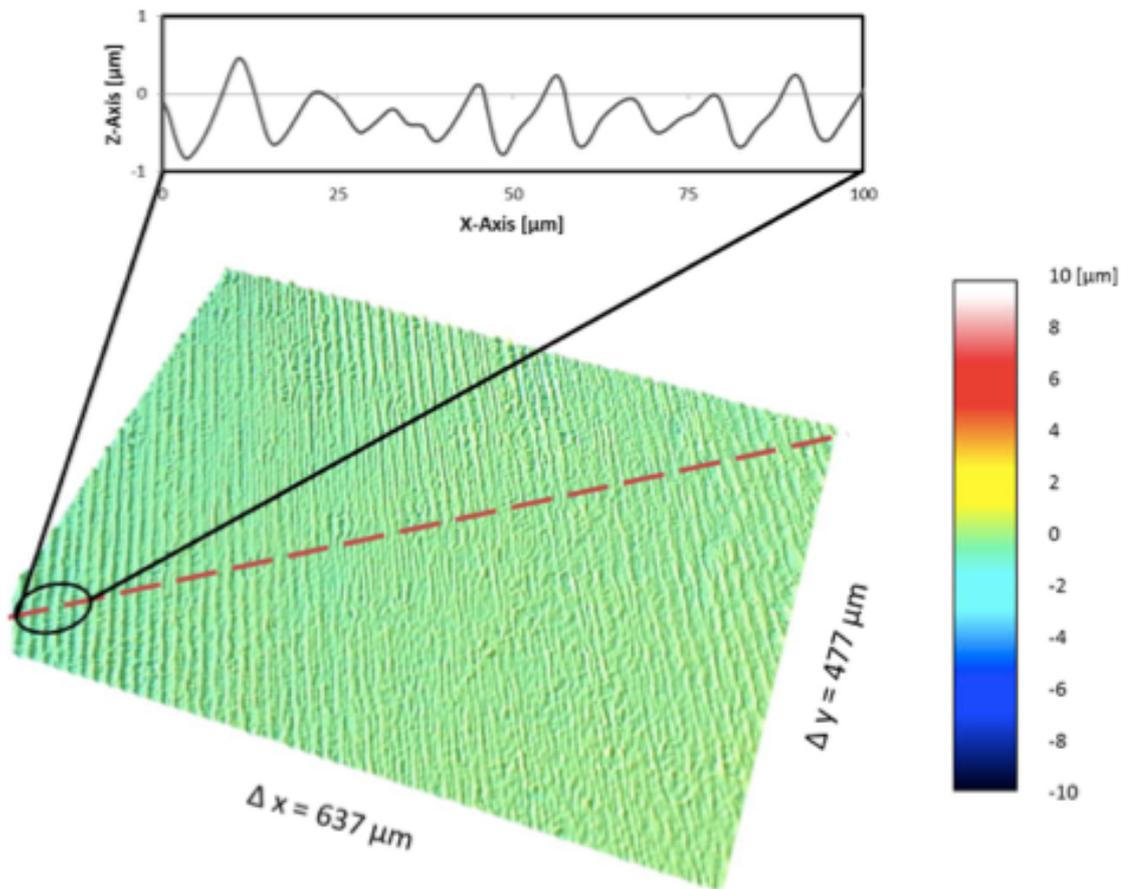


Abb. 10: DLIP 10µm Oberflächenanalyse [19]

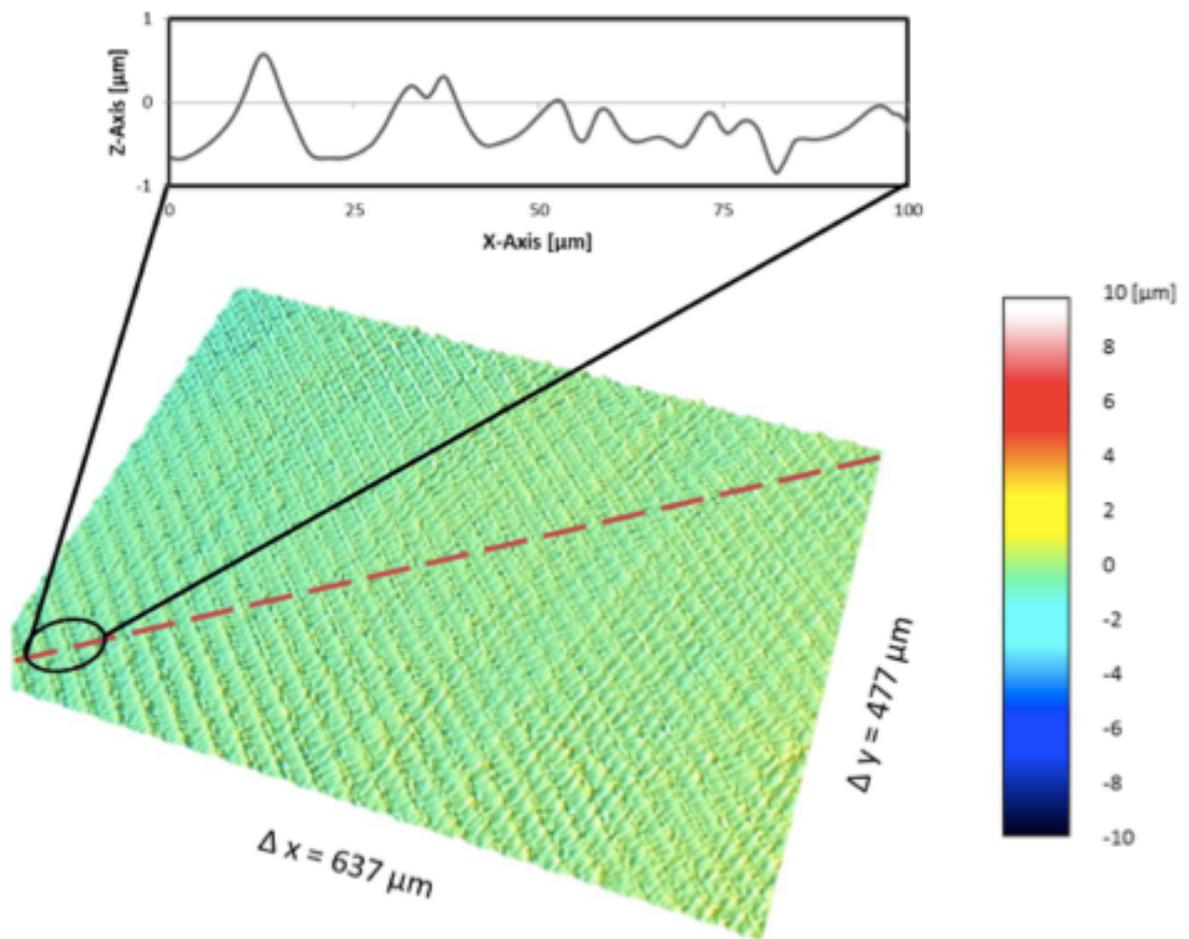


Abb. 11: DLIP 20µm Oberflächenanalyse [19]

## 2.4 Wissenschaftliche Anregung

Mehrere Studien belegen in *in vitro*-Versuchen, dass die Implantatoberfläche eine zentrale Rolle im Implantat-Knochen-Kontakt spielt; v. a. auf zellulärer Ebene [20-23].

Raue Oberflächen ( $S_a = 1-2 \mu\text{m}$ ) zeigten sich dabei besonders wirkungsvoll [20-25].

Weiterhin ließ sich *in vitro* und *in vivo* eine schnellere und bessere Osseointegration mit rauen Oberflächen im Vergleich mit unbearbeiteten Oberflächen nachweisen [20, 26-29].

Vor diesem Hintergrund wurden die Titanprüfkörper mit dem „Direct laser interference patterning“ - Verfahren bearbeitet. Die Untersuchung der Oberflächen, die auf diese Art und Weise verändert bzw. funktionalisiert wurden, ist Gegenstand dieser Dissertation.

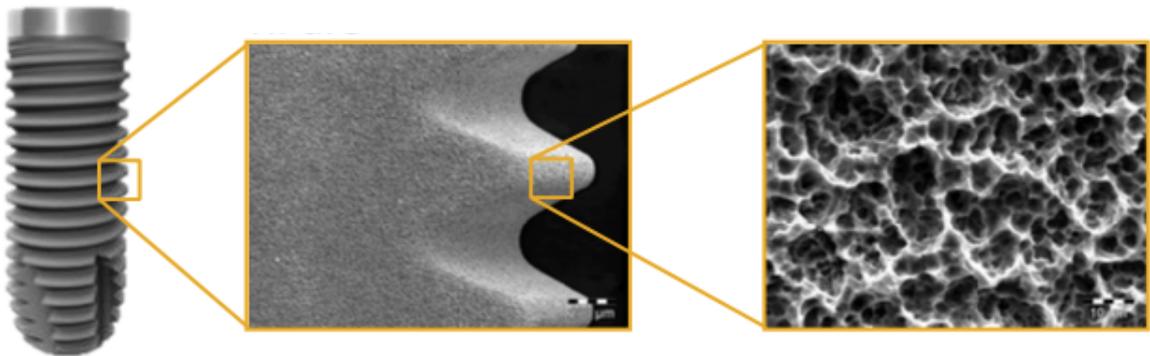
### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Materialien und Geräte

##### Titanprüfkörper und Oberflächenbearbeitung

Es wurden Prüfmuster mit den Bezeichnungen 150708-04 (3 $\mu$ m), 150401-04 (5 $\mu$ m), 150401-01 (10 $\mu$ m), 150331-01 (20 $\mu$ m) und Referenz-Material getestet. Dabei handelt es sich um zylindrische Titanprüfkörper (Titan Grad 4 [30]) mit den Dimensionen 11 mm Durchmesser und 1,5 mm Dicke. Die Prüfkörper sind einseitig strukturiert.

Bei dem Referenz-Material handelt sich um ein gestrahlt geätztes Titan Material, welches mit einer Oberflächenrauheit  $S_a = 1,7 \mu\text{m}$  die Osseointegration im Vergleich zu unbearbeiteten Titanoberflächen verbessert [17].



*Abb. 12: Gestrahlt geätzte Referenz-Material-Oberfläche mit  $S_a = 1,7 \mu\text{m}$  [17]*

Die Prüfmuster wurden bearbeitet zur Verfügung gestellt von BEGO Implant Systems GmbH & Co. KG. und steril verpackt in das Labor geliefert.

##### Positivkontrolle, toxische Kontrolle und andere Kontrollen

- Toxische Kontrolle: RMA-Prüfmuster (Polyurethan Film mit 0,1% zinc diethyldithiocarbamate (ZDEC) (Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, Japan)) gemäß der deutschen Fassung der EN ISO 10993-12:2010 extrahiert.
- Positivkontrolle: Zellkulturmedium in Plastik-Kulturoberfläche ohne vorherigen Kontakt zu Prüfmuster.
- Blank-Kontrolle: Zellkulturmedium ohne Zellen.
- Positivkontrolle für das live-dead-staining: Wako-Folie (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Cat.No.160-08893). Vorgeschlagen vom Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center.

