

Einfluss der Implantatoberfläche auf die osteogene Frühphase in vitro

Zusammenfassung

Die spezifische Oberflächenstruktur eines Implantates wird oft als Argument für bessere Einheilung und Dauerhaftigkeit herangezogen. Allerdings ist es noch nicht völlig klar, in welchem Ausmass Implantatmaterial und Implantatoberfläche letztlich zur Integration beitragen. Zum besseren Verständnis des Einflusses dieser zwei Faktoren wurden deshalb menschliche MG-63-Osteoblasten unter nicht konfluenten Bedingungen auf Glasplättchen und auf maschinenpolierten (MS) und tiefenstrukturierten (SB) Titanplättchen unter Kontrollbedingungen und unter osteogenen Bedingungen (OS) kultiviert.

Die dreidimensionale Zellarchitektur wurde jeweils nach Fluoreszenzmarkierung von Kollagen I mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie dokumentiert: Unter Kontrollbedingungen hatten die Zellen auf allen drei Oberflächen dreidimensionale, aber nicht konfluente Netzwerke aufgebaut. Auf den beiden Titanoberflächen bildeten sie zudem markante domartige Aufwerfungen. Unter OS blieb Zellarchitektur auf Glas und SB unverändert, auf MS waren hingegen praktisch keine dreidimensionalen Strukturen mehr auszumachen. In Übereinstimmung, erwies sich unter OS die Proteinmenge auf Glas und SB kaum geringer, auf MS hingegen wurden unter OS signifikant weniger Proteine gefunden. Die Aktivität des frühen Mineralisierungsmarkers «Alkalische Phosphatase» (ALP) war unter Kontrollbedingungen auf Glas am höchsten und auf MS und OS geringer. Unter OS waren nur die ALP-Werte auf MS und SB signifikant höher.

Offenbar tragen sowohl Material wie auch Oberflächenstruktur synergistisch zu den frühen Prozessen der Implantateinheilung wie Matrixbildung und Mineralisierung bei. Mögliche Auswirkungen solcher Effekte auf den Zeitpunkt der Belastbarkeit und auf die Dauerhaftigkeit werden diskutiert.

Schweiz Monatsschr Zahnmed 114: 792–799 (2004)

Schlüsselwörter: Dental, Implantat, Titan, Oberfläche, Struktur, alkalische Phosphatase, Osteoblasten

Zur Veröffentlichung angenommen: 29. April 2004

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Dr. J. Thomas Lambrecht
Vorsteher der Klinik für Zahnärztliche Chirurgie, -Radiologie,
Mund- und Kieferheilkunde der Universität Basel
Hebelstrasse 3, CH-4056 Basel
Tel. 061/267 26 06, Fax 061/267 26 07
E-Mail: J-Thomas.Lambrecht@unibas.ch

W. BASCHONG^{1,2} und J. TH. LAMBRECHT¹

¹ Departement für Zahnärztliche Chirurgie, -Radiologie, Mund- und Kieferheilkunde der Universität Basel, Hebelstrasse 3, CH-4056 Basel

² M. E. Müller Institut am Biozentrum der Universität, Klingelbergstrasse 70–90, CH-4056 Basel

Einführung

Die zahnärztliche Implantologie wird immer mehr zum integralen Bestandteil des zahnärztlichen Behandlungsspektrums (MEFFERT et al. 1992, BELSER et al. 2000, KUNZEL et al. 2002, TAYLOR & AGAR 2002). Direkt im Knochen verankert, können Implantate, je nach der Art des anstehenden Knochens und den Eigenschaften des Implantates, sofort (HODEL & LAMBRECHT 2002), d. h. in der Regel nach einer Einheilphase zwischen sechs Wochen und sechs Monaten, voll belastet (BORNSTEIN et al. 2003, MISCH & DEGIDI 2003) werden. Dabei unterscheiden sich die auf dem Markt angebotenen Implantatsysteme im Wesentlichen im Her-

stellungsmaterial, im strukturellen Aufbau und in der Art ihrer Oberfläche (SYKARAS et al. 2000, SALVI & LANG 2001). Die Strukturierung Letzterer kann, wie in tierexperimentellen und klinischen Studien dokumentiert wird, direkt den Verlauf der Implantateinheilung begünstigen (COCHRAN 1999, DAVIES 2003). Allerdings ist es unklar, inwiefern sich die Dynamik der Einheilung auf die Dauerhaftigkeit eines Implantates auswirkt, schnitten doch bei retrospektiver Analyse von mit verschiedenen Ti-Implantaten durchgeführten klinischen Untersuchungen die verschiedenen Modelle mit unterschiedlichen Oberflächenbehandlungen bezüglich der Dauerhaftigkeit gleichwertig ab (ESPOSITO et al. 2003a, b).

Einzelne an der Integration eines Implantates beteiligte Prozesse wie Zellenhaftung, Zelldifferenzierung oder Mineralisierung wurden auf verschiedenen Implantatoberflächen auch in vitro untersucht (LAMBRECHT 1991, DAVIES 1996, 2003, SCHWARTZ et al. 1997, 1999). Geprüft wurde das Verhalten von aus dem Parodont stammenden Bindegewebszellen und Osteoblasten vor allem im Bezug auf die Aktivität ihrer alkalischen Phosphatase (ALP), einem für die Frühphase der Mineralisierung typischen Markerenzym (DAVIES 1996, CARNES et al. 1997, AUBIN 1998, SCHWARTZ et al. 1999, NOTH et al. 2002). Dabei scheinen entsprechend strukturierte Oberflächen in Osteoblasten für die Knochensynthese wichtige zelluläre Prozesse, wie zum Beispiel ALP-Aktivität und Kollagen I und die Bildung von intrazellulären Kalziumablagerungen, direkt zu begünstigen (SCHWARTZ et al. 1997, SCHWARTZ et al. 1999, MUSTAFA et al. 2000). Ebenso weisen erste Untersuchungen auf eine mögliche oberflächenstrukturabhängige Wirkung von Vitamin D3 hin (SCHWARTZ et al. 2001).

