

Henningsen A.^{1,2}, Cacaci C.³, Precht C.¹, Jung O.T.¹, Rashad A.¹, Gröbe A.¹, Heiland M.¹, Smeets, R.¹

Photofunktionalisation und Oberflächenplasmaaktivierung von Titanoberflächen und Zirkonoberflächen *in vitro*

Einleitung

Moderne dentale Implantatsysteme verfügen über eine optimierte Oberflächentopografie, wenige auch über eine optimierte Oberflächenchemie. Die Oberflächenphotofunktionalisierung mit UV-Licht oder eine Oberflächenaktivierung durch Kaltplasma sind erfolgversprechende Methoden zur Förderung der Interaktionen von Proteinen und Zellen mit der Implantatoberfläche auf molekularer Ebene.

Ziel dieser Studie war, die Effekte von UV-Licht und Kaltplasma auf moderat rauen Titanoberflächen und Zirkonoberflächen *in vitro* zu vergleichen.

Material und Methoden

- Moderat raue **Titan-** (Reintitan, Ra 1,8-2,0µm, Abb. 1) und **Zirkonplättchen** (95% ZrO₂ / 5% Y₂O₃, Ra 1,9-2,2µm, Abb. 2), **nativ** und Funktionalisierung für jeweils 12 Minuten in

- **UV-Ofen** (Ushio Therabeam® Superosseo) oder
- **Kaltplasmaofen** (Diener Yocto®) mit **Argon** oder **O₂**

Arbeitsprogramm:

- Grundlagen:
 - Elektronenmikroskopie (Zeiss® Evo MA25)
 - Konfokale Mikroskopie (Sensofar® S Neox)
 - Oberflächenenergie (OEG® Surfrens Universal)
 - Oberflächenchemie (Kratos® Axis Nova, XPS)
- *In-vitro* Versuche:
 - murine Osteoblasten (MC3T3-E1)
 - Zellattachment (Live-Dead-Staining, LDS)
 - Proliferation (BrDU-Assay, XTT-Assay)
 - Zytotoxizität (Lactatdehydrogenase-Assay, LDH)

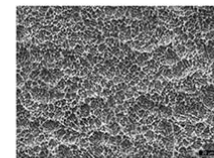


Abb. 1: Elektronenmikroskopie Titanoberfläche

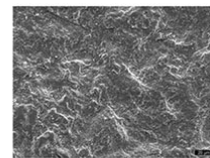


Abb. 2: Elektronenmikroskopie Zirkonoberfläche

Ergebnisse

- Durch Funktionalisation keine relevanten Änderungen der Oberflächenstruktur oder -rauigkeit
- **Superhydrophilisierung** nach Funktionalisation (Abb. 3), keine sig. Unterschiede zwischen Verfahren
- **Signifikante Reduktion der Kohlenstoffverbindungen auf Titan** (p < 0,002, t-Test, 95% KI) und **Zirkon** (p < 0,001, t-Test, 95% KI) ohne signifikante Unterschiede zwischen den Verfahren
- **Signifikante Zunahme der Oxidschicht auf Titan** durch alle Verfahren (p=0,01, t-Test, 95% KI) mit leicht aber nicht signifikant dickerer Oxidschicht nach O₂- und Argon-Plasmafunktionalisation
- **Signifikant erhöhtes Zellattachment *in vitro*** auf funktionalisierten Titanoberflächen (Tab. 1 und 2, Abb. 4), Argon-Plasma signifikant besser auf Titan, O₂-Plasma signifikant besser auf Zirkon
- **Proliferation ist nach Plasmafunktionalisation** von Titan und Zirkon signifikant besser (24h & 48h)
- Keine signifikanten Unterschiede bezüglich Zytotoxizität

Titan	Nativ Kontrolle vs. UV 12"	Nativ Kontrolle vs. O ₂ Plasma	Nativ Kontrolle vs. Arg Plasma	UV vs. O ₂ Plasma	UV vs. Arg Plasma	O ₂ Plasma vs. Arg Plasma
LDS 2h	<0,001 (+47,8%)	<0,001 (+70,4%)	<0,001 (+107,6%)	0,417 (+22,6%)	<0,001 (+59,8%)	<0,001 (+37,2%)
LDS 24h	<0,001 (+77,3%)	<0,001 (+77,7%)	<0,001 (+88,7%)	1,0 (-0,4%)	0,872 (+11,5%)	0,929 (+11,0%)
LDS 72h	<0,001 (+54,5%)	<0,001 (+47,9%)	<0,001 (+57,7%)	0,975 (-6,7%)	0,999 (+11,5%)	0,890 (+9,8%)
BrDU 24h	1,00 (+0,1%)	<0,001 (+42,6%)	<0,001 (+35,5%)	<0,001 (+42,6%)	<0,001 (+35,5%)	0,713 (-7,1%)
BrDU 48h	0,974 (-6,0%)	0,362 (+16,7)	0,236 (+8,9%)	0,285 (+14,9%)	0,498 (+7,8%)	0,936 (-7,8%)
BrDU 72h	0,997 (+0,5%)	0,642 (+2,8%)	0,091 (+5,8%)	0,758 (+2,3%)	0,132 (+5,3%)	0,579 (+3,0%)
XTT 48h	0,605 (+2,1%)	<0,001 (+14,6%)	<0,001 (+17,0%)	<0,001 (+12,5%)	<0,001 (+14,9%)	0,335 (+2,4%)
LDH 24h	0,175 (+6,3%)	0,691 (+3,6%)	0,467 (+4,6%)	0,859 (-2,7%)	0,970 (-1,7%)	0,996 (-1,0%)