## Geräte und Chemikalien

Für die Durchführung der Versuche wurden folgende Laborgeräte benötigt:

- I. Brutschrank (New Brunswick Scientific, innova CO-48-230)
- II. Sterilbank (Microflow Biological Safety Cabinet)
- III. Wasserbad (Kottermann)
- IV. Pipettierhilfe (pipetus, Hirschmann Loaborgeräte)
- V. Mikroskop mit Phasenkontrast
- VI. Fluoreszenzmikroskop (Nikon ECLIPSE TS 100)
- VII. Neubauer improved Zählkammer
- VIII. ELISA-Reader Bio Rad 680 mit Filtern für 410 nm, 450 nm, 650 nm, 655 nm, 690 nm
- IX. Tischzentrifuge Sigma 202 MK
- X. 12 Kanalpipette Rainin, 1-20 µl
- XI. 12 Kanalpipette Rainin, 20-200 µl

Für die Durchführung der Versuche wurden die folgenden Reagenzien/Materialien verwendet:

- I. T175 Zellkulturflaschen (Sarstedt Art. Nr.: 83.1812.002)
- II. Petri-Schalen (Sarstedt Art. Nr.:83.1801)
- III. 96 well Mikrotiterplatten mit Flachboden (Sarstedt, Art. Nr.: 83.1835)
- IV. 12 well Testkultur Testplatten 12 (TPP, Art. Nr.: 92412)
- V. 24 well Tissue Culture Plate, flat bottom (Sarstedt, Art. Nr.: 83.1836.500)
- VI. 6 well Tissue Culture Plate, flat bottom (Sarstedt, Art. Nr.: 83.1839)
- VII. 4 well Tissue Culture Plate, flat bottom (Sarstedt quadriPERM, Art. Nr.:94.6077.307)
- VIII. 50 ml Falcon tubes (Greiner, Art. Nr.: 227261)
- IX. 15 ml Falcon tubes (BD Falcon, Art. Nr.:352097)
- X. Isopropanol (Fluka Art. Nr.: 34965-1L)
- XI. MEM Medium (Gibco, Art. Nr.:31095-029)
- XII. 0.05% Trypsin-EDTA (1X), Phenol Red (Gibco, Art. Nr.: 25300-054)
- XIII. L-Glutamin, 200 mM (Sigma, Art. Nr.: G7513)
- XIV. DPBS (Gibco, Art. Nr.: 14190-094)
- XV. Penicillin/Streptomycin (Gibco, Art. Nr.: 15140-122)
- XVI. Fötale Kälberserum (Gibco, Art. Nr.: 10106-169)
- XVII. Trypanblau-Lösung (Sigma, Art. Nr.: T8154)

- XVIII. Sterile OP Tücher (Hartmann, Art. Nr.: 2523123)
- XIX. Sterile Handschuhe (Esteem, Art. Nr.:2D72PT75)
- XX. Toxische-Kontrolle RM-A: Polyurethan Film mit 0,1% zinc diethyldithiocarbamate (ZDEC) (Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, Japan)
- XXI. Positivkontrolle (plastic sheets, Wako Chemicals, Art. Nr.: 160-08893)
- XXII. L929-Zellen bezogen von der European Collection of Cell Culture (ECACC)
- XXIII. LDH Cytotoxicity Assay Kit (Promokine, PromoCell GmbH, Art. Nr.: PK-CA577-K313)
- XXIV. XTT-Assay Kit (Roche, Art. Nr.: 11465015001)
- XXV. BrdU-Assay Kit (Roche, Art. Nr.: 11647229001)
- XXVI. Fluorescein diacetate (FDA) (Sigma, Art. Nr.: F7378-5G )
- XXVII. Propidiumiodid (Sigma, Art. Nr.: P4170-10MG)
- XXVIII. Pasteurpipetten (Roth, Art. Nr. 4518.1)
- XXIX. 25 ml Serologische Pipette (Sarstedt, Art. Nr.: 86.1685.001)
- XXX. 10 ml Serologische Pipette (Sarstedt, Art. Nr.: 86.1254.001)
- XXXI. 5 ml Serologische Pipette (BD, Art. Nr.:356543)
- XXXII. Pipettenspitzen 0,1-10 µl (Sarstedt, Art. Nr.: 70.1130.210)
- XXXIII. Pipettenspitzen 20 µl (SafeSeal Tips Premium, Biozym, Art. Nr.: 692151)
- XXXIV. Pipettenspitzen 200 µl (SafeSeal Tips Premium, Biozym, Art. Nr.: 692069)
- XXXV. Pipettenspitzen 1000 µl (SafeSeal Tips Premium, Biozym, Art. Nr.: 692078)
- XXXVI. Mikro-Schraubröhre 2 ml, PP (Sarstedt, Art. Nr.: 72.693.005)
- XXXVII. Reagent reservoir; Disposable, Thermo Scientific No.:8086 (Fisher Scientific, Art. Nr.: 14-387-068)
- XXXVIII. Glasgefäße: Gewinde Schraubgläser Klarglas 10ml (Werner Hassa GmbH, Art. Nr.: 120010542)

### **Medium, Serum und Antibiotika**

Das Medium zur Kultivierung von L929 Zellen setzt sich aus den folgenden Bestandteilen zusammen:

- MEM Medium: Gibco, Art. Nr.: 31095-029
- L-Glutamin 200 mM: Sigma, Art. Nr.: G751
- Penicillin/Strptomycin: Gibco, Art. Nr.: 15140-122
- Fötale Kälberserum: Gibco, Art. Nr.: 10106-169

500 ml MEM werden mit 50 ml FBS (Endkonzentration 10 %), 5 ml Pen/Strep (Endkonzentration 100 units/ml Penicillin /100 µg/ml Streptomycin) sowie 5 ml L-Glutamin-Lösung (Endkonzentration 4 mM, MEM enthält schon 2 mM L-Glutamin) versetzt und bis zum Verbrauch ca. einen Monat lang bei 4°C gelagert.

Das Medium zur Kultivierung von MC3T3 Zellen setzt sich aus den folgenden Bestandteilen zusammen:

- MEM-Alpha Medium: Gibco, Art. Nr.: A10490-01
- Penicillin/Streptomycin: Gibco, Art. Nr.: 15140-122
- Fötale Kälberserum: Gibco, Art. Nr.: 10106-169

500 ml MEM-Alpha werden mit 50 ml FBS (Endkonzentration 10 %) und 5 ml Pen/Strep (Endkonzentration 100 units/ml Penicillin / 100 µg/ml Streptomycin) versetzt und bis zum Verbrauch für ca. einen Monat lang bei 4°C gelagert.

### **Zelllinie, Begründung der Auswahl und Bezugsquelle(n) der Zellen**

L929 Fibroblasten wurden von der European Collection of Cell Culture (ECACC) bezogen. Diese werden von der EN ISO 10993-5 aufgrund ihrer geringen Variabilität gegenüber äußeren und inneren Einflüssen empfohlen. MC3T3-Präosteoblasten dienen als Osteoblasten-Modell-Zellen und wurden von Dr. A. Jeschke aus dem Institut für Osteologie und Biomechanik am UKE zur Verfügung gestellt.

### 3.2 Durchführung der Versuche

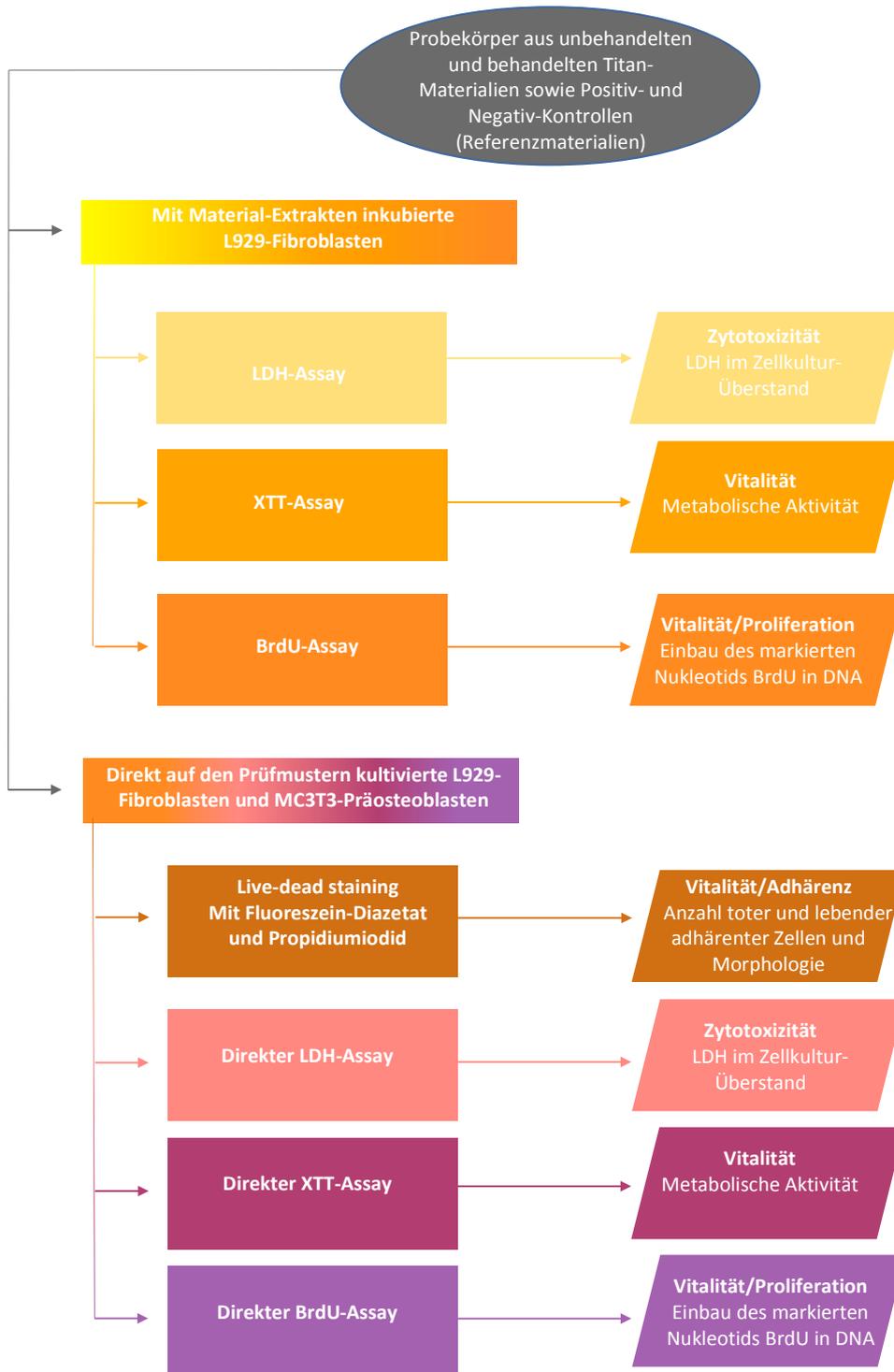


Abb. 13: Durchführung der Versuche

### 3.2.1 Vorbereitung der Zellkultur und Reagenzien

Alle Behältnisse, die während des Versuches mit den Zellen oder den Extrakten in Kontakt gekommen sind, mussten steril sein. Darüber hinaus wurde bei der Arbeit mit Zellen stets unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Es wurden immer Kittel und Handschuhe während der Durchführung der Versuche getragen. Alle selbst hergestellten Reagenzien (z.B. Medium) wurden mit Herstellungsdatum, Zusammensetzung und Herstellerinitialen beschriftet.