Der Frühphase der Osteosynthese und dem Verlauf und der Qualität der Osseointegration fallen in jedem Fall Schlüsselrollen zu, können sie sich doch nicht nur auf die Dauerhaftigkeit, sondern auch auf den Zeitpunkt der vollen Belastbarkeit auswirken. In Ergänzung bisheriger Befunde wurde deshalb im Folgenden exemplarisch untersucht, inwieweit die Oberflächenstruktur eines Implantates die Induktion der Frühphase der Mineralisierung von Knochenzellen beeinflussen kann und inwieweit dabei auch materialspezifische Eigenschaften eine Rolle spielen könnten.

Material und Methoden

Chemikalien und Zellkulturzubehör

Wenn nicht speziell erwähnt, wurden Chemikalien von Fluka/Sigma (CH-9470 Buchs), Zellkulturmedien von Gibco (Life Technologies, Gaithersburg, MD 20877) oder von Seromed (Biochrom KG, Berlin, D) und Kulturschalen und Plastikuntersilien von Falcon oder Nunc (Life Technologies, Gaithersburg, MD 20877) verwendet.

Osteoblast-ähnliche MG-63-Zellen (isoliert aus einem menschlichen osteogenen Sarcoma) stammten aus der American Type Cell Culture Collection (MG-63: ATCC CRL-1427; ATCC, Rockville, MD). Sie wurden in Zellkulturmedium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, GIBCO, pH 7,2-7,4) ergänzt mit 10% fötalem Kälber-Serum (FCS, Seromed) und unter Zusatz von Penicillin und Streptomycin, L-Glutamin und Na-Pyruvat (jeweils 1:100 aus 200 mM L-Glutamin-, 100 mM Na-Pyruvat-, und 5000 E Penicillin/5000 g Streptomycin-Stammlösungen, alle von GIBCO) in 75-cm²-Kulturflaschen bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre und bei einem CO₂-Gehalt von 5% gezüchtet. Nach Bildung eines $\frac{3}{4}$ -konfluenten Zellrasens wurden die Zellen durch dreiminütige Zugabe von 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung (Seromed) bei 37 °C losgelöst, in einer Hämatokrit-Zentrifuge (Hettich/Rotanta/R) während 3 Min. bei 1500 Umdrehungen/Min. kon-

zentriert und nach Verwerfen des Überstandes in entsprechenden Mengen Zellmedium resuspendiert.

Kultivierung von MG-63-Zellen auf verschiedenen Oberflächen

Sterile runde Deckgläschen (Durchmesser 12 mm, Huber & Cie, CH-4153 Reinach) und Titanscheibchen (2 mm hoch, Durchmesser 10 mm, Firma Friatec, Mannheim, D) mit Strukturpolitur (MS: Cat. 10-5010) oder mit Tiefenstrukturierung (SB: Cat. 10-5016) wurden in die Löcher einer 24-Loch-Kulturschale (Falcon) eingelegt. Die Oberflächen wurden jeweils mit je 50 000 MG-63-Zellen (Passagen 2-6) suspendiert in 500 µl einer 1:1-Mischung von Ham's F-12 (GIBCO) und alpha-Medium (Seromed) +10% FCS und jeweils mit 1% der Penicillin/Streptomycin, Glutamin und Na-Pyruvat Stammlösungen bedeckt. Diese Platten wurden bei Zellkulturbedingungen (siehe oben) inkubiert. Nach vier Tagen – der Zellrasen auf den Glasplättchen war mittlerweile ca. drei Viertel konfluent – wurde das Medium entfernt und entweder durch osteogenes Stimulationsmedium (OS; gemäss K. Seuwen, persönliche Mitteilung und SOTILE et al. 2002), d.h. durch Ham's F-12 und alpha-Medium (1:1) ohne FCS und enthaltend 10⁻²M beta-Glycerophosphat (Sigma), 10 µg/ml Insulin (Sigma, Stammlösung 10 mg/ml 10⁻²HCl), 4×10⁻⁸M Dexamethason (Sigma, Stammlösung 10⁻⁴M in Aethanol) und 5×10⁻⁸M Ascorbinsäure (Sigma, Stammlösung 5×10⁻⁵M in Wasser), ersetzt beziehungsweise durch Ham's F-12 und alpha-Medium (1:1) ohne FCS bei den Kontrollen. Die Kulturen wurden für weitere drei bis vier Tage inkubiert. Danach wurden die Glasplättchen und die Ti-Scheibchen zwei Mal mit PBS (pH 7,2) gewaschen, mit einer Pinzette aus der Kulturschale gehoben und die eventuell noch anhaftende Flüssigkeit mit der Ecke eines Filterpapierstreifens entfernt. Diese Plättchen wurden danach entweder für die Mikroskopie oder für die biochemische Analyse weiterverarbeitet.

Regeneration der Titanplättchen

Die für die biochemische Analyse verwendeten Titanplättchen wurden jeweils nach der Gewinnung des Zelllysates mit destilliertem Wasser gespült und dann im Ultraschallbad in Gegenwart von halbkonzentrierter Natrium-Hypochlorit-Lösung (ca. 7%) gewaschen und gespült (BASCHONG et al. 2001): Nach Spülen mit destilliertem Wasser wurden sie autoklaviert und wieder verwendet.

Probenaufbereitung für die Mikroskopie

Die gespülten Glas und Titanplättchen wurden, wie im Detail beschrieben (BASCHONG et al. 1999), bei Raumtemperatur in 0,5 ml–1 ml modifizierten Hanks' Puffer (MHB: Ca-frei, enthaltend 2 mM EGTA and 5 mM MES (2-morpholino-ethanesulfonic acid), pH 6,2-6,4), gelegt. Innerhalb von 10 Min. wurde dieser mit Permeabilisierungspuffer, d.h. MHB, zusätzlich enthaltend 0,125% Glutaraldehyd und 2% octyl-POE (n-octylpolyoxyethylen, Alexis Corp. San Diego, Ca), substituiert. Nach einer Vorfiktion/Permeabilisation von 15 Min. wurden die Zellen für 20 Min. mit MHB, enthaltend 1% Glutaraldehyd, nachfixiert, dann drei bis vier Mal mit MHB gewaschen und zur Reduktion freier Aldehydgruppen zwei Mal während 10 Min. auf Eis mit frisch hergestellter, eisgekühlter 0,5 mg/ml NaHB4 in MHB-Lösung behandelt. Deckgläser und Titanplättchen wurden anschliessend mit MHB gewaschen und in MHB, enthaltend 0,05% Natrium Azid, bei 4 °C gelagert.

