

C. J. Kirkpatrick · S. Barth · T. Gerdes · V. Krump-Konvalinkova · K. Peters  
Institut für Pathologie, Klinikum, Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz

# Pathomechanismen der gestörten Wundheilung durch metallische Korrosionsprodukte

## Zusammenfassung

**Hintergrund:** Im Dentalbereich werden seit langer Zeit metallische Werkstoffe unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung verwendet. Bei einigen Patienten kommt es nach der Implantatinsertion zu Wundheilungsstörungen. In diesem Artikel werden neben Grundlagen der eng verwandten Entzündungs- und Reparationsvorgänge die Pathomechanismen einer gestörten Wundheilung erörtert.

**Wundheilungsstörungen:** Die Modulation der Wundheilung kann über die Effekte der durch Korrosion freigesetzten Metallionen, aber auch durch die durch Abrieb entstandenen Mikropartikel auf die an der Heilung beteiligten Zelltypen (z. B. Endothelzellen) ausgeübt werden.

**Modelle:** In diesem Zusammenhang werden In-vitro-Modelle vorgestellt, mit deren Hilfe die komplexen Geschehnisse der Werkstoff-Gewebe-Grenzfläche in isolierte Aspekte zerlegt werden können. Darüber hinaus werden neu entwickelte, computergestützte Methoden angesprochen, welche die objektive Quantifizierung von biomaterial- bzw. korrosionsprodukt-induzierten Effekten auf komplexe Vorgänge, z. B. die Angiogenese in vitro, erlauben. Wegen der zentralen Bedeutung der Titanimplantate für Anwendungen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie werden erste experimentelle Ansätze zur Untersuchung möglicher negativer Auswirkungen vorgestellt. Der Beitrag schließt mit einer Diskussion über die Relevanz solcher Studien für die klinische Implantologie.

## Schlüsselwörter

Implantate · Entzündung · Wundheilung · Korrosion · Abrieb · Metallionen

Die umfangreichsten Erkenntnisse zur Verwendung von metallischen Werkstoffen stammen aus dem Gebiet der Zahnheilkunde. Im Mundraum stellt der Übergang zwischen Weichteilen, insbesondere der Gingiva, und dem Knochen eine ganz besonders empfindliche Grenzfläche dar, bei der Entzündungsprozesse einschließlich Infektionen und daraus resultierende Störungen der Heilungsreaktionen häufig auftreten. Dazu trägt auch das spezielle biologische Milieu bei, welches sich aus verschiedensten Faktoren ergibt. Zu diesen Faktoren gehören Einflüsse von Mikroorganismen, mechanische Belastung und massive nahrungsbedingte Veränderungen des pH-Werts. Alle diese Faktoren können zur Beschleunigung von Korrosionsvorgängen beitragen.

Metallische Werkstoffe im dentalen Bereich sind sehr vielfältig und umfassen

- Legierungen verschiedenster Art als Füllungsmaterialien,
- festsitzende Zahnersätze (Kronen und Brücken),
- Prothesen sowie
- Implantate, welche im direkten Knochenkontakt stehen.

Allein auf dem europäischen Markt befinden sich zurzeit mehr als 3000 verschiedene Arten, sodass die Permutationen der möglichen Wechselwirkungen (u. a. auch elektrogalvanische Prozesse) kaum überschaubar sind. Klinische Folge dieser Wechselwirkungen sind verschiedene pathologische Veränderun-

gen, welche in der Regel Entzündungsprozesse und Störungen der Gewebereparation beinhalten. In der vorliegenden Arbeit wird der aktuelle Wissensstand in Bezug auf metallinduzierte zelluläre Reaktionen und metallinduzierte Störungen der periimplantären Heilung erörtert. Darüber hinaus werden experimentelle In-vitro-Modelle vorgestellt, welche Rückschlüsse auf Pathomechanismen in vivo zulassen.

## Wundheilung: allgemeine Aspekte

Jede Art von Traumatisierung eines Gewebes induziert eine Wundheilungsreaktion (Abb. 1). Dabei kommt es zunächst zur physiologischen Reaktion der Entzündung, in deren Verlauf es zur kaskadenartig ablaufenden Aktivierung der Mediatorsysteme im Plasma kommt (Kallikrein/Kinin-, Gerinnungs-, Komplement- und fibrinolytisches System). Gleichzeitig finden streng geregelte Veränderungen der Genexpression in Zel-

Online publiziert: 14 Februar 2002  
© Springer-Verlag 2002

Diese Arbeit wird von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Schwerpunktprogramms Biosystem 322 1100 gefördert.

Prof. Dr. C.J. Kirkpatrick  
Institut für Pathologie,  
Johannes-Gutenberg-Universität,  
Langenbeckstraße 1, 55101 Mainz,  
E-mail:  
kirkpatrick@pathologie.klinik.uni-mainz.de,  
Phone: 06131-177301, Fax: 06131-176695

C. J. Kirkpatrick · S. Barth · T. Gerdes ·  
V. Krump-Konvalinkova · K. Peters

## Pathomechanisms of disturbed wound healing caused by metallic corrosion products

### Abstract

**Background:** Metallic materials of variable chemical composition have been used in dental practice for a long time. Complications with respect to tissue healing after insertion of implants are well documented. In this paper we present relevant aspects of the related fields of inflammation and repair processes and focus on the pathomechanisms of this impaired healing response.

**Modulation of wound healing:** This latter process is modulated by specific metal ions released by corrosion activity as well as by wear particles, which influence the function of the participating cell types (e.g. endothelial cells).

**In vitro models:** In this context, in vitro models are presented that permit study of isolated aspects of the complex sequence of events at the biomaterial-tissue interface. Furthermore, newly developed, computer-assisted methods allowing an objective quantification of biomaterial/corrosion product-induced effects on complex processes, such as angiogenesis in vitro, are demonstrated. Because of the central importance of titanium implants in maxillofacial surgery, new experimental approaches to study possible negative effects are presented. Finally, the relevance of such studies for clinical implantology is evaluated.