Für die Durchführung der Versuche wurde ein handschriftliches Begleitprotokoll geführt, welches u.a. Passagenummern der verwendeten Zellen enthält und einzelne Versuchsschritte dokumentiert.

Die Desinfektion der toxischen- und Positivkontrollen erfolgte unter der sterilen Werkbank mit sterilen Handschuhen und OP-Tüchern. Für die toxischen- und Positivkontrollen wurde jeweils eine Petrischale mit Isopropanol (100%) gefüllt. Die toxischen- und Positivkontrollen wurden in die Petrischale gelegt, sodass sie komplett von Isopropanol bedeckt waren. Nach 5 Minuten wurden die toxischen- und Positivkontrollen manuell aus der Petrischale genommen und für 10 Minuten auf dem OP-Tuch getrocknet.

Der WST Substrat Mix für den LDH-Assay wurde wie im Manual beschrieben angesetzt (Zugabe von 1,1 ml Aqua dest. Und 10 Minuten vortexen). Er ist bei 4°C für 2 Monate verwendbar.

Die Reagenzien für den XTT- und LDH Assay wurden steril aliquotiert. Nicht benötigte Aliquots des XTT Assays wurden bei -20°C eingefroren.

Die Zelllinien MC3T3 und L929 wurden in kontinuierlicher Routinekultur bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten. Dazu wurden T175 Zellkulturflaschen (250 ml) benutzt. Wenn der Zellrasen eine 80%-ige Dichte erreichte, wurden die Zellen passagiert. Es wurde zunächst das in der Zellkulturflasche befindliche Zellkulturmedium abgesaugt. Anschließend wurde der Zellrasen mit 10ml PBS-Lösung abgewaschen, um die Reste des Zellkulturmediums zu entfernen. Daraufhin wurden 4 ml Trypsin/EDTA-Lösung auf den Zellrasen gegeben und für 5 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubation wurde zu den nun abgelösten Zellen 4ml Zellkulturmedium hinzugegeben, um die Trypsinreaktion zu stoppen. Von dieser Zellsuspension wurden 1,5 ml in eine neue T175 Zellkulturflasche überführt und mit 20 ml Zellkulturmedium aufgefüllt.

Das Versuchsverfahren basiert auf der deutschen Fassung der EN ISO 10993-5: 2009. Die Begründung ist im internationalen Standard sowie der einschlägigen

Reproduzierbarkeit des Verfahrens zu suchen.

### 3.2.2 Extrakt-Analysen

Bei dieser Analyse geht es darum, die löslichen Elemente der Prüfmuster bezüglich deren Einfluss auf die Zellen zu untersuchen. Das Zellkulturmedium wurde vorweg mit den Prüfkörpern in Kontakt gebracht und anschließend den Zellen zugegeben. Zytotoxizität, Viabilität und Proliferation wurden danach gemessen.

#### *Herstellung der Extrakte*

Es wurden jeweils sieben Prüfkörper gleicher Art und Güte, RM-A Plättchen als toxische Kontrolle, welche der Fläche der Prüfkörper entsprechen, für  $72 \pm 2$  Stunden in wells einer 12 well-Platte in 1,88 ml in Extraktionsmedium bei  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  extrahiert. Außerdem wurden 1,88 ml Medium in Glasgefäßen als Positivkontrolle unter selben Bedingungen inkubiert [31]. Die Extraktionsbedingungen wurden gewählt, um eine Annäherung an die *in vivo* Situation implantierter Biomaterialien zu erreichen.

#### *Vorbereitung der Zellen*

Die Zellen wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn trypsiniert, gezählt und auf eine definierte Zelldichte gebracht.

Zunächst wurde mikroskopisch die Subkonfluenz und Zellmorphologie überprüft. Daraufhin wurde das Medium aus der Zellkulturflasche abpipettiert, 5 ml Trypsin wurden hinzugegeben und für 5 Minuten im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle der Zellen wurden 5 ml Medium hinzugegeben, um die Trypsinreaktion zu stoppen. Nach dem Trypsinieren wurden die Zellen mit einer Neubauer Zählkammer gezählt, die Zellsuspension bei 1500 rpm zentrifugiert und durch die Zugabe von Medium auf die gewünschte Zelldichte,  $1 \times 10^4$  Zellen pro 100  $\mu\text{l}$ , verdünnt.

100  $\mu\text{l}$ /well Zellsuspension (96 well Platte) wurden ausgesät und für 24h bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  im Brutschrank inkubiert.

Für BrdU-Assay und XTT-Assay wurden jeweils separate 96-well-Platten verwendet. Zusätzlich wurden wells mit Medium ohne Zellen zur Blank-Kontrolle vorbereitet.

Nach 24h Inkubation wurden die Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop auf Unregelmäßigkeit überprüft und untersucht, ob die gewünschte Zellmorphologie vorläge (gleichmäßige Zellverteilung und ein nicht-abgerundetes Erscheinungsbild). Unregelmäßigkeiten wurden protokolliert.

### *Auftragen der Extrakte auf die Zellen*

Unmittelbar nach der Extraktion (72h) wurden die Extrakte auf die besiedelten Platten aufgetragen. Zunächst wurde der Überstand aus jedem well mittels Mehrkanalpipette abpipettiert. Anschließend wurde 100µl Extrakt in jedes well überführt. Daraufhin wurde es für weitere 24h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach 24h Inkubation wurden die Zellen mikroskopisch auf Unregelmäßigkeiten und Zellmorphologie überprüft. Dabei war darauf zu achten, ob die Zellen abgerundet waren. Die mit dem Extrakt der toxischen Kontrolle inkubierten Zellen mussten, wie erwartet, abgerundet erscheinen. Unregelmäßigkeiten wurden protokolliert. Nach der Behebung und Auswertung der Assaydaten wurden diese mit den Aufzeichnungen der mikroskopischen Überprüfung abgeglichen.

### *LDH Assay*

Zunächst wurde der LDH Reaction Mix (200 µl WST Substrat Mix + 10ml LDH Assay Buffer) angesetzt. Anschließend wurden je 10 µl vom Überstand der mit Zellen und Extrakt inkubierten 96 well Platten für den XTT Assay in eine 96 well Platte überführt und 100 µl/well des LDH Reaction Mix zu den 10 µl hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach abgeschlossener Inkubation wurde die photometrische Messung durchgeführt. Die optische Dichte wurde bei 450 nm und 650 nm (Referenz) im Biorad 680 Microplate reader gemessen und anschließend in einer Microsoft-Excel Tabelle gespeichert.

### *XTT Assay*

Zunächst wurde der XTT labeling mixture (0,1ml electron-coupling + 5ml XTT labeling reagent) angesetzt. 50 µl/well der XTT labeling mixture für 4h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubation wurde die photometrische Messung bei 450 nm und 650 nm (Referenz) im Biorad 680 Microplate reader durchgeführt und in einer Microsoft-Excel Tabelle gespeichert.

### *BrdU Assay*

Zunächst wurde die BrdU labeling solution (BrdU labeling reagent 1:100 mit Zellkulturmedium verdünnt) angesetzt. 10µl/well der BrdU labeling solution pipettiert und für 2h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und es wurden 200µl/well des FixDenat pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und es wurden 100µl/well der anti-BrdU-POD working solution pipettiert (Anti-BrdU-POD stock solution 1:100

mit der antibody delution solution verdünnt) und für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und es wurden 3x200 µl/well washing solution pipettiert und jeweils 5 Minuten inkubiert und wieder abgesaugt. 100 µl/well der substrat solution pipettiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 25 µl/well des 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pipettiert und gut vermischt. Daraufhin wurde zeitnah die optische Dichte bei 450 nm und 690 nm (Referenz) im Biorad 680 Microplate reader gemessen und in einer Microsoft-Excel Tabelle gespeichert.

### 3.2.3 Direkte Analysen

Zur Untersuchung von Einflüssen durch den Kontakt von Zellen und den Materialien wurden L-929-Fibroblasten und MC3T3-Präosteblasten direkt auf je drei (MC3T3) und sieben (L929) Prüfkörper gleicher Art und Güte geprüft. Dieses Verfahren ermöglicht neben einer Bestimmung von direkten zytotoxischen Einflüssen auch die Bestimmung der Zell-Adhäsion an die Prüfkörper mittels live-dead-staining.

#### *Live-dead-staining*

Die Zellen wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn trypsiniert und gezählt. Nach Ansatz der Zellsuspension, mit einer Zelldichte von  $6,3 \times 10^4/\text{cm}^2$  ( $1,56 \times 10^5/\text{ml}$ ) in 806 µl (entspricht  $3 \text{ cm}^2/\text{ml}$  Zellsuspension auf den Prüfkörperoberflächen), wurde auf jedes Prüfmuster in einer 24 well Platte 806µl pipettiert.

Nach Auftragen der Zellen wurden die Prüfmuster für 24h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach 24h Inkubation wurden die Zellen mikroskopisch auf Unregelmäßigkeiten und Zellmorphologie überprüft, dabei war darauf zu achten, ob die Zellen abgerundet waren. Die mit der toxischen Kontrolle inkubierten Zellen mussten, wie erwartet, abgerundet erscheinen. Unregelmäßigkeiten wurden protokolliert.

Für die Vitalfärbung wurde zunächst die FDA (Fluorescein diacetate) Stock-Lösung angesetzt. Dafür wurden 5 mg/ml in Aceton gelöst. Für die FDA Arbeitslösung wurden weiterhin 40 µl FDA Stock-Lösung in 10 ml PBS pipettiert und gut gemischt. Der Rest der FDA Stock-Lösung wurde bei -20°C in einem lichtundurchlässigen Röhrchen gelagert.

Für die PI (Propidium iodide) Stock-Lösung wurden 50 µg/ml in PBS gelöst.

Nach Ansetzen der FDA Arbeitslösung und der PI Stock-Lösung wurden 500 µl/well der FDA Arbeitslösung und 60 µl/well der PI Stock-Lösung pipettiert, vorsichtig geschwenkt und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation

wurde der Prüfkörper vorsichtig mit einer Pinzette aus dem well genommen und in PBS vorsichtig bewegt, um die Adhäsion zu überprüfen. Anschließend wurde der Prüfkörper auf einem quadriPERM sofort mit einem aufrechten Fluoreszenzmikroskop mikroskopiert.

Zunächst wurden, unter Verwendung einer 4fach Vergrößerung, Übersichtsaufnahmen gemacht. Anschließend wurden unter Verwendung einer 10fach Vergrößerung und weiterhin unter einer 20fach Vergrößerung weitere Aufnahmen gemacht. Bei den Aufnahmen wurden stets 5 unterschiedliche Bereiche aufgenommen: Randposition 12 Uhr, Randposition 3 Uhr, Randposition 6 Uhr, Randposition 9 Uhr und die Mitte des Prüfkörpers. Außerdem war darauf zu achten, dass der Raum abgedunkelt war, der Shutter möglichst nur kurz geöffnet und zügig gearbeitet wurde, um die Photobleichung zu minimieren.

