

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE
PROF. DR. G. SCHMALZ
AUS DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

PROTEINADSORPTION AN BIOMATERIALIEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ulrich Carl

2010

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE
PROF. DR. G. SCHMALZ
AUS DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

PROTEINADSORPTION AN BIOMATERIALIEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ulrich Carl

2010

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Helmut Schweikl
2. Berichterstatter: PD. Dr. Ralf Bürgers
Tag der mündlichen Prüfung: 06. September 2010

Meinen Eltern für ihre unendliche Liebe und Unterstützung

	Seite
I Abkürzungsverzeichnis	9
II Abbildungsverzeichnis	11
1. Einleitung	13
1.1 Grenzfläche von Biomaterialien und Geweben	13
1.2 Speichel und Pellicelbildung	14
1.3 HSA (Humanes Serumalbumin)	16
1.4 Proteinadsorption an Biomaterialoberflächen	17
2. Fragestellung	22
3. Material und Methoden	23
3.1 Material	23
3.1.1 Chemikalien	23
3.1.2 Materialien	23
3.1.3 Lösungen	25
3.1.4 Biomaterialien	26
3.1.4.1 Polytetrafluorethylen (PTFE)	26
3.1.4.2 Polyethylen (PE)	27
3.1.4.3 Polymethylmethacrylat (PMMA)	28
3.1.4.4 Silikon (Mucopren)	28
3.1.4.5 Komposit (Tetric Evo Ceram)	29
3.1.4.6 Glasionomerzement (Ketac Molar)	30
3.1.4.7 Titan (Ti6Al4V)	30
3.1.4.8 Cobalt-Chrom-Molybdän (Co28Cr6Mo)	32
3.1.4.9 Silorankomposit (Filtek Siloran)	33
3.2 Methoden	33
3.2.1 Herstellung von Prüfkörpern	33
3.2.1.1 Polytetrafluorethylen (PTFE)	34
3.2.1.2 Polyethylen (PE)	34
3.2.1.3 Polymethylmethacrylat (PMMA)	34
3.2.1.4 Silikon (Mucopren)	35
3.2.1.5 Komposit (Tetric Evo Ceram)	35
3.2.1.6 Glasionomerzement (Ketac Molar)	36

	Seite
3.2.1.7 Titan (Ti6Al4V) und Cobalt-Chrom-Molybdän (Co28Cr6Mo)	37
3.2.1.8 Silorankomposit (Filtek Siloran)	37
3.2.2 Bestimmung der Oberflächenrauigkeit	37
3.2.3 Rasterelektronenmikroskopie	39
3.2.4 Netzwinkelbestimmung	39
3.2.5 Quantitativer Proteinnachweis	41
3.2.6 Speichel	42
3.2.7 Bestimmung der Speichelproteinkonzentration mittels BCA-Methode	43
3.2.8 Minifold für Proteinstandards	43
3.2.9 Proteinnachweis auf Prüfkörpern und Nitrozellulosemembran	44
3.2.9.1 Probenvorbereitung	44
3.2.9.2 Beschichtung der Proben mit HSA und Speichel	45
3.2.9.3 Nachweisverfahren mit Prüfkörpern und Nitrozellulosemembran	46
3.2.10 Detektion der Proteine mit ECL	48
3.2.11 Eichkurven und Proteinmengen auf Biomaterialoberflächen	50
3.2.12 Statistik	51
4. Ergebnisse	53
4.1 Rauigkeit der Biomaterialoberflächen	53
4.2 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Biomaterialoberflächen	55
4.3 Netzwinkel	58
4.4 Proteinadsorption auf Biomaterialien	61
4.4.1 Proteinstandardkurven mit HSA und Speichelproteinen	61
4.4.2 Proteinadsorption auf Biomaterialien	63
4.4.3 Korrelationsanalysen	64

	Seite
5. Diskussion	67
5.1 Bedeutung der Proteinstruktur für die Adsorption an Biomaterialoberflächen	67
5.2 Methoden der Proteindetektion	68
5.2.1. Nachweis radioaktiv markierter Proteine	69
5.2.2. Rasterkraftmikroskopie	70
5.2.3 Biotin-Avidin-Reaktion	71
5.2.4 Massenspektrometrie (MS)	72
•Liquid Chromatographie-Mass Spectrometry (LC-MS)	73
•Matrix-assisted laser desorption ionisation mass spectrometry (MALDI-MS)	73
5.3 Oberflächeneigenschaften und Proteinadsorption	74
5.3.1 Proteinadsorption in Abhängigkeit physiko-chemischer Parameter	77
5.4 Modelloberflächen für das Studium der Proteinadsorption	80
5.4.1 Humanes Serumalbumin (HSA) als Modellprotein	80
5.4.2 Speichelproteine und ihr Einfluss auf Plaque- und Kariesentstehung	80
5.4.3 Proteinadsorption auf medizinischen Biomaterialien	83
6. Zusammenfassung	90
7. Literaturverzeichnis	92
8. Danksagung	112
9. Lebenslauf	114
10. Anhang	115

I Abkürzungsverzeichnis

A-Silikon	Additionsvernetzendes Silikon
BCA	Bicinchinon-Säure
Bis-GMA	Bisphenol-A-diglycidyl-dimethacrylat
BSA	Bovines Serumalbumin
CoCrMo	Cobalt-Chrom-Molybdän
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	Enhanced Chemiluminescence
GIZ	Glasionomerzement
HEMA	Hydroxyethylenmethacrylat
HSA	Humanes Serumalbumin
kDa	KiloDalton
K-Silikone	Kondensationsvernetzendes Silikon
MMA	Methylmethacrylsäure
NEM	Nichtedelmetall
PBS	Phosphate Buffered Saline
PK	Prüfkörper
PMMA	Polymethylmethacrylat
PE	Polyethylen
PTFE	Polytetrafluorethylen
SAM	Self-Assembled-Monolayer
TBS	Tris-Buffered Saline
TEC	Tetric Evo Ceram
TEGDMA	Triethylenglycoldimethacrylat

UDMA Urethandimethacrylat
UHMWPE Ultra High Molecular Weight Polyethylene

II Abbildungsverzeichnis		Seite
Abbildung 1:	Perthometerapparatur und Rechenanlage für die Bestimmung der Rauigkeit von Biomaterialoberflächen	38
Abbildung 2:	Veranschaulichung der Rauigkeitsbestimmung	39
Abbildung 3:	Darstellung der Netzwinkelbestimmung bei hydrophober und hydrophiler Materialoberfläche	40
Abbildung 4:	Netzwinkelmessgerät	41
Abbildung 5:	Großaufnahme des Dosiersystems des Netzwinkel-messgerätes	41
Abbildung 6:	Veranschaulichung der Biotin-Avidin-Reaktion	42
Abbildung 7:	Biuret-Reaktion und die Bildung des detektierbaren Farbkomplexes	43
Abbildung 8:	Neun verschiedene Prüfkörper und ein HSA- bzw. Speichel-Proteinstandard auf Nitrozellulose-membran in einer Filmkassette	49
Abbildung 9:	Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge	50
Abbildung 10:	Ergebnisse der Rauigkeitsmessung der neun unterschiedlichen Werkstoffgruppen	54
Abbildung 11-19:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen: Polytetrafluorethylen (PTFE) Polyethylen (PE) Polymethylmethacrylat (PMMA) Silikon (Mucopren) Komposit (Tetric Evo Ceram) Glasionomerzement (Ketac Molar) Titan (Ti6AlV4) Cobalt-Chrom-Molybdän (Co28Cr6Mo) Silorankomposit (Filtek Siloran)	55 56 56 56 57 57 57 58 58
Abbildung 20:	Ergebnisse der Netzwinkelmessung der neun unterschiedlichen Biomaterialien	59
Abbildung 21:	Darstellung eines HSA-Proteinstandards mit Eichkurve	62

	Seite
Abbildung 22: Darstellung eines Speichel-Proteinstandards mit Eichkurve	62
Abbildung 23: Adsorbierte Proteinmengen (HSA und Speichel) auf den neun verschiedenen klinischen Biomaterialien	63
Abbildung 24: Korrelationsanalyse der HSA-Menge in Abhangigkeit von den Netzwinkeln der Materialien	65
Abbildung 25: Korrelationsanalyse der Speichelproteinmenge in Abhangigkeit von den Netzwinkeln der Materialien	66

1. Einleitung

1.1 Grenzfläche von Biomaterialien und Geweben

In der heutigen Zeit erlaubt der Fortschritt dem Menschen nach einem Unfall oder einer Krankheit durch ein Implantat oder eine zahnärztliche Restauration eine zufriedenstellende Rekonstruktion natürlicher Verhältnisse zu erzielen. Doch ist das eingebrachte Material ein Fremdkörper und vom Einfluss spezifischer Bakterien oder Zellen, die etwaige Entzündungsreaktionen auslösen können in seiner Erfolgsprognose abhängig [Frandsen *et al.*, 1991; Sbordone *et al.*, 2003; Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; von Eiff *et al.*, 2005]. Doch wie binden Bakterien und Zellen, welche auch eine Abwehrreaktion des Organismus beziehungsweise eine Nichtintegration des Werkstoffes verursachen können, an das Implantat?

Beim Einbringen eines körperfremden Materials in den menschlichen Organismus wird dieses innerhalb weniger Sekunden bis Minuten von Proteinen aus den umgebenden Gewebsflüssigkeiten überzogen. Proteine sind in allen Körperflüssigkeiten enthalten, sei es nun im Blutplasma, Bluts serum, im Speichel, im Urin oder in interstitiellen Flüssigkeiten.

In den meisten Fällen ist die erste Kontaktflüssigkeit eines medizinischen Implantats Blut, in der Mundhöhle ist es Speichel, der wie das Blut eine große Zahl organischer Bestandteile enthält [Ruhl, 1999]. Die Proteinadsorption an Implantatoberflächen erfolgt aufgrund schneller chemischer und physikalischer Wechselwirkungen, also noch bevor Zellen oder Bakterien an das Biomaterial binden. Dadurch wird ihre wichtige Bedeutung als Vermittler zwischen Materialoberfläche und Zellen oder Mikroorganismen ersichtlich [Horbett, 1993; Mrksich *et al.*, 1996; Ratner *et al.*, 1996; Montdargent *et al.*, 2000; Nakanishi *et al.*, 2001; Ofoli *et al.*, 2005; Roach *et al.*, 2005; Schweikl *et al.*, 2008; Iwata *et al.*, 2007]. Betrachtet man das breite Spektrum der Medizin, stellt die Proteinadsorption und die nachfolgende Zell- oder Bakterienadhäsion an ein eingebrachtes Biomaterial einen zweischneidigen Sachverhalt dar. Nicht an jedem Biomaterial werden Adsorption von Proteinen und die möglichen Folgen angestrebt [Arnebrant *et al.*, 1995; Wahlgren *et al.*, 1998]. Während beispielsweise eine Anhaftung von Osteoblasten zur Schaffung einer

zufriedenstellenden Osseointegration erwünscht ist, ist Zellattachement, vor allem bei in Kontakt mit Blut stehenden Prothesen, welches zur Ausbildung von Thrombosen führen würde, und an zahnärztlichen Füllungsmaterialien hingegen nicht erwünscht [Anselme, 2000; Anderson, 2001; Nakanishi *et al.*, 2001; Ostuni *et al.*, 2001; Castner *et al.*, 2002; Anselme *et al.*, 2006; Schweikl *et al.*, 2007; Ruhl *et al.*, 2007].

In der vorliegenden Arbeit wurde an verschiedenen Biomaterialien die Adsorption von Proteinen untersucht. Die meisten Oberflächen vieler dentaler Biomaterialien sind Serum, serumähnlichen Flüssigkeiten oder Speichel ausgesetzt. Deshalb wurde Speichel als eine komplexe Flüssigkeit und HSA als Modellprotein für Serumproteine gewählt, um die Proteinadsorption auf unterschiedlichen Biomaterialien zu untersuchen [Edgerton *et al.*, 1993; Glantz *et al.*, 1999; Ratner *et al.*, 2004]. Die Abhängigkeit der Proteinadsorption von den physikalisch-chemischen Eigenschaften des jeweils verwendeten Materials ist durch zahlreiche Studien belegt [Krisdhasima *et al.*, 1992; Sethuraman *et al.*, 2004; Noh *et al.*, 2006]. Hierbei sind vor allem zwei Parameter, nämlich die Oberflächenrauigkeit und die Hydrophobizität eines Werkstoffes, ausschlaggebend. Diese Parameter wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht und der Menge an adsorbiertem Protein gegenübergestellt.

1.2 Speichel und Pellicelbildung

Der Speichel erfüllt zahlreiche für den Menschen lebenswichtige Funktionen. Die Durchfeuchtung der aufgenommen Nahrung und Bildung eines Nahrungsbolus als Vorbereitung für den Schluckakt sowie die Schutzfunktion für die Schleimhäute und die Zahnhartsubstanzen sind hier wohl besonders hervorzuheben [Tabak *et al.*, 1982; Mandel, 1987; Ruhl, 1999].

Der von den verschiedenen Speicheldrüsen des Menschen (*Glandula parotis*, *Glandula sublingualis*, *Glandula submandibularis*) produzierte Speichel besteht zu etwa 99% aus Wasser, nur etwa 1% sind feste Bestandteile, die sich zu gleichen Teilen aus anorganischen und organischen Komponenten zusammensetzen [Jungermann *et al.*, 1980; Bradley, 1996]. Im Laufe eines Tages produzieren die drei paarig angelegten Speicheldrüsen zusammen mit zahlreichen multilokulär in der

Mundhöhle befindlichen kleineren Drüsen ein Speichelvolumen von 0,6–1,5l Speichel [Vaupel, 2000].

Anorganische Bestandteile sind unterschiedliche Elektrolyte wie Natrium, Kalium, Kalzium, Magnesium, Chlorid, Fluorid, Bikarbonat oder Phosphat [Jungermann *et al.*, 1980; Ruhl, 1999]. Die Gruppe der organischen Speichelbestandteile umfasst vor allem verschiedene Proteine wie Glykoproteine und Muzzine, sowie prolin-, tyrosin-, cystein- oder histidinreiche Proteine. Des Weiteren enthält der Speichel auch Verdauungsenzyme, wie Alpha-Amylase, Proteine, die antibakteriell wirken, wie etwa Peroxidase, Lactoferrin und Lysozym, Immunglobuline (D,G,M, E und sekretorisches IgA) in unterschiedlicher Konzentration [Mandel *et al.*, 1965; Edgar, 1992; Ruhl, 1999], sowie das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Albumin [Kraus *et al.*, 1973; Cohen und Levine, 1989; Carlén *et al.*, 1998; Carlén *et al.*, 2003].

Die genannten Speichelbestandteile spielen bei der Entstehung dentaler Plaque auf natürlichen und artifiziellen oralen Oberflächen eine wichtige Rolle. Bei der dentalen Plaque handelt es sich um einen nicht mineralisierten bakteriellen Belag, der aus einer organischen Matrix besteht und weder durch Spülen noch mittels Wasserspray entfernt werden und somit zu bakterieller Zerstörung der Zahnhartsubstanzen führen kann [Hoyle *et al.*, 1990; Listgarten, 1994; Gottenbos *et al.*, 1999]. Die Pelliclebildung, also die Bildung einer Schicht aus Proteinen, Glykoproteinen und Kohlenhydraten aus dem Speichel, steht am Anfang dieser Plaquebildung. Es handelt sich hierbei um einen komplexen Ablauf, der vor allem durch chemische und physikalische Vorgänge beeinflusst wird [Ruhl, 1999; Hannig *et al.*, 2007; Hannig *et al.*, 2009].

Zunächst kommt es an den Zahnoberflächen zu einer spontanen Adsorption verschiedener Speichelproteine und Glykoproteine [Hay , 1967; De Jong *et al.*, 1984; Skjorland *et al.*, 1995; Hannig , 1999; Vacca-Smith *et al.*, 2000]. In der initialen Phase sind dies vor allem Phosphoproteine (Statherine, Histatin und prolinreiche Proteine) [Yao *et al.*, 1999]. Diese Proteine enthalten negativ geladene Phosphat- oder Carboxylgruppen, die elektrostatisch an positiv geladene Kalziumionen des Hydroxylapatits binden können [Johnson *et al.*, 1993; Hannig *et al.*, 2007]. Es wird nun modellhaft angenommen, dass als nächster Schritt ein physiologischer Austausch negativ geladener Phosphoproteine gegen ebenfalls negativ geladene

Phosphationen und eine Festigung der Adsorption dieser Proteine über Kalziumbrücken erfolgt [Hay, 1967; Embry *et al.*, 1986]. Laut Hannig *et al.* (2009) können neben Phosphoproteinen aus dem Speichel auch in dieser frühen Phase schon Muzzine, verschiedene Enzyme sowie bakterielle Glykosyltransferasen in der Pellikel detektiert werden. Neben elektrostatischen spielen auch hydrophobe Wechselwirkungen und van der Waals Kräfte in dieser initialen Phase der Pellikelbildung eine entscheidende Rolle [Al-Hashimi *et al.*, 1989; Stigler *et al.*, 2003; Hannig *et al.*, 2005; Teughels *et al.*, 2006].

Die auf diese erste, sehr schnelle Phase der Pellikelbildung folgende zweite Phase ist durch die kontinuierliche Adsorption verschiedener Biomoleküle und Mikroorganismen gekennzeichnet, die im Folgenden spezifische, irreversible Bindungen zur Pellikel ausbilden können [Sonju *et al.*, 1973; Kuboki *et al.*, 1987; Skjorland *et al.*, 1995; Hannig *et al.*, 2009]. Bei der Pellikelbildung zeigt sich ein Unterschied zwischen den Proteinen gegenüber den Bakterien bezüglich ihrer Bindungsschnelligkeit. Während die Proteine mittels hydrophober Wechselwirkungen und van der Waals Kräfte deutlich schneller mit der Zahnoberfläche interagieren können, verläuft die Adsorption der Mikroorganismen auch spezifisch und wird beispielsweise über sogenannte Fimbrien vermittelt [Gristina *et al.*, 1988; Marsh *et al.*, 1995; Ruhl, 1999; Hannig *et al.*, 2007].

1.3 HSA (Humanes Serumalbumin)

HSA ist das am häufigsten vorkommende Protein im Kreislaufsystem, und ist vor allem durch seine Fähigkeit, eine große Spannbreite kleiner hydrophober Moleküle wie Fettsäuren, Bilirubin, Steroide und Thyroxin zu binden, ein wichtiges Transportmolekül, das weiterhin auch als Lösungsvermittler der genannten Moleküle dient [Peters, 1995; Leggett *et al.*, 2003; Roach *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2006]. Aufgrund seiner hohen Serumkonzentration, die 100-1000 fach höher ist als die anderer Serumproteine und seiner molekularen Masse von 66 kDa wird angenommen, dass es bevorzugt in der frühen Bildungsphase eines Proteinlayers an verschiedene Materialoberflächen adsorbiert [Gendreau *et al.*, 1982; Hao *et al.*, 2004; Roach *et al.*, 2005; Iwata *et al.*, 2007]. Albumin wird oft als antiadhesives

Protein bezeichnet und findet daher häufig Verwendung, Implantatoberflächen vor den Folgen einer möglichen Zelladhäsion, die auch zur Thrombenbildung führen könnte, zu schützen [Taborelli *et al.*, 1995; Foster *et al.*, 2003; Bacáková *et al.*, 2004]. Albumin fehlt eine spezifische Domäne zur Unterstützung der rezeptorvermittelten Zelladhäsion über sogenannte Integrine [Curtis *et al.*, 1984; Anselme, 2000; Wilson *et al.*, 2005; Schweikl *et al.*, 2007]. So wird in vielen Studien nicht nur von einer Verminderung der untersuchten Zelladhäsion berichtet, sondern oft auch von reduzierter Bakterienadhäsion, sofern die untersuchten Materialoberflächen zuvor mit HSA oder BSA beschichtet wurden [Zdanowski *et al.*, 1993; Steinberg *et al.*, 1995]. Aus diesen Gründen nutzt man HSA oder BSA als Oberflächenpassivierer, um die Erfolgsprognosen spezifischer Implantate zu erhöhen [Hao *et al.*, 2004].

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte HSA bindet bevorzugt an hydrophobe Oberflächen. So berichten Leggett *et al.* (2003), dass HSA in deutlich höherem Ausmaß an CH₃-modifizierte Oberflächen adsorbierte als an die hydrophilen COOH-modifizierten Self-Assembled-Monolayers (SAMs) [Leggett *et al.*, 2003]. Interpretiert wurde diese Beobachtung damit, dass sowohl COOH als auch HSA bei neutralem pH-Wert wahrscheinlich negativ geladen vorliegen, was folglich zu einer elektrostatischen Abstoßung beider führen würde. Auch in anderen Studien, in denen die Adsorption von HSA oder BSA getestet wurde, fand man eine hohe Affinität dieser Proteine zu hydrophoben Oberflächen [Tilton *et al.*, 1990; Iwata *et al.*, 2007; Ziegler *et al.*, 2010]. Als Mechanismen der Albuminadsorption an biomedizinischen Materialien werden überwiegend hydrophobe, aber auch elektrostatische Wechselwirkungen angenommen [Tsai *et al.*, 1990; Tsai *et al.*, 1991; Sevastianov, 1995].

1.4 Proteinadsorption an Biomaterialoberflächen

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Materialien handelt es sich um ganz unterschiedliche Biomaterialien, von denen manche ausschließlich als Füllungs- oder Unterfütterungsmaterialien in der Zahnmedizin und zahnärztlichen Chirurgie ihre Verwendung finden und solche, die im gesamten Bereich der Medizin als Implantatwerkstoffe genutzt werden.

Über die rein zahnärztlichen Biomaterialien, Ketac Molar, Tetric Evo Ceram und Filtek Siloran gibt es im Vergleich zu den weitverbreiteten Implantatwerkstoffen, wie Polyethylen (PE), Polytetrafluorethylen (PTFE), Titan, Cobalt-Chrom-Molybdän, Polymethylmethacrylat (PMMA) und Silikon nahezu keine Studien, die sich ausschließlich mit der Proteinadsorption an den jeweiligen Biomaterialien beschäftigen. So untersuchten Ziegler *et al.* (2009) in einer Studie einen Zusammenhang zwischen Hydrophobizität von Biomaterialoberflächen und Proteinadsorption. Von den untersuchten Materialien wurden sowohl der Netzwinkel (Hydrophobizitätsgrad) als auch die Oberflächenrauigkeit bestimmt. Auf den hydrophoben Materialien wie PMMA und PTFE wurde eine deutlich höhere Proteinadsorption von BSA nachgewiesen als auf hydrophilen. Auf den hydrophilen Materialoberflächen kommt es besonders durch die stark gebundenen Wassermoleküle zu einem abweisenden Verhalten gegenüber einer möglichen Proteinadsorption [Ostuni *et al.*, 2001; Kidoaki *et al.*, 2002]. Der Oberflächenrauigkeit der einzelnen Materialoberflächen wurde eine nur untergeordnete Rolle für das Ausmaß der Proteinadsorption zugeordnet [Ziegler *et al.*, 2010]. Käs und Dorner beschäftigten sich in ihren Arbeiten unter Berücksichtigung verschiedener Oberflächenparameter (Rauigkeit) mit der Bakterien- beziehungsweise Speichelproteinadsorption auf rein zahnärztlichen Biomaterialien [Käs, 2004; Dorner, 2005]. Dabei wurden neben Phosphatzement, verschiedenen Kompositen (gefüllt oder ungefüllt), Paraffin, Acrylat, auch die beiden Biomaterialien Ketac Molar (GIZ) und Silikon untersucht. Durch Politur wurden unterschiedliche Rauigkeitsgrade der Materialoberflächen erzeugt und in Abhängigkeit dieses Parameters das Adhäsionsverhalten der Proteine und Bakterien untersucht. Zwar adsorbierten im Vergleich zu den anderen untersuchten Biomaterialien mehr Proteine und Bakterien an das hydrophile Ketac Molar, eine eindeutige Erklärung dieses Sachverhaltes konnte jedoch nicht gegeben werden. Dabei spielen wohl für die Bakterienadhäsion vor allem die physikalisch-chemischen Eigenschaften der jeweiligen Materialoberfläche eine entscheidende Rolle. Der Parameter der Rauigkeit scheint bei der Bakterienadhäsion eher in den Hintergrund zu treten [Käs, 2004]. Außerdem ist für die Proteinadsorption das enge Verhältnis zwischen Oberflächenenergie und Hydrophobie wichtig. Die niedrige Oberflächenladung und somit hohe Hydro-

phobizität scheint die Adsorption von Proteinen auf den verschiedenen Materialoberflächen zu begünstigen [Dorner, 2005].

Über die häufig verwendeten Implantatwerkstoffe wie Titan, Polyethylen, Polytetrafluorethylen und Silikon gibt es zwar zahlreiche Berichte, über die Proteinadsorption auf den jeweiligen Oberflächen liegen jedoch nur wenig Studien vor [Imai *et al.*, 1999; Deligianni *et al.*, 2001]. Mit der Adsorption von Speichelproteinen auf dentalen Biomaterialien beschäftigten sich Imai *et al.* in ihrer Studie. Unter der Annahme, dass eine Adsorption von Speichelproteinen an zahnärztlichen Materialien zu einer vermehrten Anlagerung von *Candida albicans* und somit zu einem gehäuften Auftreten von Schleimhautentzündungen (Stomatitis) führt, wurde die Speichelproteinadsorption auch auf Silikon untersucht. Hierbei wurde im Vergleich zum ebenfalls untersuchten Fluorpolymer deutlich mehr Speichelproteine auf Silikon gefunden [Imai *et al.*, 1999].

Deligianni *et al.* untersuchten in ihrer Studie einen den Zusammenhang zwischen Oberflächenrauigkeit von Titan (Ti6Al4V) und Zellattachment beziehungsweise Proteinadsorption. Die Titanprüfkörper wurden durch Politur in drei unterschiedliche Rauigkeitsklassen eingeteilt, mit einer Serum-Proteinlösung beschichtet und dann für acht und sechzehn Tage in einer Zellsuspension inkubiert. Es wurde ein genereller Zusammenhang zwischen zunehmender Rauigkeit und ansteigendem Zellattachment festgestellt, welcher auch in anderen Studien beobachtet wurde [Michaels *et al.*, 1989; Bowers *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1995]. Die Adsorption des untersuchten Proteins BSA erfolgte vermehrt an den glatten Titanoberflächen. An den rauen Titanoberflächen adsorbierte jedoch deutlich mehr Gesamtserum und Fibronectin. Erklärt wurde diese Beobachtung mit der Tatsache, dass das Aufrauen der Titanoberfläche zum Anstieg der Hydrophilie führt und daher weniger Albumin an den rauen Titanoberflächen adsorbiert [McDonald *et al.*, 1998; Serro *et al.*, 1999]. Albumin unterbindet teilweise das Zellattachment auf glatten Titanoberflächen, während Fibronectin zu einer gesteigerten Zelladhäsion führt [Deligianni *et al.*, 2001]. Serro *et al.* (2006) beschäftigten sich in ihrer Studie mit dem Einfluss des Serumproteins BSA auf den Frikitionsverschleiß künstlicher Gelenkmaterialien. Albumin zeigte eine deutliche Reduzierung des Friktionskoeffizienten, sofern es an die Metallocberflächen, Cobalt-Chrom-Molybdän (Co28Cr6Mo) und Stahl (*stainless*

steel) adsorbierte; im Fall des ebenfalls untersuchten Aluminiums führte die Anwesenheit von Albumin jedoch zu keiner Reduzierung der Friktion [Serro *et al.*, 2006]. In einer darauffolgenden Studie wurde beobachtet, dass die Metalloberflächen bei neutralem pH-Wert negativ geladen, die Aluminiumoberfläche hingegen positiv geladen ist. Aufgrund der Annahme, dass Albumin bei neutralem pH-Wert ebenfalls negativ geladen ist [Gispert *et al.*, 2006] wurde vermutet, dass Albumin direkt an die Aluminiumoberfläche bindet, während die Bindung an die Metalloberflächen vor allem über die Vermittlung spezifischer Ionen erfolgen sollte [Pradier *et al.*, 2002]. Bei positiv geladener und hydrophiler Oberfläche könnte es laut Serro *et al.* zu einer Denaturierung des direkt gebundenen Albumins kommen, was die Tatsache unterstützen würde, dass im Vergleich zur untersuchten Aluminiumoberfläche auf den Metalloberflächen mittels AFM ein dickerer Proteinlayer nachgewiesen werden konnte, der dann wahrscheinlich zu einer Reduzierung des Frikionskoeffizienten führte [Serro *et al.*, 2006].

Oft werden Oberflächen durch spezifische Beschichtungen modifiziert und so ihre eigentlichen Eigenschaften maskiert oder die Zell- oder Bakterienadhäsion in Abhängigkeit vorheriger Proteinbeschichtung untersucht [Rupp *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2008]. Die Adsorption von Proteinen aus Körperflüssigkeiten an Biomaterialoberflächen ist eines der ersten und wichtigsten Ereignisse, noch bevor Zell- oder Bakterienaktivitäten wie Adhäsion, Differenzierung oder Vermehrung stattfinden [Ofoli *et al.*, 2005]. Aus diesem Grund sind die adsorbierten Proteine mitentscheidend für die Integration eines Implantatgewebes. Letztlich bedingen Struktur und Zusammensetzung der an die Oberfläche adsorbierten Proteinschicht Ausmaß und Art der nachfolgenden biologischen Reaktionen, etwa Aktivierung des Koagulationssystems oder der Immunabwehr sowie die Osseointegration [Cacciafesta *et al.*, 2001; Hao *et al.*, 2004].

Proteine ändern nach erfolgter Adsorption ihre Konformation in unterschiedlich großem Ausmaß, was von der internen Strukturstabilität eines Proteins abhängt. Besonders die „instabileren“ sogenannten „soft proteins“ wie HSA, BSA und Alpha-Lactoalbumin scheinen nach Adsorption an hydrophobe Oberflächen eine größere Konformationsänderung aufzuweisen. Es wurden sogar Hinweise gefunden, dass BSA aufgrund seiner starken Wechselwirkungen mit hydrophoben CH₃-Oberflächen

einen hohen Grad seiner helikalen Sekundärstruktur verliert und somit teilweise denaturiert wird [Roach *et al.*, 2005].

Des Weiteren wird sehr häufig auch von einem generellen Zusammenhang zwischen starker Hydrophobizität und gleichzeitigem Anstieg der Proteinadsorption berichtet [Prime *et al.*, 1991; Krisdhasima *et al.*, 1992; Sigal *et al.*, 1998; Tengvall *et al.*, 1998; Sethuraman *et al.*, 2004; Roach *et al.*, 2005; Ruhl *et al.*, 2006]. So wurde beim Protein BSA ein Anstieg seiner Adsorptionsbereitschaft beobachtet, sofern die Netzwinkel der untersuchten Polyethylenoberflächen über 60° anstiegen. Die Beobachtung, dass hydrophobe Kräfte nicht auf Oberflächen mit einem Netzwinkel kleiner als 62,4° auftreten wurde auch schon früher gemacht [Yoon *et al.*, 1997; Sigal *et al.*, 1998; Vogler *et al.*, 1999; Ostuni *et al.*, 2001; Sethuraman *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2005].

Im Unterschied zu hydrophoben wird von hydrophilen Oberflächen angenommen, dass diese aufgrund des an ihrer Oberfläche gebundenen Wassers starke abstoßende Kräfte aufweisen und somit eine deutlich geringere Tendenz zur Proteinadsorption zeigen [Israelachvili *et al.*, 1996; Ostuni *et al.*, 2001; Noh *et al.*, 2006]. In anderen Studien wurden jedoch auch gegensätzliche Beobachtungen gemacht, die die These einer verstärkten Proteinadsorption auf hydrophoberen Oberflächen im Vergleich zu hydrophileren Oberflächen nicht stützen konnten [Prime *et al.*, 1991; Malmsten, 1995; Ho *et al.*, 1996; Scotchford *et al.*, 2002].

Auch der Parameter der Oberflächenrauigkeit ist von großer Bedeutung für das Ausmaß der Proteinadsorption auf Biomaterialoberflächen. So wurde gezeigt, dass säuregeätzte und zusätzlich sandgestrahlte Titanoberflächen stets mehr Protein (Albumin) adsorbierten als die nur säuregeätzten [Sela *et al.*, 2007]. Die Mikrostruktur und Rauigkeitseigenschaften der Biomaterialoberflächen beeinflussen in großem Maß deren Benetzbarkeit, was wiederum Einfluss auf die Adsorptionsmenge von Proteinen aus Plasma, Serum oder anderen Körperflüssigkeiten nimmt [Deligianni *et al.*, 2001; Jain *et al.*, 2003; de Oliveira *et al.*, 2004; Jayaraman *et al.*, 2004; Lossdorfer *et al.*, 2004; Rupp *et al.*, 2004]. Dieser Zusammenhang zwischen erhöhter Rauigkeit und gesteigerter Speichelproteinadsorption wurde auch für verschiedene Biomaterialien gezeigt [Dorner, 2005].

2. Fragestellung

Eine der zentralen Fragen in der Zahnmedizin ist es, Biomaterialien zu finden, die Biofilm-abweisend sind. Dadurch wäre es nicht nur möglich, eine Verringerung oder eine Inhibition der bakteriellen Besiedelung auf Restaurationsoberflächen zu erzielen, sondern auch das Entstehungsrisiko von Sekundärkaries an Füllungsändern zu reduzieren. Da die mikrobielle Besiedlung oft von Proteinen vermittelt wird, besteht eine Strategie darin, Werkstoffe herzustellen oder ihre Oberflächen so zu modifizieren, dass eine Proteinbesiedlung, wenn überhaupt, nur sehr begrenzt erfolgt.

Auch in anderen Bereichen der Medizin ist eine nach der Proteinadsorption erfolgende Zell- oder Bakterienadhäsion nur bedingt erwünscht. So wird ein mögliches Zellattachment, vor allem bei in Blutkontakt stehenden Prothesen, welches zur Ausbildung von Thrombosen führen würde nicht angestrebt. Zur Schaffung einer zufriedenstellenden Osseointegration hingegen ist die Anhaftung von Osteoblasten an zahnärztlichen Implantaten erwünscht.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Proteinadsorption an unterschiedlichen medizinischen Biomaterialien zu untersuchen. Dabei wurden die Oberflächenparameter Benetzbarkeit mit Wasser und Rauigkeit berücksichtigt. Es wurden insgesamt neun Biomaterialien untersucht. Im Einzelnen handelt es sich hierbei um Polytetrafluorethylen (PTFE), Polyethylen (PE), Polymethylmethacrylat (PMMA), Silikon (Mucopren), Komposit (Tetric Evo Ceram), Glasionomerzement (Ketac Molar), Titan (Ti6AlV4), Cobalt-Chrom-Molybdän (Co28Cr6Mo), Silorankomposit (Filtek Siloran).