Immunfluoreszenzfärbung

Die in MHB aufbewahrten Glasplättchen oder Titanscheibchen wurden während 20 Min. mit 50–75 µl MHB, enthaltend 10%

Schweineserum (Jackson Immune Research Laboratories, West Grove PA, USA), konditioniert und dann mit dem in MHB verdünnten Antikörper inkubiert. Anschliessend wurden sie drei bis vier Mal mit 100–200 µl Portionen MHB gespült, für eine Stunde mit dem in 75 µl verdünnten sekundären Antikörper inkubiert und wie zuvor gespült.

Die primären Antikörper waren gegen Kollagen I (polyklonal Kaninchen 1:50; Zymed Laboratories, San Francisco CA, USA) gerichtet. Als sekundäre Antikörper wurden mit Alexa-488 nm markierte Ziege-Anti-Kaninchen Antikörper (1:800; Molecular Probes, Eugene OR, USA) verwendet.

Glasplättchen wurden konventionell in Mowiol-4-88 (Hoechst, Frankfurt BRD) eingedeckt, Titanplättchen wurden zuerst mit der Unterseite mittels Cyanolyte-Sekundenkleber (Renfert D-78247 Hilzingen) auf Objektträger geklebt, dann wurde ein Tropfen Mowiol auf die zellbewachsene Seite gegeben und dieser anschliessend mit einem Deckglas (Klasse II, ca. 170 µm dick [vgl. BASCHONG et al. 1999]) überdeckt.

Die eingedeckten Proben wurden bei 4 °C und im Dunkeln aufbewahrt. Immunfluoreszenz-markierte Proben wurden in einem Leica M-4 konfokalen Laser-Raster-Mikroskop inspiziert und fotografisch dokumentiert.

Biochemische Analysen

Die Glas und Titanscheibchen wurden mit PBS gespült und die überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapierstreifen von der Kante her abgesogen. Dann wurden sie kopfüber in die Löcher einer 24-Loch-Kulturplatte, enthaltend je 60 µl 1% Triton X-100 (Merck, Darmstadt) in destilliertem Wasser, gelegt und während einer Stunde auf Eis geschüttelt. Je 10 µl des entstandenen Lyates wurden zur Bestimmung des Proteingehaltes mittels der BioRad-Mikromethode (BioRad protein Assay 500-0006, BioRad D-80939 München) in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte übergeführt. Gemessen wurde die Farbintensität bei 690 nm nach entsprechendem Aufbereiten der Proben. Eine Verdünnungsreihe mit Rinder-Serumalbumin in destilliertem Wasser diente als Referenz.

Die verbleibenden 50 µl des Zellysates wurden zur Bestimmung der Aktivität alkalischer Phosphatase (ALP) verwendet. Nach Zuzumischen von 150 µl Inkubationsbuffer (0,2 M Diethanolamine, 2 mM MgCl₂, enthaltend 5 mM p-Nitrophenyl Phosphat (Sigma) als Substrat), wurden die Mikrotiterplatten während 120 Min. bei 37 °C bebrütet. Gemessen wurde die Farbintensität bei 405 nm. Eine Verdünnungsreihe mit alkalischer Phosphatase (Calf intestine grade II, 84085041-Roche Diagnostics, Mannheim 140 U/mg) diente als Referenz.

Statistik

Die Werte aus insgesamt acht unabhängig durchgeführten Serien wurden mittels paarweisem T-Test miteinander verglichen. Verwendet wurde das Programm STATISTIKA™ 4.1 (Statsoft, Hamburg).

Resultate

Vergleich mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie (KLRM)

In einer ersten Serie von Experimenten wurden die auf Glas beziehungsweise auf glatter, strukturpolierter (MS) und auf tiefenstrukturierter (SB) Reintitanoberfläche kultivierten Knochenzellen mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie (KLRM) dargestellt. Visuell verglichen wurden unter Normalbedingungen (Kontrolle) und unter osteogenen Bedingungen (OS) auf Glas

MS und SB kultivierte Präparate. Analysiert wurden die Oberflächen bezüglich a) der Morphologie der anhaftenden Zellen, b) der Art der Besiedlung und der Verteilung und c) bezüglich des mittels Immunfluoreszenzmarkierung sichtbar gemachten Kollagens I.

Die auf Glas gewachsenen Zellen waren typisch kuboid mit wenigen, aber ausgeprägten Ausläufern. Die Zellschicht präsentierte sich als nicht konfluent, aber mehrschichtig und vereinzelt mit mehrschichtigen Aufwerfungen. Unter OS zeigten sich keine wesentlichen Änderungen des Erscheinungsbildes, weder bezüglich der Zellmorphologie, der Oberflächenbesiedlung noch der Menge und Verteilung des Kollagens I. Letzteres erweckte in beiden Fällen den Eindruck, die einzelnen Zellen zum Teil mit einem kabelartigen Netzwerk zu verbinden (Abb. 1A, B). Auch auf den beiden Titanoberflächen hatten sich vergleichbare Zellrasen gebildet. Die Zellen waren mit den auf Glas beobachteten morphologisch vergleichbar. Allerdings zeigten sich sowohl auf der glatten als auch auf der strukturierten Oberfläche grössere, aus der Grundschicht hervortretende, untereinander verbundene domartige Zellansammlungen (Abb. 1C-F). Auf der strukturierten Oberfläche war keine eigentliche Grundschicht auszumachen. Die Zellansammlungen waren prägnant flockenartig verteilt. Das Kollagennetzwerk gab sich auf beiden Titanoberflächen typisch dreidimensional.