### Keywords

Implants · Inflammation · Wound healing · Corrosion · Wear · Metal ion release

## Originalien

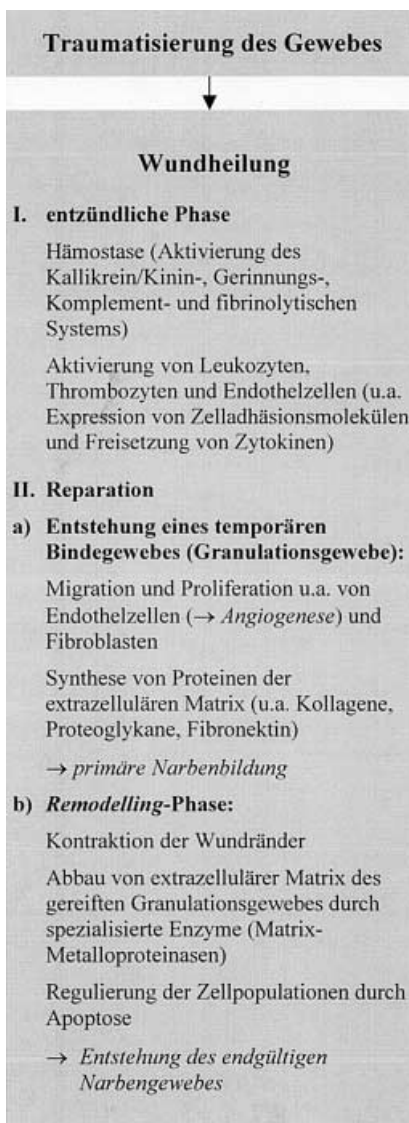


Abb. 1 ▲ Phasen der Wundheilung

len des zirkulierenden Bluts (Granulozyten, Thrombozyten, Monozyten, Lymphozyten), ortsständiger Entzündungszellen (z. B. Makrophagen, Mastzellen) sowie Endothelzellen, insbesondere der Gefäßendstrombahn (Mikrozirkulation) statt.

Obwohl die Entzündungsprozesse der Reparation vorausgehen, sind beide Vorgänge sehr eng miteinander verknüpft. Ein wesentlicher gemeinsamer Nenner ist das Endothel, welches die „Bühne“ darstellt, auf der sich die Entzündungsvorgänge abspielen [26]. Gleichzeitig sind die Endothelzellen der entscheidende Zelltyp beim angiogenen Schritt der Wundheilung.

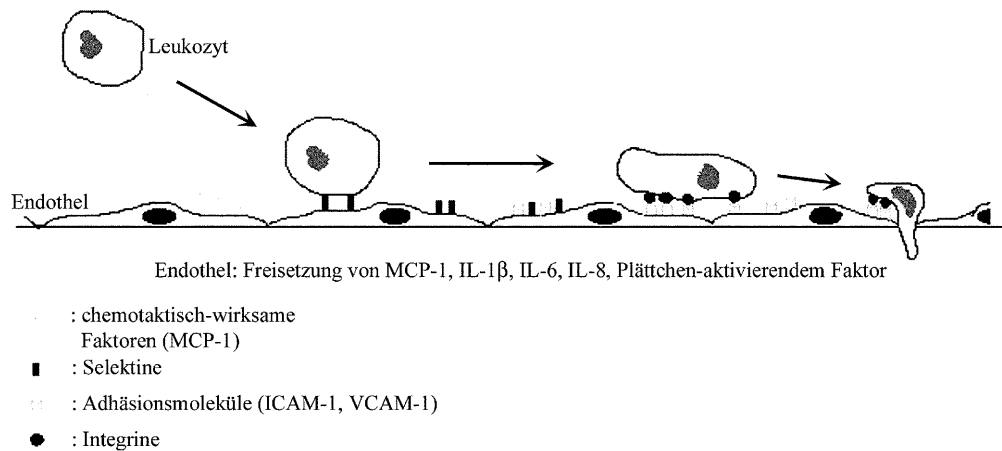
Die zentrale Bedeutung des Endothels für die Steuerung der Entzün-

dungsreaktion hängt von 2 wesentlichen Funktionen ab. Zum einen verfügt das Endothel über eine Reihe von chemotaktisch wirksamen und proinflammatorischen Syntheseprodukten, wie z. B. dem Chemokin MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), den Interleukinen (IL)-1 $\beta$ , -6 und -8 sowie dem Plättchen-aktivierenden Faktor, deren Expression durch proinflammatorische Stimuli gesteigert werden kann [31]. Zum anderen werden durch die Expression verschiedener Gruppen von Zelladhäsionsmolekülen die Wechselwirkungen zwischen Endothelzellen und zirkulierenden weißen Blutzellen (Leukozyten) durch Erkennung spezifischer Liganden gesteuert (Abb. 2) [34]. Endothelzellinteraktionen mit Granulozyten und Monozyten werden insbesondere durch die Expression von E-Selektin und ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), Lymphozytenadhäsion dagegen durch VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) reguliert.

Die zentrale Rolle von Endothelzellen bei der Angiogenese ergibt sich daraus, dass neue Blutgefäße aus einwandernden Endothelzellen des bereits vorhandenen Gefäßsystems entstehen. Angiogeneseprozesse spielen bei einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Ereignisse eine entscheidende Rolle [22]. Bei der Wundheilung um Metallimplantate, aber auch allgemein nach Gewebetrauma, wird ein so genanntes Granulationsgewebe, bestehend aus einsproßenden Kapillaren sowie aktiven Fibroblasten, gebildet. Bezüglich der frühen Phase der Angiogenese werden Endothelzellfunktionen so umgestellt, dass Basalmembranbestandteile abgebaut werden. Es folgen die Migration und die Proliferation der Endothelzellen. Dabei sind eine Reihe unterschiedlicher Zelladhäsionsmoleküle von Bedeutung [5]. Im weiteren Verlauf der Angiogenese werden Komponenten der extrazellulären Matrix neu synthetisiert und modelliert. Nicht mehr benötigte Zellen werden durch programmierten Zelltod (Apoptose) beseitigt [11]. Es muss betont werden, dass nicht nur Endothelzellen, sondern auch andere Zelltypen, wie z. B. Fibroblasten, Perizyten und Monozyten, ihren Beitrag zu diesem vielschichtigen Vorgang leisten.

Es ist bekannt, dass implantierte Werkstoffe durch ihre physikochemische Zusammensetzung komplexe bio-

Abb. 2 ► Schematische Darstellung des Übertritts (Transmigration) von Leukozyten aus dem Blutgefäß über das Endothel zum Ort der Entzündung. Es handelt sich dabei um einen chemotaktisch gesteuerten, zytokinabhängigen Prozess. Dabei spielt die Exposition von Adhäsionsmolekülen auf der Endothel- und Leukozytenoberfläche eine entscheidende Rolle



logische Reaktionen und somit die Biokompatibilität beeinflussen können [3]. Die initiale Proteinadsorption an die Werkstoffoberfläche ist in dieser Hinsicht von erheblicher Bedeutung [43], da eine molekulare Konstellation eintritt, welche die frühen Wechselwirkungen zwischen Werkstoff und dem zellulären Biosystem steuert. Hinzu kommen materialbedingte Faktoren, wie lösliche Produkte (Ionen) und die Abgabe von Mikropartikeln.