Als Testproteine dienten HSA als Modellprotein für die in Kontakt mit Blut und interstitiellen Flüssigkeiten stehenden Biomaterialien und Speichel (Human Saliva) für die zahnmedizinischen Biomaterialien.

3. Material und Methode

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

HCl konzentriert (Merck, Darmstadt; Bestellnummer M317); Tris ([USB Cleveland, OH, USA; Bestellnummer USB22643]; NaCl (Merck, Darmstadt, Bestellnummer: M6404); NaH₂PO₄ (Merck, Darmstadt; Bestellnummer M6346); NaH₂PO₄ x 12 H₂O (Merck, Darmstadt; Bestellnummer M6579); Na₂B₄O₇ x 10 H₂O (Merck, Darmstadt; Bestellnummer M6308); Biotin (Sulfo-NHS-LC-Biotin; Pierce, Rockford, IL, USA; Bestellnummer 21335); Horseradish Peroxidase Avidin D (Vector, Loerrach; Bestellnummer A-2004); Tween20 (Bio-Rad Laboratories, München; Bestellnummer 170-6531); Avidin D (Vector, Loerrach; Bestellnummer A-2000); HSA (albumin from human serum/96-99%; Sigma. St. Louis, Missouri, USA; Bestellnummer A-1653); NaHCO₃ (Merck, Darmstadt; Bestellnummer 30532929216); DMSO (Sigma, St. Louis, Missouri, USA; Bestellnummer 154938); ECL (enhanced chemiluminescence/Western Blotting Analyse System; Amersham Biosciences, Freiburg/Breisgau; Bestellnummer RPN2109); BCA Protein A (Pierce; Rockford, IL, USA; Bestellnummer 23223); BCA Protein B (Pierce, Rockford, IL, USA; Bestellnummer 23224); Ethanol (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA; Bestellnummer 8006); Toluol (Merck. Darmstadt; Bestellnummer 1.083251000).

3.1.2 Materialien

Biomaterialien

Palapress (PMMA; Heraeus Kulzer GmbH, Hanau; Bestellnummer: 64707784 Flüssigkeit und 64707798 Pulver),
Filtek Siloran (Silorankomposit, 3M ESPE AG, Seefeld; Bestellnummer 4772),
Mucopren soft (Silikon, Kettenbach GmbH & Co. KG Eschenburg; Bestellnummer 28105),

Ketac Molar (Glasionomerzement, 3M ESPE AG, Seefeld; Bestellnummer 56420),
Tetric Evo Ceram (Komposit, Ivoclar Vivadent, Schaan, Lichtenstein),
Polyethylen (Zimmer GmbH, Winterthur, Schweiz; ISO-Nummer 5834-1/-2
UHMWPE),
Polytetrafluorethylen (Werkstatt Chemie, Universität Regensburg),
Co28Cr6Mo-Legierung (Zimmer GmbH, Winterthur, Schweiz; ISO-Nummer: 5832-
12),
Ti6AV4-Legierung (Zimmer GmbH, Winterthur, Schweiz; ISO-Nummer: 5832-3).

Labormaterialien und Geräte

Zellkulturplatten (Greiner, Frickenhausen; 24-Well-Platten, Bestellnummer 662102;
96 Well-Platten, Bestellnummer 439454),
Fotoschalen (Bürkle-LaboPlast, Bad Bellingen; Bestellnummer 230570423),
Nitrozellulose-Membran (Schleicher und Schuell, Dassel; Bestellnummer 10402588),
Eppendorfzentrifuge 54115C (Eppendorf, Hamburg),
Orbitalschüttler (Edmund Bühler, Tübingen),
Minifold 1 (Dot-Blot-System/Derlan-SRC 96, Schleicher und Schuell, Dassel;
Bestellnummer 10447910),
Ersatz-O-Ringe (Schleicher und Schuell, Dassel; Bestellnummer 10447902),
Gel-Blotting-Paper GB 003 (Schleicher und Schuell, Dassel; Bestellnummer
10426896),
Membran-Vacuumpumpe (Vacuubrand, Wertheim),
Ultraschall (Bandelin, Berlin; Sonorex Super RK 102 P),
Polymerisationslampe (Dentsply De Trey, Konstanz; Dentsply Curing Light,
Bestellnummer 14754; Modellnummer 201 RE),
Perthometer (Feinprüf Perthen GmbH, Göttingen),
Cellophan (Deti Qualitätsprodukte, Meckesheim; Artikelnummer 5050),
Filterpapier (Chromatographiepapier 58 x 68 cm, VWR International, West Chester,
PE, USA; Bestellnummer 9.028.313),
Röntgenfilme (Kodak BioMax Light-2, Amersham Biosciences, Freiburg/Breisgau;
Bestellnummern V1917012 und V8689358),

Filmkassette (Amersham Biosciences, Freiburg/Breisgau; Hypercassette 8x10 inches, Bestellnummer RPN 11649),
Film-Entwicklungsautomat (Agfa, Mortsel; Belgien, Gerätenummer 38818;
Universitätsklinikum Regensburg, Bauteil H1),
Ketac Molar-Aktivator und Ketac Molar-Applicator (3M ESPE, Seefeld),
Präzisionswaage (Sartorius, Göttingen; MC 210P),
Speichelfilter (Pall Corporation, Port Washington, NY, USA; Acrodisc 32 mm Syringe Filter, Porengröße: 5/1,2/0,45/0,2 µm Supor Membrane),
Rasterelektronenmikroskop (FEI Quanta 400F/Eindhoven, Holland)
Scanner: Image Scanner (Seriennr.: 01167296, Modell: Power Look 1120 USG, Amersham Biosciences, Freiburg/Breisgau).

3.1.3 Lösungen

TBS (Tris Buffered Saline)

20 ml 1M Tris-HCl (pH 7,6), 30 ml 5 mM NaCl

Die Lösung wird mit Aqua demin. auf 1 Liter aufgefüllt.

1M Tris-HCl-Puffer

121,4 g Tris in 800 ml Aqua demin lösen, mit HCl konz. (ca. 90 ml) auf pH 7,6 einstellen, Lösung mit Aqua demin. auf 1 Liter auffüllen und autoklavieren.

5 M NaCl

292,2 g NaCl in 800 ml Aqua demin. lösen, Lösung mit Aqua demin. auf 1 Liter auffüllen und autoklavieren.

Avidin D-Lösung

10 mg Avidin D in 2 ml 50 mM NaHCO₃ lösen, sterilfiltrieren (Porengröße: 0,2 µm) und aliquotieren.

1 % HSA-Lösung

0,5 g HSA werden in 50 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) gelöst.

50 mM NaHCO₃

4 mg NaHCO₃ in 1 Liter Aqua demin. lösen, sterile Filtration mit 0,2 µm (Porengröße) Filter.

0,9 % Kochsalzlösung

9 g NaCl in 800 ml Aqua demin. lösen, auf 1L mit Aqua demin. auffüllen und autoklavieren.

Saline/NaN₃-Lösung

10 % NaN₃ in 0,9 % physiologische Kochsalzlösung lösen.

10 % NaN₃

8 g NaN₃ in 80 ml Aqua demin. lösen.

BCA Proteingemisch A/B

5 ml BCA Protein A (50 Teile) und 100 µl BCA Protein B (1 Teil) mischen.

Film-Entwicklerlösung

Agfa (Mortsel, Belgien), Developer G153 A und Developer G153 B, Zusammensetzung: 1,25 Liter Aqua demin. + 1 Liter G153 A + 0,25 Liter G153 B.

Film-Fixiererlösung

Agfa (Mortsel, Belgien), Name: Rapid Fixer G354, Zusammensetzung: 2 Liter Aqua demin. + 0,5 Liter G354]; Aceton: [Merck (Darmstadt, Deutschland), Bestellnummer: 1.00014.1011].

3.1.4 Biomaterialien

3.1.4.1 Polytetrafluorethylen (PTFE)

Polytetrafluorethylen (PTFE) ist ein vollfluorisiertes Polymer und gehört zur Klasse der Polyhalogenolefine; PTFE ist ein Thermoplast, also ein hochmolekulares Fadenmolekül (Primärstruktur), das aus weitgehend unvernetzten Monomeren

aufgebaut und in Knäueln (Sekundärstruktur) angeordnet ist [Eichner *et al.*, 2000]. Thermoplaste besitzen keinen Schmelzpunkt, sondern ein Schmelzintervall; bei höherer Temperatur erfolgt die Zersetzung, unterhalb des Intervalls sind die Thermoplaste spröde und hart [Eichner *et al.*, 2000]. Es existieren nahezu keine Materialien, die an Polytetrafluorethylen haften bleiben, da seine Oberflächenspannung extrem niedrig, der Werkstoff also sehr hydrophob ist [Ratner *et al.*, 2004; Ziegler *et al.*, 2010].

In der Medizin wird PTFE unter anderem für Implantate, beispielsweise Gefäßprothesen, verwendet. Zum einen sorgt seine chemische Beständigkeit für eine lange Lebensdauer und gute Verträglichkeit, zum anderen verringert die glatte Oberfläche die Entstehung von Blutgerinnseln [Ratner *et al.*, 2004]. Auch in zahnmedizinischen Hygieneartikeln wie Zahnpasta ist PTFE enthalten. Als Konsumartikel begegnet einem Polytetrafluorethylen hauptsächlich als universelles Beschichtungsmaterial.

3.1.4.2 Polyethylen (PE)

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte UHMWPE (ultra high molecular weight polyethylene) der Firma Zimmer GmbH (CH/Winterthur) ist laut Herstellerangaben ein medizinisches Qualitätsmaterial, das vor allem als artikulierender Oberflächenbestandteil in Gelenkprothesen verwendet wird. Die getesteten PE-Prüfkörper bestehen aus Kalziumstearat-freiem, unter Kompression geformten und maschinell gefertigtem UHMWPE [Sulzer Medica, 2001].

Polyethylen findet hauptsächlich in seiner „high density form“ medizinische Anwendung, zum Beispiel als Material für Katheter und in seiner oben erwähnten UHMWP-Form als Komponente künstlicher Hüftgelenke [Ratner *et al.*, 2004].

Die „low-density“-Form des Polyethylen findet im medizinischen Bereich keine Anwendung, da das Polymer in dieser Form den hohen Sterilisationstemperaturen nicht standhalten würde [Ratner *et al.*, 2004].

3.1.4.3 Polymethylmethacrylat (PMMA)

PMMA ist ein linear aufgebautes hydrophobes Kettenpolymer [Ratner *et al.*, 2004]. In der Medizin ist PMMA unter anderem als Knochenzement orthopädischer Implantate unentbehrlich, des weiteren ist es, aufgrund seiner hohen Stabilität und hohen Lichtdurchlässigkeit, ein geeignetes Material für intraokuläre Linsen [Ratner *et al.*, 2004]. In der Zahnheilkunde findet es vor allem als Hauptbestandteil von Teil- oder Totalprothesen seine Verwendung. Grundbaustein dieses Kunststoffes ist der Methylester der Methacrylsäure (MMA) [Eichner *et al.*, 2000]. Aufgrund seiner kurzen Kette besitzt das MMA mit 100,3°C einen niedrigen Siedepunkt [Eichner *et al.*, 2000]. Polyreaktionen (Polykondensation, -addition und –merisation) sind chemische Vorgänge, die zur Verknüpfung von mono-, bi- und höherfunktionellen Methacrylaten zu Polymeren führen [Hoffmann *et al.*, 1979; Eichner *et al.*, 1996]. Im Zuge der Polymerisation vereinigen sich ungesättigte Verbindungen (Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen/C=C Bindungen) unter Ausbildung von Kohlenstoff-Kohlenstoff Einzelbindungen (C-C Bindung) zu kettenförmigen Makromolekülen [Elias, 1990]. Die Eigenschaften eines so gebildeten Kunststoffes hängen von Art und Verknüpfung der Monomere sowie von der räumlichen Anordnung der aus ihnen gebildeten Makromolekülen und deren Wechselwirkungen untereinander ab [Eichner *et al.*, 1996].

3.1.4.4 Silikon (Mucopren)

Silikone sind wärmebeständig, hydrophob und gelten in der Regel als physiologisch verträglich, also nicht gesundheitsschädlich. Aus diesen Gründen werden sie unter anderem für die Hautpflege und in der plastischen Chirurgie verwendet; so werden auch künstliche Herzklappen und Herzschrittmacher aus Silikon gefertigt [Ratner *et al.*, 2004]. In der Zahnmedizin sind additions- und kondensationsvernetzende Silikone für die exakte Abformung der Zahnreihen und Kiefer zur Herstellung von Präzisionsmodellen unerlässlich [Marxkors *et al.*, 2005].

Bei den Silikon-Abformmassen handelt es sich um Zweikomponentenmaterialien, die entweder aus einer „Paste-Paste“-Mischung oder einer „Paste-Flüssigkeits“-

Mischung zusammengesetzt sind [Eichner *et al.*, 1996]. Die Basispaste der Silikone enthält im Wesentlichen folgende Komponenten: Polysiloxane (Si-O-Si-Ketten mit 20-90 Massenprozent mit endständigen Hydroxylgruppen oder Vinylgruppen), Füllstoffe (Diatomeenerde mit 10-80 Massenprozent sowie 0-30 Massenprozent Parafinöl) [O'Brien *et al.*, 1978; Welker *et al.*, 1990]. Der Akzelerator, der die Polyreaktion beschleunigt, enthält als Katalysator Zinnoctoat beziehungsweise Dibutylzinnlaurat und ein mehrfunktionelles Alkoxyd als Vernetzer [Eichner *et al.*, 1996]. Weiterhin sind dem Reaktor noch Lösungsmittel, Farb- und Geruchsstoffe beigesetzt.

Aufgrund ihrer Zusammensetzung bezeichnet man Silikone als hydrophobe Materialien, die im wässrigen Medium extrem schlecht benetzbar sind. Dies beeinträchtigt unter anderem die Abformung feuchter Strukturen und somit auch die Benetzbarkeit durch den Gipsbrei bei der zahnärztlichen Herstellung von Präzisionsmodellen [Kullmann, 1989]. Das in der vorliegenden Arbeit getestete A-Silikon Mucopren soft ist ein Unterfütterungsmaterial für zahnärztliche Prothesen auf Vinylpolysiloxanbasis [Kettenbach Dental, 2006].

3.1.4.5 Komposit (Tetric Evo Ceram)

In der Zahnheilkunde werden unter dem Begriff Komposit zahnfarbene, plastische Füllungswerkstoffe verstanden, deren Bestandteile mittels Lichtpolymerisation aushärten und über ein spezielles Primer/Bonding-System mit der Zahnhartsubstanz verbunden werden [Eichner *et al.*, 2000].

Derartige Kunststoffe setzen sich aus drei Hauptbestandteilen zusammen, der organischen Matrix (hydrophob), anorganischen Füllkörpern (hydrophil) und einer Silanverbundphase [Hellwig *et al.*, 2006]. Konventionelle Komposite werden je nach Größe, Durchmesser und prozentualen Anteil der Füllkörper (zum Beispiel Bariumglas und Ytterbiumtrifluorid) in Makro-, Mikro-, Hybrid- (Makro- und Mikrofüller) und Nanofüllerkomposite eingeteilt. Das in die Arbeit eingebrachte Komposit Tetric Evo Ceram (TEC) ist ein Nanofüllerkomposit mit einer durchschnittlichen Füllkörpergröße von 0,6 µm. Es besteht zu 17-18 Gewichtsprozent aus BisGMA, UDMA und ethoxiliertem Bis-EMA, zu 82-83 Gewichtsprozent aus

Füllkörpern, wie Bariumglasfüller, Ytterbiumtrifluorid. Zusätzlich enthalten sind Additive, Katalysatoren, Stabilisatoren und weniger als 0,1 Gewichtsprozent Pigmente [Ivoclar Vivadent, 2006].

3.1.4.6 Glasionomerzemente (Ketac Molar)

Glasionomerzemente (GIZ) werden als zahnärztliche Füllungsmaterialien verwendet, eignen sich aber auch als Unterfüllungsmaterial unter Amalgam-, Komposit- und Keramikrestaurationen, werden zur Befestigung von Kronen und Inlays eingesetzt und auch für Zahnstumpfaufbauten verwendet [Hellwig *et al.*, 1995].

Der Glasionomerzement ist ein Pulver-Flüssigkeitsgemisch, wobei die Pulverkomponente aus fein gemahlenen Gläsern (Ca^{+} -, Na^{+} -, F^{-} - und Aluminiumsilikat), die Flüssigkeitskomponente aus Polyacrylsäuren und Wasser besteht [Smith, 1998]. Die Abbindereaktion, bei den konventionellen GIZ eine ausschließliche Säure-Basen-Reaktion, unterteilt sich in zwei Phasen. Zunächst lösen die Protonen (H^{+}) der Polyacrylsäure Ca^{2+} und dann Al^{3+} in Form von Fluoridkomplexen aus dem Silikatglas [Hellwig *et al.*, 2006; Nicholson, 1998].

Neben den mechanischen Haftungsmechanismen kommt es bei den Glasionomerzementen auch zur Ausbildung chemischer Bindungen mit der Zahnhartsubstanz [Hellwig *et al.*, 1995]; diese entstehen zwischen Polyacrylsäure und organischen Bestandteilen von Schmelz und Dentin. Im kariesaktiven Gebiss und in der Kinderzahnheilkunde ermöglichen die Glasionomerzemente aufgrund ihrer Fluoridabgabe neue Möglichkeiten. Die Entstehung und Progredienz von Sekundärkaries kann auf diese Weise reduziert werden [Forsten, 1998; Hellwig *et al.*, 2003]. In der Arbeit wurde der hochvisköse, hydrophile Glasionomerzement Ketac Molar verwendet.

3.1.4.7 Titan (Ti6Al4V)

Aufgrund der Ausbildung einer Sauerstoffinhibitionsschicht an Luft und der daraus resultierenden Korrosionsbeständigkeit spielen Titanlegierungen nicht nur in der heutigen Medizin eine wichtige Rolle [Ratner *et al.*, 2004]. Durch diese Schutzschicht

wird die Freisetzung von Metallionen durch Korrosion verhindert [Marxkors et al., 2005]. Die Titanoxidschicht ermöglicht des weiteren das feste Anwachsen von Knochen an ein in den Körper eingebrachtes Implantat und fördert somit die sogenannte Osseointegration [Ratner et al., 2004]. In der Medizin findet Titan vielerlei Einsatz, sei es als Implantatwerkstoff, bei Kronen und Zahnbrückenkonstruktionen, in der chirurgischen Orthopädie oder in der Mittelohrchirurgie, zum Beispiel als Material für Gehörknöchelchenersatz-Prothesen [Branemark et al., 1969; Ratner et al., 2004].

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Ti6AlV4 findet seine Verwendung typischerweise als Osseosyntheseimplantatmaterial oder als Verankerungskomponente von Prothesen [Ratner et al., 2004]. Es weist hohe mechanische Festigkeitswerte auf und ermöglicht die Osseointegration durch direktes Anwachsen des Knochens auf der aufgerauten Oberfläche [Sulzer Medica, 2001].

Eine Einstufung des Titans als hydrophiler oder hydrophober Werkstoff kann nur theoretisch erfolgen. Reine Titanoberflächen zeigen aufgrund der Oxidschicht, die sich bei Raumtemperatur spontan bildet, eine hohe Oberflächenenergie [Ask et al., 1989; Tengvall and Lundstrom, 1992;]. Diese Oxidschicht ist hydrophil und bindet auf ihrer äußersten Oberfläche Hydroxyl- und Sauerstoffgruppen [Zhao et al., 2005]. Allerdings binden Materialien mit einer hohen Oberflächenenergie auch anorganische und organische Ionen aus der Atmosphäre [Kasemo and Lausmaa, 1988; Textor et al., 2001], was hingegen zu einer verminderten Hydrophilie der Titanoberfläche führt [Bumgardner et al., 2003]. Auch durch bestimmte Reinigungsprozesse mit Alkohol [Kilpaldi et al., 2000; MacDonald et al., 2002] oder Sterilisation [Vezeau et al., 2000; Serro et al., 2003] wird die Hydrophobizität der Metalloberfläche gesteigert. Aus diesem Grund nimmt man von den existierenden Titanoberflächen eine niedrige Oberflächenenergie und daraus resultierend eine hohe Hydrophobizität an [Serro et al., 1997; Taborelli et al., 1997; Valagao et al., 1999].

3.1.4.8 Cobalt-Chrom-Molybdän (Co28Cr6Mo)

Die CoCrMo-Legierung spielt in der Zahn- und Humanmedizin ebenfalls eine wichtige Rolle. Während diese Nichtedelmetall-Legierung in der Zahnheilkunde aufgrund ihres hohen E-Moduls hauptsächlich für die Herstellung von Modellgussprothesen verwendet wird, findet sie in der Humanmedizin schon seit Jahrzehnten vor allem in der Unfallchirurgie und in der Implantologie ihre Anwendung [Eichner *et al.*, 2000; Ratner *et al.*, 2004; Marxkors *et al.*, 2005].

Die Eigenschaften der einzelnen Legierungsbestandteile ermöglichen die Herstellung eines extrem harten und vor allem korrosionsbeständigen Biomaterials [Marxkors *et al.*, 2005]. Cobalt prägt als Basis der CoCr-Legierung deren Eigenschaften, zum Beispiel die Dünngflüssigkeit, und trägt durch Oxidbildung zusätzlich zur Passivierung der Legierung bei [Eichner *et al.*, 2000]. Chrom ist der wesentliche Bestandteil zur Verbesserung der Korrosionsbeständigkeit durch Bildung von Oxiden; aus diesem Grund muss zur Sicherung der Mundbeständigkeit der Chromanteil in den Cobaltlegierungen mindestens 25 Massenprozent betragen [Eichner *et al.*, 2000]. Cobalt und Chrom bilden nach Erstarrung bei hoher Temperatur einen homogenen Mischkristall. Der Molybdänzusatz stabilisiert das Gefüge, erhöht die Dehnbarkeit und besitzt weiterhin Kontrollfunktion für die thermische Ausdehnung [Eichner *et al.*, 2000]. Silizium und Kohlenstoff verbessern die Fließeigenschaften, steigern die Härte und erhöhen den Schmelzpunkt [Eichner *et al.*, 2000; Marxkors *et al.*, 2005].

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Co28Cr6Mo-Legierung der Firma Zimmer GmbH mit einem Kohlenstoffgehalt von 0,2 Prozent findet seine Verwendung besonders häufig als hoch beanspruchtes Verbindungselement in modularen Hüftprothesen; es weist sowohl im kalt-, als auch im warmverformten Zustand hohe Festigkeitswerte auf und besitzt einen hohen Verschleißwiderstand [Sulzer Medica, 2001].

3.1.4.9 Silorankomposit (Filtek Siloran)

Silorane gehören ebenfalls zu den Kompositen. Der Unterschied der Silorane zu den konventionellen Kompositen liegt in der veränderten chemischen Struktur, der daraus resultierenden erniedrigten Polymerisationsschrumpfung und im Polymerisationsablauf, der bei den Methacrylaten durch Radikale, bei den Siloranen hingegen durch Kationen gestartet wird [Weinmann *et al.*, 2005; Guggenberger *et al.*, 2007]. Der Name der Silorane setzt sich aus den Komponenten Siloxan und Oxiran zusammen, wobei die Siloxane vor allem für die Hydrophobizität des Biomaterials verantwortlich sind [Weinmann *et al.*, 2005]. Bei den neu entwickelten Siloranen werden die linearen Methacrylate durch sogenannte Epoxidgruppen ersetzt. Diese funktionellen Gruppen verbinden sich bei der Polymerisation, indem sie sich öffnen und zueinander ausdehnen [3M ESPE, 2006; 3M ESPE, 2007]. Das Ergebnis ist eine deutlich geringere Volumenschrumpfung von 0,94 Volumenprozent (bonded disk method) und 0,99 Volumenprozent (Archimedes method) im Vergleich zu den Kompositen auf Methacrylatbasis [Weinmann *et al.*, 2005]. Aus dieser Tatsache resultieren möglicherweise eine prozentuale Reduktion von Randspaltbildungen bei zahnärztlichen Füllungen. Durch die bessere Adaption des Kunststoffes an der Zahnhartsubstanz erhofft man sich eine Minimierung von Sekundärkaries [3M ESPE, 2006].

3.2. Methoden

3.2.1 Herstellung von Prüfkörpern

Zunächst werden Glasobjektträger mit 70% Ethanol gereinigt, mit Aqua demin. gründlich abgespült und anschließend an Luft getrocknet. Die Herstellung der Prüfkörper erfolgt stets mit Handschuhen, spezifischen Instrumenten (Spateln) und auf einer mit Tüchern abgedeckten Oberfläche. Der Teflonring, in den die verschiedenen Materialien appliziert werden besitzt einen inneren Durchmesser von 11,3 mm, eine Wandstärke von 2 mm und ist 2 mm hoch.

3.2.1.1 Polytetrafluorethylen

Die Herstellung der PTFE-Prüfkörper erfolgte durch die Werkstatt Chemie der Universität Regensburg. Das Polytetrafluorethylen wurde zunächst in Stangen mit 11,3 mm Durchmesser hergestellt, und von diesen Stangen werden dann kleine Scheibchen mit 2 mm Dicke mittels einer Spitze heruntergedreht.

3.2.1.2 Polyethylen (PE)

Die Herstellung der PE-Prüfkörper erfolgte durch die Firma Zimmer GmbH (Winterthur). Das Polyethylen wurde zunächst in Stangen mit 11,3 mm Durchmesser hergestellt und von diesen Stangen werden dann kleine Scheibchen mit 2 mm Dicke heruntergeschnitten.

3.2.1.3 Polymethylmethacrylat (PMMA)

Der Prothesenkunststoff PMMA ist ein Pulver-Flüssigkeits-Gemisch. In einen Gummibecher werden 7 ml Flüssigkeit (Monomer) gefüllt und dann so viel Pulver (Polymer) gegeben, dass sich eine klare, dünnflüssige Masse ergibt. Mehrere Glasobjektträger werden auf eine abgedeckte Oberfläche gelegt und je ein Teflonring auf diesen platziert. Mit einem kleinen Löffel wird der angemischte Kunststoff in die Teflonringe eingefüllt, die Prüfkörper werden in einen auf 55°C vorgeheizten Drucktopf gelegt und bei 2,5 bar Druck für 15 Minuten polymerisiert. Ein zweiter Objektträger ist aufgrund der guten Fließfähigkeit des Kunststoffes, welche Lufteinschlüsse ausschließt und die Schaffung einer glatten Oberfläche ermöglicht, nicht nötig. Zuletzt wird der so gewonnene Prüfkörper für 7 Tage bis zum Einbringen in das Experiment bei einer Temperatur von 25°C in Aqua demin. aufbewahrt, um den Restmonomergehalt zu reduzieren. Die Lagerung der Prüfkörper erfolgt in 24-Well-Platten, wobei jedes Well mit 2 ml Aqua demin. gefüllt ist.

3.2.1.4 Silikon (Mucopren)

Der Glasobjektträger wird auf eine abgedeckte Oberfläche gelegt und dann der Teflonring auf diesem platziert. Das Silikon Mucopren soft liegt in speziellen Kartuschen vor, in denen Basis- und Katalysatorpaste nach Aufsetzen auf die Mischpistole von selbst gemischt werden [Kettanbach Dental, 2006]. Mit dieser Mischpistole wird das Silikon in den Teflonring eingebracht und lässt sich aufgrund seiner fließfähigen Konsistenz gut und gleichmäßig im Ring verteilen; wie beim Ketac Molar sollte auch beim Mucopren soft die Spitze der Mischkanüle beim Applizieren möglichst im Material verbleiben, um etwaige Lufteinschlüsse zu verhindern. Ein zweiter Objektträger wird zur Schaffung einer glatten Oberfläche nicht benötigt. Der hergestellte Prüfkörper ist aufgrund seiner plastischen Stabilität unbegrenzt haltbar und muss weder in Wasser noch feucht gelagert werden.

3.2.1.5 Komposit (Tetric Evo Ceram)

Der Glasobjektträger wird auf eine abgedeckte Oberfläche gelegt und dann ein Teflonring auf diesem platziert. Aus der TEC-Spritze (3g) wird mit einem sauberen Skalpell ein etwa 8 mm langes Stück abgeschnitten, dieses dann aufrecht in die Mitte des Teflonringes gesetzt und mit einem Spatel flachgedrückt; Materialüberschüsse werden entfernt. Nun wird ein zweiter Objektträger auf den Teflonring gelegt und mit dem Daumen fest gegen diesen gedrückt. Dieses Vorgehen ist notwendig, da es sich beim Komposit TEC in seiner unpolymerisierten Form um einen zäh plastischen Werkstoff handelt. Durch die Druckausübung wird eine bessere Verteilung der Masse im Teflonring und vor allem die Schaffung glatter Prüfkörperoberflächen gewährleistet. Die Aushärtung mit der Polymerisationslampe [Halogenlampe, Dentsply de Trey (Konstanz); Lichtintensität von 575 (Messung vom 21.02.08)] erfolgt durch die Objektträger. In einem Abstand von 5 cm wird der Prüfkörper auf 12-, 16- und 20-Uhr-Position gehärtet. Der zwischen den Objektträgern befindliche TEC-Prüfkörper wird dann nach gleicher Vorgehensweise auf der Rückseite polymerisiert. Nach abgeschlossener Polymerisation (120 Sek.) werden die Objektträger vorsichtig vom Prüfkörper entfernt und dieser aus dem Teflonring

entnommen. Zuletzt wird der so gewonnene Prüfkörper für 7 Tage, bis zum Einbringen in das Experiment bei einer Temperatur von 25°C in Aqua demin. (18 MΩ) aufbewahrt, um den bei Kompositen enthaltenen Restmonomergehalt zu reduzieren. Die Lagerung der Prüfkörper erfolgt hierbei in 24-Well-Platten, wobei jedes Well mit 2 ml Aqua demin. gefüllt ist.

3.2.1.6 Glasionomerzement (Ketac Molar)

Der Glasobjektträger wird auf eine abgedeckte Oberfläche gelegt und dann der Teflonring auf diesem platziert. Das Ketac-Aplicap (Ketac-Mischkapsel) wird mit einem speziellen Aktivator der Firma 3M ESPE aktiviert, wobei der Aktivator langsam nach unten gedrückt und für 2 Sek. in dieser Position gehalten wird. Dann wird das Ketac-Aplicap für 10 Sek. mit dem Vivadent Silamat geschüttelt und ein neues Ketac-Aplicap mit dem Aktivator aktiviert; dieses wird dann ebenfalls für 10 Sekunden im Vivadent Silamat geschüttelt und in der Zeit das erste Aplicap mit dem Ketac Aplicator in den Teflonring eingebracht. Bei diesem Vorgang werden zunächst die Randbereiche des Ringes ausgefüllt, und beim Herausdrücken des Ketac-Molars versucht mit der Aplicap-Spitze im Material zu verbleiben, um etwaige Lufteinschlüsse in den Prüfkörpern zu vermeiden. Das zweite Ketac-Aplicap wird auf dieselbe Weise in den Teflonring eingebracht und die Ketac-Prüfkörper-Oberfläche so gut wie möglich mit einem Spatel geglättet. Nun wird ein zweiter Objektträger auf den Teflonring gelegt und für 30 Sekunden fest auf diesen gedrückt. Der Ketac-Prüfkörper wird zwischen den beiden Objektträgern für 7 Minuten ausgehärtet, dann die Objektträger entfernt und der Prüfkörper vorsichtig aus dem Teflonring gedrückt. Zuletzt wird der so gewonnene Prüfkörper für 24 Stunden bis zum Einbringen in das Experiment bei einer eingestellten Temperatur von 25°C in einer „feuchten Kammer“ gelagert, da der Glasionomerzement für die Abbindungsreaktion Feuchtigkeit benötigt. Die feuchte Kammer besteht aus einem Kunststoffbehälter, auf dessen Boden ein feuchtes Tuch gelegt wird; auf dieses Tuch wird ein kleines Eisengitter gelegt, und darauf die einzelnen Prüfkörper platziert. Das Eisengitter verhindert somit den direkten Kontakt zwischen Ketac-Prüfkörper und dem feuchten Tuch.

3.2.1.7 Titan (Ti6Al4V) und Cobalt-Chrom-Molybdän (Co28Cr6Mo)

Die Herstellung der beiden Prüfkörpersorten erfolgte ebenfalls durch die Firma Zimmer GmbH (CH/Winterthur). Auch hier wurden von den unterschiedlichen Materialien zunächst Stangen mit 11,3 mm Durchmesser hergestellt und von diesen dann 2 mm dicke Prüfkörperscheiben abgeschnitten.

3.2.1.8 Silorankomposit (Filtek Siloran)

Die Herstellung der Sioran-Prüfkörper wird wie bei den TEC-Prüfkörper beschrieben durchgeführt. Nach Fertigung mit Hilfe der Glasobjektträger und Teflonringe erfolgt die Aushärtung des Silorankunststoffes mittels Lichtpolymerisation [Halogenlampe, Dentsply de Trey (Konstanz); Lichtintensität von 575 (Messung vom 21.02.08)]. Zuletzt wird der Prüfkörper für 7 Tage, bis zum Einbringen in das Experiment bei einer Temperatur von 25°C in Aqua demin. aufbewahrt, um den Restmonomergehalt zu reduzieren. Die Lagerung der Prüfkörper erfolgt in 24-Well-Platten, wobei jedes Well mit 2 ml Aqua demin. gefüllt ist.

3.2.2 Bestimmung der Oberflächenrauigkeit

In der vorliegenden Arbeit wurde die Adsorption von Proteinen an klinisch relevanten Biomaterialien untersucht. Wie durch zahlreiche Studien belegt, spielt auch die Rauigkeit eines Prüfkörpers bei diesen Adsorptionsuntersuchungen eine wichtige Rolle. Je größer nämlich die Rauigkeit einer Oberfläche, desto größer ist letztlich auch die eigentliche Prüfkörperoberfläche und somit auch die Fläche für eine mögliche Proteinadsorption. Aus diesem Grund wurde bei der Herstellung der einzelnen Prüfkörper mit der „Objektträgermethode“ versucht, möglichst gleiche Bedingungen zu schaffen. Da bei einer Politur von Prüfkörperoberflächen immer die Gefahr besteht, Rückstände von Polierpasten oder Schleifpapier nicht restlos entfernen zu können, wurde sich gegen eine Politur der einzelnen Proben entschieden. Zur Bestimmung der Oberflächenrauigkeit mit dem Perthometer wurden von jeder Materialgruppe drei Prüfkörper auf den Grad ihrer Rauigkeit überprüft,

wobei auf jeder Probe drei Messstellen gemessen wurden, nämlich rechts, mittig und links auf der Oberfläche. Bei der Rauigkeitsmessung wurden die Prüfkörper auf einer speziellen Vorrichtung platziert und die Perthometeradel zunächst rechts auf dem Prüfkörper aufgesetzt. Die Nadel tastete dann die Oberfläche des jeweiligen Prüfkörpers ab, in dem sie mechanisch über die Oberfläche „gezogen“ wurde. Nach gleichem Prinzip erfolgten dann die Rauigkeitsmessungen mittig und links auf der Prüfkörperoberfläche. Man erhält also drei Messwerte für eine Prüfkörper. Pro Biomaterial wurden drei Prüfkörper getestet, so dass sich insgesamt neun Rauigkeitswerte für ein Biomaterial ergaben. Diese neun Einzelwerte wurden in einem Medianwert zusammengefasst und so die Oberflächenrauigkeit des jeweiligen Prüfkörpers bestimmt.