Bei den auf strukturierten Ti-Oberflächen kultivierten Zellen bewirkte die Gegenwart von OS keine wesentliche Änderung, weder zellmorphologisch noch von der Besiedlungsarchitektur her, auf der glatten Titanoberflächen schienen jedoch dreidimensionale Aufwerfungen im Wesentlichen zu fehlen.

Vergleich von Proliferation und alkalischer Phosphatase (ALP)

In einer zweiten Serie von Experimenten wurde der Einfluss osteogener Bedingungen auf die Zellproliferation und auf die Aktivität der für die Frühphase der Knochenbildung wichtigen ALP untersucht. Unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von OS wurden in den auf den verschiedenen Oberflächen wachsenden Zellkulturen die Proteinmengen (µg/ml) als grobes Mass für die Zellproliferation bestimmt (Tab. I).

Wie Tabelle I aufzeigt, schwankten die auf den verschiedenen Oberflächen gemessenen Zellmengen unter Kontrollbedingungen nur unwesentlich. Unter OS waren sie jeweils geringer. Allerdings erwies sich die OS-bedingte Reduktion der Zellmenge nur auf MS als statistisch signifikant.

Um interexperimentelle Schwankungen und einen möglichen Einfluss der Implantatoberflächen auf die Besiedlungsdichte auszugleichen, wurden die ALP-Werte jedes Einzelexperimentes jeweils auf die entsprechende Proteinmenge normiert und als Aktivität (µU ALP/µg Protein) angegeben. Wie in Tabelle II zusammengefasst, zeigten unter den vorliegenden Bedingungen die nicht stimulierten Kontrollen auf Glas und auf MS vergleichbare ALP-Aktivitäten. Die Grundwerte auf SB waren geringer, jedoch lagen alle Werte innerhalb der statistisch ermittelten Streuung. Unter OS war die Aktivität der zellulären ALP auf allen drei Oberflächen jeweils gegenüber den nicht stimulierten Kontrollwerten höher, die auf Glas gemessenen Erhöhungen war geringer als die auf den beiden Titanflächen gemessenen. Die auf Letzteren erreichten ALP-Werte waren vergleichbar ($ALP^*_{Glas} < ALP^*_{MS} = ALP^*_{SB}$), und die Erhöhung erwies sich als statistisch signifikant. Das Ausmass der Steigerung der ALP-Aktivität unter osteogenen Bedingungen erwies sich auf Glas gegenüber MS als signifikant geringer ($\Delta ALP_{SB} > \Delta ALP_{Glas}$ [$p < 0,05$]). Das Ausmass der Steigerung auf MS, ΔMS , liess sich hingegen statistisch weder von den auf Glas noch von den auf SB gemessenen Werten