Zum Zählen der Zellen auf den LDS Bildern mit der Zelllinie L929 wurde das Programm ImageJ verwendet. Die LDS Bilder wurden in der 4fachen Vergrößerung gezählt.

Da bei den LDS Bildern mit der Zelllinie L929 eine Bildhälfte dunkler erschien und die Zellen somit nicht ausreichend erfasst wurden, wurde die hellere Bildhälfte zum zählen der Zellen ausgewählt. Es wurden je 3 Ausschnitte pro Prüfkörper gezählt. Anschließend wurden die Werte in einer Microsoft-Excel Tabelle gespeichert.

Zum Zählen der Zellen auf den LDS Bildern mit der Zelllinie MC3T3 eignete sich das Programm ImageJ nicht, da die Zellgrenzen und somit die einzelnen Zellen nicht ausreichend vom Programm erkannt wurden. Aus diesem Grund wurden die Zellen auf den LDS Bildern mit der Zelllinie MC3T3 in der 10fachen manuell gezählt. Die gezählten Zellen wurden farbig markiert, um eine Doppelzählung zu vermeiden. Es wurden je 3 Ausschnitte pro Prüfkörper gezählt.

Anschließend wurden die Werte in einer Microsoft-Excel Tabelle gespeichert.

### **Direkte LDH-, XTT- und BrdU-Assays**

Zur quantitativen Bestimmung von direkten Einflüssen der Materialien wurden L929-Fibroblasten direkt auf je sieben Prüfkörper gleicher Art und Güte pro Mess-Zeitpunkt, mit einer Zelldichte von  $6,3 \times 10^4/\text{cm}^2$  ( $1,56 \times 10^5/\text{ml}$ ) in 806  $\mu\text{l}$  (entspricht  $3 \text{ cm}^2/\text{ml}$  Zellsuspension auf Prüfkörperoberfläche), auf jedes Prüfmuster sowie toxische- und Positivkontrollen in einer 24 well Platte (806  $\mu\text{l}/\text{well}$ ) ausgesät. Nach Auftragen der Zellen wurden die Prüfmuster für 24h im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert.

Nach 24±2 Stunden und 48±2 Stunden Inkubation wurden die Zellen mikroskopisch auf Unregelmäßigkeiten und Zellmorphologie überprüft, wobei darauf zu achten war, ob die Zellen abgerundet waren. Die mit der toxischen Kontrolle inkubierten Zellen mussten, wie erwartet, abgerundet erscheinen. Unregelmäßigkeiten wurden protokolliert. Daraufhin erfolgten die Assays, jeweils zu den Messzeitpunkten nach 24±2 Stunden und 48±2 Stunden.

#### *LDH Assay*

Es wurden je 10 µl Zellkulturüberstand aus den Inkubationen für den XTT Assay in eine 96 well Platte pipettiert und 100 µl LDH Reaction Mix dazugegeben. Anschließend wurde sie well Platte für 30 Minuten abgedeckt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die photometrische Messung bei 450 nm und 650 nm (Referenz) im Biorad 680 Microplate reader durchgeführt und in einer Microsoft-Excel Tabelle gespeichert.

#### *XTT Assay*

Zunächst wurde die XTT labeling mixture (0,1ml electron-coupling + 5ml XTT labeling reagent) angesetzt. 0,5 ml/well der XTT labeling mixture Pipettiert und für 4h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubation wurden je 100 µl des Überstandes in ein well einer 96 well Platte überführt und die photometrische Messung bei 450 nm und 650 nm (Referenz) im Biorad 680 Microplate reader durchgeführt und in einer Microsoft-Excel Tabelle gespeichert.

#### *BrdU Assay*

Zunächst wurde die BrdU labeling solution (BrdU labeling reagent 1:100 mit Zellkulturmedium verdünnt) angesetzt. 100 µl/well der BrdU labeling solution pipettiert und für 2h im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und 1 ml/well FixDenat pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und 1 ml/well anti-BrdU-POD working solution (Anti-BrdU-POD stock solution 1:100 mit der antibody delution solution verdünnt) pipettiert und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und 3x1 ml/well washing solution pipettiert und für jeweils 5 Minuten inkubiert und wieder verworfen. 1 ml/well substrat solution pipettiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 25 µl 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/well (96 well Platte) pipettiert und mit der nun farbigen Substratlösung gut vermischt. Daraufhin wurde

zeitnah die optische Dichte bei 450 nm und 690 nm (Referenz) im Biorad 680 Microplate reader gemessen und in einer Microsoft-Excel Tabelle gespeichert.

### **3.2.4 Statistische Auswertung**

Bei jedem Assay wurde zuerst der Mittelwert aus den 4 Blank-replicates berechnet. Ein Blank enthält nur Medium und keine Zellen. Dieser Wert ergibt den Baseline Wert der Assays und wurde von den entsprechenden Werten abgezogen. Für jedes Prüfmuster wurden der Mittelwert und die Standardabweichung aus den Werten der Replikate berechnet und zur graphischen Darstellung verwendet.

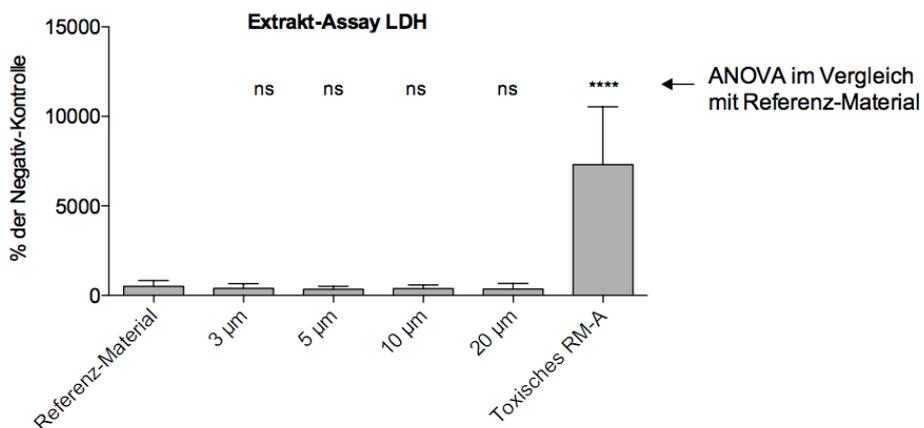
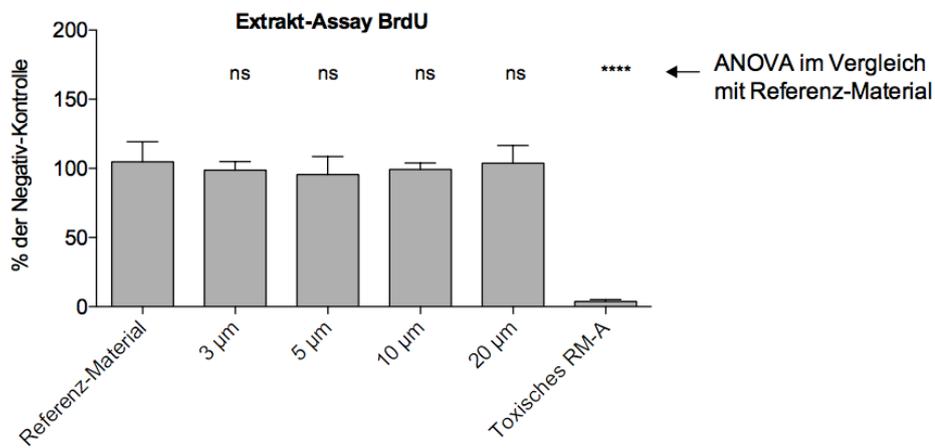
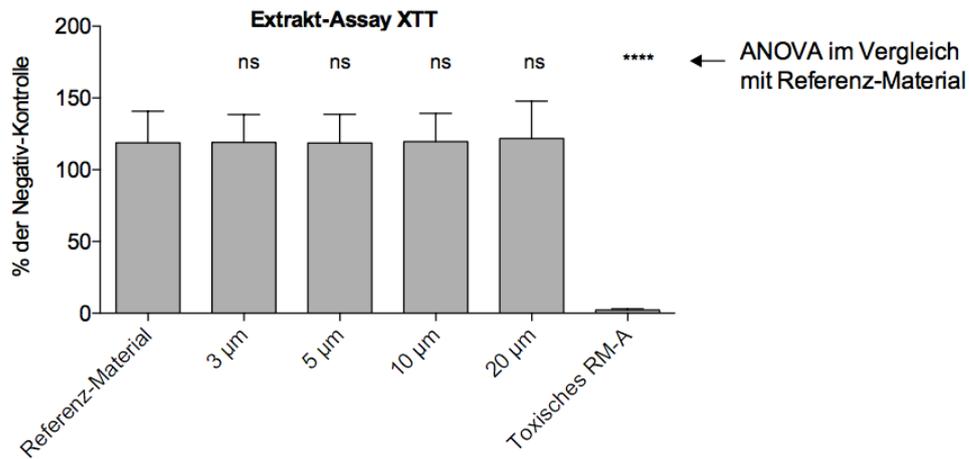
Zum Vergleich der Prüfmuster und Kontrollen wurden ANOVA-Analysen mit anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Graphpad Prism 5.

Die Zellzahlen aus den Live-dead-stainings der Prüfmuster und Kontrollen wurden mit einer one way ANOVA-Analyse mit anschließender Bonferroni-Korrektur ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Graphpad Prism 5.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 indirekte Effekte

Der XTT- und BrdU-Assay weisen vergleichbare Werte bei den Zellen auf, welche im Medium des jeweiligen Prüfkörpers inkubiert waren. D.h. es sind keine Effekte der Prüfkörper-Extrakte auf Viabilität und Proliferation der Zellen zu beobachten. Die sehr geringen Werte bei XTT und BrdU und die deutlich erhöhten Werte beim LDH-Assay des toxischen RM-A bestätigen, dass die Assays funktionieren.