Eine Tabelle mit den Werten aus allen Einzelmessungen befindet sich im Anhang (vgl. Kapitel 9).



Abbildung 1: Perthometerapparatur und Rechenanlage für die Bestimmung der Rauigkeit von Biomaterialoberlächen.

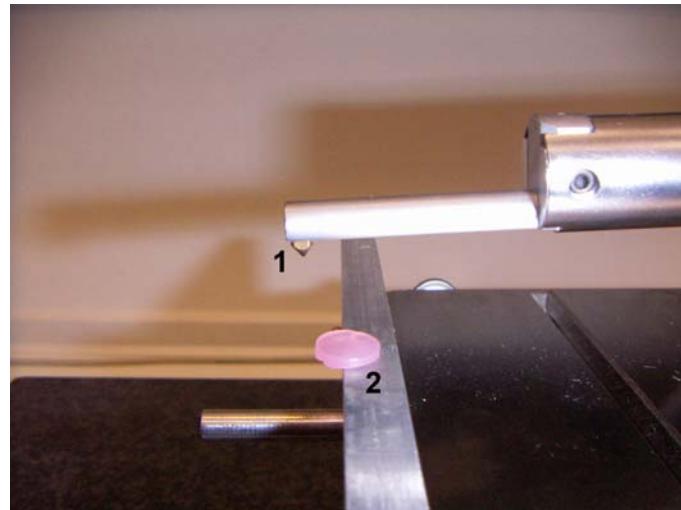


Abbildung 2: Das Bild zeigt die Perthesnadel (1) und einen Silikonprüfkörper (2), bei dem die Oberflächenrauigkeit bestimmt wird.

Der Perthesneter (Abbildungen 1 und 2) besteht aus einer Rechenanlage und der eigentlichen Perthesneterapparatur, auf welcher der jeweilige Prüfkörper platziert und dann mittels Perthesnadel seine Oberflächenrauigkeit ermittelt wird.

3.2.3 Rasterelektronenmikroskopie

Die Oberflächen der hier untersuchten Biomaterialien wurden elektronenmikroskopisch beurteilt. Dazu wurden die Prüfkörper zunächst wie oben beschrieben gereinigt und vorbereitet. Die Oberflächen wurden danach mit einem FEI Quanta 400F (Eindhoven, Holland) Rasterelektronenmikroskop im Hochvakuum-Modus in unterschiedlich hoher Auflösung nach Routineverfahren analysiert.

3.2.4 Netzwinkelbestimmung

Die Netzwinkelbestimmung mit Wasser der einzelnen Materialien erfolgte in den Räumlichkeiten der Universität Regensburg, Abteilung Chemie.

Für die Bestimmung wurden von jeder der neun Materialgruppen drei Prüfkörper nach üblicher Herstellungsmethode gefertigt und von diesen, nach Entfettung und Beseitigung etwaiger Monomer- beziehungsweise Herstellungsrückstände, der Netzwinkel gegen Wasser bestimmt (vgl. Kapitel 4.3).

Hierbei wurde der jeweilige Prüfkörper auf den Objektträger des Netzwinkelgerätes [Name: P1 Goniometer, Firma: Erna Inc. (Tokio, Japan)] gelegt und mit einer dünnen Nadel ein definierter Tropfen Wasser mit einem Volumen von etwa 2 μ l auf diesem platziert. Danach wurde durch die Mitte des Wassertropfens ein „Fadenkreuz“ gezogen und über dieses der individuelle Netzwinkel des jeweiligen Prüfkörpers abgelesen. Dieses Vorgehen wurde für jedes Material zweimal mit jeweils drei Prüfkörpern wiederholt, und die resultierenden sechs Einzelwerte zu Medianen zusammengefäßt. Die Größe des abgelesenen Winkels ist ein Maß für die Einstufung als hydrophober oder hydrophiler Werkstoff. Diese Einteilung erfolgte auch anhand der Studie von Vogler, der Biomaterialien mit einem Netzwinkel gegen Wasser von 0° bis etwa 63° als hydrophil und von etwa 63° bis 120° als hydrophob einstuft [Vogler, 1998]. Die Beobachtung, dass hydrophobe Kräfte nicht auf Oberflächen mit einem Netzwinkel kleiner als 62,4° auftreten wurde auch schon in anderen Studien gemacht [Vogler *et al.*, 1999; Ostuni *et al.*, 2001; Sethuraman *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2005].

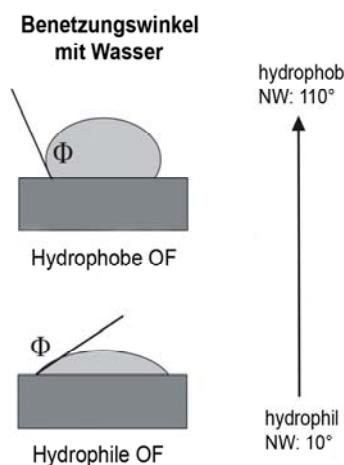


Abbildung 3: Darstellung der Netzwinkelmessung (NW) bei hydrophober und hydrophiler Materialoberfläche (OF); Φ = Benetzungswinkel.

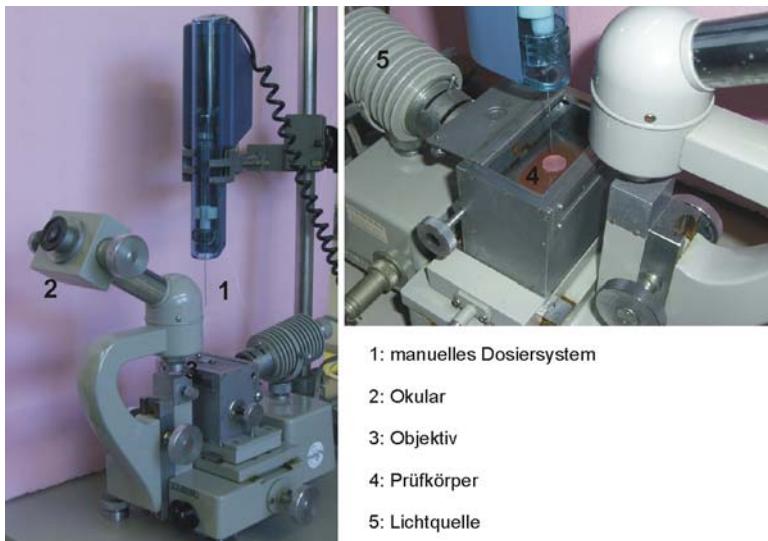


Abbildung 4 und 5: Netzwinkelmessgerät [Name: P1 Goniometer, Firma: Erna Inc. (Tokio, Japan)] und Großaufnahme des Dosiersystems des Netzwinkelmessgeräts.

Die linke Abbildung (Abbildung 4) zeigt das Netzwinkelmessgerät [Name: P1 Goniometer, Firma: Erna Inc. (Tokio, Japan)] mit dem die Hydrophobizität beziehungsweise Hydrophilie der Biomaterialien ermittelt wurde. Die rechte Abbildung (Abbildung 5) zeigt das manuelle Dosiersystem, die Ablage für die Prüfkörper und die Lichtquelle des Netzwinkelmessgerätes in Großaufnahme.

3.2.5 Quantitativer Proteinnachweis

Die Reaktion mittels Biotin/Avidin dient als quantitativer Nachweis von Proteinen auf sehr kleinen Oberflächen und wurde in Regensburg von Ruhl und Müller entwickelt [Ruhl *et al.*, 2006]. Mit dieser Reaktion ist es möglich, adsorbierte Proteine selbst auf kleinen Oberflächen quantitativ nachzuweisen, ohne diese vorher von den jeweiligen Oberflächen zu lösen. Hierbei bindet das Sulfo-NHS-Biotin unter Bildung einer Esterbindung kovalent an freie Aminogruppen des adsorbierten Proteins. Das nun in die Reaktion eingebrachte Avidin D/Avidin_D_HRP (Horseradish Peroxidase) erkennt seinerseits das Biotin und bindet an dieses. Die Horseradish Peroxidase oxidiert dann den Farbstoff Luminol, einen Bestandteil des ECL (enhanced chemiluminescence), der letztlich durch Belichtung eines lichtempfindlichen

Röntgenfilms die Proteinadsorption auf den Prüfkörpern in ein sichtbares Ergebnis überführt.

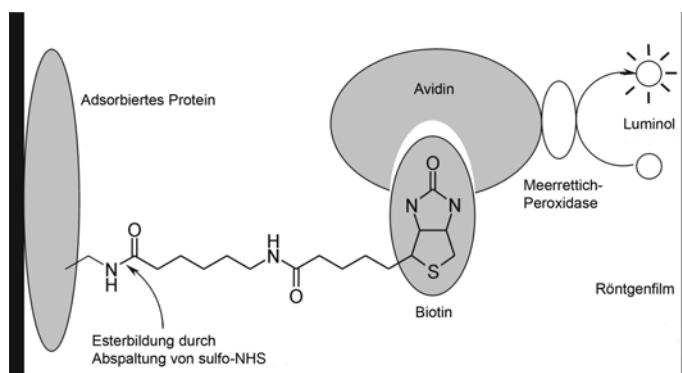


Abbildung 6: Veranschaulichung der Biotin-Avidin-Reaktion. Dieses Schema wurde nach einer Arbeit von Ruhl *et al.* modifiziert [Ruhl *et al.*, 2006].

3.2.6 Speichel

Beim in die Versuche eingebrachten Speichel handelt es sich um ein Gemisch aus dem Sekret der drei paarig angelegten Speicheldrüsen (*Glandula parotis*, *submandibularis* und *sublingualis*) sowie zahlreicher multilokulär in der Mundhöhle befindlichen kleineren Drüsen, gingivaler Sulcusflüssigkeit, abgeschilferten Epithelzellen und Bakterien [Ruhl *et al.*, 1999].

Der Speichel wurde stets von den beiden gleichen Personen gesammelt (26 Jahre/männlich und 29 Jahre/männlich), bis auf eine Porengröße von 0,2 µm mit einem Speichelfilter [Pall Corporation (Port Washington, NY, USA), Name: Acrodisc 32 mm Syringe Filter, Porengröße: 5/1,2/0,45/0,2 µm Supor Membrane] steril filtriert und nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Methode (vgl. Kapitel 3.2.7) schließlich bei -80°C tiefgefroren. Auf die Speichelabgabe unmittelbar nach der Nahrungsaufnahme und in einem Zeitraum von zwei bis drei Stunden danach wurde bewusst verzichtet, um eine unmittelbare Verunreinigung des Probenspeichels durch Nahrungsbestandteile zu vermeiden.

3.2.7 Bestimmung der Speichelproteinkonzentration mittels BCA-Methode

Die BCA-Methode zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit und gleichzeitig geringe Störanfälligkeit aus. Dieser quantitative Nachweis beruht darauf, dass die Proteine, in unserem Fall Speichelproteine, mit Cu²⁺-Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex bilden. Die Cu²⁺-Ionen des gebildeten Komplexes werden zu Cu⁺-Ionen reduziert („Biuret-Reaktion“), die mit Bicinchinon-Säure (BCA) letztlich einen violetten Farbkomplex bilden. Die Lichtadsorption dieses Farbkomplexes wird bei 562 nm gemessen [Smith *et al.*, 1985; Akins *et al.*, 1988; Sorensen, 1992; Tylianakis *et al.*, 1994].

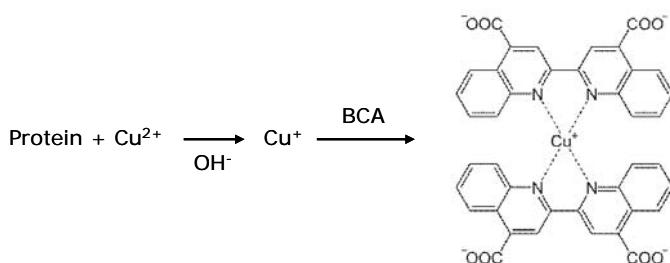


Abbildung 7: Biuret-Reaktion und die Bildung des detektierbaren Farbkomplexes [Smith *et al.*, 1985].

Zunächst wurde in eine 96-Well-Platte (Reihe A) der BSA-Standard in unterschiedlichen Konzentrationen pipettiert, in Reihe B dann der Speichel der Verdünnungsreihe der verschiedenen Probanden. Anschließend wurde in die Reihen A und B 200 µl BCA Proteingemisch pipettiert, und die Lösungen in den verschiedenen Wells wurden mit der Multipipette durchmischt. Nun wurde die Wellplatte für 30 Minuten bei 37°C geschlossen inkubiert und dann die Lichtadsorption am Photometer [Thermomax Microplate Reader; Firma: Molecular Devices, USA] gemessen.

3.2.8 Minifold für Proteinstandards

Zunächst wurde HSA abgewogen (5 mg/ml) und für die höchste Konzentration der Standardreihe (0,005 mg/ml) 1000 fach mit PBS verdünnt. Dann wurde der

Arbeitsplatz mit Einmal-Küchentüchern abgedeckt, um eine saubere Arbeitsfläche zu schaffen, und die Nitrozellulosemembran sowie zwei Filterpapiere in mit PBS gefüllten Fotoschalen eingeweicht. Dann erfolgte die 1:2 Verdünnung der HSA/PBS-Stammlösung mit PBS in einer 96 Well-Platte; dazu wurde in das 1. Well 300 µl der hergestellten Stammproteinlösung pipettiert und in das 2.-12. Well je 150 µl Proteinlösung vorgelegt. Dann wurden aus dem 1. Well 150 µl aufgenommen und in das nächste Well überpipettiert; dieser Vorgang erfolgte bis zum 12. Well, wobei die am Ende des Überpipettierens in der Pipette verbleibenden 150 µl Proteinlösung verworfen wurden. Als nächstes wurde der Minifold zusammengebaut und danach die 12 Wells des Minifolds einmal mit 100 µl PBS gespült und dann je 100 µl Proteinlösung der Standardreihe durchgesaugt. Das anschließende Nachspülen des Minifolds mit je 100 µl PBS pro Well dient dazu, an den Rändern der Minifold-Wells verbleibende Tropfen der durchgesaugten Proteinlösung zu entfernen.

Der Minifold wurde nun vorsichtig auseinandergebaut und die „Proteinstandard-Membran“ auf einem Filterpapier an Luft getrocknet. Die Nitrozellulosemembran wurde dann mit einem sauberen Skalpell in kleinere Segmente geschnitten, so in das jeweilige Experiment eingebracht und erleichterte nach der Umsetzung mittels Chemiluminszenz (vgl. Kapitel 3.2.10) durch ihre klaren Konzentrationsunterschiede die spätere Auswertung der Proteinadsorption auf den verschiedenen Biomaterialien.

3.2.9 Proteinnachweis auf Prüfkörpern und Nitrozellulosemembran

3.2.9.1 Probenvorbereitung

Aufgrund der beschriebenen Herstellung der Titan-, PE- und CoCrMo-Prüfkörper war es unerlässlich, die in das Experiment eingebrachten Prüfkörper zunächst zu entfetten und eventuelle Schmierschichten zu entfernen; dies galt für alle Materialien mit Ausnahme des Ketac Molars (GIZ-Prüfkörper). Die Metall-Prüfkörper wurden für jeweils 3 Minuten in folgenden Lösungen ultrageschallt: Aceton, Toluol, Aceton, Ethanol und Aqua demin. Die übrigen Prüfkörper wurden aufgrund ihrer geringen Säurestabilität nur in Ethanol und 3 mal in Aqua demin. geschallt. Nach der

Schallung mit Aqua demin. war auf keiner Prüfkörpergruppe noch Säure mit dem pH-Indikatorpapier nachweisbar.

3.2.9.2 Beschichtung der Proben mit HSA und Speichel

Die folgenden Mengenangaben beziehen sich auf 12 Prüfkörper (vier mal zwei proteinbeschichtete Prüfkörperduplicata und vier nicht beschichtete Leerwerte der jeweils in den Versuch eingebrachten Werkstoffgruppen) und sind für diese Menge berechnet.

Auf einen Orbitalschüttler wurden zunächst Küchentücher zur Schaffung einer sauberen Unterfläche gelegt und auf diese dann zwei Reihen von 24-Well-Platten gestellt. In der einen Reihe, bestehend aus mehreren Well-Platten, wurde das Experiment mit den Prüfkörpern durchgeführt, die vorher für 30 Minuten in HSA-Proteinlösung einem Precoating unterzogen wurden (Duplicata). In der anderen Reihe, ebenfalls aus mehreren Well-Platten bestehend, wurde das Experiment mit den vier Leerwert-Prüfkörpern durchgeführt, die vor dem Beginn keinem Protein-Precoating unterzogen wurden und somit als Vergleichswerte dienten (Leerwerte).

Für den Versuchsablauf wurden zwei separate Pinzetten verwendet, um eine Proteinübertragung von den proteinbedeckten Prüfkörpern auf die Leerwert-Prüfkörper zu verhindern.

Zu Beginn wurden die ersten zwei Reihen der ersten Well-Platte mit 1 Prozent HSA (10 mg/ml) inkubiert. Dazu wurden 0,5 g HSA in ein Becherglas abgewogen, mit 50 ml PBS aufgefüllt und mit einem Rührfisch gemischt. Aus der HSA-Lösung wurden nun je 2 ml entnommen und in die ersten zwei Reihen der ersten 24-Well-Platte pipettiert. Die einstündige Inkubation der Wellplatten mit HSA bei Raumtemperatur soll mögliche Bindungsstellen mit den Plastikwänden absättigen. Danach wurden die 2 ml HSA wieder aus der Well-Platte abgesaugt und in die ersten zwei Reihen erneut je 2 ml HSA pipettiert, die Duplicat-Prüfkörper dazugegeben und dort für 30 Minuten bei Raumtemperatur und ohne Schütteln belassen. Dann wurden mit einer 1000 µl Kolbenhubpipette 850 µl Boratpuffer (di-Natriumtetraborat) in die nächsten 4 Wellreihen der Duplicatreihe und in die nächsten zwei Wellreihen der Leerwertreihe pipettiert. Die Protein-Prüfkörper wurden aus der HSA-Lösung genommen,

weitergesetzt und die Vergleichs-Prüfkörper auch in den Boratpuffer gelegt. Der Orbitalschüttler wurde auf 60 rpm eingestellt und die Prüfkörper so für 10 Minuten gewaschen. Nach dem ersten Waschgang wurden die Prüfkörper mit ihren unterschiedlichen Pinzetten in die nächste Wellreihe weitergesetzt und für weitere 10 Minuten gewaschen.

Die Durchführung des Speichel-Proteinnachweis auf Prüfkörpern und Nitrozellulosemembran erfolgte analog zum oben beschriebenen HSA-Proteinnachweis.

3.2.9.3 Nachweisverfahren mit Prüfkörpern und Nitrozellulosemembran

Die Prüfkörper wurden in eine Biotin/DMSO/Boratpuffer-Lösung gelegt, wobei aliquotiertes Biotin in entsprechender Menge DMSO gelöst wurde, um eine Konzentration von 20 mg/ml zu erhalten. Aus der Biotin/DMSO-Lösung wurden dann 130 µl entnommen und in 26 ml Boratpuffer gegeben. Aus der Biotinlösung wurden jeweils 2 ml entnommen und in die nächsten Wellreihen pipettiert, dann die Prüfkörper weitergesetzt und diese für eine Stunde in der Biotinlösung belassen. Danach wurde wieder zweimal mit jeweils 850 µl Boratpuffer und zweimal mit 850 µl TBS/Tween20 gewaschen. Die Lösungen wurden in die nächsten Wellreihen pipettiert und die Prüfkörper diesmal bereits nach 5 Minuten weitergesetzt. Danach wurden die Prüfkörper in eine AvidinTBS/Tween20-Lösung gelegt, wobei das Avidin in einer Mischform aus Avidin_D_HRP (Horseradish Peroxidase) und Avidin_D (ohne Peroxidase) im Verhältnis 1:10 gemischt wurde. Avidin wurde daher zunächst im Verhältnis 1:10 hergestellt (2,5 µl Avidin_D_HRP + 22,5 µl Avidin_D) und dann in 25 ml TBS/Tween20 gegeben. Aus dieser Avidin/Tween20-Lösung wurden wieder 2 ml entnommen und in die nächsten Wellreihen pipetiert. Die Prüfkörper wurden weitergesetzt und für eine halbe Stunde in der Avidinlösung belassen. Dann erfolgten weitere Waschgänge, 4 mal mit je 850 µl TBS/Tween20 und dann 2 mal mit 850 µl TBS je Well für jeweils 5 Minuten. Die Prüfkörper wurden nach dem letzten Waschgang aus dem TBS genommen und dann in einer erneut mit TBS gefüllten 24-Well-Platte, die mit Parafilm abgedichtet wurde, zum Belichten transportiert.

Die Nitrozellulosemembran, mit verschiedenen Proteinkonzentrationen vorbehandelt, wurde wie die Vergleichsprüfkörper, erst beim ersten Waschgang mit Boratpuffer in

das Experiment eingebracht. Alle folgenden Mengenangaben gelten für eine Nitrozellulosemembran und sind für diese Menge berechnet. Aufgrund der Membrangröße erfolgte die Experimentdurchführung in 24cmx30cmx5cm großen Fotoschalen. Jeder Versuchsschritt wurde hierbei in einer frischen Fotoschale durchgeführt. Die erste Fotoschale wurde mit 40 ml Boratpuffer gefüllt, die Membran mit einer Pinzette in diese gelegt und dann für 10 Minuten bei 30 rpm gewaschen. Dieser Vorgang wurde dann in einer mit neuem Puffer gefüllten Fotoschale wiederholt. Als nächstes wurde die Membran in eine Biotin/DMSO(Dimethylsulfoxid)/Boratpuffer-Lösung gelegt. Aus der Biotin/DMSO-Lösung wurden dann 200 µl entnommen und in 40 ml Boratpuffer gegeben. Für eine Nitrozellulosemembran gilt somit: 40 ml Boratpuffer + 200 µl Biotinlösung (4 mg Biotin_sulfo_NHS_LC in 200 µl DMSO lösen) mischen. Aus der Biotinlösung wurden 40 ml entnommen, in die nächste Fotoschale pipettiert und dann die Membran mittels Pinzette weitergesetzt und für eine Stunde in der Biotinlösung belassen. Zunächst wurde, wie bei den Prüfkörpern, zweimal mit jeweils 40 ml Boratpuffer und dann zweimal mit 40 ml TBS/Tween20 gewaschen. Die Lösungen wurden in die nächsten Fotoschalen pipettiert und die Membran nun in eine Avidin/TBS/Tween20-Lösung gelegt. Auch hier wurde das Avidin in einer Mischform aus Avidin_D_HRP (Horseradish Peroxidase) und Avidin_D (ohne Peroxidase) im Verhältnis 1:10 gemischt und dann zum TBS/Tween20 gegeben. Die Nitrozellulosemembran wurde weitergesetzt und für ein halbe Stunde in der Avidinlösung belassen. Dann erfolgten weitere Waschgänge, 4 mal mit je 40 ml TBS/Tween20 und dann 2 mal mit je 40 ml TBS je Fotoschale für jeweils 5 Minuten auf dem Orbitalschüttler (30 rpm). Die Nitrozellulosemembran wurde nach dem letzten Waschgang aus dem TBS genommen und in einer erneut mit TBS gefüllten Fotoschale zum Belichten und Entwickeln transportiert. Die Fotoschale wurde mit Parafilm abgedeckt.

3.2.10 Detektion der Proteine mit ECL

Auf die Innenseite einer Filmkassette wurde eine Klarsichtfolie geklebt, so dass man eine nicht verschiebbare Unterfläche erhielt. Um eine bessere Haftung der in TBS transportierten Prüfkörper mit der Folie zu erlangen, wurden auf die Klarsichtfolie zwei Streifen Doppelklebeband geklebt (Abbildung 8). Auf diesen wurden später die Prüfkörper platziert. Über die erste Folie wurde nun eine zweite Klarsichtfolie gelegt, diese jedoch nur an einem Ende festgeklebt. Somit ergab sich ein aufklappbares Sandwich, in das die Prüfkörper und die Membran beim Belichtungsvorgang gelegt wurden. Nach Vorbereitung der Filmkassette wurde aus einem größeren Cellophanpapier ein 10cmx7cm großes Stück geschnitten. Dieses wurde später im Nachweis, nachdem es für zwei Minuten mit ECL inkubiert wurde, auf die Prüfkörper gelegt. Zuletzt wurde die für die Belichtung benötigte Menge an ECL berechnet. Dazu wurde noch vor Beginn des Nachweises die Nitrozellulosemembran und das Cellophanpapier vermessen, mit $0,125 \text{ cm}^2/\text{ml}$ (Angabe des Herstellers Amersham Biosciences) multipliziert und somit die für den Proteinstandard benötigte Menge ECL errechnet. Auch für die Prüfkörper und das Cellophanpapier mussten die ECL-Mengen berechnet werden. Für die 12 Prüfkörper mit einer Größe von jeweils 1 cm^2 ergab sich eine Gesamtmenge von 1,5 ml ECL.

Nach Überprüfung der Entwicklungsmaschine wurde nun das aus zwei Lösungen bestehende ECL (Solution 1 und Solution 2) im Verhältnis 1:1 angesetzt. Zunächst wurden 9 ml ECL entnommen und das in einer kleinen Box befindliche Cellophanpapier überschichtet. Nun wurde die Nitrozellulosemembran aus der mit TBS gefüllten Fotoschale genommen, kurz abgetropft und mit der Rückseite nach unten auf ein Filterpapier gelegt. Der Proteinstandard wurde dann in eine neue, saubere Fotoschale gelegt und für zwei Minuten mit der berechneten Menge an ECL inkubiert. Nun wurden die Prüfkörper aus der mit TBS gefüllten 24-Well-Platte genommen; falls sich größere Flüssigkeitstropfen auf diesen befanden, wurden diese vorsichtig mit einem Stück Filterpapier entfernt und dann, wie die Membran mit der proteinbeschichteten Oberfläche nach oben, auf dem Doppelklebeband der Filmkassette platziert. Hierbei bildete jede Materialgruppe eine Reihe von drei Prüfkörpern (Abbildung 8). Nun wurden auf jeden der 12 Prüfkörper mit einer $200 \mu\text{l}$

Kolbenhubpipette 125 µl ECL pipettiert. Nach Ablauf der 2 Minuten wurde die mit ECL inkubierte Nitrozellulosemembran aus der Fotoschale genommen, kurz auf ein Filterpapier und dann auf die erste Kopierfolie unterhalb der mit Doppelklebeband fixierten Prüfkörper gelegt. Zuletzt wurde das in ECL gelegte Cellophanpapier aus der Box genommen und ohne Luftblasen auf die 12 Prüfkörper gelegt. Nun wurde der aus den beiden Kopierfolien bestehende Sandwich geschlossen, dann ein Röntgenfilm in die Filmkassette gelegt und diese dann fest verschlossen. Nach 10 Sekunden wurde der belichtete Film wieder entnommen. Dieser Vorgang wurde dann mit drei weiteren Filmen wiederholt, wobei die Belichtungszeiten der Filme diesmal sechzig, neunzig und hundertzwanzig Sekunden betrugen. Die entwickelten Filme wurden dann mittels Auslesen der erhaltenen Graustufen ausgewertet und somit die adsorbierte Proteinmenge auf den Prüfkörpern beziehungsweise der Nitrozellulosemembran bestimmt (vgl. Kapitel 3.2.11).



Abbildung 8: Neun verschiedene Prüfkörper und je ein HSA- beziehungsweise Speichel-Proteinstandard auf Nitrozellulosemembran in einer Filmkassette.

3.2.11 Eichkurven und Proteinmengen auf Biomaterialoberflächen

Der belichtete Film, der je zwölf unterschiedlich stark gefärbte Prüfkörper (acht mit HSA- beziehungsweise mit Speichel beschichtete und vier nicht beschichtete) und einen jeweiligen HSA- beziehungsweise Speichelstandard mit einer Ausgangskonzentration von üblicherweise 0,005 mg/ml zeigt, wurde zunächst gescannt und dann mit einem speziellen Auswertungsprogramm (Optimas Version 6.1/CO Bothell, WA, USA) ausgewertet.

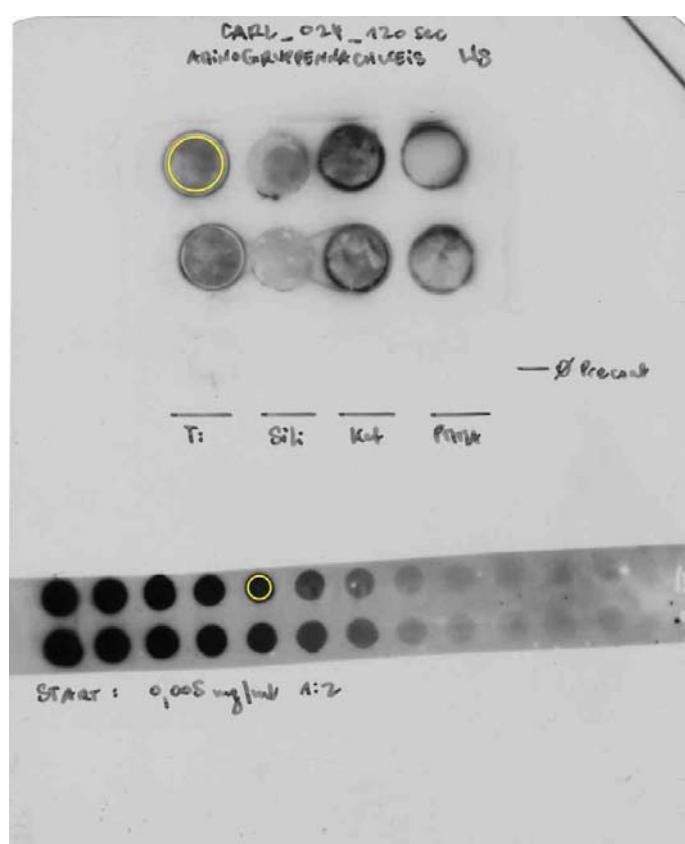


Abbildung 9: Die Abbildung zeigt beispielhaft einen belichteten Film zur Bestimmung der Proteinmenge auf Biomaterialien. In der oberen Hälfte erkennt man in unterschiedlichen Graustufen die detektierten Proteinmengen auf jeweils zwei Prüfkörpern der Biomaterialien Titan (Ti), Silikon (Sili), Ketac Molar (Ket) und PMMA. Die untere Hälfte zeigt Graustufen, die den auf einer Nitrozellulosemembran aufgetragenen Proteinmengen (Dopplewerte) entsprechen. Die höchste hier aufgetragene Proteinmenge von 0,005 mg/ml ergibt die höchste Schwärzung (links), mit steigenden Verdünnungsschritten von 1:2 werden die Grauwerte (nach rechts) kleiner.

Mit Hilfe dieses Programms ist es möglich, die unterschiedlichen Lumineszenzgrade auf einer Schwarz-Weißskala zu bestimmen. Dafür wurden die jeweiligen

Schwärzungsgrade auf den neun verschiedenen Prüfkörpern und den Proteinstandards eingelesen und digitalisiert. Die Doppelwerte der seriellen Verdünnungen der HSA- und Speichelstandards wurden dann in das Programm TableCurve übernommen und zu Eichkurven gefittet (vgl. Kapitel 4.4.1). Über die Grauwerte der Prüfkörper wurden aus den Eichkurven die entsprechenden Proteinmengen für HSA und Speichel errechnet. Die so erhaltenen Daten wurden in Tabellen gesichert und auf Fehler überprüft.

Für die Auswertung der Prüfkörpergraustufen wurde hierbei stets, wie auf dem Film gezeigt (Abbildung 9), die gleiche Kreisgröße von 2,15 (spezifische Skalierung des Programms) angelegt. Die Graustufen des mitgeführten Standards wurden der Größe entsprechend mit einer kleineren Kreisgröße von 1,0 ausgewertet. Die jeweiligen Kreisgrößen wurden absichtlich kleiner gewählt, um die bei einigen Prüfkörpern und den Standarddots mit höherer Konzentration auftretenden Randeffekte auszuschließen.

3.2.12 Statistik

Die Rauigkeitsmessung mit dem Perthometer wurden mit drei Prüfkörpern je Biomaterial durchgeführt. Dabei wurde die Rauigkeit eines Prüfkörpers links, mittig und rechts auf der Oberfläche gemessen. So ergaben sich neun Messwerte, die dann in einem Medianwert mit 25-75% Perzentilen zusammengefasst wurden.

Die Netzwinkel der Materialoberflächen an einem aufgesetzten Wassertropfen wurden für jedes Material zweimal mit jeweils drei Prüfkörpern wiederholt, und die resultierenden sechs Einzelwerte ebenfalls zu Medianwerten mit 25-75% Perzentilen zusammengefasst.

Für die Bestimmung der HSA- und Speichelproteinadsorption auf den unterschiedlichen Biomaterialien wurden von jedem Werkstoff jeweils zehn Materialprüfkörper mit HSA und zehn Materialprüfkörper mit Speichel (WS) beschichtet. Die Proteinmenge wurde durch die Biotin/Avidin-Reaktion (vgl. Kapitel 3.2.5) sichtbar und mit Hilfe der Graustufenauslesung ermittelt. Die Proteinadsorption wurde dann für jedes Material wiederum in einem Medianwert mit 25-75% Perzentilen zusammengefasst (vgl. Kapitel 4.5.1). Unterschiede zwischen den

Medianen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U-Tests (SPSS Version 15.0, SPSS, Chicago, IL, USA) durch paarweises Vergleichen von Werten auf der 0,05 Signifikanzebene untersucht.

Für Korrelationsanalysen mittels SigmaPlot (SigmaPlot 8.0, Systat Software, San Jose, CA, USA) zur Abhängigkeit der Proteinadsorption von den Netzwinkeln auf den verschiedenen Materialien wurden ebenfalls Medianwerte herangezogen.