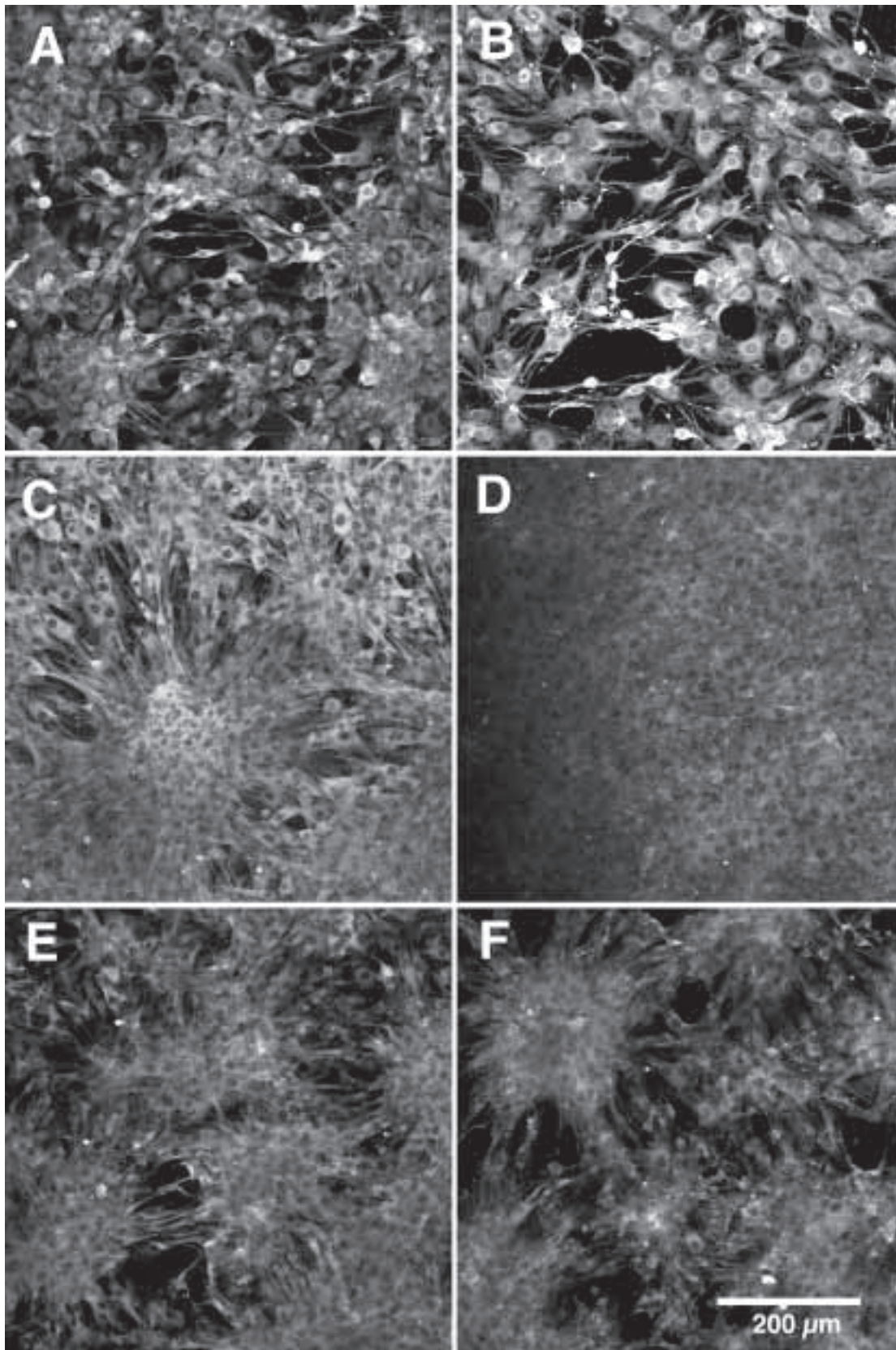


Abb. 1 Konfokale Laser-Raster-Fluoreszenz-Mikrographien Kollagen-I-markierter MG-63 Osteoblasten. Osteoblasten auf Glas (A, B), auf struktur poliertem Titan (C, D) und auf tiefenstrukturiertem Titan (E, F). Kontrollkulturen (A, C, D) und unter osteogenen Bedingungen kultivierte Zellen (B, D, F). Aus n virtuellen Schnitten (Schnittdicke $0,5 \mu\text{m}$) rekonstruierte dreidimensionale Anordnungen. Massstab $100 \mu\text{m}$ ($200 \mu\text{m}$ auf Bild).

Tab. I Einfluss der Oberfläche auf die Proliferation von MG-63-Osteoblasten

PROTEIN	Glas°	GLAS*	MS°	MS*	SB°	SB*
[µG/ML] ±SEM	431±35	365±29	423±27	309±19	423±30	366±21
Δ	N.S., N=27		P<0,005; N=26.		N.S., N=32	
	Δ _{GLAS} - Δ _{MS} : N.S., N=24		Δ _{SB} - Δ _{MS} : P<0,05, N=25		Δ _{GLAS} - Δ _{SB} : N.S., N=21	

Oberflächen: MS: Titan strukturiert, SB Titan tiefenstrukturiert. (°) Kontrollbedingungen, (*) osteogene Bedingungen. Statistischer Vergleich mittels paarweisem T-Test Δ.: Differenz N.S.: nicht signifikant.

Tab. II Einfluss der Oberfläche auf die Aktivität der alkalischen Phosphatase in MG-63-Osteoblasten

ALP	Glas°	GLAS*	MS°	MS*	SB°	SB*
[µg U/µg Protein] ±SEM	6,2±0,9	8,3±0,8	5,8±0,9	9,7±0,8	4,3±0,5	9,8±1,0
Δ	P<0,0005, N=25		P<0,0005; N=22		N.S.; N=22.	
	Δ _{GLAS} -Δ _{MS} : N.S., N=20		Δ _{SB} -Δ _{MS} : N.S., N=21		Δ _{GLAS} -Δ _{SB} : P<0,05, N=21	

Signaturen wie Tab. I

unterscheiden: $\Delta ALP_{SB} \cong \Delta ALP_{MS} \Delta ALP_{MS} ALP_{Glas} ALP^*_{Glas} < ALP^*_{MS} \cong ALP^*_{SB}$.

Diskussion

Oberstes Ziel bei der Herstellung von Zahnimplantaten ist es, diese im Strukturaufbau und in ihrer Form so zu gestalten, dass sie mit möglichst geringem chirurgischem Aufwand inseriert werden können, sich die Zeit bis zur ihrer vollen Belastbarkeit möglichst kurz hält, ihre Insertion dauerhaft ist und sie in Funktion und Ästhetik dem natürlichen Zahn möglichst nahe kommen. Es liegt auf der Hand, dass eine strukturierte Oberfläche der natürlichen dreidimensionalen Umgebung von Knochenzellen weit mehr entspricht als der flache Boden einer Kulturschale oder eine polierte Ti-Implantatoberfläche. Der möglichst natürlichen Gestaltung der Oberflächenstruktur der Kontaktzone zwischen Implantat und Knochen wird deshalb grosse Wichtigkeit beigemessen.

Bei der Insertion eines Implantates entsteht zwischen Implantatoberfläche und anstehendem Knochen ein Grenzraum. Dieser wird idealerweise von Knochenvorläufer- oder Knochenzellen aufgefüllt, welche – über die Bildung einer neuen mineralisierten Matrix – als reife Knochenzellen das Implantat im Knochen fest verankert (SCHWARTZ et al. 1997, DAVIES 2003). Ziel der vorliegenden Studie war es, zu untersuchen, inwiefern sich Material und Struktur der Implantatoberfläche auf deren Besiedlung und auf die Induktion von an der Frühphase der Knochenbildung beteiligten Prozessen auswirkt. Verglichen wurden auf Glas beziehungsweise auf glatten (MS) und strukturierten (SB) Reintitanoberflächen wachsende MG-63-Osteoblasten bezüglich der Zellzahl und der Grundaktivität von ALP, dies in Abwesenheit und in Anwesenheit von osteogenem Supplement (OS), einer Mischung aus Dexamethason, Ca-Glycerophosphat und Vitamin C, die, ähnlich wie Vitamin D mit den entsprechenden Zusätzen, die Knochenbildung in vitro initiiert (BOYAN et al. 2002). Um der Frühphase der Besiedlung gerecht zu werden und um Effekte ungleicher Oberflächengrösse weitgehend auszuschalten, wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch entsprechend reduzierte Zellmengen eingesät; die Zellen wurden also unter subkonfluenten Bedingungen noch in der Wachstumsphase untersucht. Entsprechend waren in den Kontrollkulturen auch zum Messzeit-

punkt sowohl auf der glatten Glas- und Titanoberfläche MS als auch auf der durch Strukturierung vergrösserten SB die Zellmengen gleich.