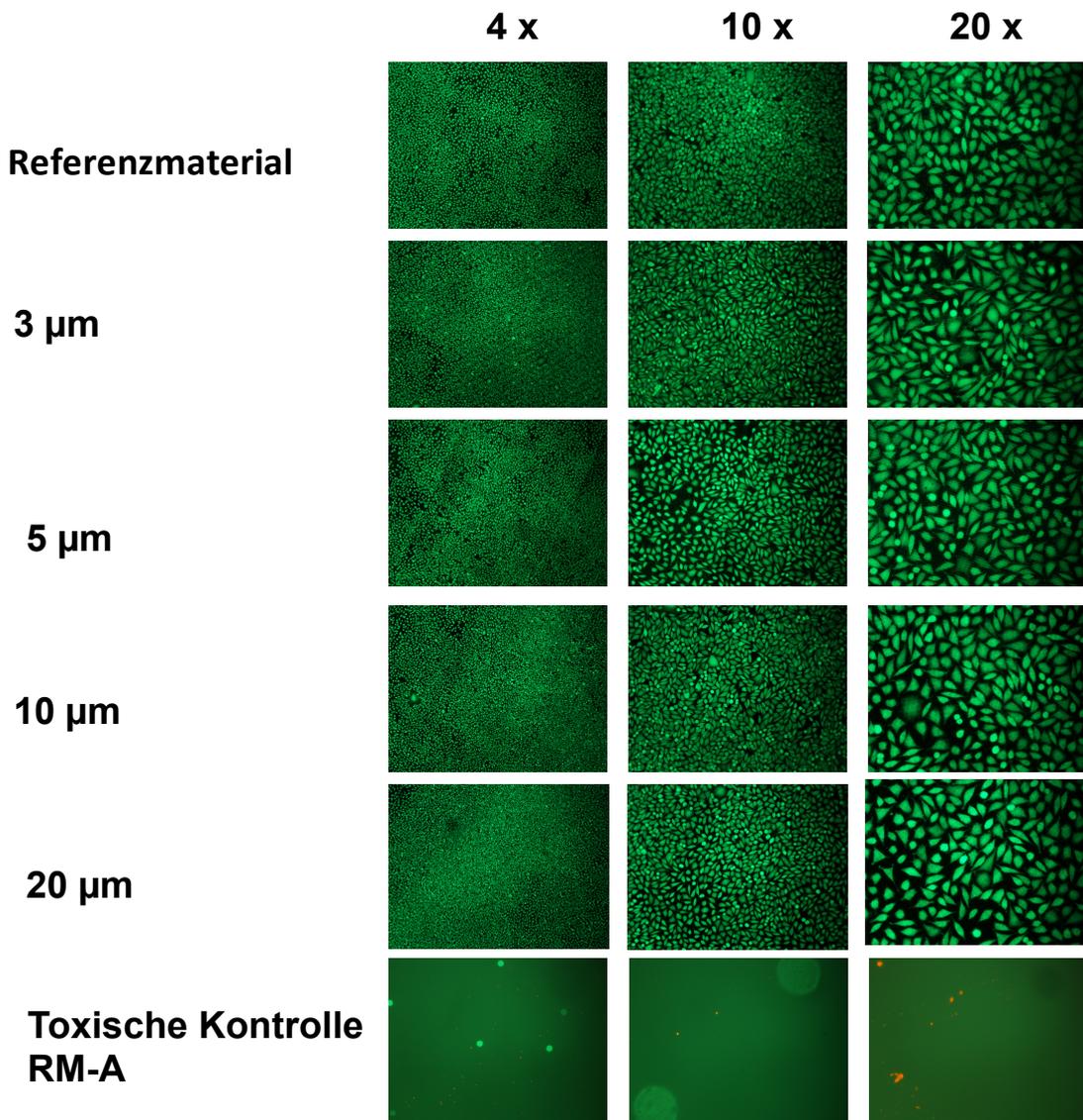


**Abb. 14: Ergebnisse der Extrakt-Analysen.** Gezeigt sind jeweils Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Ergebnisse einer ANOVA-Analyse mit anschließender Bonferroni Korrektur für den Vergleich mit dem Referenz-Material werden über dem Plot aufgeführt. ns: Nicht signifikant

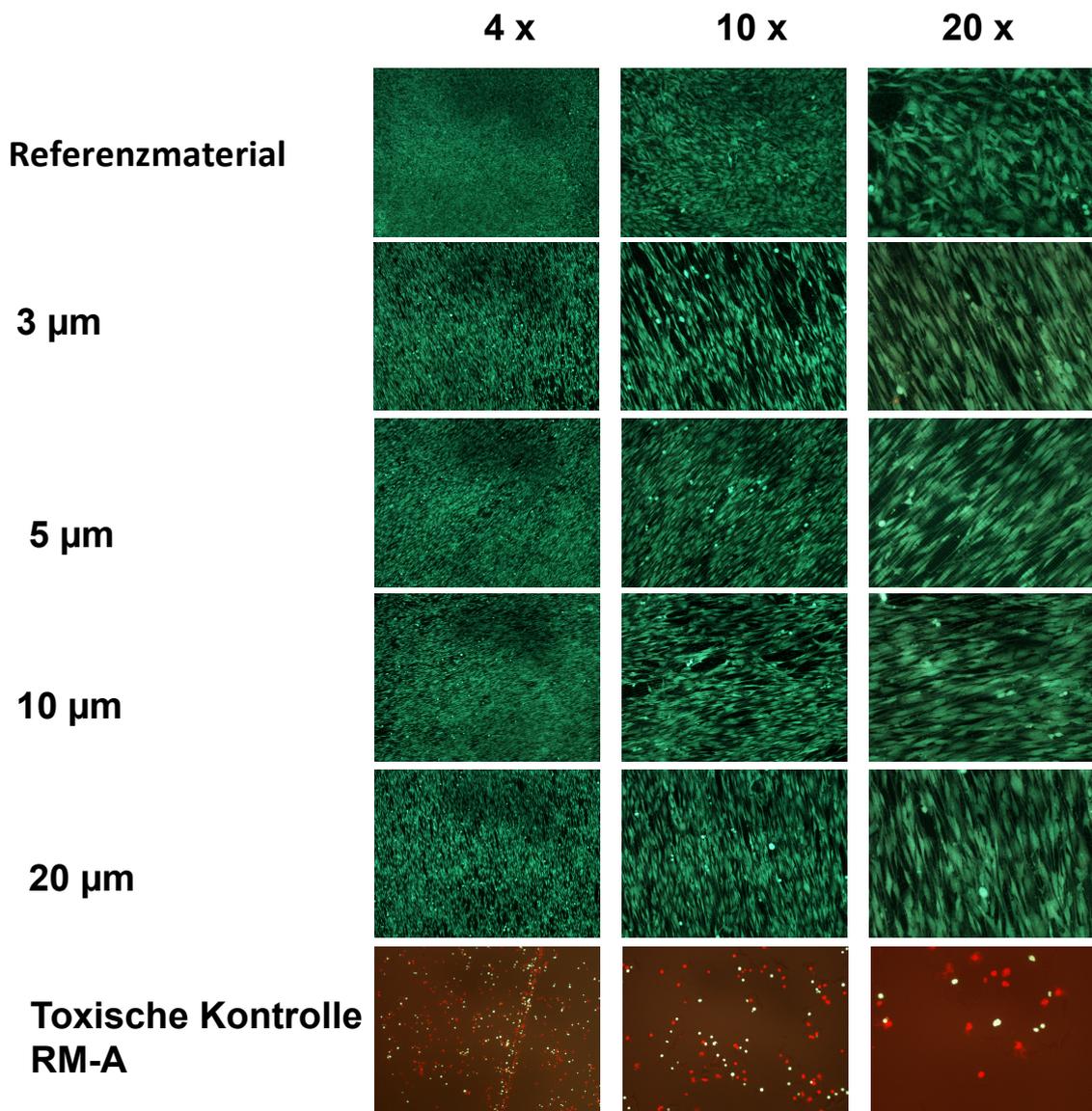
## 4.2 Zell-Adhäsion

Im Live-dead-staining sind auf allen Titan-Materialien fast ausschließlich vitale grüne Zellen und keine toten roten Zellen zu sehen. Weiterhin ist sowohl bei den MC3T3- als auch bei den L929-LDS eine charakteristische Zellmorphologie der grünen Zellen zu beobachten. Optisch sind keine Unterschiede der laserstrukturierten Materialien zu dem nicht-laserstrukturierten Referenz-Material ersichtlich.

Dagegen weist die toxische RM-A Kontrolle kaum (L929) bzw. keine (MC3T3) grünen Zellen auf. Nur vereinzelt waren rote Zellen zu sehen.



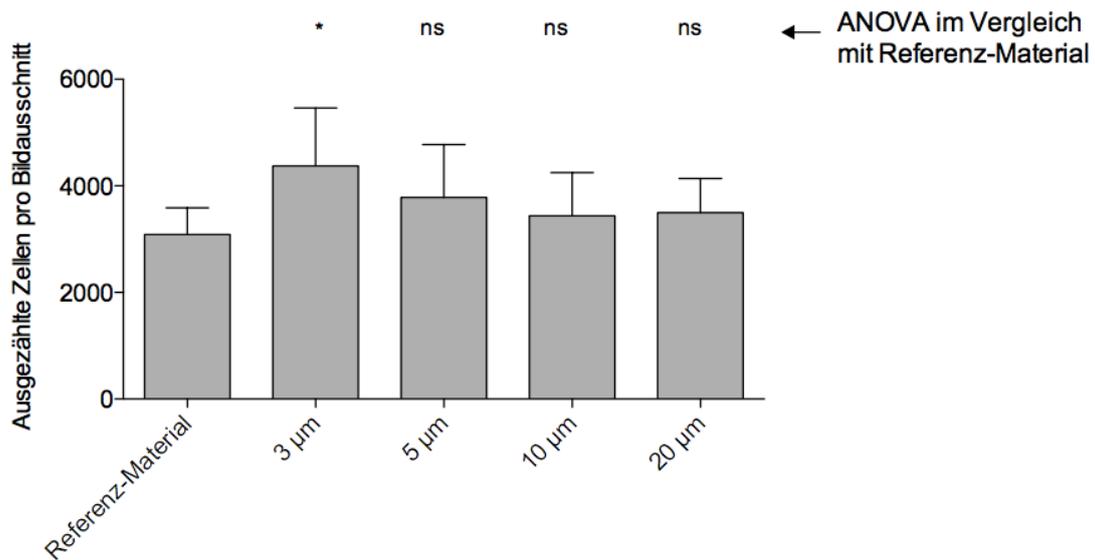
*Abb. 15: Live-dead-staining-Analysen für L-929-Fibroblasten.* Gezeigt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der besiedelten Titanprüfkörper in 4x, 10x und 20x Vergrößerung.



**Abbildung 16: Live-dead-staining-Analysen für MC3T3-Praosteoblasten.** Gezeigt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der besiedelten Titanprüfkörper in 4x, 10x und 20x Vergrößerung.

Nach einer genauen Auszählung ist eine signifikant erhöhte Zellzahl von L929 auf den 3 μm strukturierten Prüfkörpern im Vergleich zu dem Referenz-Material ( $p \leq 0,05$ ) festzustellen. Auch auf den größeren Dimensionen der strukturierten Prüfkörper (5 μm, 10 μm und 20 μm) wurden tendenziell mehr L929 Zellen gezählt als auf dem Referenz-Material; hier ist jedoch der Unterschied statistisch nicht signifikant.