Die statistische Auswertung sämtlicher Daten sowie ihre grafische Darstellung (SigmaPlot 8.0) erfolgte durch Herrn Dr. K.-A. Hiller (Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie des Universitätsklinikums der Universität Regensburg).

4. Ergebnisse

4.1 Rauigkeit der Biomaterialoberflächen

Für jede Werkstoffklasse wurde mit dem Perthometer die Oberflächenrauigkeit bestimmt, wobei je eine Messung rechts, mittig und links auf der Prüfkörperoberfläche erfolgte. Man erhält also drei Messwerte für eine Prüfkörper. Pro Biomaterial wurden drei Prüfkörper getestet, so dass sich insgesamt neun Rauigkeitswerte für ein Biomaterial ergaben. Diese neun Einzelwerte wurden in einem Medianwert zusammengefasst.

Für die neun hier geprüften Biomaterialien wurden unter den gegebenen Bedingungen der Herstellung ihrer Oberflächen Rauigkeitswerte zwischen $R_a = 0,04 \mu\text{m}$ (Polymethylmethacrylat) und $R_a = 0,53 \mu\text{m}$ (Polyethylen und Tetric Evo Ceram) gefunden (Abbildung 10). Auch die manuell hergestellten Materialprüfkörper wiesen Rauigkeitswerte zwischen $R_a = 0,04 \mu\text{m}$ (PMMA) und $R_a = 0,53 \mu\text{m}$ (Tetric Evo Ceram) auf. Diese Differenz lässt sich unter Umständen, trotz der gleichen Herstellungsmethode, durch die verschiedenen Konsistenzen der Materialien zu erklären. Aufgrund der relativ hohen Viskosität der Komposite Filtek Siloran ($R_a = 0,20 \mu\text{m}$) und Tetric Evo Ceram ($R_a = 0,53 \mu\text{m}$) kann es bei der Fertigung mit der Objekträgermethode zu Lufteinschlüssen gekommen sein; in welchem Maß sich diese auf die Rauigkeit ausgewirkt haben ist unklar (vgl. Kapitel 4.2). Der Glasionomerzement Ketac Molar ($R_a = 0,23 \mu\text{m}$) ist ebenfalls ein viskoses Material. Da der Glasionomerzement nur in spezifischen „Aplicaps“ geliefert wird und mehrere davon nötig waren um einen Prüfkörper herzustellen, kann diese Unterbrechung während der Fertigung ebenfalls zu Lufteinschlüssen innerhalb, beziehungsweise auf der Prüfkörperoberfläche geführt haben. Die Glasionomerzement-Prüfkörper wurden aufgrund ihrer Abbindereaktion nach ihrer Herstellung zunächst trocken und dann in einer feuchten Kammer gelagert. Dies kann auch zu Spannungen und Mikrorissen innerhalb des Gefüges führen, die dann die Oberflächenbeschaffenheit des Materials hinsichtlich einer gesteigerten Rauigkeit beeinflusst haben. Silikon ($R_a = 0,15 \mu\text{m}$) und PMMA ($R_a = 0,04 \mu\text{m}$) wiesen relativ niedrige Rauigkeitswerte auf. So findet man unter anderem Studien, die Oberflächen mit einer Rauigkeit von $R_a = 0,20 \mu\text{m}$ und

weniger als glatt interpretieren [Bürgers *et al.*, 2009], da bei diesen Werten kein Einfluss auf eine gesteigerte Bakterienadhäsion mehr zu erwarten ist [Bollen *et al.*, 1997]. Inwieweit sich diese Aussage allgemein auf die Proteinadsorption übertragen lässt, ist jedoch nicht geklärt.

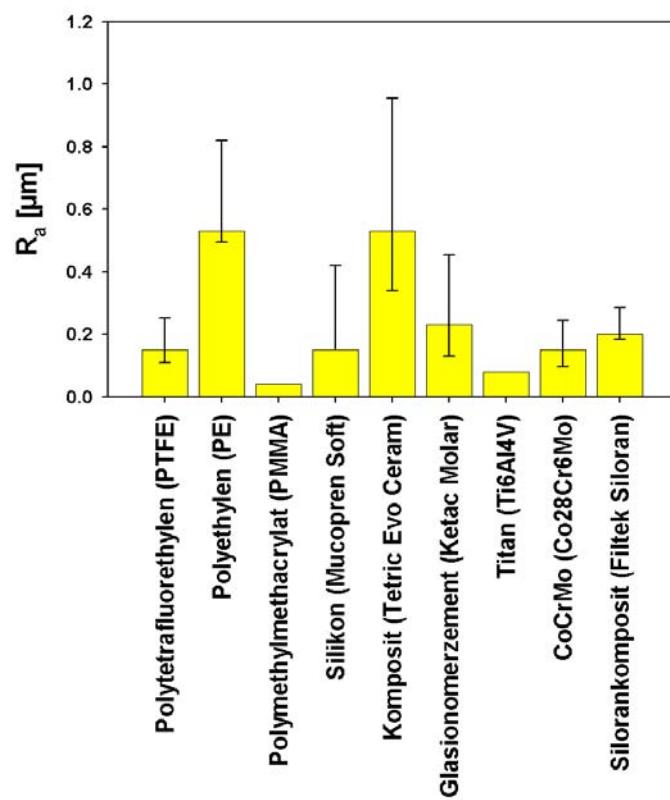


Abbildung 10: Ergebnisse der Rauigkeitsmessung der neun unterschiedlichen Werkstoffgruppen. Es sind Mediane mit 25-75% Perzentilen dargestellt ($N = 9$).

Die maschinell hergestellten Materialprüfkörper können mit Ausnahme des Polyethylen ($R_a = 0,53 \mu\text{m}$) als glatt bezeichnet werden. So wiesen sowohl Polytetrafluorethylen (PTFE), als auch Cobalt-Chrom-Molybdän mit einer Rauigkeit von $R_a = 0,15 \mu\text{m}$ denselben Wert auf, wie das manuell hergestellte Silikon. PTFE und Polyethylen ($R_a = 0,53 \mu\text{m}$) wurden zwar auf die gleiche Weise gefertigt und die jeweiligen Prüfkörper von einer Materialstange heruntergedreht, dennoch unterschieden sie sich deutlich in ihrem Rauigkeitswert. Titan, das von einer Materialstange heruntergeschnitten wurde zeigt mit einem Wert von $R_a = 0,08 \mu\text{m}$ eine glatte Oberfläche, so dass der Einfluss der Rauigkeit auf die Proteinadsorption

genau wie bei den Biomaterialien Polymethylmethacrylat (PMMA), Cobalt-Chrom-Molybdän (CoCrMo), Polytetrafluorethylen (PTFE) und Silikon mit jeweils Werten unter $R_a = 0,16 \mu\text{m}$ relativ gering sein sollte. Vergleicht man die gefundenen Werte mit vergleichbaren aus anderen Studien, so fanden sich zum Beispiel für das Silorankomposit und Tetric Evo Ceram, jedoch nach Politur, Rauigkeitswerte von $R_a = 0,04 \mu\text{m}$ [Bürgers *et al.*, 2008] und für poliertes Titan $R_a = 0,15 \mu\text{m}$ [Bürgers *et al.*, 2009]. In der vorliegenden Arbeit wurde sich, um etwaige Polierrückstände zu vermeiden, gegen die Politur der Prüfkörperoberflächen entschieden.

4.2 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Biomaterialoberflächen

Die in den folgenden Abbildungen dargestellten Aufnahmen zeigen Oberflächen der Biomaterialien. Diese Aufnahmen lassen neben der erfolgten Rauigkeitsmessung einen zusätzlichen Vergleich der einzelnen Biomaterialien bezüglich ihrer Oberflächenbeschaffenheit zu. So erkennt man zum Beispiel bei den maschinell hergestellten Metall-, Polytetrafluor- und Polyethylenprüfkörpern Schneidespuren des Herstellungsvorgangs oder bei den manuell hergestellten Glasionomerzement-Prüfkörpern (Ketac Molar) kleine Lufteinschlüsse oder Risse.

Polytetrafluorethylen (PTFE)

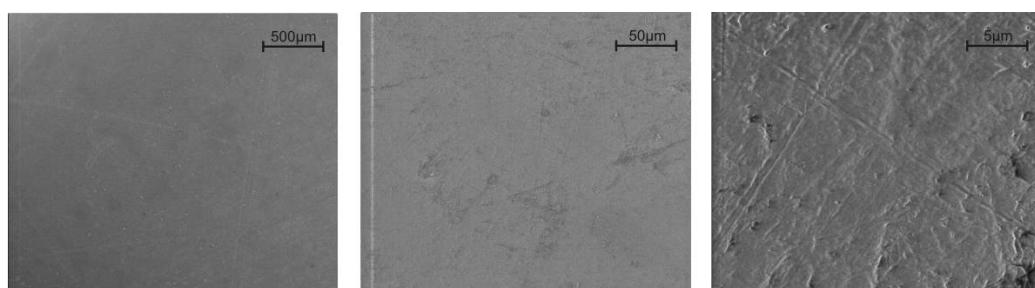


Abbildung 11: Rasterelektronische Aufnahme des Polytetrafluorethylen-Prüfkörpers.

Polyethylen (PE)

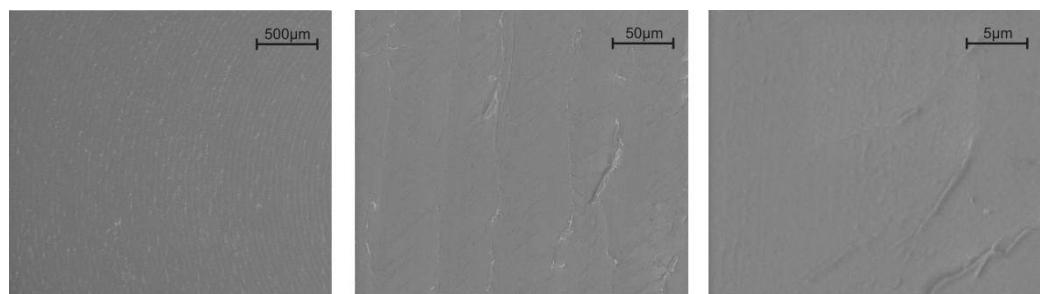


Abbildung 12: Rasterelektronische Aufnahme des Polyethylen-Prüfkörpers.

Polymethylmethacrylat (PMMA)

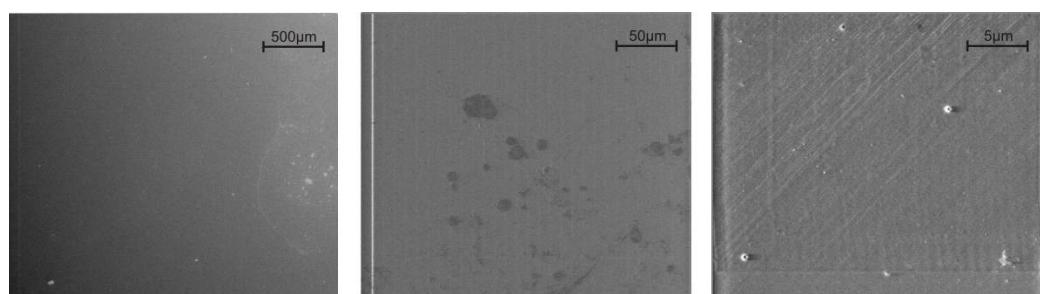


Abbildung 13: Rasterelektronische Aufnahme des Polymethylmethacrylat-Prüfkörpers.

Silikon (Mucopren)

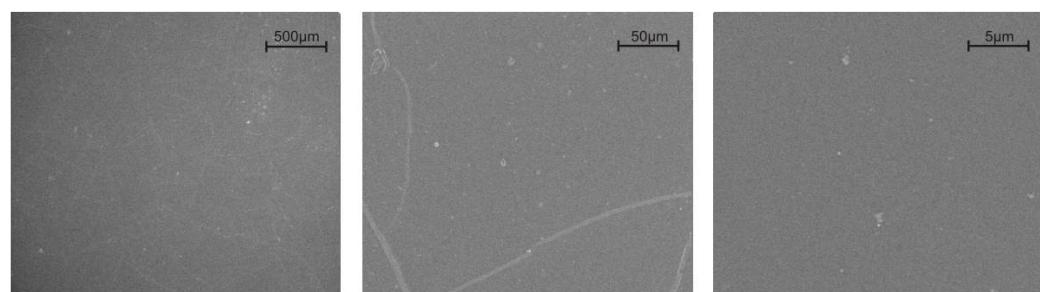


Abbildung 14: Rasterelektronische Aufnahme des Silikon-Prüfkörpers.

Komposit (Tetric Evo Ceram)

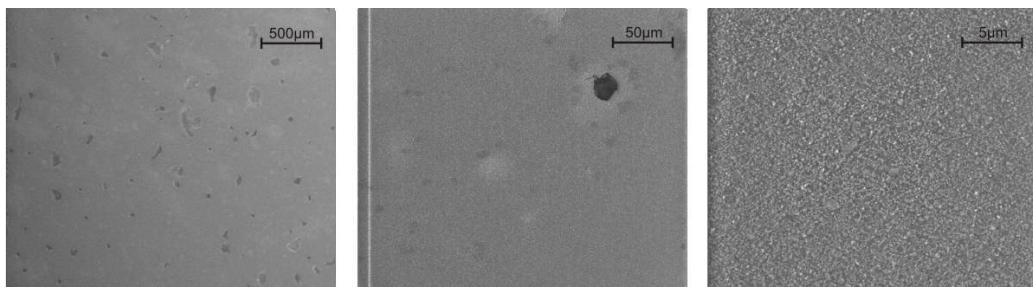


Abbildung 15: Rasterelektronische Aufnahme des Tetric Evo Ceram-Prüfkörpers.

Glasionomerzement (Ketac Molar)

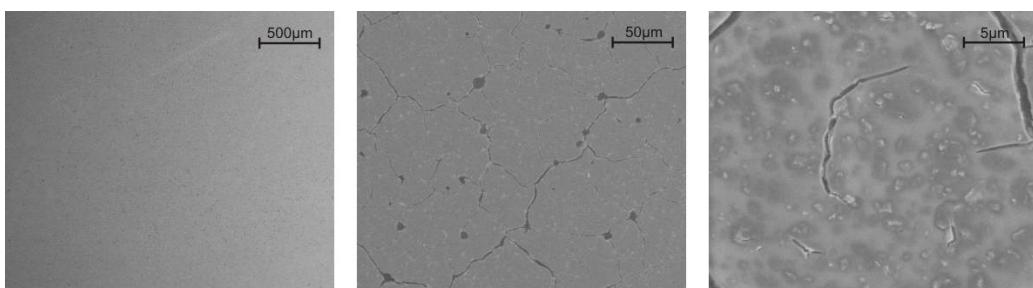


Abbildung 16: Rasterelektronische Aufnahme des Glasionomer-Prüfkörper.

Titan (Ti6AlV4)

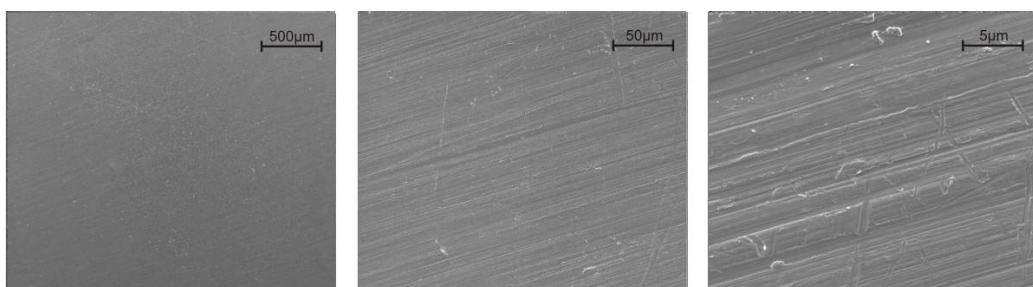


Abbildung 17: Rasterelektronische Aufnahme des Titan-Prüfkörpers.

Cobalt-Chrom-Molybdän (Co28Cr6Mo)

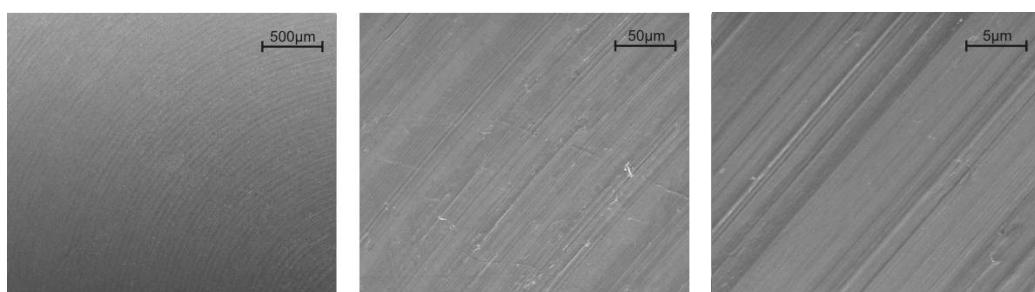


Abbildung 18: Rasterelektronische Aufnahme des Cobalt-Chrom-Molybdän-Prüfkörpers.

Silorankomposit (Filtek Siloran)

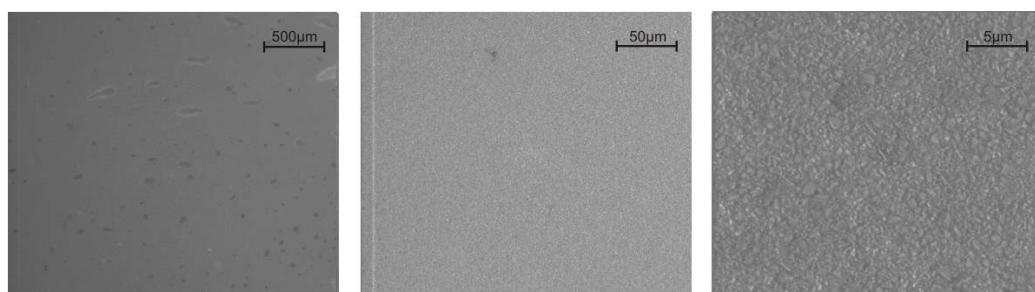


Abbildung 19: Rasterelektronische Aufnahme des Siloran-Prüfkörpers.

4.3 Netzwinkel

Bei der Netzwinkelmessung wurden für jede Werkstoffgruppe sechs Messwerte ermittelt und über die einzelnen Werte der Medianwert bestimmt. Bei der Netzwinkelbestimmung gegen Wasser wurden für die neun getesteten Materialien Werte zwischen 50,5° (Glasionomerzement) und 118,5° (Polytetrafluorethylen) gefunden (Abbildung 20).

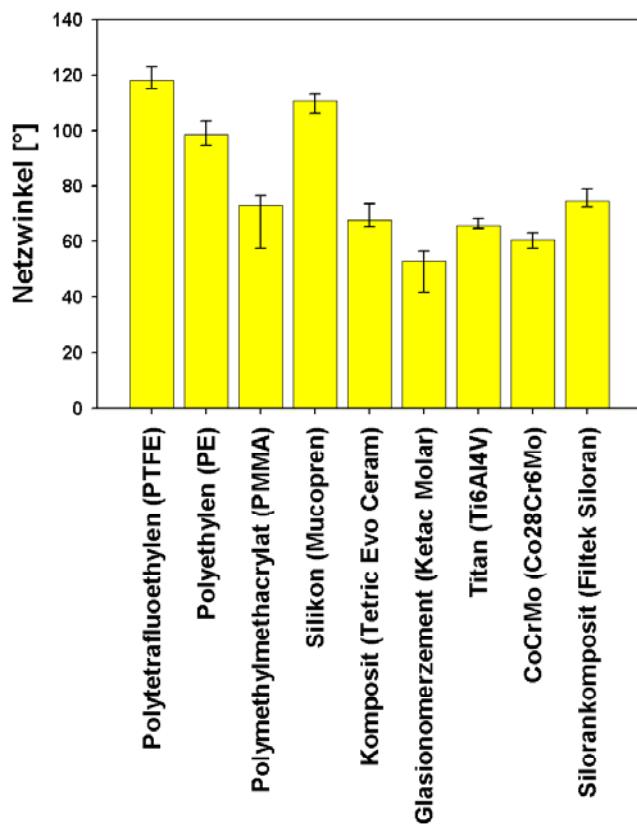


Abbildung 20: Ergebnisse der Netzwinkelmessung der neun unterschiedlichen Biomaterialien. Es sind Mediane mit 25-75% Perzentilen dargestellt ($N = 6$).

Aufgrund dieser Spannbreite wurden Materialien mit Netzwinkeln zwischen $118,5^\circ$ und $98,5^\circ$ als stark hydrophob (Polytetrafluorethylen, Silikon und Polyethylen), solche mit Netzwinkeln von 65° bis 73° als schwach hydrophob (Polymethylmethacrylat, Siloran, Tetric Evo Ceram, Titan und Cobalt-Chrom-Molybdän) und solche mit Netzwinkeln zwischen 0° unbd 65° als hydrophil (Glasionomerzement) klassifiziert. Diese Einstufung basiert auf den Ergebnissen anderer Studien, die beobachteten, dass hydrophobe Kräfte auf Oberflächen mit einem Netzwinkel kleiner als $62,4^\circ$ nicht auftreten [Vogler *et al.*, 1999; Ostuni *et al.*, 2001; Sethuraman *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2005]. Die Metalle Titan und Cobalt-Chrom-Molybdän stellen mit ihren Netzwinkeln von $56,5^\circ$ und $60,5^\circ$ hierbei einen Grenzfall dar. Die Klassifizierung als hydrophober beziehungsweise hydrophiler Werkstoff ist nicht eindeutig. So kann eine Einstufung

des Titans als hydrophiler beziehungsweise hydrophober Werkstoff nur theoretisch erfolgen [Zhao *et al.*, 2005]. So beeinflusst nicht nur die Oxidschicht, die sich bei Raumtemperatur auf der Titanoberfläche bildet, sondern auch die Bindung verschiedener anorganischer und organischer Ionen sowie CO₂ aus der Atmosphäre die chemischen Oberflächeneigenschaften [Tengvall and Lundstrom, 1992; Textor *et al.*, 2001]. In der Literatur findet man unter anderem für Titan einen Netzwinkel gegen Wasser von 52,8° [Bürgers *et al.*, 2009].

Vergleicht man die gemessenen Netzwinkelwerte der verschiedenen Materialien mit der vorher erfolgten Einstufung als hydrophiles oder hydrophobes Material, stimmen die Annahmen überein (vgl. Kapitel 3.1.4). Polytetrafluorethylen mit einem Netzwinkel von 118,5° entspricht der Klassifizierung als stark hydrophobes Material, genau wie Silikon (110,5°) und Polyethylen (98,5°). Das Silorankomposit (74,5°) zeigt im Vergleich mit dem konventionellen Komposit TetricEvoCeram (67,5°) einen höheren Netzwinkel gegen Wasser und somit eine höhere Hydrophobizität. Dies wurde aufgrund seiner chemischen Zusammensetzung aus Oxiranen und Siloxanen bereits vermutet; besonders der Bestandteil der Siloxane ist für die gesteigerte Hydrophobizität des Biomaterials verantwortlich [Weinmann *et al.*, 2005]. Der Netzwinkel des Polymethylmethacrylats fällt mit 73° im Vergleich mit dem von Lampin *et al.* (1997) gefundenen Wert von 62,5° zwar etwas größer aus; dennoch ist mit diesem Wert eine Einstufung von PMMA als hydrophobes Material möglich [Lampin *et al.*, 1997]. Der Glasionomerzement Ketac Molar ist mit einem Netzwinkel von 50,5° das hydrophilste der hier untersuchten Biomaterialien [vgl. auch Dorner, 2005].

Der paarweise Vergleich der Netzwinkel- und Rauigkeitsmessung mittels Mann-Whitney-Test ($p \leq 0,05$) ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Statistische Analyse der Netzwinkel- und Rauigkeitsmessung mittels Mann-Whitney-Test ($p \leq 0,05$).

PTFE= Polytetrafluorethylen; PE= Polyethylen; PMMA= Polymethylmethacrylat; Silikon (Mucopren soft); TEC= Tetric Evo Ceram; GIZ= Glasionomerzement (Ketac Molar); Titan (TiAl4V6); CoCrMo= Cobalt-Chrom-Molybdän (Co28Cr6Mo); Siloran= Filtek Siloran. ns = nicht signifikant.

	PTFE	PE	PMMA	Silikon	TEC	GIZ	Titan	CoCrMo	Siloran	
PTFE		0	0	0.001	0	0	0	0	0	N W
PE	0		0	0	0	0	0	0	0	
PMMA	0	0		0	ns	0	ns	ns	ns	
Silikon	ns	0.004	0		0	0	0	0	0	
TEC	0.002	ns	0	0.019		0	0	ns	0.001	
GIZ	ns	ns	0	ns	ns		0	0	0	
Titan	0	0	0	0	0	0		0	0	
CoCrMo	ns	0	0	ns	0.002	ns	0		0	
Siloran	ns	0	0	ns	0.011	ns	0	ns		
RAU										

4.4 Proteinadsorption auf Biomaterialien

4.4.1 Proteinstandardkurven mit HSA und Speichelproteinen

Zur Darstellung einer Eichkurve wurden unterschiedliche Mengen an HSA und Speichelproteinen mittels Chemilumineszenz auf einem Film sichtbar gemacht und als Grauwerte dargestellt (Abbildungen 21 und 22). Im rechten Bereich des Proteinstandards (Nitrozellulosemembran) liegt aufgrund der höheren Proteinkonzentration eine stärkere Schwarzfärbung vor. Diese nimmt, mit abnehmender Protein-Konzentration auf der Zellulosemembran in Richtung des linken Bereichs kontinuierlich ab. Die zugehörige Eichgerade zeigt die Abhängigkeit der Graustufen von den eingesetzten Proteinmengen. In jedem einzelnen Experiment zur Bestimmung der HSA- und Speichelprotein-Menge auf Biomaterialien wurde eine entsprechende Eichkurve erstellt (vgl. Kapitel 3.2.11).

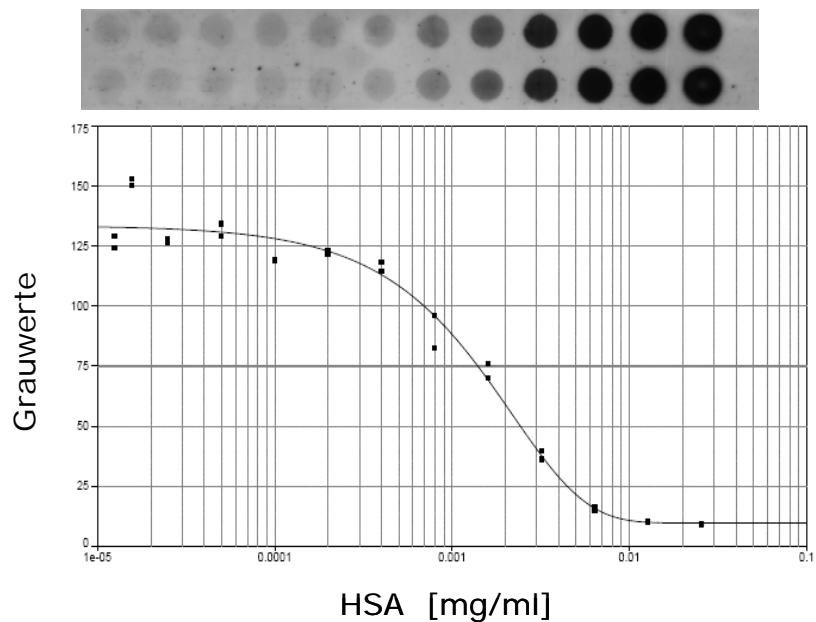


Abbildung 21: Darstellung eines HSA-Standards mit Eichkurve. Die als unterschiedliche Grauwerte (reziprok errechnet) detektierten Proteinmengen einer seriellen Verdünnungsreihe des HSA-Standards auf einer Nitrozellulosemembran (oben) sind in der Grafik (unten) quantifiziert und gefittet.

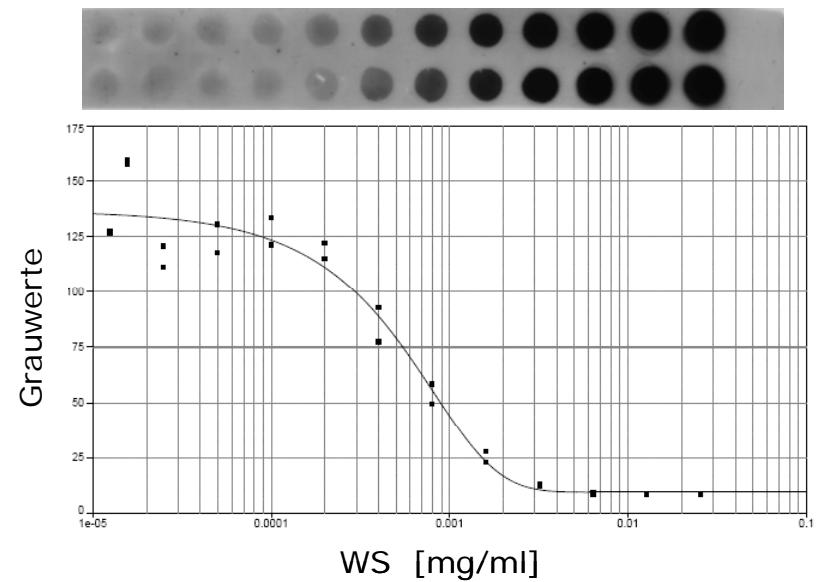


Abbildung 22: Darstellung eines Speichelprotein-Standards mit Eichkurve. Die als unterschiedliche Grauwerte (reziprok errechnet) detektierten Proteinmengen einer seriellen Verdünnungsreihe des Speichelprotein-Standards (Gesamtspeichel WS = *whole saliva*) auf einer Nitrozellulosemembran (oben) sind in der Grafik (unten) quantifiziert und gefittet.

4.4.2 Proteinadsorption auf Biomaterialien

Die neun Biomaterialien adsorbierten unterschiedliche Mengen des Serumproteins HSA und der Proteine des Gesamtspeichels (*whole saliva*) (Abbildung 23). Auffällig ist die Tatsache, dass an sieben von neun Biomaterialien deutlich mehr Gesamtspeichel (WS) als HSA adsorbierte. Vor allem bei Polytetrafluorethylen und Polyethylen war dieser Unterschied in der Proteinadsorption besonders eindeutig. So adsorbierte an das Polytetrafluorethylen 37 mal mehr Gesamtspeichel (etwa $0.185 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) als HSA (etwa $0.005 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und an Polyethylen etwa 12,5 mal so viel. Zwar ist die Speicheladsorption auch an den Biomaterialien Polymethylmethacrylat, Silikon, Ketac Molar, Titan und Filtek Siloran größer als die von HSA, hier sind jedoch die Unterschiede nicht so groß wie bei Polytetrafluorethylen und Polyethylen.

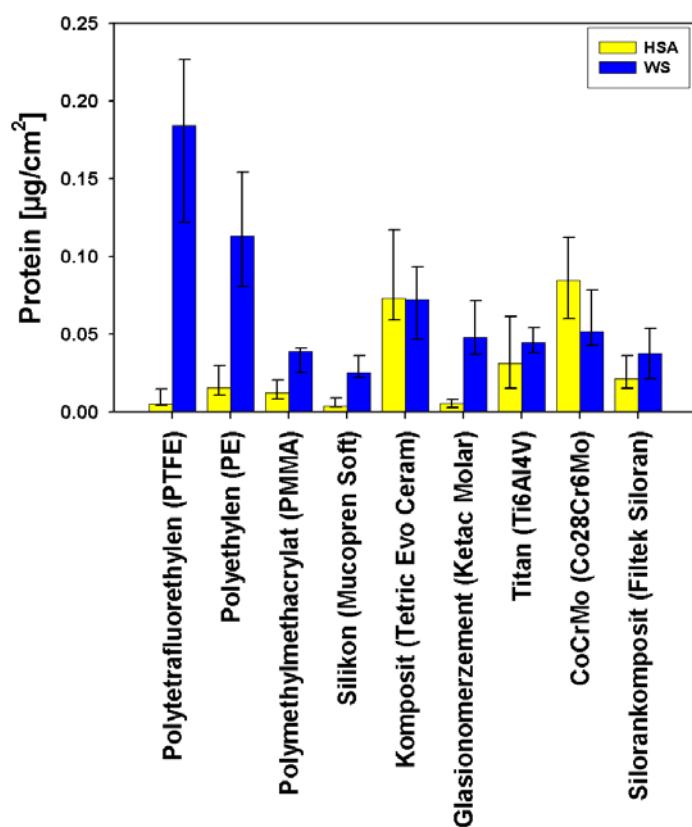


Abbildung 23: Adsorbierte Proteinmengen (HSA- und Speichel) auf den neun verschiedenen klinischen Biomaterialien. Es sind Mediane mit 25-75% Perzentilen dargestellt ($N = 15$). Das Ergebnis der statistischen Analyse der Unterschiede zwischen den Medianen der Proteinmengen ist unten in Tabelle 2 gezeigt.

Während das Komposit Tetric Evo Ceram nahezu gleich viel HSA wie Speichel adsorbierte, wurde nur auf Cobalt-Chrom-Molybdän mehr HSA als Speichel nachgewiesen. Insgesamt adsorbierte nur an vier Biomaterialien mehr als 0,005 µg/cm² Speichel oder HSA, nämlich an Polytetrafluorethylen mit der insgesamt höchsten Proteinadsorption von etwa 0.185 µg/cm², sowie an Polyethylen, Komposit (TEC) und an Cobalt-Chrom-Molybdän.

Tabelle 2: Statistische Analyse der HSA- und Speichelprotein-Mengen auf den Materialien mit Mann-Whitney-Test ($p < 0,05$).

PTFE= Polytetrafluorethylen; PE= Polyethylen; PMMA= Polymethylmethacrylat; Silikon (Mucopren soft); TEC= Tetric Evo Ceram; GIZ= Glasionomerzement (Ketac Molar); Titan (TiAl4V6); CoCrMo= Cobalt-Chrom-Molybdän (Co28Cr6Mo); Siloran= Filtek Siloran. ns = nicht signifikant. In der Diagonalen (grau hinterlegt) sind die p-Werte der Precoats HSA vs. WS gegeneinander dargestellt (ns = nicht signifikant; $p \leq 0,05$).

