



Abschlussbericht „Antibak-Dental“

Thema:

Antibakterielle Ausrüstung von pastösen Knochenzementen mittels Metallionen für die
Anwendung im Dentalbereich

Antragstellung/Projektleitung:

Jun.-Prof. Dr. med. dent. Matthias C. Schulz

Dr.-Ing. Matthias Schumacher

Dr. rer. nat. Anja Lode

Projektbearbeitung:

Dr. rer. nat. Anne Bernhardt

Rudi Walther

Michael Geißler

Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum *Carl
Gustav Carus* Dresden und

Zentrum für Translationale Knochen-, Gelenk- und Weichgewebeforschung, Medizinische
Fakultät der Technischen Universität und Universitätsklinikum *Carl Gustav Carus* Dresden

Projektlaufzeit:

1. 4. 2017 – 31. 7. 2019

1. Problemstellung und Zielsetzung

Die Zahl der Versorgungen mit Dentalimplantaten nach Zahnverlust nimmt in Deutschland wie auch weltweit zu. Eine der häufigsten Komplikationen, die zum Versagen eines Dentalimplantats führen, ist die sog. *Periimplantitis* – eine Entzündung des Gewebes um das Implantat. Dies kann zu einer Rückbildung des Knochens, in dem das Implantat verankert ist, führen, wodurch sich das Implantat lockern kann. Der aktuelle Therapieansatz zur Rettung des Implantats besteht in der Bekämpfung der Infektion, z. B. durch mechanische Reinigung der Implantatoberfläche sowie durch Spülen mit Desinfektionslösungen. Ist dies nicht erfolgreich, bleibt nur eine Entfernung des Implantats, um die Entzündung zu beseitigen. Anschließend folgt eine meist langwierige Regeneration des Kieferknochens, bevor ein neues Implantat eingesetzt werden kann. Für den Patienten bedeutet dies eine lange Zeit eingeschränkter Kaufunktion und eine erneute Implantation mit den damit verbundenen Risiken und Kosten.

Ziel des Projektes war es, eine Strategie zu entwickeln, mit der die Infektion um ein Dentalimplantat bekämpft, dieses gleichzeitig stabilisiert und mittelfristig eine vollständige Regeneration des Knochens, in dem das Implantat verankert ist, erzielt werden kann. Dazu sollte ein neuartiger Knochenzement mit antibakterieller Wirkung etabliert werden, der 1.) zum Auffüllen des periimplantären Defektbereichs verwendet werden kann und dort zur mechanischen Stabilisierung des Implantatbettes beiträgt, der 2.) aufgrund seiner osteokonduktiven Eigenschaften die Regeneration des Knochens fördert und der 3.) durch kontrollierte Freisetzung antibakteriell wirksamer Metallionen die Infektion lokal bekämpft und eine erneute Infektion langfristig verhindert. Damit sollen die Entfernung des infizierten Implantats, die nachfolgend notwendige Augmentation des Kiefers und die anschließende erneute Versorgung mit einem Implantat sowie die damit verbundenen Kosten umgangen werden.

2. Gewählter Lösungsweg

Ausgangspunkt für die Entwicklung war ein klinisch etablierter und kommerziell verfügbarer Calciumphosphat-Knochenzement, der von den Antragstellern bereits erfolgreich als Träger für Zytostatika zur Tumorbehandlung [1] sowie als Quelle zur Freisetzung bioaktiver, die Knochenneubildung stimulierender Ionen für die Therapie Osteoporose-bedingter Frakturdefekte eingesetzt wurde [2]. Dieser sollte durch Einbringung von silberhaltigen, mesoporösen, bioaktiven Glaspartikeln (MBG) modifiziert werden. Bioaktive Gläser sind im Vergleich zu Calciumphosphat-Zementen leichter löslich, weshalb sie als Quelle für die gezielte Freisetzung antibakteriell wirksamer Silber-Ionen (Ag^+) eingesetzt wurden (Abb. 1).

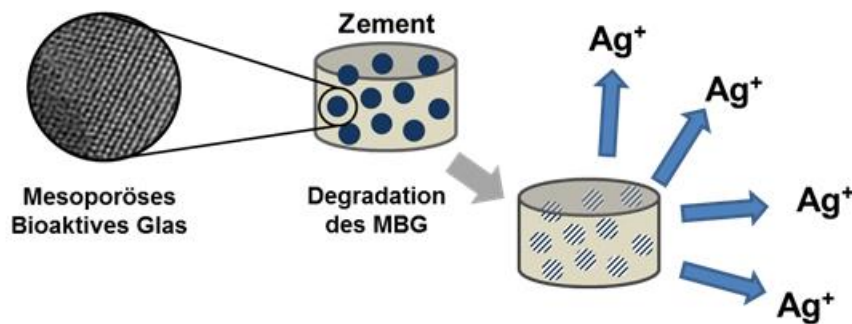


Abb. 1: Schematische Darstellung des Wirkprinzips des neuartigen Knochenzements. Durch Degradation der im Zement enthaltenen MBG-Partikel kommt es zur Freisetzung von Ag^+ -Ionen.