Bisher hatten sich In-vitro-Untersuchungen zum Einfluss von Implantatoberflächen auf die Frühphase der Knochenbildung im Wesentlichen auf die biochemische Erfassung von Proliferation, ALP-Aktivität und Mineralisierung und auf die Abbildung der besiedelten Oberfläche mittels Rasterelektronenmikroskopie (KELLER et al. 2003, JAYARAMAN et al. 2004) und neuerdings auch auf die Bestimmung weiterer an der Knochenbildung beteiligter Proteine über die RNA-Expression konzentriert (LIU et al. 1997, OGAWA & NISHIMURA 2003). In den vorliegenden Untersuchungen konnte zum ersten Mal, zumindest exemplarisch, durch Verwendung der KLRM in Kombination mit digitaler Bildverarbeitung die Besiedlungsarchitektur noch in der Wachstumsphase mit einbezogen werden, dies nicht nur über die Zellrasenoberfläche, sondern computertomografieähnlich im optisch rekonstruierten dreidimensionalen Raum. In der Folge zeigte sich, dass zumindest MG-63-Knochenzellen schon in der Wachstumsphase und vor Konfluenz dreidimensionale Schichten bilden: auf Glas mehrschichtig und eher gleichförmig und unabhängig von der Oberflächenbehandlung, auf beiden Titanoberflächen mehrschichtig und unter Bildung herausragender domartig dreidimensionaler Strukturen. Letzteres könnte als weitere Eigenschaft zum für Reintitan bekannten knochenbildungsfördernden Effekt (POHLER 2000) beitragen. Offenbar sind die dreidimensionalen Aufwerfungen auf der glatten Ti-Oberfläche labiler als diejenigen auf der strukturierten Ti-Oberfläche oder als die Zellschichten auf Glas: Unter OS waren auf MS keine Aufwerfungen mehr zu beobachten, auf SB und Glas waren keine Veränderungen auszumachen. Auch hatte sich unter OS gegenüber der Kontrolle nur auf MS die Zellzahl signifikant verringert. Ebenso scheint in Übereinstimmung mit ähnlichen Experimenten (SCHWARTZ et al. 1999, 2001, BOYAN et al. 2002, DAVIES 2003, DEKKER et al. 2003) die Oberflächenstruktur die ALP-Aktivität zu beeinflussen: Auf SB wachsende Zellen wiesen in der Kontrolle die geringste ALP-Aktivität auf; unter OS hingegen erreichten sie mit MS vergleichbare Werte. Offenbar beeinflussen sowohl Art des Materials wie auch Art der Oberfläche das Verhalten der MG-63-Knochenzellen. Dabei scheint die Ausbildung domartig dreidimensionaler Strukturen eher materialabhängig zu sein. Diese könnten einen

Teil des für Reintitan bekannten knochenbildungsfördernden Effektes ausmachen. Die OS-bedingte Destabilisierung dieser Gebilde beziehungsweise die Begünstigung der ALP-Stimulation auf SB scheinen hingegen oberflächenspezifisch zu sein. Sie könnten auf einen besseren Erhalt der phenotypischen Plastizität der Knochenzellen (LIU et al. 1997) und somit auf eine bessere Differenzierbarkeit auf strukturierten Oberflächen zurückzuführen sein: Eine bei Kultivation in dreidimensionalen Systemen wesentlich verbesserte Differenzierbarkeit wurde denn auch für verschiedene mesenchymale Zellen berichtet (BASCHONG et al. 1997; MARTIN et al. 2001, CUIKERMANN et al. 2001).

In der vorliegenden Studie konnte zumindest exemplarisch eine durch Titan begünstigte Ausbildung dreidimensionaler Zellverbände und deren grössere Labilität auf flacher Titanoberfläche sowie eine auf Stimulation bessere Ansprechbarkeit auf strukturierter Titanoberfläche wachsender Zellen beobachtet werden. Beide Effekte deuten auf Synergien beziehungsweise auf Antagonismen zwischen Material und Oberflächenstruktur eines Implantates hin. Material und Oberflächenstruktur scheinen sich besonders in der Frühphase auf die Entwicklung der periimplantären, mineralisierenden Matrix auszuwirken. Gemäss unserer Daten würden sich nach Insertion eines Ti-Implantates mit glatter Oberfläche die Knochenzellen dank des osteokonduktiven Einflusses von Titan (POHLER et al. 2000) schneller zu einem Knochengewebe entwickeln als ein Implantat aus anderem, weniger osteokonduktivem Material. Allerdings würde wohl bei glatter Ti-Oberfläche die Osseointegrationsphase länger dauern als bei einem Ti-Implantat mit entsprechend strukturierter, die Zellstimulation begünstigender Oberfläche. Somit würde beim glatten Implantat der Zeitpunkt der vollen klinischen Belastbarkeit später eintreten, dies in Übereinstimmung mit tierexperimentellen und klinischen Studien, die für Implantate mit strukturierter Oberfläche sowohl eine schnellere Osseointegration als auch eine frühere Belastbarkeit belegen konnten (BUSER et al. 1991, 1999, ERICSSON et al. 1994, LARSSON et al. 1996). Dass eine frühere Belastbarkeit die Dauerhaftigkeit nicht beeinträchtigen muss, bestätigen auch neueste Metaanalysen zur Dauerhaftigkeit von Dentalimplantaten (ESPOSITO et al. 2003a, b): Die Dauerhaftigkeit erwies sich bei den untersuchten neun Ti-Implantattypen als modell- und oberflächenstrukturunabhängig. Genauere Abklärungen der hier beobachteten Effekte sind geplant. Dabei sollen neue analytische Methoden auf genetischer und Proteinebene (FRANK et al. 2002, SCHNEIDER et al. 2003) zusammen mit extensiveren dreidimensional mikroskopischen Reihenuntersuchungen dazu beitragen, mögliche Synergien zwischen Material und Oberflächenbeschaffenheit aufzuzeigen, um so Oberflächen und Materialien zu entwickeln, die eine möglichst frühzeitig belastbare und dauerhafte Insertion eines Implantates gewährleisten.

Verdankungen

Wir danken unserer Martha Imholz und Rosmarie Suetterlin vom M. E. Müller Institut für Strukturblogie am Biozentrum der Universität Basel für die exzellente technische Unterstützung, Dr. K. Seuwen und Dr. Dr. C. Jacquiéry für ihre wertvollen Anregungen, der Firma Friatec, Mannheim D, für die Titanplättchen, Prof. Dr. L. Landmann, Institut für Anatomie der Universität Basel, für die Möglichkeit, das konfokale Mikroskop zu benutzen, Dr. C. Artmann und Dipl. Wirt. Math. C. Schneeberger für die statistische Auswertung und der Société Suisse d'Odontologie (SSO) für ihre grosszügige Unterstützung (SSO-Gesuch 197).