### Auszählung live-dead staining / Adhärenzbestimmung mit L929 Zellen

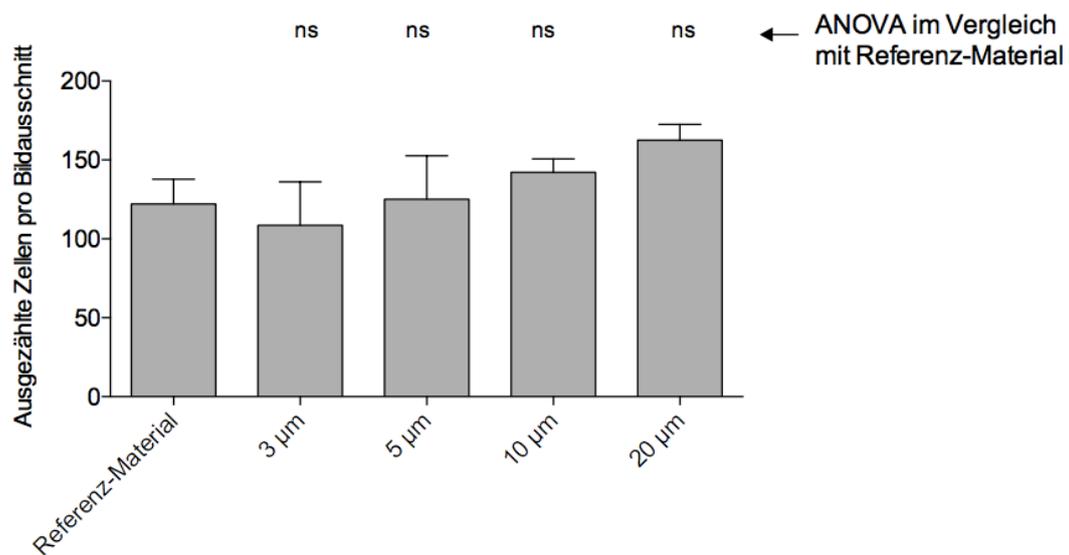


**Abbildung 17: Auszählung der vitalen L929 Zellen.** Gezeigt sind jeweils Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Ergebnisse einer ANOVA-Analyse mit anschließender Bonferroni Korrektur für den Vergleich mit dem Referenz-Material werden über dem Plot aufgeführt.

ns: Nicht signifikant, \*:  $p \leq 0.05$ .

Bei den MC3T3 Zellen zeigt auch die Auszählung keinen signifikanten Unterschied zwischen den modifizierten Prüfkörpern und dem Referenz-Material. Auf den Prüfkörpern in der Dimension 3 µm zeigten sich tendenziell leicht weniger adhärenente Zellen im Vergleich zum Referenz-Material. Auf den Prüfkörpern der Dimension 5 µm, 10 µm und 20 µm zeigten sich dagegen tendenziell mehr adhärenente Zellen im Vergleich zum Referenz-Material.

### Auszählung live-dead staining / Adhärenzbestimmung mit MC3T3 Zellen



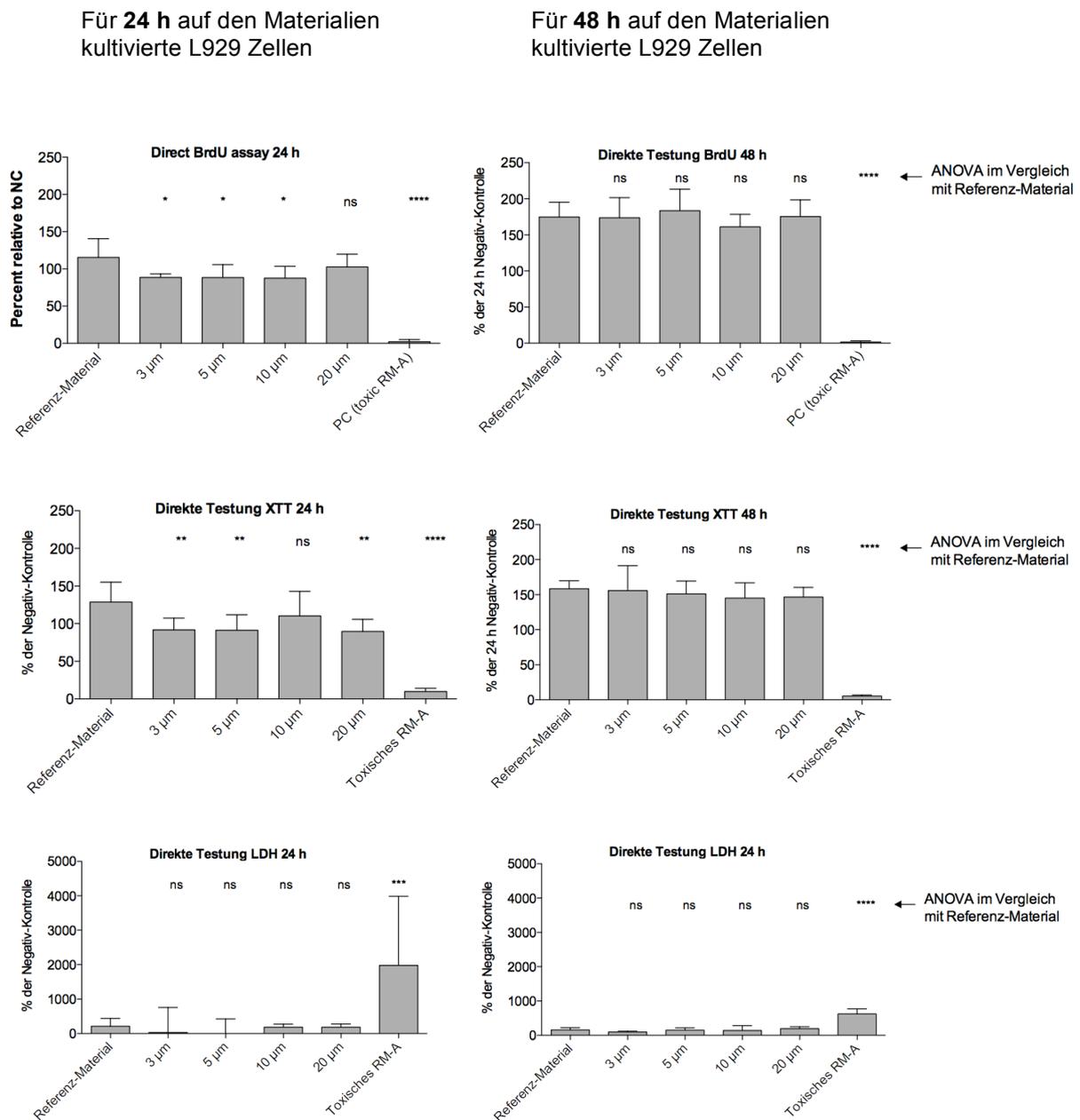
**Abbildung 18: Auszählung der vitalen MC3T3 Zellen.** Gezeigt sind jeweils Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Ergebnisse einer ANOVA-Analyse mit anschließender Bonferroni Korrektur für den Vergleich mit dem Referenz-Material werden über dem Plot aufgeführt.

ns: Nicht signifikant.

### 4.3 Direkte Effekte

Die Zellen auf den modifizierten Prüfkörpern zeigen nach 24 h eine geringere Viabilität/Proliferation im Vergleich zu den Zellen auf dem Referenz-Material. Eine erhöhte Toxizität wurde jedoch nicht gemessen.

Nach 48 h sind keine Unterschiede mehr feststellbar.



**Abbildung 19: Viabilität und Proliferation der Zellen auf den Prüfkörper sowie die Toxizität der Prüfkörper.** Gezeigt sind jeweils Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Ergebnisse einer ANOVA-Analyse mit anschließender Bonferroni Korrektur für den Vergleich mit dem Referenz-Material werden über dem Plot aufgeführt.

ns: Nicht signifikant, \*:  $p \leq 0.05$ .

## 5. Diskussion

### Assays und Methoden

Die nachweisbar starke Zytotoxizität der toxischen RM-A Folie, die kaum messbare Viabilität und Proliferation der Zellen auf der RM-A Folie und das Fehlen von lebendigen Zellen auf der RM-A Folie zeigen, dass alle Assays und Methoden funktionieren.

### Indirekte Effekte der Titan-Prüfkörper

Alle Titan-Materialien sind in den Extrakt-Assays unauffällig und unterscheiden sich kaum von der Positivkontrolle. Somit sind keine zytotoxischen, viabilitäts- oder proliferations-hemmenden Effekte durch die Material-Extrakte nachweisbar. Daher ist eine gute Zytokompatibilität aller Titan-Materialien festzustellen.

### Zell-Adhäsion

Im Live-dead-staining sind auf allen Titan-Materialien fast ausschließlich vitale (grüne) und kaum tote (rote) Zellen erkennbar. Auch sind auf allen Titanmaterialien Zellen mit Zelltyp-charakteristischer Morphologie erkennbar, was für eine gute Zell-Adhäsion spricht. Das gilt sowohl für die L-929-Fibroblasten, als auch für die MC3T3-Präosteoblasten. Insgesamt zeigen die live-dead-stainings eine sehr gute Zytokompatibilität aller Titan-Materialien.

Eine genaue Auszählung ergab eine signifikant höhere Zahl der L929 Zellen auf den in der Dimension 3 µm strukturierten Probekörpern als auf dem Referenz-Material ( $p \leq 0.05$ ), was für eine bessere Adhäsion der Zellen an der modifizierten Oberfläche spricht. Bei den MC3T3 Zellen konnte diese Verbesserung der Adhäsion jedoch nicht bestätigt werden. Im Gegenteil, tendenziell wurden weniger Zellen gezählt, wobei der Unterschied nicht statistisch signifikant war.

### Direkte Effekte

Die Laser-strukturierten Materialien zeigen eine leicht verminderte Viabilität/Proliferation der Zellen nach 24 h im BrdU- und im XTT-Assay im Vergleich mit dem Referenz-Material, aber keine Zytotoxizität (LDH-Assay). Die Verminderung der Viabilität/Proliferation nach 24 h ist zwar signifikant im Vergleich mit dem Referenz-Material, fällt aber deutlich schwächer aus als die in der EN ISO 10993-5 als Grenze zur Toxizität definierten 70% der Positivkontrolle. Nach 48 h sind keine

Unterschiede mehr feststellbar.

Wie auch auf den live-dead-staining Ergebnissen zu sehen, sind nach 24 Stunden die Zellen sehr dicht gewachsen. Nach 48 h Stunden haben sie wahrscheinlich schon Konfluenz erreicht.

#### **Adhäsionsvariabilitäten der L929- und MC3T3 Zellen**

Die Anzahl an lebendigen L929 Zellen und den MC3T3 Zellen zeigen eine entgegengesetzte Tendenz bei der Zelladhäsion bzw. -anheftung an die Prüfkörper. Das ist am deutlichsten auf den 3 µm strukturierten Oberflächen festzustellen. Während bei L929 signifikant mehr Zellen angeheftet waren, fiel die Anzahl bei MC3T3 geringer aus. Dabei ist jedoch zu beachten, dass bei MC3T3 nur die Zellen auf 3 Prüfkörpern gezählt wurden, während bei L929 die Zellen auf 7 Prüfkörper gezählt wurden. Die Ergebnisse der L929 Zellen sind daher verlässlicher.

Im weiteren Verlauf wären weitere Versuchsdurchgänge mit einer größeren Probenzahl notwendig, um die Auszählung beider Zellreihen vergleichen zu können.

#### **Fehlende Überlegenheit der DLIP modifizierten Oberflächen**

Die vergleichbare Toxizität, Viabilität und Proliferation der modifizierten Prüfkörper und dem Referenz-Material lassen auf keine Überlegenheit der DLIP modifizierten Oberflächen im Vergleich zu dem Referenz-Material schließen. Mit dem Ziel, eine Verbesserung der Zytokompatibilität und Osseointegration durch Funktionalisierung der Implantatoberfläche zu erreichen, gilt es, weitere Oberflächenmodifikationen herzustellen und *in vitro* zu testen. Unter diesen potentiellen Oberflächenmodifikationen könnte es Kandidaten geben, welche eine Verbesserung der Zytokompatibilität und Osseointegration von Implantaten darstellen.