Es wurden verschiedene Zusammensetzungen der Ausgangsstoffe für die MBG-Synthese getestet mit dem Ziel, eine Rezeptur zu finden, die eine Freisetzung von Ag^+ -Ionen im wirksamen Konzentrationsbereich erlaubt bei gleichzeitigem Erhalt der mesoporösen Partikelstruktur.

Um eine sehr gute Applizierbarkeit und einfache Handhabung für den Chirurgen zu gewährleisten, wurde eine spezielle pastöse Form des Knochenzementes eingesetzt, die eine Ölphase zur Stabilisierung der Paste enthält [3]. Durch Zusatz der MBG-Partikel verändert sich der Feststoffgehalt, entsprechend wurden die Verarbeitungsparameter des Komposites durch Anpassung des Ölgehaltes neu eingestellt.

Die Freisetzung der Ag^+ -Ionen wurde sowohl aus den MBG-Partikeln als auch aus den Zement-MBG-Kompositen bestimmt. Die Komposite wurden außerdem hinsichtlich ihrer mechanischen Kennwerte und der Kompatibilität zu relevanten Zelltypen (humane dentale Pulpastammzellen) *in vitro* untersucht.

3. Wissenschaftliche Ergebnisse

3.1. Untersuchung der antibakteriellen Wirkung von Silberionen

Um die antibakterielle Wirkung der zu entwickelnden Zement-MBG-Komposite gezielt einzustellen und gleichzeitig eine Freisetzung zu hoher (und damit ggf. toxischer) Ag^+ -Konzentrationen zu vermeiden, ist die Kenntnis der für die Eliminierung relevanter Bakterien erforderlichen Ag^+ -Konzentration notwendig.

Ausgehend von in der Literatur beschriebenen Referenzwerten von 0,65 $\mu\text{g/ml}$ [4] bzw. 4,8 bis 38,4 $\mu\text{g/ml}$ Ag^+ MIC (*minimum inhibitory concentration*) [5] wurden unter Verwendung des klinisch relevanten Bakterienstammes *Staphylococcus aureus* (DSM 1104 / ATCC 27853) antibakteriell wirksame Ag^+ -Ionenkonzentrationen evaluiert. Dazu wurde ein Agar-Diffusionstest nach DIN 58940 durchgeführt: Testplättchen aus Filterpapier wurden auf eine

Agarplatte (Müller-Hinton-Agar), auf der sich der Bakterienrasen befand, gelegt; anschließend wurden 20 µl Silbernitratlösung pro Testplättchen zugegeben. Für die vergleichende Untersuchung verschiedener Konzentrationen wurde eine Verdünnungsreihe von Silbernitrat angelegt, als Lösungsmittel wurde im Hinblick auf die Testung in Zellkulturexperimenten (*in vitro*) bzw. die Anwendung (*in vivo*) Zellkulturmedium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium + 10% fötales Kälberserum, w/o Antibiotika) verwendet. Nach 18 h Kultivierung bei 37°C wurde die Fläche der Hemmhöfe bestimmt, also des Bereiches im Umkreis der Plättchen, in dem die Bakterien abgestorben waren.

Zunächst wurden entsprechend der Erfahrungswerte aus der Literatur Silberkonzentrationen im Bereich unterhalb von 50 µg/ml getestet – dabei konnte keine Ausbildung eines Hemmhofes beobachtet werden. Erst eine Konzentration von 50 µg/ml zeigte eine antimikrobielle Wirkung, die mit zunehmender Konzentration (bis 5000 µg/ml) anstieg (Abb. 2).