Summary

BASCHONG W, LAMBRECHT J T: **Influence of an implant's surface structure on the early phase of bone formation in vitro** (in German). Schweiz Monatsschr Zahnmed 114: 792-799 (2004) The specific structure of a dental implant's surface is often used as an argument for a better overall performance and durability. Nonetheless, it is not yet fully clear to what extent an implant's material or surface structure improves its performance. For a better understanding of the early integration-related processes, growth and initiation of mineralization of human MG-63 osteoblasts grown on glass slides or on polished (MS: machine-surfaced) or structured (SB: deep-structured) titanium surfaces were monitored. Cells were cultured under non-confluent conditions in absence and presence of osteogenic medium (OS). The 3D-architecture of growing cells was documented by confocal laser scanning microscopy (CLSM) upon fluorescently labeling for collagen I. Collagen I distribution was found comparable under all conditions. In control cultures on glass, MS and SB, cells had grown as multilayered but not yet confluent networks, which additionally comprised dome-like structures on the two Ti-surfaces. While on glass and SB cells essentially maintained this architecture also in presence of OS, three-dimensional structures on MS were – if at all – only barely visible. This was reflected also in the protein content of the cultures that was significantly lower under OS in the case of MS only.

The activity of the early mineralization marker alkaline phosphatase (ALP) was higher in the controls on glass than on MS or SB. In presence of OS it was significantly higher on MS and SB than in the controls, yet not on glass. Obviously both, the surface material and the surface structure contribute – possibly synergistically – to early processes of implant integration, such as matrix formation and mineralization. The impact of such effects is discussed, in relation to implant loading and implant durability.

Résumé

La structure spécifique de la surface d'un implant dentaire est souvent citée comme argument pour une meilleure intégration et une durée de vie prolongée. Toutefois il n'est pas encore très clair dans quelle mesure la nature et la surface de l'implant contribuent à cette intégration. Pour avoir une meilleure compréhension des processus précoces d'intégration, la croissance et le début de minéralisation d'ostéoblastes humains MG-63 ont été étudiés sur des plaquettes de verre, sur des plaquettes de titane de surface usinée (MS) et de surface très rugueuse (SB). Les cellules ont été cultivées dans des conditions non confluentes en présence et en l'absence de milieu ostéogénique (OS). L'architecture tridimensionnelle des cellules en croissance a été étudiée au moyen d'un microscope à balayage à laser confocal après marquage du collagène de type I par fluorescence. La distribution de collagène de type I était comparable dans toutes les conditions. Dans les cultures contrôles, les cellules ont grandi sur les trois surfaces en multicouches, mais pas encore en réseau confluent. Elles forment, de plus, sur les deux surfaces de titane des structures en forme de dôme. En présence d'OS, l'architecture cellulaire sur le verre et sur SB reste inchangée, alors que sur MS elle était pratiquement absente. Cela s'est aussi reflété dans les taux de protéines, qui était significativement inférieur sur MS en présence d'OS comparé aux taux sur les deux autres surfaces (verre et SB).

L'activité du marqueur de la minéralisation précoce, la «phosphatase alcaline» (ALP) était plus élevée dans les conditions de

contrôle sur le verre que sur MS et SB. Par contre, en présence d'OS, les valeurs d'ALP étaient significativement plus grandes sur MS et SB que sur le verre.

Apparemment, aussi bien la nature du matériau que la structure de surface contribuent de façon synergique au processus d'intégration précoce de l'implant, telles que formation de la matrice et minéralisation. L'impact de tels effets est discuté en relation avec la mise en charge de l'implant et sa durée de vie.