### Allergische Reaktionen

Wenn auch Überempfindlichkeitsreaktionen gegen Metalle wie Nickel seit langer Zeit bekannt sind [16, 48], liegen in der Literatur lediglich sporadische Berichte über Hypersensibilitäten gegenüber metallischen Werkstoffen vor [13, 18]. Eine definitive Korrelation zwischen einer im Hauttest festgestellten Kontaktallergie und einer Intoleranz gegenüber orthopädischen Metallimplantaten ist ungeklärt [44]. Des Weiteren ist bekannt, dass die Mundschleimhaut weit aus weniger reaktiv gegenüber allergischen Reizen ist als die Haut.

Yang u. Merritt [52] wiesen darauf hin, dass bei Immunreaktionen gegen Metalle nicht nur zellgebundene Reaktionen (Typ-IV-Überempfindlichkeit), sondern auch die Produktion von Antikörpern gegen Metalle stattfinden. Eine Betrachtung der Literatur lässt erkennen, dass die Forschung auf dem Gebiet der möglichen implantatassoziierten Immunreaktionen vertieft werden muss.

Ein Schwerpunkt der immunologischen Forschung betrifft die Interaktionen zwischen T-Lymphozyten und Zellen der Monozyten-Makrophagen-Reihe als Antigen präsentierende Zellen. Dennoch gibt es andere Zellen, wie z. B. Endothelzellen, die auch als Antigen präsentierende Zellen fungieren und MHC-Klasse-II-Antigene exprimieren können. Diese Überlegungen unterstreichen die Notwendigkeit, immunologisch relevante Aspekte der Implantologie klinisch und experimentell zu verfolgen.

### Korrosion und Abrieb

Entscheidende Einflussgrößen metallischer Werkstoffe sind ihre Korrosions- [23, 46, 47] und Abriebprodukte als Folge chemischer bzw. mechanischer Belastung [1, 19, 35, 40, 51]. In Bezug auf den Aufbau geeigneter experimenteller Modelle zur Untersuchung der pathobiologischen Effekte dieser Korrosions- und Abriebprodukte stellt sich die schwierige Frage der relevanten Konzentrationen bzw. Mengen der Metallionen bzw. Partikel, welche im Experiment eingesetzt werden sollten. Blumenthal et al. [7] bemängelten die zur Solubilisierung benötigte Säurebehandlung von Gewebeproben vor der Bestimmung von Ionenkonzentrationen und Partikelzahlen, da diese Methode einige Partikel in Ionen umwandeln und somit den ursprünglichen Zustand im Gewebe verfälschen könnte. Mit Hilfe einer Hypochloritbehandlung wurde dieses Problem gelöst. Relevant für die im Folgen-

den dargestellten experimentellen Daten war der Nachweis von Kobaltionenkonzentrationen bis zu 0,9 mM im Gewebe um gelockerte Metallimplantate (Hüftgelenkprothesen). Unsere In-vitro-Studien zur Toxizität von Kobaltionen zeigten in Konzentrationsbereichen, welche denen von Blumenthal et al. [7] nachgewiesenen Konzentrationen entsprechen, einen deutlich zytotoxischen Einfluss auf Endothelzellen im Verlauf von 24–72 h (Induktion der Apoptose) [37].

### Experimentelle Studien über Pathomechanismen

Die nach einer Implantation zu erwartenden Gewebereaktionen an der Werkstoff-Gewebe-Grenzfläche sind von äußerster Komplexität. In-vitro-Modelle, welche diese in vivo auftretenden Reaktionen adäquat nachahmen (z. B. Dreidimensionalität, gewebeähnlicher Zustand, Verwendung humaner Zellen, zelluläre Interaktionen), sind nur in geringer Anzahl etabliert. Es finden sich jedoch in der Literatur eine Reihe von Studien an Zellen verschiedener Spezies, die entscheidende Einzelkomponenten des komplexen Geschehens in vitro verfolgen. So konnten z. B. Elagli et al. [12] zeigen, dass Titanpartikel von murinen Peritonealmakrophagen in vitro phagozytiert werden, ohne dabei zytotoxische Effekte zu induzieren. Es kam jedoch zur Steigerung verschiedener Enzymaktivitäten (u. a. Laktatdehydrogenase bzw. Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase).

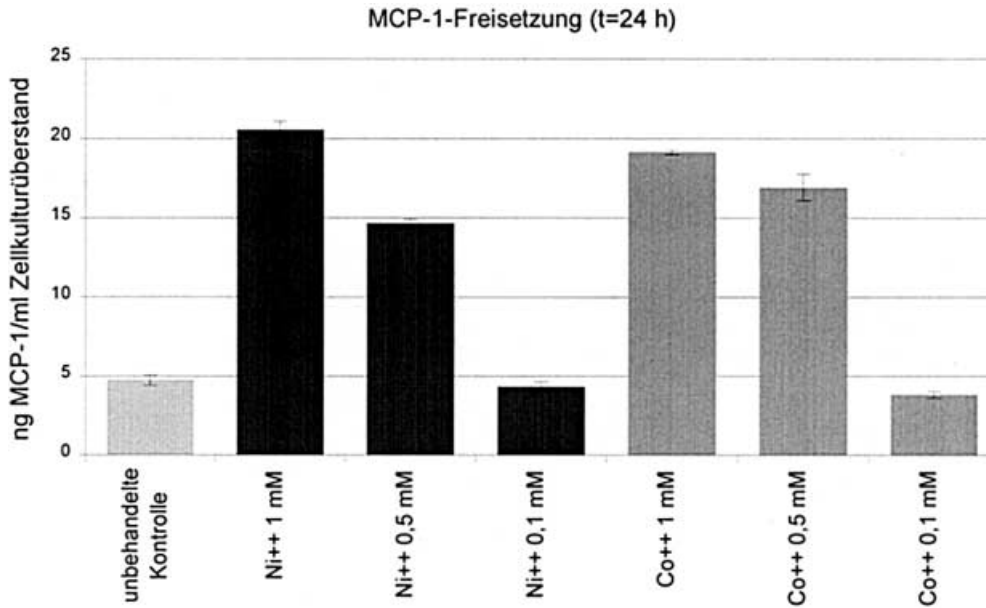


Abb. 3 ◀ Freisetzung von MCP-1 in den Zellkulturüberstand nach 24-stündiger Inkubation von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen mit verschiedenen Konzentrationen von Ni<sup>2+</sup> und Co<sup>2+</sup> (Nachweis mittels ELISA)