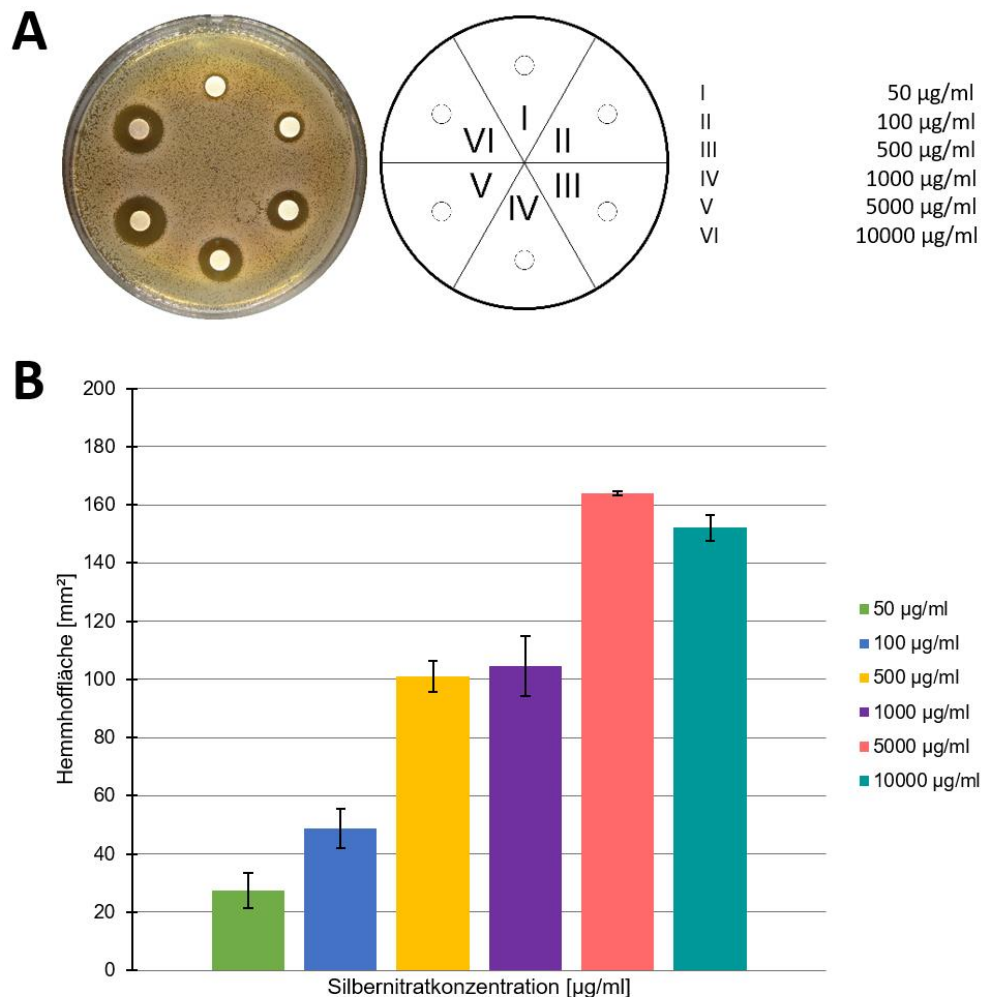


Abb. 2: Hemmhoffläche bei unterschiedlichen Silbernitratkonzentrationen in Zellkulturmedium. **A.** Agardiffusionstest unter Verwendung von *Staphylococcus aureus* als klinisch relevanter Bakterienstamm, repräsentative Aufnahme. **B.** Quantifizierung der Hemmhoffläche, n=2 +/- Standardabweichung

Grund für die starke Abweichung dieser Ergebnisse zu den Erfahrungswerten aus der Literatur war die Verwendung von Zellkulturmedium als Lösungsmittel für das eingesetzte Silbernitrat. Die darin enthaltenen Chloridionen führen zur Ausfällung von schwerlöslichem Silberchlorid und damit zur Verminderung der wirksamen Ag^+ -Konzentration. Wird das Silbernitrat hingegen in deionisiertem Wasser gelöst, ergibt sich eine niedrigere antibakteriell wirksame Konzentration. Dies wurde in einem vergleichenden Versuch gezeigt. Jeweils die gleiche Menge *S. aureus*-Kultur wurde für die Zeitdauer von 5 min, 30 min und 6 h der Wirkung von Silbernitrat (0,5, 1, 5, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ in Wasser bzw. Zellkulturmedium) ausgesetzt. 20 μl der Zellsuspension wurden auf eine Agarplatte getropft und für 18 h bei 37°C inkubiert; anschließend erfolgte die Fotodokumentation (Abb. 3).