Literaturverzeichnis

- AUBIN J E: Bone stem cells. *Cell Biochem Suppl* 30: 73–82 (1998)
- BASCHONG W, SUETTERLIN R, AEBI U: Punch-wounded, fibroblast populated collagen matrices: a novel approach for studying cytoskeletal changes in three dimensions by confocal laser scanning microscopy. *Eur J Cell Biol* 72: 189–201 (1997)
- BASCHONG W, DUERRENBERGER M, MANDINOVA A, SUETTERLIN R: Three-dimensional visualization of cytoskeleton by confocal laser scanning microscopy. *Methods Enzymol* 307: 173–189 (1999)
- BASCHONG W, SUETTERLIN R, HEFTI A, SCHIEL R H: Confocal laser scanning microscopy and scanning electron microscopy of tissue Ti-implant interfaces. *Micron* 32: 33–41 (2001)
- BELSER U C, BUSER D, SCHMID J P, LANG N P: Aesthetic implant restorations in partially edentulous patients – a critical appraisal. *Periodontol* 17: 132–150 (2000)
- BORNSTEIN M M, LUSSI A, SCHMID B, BELSER U C, BUSER D: Early loading of nonsubmerged titanium implants with a sandblasted and acid etched (SLA) surface: 3 year results of a prospective study in partially edentulous patients. *Int J Oral Maxillofac Implants* 18: 659–666 (2003)
- BOYAN B D, BONEWALD L F, PASCHALIS E P, LOHMANN C H, ROSSER J, COCHRAN D L, DEAN D D, SCHWARTZ Z, BOSKEY A L: Osteoblast-mediated mineral deposition in culture is dependent on surface microtopography. *Calcif Tissue Int* 71: 519–529 (2002)
- BUSER D, SCHENK R K, STEINEMANN S, FIORELLINI J P, FOX C H, STICH H: Influence of surface characteristics on bone ontegration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 25: 889–902 (1991)
- BUSER D, NYDEGGER T, OXLAND T, COCHRAN D L, SCHENK R K, HIRT H P, SNETIVY D, NOLTE L P: Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface. A biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 45: 75–83 (1999)
- CARNES D L, MAEDER C H L, GRAVES D T: Cells with Osteoblastic Phenotypes Can Be Explanted From Human Gingiva and Periodontal Ligament. *J Periodontol* 68: 701–707 (1997)
- COCHRAN D L: A comparison of endosseous dental implant surfaces. *J Periodontol* 70: 1523–1539 (1999)
- COOPER L F, MASUDA T, YLIHEIKKILA P K, FELTON D A: Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part II. In vitro studies. *Int J Oral Maxillofac Implants* 13: 163–74 (1998)
- CUIKERMAN E, PANKOV R, STEVEN D R, YAMADA K: Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Science* 294: 1708–1712 (2001)
- DAVIES J E: In vitro modeling of the bone/implant interface. *Anat Rec* 245: 426–445 (1996)
- DAVIES J E: Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ* 67: 932–949 (2003)
- DEKKER R J, VAN BLITTERSWIJK C A, HOFLAND I, ENGELBERTS P J, LI J, DE BRUIJN J D: Studying the effect of different macrostructures on in vitro cell behaviour and in vivo bone formation using a tissue engineering approach. *Novartis Found Symp* 249: 148–167, discussion 167–169, 170–174, 239–241 (2003)
- ERICSSON I, JOHANSSON C B, BYSTEDTH H, NORTON M R: A histomorphometric evaluation of bone-to-implant contact on machine-prepared and roughened titanium dental implants. A pilot study in the dog. *Clin Oral Impl Res* 5: 202–206 (1994)
- ESPOSITO M, WORTHINGTON H, THOMSEN P, COULTHARD P: Interventions for replacing missing teeth: different types of dental implants. *Cochrane Database Syst Rev* 2003 (3): CD003815 (2003a)
- ESPOSITO M, COULTHARD P, WORTHINGTON H, JOKSTAD A, WENNERBERG A: Interventions for replacing missing teeth: different types of dental implants. *Cochrane Database Syst Rev* 2003 (4): CD003815 (2003b)
- FRANK O, HEIM M, JAKOB M, BARBERO A, SCHAFFER D, BENDIK I, DICK W, HEBERER M, MARTIN I: Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro. *J Cell Biochem* 85: 737–746 (2002)
- HODEL Y, LAMBRECHT J T: Late results of immediately loaded interforaminal implants. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 112: 600–604 (2002)
- JAYARAMAN M, MEYER U, BUEHNER M, JOOS U, WIESMANN H P: Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials* 25, 625–631 (2004)
- KELLER J C, SCHNEIDER G B, STANFORD G M, KELLOGG B: Effects of implant microtopography on osteoblast cell attachment. *Implant Dent* 12: 175–181 (2003)
- KUNZEL A R, SCHIEL H J, LAMBRECHT J T: Long-time results of ITI full-screw implants. Analysis of 10-year effectiveness of 468 implants. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 112: 20–35 (2002)
- LAMBRECHT J T: Resorbierende Knochenzellen des Menschen in vitro. Carl Hanser Verlag, München (1991)
- LARSSON C, THOMSEN P, ARONSSON B O, RODAHL M, LAUSMAA J, KASEMO B, ERICSON L E: Bone response to surface-modified titanium implants: studies on the early tissue response to machined and electropolished implants with different oxide thickness. *Biomaterials* 17: 605–616 (1996)
- LIU F, MALAVAL L, AUBIN J E: The mature osteoblast phenotype is characterized by extensive plasticity. *Exp Cell Res* 232: 97–105 (1997)
- MARTIN I, SUETTERLIN R, BASCHONG W, HEBERER M, VUNJAK-NOVAKOVIC G, FREED L E: Enhanced cartilage tissue engineering by sequential exposure of chondrocytes to FGF-2 during 2D expansion and BMP-2 during 3D cultivation. *J Cell Biochem* 83: 121–128 (2001)
- MEFFERT R M, LANGER B, FRITZ M E: Dental implants: a review. *J Periodontol* 63: 859–870 (1992)
- MISCH C E, DEGIDI M: Five year prospective study of immediate/early loading of fix prosthesis in completely edentulous jaws with a bone quality based implant system. *Clin Impl Dent Relat Res* 5: 17–28 (2003).
- MUSTAFA K, WROBLEWSKY J, HULTENBY K, LOPEZ B S, ARVIDSON K: Effects of titanium surfaces blasted with TiO₂ particles on the initial attachment of cells derived from human mandibular bone. A scanning electron microscopic and histomorphometric analysis. *Clin Oral Implants Res* 116: 116–128 (2000)
- NOTH U, OSYCZKA A M, TULI R, HICKOK N J, DANIELSON K G, TUAN R S: Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res* 20: 1060–1069 (2002)

- OGAWA T, NISHIMURA I: Different bone integration profiles of turned and acid-etched implants associated with modulated expression of extracellular matrix genes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 18: 210–218 (2003)
- POHLER O E: Unalloyed titanium for implants in bone surgery. *Injury* 31 Suppl 4: 7–13 (2000)
- SALVI G E, LANG N P: Changing paradigms in implant dentistry. *Crit Rev Oral Biol Med* 12: 252–272 (2001)
- SCHNEIDER G R, PERINPANAYAGAM H, CLEGG M, ZAHARIAS R, SEABOLD D, KELLER J, STANFORD C: Implant roughness affects osteoblast gene expression. *J Dent Res* 82: 372–376 (2003)
- SCHWARTZ Z, KIESWETTER K, DEAN D D, BOYAN B D: Underlying mechanism at the bone-surface interface during regeneration. *J Periodontal Res* 32: 166–171 (1997)
- SCHWARTZ Z, LOHMANN C H, OEFINGER J, BONEWALD L F, DEAN D D, BOYAN B D: Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells in the osteoblastic lineage. *Adv Dent Res* 13: 38–48 (1999)
- SCHWARTZ Z, LOHMANN C H, VOCKE A K, SYLVIA V L, COCHRAN D L, DEAN D D, BOYAN B D: Osteoblast response to titanium surface roughness and 1 α , 25-(OH) $_2$ D $_3$ is mediated through the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. *J Biomed Mater Res* 56: 417–426 (2001)
- SOTTILE Y, HALLEUX C, BASSILANA F, HELLER H, SEUWEN K: Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone* 30: 699–704 (2002)
- SYKARAS N, IACOPINO A M, MARKER V A, TRIPLETT R G, WOODY R D: Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 15: 675–690 (2000)
- TAYLOR T D, AGAR J R: Twenty years of progress in implant prosthodontics. *J Prosthet Dent* 88: 89–95 (2002)