Diese Aktivitätssteigerungen wurden als Zellabwehrreaktion und nicht als Zeichen einer zytotoxischen Wirkung gewertet. Eine fehlende toxische Wirkung von Titanpartikeln wurde auch für humane Monozyten beschrieben. Trotz ausbleibender Toxizität induzieren TiAlV-Partikel im Vergleich zu Partikeln von TiAlNb oder reinem Titan eine signifikant höhere Freisetzung von Prostaglandin E<sub>2</sub> sowie den Zytokinen IL-1, IL-6 und TNF $\alpha$  [39]. Eine titaninduzierte Produktion von Zytokinen in humanen Blutmonozyten wurde auch von anderen Forschergruppen belegt [6]. Aus NiCr-Dentallegierungen resultierende Korrosionsprodukte führten bei Gingivafibroblasten zur Reduktion der Zellproliferation. Zytotoxische Effekte blieben wiederum aus [9]. Kürzlich wurden Bakterienassays mit Hilfe eines Biolumineszenzverfahrens verwendet, um die Toxizität verschiedener Metallionenmischungen zu untersuchen [41]. Dabei konnten gute Übereinstimmungen zwischen dieser Methode und konventionellen Zellassays erzielt werden.

Weitere In-vitro-Studien zur Untersuchung von Zellinteraktionen mit Titan befassten sich mit dem Proliferationsverhalten von Zelllinien (z. B. L-929) bei Adhäsion auf Titanlegierungen [21], der Adhäsion von Osteoblasten in Abhängigkeit von extrazellulären Matrixproteinen, wie Fibronectin und Laminin [29], der Regulierung der Tenas-

cinproduktion in Gingivafibroblasten durch Modifikation der Topographie von Titanoberflächen [17] und der Induktion des Osteoblastenphänotyps in humanen Knochenmarkzellen in Kontakt mit Titan [25].

Zahlreiche Studien zeigten in unterschiedlichen Zellkultursystemen die Zytotoxizität von Metallionen [10, 27, 45, 49, 50]. Eine entscheidende Rolle bei dem Nachweis der Zytotoxizität spielt die Wahl der Kulturbedingungen. Da verschiedene Zelltypen abweichende Anforderungen an das Zellkulturmilieu stellen, sind üblicherweise unterschiedliche Kulturmedien in Verwendung. Unsere Untersuchungen zeigen, dass die Ergebnisse der metallioneninduzierten Effekte in deutlicher Abhängigkeit zur Zusammensetzung des Zellkulturmediums stehen. Dabei ist vermutlich die Konzentration an Spurenelementen (z. B. Zn, Se) ein ausschlaggebender Faktor (Manuskript in Vorbereitung).

Im eigenen Labor wird versucht, die pathobiologische Situation in vivo durch Anwendung von In-vitro-Methoden zu simulieren, wobei ausschließlich mit Zellen humanen Ursprungs experimentiert wird. So soll die klinische Relevanz dieser experimentellen Ansätze bewahrt bleiben. Es muss dabei betont werden, dass alle in vitro gewonnenen Daten aus einem artifiziellen System resultieren, welches ständig mit der In-vivo-Konstellation, ob tierexperimentell oder kli-

nisch, verglichen werden sollte. Vorteilhaft ist jedoch der Einsatz von In-vitro-Modellen, weil die Möglichkeit zur Aufklärung isolierter Schritte der Pathogenese besteht, welche insbesondere für die Konzipierung neuer therapeutischer Vorgehensweisen notwendig ist.

Aufgrund der erheblichen pathogenetischen Signifikanz des Endothels für die Entzündungs- und Wundheilungsreaktion muss nach einem geeigneten Modellsystem in vitro gesucht werden. Humane Umbilikalvenenendothelzellen, d. h. Endothelzellen aus der Nabelschnur, sind leicht verfügbar und somit ein beliebtes Modell für solche Studien. Problematisch dabei sind ihr embryonaler Ursprung und ihre makrovaskuläre Natur, d. h. sie stammen aus größeren Gefäßen des venösen Bereichs. Die oben präsentierten Grundlagen der Entzündungsreaktion sowie Reparatur zeigen jedoch eindeutig, dass sich diese essenziellen Reaktionen im mikrovaskulären Bereich abspielen. Da vergleichende Studien an Endothelzellen unterschiedlicher Herkunft neben der bekannten strukturellen Heterogenität auch eine große funktionelle Heterogenität zeigen [32, 37], muss dieser bei den verschiedenen In-vitro-Modellen Rechnung getragen werden, indem der relevante Mikrozirkulationsabschnitt beachtet wird.

Als geeigneter Endothelzelltyp für In-vitro-Ansätze wurden von uns hu-

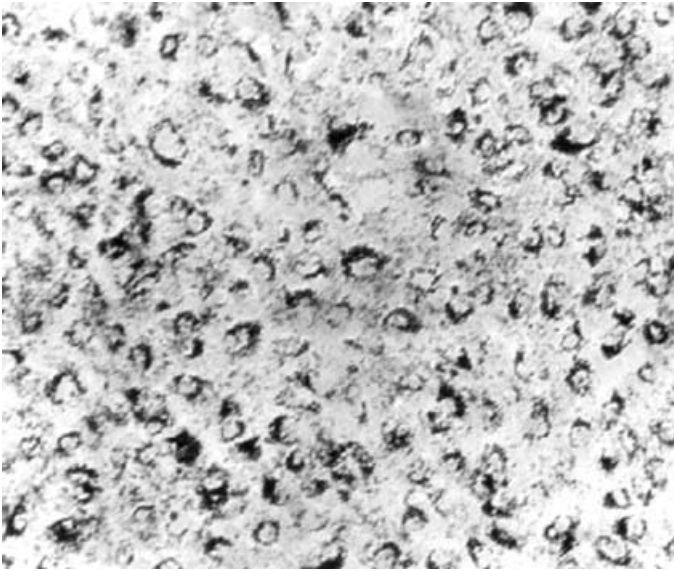


Abb. 4 ▲ Endothelzellen nach 24-stündiger Inkubation mit  $\text{TiO}_2$ -Partikeln (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Zellkulturmedium; Phasenkontrastaufnahme, Vergr. 100:1)

mane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen gewählt und eine Reihe von Assays aufgebaut, die wichtige Entzündungsparameter erfassen. Insbesondere spielt die Expression proinflammatorischer Faktoren, wie den Chemokinen MCP-1 und IL-8, eine entscheidende Rolle, da diese den Aktivierungszustand der Mikrovaskulatur widerspiegeln. Als Modellen aus der Implantologie galten für unsere Studien  $\text{Ni}^{2+}$ - und  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen. Alle bisher durchgeführten Versuche zeigten eine eindeutige, dosisabhängige Expressionssteigerung der proinflammatorischen Genprodukte der Endothelzellen. Dazu gehören MCP-1 (Abb. 3) und IL-8, welche u. a. die Chemotaxis von Monozyten bzw. neutrophilen Granulozyten bewirken, sowie bedeutsame Zelladhäsionsmoleküle, wie E-Selektin und ICAM-1, welche entsprechende Liganden an Monozyten und Granulozyten des peripheren Bluts erkennen. Erwähnenswert ist, dass die trivalenten Ionen des Chroms zwar zytotoxisch wirken, aber darüber hinaus keinen Einfluss auf den entzündlichen Status der Endothelzellen haben.