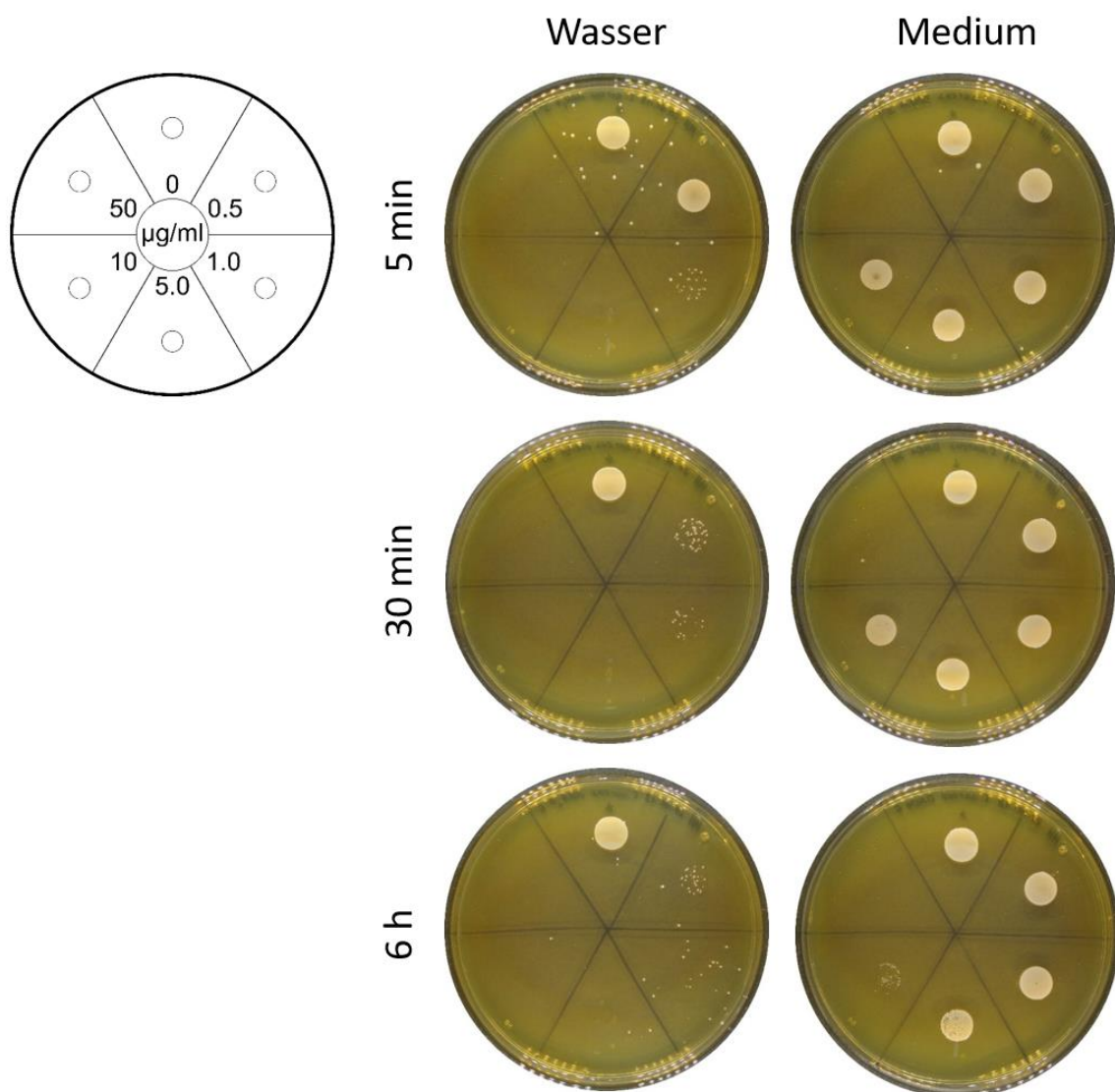


Abb. 3: Wachstum von *Staphylococcus aureus* nach Behandlung (für 5 min, 30 min bzw. 6 h) mit unterschiedlichen Silbernitratkonzentrationen in deionisiertem Wasser bzw. Zellkulturmedium; repräsentative Aufnahmen.

Es zeigte sich, dass die antimikrobielle Wirkung von der Inkubationsdauer abhängt. Bei Lösung des Silbernitrates in Wasser konnte bereits nach 5 min Inkubation eine signifikante antibakterielle Wirkung bei einer Konzentration von 1,0 µg/ml festgestellt werden; bei längerer Inkubationen waren auch Konzentrationen < 1,0 µg/ml wirksam. Dagegen konnte bei Lösung des Silbernitrates in Zellkulturmedium nach 5 bzw. 30 min die Wirksamkeitsgrenze von 50 µg/ml aus den Agardiffusionstests bestätigt werden; erst bei einer Inkubation von 6 Stunden zeigte auch eine Konzentration von 10 µg/ml eine antibakterielle Wirkung.

Um die effektive Ag⁺-Konzentration in Zellkulturmedium zu ermitteln, wurden verschiedene Mengen an Silbernitrat zu deionisiertem Wasser bzw. Zellkulturmedium gegeben. Die Bildung von Niederschlägen war bei der Zugabe von Silbernitrat zu Zellkulturmedium bereits visuell zu erkennen (Abb. 4A). Die Lösungen wurden durch 0,2 µm-Filter filtriert, um diese Präzipitate zu entfernen; anschließend wurde die Menge der verbliebenen Ag⁺-Ionen mittels ICP-OES quantifiziert (Abb. 4B). Die Ag⁺-Konzentration in Zellkulturmedium war im Vergleich zu Wasser auf etwa ein Viertel reduziert.