### **5.5 Literaturvergleich**

Wie schon zuvor erwähnt, wurde in mehreren Studien in *in vitro*-Versuchen belegt, dass die Implantatoberfläche sowohl auf zellulärer als auch molekularer Ebene eine zentrale Rolle im Implantat-Knochen Kontakt spielt [20-23].

Raue Oberflächen ( $Sa = 1-2 \mu m$ ) zeigten sich dabei besonders wirkungsvoll. Es zeigte sich, dass eine raue Oberfläche die Osseointegration dahingehend verbessert, dass eine Verbesserung der Zellulären Antwort erreicht wurde, was sich in einer zytoskeletalen Organisation und Zelldifferenzierung auf der Implantatoberfläche zeigt [20-25].

Weiterhin ließ sich im Vergleich mit unbearbeiteten Oberflächen *in vitro* und *in vivo*

eine schnellere und bessere Osseointegration mit rauen Oberflächen nachweisen [20, 26-29].

Heutzutage gibt es eine Reihe an Oberflächenmodifikationen, wie zum Beispiel Sandblasting [24], acid-etching [25, 32, 33], Anodisation/Oxidation [34] oder Calcium-Phosphate Kristall Deposition [35, 36].

Direct metal laser sintering (DMLS) ist eine weitere Technologie, welche es erlaubt, Oberflächen zu bearbeiten und sogar komplexe 3D Objekte anhand vorgefertigter Computermodelle zu erstellen [20].

Zwahr et al. verwendeten ebenso das DLIP Verfahren und verglichen es in den Dimensionen 5  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$  und 20  $\mu\text{m}$  mit blasting und acid-etching. Die Zellviabilität (humane Osteoblasten) war nach einer Inkubation von 7 Tagen 16% höher als bei den Vergleichsgruppen. Die chemische Charakterisierung zeigte darüber hinaus einen erhöhten Anteil von Stickstoff in der reaktiven Titanoberfläche von 3,9% auf 23,4% [37].

Roitero et al. untersuchten das DLIP Verfahren in einer parametrischen Studie, um die Bearbeitung von Zirconiumoberflächen zu objektivieren. Sie konnten beobachten, dass sich mittels DLIP auf Zirconium eine Linienstrukturierung mit minimalem Materialschaden durchführen ließ [38]. Titanoberflächen hingegen wiesen keine strukturellen Oberflächenschäden nach DLIP Strukturierung auf [37].

Trisi, et al. verglichen *in vivo* laserbearbeitete Titanprüfkörper mit unbearbeiteten Titanprüfkörpern. Die Prüfkörper wurden für 8 Wochen im Beckenknochen von Schafen implantiert und danach histomorphometrisch und biomechanisch verglichen. Es zeigte sich ein 30% höherer Knochen-Implantat-Kontakt (bone-implant contact, BIC) bei den laserbearbeiteten Titanprüfkörpern und damit eine verbesserte Osseointegration im Vergleich zu den unbearbeiteten Titanprüfkörpern [39].

Radmanesh, et al. untersuchten ebenso den Einfluss laserbearbeiteter Oberflächen von Titanprüfkörpern. Die Titanprüfkörper wurden mit verschiedenen Laserfrequenzimpulsen bearbeitet und anschließend mit Fibroblasten besiedelt. Die mit verschiedenen Frequenzen bearbeiteten Oberflächen wurden mit unbehandelten verglichen. Es zeigte sich trotz erhöhter Oxidation der laserbearbeiteten Titanoberflächen eine höhere Zelldichte auf den unbearbeiteten Titanoberflächen, mit Ausnahme der laserbearbeiteten Titanoberflächen, welche mit einer Laserimpulsfrequenz von 25 kHz bearbeitet wurden. Hier wurde eine verbesserte Zellkolonisation nach 72h beobachtet [40].

Hyzy SL et al. kombinierten Laser Sinterung (LS) mit anderen Oberflächenmodifikationen und zeigten eine Verbesserung der Osseointegration. Dabei zeigte sich eine Überlegenheit der Kombination aus LS und grit blasting und LS, grit blasting und acid-etching gegenüber glatter oder nur LS Oberflächen [41].

Kim et al. verglichen 4 verschiedene modifizierte Titanimplantatoberflächen: unbearbeitete, „Modi-anodized“ (Sandblasting, acid-etching und Anodisation), Anodisiert und SLA (Sandblasting und acid-etching). Die *in vitro*- und *in vivo*-Versuche zeigten eine Überlegenheit der „Modi-anodized“-Oberfläche im Vergleich zu den anderen Oberflächenmodifikationen. *In vitro* zeigte sich eine verbesserte Zelladhäsion und *in vivo* wurde eine verbesserte Osseointegration festgestellt [28].

Ou, Hsu et al. verglichen 3 verschieden modifizierte Titanimplantatoberflächen, unbearbeitet, SLA und „SLAffinity“ (Elektrochemische Oxidation und SLA). Es zeigte sich in den *in vivo*-Versuchen eine Überlegenheit der „SLAffinity“-Oberfläche. Nach 2 und 8 Wochen konnte eine höhere Knochenakkumulation auf dem Implantat beobachtet werden, was für eine frühere und verbesserte Osseointegration im Vergleich zu den anderen Oberflächenmodifikationen spricht [27]

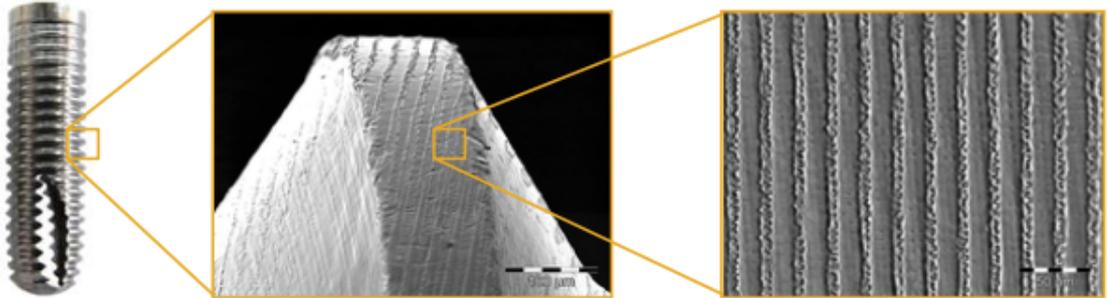
Chiang, Hsu et al. untermauern die Aussagen der zuvor vorgestellten Studie [26].

Zusammenfassend lässt sich aus dem Literaturvergleich schließen, dass bestimmte modifizierte Implantatoberflächen, nicht modifizierten Implantatoberflächen hinsichtlich der Zelladhäsion und BIC und damit der Osseointegration überlegen sind [24-29, 32, 39, 42]. Weiterhin zeigt sich, dass die Kombination aus verschiedenen Oberflächenmodifikationen den einzelnen Oberflächenmodifikationen hinsichtlich der Osseointegration überlegen ist [26-28, 41].

DLIP bearbeitete Titanoberflächen sind nach eigener Datenerhebung und Literaturvergleich Sandblasting, acid-etching und SLA im Hinblick auf Zellviabilität und Zelladhäsion tendenziell überlegen [37]. Weiterhin ist das Verfahren auch für andere dentale Materialien, wie zum Beispiel Zirconium, anwendbar [38]. Jedoch fehlen bisher Studien, die signifikante Vorteile *in vitro* und/oder *in vivo* belegen.

Die bakterielle Adhäsion an Implantaten ist ein weiterer interessanter und wichtiger Faktor, welcher sowohl die Osseointegration als auch die allgemeine Wundheilung beeinflussen kann. Neben der Interaktion zwischen Implantat und Knochen ist die Interaktion zwischen Bakterien und Implantat ebenso Gegenstand der Forschung und ein weiterer wichtiger Co-Faktor, welcher neben der Oberflächenbearbeitung zur Verbesserung der Osseointegration berücksichtigt werden sollte.

Dies war jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit. Im Hinblick darauf sollten nach signifikanter Verbesserung der Osseointegration weitere Versuche bezüglich der bakteriellen Adhäsion durchgeführt werden.



*Abb. 20: Beispiel einer laserstrukturierte Implantatoberfläche [17]*

## 6. Zusammenfassung

Die Verbesserung des Knochen-Implantat-Kontaktes kann die Osseointegration des Implantates begünstigen und den Einheilungsprozess nach der Implantation beschleunigen. Dafür ist die Oberflächenmodifikation von Implantaten eine vielversprechende Strategie. Modifizierte Implantatoberflächen werden zunächst *in vitro* hinsichtlich ihrer Zytokompatibilität getestet.

In der vorliegenden Arbeit wurden Titan-Prüfkörper mit modifizierten Oberflächen in vier verschiedenen Struktur-Dimensionen untersucht. Die Oberflächenmodifikationen wurden durch „direct laser interference patterning“ realisiert. Die Zytotoxizität der Prüfkörper, sowie die Vitalität und Proliferation von Zellen der Zelllinie L929 in Kontakt mit den Prüfkörpern oder Extrakten der Prüfkörper wurden gemessen. Desweiteren wurden die Adhäsion und die Morphologie von L929- und MC3T3-Zellen auf den Oberflächen der Prüfkörper mittels live-dead-staining untersucht. Als Referenz wurden Titan-Prüfkörper aus dem Referenz-Material mituntersucht.

Die Titan-Prüfkörper mit Oberflächenmodifikation zeigten nur geringe Unterschiede im Vergleich zu dem Referenz-Material. Auch zwischen den modifizierten Oberflächen mit verschiedenen Mikrostrukturierungen in den Dimensionen 3, 5, 10 und 20  $\mu\text{m}$  wurden keine deutlichen Unterschiede festgestellt.

Die Ergebnisse zeigten keine deutliche Überlegenheit der Oberflächenmodifikationen durch „direct laser interference patterning“ in den getesteten Dimensionen 3, 5, 10 und 20  $\mu\text{m}$  im Vergleich zur Referenz. Im Ausblick sollten weitere Oberflächenmodifikationen mit größeren Struktur-Dimensionen, z. B. bis zu 100  $\mu\text{m}$ , und mit anderen verschiedenen Oberflächentopographien erstellt und *in vitro* getestet werden.

## 7. Abstract

The improvement of the bone-to-implant contact can promote the osseointegration of the implant and accelerate the healing process after implant placement. The surface modification of implants is a promising strategy for this purpose. Modified implant surfaces are first tested in vitro for their cytocompatibility.

In the present work, titanium test specimens with modified surfaces in four different structural dimensions were investigated. The surface modifications were realized by "direct laser interference patterning". The cytotoxicity of the specimens as well as the vitality and proliferation of cells of cell line L929 in contact with the specimens or extracts of the specimens were measured. Furthermore, the adhesion and morphology of L929 and MC3T3 cells on the surfaces of the specimens were investigated by live dead staining. As a reference, titanium specimens from the reference material were also examined.

The titanium specimens with surface modification showed only minor differences compared to the reference material. No significant differences were found between the modified surfaces with different microstructures in the dimensions 3, 5, 10 and 20  $\mu\text{m}$ .