Da für experimentelle Zwecke keine Titanionen, sondern lediglich  $\text{TiO}_2$ -Partikel zur Verfügung stehen, besteht bisher keine Möglichkeit, die mit  $\text{Co}^{2+}$ - und  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen durchgeführten Versuchsreihen mit Titanionen zu wiederholen. Versuche zur Exposition von humanen dermalen mikrovaskulären

Endothelzellen mit  $\text{TiO}_2$ -Partikeln führten zu deren Phagozytose. Nach 24-stündiger Inkubation zeigte das phasenkontrastmikroskopische Bild die Akkumulation dieser Partikel im Zytoplasma (Abb. 4).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen ließen erkennen, dass  $\text{TiO}_2$ -Partikel schon nach 1-stündiger Inkubation phagozytiert wurden (Abb. 5). Da die Partikel aggregiert erschienen, ist zu vermuten, dass sie in Vakuolen internalisiert wurden (Abb. 5a). Nach 24-stündiger Inkubation zeigten auch die elektronenmikroskopischen Bilder große Partikelmengen diffus im Zytoplasma (Abb. 5b).

Die Untersuchung des Inflammationsstatus der humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen nach Exposition mit  $\text{TiO}_2$ -Partikeln führte nicht zur signifikanten Erhöhung der E-Selektin-Expression (Abb. 6). Trotzdem zeigten Einzelfälle eine geringfügige Expressionssteigerung. Diese fand jedoch erst bei der Gabe hoher Partikelmengen (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Zellkulturmedium) statt und ist im Vergleich mit den durch  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen (Abb. 6) induzierten Effekten als geringfügig einzustufen. Es ist dazu anzumerken, dass es sich bei den humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen um Primärzellen handelt, bei denen es zu spenderabhängigen, individuellen Abweichungen kommen kann.

Zur vollständigen Charakterisierung der durch  $\text{TiO}_2$  ausgelösten Effekte wurde die Genproduktexpression von ICAM-1 und VCAM-1 quantifiziert. Es zeigten sich keine Abweichungen zu den unbehandelten Kontrollzellen. Auch die Freisetzung der Chemokine MCP-1 und IL-8 wurde durch die Partikelexposition nicht signifikant verändert.

Damit führt die Exposition bzw. Phagozytose von  $\text{TiO}_2$ -Partikeln nicht zu signifikanten Veränderungen des Expressionsstatus der von uns untersuchten endothelialen Entzündungsparameter.

### Metallische Korrosions- und Verschleißprodukte als potenzielle Auslöser klinisch-pathologischer Veränderungen

al-Saffar et al. [1] beschrieben eine starke Korrelation zwischen dem Vorliegen metallischer Verschleißpartikel und der Expressionssteigerung von E-Selektin in den Endothelzellen der Blutgefäße im Periimplantatgewebe. Weitere immunhistochemische Studien beschrieben hohe Zytokinaktivitäten (z. B. IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6,  $\text{TNF}\alpha$ ) in den Geweben um gelockerte Hüftgelenkprothesen. Dabei gibt es jedoch keine nachweisbare Korrelation zwischen dem Ausmaß des Verschleißes und der Expressionshöhe der Zytokine [42].

Wesentliche pathogenetische Bedeutung nach der Entstehung von Abriebpartikeln in vivo kommt den Phagozyten und insbesondere den Makrophagen zu. Aus immunhistochemischen sowie Gewebekulturexperimenten geht hervor, dass metallische Partikel die Produktion des Wachstumsfaktors GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) in Makrophagen stimulieren, welcher die Proliferation und Frühphase der Makrophagenfusion zu mehrkernigen Riesenzellen vom osteoklastären Typ induziert [2]. Letztere sind für die klinische Komplikation der periimplantären Osteolyse von Bedeutung. Weitere Arbeiten im Tierexperiment zeigen eindeutig, dass Metallpartikel sowohl intraartikulär [20] als auch subkutan [38] eine starke Makrophagenreaktion hervorrufen können.

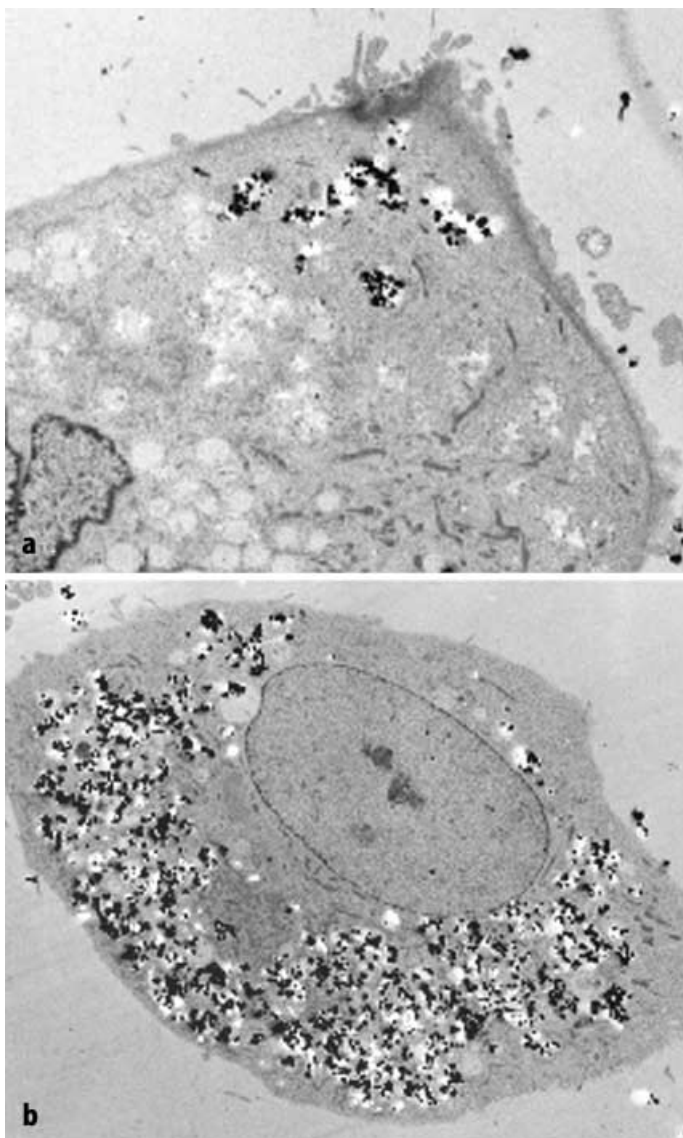


Abb. 5a,b ▲ Endothelzellen nach 1- (a) bzw. 24-stündiger (b) Inkubation mit  $\text{TiO}_2$  ( $25 \mu\text{g/ml}$ ) Zellkulturmedium; transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen, Vergr. 920:1 bzw. 520:1)