Tabelle 1: P-Werte (T2-Test, 95% KI) und Veränderung der Relativwerte in Prozent bezogen auf die Eingangsvariablen der *in-vitro* Tests für Titan

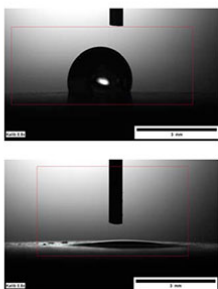


Abb. 3: Drop shape analysis (Beispiele), oben Titan nativ, unten Titan UV 12"

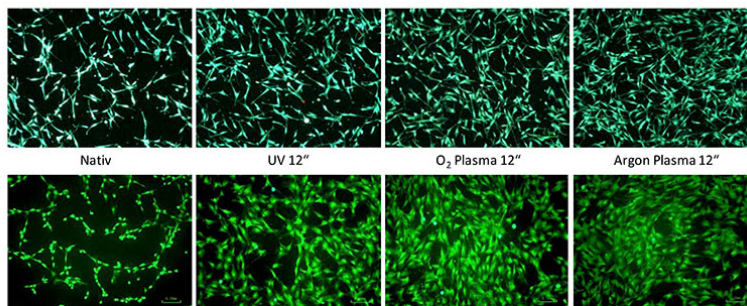


Abb. 4: Zellattachment nach 24 h, Fluoreszenzfärbung, Mikroskopie in 4x Vergrößerung, oben Titan, unten Zirkon

Zirkon	Nativ vs. UV 12"	Nativ Kontrolle vs. O ₂ Plasma	Nativ Kontrolle vs. Arg Plasma	UV vs. O ₂ Plasma	UV vs. Arg Plasma	O ₂ Plasma vs. Arg Plasma
LDS 2h	<0,001 (+30,6%)	<0,001 (+52,9%)	0,678 (-6,1%)	0,052 (+22,3%)	<0,001 (-36,7%)	<0,001 (-59,0%)
LDS 24h	0,019 (+9,0%)	<0,001 (+17,5%)	0,011 (+8,7%)	0,128 (+8,5%)	1,00 (-0,4%)	0,073 (-8,8%)
LDS 72h	0,074 (+6,5%)	<0,001 (+25,5%)	0,403 (-4,2%)	<0,001 (+19,0%)	0,001 (-10,7%)	<0,001 (-29,7%)
BrDU 24h	0,837 (+3,2%)	<0,001 (+10,7%)	1,00 (+0,7%)	1,00 (+7,5%)	0,956 (-2,5%)	0,604 (-9,9%)
BrDU 48h	0,927 (+2,5%)	0,025 (+12,8%)	0,994 (-1,1%)	0,091 (+10,3%)	0,820 (-3,6%)	0,014 (-13,9%)
BrDU 72h	0,993 (+0,9%)	0,099 (+8,1%)	0,126 (+7,7%)	0,166 (+7,2%)	0,205 (+6,8%)	0,999 (-0,4%)
XTT 48h	0,868 (+1,8%)	<0,001 (+15,9%)	0,001 (+11,0%)	<0,001 (+14,2%)	0,003 (+9,2%)	0,165 (+5,0%)
LDH 24h	0,382 (+2,5%)	0,966 (+0,9%)	0,765 (+1,6%)	0,766 (-1,6%)	0,966 (-0,9%)	0,984 (+0,9%)

Tabelle 2: P-Werte (T2-Test, 95% KI) und Veränderung der Relativwerte in Prozent bezogen auf die Eingangsvariable der *in-vitro* Tests für Zirkon

Schlussfolgerung

Eine Oberflächenfunktionalisation durch UV-Licht oder Kaltplasma führt zu einer signifikanten Reduktion von Kohlenstoffverbindungen auf Titan- und Zirkonoberflächen und zur Superhydrophilisierung. Beide Verfahren können *in vitro* die osteokonduktive Kapazität von Titan- und Zirkonoberflächen erhöhen mit signifikant besseren Proliferationsergebnissen für Kaltplasma verglichen zu UV. Weitere Studien sind erforderlich, um zu zeigen, ob durch beide Verfahren auch eine schnellere und verbesserte Osseointegration ermöglicht wird.

Literatur

- Aita H, Hori N, Takeuchi M, Suzuki T, Yamada M, Anpo M, et al. The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone. *Biomaterials*. 2009;30(6):1015-25.
- Att W, Takeuchi M, Suzuki T, Kubo K, Anpo M, Ogawa T. Enhanced osteoblast function on ultraviolet light-treated zirconia. *Biomaterials*. 2009;30(7):1273-80.
- Guastaldi FP, Yoo D, Marin C, Jimbo R, Tovar N, Zanetta-Barbosa D, et al. Plasma treatment maintains surface energy of the implant surface and enhances osseointegration. *Int J Biomater*. 2013;2013:354125.
- Suzuki T, Hori N, Att W, Kubo K, Iwasa F, Ueno T, et al. Ultraviolet treatment overcomes time-related degrading bioactivity of titanium. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(12):3679-88.

Das Projekt wird gefördert von der Camlog Foundation (Fördernummer CF11501)

Kontakt: Dr. Dr. Anders Henningsen
Wissenschaftlicher Mitarbeiter der
Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf
Email: a.henningsen@uke.de
Tel.: +49 (0)40 – 741053259