The results showed no clear superiority of the surface modifications by "direct laser interference patterning" in the tested dimensions 3, 5, 10 and 20  $\mu\text{m}$  compared to the reference. In the future, further surface modifications with larger structure dimensions, e.g. up to 100  $\mu\text{m}$ , and with other different surface topographies should be created and tested in vitro.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

BIC	Bone-to-Implant-contact
BrdU	Bromodeoxyuridine
DLIP	Direct Laser Interference Patterning
DMLS	Direct metal laser sintering
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	Fetal bovin serum
FDA	Fluorescein diacetate
LDH	Lactatdehydrogenase
LDS	Live-dead-staining
LS	Laser sintering
Nd:YAG	Neodymium-doped yttrium aluminium garnet
PBS	Phosphate - Buffered saline
PI	Propidiumiodid
RM-A	Polyurethan Film mit 0,1% ZDEC
Sa	Oberflächenrauheit
SLA	Sandblasting und acid-etching kombiniert

XTT sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis  
(4methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate

ZDEC Zinc diethyldithiocarbamate

## 9. Literaturverzeichnis

1. Was ist ein Zahnimplantat. [cited 2016 2016-12-13 14:30:37]; Available from: <http://www.bego.com/de/implantologie-loesungen/service/patientenbereich/das-abc-der-implantologie/was-ist-ein-zahnimplantat/>.
2. Zahn-Implantate Patienteninformation. [cited 2016 13.12.2016, 15:03 Uhr]; Available from: [http://www.bego.com/fileadmin/user\\_downloads/Mediathek/Implants/Patienten/Patienteninformations-Broschuere\\_BEGO-Implant-Systems.pdf](http://www.bego.com/fileadmin/user_downloads/Mediathek/Implants/Patienten/Patienteninformations-Broschuere_BEGO-Implant-Systems.pdf).
3. Nomura, T., S. Shingaki, and T. Nakajima, *Current evaluation of dental implants: a review of the literature*. J Long Term Eff Med Implants, 1998. **8**(3-4): p. 175-92.
4. Romeo, E., et al., *Long-term clinical effectiveness of oral implants in the treatment of partial edentulism. Seven-year life table analysis of a prospective study with ITI dental implants system used for single-tooth restorations*. Clin Oral Implants Res, 2002. **13**(2): p. 133-43.
5. Lambrecht, J.T., et al., *Long-term evaluation of submerged and nonsubmerged ITI solid-screw titanium implants: a 10-year life table analysis of 468 implants*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2003. **18**(6): p. 826-34.
6. Buser, D., et al., *Long-term evaluation of non-submerged ITI implants. Part 1: 8-year life table analysis of a prospective multi-center study with 2359 implants*. Clin Oral Implants Res, 1997. **8**(3): p. 161-72.
7. Kapur, K.K., et al., *A randomized clinical trial comparing the efficacy of mandibular implant-supported overdentures and conventional dentures in diabetic patients. Part I: Methodology and clinical outcomes*. J Prosthet Dent, 1998. **79**(5): p. 555-69.
8. Marra, R., et al., *Rehabilitation of Full-Mouth Edentulism: Immediate Loading of Implants Inserted With Computer-Guided Flapless Surgery Versus Conventional Dentures: A 5-Year Multicenter Retrospective Analysis and OHIP Questionnaire*. Implant Dent, 2017. **26**(1): p. 54-58.
9. Eichner, K. and C. Stecklina, *[Study of the atrophy of the jaws]*. Fogorv Sz, 1994. **87**(9): p. 255-60.
10. Thoma, D.S., et al., *Marginal bone-level alterations of loaded zirconia and titanium dental implants: an experimental study in the dog mandible*. Clin Oral Implants Res, 2016. **27**(4): p. 412-20.
11. Kohal, R.J., et al., *Osteoblast and bone tissue response to surface modified zirconia and titanium implant materials*. Dent Mater, 2013. **29**(7): p. 763-76.
12. Sollazzo, V., et al., *Anatase coating improves implant osseointegration in vivo*. J Craniofac Surg, 2007. **18**(4): p. 806-10.
13. Gotman, I., *Characteristics of metals used in implants*. J Endourol, 1997. **11**(6): p. 383-9.
14. Branemark, P.I., *Osseointegration and its experimental background*. J Prosthet Dent, 1983. **50**(3): p. 399-410.
15. Mavrogenis, A.F., et al., *Biology of implant osseointegration*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2009. **9**(2): p. 61-71.
16. Schenk, R.K. and D. Buser, *Osseointegration: a reality*. Periodontol 2000, 1998. **17**: p. 22-35.
17. T. Brinkmann, N.G., M. große Holthaus, N.Giannini, D. Langheinrich, A. Lasagni, *Charakterisierung der Eigenschaften laserstrukturierter Titan-*

- Oberflächen und deren Einfluss auf das in-vitro Verhalten von Osteoblasten.* MSE.
18. Lasagni, A.s.F. *Grossflächige Herstellung von Mikro- und Submikrometerstrukturen, Oberflächenfunktionalisierung mit direkter Interferenz.* [cited 2016 14.12.2016, 17:18 Uhr]; Available from: [https://www.iws.fraunhofer.de/content/dam/iws/de/documents/publikationen/infoblaetter/800-2\\_interferenzstruktur\\_de.pdf](https://www.iws.fraunhofer.de/content/dam/iws/de/documents/publikationen/infoblaetter/800-2_interferenzstruktur_de.pdf).
  19. Hartjen, P., et al., *Cytocompatibility of Direct Laser Interference-patterned Titanium Surfaces for Implants.* In Vivo, 2017. **31**(5): p. 849-854.
  20. Mangano, F., et al., *Direct metal laser sintering titanium dental implants: a review of the current literature.* Int J Biomater, 2014. **2014**: p. 461534.
  21. Aljateeli, M. and H.L. Wang, *Implant microdesigns and their impact on osseointegration.* Implant Dent, 2013. **22**(2): p. 127-32.
  22. Wennerberg, A. and T. Albrektsson, *Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review.* Clin Oral Implants Res, 2009. **20 Suppl 4**: p. 172-84.
  23. Shalabi, M.M., et al., *Implant surface roughness and bone healing: a systematic review.* J Dent Res, 2006. **85**(6): p. 496-500.
  24. Piattelli, A., et al., *Histologic and histomorphometric analysis of the bone response to machined and sandblasted titanium implants: an experimental study in rabbits.* Int J Oral Maxillofac Implants, 1998. **13**(6): p. 805-10.
  25. Klokkevold, P.R., et al., *Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in the rabbit.* Clin Oral Implants Res, 1997. **8**(6): p. 442-7.
  26. Chiang, H.J., et al., *Early bone response to machined, sandblasting acid etching (SLA) and novel surface-functionalization (SLAffinity) titanium implants: characterization, biomechanical analysis and histological evaluation in pigs.* J Biomed Mater Res A, 2016. **104**(2): p. 397-405.
  27. Ou, K.L., et al., *Osseointegration of titanium implants with SLAffinity treatment: a histological and biomechanical study in miniature pigs.* Clin Oral Investig, 2016. **20**(7): p. 1515-24.
  28. Kim, M.H., et al., *Cell adhesion and in vivo osseointegration of sandblasted/acid etched/anodized dental implants.* Int J Mol Sci, 2015. **16**(5): p. 10324-36.
  29. Yeo, I.S., *Reality of dental implant surface modification: a short literature review.* Open Biomed Eng J, 2014. **8**: p. 114-9.
  30. F67-13, A. *Standard Specification for Unalloyed Titanium, for Surgical Implant Applications (UNS R50250, UNS R50400, UNS R50550, UNS R50700).* 2013 [cited 2016 05.12.2016].
  31. 10993-12, D.E.I., *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 12: Sample preparation and reference materials (ISO 10993-12:2012).* German version of EN ISO 10993-12:2012, International Organisation for Standardization, 2012.
  32. Shah, F.A., et al., *Direct communication between osteocytes and acid-etched titanium implants with a sub-micron topography.* J Mater Sci Mater Med, 2016. **27**(11): p. 167.
  33. Mangano, C., et al., *Immediate loading of modified acid etched dental implants in postextraction sockets: a histological and histomorphometrical comparative study in nonhuman primate Papio ursinus.* Implant Dent, 2009. **18**(2): p. 142-50.

34. Ivanoff, C.J., et al., *Histologic evaluation of bone response to oxidized and turned titanium micro-implants in human jawbone*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2003. **18**(3): p. 341-8.
35. Sul, Y.T., C.B. Johansson, and T. Albrektsson, *Oxidized titanium screws coated with calcium ions and their performance in rabbit bone*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2002. **17**(5): p. 625-34.
36. LeGeros, R.Z., *Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates*. Clin Orthop Relat Res, 2002(395): p. 81-98.
37. Zwahr, C., et al., *Laser Surface Patterning of Titanium for Improving the Biological Performance of Dental Implants*. Adv Healthc Mater, 2016.
38. Roitero, E., et al., *A parametric study of laser interference surface patterning of dental zirconia: Effects of laser parameters on topography and surface quality*. Dent Mater, 2016.
39. Trisi, P., et al., *Laser-Treated Titanium Implants: An In Vivo Histomorphometric and Biomechanical Analysis*. Implant Dent, 2016. **25**(5): p. 575-80.
40. Radmanesh, M., et al., *Mouse embryonic fibroblasts accumulate differentially on titanium surfaces treated with nanosecond laser pulses*. Biointerphases, 2016. **11**(3): p. 031009.
41. Hyzy, S.L., et al., *Novel hydrophilic nanostructured microtexture on direct metal laser sintered Ti-6Al-4V surfaces enhances osteoblast response in vitro and osseointegration in a rabbit model*. J Biomed Mater Res A, 2016. **104**(8): p. 2086-98.
42. Traini, T., et al., *Direct laser metal sintering as a new approach to fabrication of an isoelastic functionally graded material for manufacture of porous titanium dental implants*. Dent Mater, 2008. **24**(11): p. 1525-33.

## 10. Danksagung

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Gosau, Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, unter dessen Leitung die vorliegende Arbeit angefertigt wurde.

Mein großer Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf Smeets, Leiter der Forschung der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, für die Überlassung des Themas, unter dessen Betreuung die vorliegende Arbeit angefertigt wurde.

Mein außerordentlicher Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Philip Hartjen und Frau PD Dr. Lan Kluwe für die Überlassung des Themas und für die hervorragende Betreuung mit einem gewaltigen fachlichen Wissen und einer fortwährenden Motivation während der gesamten Zeit der Erstellung der Arbeit.

Außerdem gilt mein Dank dem ganzen Laborteam des Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie - Labors des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf für die Unterstützung und die Einarbeitung in die Laboratorien und Zellkultur.

Ich danke darüber hinaus meiner Familie, die mich immer mit Ihrer Anteilnahme und einem fortwährendem Interesse bedingungslos unterstützt hat.

Und dir, liebe Malin, danke ich für deinen Beistand mit deinem unverwechselbaren Wesen und deiner wundervollen Art.

## 11. Lebenslauf

**Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.**

## 12. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

.....

Thiago Gundelwein Silva