### Experimentelle Studien zur Angiogenese in vitro

Die Angiogenese ist in den letzten Jahren vermehrt in den Mittelpunkt der Forschung gerückt. Diese Fokussierung steht im Zusammenhang mit dem Wissen, dass die Angiogenese an der Regulation des Wachstums maligner Tumoren beteiligt ist [14]. Da die Angiogenese jedoch auch Anteil an den Wundheilungsprozessen besitzt, sind Untersuchungen zu den Auswirkungen implantierter Materialien auf diese Prozesse von großem Interesse. Da die Angiogenese in vivo eine komplexe Aneinanderreihung biologischer Reaktionen ist [4],

bei der aufgrund dieser Komplexität nur schwer zwischen direkten und indirekten Effekten unterschieden werden kann, wurden Modelle zur Angiogenese in vitro entwickelt [15, 24, 28, 36].

Dafür wurde genutzt, dass Endothelzellen auch in vitro in der Lage sind, kapillarähnliche Strukturen zu bilden. Es wird davon ausgegangen, dass diese Fähigkeit als intrinsisches Programm durch spezielle Stimuli abgerufen werden kann. Die meisten Modelle zur Angiogenese in vitro nutzen die Proteine der extrazellulären Matrix, um in oder auf dreidimensionalen Matrices gewebeähnliche Bedingungen zu schaffen. Die Bildung endothelialer, kapillarähnlicher

Strukturen erfordert jedoch häufig noch zusätzliche exogene Stimuli, wie z. B. Wachstumsfaktoren. Es wird vermutet, dass die unterschiedlichen Modelle in Abhängigkeit vom Angiogenesestimulus und der Wahl der extrazellulären Matrixkomponenten abweichende Aspekte der Angiogenese in vivo widerspiegeln.

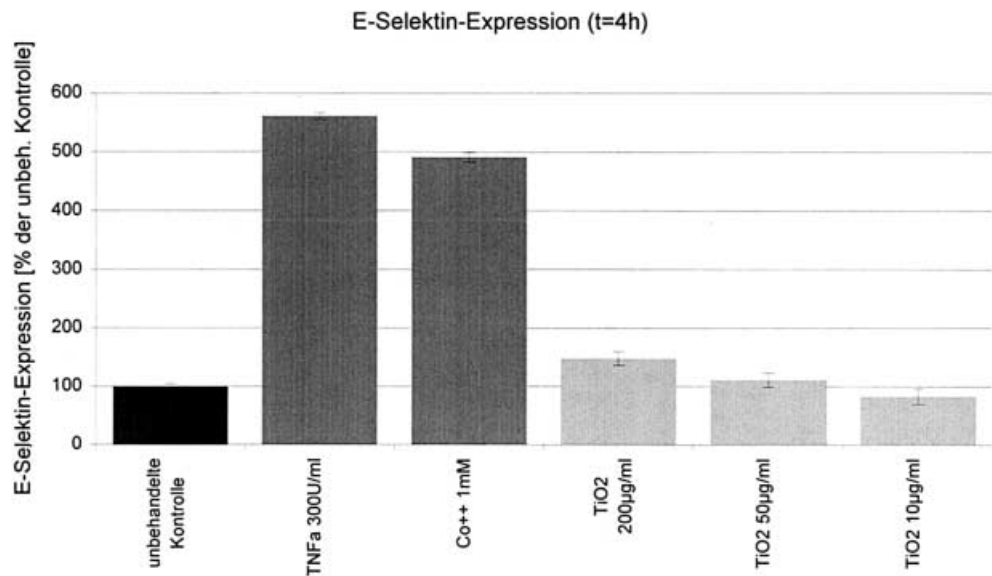
Für die Testung materialinduzierter Effekte auf die Angiogenese in vitro arbeiten wir mit einem bereits etablierten In-vitro-Modell [33]. Hier führt die Applikation eines dünnen Gels aus Typ-I-Kollagen auf die apikale Oberfläche der humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen zur Entstehung kapillarähnlicher Strukturen. Auslöser für die Morphogenese ist dabei vermutlich die Störung der endothelialen Polarität [30]. Dieses Modell spiegelt die während der Angiogenese erforderliche endotheliale Migration im engen interzellulären Kontakt wider. Die überwiegende Zweidimensionalität der primären In-vitro-Angiogeneseprozesse haben wir uns zunutze gemacht und eine computergestützte Quantifizierung der Effekte etabliert (zur Publikation angenommen).

Dieses Angiogenesemodell wird von uns zur Testung von metallioneninduzierten Effekten genutzt. Dabei ist die Inhibierung der Angiogenese in vitro durch divalente Kobaltionen besonders auffallend. Die aufgrund der Ergebnisse im Angiogenesemodell durchgeführten Endothelzelladhäsionsversuche und Immunfluoreszenzstudien weisen auf eine Störung der Zytoskelettfunktion hin (Manuskript in Vorbereitung).

### Fibrotische Reaktion

Nach Traumatisierung eines Gewebes durch Implantation kommt es zur Entzündung und nachfolgend im Rahmen der Wundheilung zur Reparatur. Reparatursprozesse beinhalten die Synthese und Reorganisation der extrazellulären Matrix. Ein bedeutender Faktor für die extrazelluläre Matrixsynthese ist das TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ), ein multifunktionales Zytokin, welches in verschiedenen Isoformen freigesetzt wird. Die bei der Entzündung infiltrierenden Zellen (Leukozyten, Monozyten/Makrophagen) sind in der Lage, TGF- $\beta$  zu sezernieren. Die Freisetzung der TGF- $\beta$ -Moleküle induziert die Produktion verschiedener extrazellulärer Matrixkomponenten und verhindert

Abb. 6 ► **Oberflächenexpression von E-Selektin auf humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen nach TNF $\alpha$ -Stimulation bzw. Zugabe von CoCl $_2$  (1 mM) und verschiedenen TiO $_2$ -Partikelkonzentrationen (Expression der unbehandelten Zellen: 100%; Nachweis mittel EIA)**



gleichzeitig deren Degradation. Unter normalen Umständen führen diese Eigenschaften zur Reparatur des betroffenen Gewebes, können aber auch im ungünstigen Fall, z. B. einer durch Korrosionsprodukte ausgelösten chronischen Entzündung, einen Beitrag zur Fibrose des Gewebes leisten [8].