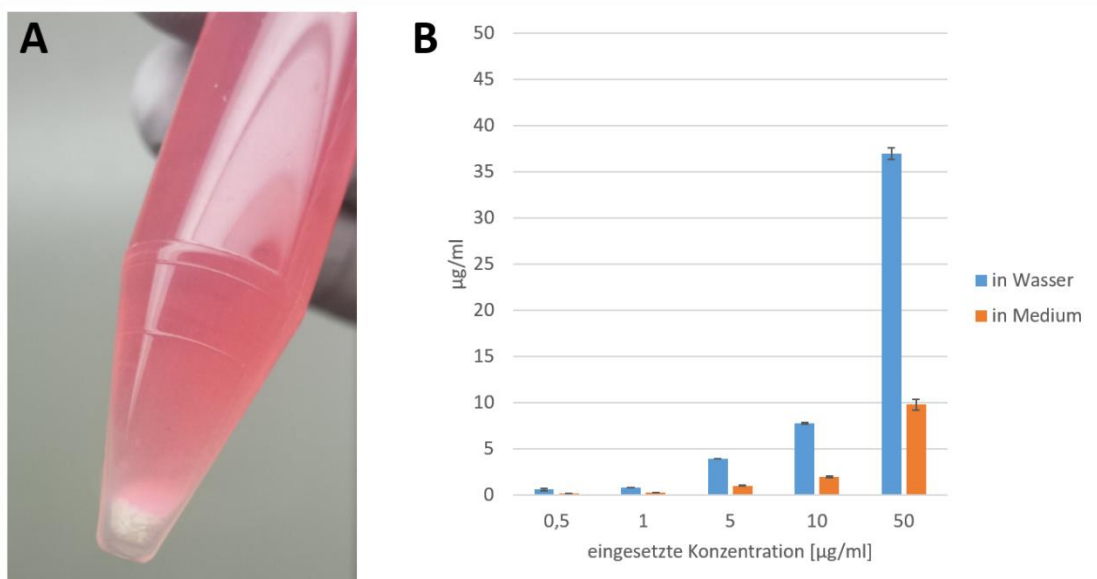


Abb. 4: Präzipitation von Silberchlorid in Zellkulturmedium. **A.** Bei einer Konzentration von 1 mg/ml Silbernitrat war eine starke Niederschlagbildung visuell zu erkennen. **B.** Ag⁺-Konzentration in deionisiertem Wasser und Zellkulturmedium (Quantifizierung mittels ICP-OES; n=3 +/- Standardabweichung).

Die mikrobiologischen Arbeiten wurden in Kooperation mit dem Institut für Naturstofftechnik der TU Dresden durchgeführt.

3.2. Untersuchung der zellbiologischen Wirkung von Silberionen

Verschiedene Ag^+ -Ionenkonzentrationen wurden *in vitro* auf ihre Verträglichkeit gegenüber humanen mesenchymalen Stammzellen (MSC, isoliert aus dem Knochenmark, immortalisierte Zelllinie [6]) sowie humanen dentalen Pulpa-Stammzellen (DPSC, isoliert aus Weisheitszähnen, primäre Zellen von 2 Spendern) untersucht. Beide Zelltypen kommen beim Einbringen des Zementkomposites in den periimplantären Knochen in Kontakt mit dem Material und sind für die Knochenneubildung verantwortlich. Die Zellen wurden in Gegenwart von Silbernitrat in verschiedenen Konzentrationen für 1, 3, 5 bzw. 7 Tage kultiviert. Nach Lyse der Zellen wurde deren Vitalität und Zellzahl durch Quantifizierung der Enzymaktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) sowie des DNA-Gehaltes ermittelt.

In einer ersten Versuchsreihe wurde der Einfluss von Ag^+ -Ionen in einem großen Konzentrationsbereich in den folgenden Abstufungen untersucht: 0, 0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$. Dabei zeigte sich, dass die toxische Konzentration bereits zwischen 1 und 5 $\mu\text{g/ml}$ liegt. Daher wurde in den folgenden Experimenten eine feinere Abstufung zwischen 0 und 4 $\mu\text{g/ml}$ gewählt. Abb. 5 zeigt die Ergebnisse der LDH-Aktivitätsmessung sowie der DNA-Quantifizierung für die DPSC des Spenders 1; die Untersuchungen mit DPSC des Spenders 2 ergaben sehr ähnliche Ergebnisse.