	PTFE	PE	PMMA	Silikon	TEC	GIZ	Titan	CoCrMo	Siloran	
PTFE	0.001	ns	ns	ns	0	ns	0.003	0	0.003	H S A
PE	0.041	0.001	ns	0.01	0	0.005	ns	0	ns	
PMMA	0.001	0.001	0.008	0.028	0.004	0.048	ns	0.004	ns	
Silikon	0.001	0.001	ns	0	0	ns	0	0	0	
TEC	0.001	0.043	0.007	0.001	ns	0	0.015	ns	0.001	
GIZ	0.001	0.001	ns	0.002	ns	0	0	0	0	
Titan	0.001	0.001	ns	0.003	ns	ns	ns	0.015	ns	
CoCrMo	0.001	0.008	0.050	0.002	ns	ns	ns	ns	0	
Siloran	0.001	0.001	ns	ns	0.038	ns	ns	ns	ns	
WS										

4.4.3 Korrelationsanalysen

Im Folgenden sind die Ergebnisse von Korrelatioinsanalysen zwischen Netzwinkeln und adsorbierten Proteinmengen auf den unterschiedlichen Materialien dargestellt. Auf die Korrelation der Proteinmenge und der Rauigkeit von Oberflächen wurde verzichtet. Sie sollte idealerweise auf nur einem Werkstoff mit gezielt erzeugten Rauigkeitsunterschieden untersucht werden. Dieses Vorgehen war in der vorliegenden Arbeit nicht beabsichtigt.

Für die Adsorption von HSA erkennt man für den weiteren Bereich hydrophiler Netzwinkel (55-75°) relativ große Unterschiede (Abbildung 24). Im stark hydrophoben Bereich der Netzwinkel (100-120°) hingegen adsorbierten vergleichsweise ähnliche

Mengen an HSA. Möglicherweise enthält diese Analyse damit einen Hinweis darauf, dass im hydrophoben Bereich ein spezifischer und im hydrophilen Bereich ein unspezifischer Zusammenhang zwischen Netzwinkel und HSA-Proteinkonzentration bestehen könnte.

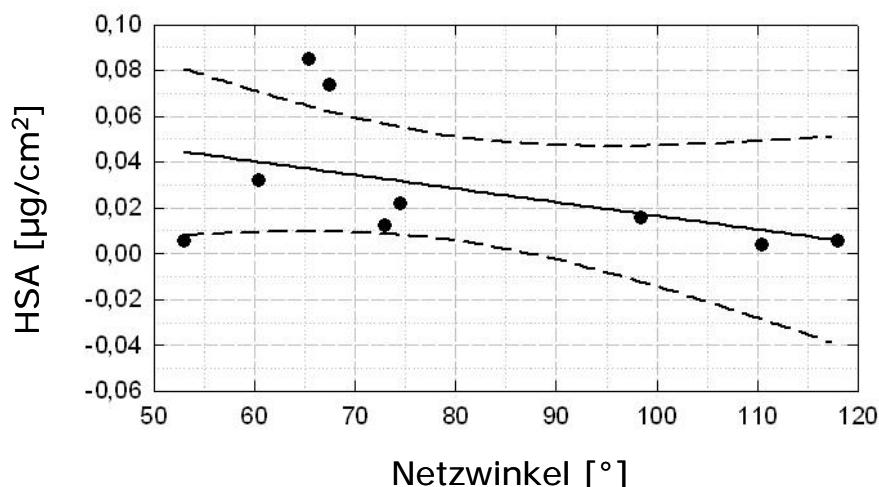


Abbildung 24: Korrelationsanalyse der HSA-Menge in Abhängigkeit von Netzwinkeln der Materialien. Linearer Fit (Gerade) von Medianen mit 95% Konfidenzlimiten; die Mediane sind als Punkte dargestellt.

$$y = a + bx: y = 0.075946152 + (-0.00059458029); r^2 = 0.20600306.$$

Anders als für HSA erkennt man für die Adsorption von Speichelproteinen im weiteren Bereich hydrophiler Netzwinkel ($55\text{-}75^\circ$) relativ geringe Unterschiede (Abbildung 25). Wieder entgegengesetzt zur Beobachtung mit HSA sind im stark hydrophoben Bereich der Netzwinkel ($100\text{-}120^\circ$) die Mengen adsorbiert Speichelproteine sehr unterschiedlich. So könnte diese Korrelationsanalyse einen Hinweis darauf geben, dass Speichelproteine eher auf hydrophilen Oberflächen spezifisch adsorbieren.

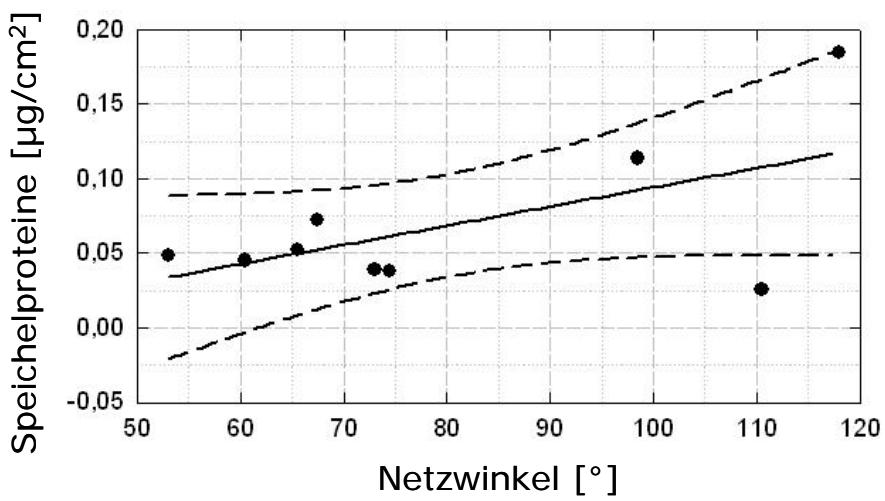


Abbildung 25: Korrelationsanalyse der Speichelproteinmenge in Abhängigkeit von Netzwinkeln der Materialien. Linearer Fit (Gerade) von Medianen mit 95% Confidenzlimiten; die Mediane sind als Punkte dargestellt.

$$y=a+bx: y=-0.034361725+0.0012856283; r^2=0.34579948.$$

5. Diskussion

Die Menge der an einer Oberfläche adsorbierten Proteine wird durch verschiedene Faktoren wie Eigenschaften des Proteins (Ladung, Größe und Strukturstabilität) und der adsorbierten Oberfläche sowie den herrschenden Umwelt- beziehungsweise Versuchsbedingungen (spezifische Ionen, pH-Wert des umgebenden Milieus, Verwendung von Lösungsmitteln) beeinflusst. Besonders die interne Strukturstabilität des jeweiligen Proteins scheint von großer Bedeutung zu sein [Nakanishi *et al.*, 2001].

5.1 Bedeutung der Proteinstruktur für die Adsorption an Biomaterialoberflächen

In der Fachliteratur werden zwei grundlegende Strukturgruppen innerhalb der Proteine unterschieden. Zunächst die sogenannten „*hard proteins*“ wie Alpha-Chymotrypsin, Lysozyme und die Ribonuclease, die allesamt eine relativ hohe interne Strukturstabilität aufweisen. Diese Proteine adsorbieren in der Regel nur in geringem Ausmaß an hydrophile Oberflächen, trotz der vorliegenden elektrostatischen Anziehung; die Adsorption an hydrophoben Oberflächen, welche nach erfolgter Bindung zu Änderungen in der Proteinstruktur führt, fällt im Betrag hingegen höher aus [Norde *et al.*, 1992; Bos *et al.*, 1994; Baron *et al.*, 1999]. Auch Zoungrana *et al.* (1997) untersuchten die Adsorptionstendenz „harter Proteine“ auf hydrophilen und hydrophoben Oberflächen und beobachteten ebenfalls eine größere Affinität des Alpha-Chymotrypsins an hydrophoben Teflonoberflächen im Vergleich zu hydrophilen Silikatoberflächen. Des weiteren wies das genannte Protein nach Bindung an die hydrophobe Teflonoberfläche eine starke Inaktivierung auf, was auf eine starke Interaktion des Enzyms mit der Oberfläche zurückgeführt wurde.

Als „*soft proteins*“ werden Proteine bezeichnet, die im Vergleich mit den oben genannten Proteinen eine niedrigere innere Strukturstabilität aufweisen. Zu diesen Proteinen zählen unter anderem Humanes Serumalbumin (HSA), Bovines Serumalbumin (BSA), Immunglobulin G (IgG) sowie das Alpha-Lactoalbumin [Nakanishi *et al.*, 2001]. Diese Proteine besitzen die Tendenz, ungeachtet elektrostatischer

Interaktionen, an vielen Oberflächen zu adsorbieren; dies resultiert aus einem durch die eigentliche Adsorption zustande kommenden Zuwachs an konformativer Entropie [Bos *et al.*, 1994; Sakiyama *et al.*, 1999]. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass HSA und die oben genannten Proteine sogar an elektrostatisch abweisenden Oberflächen binden und diese, nach Adsorption an hydrophobe Materialoberflächen, größere Konformationsänderungen aufweisen [Silin *et al.*, 1997; Norde *et al.*, 2000; Nakanishi *et al.*, 2001]. Siedlecki *et al.* (2007) zeigten in ihrer Studie einen generellen Zusammenhang zwischen andauernder Kontaktzeit des Proteins BSA mit einer hydrophoben Oberfläche und daraus resultierenden Konformationsänderungen des Proteins. Erklärt wurde dieses Ergebnis durch die Tatsache, dass das Protein BSA vermutlich hydrophobe Aminosäuren seiner inneren Struktur an die Oberfläche bewegt, wo diese dann mit dem jeweiligen Substrat interagieren können und die beobachtete Änderung der Proteinkonformation bewirken [Siedlecki *et al.*, 2007].

Der Adsorptionsprozess der „*hard proteins*“ scheint zeitlich sehr schnell zu verlaufen, im Gegensatz zu den „*soft proteins*“, deren Adsorption aufgrund ihrer geringen internen Stabilität mit einer Strukturänderung einhergeht, besonders wenn eine elektrische Abstoßung zwischen Protein und Oberfläche besteht [Arnebrant *et al.*, 1986; Norde *et al.*, 1992; Billsten *et al.*, 1995; Itho *et al.*, 1995; Malmsten, 1995; Barrough *et al.*, 1999; Giacomelli *et al.*, 1999]. So beschreiben Martins *et al.* (2003) die Albuminadsorption auf hydrophoben CH₃-SAMs als „*multistep-process*“, beginnend mit Wechselwirkungen der hydrophoben Bindestellen auf der Proteinoberfläche, gefolgt vom weiteren Zusammenspiel infolge der Proteindenaturierung [Dent *et al.*, 1998]. Nakanishi *et al.* (2001) diskutierten, dass Proteine kleine Peptidregionen aufweisen, die direkt mit einer beliebigen Oberfläche reagieren. Die Aminosäurenanordnung innerhalb der Peptidregionen könnten der entscheidende Faktor für das Adsorptionsverhalten von Proteinen an Oberflächen sein [Nakanishi *et al.*, 2001].

5.2 Methoden zur Proteindetektion

In der heutigen Wissenschaft gibt es verschiedene Möglichkeiten, die Menge an adsorbierten Proteinen an Oberflächen zu bestimmen. Hierbei kann man direkte und indirekte Methoden unterscheiden. Zu den indirekten Methoden zählt zum Beispiel die Quantifizierung radioaktiv markierter Substanzen (Radiolabeling) [Serro *et al.*, 2006]. Direkte Nachweisverfahren sind unter anderem die Quantifizierung mit Hilfe eines Rasterkraftmikroskops [Kidoaki and Matsuda, 1999], die gleichzeitig auch eine qualitative Aussage erlaubt, der Nachweis von Biomolekülen über eine Biotin/Avidin-Reaktion [Ruhl *et al.*, 2007] oder die Massenspektrometrie (MS), die unterschiedlich modifiziert werden kann [Hübschmann, 2008].

5.2.1 Nachweis radioaktiv markierter Proteine

Die am häufigsten genutzte in vitro-Methode, die Proteinadsorption an Oberflächen zu bestimmen ist, radioaktiv markierte Proteine zu verwenden [Wojciechowski *et al.*, 1986; Bale *et al.*, 1988; Rapoza *et al.*, 1989; Chinn *et al.*, 1992; Cornelius *et al.*, 1992]. Bei diesem Nachweisverfahren werden die jeweiligen Proteine meist mit Iodionen (^{125}I) markiert [Cornelius *et al.*, 1992; Sheardown *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998]. Diese Technik ist sehr sensitiv, um quantitative Informationen über Proteinadsorption an Oberflächen zu erhalten, sie liefert jedoch im Vergleich zur Rasterkraftmikroskopie keine Aussagen bezüglich der Proteinkonformation [Chittur, 1998]. Mittlerweile ist die Quantifizierung der Proteinadsorption an verschiedenen Oberflächen mittels radioaktiv-markierter Proteine, nicht nur deshalb, etwas in den Hintergrund getreten. Sheardown *et al.* fanden heraus, dass es bei der Quantifizierung auf Metalloberflächen durch die unterschiedlich benutzten Konzentrationen an Iodionen, aufgrund der starken Interaktionen zwischen Metall (Gold) und Iodionen, zu fehlerhaften Ergebnissen kommen kann [Sheardown *et al.*, 1997].

5.2.2 Rasterkraftmikroskopie

Die Untersuchung und Charakterisierung von Materialoberflächen mit Hilfe der Atomic Force Microscopy (AFM) gehört heute zum Standard [Jandt, 1998; Jandt, 2001]. So findet diese unter anderem zur exakten Darstellung unterschiedlicher Materialoberflächen, wie Metalle [Orisaka *et al.*, 1999], Polymere [Jandt *et al.*, 1993], Keramik [Baretzky *et al.*, 1996] oder zur Charakterisierung von Biomolekülen [Klinov *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000; Cacciafesta *et al.*, 2001] und Zellen [DeRose *et al.*, 1998] ihre Anwendung. Mit dem Rasterkraftmikroskop ist nicht nur die Analyse einzelner Proteinmoleküle möglich [Fritz *et al.*, 1995; Marchant *et al.*, 1997], sondern auch die Analyse komplexer Proteinfilme [Rasmussen *et al.*, 1994; Baty *et al.*, 1997; Ta *et al.* 1998; Gunning *et al.*, 1999]. Die AFM erlaubt die Messung der sogenannten Kraft-gegen-Distanz Kurve (*force-versus-distance curve*) zwischen der Mikroskop-nadel und der zu untersuchenden Oberfläche; sie ermöglicht neben der Messung einzelner Molekülkräfte zwischen spezifischen Proteinpaaren, wie zum Beispiel Avidin und Biotin [Florin *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994; Moy *et al.*, 1994; Pierce *et al.*, 1994] auch die Messung der Adhesionskräfte zwischen Proteinen und Biomaterialoberflächen [Haggerty *et al.*, 1991; Eppell *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1997; Eckert *et al.*, 1997; Sagvolden *et al.*, 1998; Matsuda and Kidoaki, 1999]. Dies kann sowohl an Luft [Zenhausern *et al.*, 1993], in destilliertem Wasser [Cacciafesta *et al.*, 2000] als auch in Pufferlösungen [Marchant *et al.*, 1997] bei unterschiedlichen Temperaturen erfolgen. Beim Rasterkraftmikroskop wird eine nanoskopisch kleine Nadel, die an einer Blattfeder, dem sogenannten Cantilever befestigt ist, in einem definierten Raster über die zu untersuchende Oberfläche geführt [Jandt *et al.*, 2001]. Aufgrund der unregelmäßigen Oberflächenstruktur biegt sich die Blattfeder unterschiedlich stark; diese Auslenkung der Spitze wird dann typischerweise mit Sensoren gemessen. So ergibt sich durch das punktweise Aufzeichnen der Nadel-Auslenkungen eine Abbildung der Probenoberfläche [Eibl and Moy, 2005]. Das Rasterkraftmikroskop kann in verschiedenen Modi genutzt werden; so unterscheidet man neben dem Kontakt-Modus (Contact mode) auch den sogenannten Nichtkontakt-Modus (Tapping-Mode) [Parkinson, 1997; Giessibl, 2003]. Beim Kontaktmodus steht die Mikroskopspitze in ständigem Kontakt mit der Proben-

oberfläche. Aus diesem Grund eignet sich dieser Modus eher nicht für die Untersuchung von Biomolekülen auf Materialoberflächen, sofern es sich bei den Molekülen um schwach gebundene handelt [Jandt, 2001]. Beim Tapping-Modus wird die Blattfeder, meist über ein Piezoelement, zu Schwingungen angeregt; sobald sich die Mikroskopspitze über die Oberfläche bewegt, beginnt sie diese zu berühren [Giessibl *et al.*, 2000]. Die Fähigkeit des Rasterkraftmikroskops mit den unterschiedlichen Modi auch unter wässrigen Bedingungen Bilder von Molekülen und Oberflächen zu ermöglichen, ist ein großer Vorteil gegenüber anderen Mikroskoptechniken [Jandt, 2001]. AFM bietet somit die Möglichkeit die Beschaffenheit eines Proteinlayers sowohl in wässriger Lösung als auch unter trockenen Bedingungen zu erforschen [Dufrêne *et al.*, 1999].

5.2.3 Biotin/Avidin-Reaktion

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Proteinadsorption auf verschiedenen Biomaterialoberflächen wurde mit Hilfe der Biotin/Avidin-Reaktion bestimmt [Ruhl, 2006]. Diese quantitative Nachweismethode ermöglicht eine Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge ohne diese vorher von der Oberfläche entfernen zu müssen. Bei der Biotin/Avidin-Reaktion bindet das Sulfo-NHS-Biotin unter Bildung einer Esterbindung kovalent an die freie Aminogruppe des adsorbierten Proteins. Das nun in die Reaktion eingebrachte Avidin D/Avidin_D_HRP (Horseradish Peroxidase) erkennt seinerseits das Biotin und bindet an dieses. Die Horseradish Peroxidase oxidiert dann den Farbstoff Luminol, der letztlich durch Belichtung eines Röntgenfilms die Proteinadsorption auf den Prüfkörpern in ein sichtbares Ergebnis überführt (siehe Abbildung 6). Vorteil dieser Methode ist die Nachweismöglichkeit relativ kleiner Proteinmengen auf einer kleinen Oberfläche. Nachteilig ist jedoch die Tatsache, dass man mit dieser Methode Oberflächen, die mit Aminogruppen modifiziert sind, nicht vermessen kann [Ruhl *et al.*, 2006].

5.2.4 Massenspektrometrie (MS)

Bei der Massenspektrometrie wird die Substanz, die man untersuchen möchte in die Gasphase überführt und dann ionisiert. Die ionisierten Teilchen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und dann die Masse des Analyten unter Kenntnis der Ionenladung bestimmt [Lawson, 1989]. Der Massenspektrometer setzt sich aus drei wesentlichen Bestandteilen, der Ionenquelle, dem Analysator und einem Detektor zusammen. In der Ionenquelle wird zunächst die zu untersuchende Substanz ionisiert; diese Ionisierung kann hierbei mit Hilfe verschiedener Methoden erfolgen, unter anderem mit der sogenannten Elektrospray-Ionisation (ESI), die sich besonders für große Moleküle, zum Beispiel Proteine eignet [Böhm, 2004]. Auch mit einem Laserlicht kann von einer festen Oberfläche die zu untersuchende Substanz abgedampft und anschließend ionisiert werden. Dieses Verfahren bezeichnet man als MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) [Böhm, 2004]. Die Ionen werden meistens mit Hilfe eines elektrischen Feldes aus der Ionenquelle extrahiert und in den Analysator weitergeleitet, der die Ionen dann nach ihrer Masse auftrennt [McLafferty and Turecek., 1995]. Häufig wird ein sogenannter TOF-Analysator (time of flight) verwendet, der den Vorteil bietet, keine prinzipielle Massenbegrenzung zu besitzen und somit Ionen aller Massen analysieren zu können [Castner *et al.*, 2003]. Als Detektor wird meist ein Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) verwendet. Dieser wird unter anderem mit einer Konversionsdynode kombiniert, bei der die Ionen aufgrund einer angelegten Beschleunigungsspannung auf eine Metalloberfläche prallen und der Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) dann die freiwerdenden Elektronen detektiert [Budzikiewicz *et al.*, 2005]. Bei sehr komplexen Proben ist es oft hilfreich, diese vor der Überführung in den Massenspektrometer mit einem vorherigen Verfahren aufzutrennen. In diesem Zusammenhang wird die Massenspektrometrie oft in Kombination mit Gas- (GC/MS) oder Flüssigkeits-Chromatographen (LC/MS) genutzt [Lawson *et al.*, 1998; Hübschmann, 2008]. Mit der Massenspektrometrie ist generell der qualitative und quantitative Nachweis sehr kleiner Substanzmengen und im Vergleich mit anderen Proteinnachweisverfahren auch gleichzeitig eine Aussage bezüglich der Proteinkonformationen möglich [Liedberg *et al.*, 1984; Chittur, 1998; McDermott and Ta, 2000; Böhm, 2004].

Liquid Chromatographie-Mass Spectrometry (LC-MS)

Mit diesem Verfahren sind schon in mehreren Studien Speichelproteine und -peptide detektiert und bestimmt worden [Castagnola *et al.*, 2003; Messana *et al.*, 2003; Vitorino *et al.*, 2004b; Hardt *et al.*, 2005; Vitorino *et al.*, 2008]. Bei der LC-MS wird die Proteinprobe also zunächst mit Hilfe eines Flüssigkeits-Cgromatographen aufgetrennt und dann erst in den Massenspektrometer überführt. Dieser Fortschritt hat die Identifikation verschiedener Peptidgruppen ermöglicht, wie zum Beispiel der basischen und sauren PRP's (prolin rich proteins) oder der Statherine (tyrosinreiche Proteine) und Histatine (histidinreiche Proteine) [Vitorino *et al.*, 2007].

Matrix-assisted laser desorption ionisation mass spectrometry (MALDI-MS)

Bei der sogenannten MALDI-MS werden Moleküle der zu untersuchenden Substanz in die Kristalle der MALDI-Matrix eingebaut; als Matrixsubstanzen dienen oft kleine organische Moleküle, die bei der verwendeten Laserwellenlänge Energie adsorbieren [Böhm *et al.*, 2004]. Mit kurzen, hochenergetischen Laserimpulsen kommt es zu einer explosionsartigen Teilchenablösung an der Kristalloberfläche und zum Verdampfen der Matrix; hierbei werden, zusammen mit der Matrix, die eingebauten Analytmoleküle mitgerissen und gleichzeitig ionisiert. So können die Moleküle dann in das Vakuum des Massenspektrometers überführt und anschließend massenspektrometrisch analysiert werden [Lawson *et al.*, 1998]. So ist mit der modifizierten Oberflächen-MALDI-MS, die von St. John *et al.* entwickelt wurde eine direkte Analyse eines Biofilms auf unterschiedlichen Biomaterialien *in vivo* möglich. Im Gegensatz zur herkömmlichen MALDI-MS wird hier der Analyt von einem biologischen Medium direkt auf ein synthetisches Material adsorbiert [Griesser *et al.*, 2000]. Auch für die genaue Analyse des menschlichen Speichels wurde und wird die MALDI-MS verwendet. So untersuchten Walz *et al.* (2006) die Speichelzusammensetzung der *Glandula parotis*, *Glandula submandibularis* und *sublingualis* [Walz *et al.*, 2006] hinsichtlich der zwei großen Proteinklassen der PRP's (*prolin rich proteins*) und der Speichelmuzzine [Walz *et al.*, 2006]. In einer weiteren Arbeit wurden mit

Hilfe der MALDI-MS Glykoproteinrezeptoren des Speichels für das Pathogen *Helicobacter pylori* gefunden [Walz *et al.*, 2009].

Der Vorteil der MALDI-MS ist nach Aussage mehrerer Studien die sehr niedrige Detektionsgrenze, die es ermöglicht auch sehr geringe Mengen an Makromolekülen zu analysieren [Karas and Hillenkamp, 1988; Jespersen *et al.*, 1994; Griesser *et al.*, 2000].

5.3 Oberflächeneigenschaften und Proteinadsorption

Wie im Kapitel „Proteinadsorption an Biomaterialoberflächen“ (vgl. Kapitel 1.4) beschrieben, hängt das Ausmaß der Adsorption nicht nur von den Eigenschaften der jeweiligen Proteine ab, sondern auch von verschiedenen Oberflächenparametern wie Rauigkeit und Hydrophilie. Betrachtet man wissenschaftliche Studien, die sich mit dem Bindungsverhalten von HSA beschäftigt haben, lässt sich übereinstimmend feststellen, dass Albumin normalerweise eine deutlich größere Tendenz aufweist, an hydrophoben Oberflächen zu binden als an hydrophilen [van Dulm *et al.*, 1983; Tilton *et al.*, 1990; Prime *et al.*, 1991; Silin *et al.*, 1997; Sigal *et al.*, 1998; Tengvall *et al.*, 1998; Kalltorp *et al.*, 2000; Ostuni *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2003; Sethuraman *et al.*, 2004; Sethuraman *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2005].

Eine Erklärung für gesteigertes Bindungsverhalten von Proteinen wie Albumin und spezifischen Speichelproteinen an aufgerauten Oberflächen ist, dass durch die Rauigkeit größere Oberflächenareale auf dem jeweiligen Material entstehen und die so geschaffenen Vertiefungen günstigere Möglichkeiten für eine Kolonisierung bieten [An *et al.*, 1997]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Proteinadsorption von HSA und menschlichem Gesamtspeichel (*whole saliva*) an neun Biomaterialien untersucht. Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf zwei Oberflächeneigenschaften gelegt, nämlich die Rauigkeit und die Hydrophilie der jeweiligen Materialien.

Bei der Ermittlung der Netzwinkel gegen Wasser (Maß für die Hydrophilie einer Oberfläche) wurden Winkel zwischen 118,5° (hydrophob) und 50,5° (hydrophil) gefunden. Die Materialien PTFE (Polytetrafluorethylen), PE (Polyethylen) und Silikon (Mucopren soft) wurden hierbei mit Netzwinkeln zwischen 118,5° und 110,5° als hydrophob eingestuft. PMMA (Polymethylmethacrylat), Filtek Siloran (Siloran-

komposit), Tetric Evo Ceram (Komposit), Titan (Ti6Al4V) und Cobalt-Chrom-Molybdän mit Netzwinkeln zwischen 73° und 65,5° als schwach hydrophob und letztlich der Glasionomerzement (Ketac Molar) mit einem Netzwinkel von 50,5° als hydrophil. Diese Einteilung erfolgte anhand der Studie von Vogler, der Biomaterialien mit einem Netzwinkel gegen Wasser von 0° bis etwa 63° als hydrophil und von 63° bis 120° als hydrophob einstuft [Vogler, 1998]. Die Beobachtung, dass hydrophobe Kräfte nicht auf Oberflächen mit einem Netzwinkel kleiner als 62,4° auftreten, wurde auch in anderen Studien gemacht [Vogler *et al.*, 1999; Ostuni *et al.*, 2001; Sethuraman *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2005]. So wurden in der Studie von Vogler auch die Netzwinkel gegen Wasser der Biomaterialien Polytetrafluorethylen (108°), Polyethylen (94°) und Polymethylmethacrylat (80°) gemessen [Vogler, 1998]. Diese Werte unterschieden sich zwar geringfügig von den hier ermittelten Messwerten, eine eindeutige Einstufung als hydrophobes oder hydrophiles Material war jedoch möglich.

Die Rauigkeitswerte der untersuchten Materialien bewegten sich zwischen $R_a = 0,04 \mu\text{m}$ (Polymethylmethacrylat) und $R_a = 0,53 \mu\text{m}$ (Polyethylen und Tetric Evo Ceram). Folgt man der aktuellen Literatur, sollte an den hydrophoben und rauen Materialien mehr Protein, besonders HSA, adsorbieren als an den hydrophilen und glatten [Sethuraman *et al.*, 2004; Roach *et al.*, 2005; Ruhl *et al.*, 2006; Ziegler *et al.*, 2010]. In meiner Arbeit wurden jedoch andere Ergebnisse gefunden. So adsorbierte an den beiden hydrophoben Materialien PTFE und PE signifikant mehr Gesamtspeichel als HSA, wobei der Unterschied im Adsorptionsverhalten besonders beim erstgenannten deutlich ist. Das ebenfalls hydrophobe Silikon adsorbierte zwar auch mehr Gesamtspeichel als HSA, jedoch deutlich weniger Gesamtspeichel und HSA als der von uns als hydrophil eingestufte Glasionomerzement.

Die schwächer hydrophoben Materialien wie PMMA, Filtek Siloran, Tetric Evo Ceram, Titan und Cobalt-Chrom-Molybdän wiesen ebenfalls kein einheitliches Adsorptionsverhalten auf. So adsorbierte PMMA mit einem Netzwinkel von 73° deutlich weniger Protein als das Komposit TEC mit einem Netzwinkel von 67,5°, das in der Menge ungefähr gleichviel Speichel und HSA adsorbierte. Am Silorankomposit Filtek Siloran band, trotz eines höheren Netzwinkels, ebenfalls weniger Protein als am TEC, wobei auch hier in der Summe mehr Gesamtspeichel als HSA gebunden

wurde. Titan und Cobalt-Chrom-Molybdän, ersteres mit einem höheren Netzwinkel, adsorbierten ebenfalls ganz unterschiedlich. Während Titan mehr Gesamtspeichel adsorbierte, war Cobalt-Chrom-Molybdän das einzige der neun Materialien, das mehr HSA als Speichel adsorbierte. Der in der Arbeit als hydrophilstes Material eingestufte Glasionomerzement adsorbierte wie auch die deutlich hydrophoberen Materialien PTFE und PE mehr Speichel als HSA; aus der Tatsache, dass er jedoch mehr Speichel als PMMA (Netzwinkel von 73°) adsorbierte, resultiert deutlich das Ergebnis der Studie, nämlich der fehlende generelle Zusammenhang von Hydrophobizität und gesteigerter Proteinadsorption an Materialoberflächen. Aus der ermittelten Proteinadsorption von Gesamtspeichel und HSA lässt sich kein einheitliches Adsorptionsmuster bezüglich des Netzwinkels gegen Wasser erkennen - im Unterschied zu anderen Studien, die von einem allgemeinen Zusammenhang zwischen starker Hydrophobizität und gleichzeitigem Anstieg in der Proteinadsorption berichten [Prime *et al.*, 1991; Krisdashima *et al.*, 1992; Sigal *et al.*, 1998; Tengvall *et al.*, 1998; Sethuraman *et al.*, 2004; Roach *et al.*, 2005]. Erstaunlich ist zunächst die in dieser Arbeit gefundene große Differenz in der Proteinadsorption von Speichel und HSA, was die besonders hydrophoben Materialien Polytetrafluorethylen (PTFE) und Polyethylen (PE) angeht. Diese ist auch nicht mit den ermittelten Rauigkeitswerten zu erklären, bei denen Teflon (PTFE), mit relativ kleinem Rauigkeitswert von $R_a = 0,15 \mu\text{m}$, deutlich unter dem Wert des Polyethylens mit $R_a = 0,53 \mu\text{m}$ liegt und dennoch beträchtlich mehr Speichel adsorbiert als PE. Ein möglicher Erklärungsversuch für diese Sachlage könnte die oben bereits angesprochene Problematik des „soft proteins“ HSA sein, nämlich die geringe interne Stabilität und die nach Bindung an stark hydrophobe Oberflächen auftretenden Konformationsänderungen. Im Zuge dieser strukturellen Änderungen kann es auch zur Auflösung helikaler Strukturen und somit zu einer partiellen Denaturierung kommen [Roach *et al.*, 2005]. Inwieweit eine mögliche Denaturierung die mit der Biotin-Avidin-Reaktion nachzuweisenden freien Aminogruppen des Proteins betreffen, ist allerdings unklar. Auch die Unterschiede zwischen dem Komposit Tetric Evo Ceram und dem Metall Cobalt-Chrom-Molybdän bezüglich eines Zusammenhangs zwischen Rauigkeit und Adsorptionsverhalten sind nicht erklärbar. So unterscheiden sie sich zwar in ihren Rauigkeitswerten $R_a = 0,53 \mu\text{m}$ zu $R_a = 0,15 \mu\text{m}$ wie Teflon und Polyethylen, weisen

dafür jedoch relativ ähnliches Adsorptionsverhalten auf. Aus diesen Gründen lässt sich festhalten, dass Hydrophilie und Oberflächenrauigkeit nur Teilparameter im komplexen Vorgang der Proteinadsorption sind. Allein mit diesen beiden ist das unterschiedliche Adsorptionsverhalten auf den untersuchten Biomaterialien nicht eindeutig und zufriedenstellend zu erklären. Eine wichtige Rolle spielt wohl auch der Einfluss spezifischer Ionen und chemischer Gruppen auf den Materialoberflächen.

5.3.1 Proteinadsorption in Abhängigkeit physiko-chemischer Parameter

Die Proteinadsorption auf Materialoberflächen wird von verschiedenen Parametern beeinflusst. So spielen nicht nur die Struktur des jeweiligen Proteins, sondern auch Oberflächenparameter wie Rauigkeit, Hydrophobizität, pH-Wert des umgebenden Milieus, sowie der Einfluss von Ionen eine entscheidende Rolle.

Besonders in der heutigen Zeit, in der die Anwendung von Implantaten jeglicher Art immer selbstverständlicher und lebenswichtiger wird, ist die Proteinadsorption und die nachfolgende Besiedelung des Implantats mit Zellen, Bakterien oder Pilzkulturen der Vorgang, der letztlich über Erfolg oder Misserfolg eines Implantats entscheidet [Scarano *et al.*, 2004; von Eiff *et al.*, 2005; Elter *et al.*, 2008].

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften einer Materialoberfläche (Rauigkeit und Netzwinkel) spielen bei der Proteinadsorption, die nach Einbringen eines Implantates in den Körper innerhalb weniger Sekunden erfolgt [Lyman *et al.*, 1975; Vroman *et al.*, 1977; Sheardown *et al.*, 1997; Ruhl, 1999; Wilson *et al.*, 2005] eine besonders wichtige Rolle [Esposito *et al.*, 1998; Quirynen *et al.*, 2002]. In zahlreichen Studien versuchte man durch Modifizierung der Oberflächenrauigkeit oder der Oberflächenchemie die Hydrophobizität der verwendeten Materialien zu verändern. Dabei versteht man unter Rauigkeit (Rauheit), einem Begriff aus der Oberflächenphysik, eine Unebenheit der Oberflächenhöhe. Die Rauigkeit wird üblicherweise in der Einheit μm angegeben. Dabei ist die mittlere Rauheit (R_a) der mittlere Abstand eines Messpunktes auf der Oberfläche zur Mittellinie. Die Oberflächenrauheit kann beispielsweise durch Schleifen, Polieren oder Sandstrahlen verändert werden. Rauheit bezeichnet weiterhin eine Gestaltabweichung, die für technische Oberflächen in DIN 4760 definiert ist [<http://de.wikipedia.org>; Beuth-

Verlag, Berlin]. Hierbei wurde aufgezeigt, dass eine gesteigerte Rauigkeit gleichzeitig auch zu einer Steigerung in der Protein-, Bakterien-, oder Zelladhäsion führt, was teilweise mit der Vermutung begründet wurde, dass Mikroorganismen auf raueren Oberflächen gegenüber auftretenden Scherkräften besonders geschützt sind [Bollen *et al.*, 1997; An *et al.*, 1998; Hannig, 1999; Sela *et al.*, 2006; Theugels *et al.*, 2006; Bürgers *et al.*, 2010]. Bollen *et al.* untersuchten die Bakterienadhäsion an verschiedenen rauen Implantatmaterialien, wobei sie Materialoberflächen mit einer Rauigkeit von $R_a = 0,2 \mu\text{m}$ als glatt einstuften, da unterhalb dieses Schwellenwertes kein Einfluss auf die Bakterienadhäsion mehr festgestellt werden konnte [Bollen *et al.*, 1997]. Für die Adsorption von Proteinen auf Materialoberflächen ist ein vergleichbarer Wert in der Literatur momentan nicht verfügbar.