### Rückschlüsse der metall-induzierten Effekte in vitro auf die Reparatur in vivo

Unsere experimentellen Daten zeigen, dass v. a. 2-wertige Metallionen deutliche Effekte auf den Entzündungsstatus von Endothelzellen besitzen. Die Zugabe der 3-wertigen Chrom- und Aluminiumionen und der Partikel des TiO $_2$  zeigen bei den von uns untersuchten Parametern keine signifikanten Effekte. Die auffallenden Effekte der 2-wertigen Metallionen sind darauf zurückzuführen, dass es eine Vielzahl biologischer Modulationspunkte gibt, welche von 2-wertigen Ionen (z. B. Ca, Mg, Mn, Se, Zn) abhängig sind.

Die in den vorherigen Abschnitten vorgestellten Publikationen und die Daten aus dem eigenen Labor zeigen, dass die Korrosionsprodukte und Abriebpartikel metallischer Implantate Einfluss auf bestimmte Aspekte der Wundheilung besitzen. Dabei tragen die experimentellen Ansätze in vitro zur Aufklärung bei, da die Komplexität der Prozesse in vivo häufig keine Rückschlüsse auf den direkten Auslöser mehr zulassen. Die In-vitro-Ansätze erlauben dagegen

die Betrachtung eines einzelnen Zelltyps, Korrosionsprodukts (Ionen) bzw. Abriebprodukts und tragen deshalb zur Vereinfachung bei. Da die In-vitro-Situation als artifiziell zu bezeichnen ist, müssen alle hier gewonnenen Daten mit der Situation in vivo verglichen werden, damit die klinische Relevanz bewahrt bleibt. Nichtsdestoweniger erlauben diese In-vitro-Ansätze Einblicke, welche in vivo verwehrt bleiben.

### Weiterführende Studien

In Bezug auf die dentale Implantologie, wobei Titanimplantate in der herkömmlichen Praxis im Mittelpunkt stehen, müssen experimentelle Wege entwickelt werden, um die biologischen Effekte von Titanionen untersuchen zu können. Bisher besteht lediglich die Möglichkeit, im Reagenzglas dieses hochreaktive Element als Oxid (TiO $_2$ ) zu untersuchen. Zurzeit wird versucht, neue In-vitro-Technologien zu entwickeln, welche die Untersuchung von freigesetzten Titanionen und ihren Auswirkungen auf relevante Zellen ermöglicht.

Ebenfalls von Bedeutung ist die In-situ-Expression wichtiger entzündungsregulierender Faktoren im periimplantären Gewebe und deren Vergleich mit den in vitro gewonnenen Daten.

**Danksagung** · Wir danken Frau Marianne Müller für ihre ausgezeichnete technische Assistenz.

## Literatur

1. Al-Saffar N, Mah JT, Kadoya Y, Revell PA (1995) Neovascularisation and the induction of cell adhesion molecules in response to degradation products from orthopaedic implants. *Ann Rheum Dis* 54: 201
2. Al-Saffar N, Khwaja HA, Kadoya Y, Revell PA (1996) Assessment of the role of GM-CSF in the cellular transformation and the development of erosive lesions around orthopaedic implants. *Am J Clin Pathol* 105: 628
3. Anselme K, Linez P, Bigerelle M, Le Maguer D, Le Maguer A, Hardouin P, Hildebrand HF, Iost A, Leroy JM (2000) The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behaviour. *Biomaterials* 21: 1567
4. Battagay EJ (1995) Angiogenesis: mechanistic insights neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med* 73: 333
5. Bazzoni G, Dejana E, Lampugnani MG (1999) Endothelial adhesion molecules in the development of the vascular tree: the garden of forking paths. *Curr Opin Cell Biol* 11: 573
6. Blaine TA, Rosier RN, Puzas JE, Looney RJ, Reynolds PR, Reynolds SD, O'Keefe RJ (1996) Increased levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 protein and messenger RNA in human peripheral blood monocytes due to titanium particles. *J Bone Joint Surg Am* 78: 1181
7. Blumenthal NC, Cosma V, Jaffe W, Stuchin S (1994) A new technique for quantification metal particulates and metal reaction products in tissues near implants. *J Appl Biomater* 5: 191
8. Branton MH, Kopp JB (1999) TGF-beta and fibrosis. *Microbes Infect* 1: 1349
9. Bumgardner JD, Lucas LC (1994) Corrosion and cell culture evaluations of nickel-chromium dental casting alloys. *J Appl Biomater* 5: 203