Sowohl die Bestimmung der Zellzahl anhand des DNA-Gehaltes als auch die Quantifizierung der vitalen Zellen anhand der LDH-Aktivität ergab, dass unter den gewählten Zellkulturbedingungen Ag^+ -Konzentrationen $> 2,5 \mu\text{g/ml}$ zu einer signifikant reduzierten Zellzahl führen und damit toxisch für die Zellen sind.

Um die beobachtete toxische Wirkung zweifelsfrei auf die Ag^+ -Ionen zurückführen zu können, wurden zusätzlich Versuche mit DPSC (Spender 1 und 2) durchgeführt, in denen Kalziumnitrat in den folgenden Konzentrationen zum Zellkulturmedium gegeben wurden: 0, 0,5, 1, 2, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$. Hierbei konnten im gleichen Untersuchungszeitraum keinerlei toxische Effekte beobachtet werden; die Bestimmung der LDH-Aktivität und des DNA-Gehaltes ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Konzentrationen. Somit konnte eine toxische Wirkung der NO_3^- -Ionen ausgeschlossen werden.

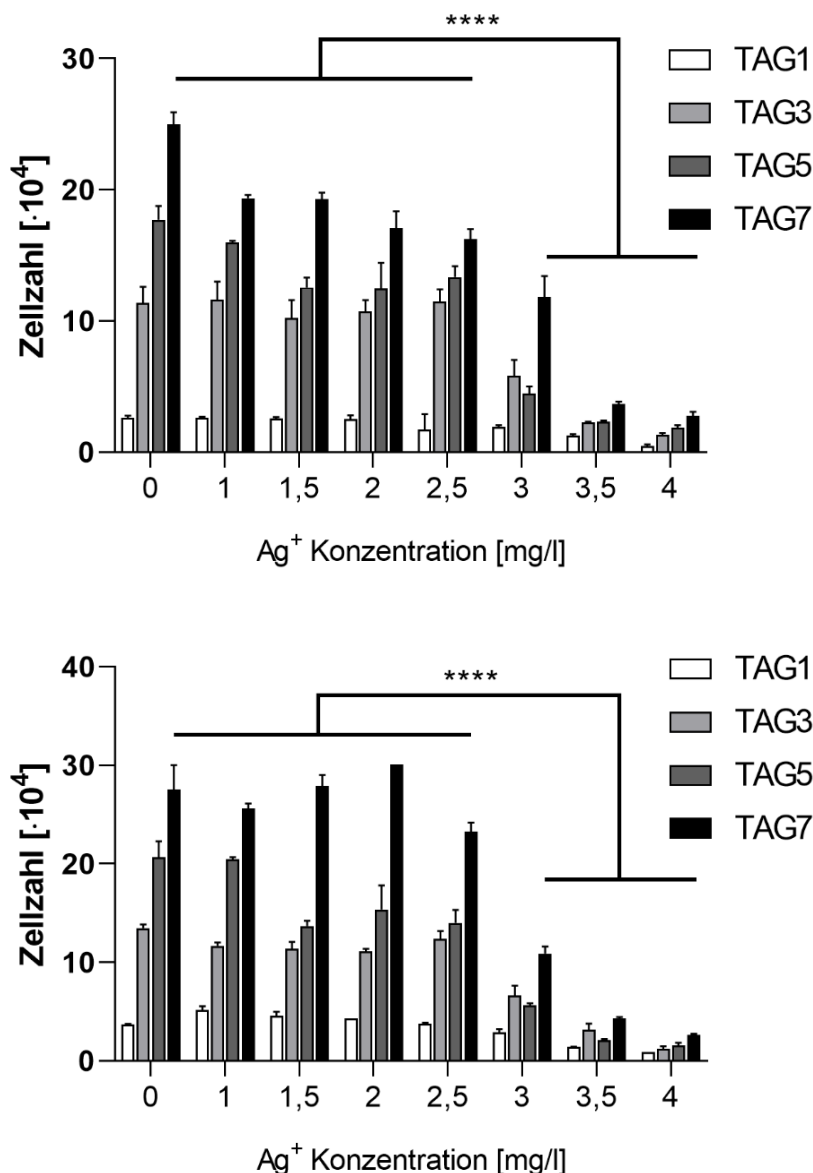


Abb. 5: Wachstum von DPSC in Gegenwart von unterschiedlichen Silbernitratkonzentrationen. **A.** Zellzahl ermittelt aus der LDH-Aktivität durch Korrelation mit einer Kalibriergeraden (n=3 +/- Standardabweichung, **** $p < 0,0001$). **B.** Zellzahl ermittelt aus dem DNA-Gehalt mit einer Kalibriergeraden (n=3 +/- Standardabweichung, **** $p < 0,0001$).