Die Hydrophobizität der jeweiligen Materialoberfläche wurde durch das Applizieren verschiedener chemischer Gruppen, zum Beispiel durch Hydroxygruppen (OH^-) oder Heptadecafluorotetrahydrodecylgruppen (HFS-) beeinflusst, die mit Netzwinkeln gegen Wasser von etwa 10° - 15° als besonders hydrophil und 108° - 116° als besonders hydrophob klassifiziert wurden [Ruhl *et al.*, 2006; Schweikl *et al.*, 2008]. In anderen Arbeiten wurden auch chemische Gruppen wie Carboxylgruppen (COOH^-) oder Methylgruppen (CH_3^-), die man als moderat hydrophil beziehungsweise moderat hydrophob einstuft zur Modifizierung von Materialoberflächen verwendet und ihr Einfluss auf die Proteinadsorption untersucht. [Dupont-Gillain *et al.*, 2003]. In der Regel binden mehr Proteine an hydrophobe Oberflächen, als an hydrophile [Tilton *et al.*, 1990; Martins *et al.*, 2003; Sethuraman *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2005; Ziegler *et al.*, 2010]. Die Bindung zwischen Proteinen und einer hydrophober Oberfläche scheint aber nicht so stark zu sein, wie die zwischen Proteinen und einer hydrophilen Oberfläche. In einer Arbeit von Dupont-Gillain *et al.* (2003) verharrt das adsorbierte HSA-Protein nach Adsorption an die hydrophile COOH-Oberfläche in seiner naturgegebenen Struktur und Ausrichtung, was für eine stärkere Bindung zwischen Protein und Oberfläche sprechen könnte. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass die HSA-Proteine auf der hydrophoben CH_3 -Oberfläche nach Abschluss des Adsorptionsvorganges die Fähigkeit besaßen, ihre Konformation und Ausrichtung zu verändern [Dupont-Gillain *et al.*, 2003]. Unterstützt wurde diese Beobachtung auch von Tilton *et al.* und Jeyachandran *et al.* während Kidoaki and Matsuda stärkere

Interaktionen zwischen Proteinen und hydrophoben CH₃-Oberflächen fanden [Tilton *et al.*, 1990; Kidoaki and Matsuda, 1999; Jeyachandran *et al.*, 2009]. Man findet jedoch auch Arbeiten, welche bei der Adsorption verschiedener Proteine auf unterschiedlich energetischen Oberflächen (hydrophob/hydrophil) letztlich immer eine Konformationsänderungen des jeweiligen Proteins feststellten [Norde *et al.*, 1999; Norde *et al.*, 2000; Giacomelli *et al.*, 2001].

Neben Rauigkeit und Netzwinkel der untersuchten Modelloberfläche sind jedoch auch der pH-Wert des umgebenden Milieus und der Einfluss spezifischer Ionen auf das Ausmaß der Proteinadsorption von großer Bedeutung. Am Beispiel der Proteinadsorption des Serumproteins HSA an Titan wird deutlich, dass besonders bei Metallen die Adsorption durch verschiedene Ionen gesteuert wird. So untersuchten Klinger *et al.* die Proteinadsorption von HSA auf Titan in Abhängigkeit des pH-Wertes und unter dem Einfluss von Kalium, Kalzium und Magnesium. Man fand bei unterschiedlichen pH-Werten (pH3 und pH7) auf den mit Kalzium und Magnesium vorbehandelten Titanprüfkörpern eine ungefähr gleichstarke Adsorption von HSA, wobei die Vorbehandlung mit Kalium nur zu einer sehr geringen HSA-Adsorption führte. Erklärt wurde diese Tatsache mit der unterschiedlichen Ladung des Albumins bei verschiedenen pH-Werten. So liegt Albumin bei pH7 negativ geladen vor und kann, vermittelt durch die zweifach positiv geladenen Ionen Ca²⁺ und Mg²⁺, die in diesem Fall als Brückenbauer zwischen negativer Albumin- und Titanoberfläche fungieren, an die negativ geladene Titanoberfläche binden [Hallab *et al.*, 1995; MacDonald *et al.*, 2002]. Im Fall des einfach positiv geladenen Kaliumions ist dies jedoch nicht möglich. Bei pH3 liegt Albumin positiv geladen vor und die Titanoberfläche ist durch die Wasserstoffmoleküle, die an die Oxidschicht binden neutralisiert; dies führt also bei niedrigem pH zu einer elektrostatischen Abstoßung zwischen Albumin und Titan, die auch durch die Anwesenheit von Kalzium oder Magnesium nicht aufgehoben werden kann [Klinger *et al.*, 1997]. Der Einfluss des pH-Wertes auf die Proteinladung und etwaig resultierende Konformationsänderungen eines Proteins wurde auch in anderen Studien aufgezeigt [Foster, 1960; Pedersen, 1972; Fogh-Andersen, 1977; Okabe and Hokaze, 1993; Wassell and Embery, 1996].

5.4 Modelloberflächen für das Studium der Proteinadsorption

5.4.1 Humanes Serumalbumin (HSA) als Modellprotein

Mit einem Molekulargewicht von 66 kDa ist Albumin das am meisten vorkommende Serumprotein des menschlichen Körpers, welches verschiedene Fettsäuren und andere Proteine innerhalb des Blutkreislaufs transportiert [Putnam *et al.*, 1975; Carter *et al.*, 1989; Carter *et al.*, 1990; Paulsson *et al.*, 1993; Carter *et al.*, 1994; Liebmann-Vinson *et al.*, 1996; Dupont-Gillain *et al.*, 2003]. Aufgrund seiner hohen Serumkonzentration, die 100-1000 fach höher ist als die anderer Serumproteine und seiner relativ kleinen molekularen Masse wird angenommen, dass es bevorzugt in der frühen Bildungsphase eines Proteinlayers an verschiedene Materialoberflächen adsorbiert [Roach *et al.*, 2005; Iwata *et al.*, 2007]. Dieses Protein zeichnet sich besonders durch seine hohe Resistenz gegenüber bakteriellen Proteasen aus und wird des weiteren auch als Bestandteil der dentalen Plaque vorgefunden [Kraus *et al.*, 1973; Cohen und Levine, 1989; Carlén *et al.*, 1998; Carlén *et al.*, 2003]. HSA oder BSA werden oft auch als antiadhäsive Proteine bezeichnet und finden daher häufig Verwendung, wenn es darum geht, Implantatoberflächen vor den Folgen einer möglichen Zelladhäsion, die auch zur Thrombenbildung führen könnte, zu verhindern [Frautschi *et al.*, 1983; Vaudaux *et al.*, 1984; Kamath *et al.*, 1993; Taborelli *et al.*, 1995; Bacáková *et al.*, 2004]. So wird in zahlreichen Studien nicht nur von einer Verminderung der untersuchten Zelladhäsion berichtet, sondern auch von reduzierter Bakterien- und Pilzadhäsion, sofern die untersuchten Materialoberflächen zuvor einer Beschichtung mit HSA oder BSA unterzogen wurden [Pringle and Fletcher, 1986; Proctor *et al.*, 2006; Ruhl *et al.*, 2007; Bürgers *et al.*, 2009].

5.4.2 Speichelproteine und ihr Einfluss auf Plaque- und Kariesentstehung

Die Zusammensetzung des humanen Speichels und die Funktion seiner Komponenten sind oben beschrieben (vgl. Kapitel 1.2). Auch das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Protein Albumin ist im Speichel nachzuweisen [Carlén *et al.*, 1998]. Die sogenannte Pellicelbildung, also die Bildung einer Schicht von

Glykoproteinen und Kohlenhydraten aus dem Speichel, steht am Anfang der Plaque- und eventuell nachfolgenden Kariesbildung auf verschiedenen Oberflächen in der Mundhöhle. Der Pellicel übernimmt jedoch auch schützende Funktionen; so reguliert er unter anderem die Remineralisierung und Demineralisierung der Zahnhartsubstanz [Lendenmann *et al.*, 2000; Lussi *et al.*, 2004; van Nieuw Amerongen *et al.*, 2004]. Bei der Pellicelbildung handelt sich um einen komplexen Ablauf, der vor allem durch chemische und physikalische Vorgänge, wie van-der-Waals- und Coulomb-Kräfte, aber auch durch hydrophobe, elektrostatische Interaktionen, sowie kovalente Bindungen zwischen Protein und Zahn- beziehungsweise Materialoberfläche beeinflusst wird [van Oss, 2003; Quinn *et al.*, 2006; Theugels *et al.*, 2006; Norde *et al.*, 2008]. Laut Hannig *et al.* haben hierbei alle genannten Kräfte einen gewissen Einfluss auf die Proteinadsorption und die Proteinkonformation nach erfolgter Adsorption. Die chemisch-physikalischen Eigenschaften der Oberfläche, an welche die Proteine in der Mundhöhle adsorbieren (Zahnoberflächen oder verschiedene Materialoberflächen) scheinen daher auch wichtige Adsorptionsfaktoren zu sein. Hierbei werden vor allem der Oberflächenenergie, der Rauigkeit und der chemischen Beschaffenheit der jeweiligen Oberfläche eine entscheidende Rolle im Adsorptionsprozess zugeschrieben [Hannig *et al.*, 2007; Hannig *et al.*, 2009].

Der Vorgang der Proteinadsorption und die Ausbildung eines sogenannten Proteinlayers ist keinesfalls statisch; so kommt es in der Proteinschicht, aufgrund der obengenannten Einflussfaktoren, zu ständigen Umbauprozessen [Iontcheva *et al.*, 1997; Yao *et al.*, 2000]. Proteine verändern ihre Struktur werden von der Oberfläche abgestoßen, richten sich neu aus oder werden proteolytisch abgebaut [de Jong *et al.*, 1984; Jensen *et al.*, 1992; Lamkin *et al.*, 2001; Helmerhorst *et al.*, 2006; Norde *et al.*, 2008]. In der Mundhöhle unterliegen diese Vorgänge zusätzlich dem pH-Einfluss des Speichels [Hannig *et al.*, 2009]. Falsch ist die Annahme, dass der als Proteinlayer bezeichnete Pellicel ausschließlich aus Proteinen besteht; so wurde in mehreren Studien die Existenz verschiedener Enzyme und anderer Makromoleküle nachgewiesen [Kraus *et al.*, 1973; Lendenmann *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2004; Hannig *et al.*, 2005; Hannig *et al.*, 2006]. Auch sind nicht alle im Speichel vorkommenden Proteine an der Pellicelbildung beteiligt. Es handelt sich hierbei also um einen

selektiven Vorgang [Hay *et al.*, 1967; Yao *et al.*, 2003; Hannig *et al.*, 2006; Hannig *et al.*, 2008].

Mit verschiedenen Verfahren wurde in mehreren Studien versucht eine genau Analyse der Pellikelzusammensetzung durchzuführen. So wurde unter anderem der Nachweis von sauren PRP's (prolinreiche-Proteine), Statherinen (tyrosinreiche Proteine), Histatinen (histidinreiche Proteine), Cystatinen (cysteinreiche Proteine), Amylase (Enzym), Lactoferrin und Lysozym (antibakteriell wirksame Proteine), sowie von Muzzinen (MG1 und MG2) erbracht [Kousvelari *et al.*, 1980; Bennick *et al.*, 1983; Carlén *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Hannig *et al.*, 2005; Hannig *et al.*, 2007]. Vitorino *et al.* beobachteten in ihrer Arbeit, dass der auf dem Zahnschmelz gebildete Pellikel aus zwei unterschiedlichen Proteinclustern zu bestehen scheint; der eine, angereichert mit besonders vielen Säuregruppen und phosphorylierten Peptiden, der andere ohne diese Komponenten. Insgesamt wurden mehr als 90 Speichelpeptide und Speichelproteine in der Pellikel detektiert [Vitorino *et al.*, 2008]. Siqueira *et al.* unterschieden in ihrer in vitro-Studie die detektierten Speichelproteine anhand ihrer möglichen Rolle innerhalb der Pellikelkonformation. Die erste Gruppe umfasst ihrer Meinung nach Proteine, welche die Fähigkeit besitzen an Kalziumionen zu binden; diese Proteine scheinen dadurch mit den Kalziumionen des Zahnschmelzes interagieren zu können und werden daher auch als „*pellikel precursor proteins*“ bezeichnet. Die zweite Gruppe hingegen beinhaltet Proteine, die eine hohe Tendenz aufweisen an Phosphationen zu binden; von diesen beiden Gruppen wird angenommen, dass sie die erste Proteinschicht bilden, die an den Kalzium- und Phosphationen enthaltenden Zahnschmelz (Hydroxylapatit) bindet. Die dritte Gruppe umfasst laut Siqueira *et al.* Proteine, die mit anderen Proteinen interagieren, so wie zum Beispiel das Protein MUC5B, von dem man annimmt, dass es Komplexe mit anderen Speichelproteinen bildet [Iontcheva *et al.*, 1997] Weitere Proteine, die in der Pellikel gefunden wurden, sind laut entweder in die spezifische Immunantwort involviert, übernehmen antimikrobielle Aufgaben oder besitzen ungeklärte Funktion [Siqueira *et al.*, 2007].

Sehr einflussreiche Parameter für die Proteinadsorption scheinen im Bezug auf die in der Mundhöhle vorkommenden (Material)oberflächen vor allem die Rauigkeit und die Hydrophobizität zu sein. An rauen und/oder hydrophoben Oberflächen scheint mehr

Protein zu adsorbieren, als an glatten und/oder hydrophilen [Uyen *et al.*, 1990; Vassilakos *et al.*, 1993; Carlèn *et al.*, 2001; Lindh, 2002; Ruhl *et al.*, 2006]. Bei Vassilakos *et al.* beobachtete man, dass die Bindung zwischen hydrophoben Prüfkörperoberflächen und Speichelproteine nur schwach ausgeprägt war und die Proteine auch relativ leicht wieder von der Oberfläche entfernt werden konnten [Vassilakos *et al.*, 1993]. Eine allgemeine Aussage zum Adsorptionsverhalten von Speichelproteinen an Oberflächen ist also nicht möglich [Moreno *et al.*, 1982; Vassilakos *et al.*, 1992; Lindh, 2002].

Nach erfolgter Proteinadsorption kommt es dann unter anderem auch zur Adhesion von Bakterien. Im Gegensatz zu den Proteinen verläuft die Adhäsion der Mikroorganismen auch spezifisch, vor allem über sogenannte Fimbrien [Gristina *et al.*, 1988; Marsh *et al.*, 1995; Hannig *et al.*, 2007].

5.4.3 Proteinadsorption auf medizinischen Biomaterialien

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Materialien handelt es sich um ganz unterschiedliche Biomaterialien, von denen manche ausschließlich als Füllungs- oder Unterfütterungsmaterialien in der Zahnmedizin und zahnärztlichen Chirurgie ihre Verwendung finden und solche, die im gesamten Bereich der Medizin als Implantatwerkstoffe genutzt werden. Über die rein zahnärztlichen Materialien, Ketac Molar, Tetric Evo Ceram und Filtek Siloran gibt es im Vergleich zu den weitverbreiteten Implantatwerkstoffen, wie Polyethylen (PE), Polytetrafluorethylen (PTFE), Titan, Cobalt-Chrom-Molybdän, Polymethylmethacrylat (PMMA) und Silikon sehr wenige Studien, die sich ausschließlich mit der Proteinadsorption an den jeweiligen Biomaterialien beschäftigen.

Polytetrafluorethylen (PTFE) wird in der Medizin zum Beispiel für Gefäßprothesen verwendet, da seine Oberfläche glatt und sehr hydrophob ist. Dadurch wird die Entstehung von Blutgerinnseln und die Adsorption von Proteinen minimiert [Ratner *et al.*, 2004; Ziegler *et al.*, 2010]. Senechal *et al.* zeigten den Adhesionunterschied des Pathogens *Enterococcus faecalis* an verschiedenen Polymeroberflächen; hierbei wurde neben Polyurethan und Polyamid auch PTFE untersucht. Die Untersuchung

der verschiedenen Oberflächen mittels Atomic Force Mocroscopy (AFM) legte dar, dass *Enterococcus faecalis* auf der Polytetrafluorethylenoberfläche in deutlich geringerer Menge nachgewiesen wurde, als auf Polyurethan und Polyamid, die beide kein Fluor enthalten. Des weiteren beobachtete man, dass die Bakterien von der PTFE-Oberfläche auch wieder leichter entfernt werden konnten als von den anderen Materialien. Dies lässt laut Senechal *et al.* den Schluss zu, dass initiale Bakterienadhesion kontrolliert und durch geeignetes „Biomaterial-Design“ sogar verhindert werden kann [Senechal *et al.*, 2004].

Hallab *et al.*, untersuchten in Abhängigkeit von Oberflächenrauhigkeit und Hydrophobizität die Adhesion von Fibroblasten an verschiedenen Materialien. Dabei zeigte sich, dass deutlich weniger Zellen auf den hydrophoben Polymermaterialien, darunter auch Polytetrafluorethylen, nachgewiesen werden konnte, als auf hydrophileren Metallocerflächen wie Titan (Ti6Al4V) [Hallab *et al.*, 2001].

Polyethylen (PE) wird vor allem in seiner UHMWPE-Form (*ultra high molecular weight polyethylene*) als Katheter in der heutigen Gefäßchirurgie oder als Komponente künstlicher Hüftgelenke verwendet [Ratner *et al.*, 2004]. Titushkin *et al.* beschäftigten sich mit der Aktivität von Blutplättchen auf Carbon-modifiziertem Polyethylen. Hierbei wurde die Hälfte der Polyethylenprüfkörper mit Carbon vorbehandelt und dann alle Proben einem zusätzlichem Precoating mit HSA unterzogen. Die Ergebnisse zeigten eine deutlich geringere Aktivität der Blutplättchen auf dem vorbehandelten Polyethylen im Vergleich zum gänzlich unbehandelten, was die These von HSA als Oberflächenpassivierer stützt [Titushkin *et al.*, 2001].

Iwasaki *et al.* hingegen untersuchten die Gaspermeabilität und Blutkompatibilität einer mit Phospholipiden modifizierten Polyethylenmembran. Diese PMD-Membran zeigte dieselbe Gaspermeabilität wie eine herkömmliche Polyethylenmembran. Die neue Membran reduziert die Gefahr eines Misserfolges und ist aufgrund ihrer guten Sauerstoffdurchlässigkeit und Blutkompatibilität eine nützliche Bereicherung auf dem Gebiet der herkömmlichen Polyethylenmembranen [Iwasaki *et al.*, 2002].

Polymethylmethacrylat (PMMA) gehört neben Polyethylen (PE) und Polytetrafluorethylen (PTFE) aufgrund seiner Oberflächenbeschaffenheit zu den hydrophoben Materialien und findet, vor allem durch diese Tatsache bedingt, vielseitige Verwendung (vgl. Kapitel 3.1.4.1). Der Zusammenhang zwischen Hydrophobizität und Proteinadsorption wurde von mehreren Autoren untersucht. Von den untersuchten Materialien, darunter Polymethylmethacrylat, wurden jeweils der Netzwinkel und die Oberflächenrauigkeit bestimmt. Für PMMA wurde hierbei ein Netzwinkel gegen Wasser von $68,4^\circ$ gemessen, ein Wert, der sich von dem in der vorliegenden Arbeit gemessenen Wert für Polymethylmethacrylat von 73° nur geringfügig unterschied [Ziegler et al., 2010]. Als Modellprotein wurde bei Ziegler et al. BSA gewählt und eine deutlich höhere Proteinadsorption auf den hydrophoben Materialien, wie PMMA und PTFE nachgewiesen. Auf hydrophilen Materialoberflächen kommt es laut Ziegler et al., sowie Kidoaki et al. und Ostuni et al. vor allem durch die stark gebundenen Wassermoleküle zu einem abweisenden Verhalten gegenüber der Proteinadsorption [Ostuni et al., 2001; Kidoaki et al., 2002; Ziegler et al., 2010]. Die Oberflächenrauigkeit der einzelnen Materialoberflächen spielt für das Ausmaß der Proteinadsorption nur eine untergeordnete Rolle [Cai et al., 2006; Siedlecki and Xu, 2007; Ziegler et al., 2010]. In der Studie von Lampin et al., die sich mit dem Zusammenhang zwischen Oberflächenrauigkeit, Hydrophobizität und der Adhesion von Zellen beschäftigten, wurde speziell der Einfluss dieser Parameter auf PMMA-Oberflächen untersucht. Hierbei wurden die Oberflächen mit Aluminiumgranulat (Al_2O_3) sandgestrahlt und dabei Oberflächen unterschiedlicher Rauigkeit erzeugt. Anschließend erfolgten Messungen dieser modifizierten Oberflächen hinsichtlich ihrer Hydrophobizität, wobei ersichtlich wurde, dass der Anstieg der Rauigkeit auch zu einem Anstieg der Hydrophobizität der einzelnen Oberflächen führte. Auf den raueren PMMA-Oberflächen führte der Anstieg in der Oberflächenspannung auch zu einer gesteigerten Zelladhäsion [Lampin et al., 1997].

Silikone sind wärmebeständig, hydrophob, also im wässrigen Milieu extrem schlecht benetzbar und gelten in der Regel als nicht gesundheitsschädlich. Aus diesen Gründen werden sie unter anderem für die Hautpflege und in der plastischen Chirurgie verwendet; so werden unter anderem auch künstliche Herzklappen und

Herzschriftermacher aus Silikon gefertigt [Ratner *et al.*, 2004]. In der Zahnmedizin sind additions- und kondensationsvernetzende Silikone für die exakte Abformung der Zahnreihen und Kiefer zur Herstellung von Präzisionsmodellen unerlässlich [Marxkors *et al.*, 2005].

Käs beschäftigte sich in seiner Dissertation mit der Adhesion von *Streptococcus gordonii* DL1 an zahnärztlichen Werkstoffoberflächen, in Abhängigkeit von vorher erfolgter Speichel-Proteinbeschichtung und erzeugter Oberflächenrauigkeit. Neben Phosphatzement, verschiedenen Kompositen (gefüllt oder ungefüllt), Paraffin, Acrylat und dem Glasionomerzement Ketac Molar wurde auch Silikon untersucht. An den untersuchten Silikonprüfkörpern adherierten weniger Bakterien als an Phosphatzement, Glasionomerzement und konventionellen Kompositen. Die Ergebnisse waren jedoch weniger von der Oberflächenrauigkeit und der Proteinpräsenz, als vom Material an sich und chemisch-physikalischen Faktoren abhängig [Käs, 2004].

Imai *et al.* wiederum fanden auf Silikon im Vergleich zu Fluorpolymer eine größere Menge an adsorbierten Speichelproteinen [Imai *et al.*, 1999].

Das *Komposit Tetric Evo Ceram* ist ein zahnfarbener, plastischer Füllungswerkstoff, der ausschließlich in der Zahnmedizin seine Verwendung findet. Das in der Arbeit getestete Komposit Tetric Evo Ceram (TEC) ist ein Nanofüllerkomposit mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 0,6 µm und kann aufgrund der Bestanteile seiner organischen Matrix, besonders des Urethandimethacrylats (UDMA) als hydrophob bezeichnet werden [Marxkors *et al.*, 2005].

Silorane gehören ebenfalls zu den dentalen Kompositen. Der Name der Silorane setzt sich aus den Komponenten Siloxan und Oxiran zusammen, wobei die Siloxane vor allem für die Hydrophobizität des Werkstoffes verantwortlich sind, was wiederum zu einer verminderten Adsorption oraler Mikroorganismen führen könnte. [Guggenberger *et al.*, 2000; Palin *et al.*, 2005; Weinmann *et al.*, 2005]. Der große Unterschied der Silorane zu den bisherigen Kompositen, wie Tetric Evo Ceram liegt in der veränderten chemischen Struktur und der daraus resultierenden erniedrigten Polymerisationsschrumpfung sowie im Polymerisationsablauf, der bei den Methacrylaten durch Radikale, bei den Siloranen hingegen durch Kationen gestartet wird [Weinmann *et al.*, 2005; Guggenberger *et al.*, 2007]. Bürgers *et al.* stellten die

Unterschiede von Tetric Evo Ceram und Filtek Siloran bezüglich der Bakterienadhäsion dar [Bürgers *et al.*, 2009]. Hierbei wurde unter Berücksichtigung der Oberflächenrauigkeit und dem Maß der Hydrophobizität die Adhäsion von *Streptococcus oralis*, *Strept. sanguinis*, *Strept. gordonii* und *Streptococcus mutans* untersucht. Sowohl Tetric Evo Ceram, als auch Filtek Siloran wiesen nach Polieren der jeweiligen Prüfkörperoberfläche einen Rauigkeitswert von $R_a = 0,04 \mu\text{m}$ auf. Die Hydrophobizität offenbarte jedoch einen deutlichen höheren Wert für das Silorankomposit ($92,1^\circ$) im Vergleich zum konventionellen Methacrylatkomposit Tetric Evo Ceram ($60,0^\circ$). Die geringste Bakterienadhäsion aller getesteter Kunststoffe für die vier Bakterienstämme wurde auf Filtek Siloran nachgewiesen. Bei gleicher Rauigkeit scheint hier also die höhere Hydrophobizität des Silorankomposit für die verminderte Bakterienadhäsion ausschlaggebend zu sein. Dieses Ergebnis steht auch in Übereinstimmung mit anderen Studien, doch kann die Hydrophobizität nicht als einziger Parameter für eine verminderte Bakterienadhäsion deklariert werden [Quirynen *et al.*, 1995; An *et al.*, 1998; Theugels *et al.*, 2006; Bürgers *et al.*, 2009]. Dorner untersuchte in seiner Promotion, in Abhängigkeit von Oberflächenrauigkeit und Hydrophobizität die Adsorption von Speichelproteinen auf verschiedenen zahnärztlichen Materialien. Auch er beobachtete einen generellen Zusammenhang zwischen Rauigkeit, Hydrophobizität und der resultierenden Proteinadsorption, verwies aber auf die Tatsache, dass allein durch diese Parameter das Ausmaß der Adsorption jedoch nicht zu erklären sei [Dorner, 2005].

Glasionomerzemente (GIZ) werden als zahnärztliche Füllungsmaterialien verwendet, eignen sich aber auch als Unterfüllungsmaterial unter Amalgam-, Komposit- und Keramikrestaurierungen, werden zudem zur Befestigung von Kronen und Inlays eingesetzt und auch für Zahnstumpfaufbauten verwendet [Hellwig *et al.*, 1995].

In der Arbeit wurde der hochviskose, hydrophile Glasionomerzement Ketac Molar verwendet. Käs und Dorner fanden, dass mehr Proteine und Bakterien an Ketac Molar im Vergleich zu anderen untersuchten Biomaterialien adsorbierten. Neben der Rauigkeit der einzelnen Biomaterialien spielten besonders ihre chemisch-physikalischen Eigenschaften und die daraus resultierende Hydrophobizität und/oder Hydrophilie eine entscheidende Rolle [Käs, 2004; Dorner, 2005].

Titan ist aufgrund der Ausbildung einer Sauerstoffinhibitionsschicht an Luft und der daraus resultierenden Korrosionsbeständigkeit ein nahezu universell einsetzbares [Lausmaa *et al.*, 1986] und vor allem in der Zahnmedizin ein über Jahrzehnte verwendetes (Implantat)material [Albrektsson, 1985; Branemark *et al.*, 1985; Adell *et al.*, 1990] Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Ti6Al4V (Titanium 6 Aluminium 4 Vanadium) findet seine Anwendung typischerweise als Osseosyntheseimplantat-material, zum Beispiel in der chirurgischen Orthopädie oder in der Mittelohrchirurgie als Material für Gehörknöchelchenersatz [Ratner *et al.*, 2004].

Deligianni *et al.* (2001) untersuchten in ihrer Studie den generellen Zusammenhang zwischen Oberflächenrauigkeit von Ti6Al4V und Zellattachment beziehungsweise Proteinadsorption. Die Titanprüförper wurden mittels unterschiedlicher Politur in drei Rauigkeitsklassen eingeteilt, mit einer Serum-Proteinlösung beschichtet und dann für acht/sechzehn Tage in einer Zellsuspension inkubiert. Beobachtet wurde ein Zusammenhang zwischen ansteigender Rauigkeit und ansteigendem Zellattachment, der auch in anderen Studien beobachtet wurde [Michaels *et al.*, 1989; Bowers *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1995; Deligianni *et al.*, 2001]. Durch Nachweis enzymatischer Aktivität konnte weiterhin gezeigt werden, dass auch die Zelldifferenzierung Rauigkeits-sensitiv ist. Die Adsorption von BSA erfolgte bevorzugt an den glatten Titanoberflächen, während an den rauen deutlich mehr Gesamtserum und Fibronectin adsorbierte. Diese Beobachtung wurde mit der Tatsache erklärt, dass das Aufrauen der Titanoberfläche zum Anstieg der Hydrophilie führt und daher weniger Albumin an den rauen Titanoberflächen adsorbiert [McDonald *et al.*, 1998; Serro *et al.*, 1999]. Albumin scheint also das Zellattachment auf glatten Titanoberflächen teilweise zu unterbinden, während Fibronectin, das vorwiegend an rauen Titanoberflächen adsorbierte zu einer gesteigerten Zelladhäsion führt [Deligianni *et al.*, 2001].

Bürgers *et al.* fanden in vitro und in vivo nach zweistündiger Inkubation mit *Streptococcus sanguinis* eine deutlich höhere Adhesionsrate auf rauen, sandgestrahlten und geätzten Titanoberflächen, als auf den unbehandelten. Da die vorbehandelten Titanoberflächen neben der deutlich größeren Rauigkeit auch eine niedrigere Oberflächenenergie aufwiesen, führte man die gesteigerte Bakterienadsorption vor allem auf den Parameter der Oberflächenrauigkeit zurück [Bürgers *et al.*, 2009].

Cobalt-Chrom-Molybdän wird in der Zahnheilkunde aufgrund seines hohen E-Moduls hauptsächlich für die Herstellung von Modellgussprothesen verwendet. In der Humanmedizin ist es vor allem in der Unfallchirurgie ein Verbindungselement in modularen Hüftprothesen und in der Implantologie [Eichner *et al.*, 2000; Ratner *et al.*, 2004; Marxkors *et al.*, 2005].

Webster *et al.* beschäftigten sich mit der Adhesion von Osteoblasten auf Cobalt-Chrom-Molybdän (Co28Cr6Mo) und Titan (Ti6Al4V) und verglichen die Adhesionsmengen auf den herkömmlichen Metalloberflächen mit Nanophase-Metallen (Nanophase-Co28Cr6Mo und Nanophase-Ti6Al4V). Diese Nanophase-Metalle zeichnen sich durch besonders kleine Partikelgrößen aus, die nur noch einen Durchmesser von etwa 100 nm aufweisen. Sie unterscheiden sich von den herkömmlichen Metalllegierungen somit nur hinsichtlich ihrer Rauigkeit nicht jedoch in ihrer Chemie und Zusammensetzung. Die Rauigkeitswerte der Nanophase-Metalle waren im Vergleich zu den konventionellen Metallen um den Faktor 2-3 höher. Der beobachtete Anstieg der Osteoblastenadhesion lässt sich mit diesen höheren Rauigkeitswerten erklären und mit der Annahme, dass die modifizierten Metalle an ihrer Oberfläche einen höheren Anteil an Bindungen zwischen den Metallatomen aufweisen an welche die Osteoblasten bevorzugt binden [Webster *et al.*, 2004].

Betrachtet man nun die Studien, die sich mit der Adsorption und Adhesion von Proteinen, Bakterien, Pilzen oder Zellen auf verschiedenen klinisch relevanten Materialien und Werkstoffen beschäftigt haben in ihrer Gesamtheit, lässt sich festhalten, dass es verschiedene Ansätze gibt, die versuchen eine Erklärung für das jeweilige Adsorptionsverhalten zu geben. Die in meiner Arbeit gefundenen Ergebnisse der Proteinadsorption auf unterschiedlichen Biomaterialien lassen auf einen sehr komplexen Vorgang schließen, der nur mit den Parametern des Netzwikels gegen Wasser und der Oberflächenrauigkeit nicht vollständig zu erklären ist. Neben diesen Parametern spielen bestimmt auch funktionelle chemische Gruppen, die hydrophobe oder hydrophile Oberflächen erzeugen, sowie Lösungsmittel, pH-Wert, Ionen und Ionestärke eine entscheidende Rolle. All diese Einflüsse sind in der Lage die Adsorption unterschiedlicher Proteine quantitativ und selektiv zu verändern.

6. Zusammenfassung

Die Adhäsion von Bakterien und Zellen auf der Oberfläche von Biomaterialien ist ein Faktor, der den klinischen Erfolg oder Misserfolg dieser Werkstoffe mitbestimmt. Die Oberflächen der in den Organismus eingebrachten Werkstoffe adsorbieren zunächst Proteine aus dem umgebenen Milieu, die nun ihrerseits das Maß der Adhäsion von Bakterien und Zellen modifizieren können. Rauigkeit und Hydrophobizität von Werkstoffoberflächen werden in der Literatur als modifizierende Parameter der Proteinadsorption diskutiert.

Ziel dieser Arbeit war es, die Adsorption von humanem Serumalbumin (HSA) als Modellprotein für Serumproteine und der Proteine des Gesamtspeichels auf klinisch relevanten Biomaterialien zu untersuchen. Außerdem wurde die Menge der adsorbierten Proteine auf die Hydrophobizität der Materialoberflächen bezogen.