10. Carroll S, Wood EJ (2000) Exposure of human keratinocytes and fibroblasts in vitro to nickel sulphate ions induces synthesis of stress proteins Hsp72 and Hsp90. *Acta Derm Venereol* 80:94
11. Dimmeler S, Zeiher AM (2000) Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression. *Circ Res* 87: 434
12. Elagli K, Vernon C, Hildebrand HF (1995) Titanium-induced enzyme activation on murine peritoneal macrophages in primary culture. *Biomaterials* 16: 1345
13. Federmann M, Morell B, Graetz G, Wyss M, Elsner P, Thiessen R von, Wuthrich B, Grob D (1994) Hypersensitivity to molybdenum as a possible trigger of ANA-negative systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 53: 403
14. Folkman J (1996) New perspectives in clinical oncology from angiogenesis research. *Eur J Cancer* 32A: 2534
15. Folkman J, Haudenschild C (1980) Angiogenesis in vitro. *Nature* 288: 551
16. Gawkrödger DJ (1996) Nickel dermatitis: how much nickel is safe? *Contact Dermatitis* 35: 267
17. Goto T, Brunette DM (1998) Surface topography and serum concentration affect the appearance of tenascin in human gingival fibroblasts in vitro. *Exp Cell Res* 244: 474
18. Hansen PA, West LA (1997) Allergic reaction following insertion of a Pd-Cu-Au fixed partial denture: a clinical report. *J Prosthodont* 6: 144
19. Haynes DR, Crotti TN, Haywood MR (2000) Corrosion of and changes in biological effects of cobalt chrome alloy and 316L stainless steel prosthetic particles with age. *J Biomed Mater Res* 49: 167
20. Howie DW, Vernon-Roberts B (1988) The synovial response to intraarticular cobalt-chrome wear particles. *Clin Orthop* 232: 244
21. Ito A, Okazaki Y, Tateishi T, Ito Y (1995) In vitro biocompatibility, mechanical properties, and corrosion resistance of Ti-Zr-Nb-Ta-Pd and Ti-Sn-Nb-Ta-Pd alloys. *J Biomed Mater Res* 29: 893
22. Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD (1997) The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *Faseb J* 11: 457
23. Jacobs JJ, Gilbert JL, Urban RM (1998) Corrosion of metal orthopaedic implants. *J Bone Joint Surg Am* 80: 268
24. Kadish JL, Butterfield CE, Folkman J (1979) The effect of fibrin on cultured vascular endothelial cells. *Tissue Cell* 11: 99
25. Kim KJ, Itoh T, Kotake S (1997) Effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on human bone marrow cells cultured with various biomaterials. *J Biomed Mater Res* 35: 279
26. Kirkpatrick CJ, Wagner M, Hermanns I, Klein CL, Köhler H, Otto M, Kooten T van, Bittinger F (1997) Physiology and cell biology of the endothelium: a dynamic interface for cell communication. *Int J Microcirc* 17: 231
27. Kooten TG van, Klein CL, Wagner M, Kirkpatrick CJ (1999) Focal adhesions and assessment of cytotoxicity. *J Biomed Mater Res* 46: 33
28. Korff T, Augustin HG (1998) Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J Cell Biol* 143: 1341
29. Kornu R, Maloney WJ, Kelly MA, Smith RL (1996) Osteoblast adhesion to orthopaedic implant alloys: effects of cell adhesion molecules and diamond-like carbon coating. *J Orthop Res* 14: 871
30. Kramer RH (1985) Extracellular matrix interactions with the apical surface of vascular endothelial cells. *J Cell Sci* 76: 1
31. Krishnaswamy G, Kelley J, Yerra L, Smith JK, Chi DS (1999) Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease. *J Interferon Cytokine Res* 19: 91
32. Lehmann I, Brylla E, Sittig D, Spanel-Borowski K, Aust G (2000) Microvascular endothelial cells differ in their basal and tumour necrosis factor-alpha-regulated expression of adhesion molecules and cytokines. *J Vasc Res* 37: 408
33. Montesano R, Orci L, Vassalli P (1983) In vitro rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices. *J Cell Biol* 97: 1648
34. O'Donnell J, Mille-Baker B, Laffan M (2000) Human umbilical vein endothelial cells differ from other endothelial cells in failing to express ABO blood group antigens. *J Vasc Res* 37: 540
35. Nakashima Y, Sun DH, Maloney WJ, Goodman SB, Schurman DJ, Smith RL (1998) Induction of matrix metalloproteinase expression in human macrophages by orthopaedic particulate debris in vitro. *J Bone Joint Surg Br* 80: 694
36. Nehls V, Drenckhahn D (1995) A novel, microcarrier-based in vitro assay for rapid and reliable quantification of three-dimensional cell migration and angiogenesis. *Microvasc Res* 50: 311
37. Peters K, Unger RE, Barth S, Gerdes T, Kirkpatrick CJ (2001) Induction of apoptosis in human microvascular endothelial cells by divalent cobalt ions. Evidence for integrin-mediated signalling via the cytoskeleton. *J Mater Sci* 12: 955
38. Pandey R, Quinn J, Joyner C, Murray DW, Triffitt JT, Athanasou NA (1996) Arthroplasty implant biomaterial particle associated macrophages differentiate into lacunar bone resorbing cells. *Ann Rheum Dis* 55: 388
39. Rogers SD, Howie DW, Graves SE, Pearcy MJ, Haynes DR (1997) In vitro human monocyte response to wear particles of titanium alloy containing vanadium or niobium. *J Bone Joint Surg Br* 79: 311
40. Shahgaldi BF, Heatley FW, Dewar A, Corrin B (1995) In vivo corrosion of cobalt-chromium and titanium wear particles. *J Bone Joint Surg Br* 77: 962
41. Shettlemore MG, Bundy KJ (1999) Toxicity measurement of orthopedic implant alloy degradation products using a bioluminescent bacterial assay. *J Biomed Mater Res* 45: 395
42. Stea S, Visentin M, Granchi D, Melchiorri C, Soldati S, Sudanese A, Toni A, Montanaro L, Pizzoferrato A (1999) Wear debris and cytokine production in the interface membrane of loosened prostheses. *J Biomater Sci Polym Ed* 10: 247
43. Tang L, Ugarova TP, Plow EF, Eaton JW (1996) Molecular determinants of acute inflammatory responses to biomaterials. *J Clin Invest* 97: 1329
44. Thomas P, Summer B, Sander CA, Przybilla B, Thomas M, Naumann T (2000) Intolerance of osteosynthesis material: evidence of dichromate contact allergy with concomitant oligoclonal T-cell infiltrate and TH<sub>1</sub>-type cytokine expression in the peri-implant tissue. *Allergy* 55: 969
45. Wagner M, Hermanns I, Bittinger F, Kirkpatrick CJ (1999) Induction of stress proteins in human endothelial cells by heavy metal ions and heat shock. *Am J Physiol* 277: L1026
46. Walczak J, Shahgaldi F, Heatley F (1998) In vivo corrosion of 316L stainless-steel hip implants: morphology and elemental compositions of corrosion products. *Biomaterials* 19: 229
47. Wang JY, Wicklund BH, Gustilo RB, Tsukayama DT (1996) Titanium, chromium and cobalt ions modulate the release of bone-associated cytokines by human monocytes/macrophages in vitro. *Biomaterials* 17: 2233
48. Wataha JC (2000) Biocompatibility of dental casting alloys: a review. *J Prosthet Dent* 83: 223
49. Wataha JC, Lockwood PE, Marek M, Ghazi M (1999) Ability of Ni-containing biomedical alloys to activate monocytes and endothelial cells in vitro. *J Biomed Mater Res* 45: 251
50. Wataha JC, Lockwood PE, Schedle A (2000) Effect of silver, copper, mercury, and nickel ions on cellular proliferation during extended, low-dose exposure. *J Biomed Mater Res* 52: 360
51. Wooley PH, Nasser S, Fitzgerald RH (1996) The immune response to implant materials in humans. *Clin Orthop* 326: 63
52. Yang J, Merritt K (1996) Production of monoclonal antibodies to study corrosion products of CO-CR biomaterials. *J Biomed Mater Res* 31: 71