3.3. Synthese und Charakterisierung von mit Silberionen dotierten mesoporösen bioaktiven Glasparkeln

Als Referenzmaterial wurde zunächst ein silberfreies mesoporöses bioaktives Glas (MBG) durch Sol-Gel-Synthese, wie bei Zhu et al. [7] beschrieben, hergestellt. Dieses MBG mit der Bezeichnung 80S15C wurde aus SiO₂ (freigesetzt durch saure Hydrolyse von Tetraethylorthosilikat-TEOS) und CaO (eingeführt als Kalziumnitrat*Hydrat) in einem molaren

Verhältnis von 80 zu 15 % synthetisiert. Als Template für die Bildung der mesoporösen Struktur diente das organische Polymer Pluronic123. Der Phosphatgehalt (eingeführt durch Triethylphosphat) lag bei 5 mol %. Die ethanolische Lösung der genannten Prekursoren wurde zunächst für 24 Stunden gerührt, dann wurde die Mischung 7 Tage bei RT geliert, wobei das Lösungsmittel verdampfte und die mesoporöse 3D Struktur gebildet wurde. Das getrocknete Gel wurde bei 700°C kalziniert, wobei der Porenbildner Pluronic ausgebrannt wurde. Für alle weiteren Experimente wurde das Material in Partikel von maximal 250 µm Durchmesser zermahlen.

Mit Silberionen dotierte MBG-Partikel wurden nach dem gleichen Verfahren hergestellt wie die silberfreie MBG-Referenz. Während der Gelbildung wurde zusätzlich Silbernitrat in die Reaktionsansätze gegeben. Außerdem wurde anstelle von Salzsäure Salpetersäure zur Katalyse der TEOS-Hydrolyse eingesetzt, da in Gegenwart von Chloridionen schwerlösliches Silberchlorid ausfällt, das dann nicht mehr in die Glasstruktur integriert werden kann.

Es wurden 8 verschiedene silberhaltige MBG hergestellt. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der silberhaltigen MBG-Proben und der Referenz. Der Phosphatgehalt betrug bei allen Proben 5 mol %.

Probenbezeichnung	Hintergrund
80S15C	reines MBG, Referenz
80S13C2Ag	Substitution von Kalzium durch Silber, Silikatgehalt bleibt gleich
80S8C7Ag	
80S4C11Ag	
80S15Ag	
73S13C9Ag	Addition von Silber bei sinkendem Silikatgehalt
66S12C17Ag	
55S10C30Ag	
45S8C42Ag	

Am bioaktiven Glas mit der Zusammensetzung 45S8C42Ag wurde exemplarisch die Freisetzung von Ca^{2+} und Ag^+ in Abhängigkeit von der Partikelgröße analysiert. Dazu wurden

die Partikel in verschiedene Partikelgrößen fraktioniert und bis zu 14 Tage in Wasser ausgelagert. Die Freisetzung der genannten Ionen wurde durch optische Emmissionsspektrometrie mittels induktiv gekoppelten Plasmas (ICP-OES) bestimmt (Abb. 6). Die Freisetzung von Ca^{2+} stieg mit abnehmender Partikelgröße kontinuierlich an. Bei der Freisetzung von Ag^+ war ein solcher Effekt nicht zu beobachten. Daher wurde im weiteren Verlauf auf die aufwendige, mit Verlusten verbundene Größenfraktionierung verzichtet.