Als Materialien wurden die Metalllegierungen Ti6Al4V und Co28Cr6Mo, die Kunststoffe Polytetrafluorethylen, Polyethylen, Polymethylmethacrylat (PMMA), Tetric Evo Ceram, Filtek Siloran und Silikon sowie der Glasionomerzement (Ketac Molar) verwendet. Die Prüfkörper der Werkstoffe hatten einen Durchmesser von 11,3 mm, eine Wandstärke von 2 mm und waren 2 mm hoch. Als Maß der Hydrophobizität der Oberflächen diente die Bestimmung des Netzwinkels gegen Wasser. Als stark hydrophob wurden Polytetrafluorethylen, Silikon und Polyethylen mit Netzwinkeln zwischen 118,5° und 110° eingestuft; Polymethylmethacrylat, Filtek Siloran, Tetric Evo Ceram, Titan und Cobalt-Chrom-Molybdän wurden aufgrund von Netzwinkeln zwischen 73° und 65° als schwach hydrophob bewertet und der Glasionomerzement Ketac Molar hatte mit einem Netzwinkel von 50,5° eine hydrophile Oberfläche.

Die Rauigkeitswerte der manuell und maschinell gefertigten Biomaterialien lagen zwischen $R_a = 0,04 \mu\text{m}$ für das Polymethylmethacrylat und $R_a = 0,53 \mu\text{m}$ für das dentale Komposit Tetric Evo Ceram sowie Polyethylen. Die Unterschiede in der Oberflächenrauigkeit wurden auf die Herstellungsmethoden und die Viskosität der einzelnen Werkstoffe zurückgeführt.

HSA und die Proteine aus Gesamtspeichel auf den kleinen Prüfkörpern wurden über den Nachweis freier Aminogruppen und über eine Biotin-Avidin-gekoppelte Reaktion detektiert. Eichkurven mit HSA und Speichelstandards erlaubten die quantitative

Bestimmung adsorbieter Proteinmengen. Die als stark eingestuften hydrophoben Biomaterialien Polytetrafluorethylen und Polyethylen adsorbierten 37- ($0.185 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) beziehungsweise 12,5-mal so viel Proteine aus dem Gesamtspeichel als HSA. Außerdem adsorbierten Polytetrafluorethylen und Polyethylen deutlich weniger HSA als die weniger hydrophoben Biomaterialien Polymethylmethacrylat, Tetric Evo Ceram, Titan, Cobalt-Chrom-Molybdän und Filtek Siloran. Auch an den Werkstoffen Polymethylmethacrylat, Silikon, Ketac Molar, Titan und Filtek Siloran wurde eine deutlich höhere Speicheladsorption gefunden, wobei hier jedoch die Unterschiede nicht so groß waren wie bei Polytetrafluorethylen und Polyethylen. Nur auf Cobalt-Chrom-Molybdän konnte als einzigm der neun Biomaterialien eine höhere Proteinadsorption von HSA als von Speichel nachgewiesen werden.

Die Korrelatioinsanalysen zwischen der Größe der Netzwinkel und den adsorbierten Proteinmengen auf den unterschiedlichen Materialien zeigten mit HSA für den Bereich hydrophiler Netzwinkel ($55-75^\circ$) relativ große Unterschiede. Im hydrophoben Bereich der Netzwinkel ($100-120^\circ$) hingegen adsorbierten vergleichsweise ähnliche Mengen an HSA. Möglicherweise besteht im hydrophoben Bereich ein spezifischer, im hydrophilen Bereich ein unspezifischer Zusammenhang zwischen Netzwinkel und HSA-Proteinkonzentration. Für die Adsorption von Speichelproteinen erkennt man, anders als für HSA, im Bereich hydrophiler Netzwinkel ($55-75^\circ$) relativ geringe Unterschiede, im hydrophoben Bereich der Netzwinkel ($100-120^\circ$) waren die Unterschiede der adsorbierten Mengen an Speichelproteinen groß. So könnte diese Korrelationsanalyse einen Hinweis darauf geben, dass Speichelproteine eher auf hydrophilen Oberflächen spezifisch adsorbieren. Für den Parameter Oberflächenrauigkeit war mit den hier geprüften Materialien kein Zusammenhang zur Proteinadsorption erkennbar.

Die in der Arbeit gefundenen Ergebnisse der Proteinadsorption auf unterschiedlichen Biomaterialien verweisen somit auf einen sehr komplexen Vorgang, der nur mit den Parametern der Hydrophobizität oder Hydrophilie und der Oberflächenrauigkeit nicht vollständig zu erklären ist. Bestimmt spielen auch die funktionellen chemischen Gruppen selbst, die hydrophobe oder hydrophile Oberflächen erzeugen eine Rolle. Daneben sollten Parameter wie Lösungsmittel, pH-Wert, Ionen und Ionenstärke die Adsorption unterschiedlicher Proteine quantitativ und selektiv verändern können.

7. Literaturverzeichnis

- Adell R, Lekholm U, Branemark PI, Jemt T. Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1990; 5: 347.
- Akins RE, Tuan RS. Measurement of protein in 20 seconds using a microwave BCA assay. *Biotechniques* 1992; 12: 496-499.
- Albrektsson T. Dental implants: a review of clinical approaches. *Aust Prosthodont Soc Bull* 1985; 15: 7-25.
- Al-Hashimi I, Levine MJ. Characterization of in vivo salivary-derived enamel pellicle. *Arch Oral Biol* 1989; 34: 289-295.
- An YH, Friedman RJ. Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *J Microbiol Methods* 1997; 30:141-152.
- An YH, Friedman RJ. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res* 1998; 43: 338-348.
- Anderson JM. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Res* 2001; 31: 81-110.
- Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000; 21: 667-681.
- Anselme K, Bigerelle M. Modelling approach in cell/material interactions studies. *Biomaterials* 2006; 27: 1187-1199.
- Arnebrant T, Barton K, Nylander T. Adsorption of alpha-lactoalbumin and beta lactoglobulin on metal surfaces versus temperature. *J Colloid Interface Sci* 1986; 119: 383-390.
- Arnebrant T, Wahlgren MC in: T.A. Horbett, J.L. Brash (Eds.), *Protein at interfaces 2*, ACS Symposium Series 602, American Chemical Society, Washington, DC, 1995, Chapter 17.
- Ask M, Lausmaa J, Kasemo B. Preparation and surface spectroscopic characterization of oxide-films on Ti6Al4V. *Appl Surf Sci* 1989; 35: 283-301.
- Bacáková L, Filova E, Rypáček F, Svorcík V, Starý V. Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiol Res* 2004; 53: 35-45.
- Bale MD, Mosher DF, Wolfarth L, Sutton RC. Competitive adsorption of fibronectin, fibrinogen, immunoglobulin, albumin and bulk plasma proteins on polystyrene latex. *J Colloid Interface Sci* 1988; 125: 516.
- Baretzky B, Reinsch B, Taffner U, Schneider G, Ruhle Z. *Metallkunde* 1996; 87: 332.
- Baron MH, Revault M, Moinville SS, Abadie J, Quiquempoix H. Chymotrypsin adsorption on montmorillonite: enzymatic activity and kinetic FTIR structural analysis. *J Colloid Interface Sci* 1999; 214: 319-332.
- Barrough A, Lernoux E, Lemaitre J, Rouxhet PG. Adsorption of catalase on hydroxyapatite. *J. Colloid Interface Sci* 1999; 208: 147-152.

- Baty AM, Leavitt PK, Siedlecki CA, Tyler BJ, Suci PA, Marchant RE, Geesey GG. Adsorption of adhesive proteins from the Marine Mussel, *Mytilus edulis*, on polymer films in the hydrated state using angle dependent x-ray photo-electron spectroscopy and atomic force microscopy. *Langmuir* 1997; 13: 5702-5710.
- Bennick A, Chau G, Goodlin R, Abrams S. The role of human salivary acidic proteins in the formation of acquired dental pellicle in vivo and their fate after adsorption to the human enamel surface. *Arch Oral Biol* 1983; 28: 19-27.
- Billsten P, Wahlgren M, Arnebrant T, McGuire J, Elwing H. Structural changes of T4 lysozyme upon adsorption to silica nanoparticles measured by circular dichroism. *J Colloid Interface Sci* 1995; 175: 77-82.
- Boehm AM. Command line Tool for Calculating Theoretical MS Spectra for Given Sequences, *Bioinformatics* 2004; 20: 2889-2891.
- Bollen, C.M., Lambrechts, P. and Quirynen, M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater* 1997; 13: 258-269.
- Bos MA, Shervani Z, Anusiem ACI, Giesbers M, Norde W, Kleijn JM. Influence of the electric potential of the interface on the adsorption of proteins. *Colloids Surface B* 1994; 3: 91-100.
- Bowers KT, Keller JC, Randolph BA, Wick DG, Michaels CM. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1992; 7: 302-10.
- Bradley RM. *Physiologie des Stomatognathen Systems*. Berlin: Ullstein Mosby GmbH & Co. KG, 1996.
- Branemark P, Breine U, Adell R, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intraosseous anchorage of dental prostheses. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1969; 3: 81.
- Branemark PI, Zarb GA, Albrektsson T (Eds.). *Tissue Integrated Prostheses: Osseointegration in Clinical Practice*, Quintessence, Chicago, 1985.
- Budzikiewicz H, Schäfer M. *Massenspektrometrie- Eine Einführung*. Wiley-VCH, Weinheim 2005.
- Buergers R, Schneider-Brachert W, Hahnel S, Rosentritt M, Handel G. Streptococcal adhesion to novel low-shrink silorane-based restorative. *Dent Mater* 2009; 25: 269-275.
- Buergers R, Hahnel S, Reichert TE, Rosentritt M, Behr M, Gerlach T, Handel G, Gosau M. Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. *Acta Biomater* 2010; 6: 2307-2313/ Epub 2009 Nov 16.
- Buergers R, Gerlach T, Hahnel S, Schwarz F, Handel G, Gosau M. In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clin Oral Impl Res* 2010; 21: 156-164.

Bumgardner JD, Wiser R, Elder SH, Jouett R, Yang Y, Ong JL. Contact angle, protein adsorption and osteoblast precursor cell attachment to chitosan coatings bonded to titanium. *J Biomater Sci PolymEd* 2003; 14: 1401-1409.

Cacciafesta P, Humphris ADL, Jandt KD, Miles MJ. Human plasma fibrinogen adsorption on ultraflat titanium oxide surfaces studied with atomic Force microscopy. *Langmuir* 2000; 16: 8167-8175.

Cacciafesta P, Hallam KR, Watkinson AC, Allen GC, Miles MJ, Jandt KD. Visualisation of human plasma fibrinogen adsorbed on titanium implant surfaces with different roughness. *Surf Sci* 2001; 491: 405-420.

Cai KY, Bossert J, Jandt KD. Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation? *Colloids Surface B-Biointerfaces* 2006; 49: 136-144.

Carlén A, Borjesson AC, Nikdel K, Olsson J. Composition of pellicles formed in vivo on tooth surfaces in different parts of the dentition, and in vitro on hydroxyapatite. *Caries Res* 1998; 32: 447-455.

Carlén A, Rüdiger SG, Loggner I, Olsson J. Bacteria-binding plasma proteins in pellicles formed on hydroxyapatite in vitro and on teeth in vivo. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 203-207.

Carlén A, Nidkær K, Wennerberg A, Holmberg K, Olsson J. Surface characteristics and in vitro biofilm formation on glass ionomer and composite resin. *Biomaterials* 2001; 22: 481-487.

Carter DC, He XM, Munson SH, Twigg PD, Gernert KM, Broom MB, Miller TY. Three-dimensional structure of human serum albumin. *Science* 1989; 244: 1195-1198.

Carter DC, He XM. Structure of human serum albumin. *Science* 1990; 249: 302-303.

Carter DC, Ho JX. Structure of serum albumin. *Adv. Protein Chem* 1994; 45: 153-203.

Castagnola M, Cabras T, Inzitari R, Zuppi C, Rossetti DV, Petruzzelli R, Vitali A, Loy F, Conti G, Fadda MB. Determination of the post-translational modifications of salivary acidic proline-rich proteins. *Euro J Morphol* 2003; 41: 93-98.

Castner DG, Ratner BD. Biomedical surface science: Foundations to frontiers. *Surface Sci* 2002; 500: 28-60.

Castner DG, Belu AM, Graham DJ. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry: techniques and applications for the characterization of biomaterial surfaces. *Biomaterials* 2003; 24: 3635-3653.

Chen X, Davies MC, Roberts CJ, Tendler SJB, Williams PM, Davies J, Dawkes AC, Edwards JC. Recognition of protein adsorption onto polymer surfaces by scanning force microscopy and probe-surface adhesion measurements with protein coated probes. *Langmuir* 1997; 13: 4106-4111.

Chinn JA, Posso SE, Horbett TA, Ratner BD. Postadsorptive transitions in fibrinogen adsorbed to polyurethanes: changes in antibody binding and sodium dodecylsulfate elutability. *J Biom Mater Res* 1992; 26: 757-778.

Chittur KK. FTIR/ATR for protein adsorption to biomaterial surfaces. *Biomaterials* 1998; 19: 357-369.

Cohen RE, Levine MJ. Salivary glycoproteins. In: Tenovuo JO (Hrsg.). *Human saliva: clinical chemistry and microbiology* 1989; Band 1: (Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.) 101-130.

Cornelius RM, Wojciechowski PW, Brash JL. Measurement of protein adsorption kinetics by an in situ, real-time, solution depletion technique. *J Colloid Interface Sci* 1992; 150: 121-133.

Curtis ASG and Forrester JV. The competitive effects of serum proteins on cell adhesion. *J Cell Sci* 1984; 71: 1-15.

De Jong HP, de Boer P, Busscher HJ, Pelt AW, Arends J. Surface free energy changes of human enamel during pellicle formation- an in vivo study. *Caries Res* 1984; 18: 408-415.

Deligianni DD, Katsala N, Ladas S, Sotiropoulou D, Amedee J, Missirlis YF. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials*. 2001; 22: 1241-1251.

Dent AH, Aslam M. Other categories of protein coupling in: Aslam M, Dent AH, editors. *Bioconjugation, protein coupling techniques for the biomedical sciences*. London: Macmillan 1998; 504-569.

de Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials* 2004; 25: 403-413.

DeRose JA, Revel JP. Studying the surface of soft materials (live cells) at high resolution by scanning probe microscopy: challenges faced. *Thin Solid Films* 1998; 331: 194-202.

Dorner S. Dissertation: Quantifizierung der Speichelproteinadsorption an zahnärztlichen Werkstoffoberflächen. 2005, Universität Regensburg.

Dupont-Gillain ChC, Fauroux CMJ, Gardner DCJ, Leggett GJ. Use of AFM to probe the adsorption strength and time-dependent changes of albumin on self-assembled monolayers. Wiley Periodicals, Inc 2003.

Dufrêne YF, Marchal TG, Rouxhet PG. Probing the organization of adsorbed protein layers: complementarity of atomic force microscopy, X-ray photoelectron spectroscopy and radiolabeling. *Applied Surface Science* 1999;144-145, 638-643.

Eckert R, Jeney S, Hörber JK. Understanding intercellular interactions and cell adhesion: lessons from studies on protein-metal interactions. *Cell Biol Int* 1997; 21: 707-713.

Edgar M. Saliva: its secretion, composition and functions. *British Dental Journal* 1992; 172: 305-312.

Edgerton M, Levine MJ. Biocompatibility: its future in prosthodontic research. *J Prosthet Dent* 1993; 69: 406-415.

Eibl RH, Moy VT. Atomic force microscopy measurements of protein-ligands and receptors. *Science* 1994; 266: 257-259.

- Eichner K, Kappert HF. Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung, Hüthig Verlag, Heidelberg, 1996.
- Eichner K, Kappert HF. Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung; Band 1: Grundlagen und Verarbeitung; 7. Auflage. Georg Thieme Verlag, 2000.
- Elias HG. Makromoleküle. Struktur, Synthese, Eigenschaften. 5.Auflage Hüthig & Wepf, Basel, 1990.
- Elter, C, Heuer, W, Demling A, Hannig M, Heidenblut T, Bach FW and Stiesch-Scholz M. Supra- and subgingival biofilm formation on implant abutments with different surface characteristics. *Int J Oral Maxillofacial Impl* 2008; 23: 327-334.
- Embery G, Heany TG, Stanbury JB. Studies on the organic polyanionic constituents of human acquired pellicle. *Arch Oral Biol* 1986; 31: 623-625.
- 3M ESPE. Informationsbroschüre über Filtek Siloran, 2006.
- 3M ESPE: Der klinische Umgang mit Filtek Siloran/Klinische Fälle, 2007.
- Eppel SJ, Simmons SR, Albrecht RM, Marchant RE. Cell-surface receptors and proteins on platelet membranes imaged by scanning force microscopy using immunogold contrast enhancement. *Biophys J* 1995; 68: 671-680.
- Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U and Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *Euro J Oral Sci* 1998; 106: 527-551.
- Florin EL, Moy VT, Gaub HE. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science* 1994; 264: 415-417.
- Fogh-Andersen N. Albumin/calcium association at different pH, as determined by potentiometry. *Clin Chem* 1977; 23: 2122-2126.
- Forsten L. Fluoride release and uptake by glass-ionomers and related materials and its clinical effect. *Biomaterials* 1998; 19: 503-508.
- Foster J. Plasma albumin, the plasma proteins, Vol. I. Isolation, characterization and function, Academic, New York, USA, 1960, pp 179-239.
- Foster MD, Choi EJ. Surfactant displacement of human serum albumin adsorbed on loosely packed self-assembled monolayers: cetyltrimethylammonium bromide versus sodium dodecyl sulfate. *J Colloid Interface Sci* 2003; 261: 273-282.
- Frandsen EV, Pedrazzoli V and Kilian M. Ecology of viridans streptococci in the oral cavity and pharynx. *Oral Microbiol Immunol* 1991; 6: 129-133.
- Frautschi JR, Munro MS, Lloyd DR, Eberhart RC. Alkyl derivatized cellulose acetate membranes with enhanced albumin affinity, *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1983; 24: 242.
- Fritz M, Radmacher M, Cleveland JP, Allersma MW, Stewart RJ, Gieselmann R, Janmey P, Schmidt CF, Hansma PK. Imaging globular and filamentous proteins in physiological buffer solutions with tapping mode atomic force microscopy. *Langmuir* 1995; 11: 3529-3535.

- Gendreau RM, Leininger RI, Winters S, Jakobsen RJ. Fourier-transform infrared spectroscopy for protein-surface studies. *Advances in chemistry Series* 1982; 199: 371-394.
- Giacomelli CE and Norde W. The adsorption-desorption cycle: Reversibility of the BSA-silica system. *J Colloid Interface Sci* 2001; 233: 234.
- Giacomelli CE, Esplandiu MJ, Ortiz PI, Avena MJ, De Pauli CP. Ellipsometric study of bovine serum albumin adsorbed onto Ti/TiO₂-electrode. *J Colloid Interface Sci* 1999; 218: 404-411.
- Giessibl FJ, Hembacher S, Bielefeldt H, Mannhardt J. Subatomic features on the silicon surface observed by atomic force microscopy. *Science* 2000; 289: 422-425.
- Giessibl FJ. Advances in atomic force microscopy. *Reviews of Modern Physics* 2003; 75: 949-983.
- Gispert MP, Serro AP, Colaco R, Saramago B. Friction and wear mechanisms in hip prosthesis: Comparison of joint materials behaviour in several lubricants. *Wear* 2006; 260: 149-158.
- Glantz PO, Arnerbrant T, Nylander T, Baier RE. Bioadhesion-a phenomenon with multiple dimensions. *Acta Odontol Scand* 1999; 57: 238-241.
- Gottenbos B, van der Mei H, Busscher H. Models for studying initial adhesion and surface growth in biofilm formation on surfaces. *Method Enzymol* 1999; 310: 523-534.
- Griesser HJ, McLean KM, McArthur SL, Chatelier RC, Kingshott P. Hybrid Biomaterials: Surface-MALDI mass spectrometry analysis of covalent binding versus physisorption of proteins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2000; 17: 23-35.
- Gristina AG, Naylor P, Myrvik Q. Infections from biomaterials and implants: a race for the surface. *Med Prog Technol* 1988; 14: 205-224.
- Guggenberger R, Weinmann W. Exploring beyond methacrylates. *Am J Dent* 2000; 13: 82D-84D.
- Guggenberger R, Weinmann W, Kappler O, Fundingsland J, Thalacker C. Historical evolution of volumetric polymerization shrinkage of restorative composites. *J Dent Res* 2007; Abstr. # 403.
- Gunning AP, Mackie AR, Wilde PJ, Morris V. *Langmuir* 1999; 15: 4636-4640.
- Haggerty L, Watson BA, Barreau MA, Lenhoff AM. Ordered arrays of proteins on graphite observed by scanning tunneling microscopy. *J Vac Technol B* 1991; 9: 1219-1222.
- Hallab NJ, Bundy KJ, O'Connor K, Clark R, Moses RL. Cell adhesion to biomaterials: Correlations between surface charge, surface roughness, adsorbed protein and cell morphology. *J Long Term Eff Med Implants* 1995; 5: 209.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, and Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 95-108.

- Hannig M. Transmission electron microscopi of early plaque formation on dental materials in vivo. *Euro J Oral Sci* 1999; 107: 55-64.
- Hannig M. Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h-period. *Clin Oral Investig* 1999; 3: 88-95.
- Hannig C, Hoch J, Becker K, Hannig M, Attin T. Lysozyme activity in the initially formed in situ pellicle. *Arch Oral Biol* 2005; 50: 821-828.
- Hannig C, Hannig M, Attin T. Enzymes in the acquired enamel pellicle. *Euro J Oral Sci* 2005; 113: 2-13.
- Hannig M, Joiner A. The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci* 2006; 19: 29-64.
- Hannig C, Huber K, Lambrechts I, Gräser J, D'Haen J, Hannig M. Detection of salivary Alpha-amylase and lysozyme exposed on the pellicle formed in situ on different materials. *J Biomed Mater Res A* 2007; 83: 98-103.
- Hannig M, Hannig C. Der initiale orale Biofilm- pathogen oder protektiv? *Oralprophylaxe & Kinderzahnheilkunde* 2007; 29.
- Hannig M, Hannig C. The oral cavity- a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Invest* 2009; 13: 123-139.
- Hao L, Lawrence J. The adsorption of human serum albumin on CO₂ laser modified magnesia partially stabilised zirconia (MgO-PSZ). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2004; 34: 87-94.
- Hardt M, Thomas LR, Dixon SE, Newport G, Agabian N, Prakobphol A, Hall SC, Witkowska HE and Fisher SJ. Toward defining the human parotid gland salivary proteome and peptidome: identification and characterization using 2D SDS-PAGE, ultrafiltration, HPLC and mass spectrometry. *Biochemistry* 2005; 44: 2885-2899.
- Hay DI. The adsorption of salivary proteins by hydroxyapatite and enamel. *Arch Oral Biol* 1967; 2: 937-946.
- Hay DI. The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite. *Arch Oral Biol* 1967; 12: 937-946.
- Hellwig E, Klimek J, Attin T. *Einführung in die Zahnerhaltung*. 1. Auflage Urban & Schwarzenberg, München-Wien –Baltimore, 1995.
- Hellwig E, Klimek J, Attin T. *Einführung in die Zahnerhaltung*. 3. Auflage Urban & Schwarzenberg, 2003.
- Hellwig E, Klimek J, Attin T. *Einführung in die Zahnerhaltung*. 4. Auflage Urban & Fischer Verlag, 2006; S.161 and 201-202.
- Helmerhorst EJ, Alagl A, Siqueira WL ,Oppenheim FG. Oral Fluid Proteolytic Effects on Histatin 5 Structure and Function. *Arch Oral Biol* 2006; 51: 1061-1070.
- Ho CH, Britt DW, Hhlady V. Human low density lipoprotein and human serum albumin adsorption onto model surfaces studied by total internal reflection fluorescence and scanning force microscopy. *J Mol Recognit* 1996; 9: 444-455.

- Hoyle B, Jass J, Costerton J. The biofilm glycocalyx as a resistance factor. *J Antimicrob Chemother* 1990; 26: 1-5.
- Hoffmann M, Krämer H, Kuhn R. Kunststoffe in der Zahnmedizin 1979; 13: 142/146.
- Horbett TA. Principles underlying the role of adsorbed plasmaproteins in blood interactions with foreign materials. *Cardiovascular Pathology* 1993; 2: S137-148.
- <http://de.wikipedia.org>; Beuth-Verlag, Berlin DIN 4760.
- Huebschmann HJ. Handbook of GC/MS, Fundamentals and Applications, 2.rev.Ed. Wiley-VCH Verlagsgesellschaft GmbH, Weinheim; ISBN 978-3-527-31427-0; 2008.
- Imai Y, Tamaki Y. Measurement of adsorption of salivary proteins onto soft denture lining materials. *J Prosthet Dent* 1999; 82: 348-51.
- Iontcheva I, Oppenheim FG, Troxler RF. Humansalivarymucin MG1 selectively forms heterotypic complexes with amylase, prolin-rich proteins, statherin, and histatins. *J Dent Res* 1997; 76: 734-743.
- Israelachvili J, Wennerstrom H. Role of hydration and water structure in biological and colloid interactions. *Nature* 1996; 379: 219-225.
- Itho H, Nagata A, Toyomasu T, Sakiyama T, Nagai T, Saeki T, Nakanishi K. Adsorption of beta-lactoglobulin onto the surface of stainless steel particles. *Biosci Biotech Biochem* 1995; 59: 1648-1651.
- Ivoclar Vivadent: Wissenschaftliche Arbeit über das Komposit Tetric Evo Ceram 2006,S.5/S.8.
- Iwata Y, Uchiyama S, Kurita K, Morimoto N, Nakabayashi N. A nonthrombogenic gas-permeable membrane composed of a phospholipid polymer skin film adhered to a polyethylene porous membrane. *Biomaterials* 2002; 23: 3421-3427.
- Iwata H, Arima Y. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials* 2007; 28: 3074-3082.
- Jain R, von Recum AF. Effect of titanium surface texture on the cell-biomaterial interface. *J Invest Surg* 2003; 16: 263-273.
- Jandt KD. Developments and perspectives of scanning probe microscopy (SPM) on organic materials systems. *Mat Sci Eng R* 1998; R21, 5-6: 221-295.
- Jandt KD. Atomic force microscopy of biomaterials surfaces and interfaces. *Surf Sci* 2001; 491: 303-332.
- Jandt KD, McMaster TJ, Miles MJ, Petermann J. Scanning force microscopy of melt-crystallized, metal-evaporated poly(butene-1) ultrathin films. *Macromolecules* 1993; 26: 6552-56.
- Jayaraman M, Meyer U, Buhner M, Joos U, Wiesmann HP. Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials* 2004; 25: 625-631.

- Jensen JL, Lamkin MS, Oppenheim FG. Adsorption of human salivary proteins to hydroxyapatite: a comparison between whole saliva and glandular salivary secretions. *J Dent Res* 1992; 71: 1569-1576.
- Jespersen S, Niessen WMA, Tjaden UR, van der Greef J, Litborn E, Lindberg U, Roeraade. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1994; 8: 581.
- Jeyachandran YL, Mielczarski E, Rai B, Mielczarski JA. Quantitative and Qualitative Evaluation of Adsorption/Desorption of Bovine Serum Albumin on Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces. *Langmuir* 2009; 25: 11614-11620.
- Johnsson M, Levine MJ, Nancollas GH. Hydroxyapatite binding domains of salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4: 371-378.
- Jungermann K, Möhler H. *Biochemie*; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1989; 132.
- Käs C. Dissertation: Quantifizierung der Adhäsion von *Streptococcus gordonii* DL1 an zahnärztlichen Werkstoffoberflächen. 2004, Universität Regensburg.
- Kalltorp M, Carlén A, Thomsen P, Olsson J, Tengvall P. Analysis of rat plasma proteins desorbed from gold and methyl- and hydroxyl-terminated alkane thiols on gold surfaces. *J Mater Sci: Mater Med* 2000; 11: 191-199.
- Kamath KR, DeMeo D, Park K. Albumin grafting on polymer surfaces by gamma irradiation, *Polymer Preprints* 1993; 34: 106-107.
- Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10.000 daltons. *Anal Chem* 1988; 60: 2299-2301.
- Kasemo B, Lausmaa J. Biomaterial and implant surfaces: on the role of cleanliness, contamination and preparation procedures. *J Biomed Mater Res* 1988; 22: 145-158.
- Kettenbach Dental. Produktinformation über Mucopren soft; 2006.
- Kidoaki S, Matsuda T. Adhesion forces of the blood plasma proteins on self-assembled monolayer surfaces of alkanethiolates with different functional groups measured by an atomic force microscope. *Langmuir* 1999; 15: 7639-7646.
- Kidoaki S, Matsuda T. Mechanistic aspects of protein/material interactions probed by atomic force microscopy. *Colloids Surfaces B- Biointerfaces* 2002; 23: 152-163.
- Kipaldi DV, Lemons JE, Liu J, Raikar GN, Weimer JJ, Vohra Y. Cleaning and heat-treatment effects on unalloyed titanium implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Impl* 2000; 15: 219-230.
- Klinger A, Steinberg D, Kohavi D, Sela MN.: Mechanism of adsorption of human albumin to titanium in vitro. John Wiley & Sons Inc, 1997.
- Klinov DV, Lagutina IV, Prokorov VV, Neretina T, Khil PP, Lebedev YB, Chereny DI, Demin VV, Sverdlov ED. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 4603.

- Kousvelari EE, Baratz RS, Burke B, Oppenheim FG. Immunochemical identification and determination of prolin-rich-rich proteins in salivary secretions, enamel pellicle, and glandular tissue specimens. *J Dent Res* 1980; 59: 1430-1438.
- Kraus FW, Orstavik D, Hurst DC, Cook CH. The acquired pellicle: variability and subject-dependence of specific proteins. *J Oral Pathol* 1973; 2: 165-173.
- Krisdhasima V, Mc Guire J, Sproull R. Surface hydrophobic influence on beta-lactoglobulin adsorption kinetics. *J Colloid Interface Sci* 1992; 154: 337-350.
- Kuboki Y, Teraoka K, Okada S. X-ray photoelectron spectroscopic studies of the adsorption of salivary constituents on enamel. *J Dent Res* 1987; 66: 1016-1019.
- Kullmann W. *Atlas der Zahnerhaltung mit Gls-Ionomer-Zementen und Komposit-Kunstoffen*. Hanser (München), 1989.
- Lawson AM. *Mass Spectrometry-Clinical Biochemistry-Principles/Methods/Applications*, Walter de Gruyter and Co., Berlin/New York, 1989.
- Lausmaa J, Mattson L, Rolander U, Kasemo B. Chemical composition and morphology of titanium surface oxides. *Mater Res Soc Symp Proc* 1986; 55: 351-359.
- Lampin M, Warocquier-Clerout R, Legris C, Degrange M, Sigot-Luizard MF. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion and cell migration. *J Biomed Mater Res* 1997; 36: 99.
- Lamkin MS, Migliari D, Yao Y, Troxler RF, Oppenheim FG. New in vitro model for the acquired enamel pellicle: pellicles formed from whole saliva show inter-subject consistency in protein composition and proteolytic fragmentation patterns. *J Dent Res* 2001; 80: 385-388.
- Leggett GJ, Dupont-Gillain ChC, Fauroux CMJ, Gardner DCJ. Use of AFM to probe the adsorption strength and time-dependent changes of albumin on self-assembled monolayers. Wiley Periodicals Inc, 2003.
- Lee GU, Kidwell DA, Colton RJ. Sensing discrete Streptavidin-Biotin interactions With atomic force microscopy. *Langmuir* 1994; 10: 354-357.
- Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG. Saliva and dental pellicle- a review. *Adv Dent Res* 2000; 14: 22-28.
- Li J, Helmerhorst EJ, Corley RB, Luus LE, Troxler RF, Oppenheim FG. Characterization of the immunologic responses to human *in vivo* acquired pellicle as a novel means to investigate its composition. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 183-191.
- Li J, Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim FG. Identification of *in vivo* Pellicle constituents by analysis of serum immune responses. *J Dent Res* 2004; 83: 60-64.
- Li J, Helmerhorst EJ, Yao Y, Nunn ME. Statherin is *an vivo* pellicle constituent: identification and immuno-quantification. *Arch Oral Biol* 2004; 49: 379-385.

Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, Socransky SS and Oppenheim FG. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol* 2004; 97: 1311-1318.

Liedberg B, Ivarsson B, Lundstrom I. Fourier transform infrared reflection absorption spectroscopy (FT-IRAS) of fibrinogen adsorbed on metal and metal oxide surfaces. *J Biochem Biophys Meth* 1984; 9: 233-243.

Lima EM, Koo H, Vacca-Smith AM, Rosalen PL, Del-Bel-Cury AA. Adsorption of salivary and serum proteins and bacterial adherence on titanium and circonda ceramic surfaces. *Clin Oral Implants Res* 2008; 19: 780-785.

Lindh L. On the adsorption behaviour of saliva and purified salivary proteins at solid/liquid interfaces. *Swed Dent J* 2002; 152: 1-57.

Listgarten M. The structure of dental plaque. *Periodontol 2000* 1994; 5: 52-65.

Liu F, Zhou M, Zhang F. ¹²⁵I Labelling of Human Serum Albumin and Fibrinogen and a Study of Protein Adsorption Properties on the Surface of Titanium Oxide Film. *Appl Radiat Isot*, 1998; 49: 1-2, 67-72.

Lossdorfer S, Schwartz Z, Wang L, Lohmann CH, Turner JD, Wieland M, Cochran DL, Boyan BD. Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity. *J Biomedic Mat Res A* 2004; 70: 361-369.

Lussi A, Jaeggi T, Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res* 2004; 38: 34-44.

Lyman DJ, Knutson K, McNeill B, Shibatani K. Effects of chemical structure and surface properties of synthetic polymers on the coagulation of blood. Relation between polymer morphology and protein adsorption. *Transactions of the American Society of Artificial Internal Organs* 1975; 21: 49.

MacDonald DE, Deo N, Markovic B, Stranick M, Somasundran P. Adsorption and dissolution behavior of human plasma fibronectin on thermally and chemically modified titanium oxide particles. *Biomaterials* 2002; 23: 1269.

Mandel ID. The functions of saliva. *J Dent Res* 1965; 66: 623-637.

Malmsten M. Ellipsometry studies of fibronectin adsorption. *Colloids Surf, B* 1995; 3: 371-381.

Malmsten M. Ellipsometry studies of the effects of surface hydrophobicity on protein adsorption. *Colloids Surf, B* 1995; 3: 297-308.

Marchant RE, Barb MD, Shainoff JR, Eppel SJ, Wilson DL, Siedlecki CA. Three dimensional Structure of human fibrinogen under aqueous conditions visualized by atomic force Microscopy. *Thromb Haemost* 1997; 77: 1048-1051.

Marsh P, Breadshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *J Induct Micro* 1995; 15: 169-175.

Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res* 1995; 29: 389-401.

- Martins MCL, Fonseca C, Barbosa MA, Ratner BD. Albumin adsorption on alkanethiols self-assembled monolayers on gold electrodes studied by chronopotentiometry. *Biomaterials* 2003; 24: 3697-3706.
- Martins MC, Ratner BD, Barbosa MA. Protein adsorption on mixtures of hydroxyl- and methyl-terminated alkanethiols self-assembled monolayers. *J Biomed Mater Res* 2003; 67: 158-171.
- Marxkors R, Meiners H. Taschenbuch der zahnärztlichen Werkstoffkunde. 5. überarbeitete und ergänzte Auflage, 2005.
- McDermott MT, Ta TC. Mapping Interfacial Chemistry Induced Variations in Protein Adsorption with Scanning Force Microscopy. *Anal Chem* 2000; 72: 2627-2634.
- McDonald DE, Markovic B, Allen M, Somasundaran P, Boskey AL. Surface analysis of human plasma fibronectin adsorbed to commercially pure titanium materials. *J Biomed Mater Res* 1998; 41: 120-30.
- McLafferty FW und Turecek F. Interpretation von Massenspektren, 4.Ed., Spektrum Akademischer Verlag GmbH (Heidelberg), 1995.
- Messana I, Loffredo F, Inzitari R, Cabras T, Giardina B, Onnis G, Piludu M, Castagnola M. The coupling of RP-HPLC and ESI-MS in the study of small Peptides and proteins secreted in vitro by human salivary glands that are soluble in acidic solution. *Euro J Morph* 2003; 41:103-106.
- Michaels CM, Keller JC, Stanford CM, Solursh M. In vitro cell attachment of osteoblast-like cells to titanium. *J Dent Res* 1989; 68 (special issue): 278-86.
- Montdargent B, Letourneur D. Toward new biomaterials. *Infection Control Hosp Epidemiol* 2000; 21: 404-410.
- Moreno EC, Kresak M, Hay DI. Adsorption thermodynamics of acidic prolin-rich human salivary proteins onto calcium apatites. *J Biol Chem* 1982; 257: 2981-2989.
- Moy VT, Florin EL, Gaub HE. Adhesion forces between individual ligand receptor pairs *Science* 1994; 266: 257-259.
- Mrksich M, Whitesides GM. Using self-assembled monolayers to understand the interactions of man made surfaces with proteins and cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1996; 25: 55-78.
- Nakanishi K, Sakiyama T, Imamura K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *J Biosci Bioeng* 2001; 91: 233-244.
- Nicholson JW. Chemistry of glass-ionomer cements: a review. *Biomaterials* 1998; 19: 485-494.
- Noh H, Vogler EA. Volumetric interpretation of protein adsorption: mass and energy balance for albumin adsorption to particulate adsorbents with incrementally increasing hydrophilicity. *Biomaterials* 2006; 27: 5801-5812.
- Norde W, Anusiem CI. Adsorption, desorption and re-adsorption of proteins on solid surfaces. *Colloids Surf* 1992; 66: 73-80.
- Norde W, Giacomelli CE. BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states. *J Biotechnol* 2000; 79: 259-268.

- Norde W, Giacomelli CE. Conformational changes in proteins at interfaces: From solution to the interface and back. *Macromol Symp* 1999; 145: 125.
- Norde W. My voyage of discovery to proteins on flatland...and beyond. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2008; 61: 1-9.
- O'Brien WJ, Ryge G. An outline of dental materials. Saunders, Philadelphia, London, Toronto, 1978.
- Ofoli R, Sachin S. Vaidya. Adsorption and interaction of fibronectin and human serum albumin at the liquid-liquid interface. *Langmuir* 2005; 21: 5852-5858.
- Okabe N, Hokaze M. Effect of divalent metal ions on the binding of thyroxine to bovine serum albumin as measured by fluorescence. *Biol Pharm Bull* 1993; 16: 719-721.
- Orisaka T, Minobe, Uchihashi T, Sugawara Y, Morita S. The atomic resolution imaging of Metallic Ag (111) surface by noncontact atomic force microscopy. *Appl Surf Sci* 1999; 140: 243-246.
- Ostuni E, Chapman RG, Holmlin RE, Takayama S, Whitesides GM. A survey of structure property relationships of surfaces that resist the adsorption of protein. *Langmuir* 2001; 17: 5605-5620.
- Ostuni E, Chapman RG, Liang MN, Meluleni G, Pier G, Ingberg DE, Whitesides GM. Self-assembled monolayers that resist the adsorption of proteins and the adhesion of bacterial and mammalian cells. *Langmuir* 2001; 17: 6336-6343.
- Palin WM, Fleming GJ, Nathwani H, Burke FJ, Randall RC. In vitro cuspal deflection and microleakage of maxillary premolars restored with novel low-shrink dental composites. *Dent Mater* 2005; 21: 324-325.
- Parkinson B. Procedures in Scanning Probe Microscopies. John Wiley and Sons Ltd, 1997.
- Paulsson M, Kober M, Freij-Larsson C, Stollenwerk M, Wesslen B, Ljungh A. Adhesion of staphylococci to chemically modified and native polymers, and the influence of preadsorbed fibronectin, vitronectin and fibrinogen. *Biomaterials* 1993; 14: 845-853.
- Pedersen KO. Binding of calcium to serum albumin. Effect of pH via competitive hydrogen and calcium ion binding to the imidazole groups of albumin. *Scand. J Clin Lab Invest* 1972; 29: 75-83.
- Peters T. All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications. San Diego, Academic Press, 1995.
- Pierce M, Stuart J, Pungor A, Dryden P, Hlady V. Adhesion force measurement using an atomic force microscope upgraded with a linear position sensitive detector. *Langmuir* 1994; 10: 3217-3221.
- Platé NA, Matrosovich MN. Affinity chromatography of serum albumin on synthetic polymeric adsorbents. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 1976; 229: 496-499.
- Pradier CM, Costa D, Rubio C, Compéré C, Marcus P. Role of salts on BSA adsorption on stainless steel in aqueous solutions. FT-IRRAS and XPS characterization. *Surf Interface Anal* 2002; 34: 50-54.

- Prime KL, Whitesides GM. Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces. *Science* 1991; 252: 1164-1167.
- Pringle JH, Fletcher M. Influence of substratum hydration and adsorbed macromolecules on bacterial attachment to surfaces. *Appl Environ Microbiol* 1986; 51: 1321-1325.
- Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, Peters G. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent And recurrent infections. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4: 295-305.
- Putnam FW. *The Plasma Proteins*; Academic Press: New York, 1975; pp 75-125.
- Quinn A, Mantz H, Jacobs K, Bellion M, Santen L. Protein adsorption kinetics In different surface potentials. *Europhysics Lett* 2006; 81: 1-6.
- Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface free-energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 1-14.
- Quirynen M, De SM and Van SD. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clin Oral Impl Res* 2002; 13: 1-19.
- Rapoza RJ, Horbett TA. Changes in the SDS elutability of fibrinogen adsorbed from plasma to polymers. *J Biomater Sci Polym Ed* 1989; 1: 69-80.
- Rasmusson JR, Erlandsson R, Salaneck WR, Schott M, Clark DT, Lundstrom I, Brash JL, Hansman HG. Adsorption of fibrinogen on thin oriented poly(tetrafluoroethylene) [PTFE] fibres studied by scanning force microscopy Scanning Microsc 1994; 8: 481-490.
- Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JL. *Biomaterials science- an introduction to materials in medicine*. San Diego, CA, USA: Academic Press, 1996.
- Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. *Biomaterials Science- An Introduction to Materials in Medicine* 2nd Edition, 2004.
- Ratner BD, Bryant SJ. Biomaterials: Where we have been and where we are going. *Annu Rev Biomed Eng* 2004; 6: 41-75.
- Roach P, Farrar D, Perry CC. Interpretation of protein adsorption: surface-induced conformational changes. *J Am Chem Soc* 2005; 127: 8168-8173.
- Rudiger SG, Carlen A, Meurman JH, Kari K, Olsson J. Dental biofilms at healthy and inflamed gingival margins. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 524-530.
- Ruhl S. *Habilitationsschrift: Proteine und Glykoproteine im Speichel: Interaktionen mit der oralen mikrobiellen Flora und mögliche klinische Bedeutung*. 1999, Universität Regensburg.
- Ruhl S, Müller R, Gröger G, Hiller K-A, Schmalz G. Fluorescence-based bacterial overlay method for simultaneous *in situ* quantification of surface-attached bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 2653-2660.
- Ruhl S, Mueller R, Hiller K-A, Schmalz G. Chemiluminescence-based detection and comparison of protein amounts adsorbed on differently modified silica surfaces. *Anal Biochem* 2006; 359: 194-202.

- Ruhl S, Sandberg AL, Cisar JO. Salivary receptors for the prolin-rich protein-binding and lectin-like adhesins of oral actinomycetes and streptococci. *J Dent Res* 2004; 83: 505- 510.
- Rupp F, Scheideler L, Rehbein D, Axmann D, Geis-Gerstorfer J. Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications. *Biomaterials* 2004; 25: 1429-1438.
- Rupp F, Axmann D, Ziegler C, Geis-Gerstorfer J. Adsorption/desorption phenomena on pure and Teflon AF-coated titania surfaces studied by dynamic contact angle analysis. *J Biomed Mater Res* 2002; 62: 567-578.
- Sagvolden G, Giaever I, Feder J. Cell adhesion force microscopy. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 471-476.
- Sakiyama T, Tamino K, Urakawa M, Imamura K, Takahashi T, Nahai T, Nakanishi K. Characteristics of tryptic fragments of bovine beta-lactoglobulin on a stainless steel surface. *J Biosci Bioeng* 1999; 88: 536-541.
- Sbordone L and Bortolaia C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Investig* 2003; 7: 181-188.
- Scarano A, Piatelli M, Caputi S, Favero GA and Piattelli A. Bacterial Adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study. *J Perio* 2004; 75: 292-296.
- Schweikl H, Mueller R, Englert C, Hiller K-H, Kujat R, Nerlich M, Schmalz G. Proliferation of osteoblasts and fibroblasts on model surfaces of varying roughness and surface chemistry. *J Mater Sci Mater Med* 2007; 18: 1895-1905.
- Schweikl H, Mueller R, Ruhl S, Hiller K-A, Schmalz G. Adhesion of eukaryotic cells and staphylococcus aureus to silicon model surfaces. *J Biomed Mater Res A* 2008; 84: 817-827.
- Scotchford CA, Gilmore CP, Cooper E, Leggett GJ, Downes S. Protein adsorption and human osteoblast-like cell attachment and growth on alkylthiol on gold self-assembled monolayers. *J Biomed Mater Res* 2002; 59: 84-99.
- Sela MN, Badihi L, Rosen G, Steinberg D, Kohavi D. Adsorption of human plasma proteins to modified titanium surfaces; *Clin Oral Impl Res* 2007; 18: 630-638.
- Senechal A, Carrigan SD, Tabrizian M. Probing surface adhesion forces of Enterococcus faecalis to medial-grade polymers using atomic force Microscopy. *Langmuir* 2004; 20: 4172-4177.
- Serro AP, Fernandes AC, Saramago B, Lima J, Barbosa MA. Apatite deposition on titanium surfaces-the role of albumin adsorption. *Biomaterials* 1997; 18: 963-968.
- Serro AP, Saramago B. Influence of sterilization on the mineralization of titanium implants induced by incubation in various biological model fluids. *Biomaterials* 2003; 24: 4749-4760.
- Serro AP, Gispert MP, Martins MCL, Broqueira P, Colaco R, Saramago B. Adsorption of albumin on prosthetic materials: Implication for tribological behavior. Wiley Periodicals Inc, 2006.

- Serro AP, Fernandes AC, Saramago B, Norde W. Bovine serum albumin adsorption on titania surfaces and its relation to wettability aspects. *J Biomed Mater Res* 1999; 46: 376-81.
- Sethuraman A, Han M, Kane RS, Belfort G. Effect of surface wettability on the adhesion of proteins. *Langmuir* 2004; 20: 7779-7788.
- Sethuraman A, Vedantham G, Imoto T, Przybycien T, Belfort G. Protein unfolding at interfaces: slow dynamics of alpha-helix to beta-sheet Transition. *Proteins Struct Funct Bioinformatics* 2004; 56: 669-678.
- Sebastianov VI. Interrelation of protein adsorption and blood compatibility of biomaterials, in: High Performance Biomaterials, M. Szycher (ed.), Technomics, Lancaster, PA, 1995, pp. 313-341.
- Sheardown H, Cornelius RM, Bradsh JL. Measurement of protein adsorption to metals using radioiodination methods: a caveat. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 1997; 10: 29-33.
- Sigal GB, Mrksich M, Whitesides GM. Effect of surface wettability on the adsorption of proteins and detergents. *J Am Chem Soc* 1998, 120, 3464-3473.
- Siedlecki CA, Xu L-C. Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials* 2007; 28: 3273-3283.
- Silin V, Weetal H, Vanderah D. SPR studies of the nonspecific adsorption kinetics of human IgG and BSA on gold surfaces modified by self-assembled monolayers. *J Colloid Interface Sci* 1997; 185: 94-103.
- Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ, Gygi SP, Oppenheim FG. Identification of Protein Components in vivo Human Acquired Enamel Pellicle Using LC-ESI-MS/MS. *J Proteome Res* 2007; 6: 2152-2160.
- Skjorland KK, Rykke M, Sonju T. Rate of pellicle formation in vivo. *Acta Odontol Scand* 1995; 53: 358-362.
- Smith DC. Development of glass-ionomer cement systems. *Biomaterials* 1998; 19: 467-478.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK , Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analyt Biochem* 1985; 150: 76-85.
- Sonju T, Rolla G. Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth in vivo. Rate of formation and amino acid analysis. *Caries Res* 1973; 7: 30-38.
- Sorensen K. One reagent simultaneously identifies the salt and the protein peaks on desalting column. *BioTechniques* 1992; 12: 235-236.
- Stayton PS, Drobny P, Shaw WJ, Long JR, Gilbert M. Molecular recognition at the protein-hydroxyapatite interface. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 2003; 14: 370-376.
- Steinberg D, Klinger A, Kohavi D, Sela MN. Adsorption of human salivary proteins onto titanium powder. 1: adsorption of human salivary albumin. *Biomaterials* 1995; 16: 1339-1343.

Stigler R, Carlén A, Nagursky H, Hannig M. Composition of the salivary pellicle formed in eight different locations of the dentition. *J Dent Res B* 2003; 217.

Sulzer Medica (heute: Zimmer GmbH). Produktinformation, Sulzer Orthopedics-Materials, 2001; S. 6/9/10.

Ta TC, Sykes MT, McDermott MT. Real-time observation of plasma protein film formation on well-defined surfaces with scanning force microscopy. *Langmuir* 1998; 14: 2435-2442.

Tabak LA, Levine MJ, Mandel ID, Ellison SA. Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. *J Oral Pathol* 1982; 11: 1-17.

Taborelli M, Eng L, Descouts P, Ranieri JP, Bellamkonda R, Aebischer P. J. Bovine serum albumin conformation on methyl and amine functionalized surfaces compared by scanning force microscopy. *Biomed Mater Res* 1995; 29: 707-714.

Taborelli M, Jobin M, Francois P, Vaudaux P, Tonetti M, Szmukler-Moncler S, Simpson JP, Descouts P. Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium. (I) Surface characterization. *Clin Oral Implants Res* 1997; 8: 208-216.

Tengvall P, Lundstrom I. Physico-chemical considerations of titanium as a biomaterial. *Clin Mater* 1992; 9: 115-134.

Tengvall P, Lundstrom I, Liedberg B. Protein adsorption studies on model organic surfaces: an ellipsometric and infrared spectroscopic approach. *Biomaterials* 1998; 19: 407-422.

Textor M, Sittig C, Frauchiger V, Tosatti S, Brunette DM. Properties and biological significance of natural oxide films on titanium and its alloys. In Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P, Editors. *Titanium in medicine*. New York: Springer 2001; pp. 172-230.

Theugels W, van Asche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Impl Res* 2006; 17: 68-81.

Tilton RD, Robertson CR, Gast AP. Lateral diffusion of bovine serum albumin adsorbed at the solid-liquid interface. *J Colloid Interface Sci* 1990; 137: 192-202.

Titushkin IA, Vasin SL, Rozanova IB, Pokidysheva EN, Alekhin AP, Sevastianov VI. Carbon coated polyethylene: effect of surface energetics and topography on human platelet adhesion. *ASAIO-J* 2001; 47: 7-11.

Tsai CC, Dollar ML, Constantinescu A, Kulkarni PV, Eberhart RC. Performance evaluation of hydroxylated and acylated silicone rubber coatings. *Asaio Trans* 1991; 37: 192-193.

Tsai CC, Dollar ML, Huo HH, Kulkarni PV, Eberhart RC. Biocompatible coatings with high albumin affinity. *Asaio Trans* 1990; 36: 307-310.

Tylianakis PE, Kakabakos SE, Evangelatos GP, Ithakissios DS. Direct colorimetric determination of solid-supported functional groups and ligand using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1994; 219: 335-340.

- Uyen HM, Schakenraad JM, Sjollema J, Noordmans J, Jongebloed WL, Stokroos I, Busscher HJ. Amount and surface structure of albumin adsorbed to solid substrata with different wettabilities in a parallel plate flow cell. *J Biomed Mater Res* 1990; 24: 1599-1614.
- Vacca-Smith AM, Bowen WH. In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. *Arch Oral Biol* 2000; 45: 277-291.
- Valagao Amadeu do Serro AP, Fernandes AC, de Norde W. Bovine serum albumin adsorption on titania surfaces and its relation to wettability aspects. *J Biomed Mater Res* 1999; 46: 376-381.
- Van Nieuw Amerongen A, Bolscher JG, Veerman EC. Salivary proteins: protective and Diagnostic value in cariology. *Caries Res* 2004; 38: 247-253.
- van Oss CJ. Long-range and short-range mechanisms of hydrophobic attraction and hydrophilic repulsion in specific and aspecific interactions . *J Mol Recognit* 2003; 16: 177-190.
- van Dulm P, Norde W. The adsorption of human plasma albumin on solid surfaces, with special attention to the kinetic aspects. *J Colloid Interface Sci* 1983, 91: 248-255.
- Vassilakos N, Arnebrandt T, Glantz PO. Adsorption of whole saliva onto hydrophilic and hydrophobic solid surfaces: influence of concentration, ionic strength and pH. *Scand J Dent Res* 1992; 100: 346-353.
- Vassilakos N, Arnebrandt T, Glantz PO. An in vitro study of salivary film formation at solid/liquid interfaces. *Scand J Dent Res* 1993; 101: 133-137.
- Vassilakos N, Rundegren J, Arnebrandt T, Glantz PO Adsorption from salivary fractions at solid/liquid and air/liquid interfaces. *Arch Oral Biol* 1992; 37: 549-557.
- Vaudaux P, Waldvogel FA, Morgenthaler J, Nydegger UE. Adsorption of fibronectin onto polymethylmethacrylate and promotion of *Staphylococcus aureus* adherence. *Infect Immun* 1984; 45: 768-774.
- Vaupel P. Funktionen des Magen-Darm-Trakts; in Schmidt RF, Thews G, Lang F (Hrsg.). *Physiologie des Menschen*, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 28. Auflage, 2000, 806-848.
- Vezeau PJ, Keller JC, Wightman JP. Reuse of healing abutments: an in vitro model of plasma cleaning and common sterilization techniques. *Implant Dent* 2000; 9: 236-246.
- Vitorino R, Lobo MJ, Duarte JA, Ferrer-Correia AJ, Domingues PM, Amado FM. Analysis of salivary peptides using HPLC-electrospray mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* 2004b; 18: 570-575.
- Vitorino R, Calheiros-Lobo MJ, Williams J, Ferrer-Correia A, Tomer KB, Duarte JA, Domingues PM, Amado FML. Peptidomic analysis of human acquired pellicle. *Biomedical Chromatography* 2007; 21: 1107-1117.
- Vitorino R, Calheiros-Lobo MJ, Domingues PM, Amado FML. Peptide profile of human acquired enamel pellicle using MALDI tandem MS. *J Sep Sci* 2008, 31: 523-537.
- von Eiff C, Jansen B, Kohnen W and Becker K. Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis. *Drugs* 2005; 65: 179-214.

- von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *The Lancet Infect Dis* 2002; 2: 677-685.
- Vogler EA. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Adv Colloid Interface Sci* 1998; 74: 69-117.
- Vogler EA. Water and the acute biological response to surfaces. *J Biomater Sci Polym Ed* 1999; 10: 1015-1045.
- Vroman L, Adams AL, klings M, Fisher GC, Munoz PC, Solensky RP. Reactions of formed elements of blood with plasma proteins at interfaces. *Annals of the New York Academy of Science* 1977; 283: 65.
- Wahlgren M, Welin-Klintström S, Karlsson CA-C in: Malmsten (Ed.), *Biopolymers at interfaces* 1998 (Dekker, New York); Vol.75: 485.
- Walz A, Stühler K, Wattenberg A, Hawranke E, Meyer HE, Schmalz G, Blüggel M, Ruhl S. Proteome analysis of glandular parotid and submandibular-sublingual saliva in comparison to whole human saliva by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 2006; 6: 1631-1639.
- Walz A, Odenbreit S, Stühler K, Wattenberg A, Meyer HE, Mahdavi J, Borèn T, Ruhl S. Identification of glycoprotein receptors within the human salivary proteome for the Lectin-like BabA and SabA adhesins of Helicobacter pylori by fluorescence-based 2-D bacterial overlay. *Proteomics* 2009; 9: 1582-1592.
- Wassels DTH and Embrey G. Adsorption of bovine serum albumin on to titanium powder. *Biomaterials* 1996; 17: 859-864.
- Webster TJ, Ejiofor JU. Increased osteoblast adhesion on nanophas metal: Ti, Ti6Al4V and CoCrMo. *Biomaterials* 2004; 25: 4731-4739.
- Weinmann W, Thalacker C, Guggenberger R. Siloranes in dental composites. *Dent Mater* 2005; 21: 68-74.
- Welker D, Musil R. Werkstoffkundlich-klinische Auswahlkriterien und Anwendungsempfehlungen für Silikonabformmassen unterschiedlichen Reaktionstyps. *Zahnarzt Magazin* 1990; 3: 36-41.
- Wojciechowski P, ten Hove P, Brash JL. Phenomenology and mechanisms of the transient adsorption of fibrinogen from plasma (Vroman effect). *J Colloid Interface Sci* 1986; 111: 455.
- Wilson CJ, Clegg R, Vesley DI, Pearcy MJ. Mediation of Biomaterial-Cell Interactions by adsorbed Proteins: A Review. *Tissue Engineering* 2005;11: 1/2.
- Wu YG, Simonovsky FI, Ratner BD, Horbett TA. The role of adsorbed fibrinogen in platelet adhesion to polyurethane surfaces: a comparison of hydrophobicity, protein adsorption, monoclonal antibody binding, and platelet adhesion. *J Biomed Mater Res Part A* 2005; 74: 722-738.
- Xu LC, Logan BE. Interaction forces between colloids and protein-coated surfaces measured using an atomic force microscope. *Environ Sci Technol* 2005; 39: 3592-3600.
- Yang Y, Cavin R, Ong JL. The adsorption on titanium surfaces and their effect on osteoblast attachment. *J Biomed Mater Res* 2003; 67: 344-349.

- Yao Y, Lamkin MS, Oppenheim FG. Pellicle precursor proteins: acidic prolin-rich proteins, statherin, and histatins, and their crosslinking reaction by oral trans-glutaminase. *J Dent Res* 1999; 78: 1696-1703.
- Yao Y, Lamkin MS, Oppenheim FG. Pellicle precursor protein crosslinking characterization of an adduct between acidic prolin-rich protein (PRP-1) and statherin generated by transglutaminase. *J Dent Res* 2000, 79: 930-938.
- Yao Y, Berg EA, Costello CE, Troxler RF, Oppenheim FG. Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches. *J Biol Chem* 2003; 278: 5300-5308.
- Yoon RH, Flinn DH, Rabinovich YI. Hydrophobic interactions between dissimilar surfaces. *J Colloid Interface Sci* 1997; 185: 363-370.
- Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, Boyan BD. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. Wiley Periodicals, Inc 2005.
- Zdanowski Z, Ribbe E, Schalén C. Influence of some plasma proteins on in vitro bacterial adherence to PTFE and Dacron vascular prostheses. *APMIS* 1993; 101: 926-932.
- Zenhausern F, Adrian M, Descouts P. Solution structure and direct imaging of fibronectin adsorption to solid surfaces by scanning force microscopy and cryo-electron microscopy. *J Electron Microsc* 1993; 42: 378.
- Zhang WK, Xu QB, Zou S, Li HB, Xu WQ, Zhang X, Shai ZZ, Kudera M, Gaub HE. Single-molecule force spectroscopy on Bombyx mori silk fibroin by atomic force Microscopy. *Langmuir* 2000; 16: 4305.
- Ziegler C, Müller C, Lüders A, Hoth-Hannig W, Hannig M. Initial bioadhesion on dental materials as a Function of Contact Time, pH, Surface Wettability and Isoelectric Point. *Langmuir* 2010; 26: 4136-4141.
- Zoungrana T, Findenegg GH, Norde W.: Structure, stability, and activity of adsorbed enzyme. *J Colloid Interface Sci* 1997; 190: 437-448.

8. Danksagung

Ich möchte die Danksagung nutzen, um allen Personen meinen Dank auszusprechen, die am Gelingen dieser Dissertation beteiligt waren und ohne die eine Fertigstellung nicht möglich gewesen wäre.

Desweiteren möchte ich auch besonders den Menschen danken, durch deren Einfluss und Freundschaft ich mich während meines Studiums persönlich weiterentwickelt habe und die ein fester Bestandteil meines Lebens geworden sind.

Bedanken möchte ich mich zuerst ganz herzlich bei Herrn Professor Dr. G. Schmalz für die Bereitstellung der Arbeitsmittel zur Durchführung der Versuche. Ich habe mich in der „Kons“ immer sehr gut betreut gefühlt, viele nette und hilfsbereite Menschen kennengelernt, was meine Arbeitseinstellung und mein Engagement zusätzlich gesteigert hat.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. H. Schweikl für seinen engagierten Einsatz sowohl in der Entwicklungsphase der Dissertation als auch während der Durchführung der Versuche. Gern erinnere ich mich an die Sitzungen in ihrem Büro, ihre Hilfe bei der Literaturrecherche und die vielen nützlichen Anregungen und Tipps bezüglich der Arbeit. Danke vor allem auch für Ihr Vertrauen und die Möglichkeit selbständig und engagiert arbeiten zu dürfen.

Großer Dank gebührt auch Herrn Dr. Rainer Müller, der diese Dissertation ebenfalls von Anfang bis Ende mitbegleitete und durch seine Unterstützung und fachliche Kompetenz auf dem Gebiet der Chemie zum Gelingen der Dissertation beigetragen hat.

Herrn Dr. rer. nat. K.A. Hiller danke ich besonders für die Durchführung der statistischen Auswertung der Ergebnisse. Ich weiß, dass vor allem die Auswertung der HSA- und Speichelstandards einen sehr großen Arbeitsaufwand bedeutet haben-dafür vielen Dank.

Frau Brigitte Bey und Frau Helga Ebensberger gilt mein Dank für die Herstellung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Dank gebührt auch der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik und Werkstoffkunde der Universitätsklinik Regensburg für die freundliche Bereitstellung des Perthometers.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des „Kons-Labors“, Claudia Bosel, Carola Bolay, Christine Petzel, Claudia Waha und Alexander

Eckhardt. Durch eure nette, offene und hilfsbereite Art habt ihr mir so manchen tristen Tag im Labor versüßt; die Kuchentreffen dienstags nachmittags mit viel Lachen und Späßen sind unvergessen.

Lieber Andi!

Du weißt, dass Du als mein „persönlicher MTA“ ganz besonders großen Anteil an dieser Arbeit hast und diese paar Sätze nur bedingt ausdrücken können, wie froh ich bin, dass Du mich betreut hast. Schon vom ersten Tag an, haben wir uns super verstanden, sind gleich ein Team gewesen und haben trotz der anstrengenden Arbeit viel Spaß gehabt. Du warst bei Problemen und Sorgen immer für mich da, hast mich während der gesamten Arbeit stets uneingeschränkt unterstützt und bist mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Ich hoffe inständig, dass Du der Kons erhalten bleibst... Ich werde die Zeit bei Dir im Labor und die vielen lustigen Episoden nicht vergessen. Ich bin als Fremder gekommen und gehe als Freund!

Danke für alles!!!

Weiterer Dank gebührt meinen Freundinnen und Freunden Louisa Riedel, Katharina Schedel, Michael Hansmann, Alpar Barta und Levente Parragi, die ich während meiner Studienzeit kennenlernen durfte.

Zuletzt möchte ich jedoch ganz besonders meinen Eltern danken, ohne deren unermüdliche Liebe und Unterstützung mein Studium gar nicht möglich gewesen wäre. Ihr habt mich stets zur richtigen Zeit gelobt beziehungsweise getadelt und mich zu dem Menschen erzogen, der ich heute bin.

Ich liebe euch!

9. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Ulrich Carl
Geboren am: 14.10.1982 in Heilbronn
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Doktorarbeit

Thema: Proteinadsorption an klinisch relevanten Materialien und Werkstoffen
Betreuer: Prof. Dr. Helmut Schweikl,
Lehrstuhl für Zahnerhaltung und Parodontologie
am Universitätsklinikum Regensburg

Bildungsweg

1989-1993	Besuch der Grund- und Hauptschule, Neckargemünd
1993-2002	Besuch des St. Raphael Gymnasiums, Heidelberg, Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
Sept. 2002- Sept. 2003	Ableistung des Zivildienstes (Katholische Sozialstation Neckargemünd)
WS 2003/04	Immatrikulation an der Universität Regensburg und Beginn des Studiums der Zahnheilkunde
Sommer 2004	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
WS 2006/07	Zahnärztliche Vorprüfung
SS 2009	Anmeldung zur zahnärztlichen Prüfung
Dezember 2009	Abschluss des Studiums der Zahnheilkunde und Approbation als Zahnarzt im Dezember 2009
Jan. 2010 – Nov. 2010	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, Prof. Dr. med. dent. Gottfried Schmalz, Universitätsklinikum Regensburg

10. Anhang

Tabelle 3: Auflistung der Rauigkeitswerte für die neun unterschiedlichen Biomaterialien. Die so ermittelten Werte wurden für jedes Material in einem Median (Perzentile 25-75%) zusammengefasst.

Material	Messung	Wert in µm	Medianwert in µm
Silikon	1. Prüfkörper links	0.19 µm	
	1. Prüfkörper mittig	0.34 µm	
	1. Prüfkörper rechts	0.15 µm	
	2. Prüfkörper links	0.15 µm	
	2. Prüfkörper mittig	0.84 µm	
	2. Prüfkörper rechts	0.15 µm	
	3. Prüfkörper links	0.11 µm	
	3. Prüfkörper mittig	0.5 µm	
	3. Prüfkörper rechts	0.15 µm	0.15 µm
Polymethylmethacrylat	1. Prüfkörper links	0.04 µm	
	1. Prüfkörper mittig	0.04 µm	
	1. Prüfkörper rechts	0.04 µm	
	2. Prüfkörper links	0.08 µm	
	2. Prüfkörper mittig	0.04 µm	
	2. Prüfkörper rechts	0.04 µm	
	3. Prüfkörper links	0.04 µm	
	3. Prüfkörper mittig	0.04 µm	
	3. Prüfkörper rechts	0.04 µm	0.04 µm
Polyethylen	1. Prüfkörper links	0.92 µm	
	1. Prüfkörper mittig	0.53 µm	
	1. Prüfkörper rechts	0.42 µm	
	2. Prüfkörper links	0.84 µm	
	2. Prüfkörper mittig	0.53 µm	
	2. Prüfkörper rechts	0.8 µm	
	3. Prüfkörper links	0.53 µm	
	3. Prüfkörper mittig	0.46 mm	
	3. Prüfkörper rechts	0.61 µm	0.53 µm
Ketac Molar	1. Prüfkörper links	0.08 µm	
	1. Prüfkörper mittig	1.56 µm	
	1. Prüfkörper rechts	0.53 µm	
	2. Prüfkörper links	0.11 µm	
	2. Prüfkörper mittig	0.23 µm	
	2. Prüfkörper rechts	0.38 µm	
	3. Prüfkörper links	0.23 µm	
	3. Prüfkörper mittig	0.38 µm	
	3. Prüfkörper rechts	0.15 µm	0.23 µm
Polytetrafluorethylen	1. Prüfkörper links	0.27 µm	
	1. Prüfkörper mittig	0.27 µm	
	1. Prüfkörper rechts	0.15 µm	
	2. Prüfkörper links	0.11 µm	
	2. Prüfkörper mittig	0.11 µm	
	2. Prüfkörper rechts	0.15 µm	

	3. Prüfkörper links	0.11 µm	
	3. Prüfkörper mittig	0.23 µm	
	3. Prüfkörper rechts	0.15 µm	0.15 µm
Titan	1. Prüfkörper links	0.08 µm	
	1. Prüfkörper mittig	0.08 µm	
	1. Prüfkörper rechts	0.08 µm	
	2. Prüfkörper links	0.08 µm	
	2. Prüfkörper mittig	0.08 µm	
	2. Prüfkörper rechts	0.08 µm	
	3. Prüfkörper links	0.08 µm	
	3. Prüfkörper mittig	0.08 µm	
	3. Prüfkörper rechts	0.08 µm	0.08 µm
CoCrMo	1. Prüfkörper links	0.08 µm	
	1. Prüfkörper mittig	0.31 µm	
	1. Prüfkörper rechts	0.26 µm	
	2. Prüfkörper links	0.15 µm	
	2. Prüfkörper mittig	0.23 µm	
	2. Prüfkörper rechts	0.1 µm	
	3. Prüfkörper links	0.15 µm	
	3. Prüfkörper mittig	0.15 µm	
	3. Prüfkörper rechts	0.09 µm	0.15 µm
Tetric Evo Ceram	1. Prüfkörper links	0.53 µm	
	1. Prüfkörper mittig	0.99 µm	
	1. Prüfkörper rechts	0.47 µm	
	2. Prüfkörper links	0.15 µm	
	2. Prüfkörper mittig	0.92 µm	
	2. Prüfkörper rechts	0.21 µm	
	3. Prüfkörper links	0.5 µm	
	3. Prüfkörper mittig	1.3 µm	
	3. Prüfkörper rechts	0.82 µm	0.53 µm
Siloran	1. Prüfkörper links	0.25 µm	
	1. Prüfkörper mittig	0.18 µm	
	1. Prüfkörper rechts	0.1 µm	
	2. Prüfkörper links	0.19 µm	
	2. Prüfkörper mittig	0.2 µm	
	2. Prüfkörper rechts	0.23 µm	
	3. Prüfkörper links	0.32 µm	
	3. Prüfkörper mittig	0.44 µm	
	3. Prüfkörper rechts	0.19 µm	0.2 µm