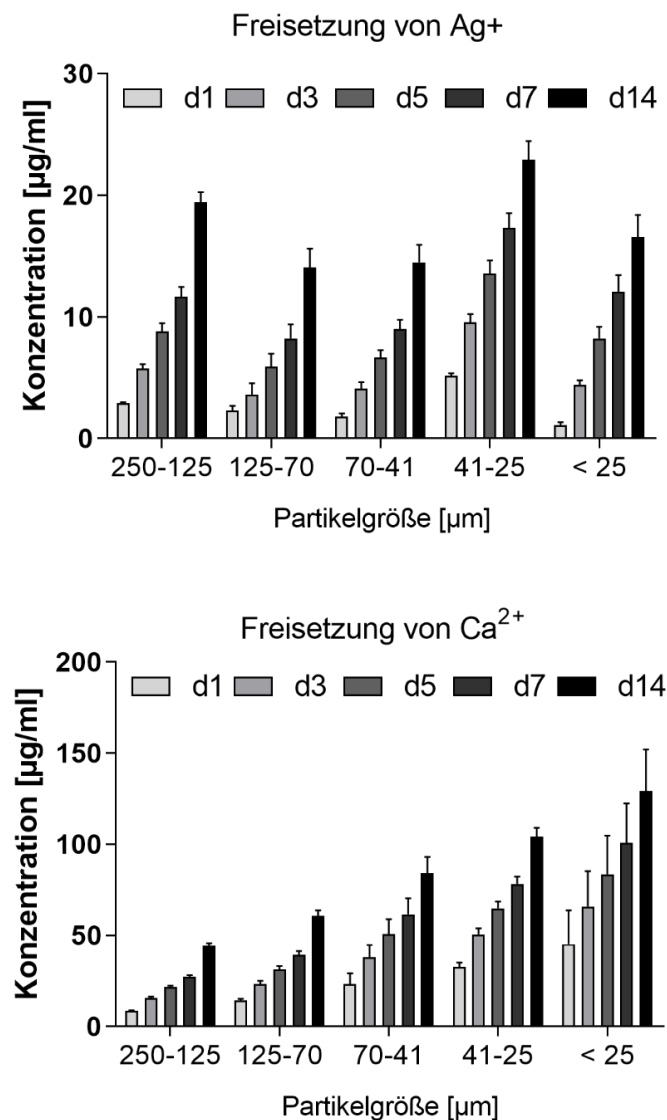


Abb. 6: Freisetzung von Ag^+ - und Ca^{2+} -Ionen aus dem bioaktiven Glas 45S8C42Ag in Abhängigkeit von der Partikelgröße. Kumulative Auftragung. Mittelwerte aus $n=4$ +/- Standardabweichung

Mit Hilfe von Röntgendiffraktionsmessungen wurde eine Phasenanalyse an 5 ausgewählten Proben durchgeführt: 80S15C, 80S4C11Ag, 80S15Ag, 73S9C13Ag und 45S8C42Ag (Abb. 7).

Nur die nicht-silberhaltige Referenzprobe 80S15C war durchgehend amorph. Alle anderen Proben enthielten neben der amorphen Glasphase auch kristalline, silberhaltige Phasen.

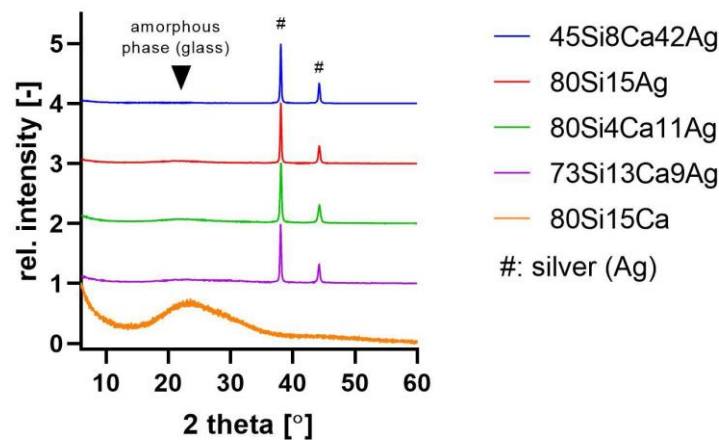


Abb. 7: Röntgenbeugungsspektren von 5 ausgewählten Biogläsern.

Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Untersuchungen können Aufschluss darüber geben, ob in den synthetisierten bioaktiven Gläsern mesoporöse Strukturen gebildet wurden. Sowohl in der Referenzprobe als auch in den silberhaltigen Glasproben 80SC11Ag, 80S15Ag und 73S9C13Ag konnten hochgeordnete mesoporöse Strukturen nachgewiesen. Lediglich die Probe mit dem höchsten Silbergehalt, 45S8C42Ag, wies keinerlei mesoporöse Strukturen auf (Abb. 8).

Die Freisetzung von Ag^+ und Ca^{2+} wurde für alle synthetisierten bioaktiven Gläser nach Auslagerung in Wasser untersucht (Abb. 9). In diesem Versuch wurden Partikelgrößen von 25-250 μm eingesetzt.

Die Ca^{2+} -Freisetzung korrelierte wiederum mit dem Kalziumgehalt der Gläser. So wurden in der Gruppe, bei der Kalzium durch Silber substituiert wurde (80S13C2Ag, 80S8C7Ag, 80S4C11Ag) mit sinkendem Kalziumgehalt auch eine verminderte Ca^{2+} Freisetzung beobachtet.

Die Freisetzung von Ag^+ korrelierte nicht durchgängig mit dem Silbergehalt der Gläser. Die höchste Freisetzung wurde für Gläser mit 11- bzw. 15 mol % Silber detektiert. Ein darüber hinaus steigender Silbergehalt von 17, 30 oder sogar 42 mol % beeinflusst die Freisetzung von Ag^+ nicht positiv. Es wird angenommen, dass die Zugabe von mehr als 15 mol % Silber nicht zu einem weiteren Einbau Ag^+ in die Glasstruktur führt. Vielmehr scheint sich bei höheren Konzentrationen metallisches Silber abzuscheiden. Das könnte auch das Fehlen der geordneten mesoporösen Strukturen in 45S8C42Ag erklären (Abb. 8).

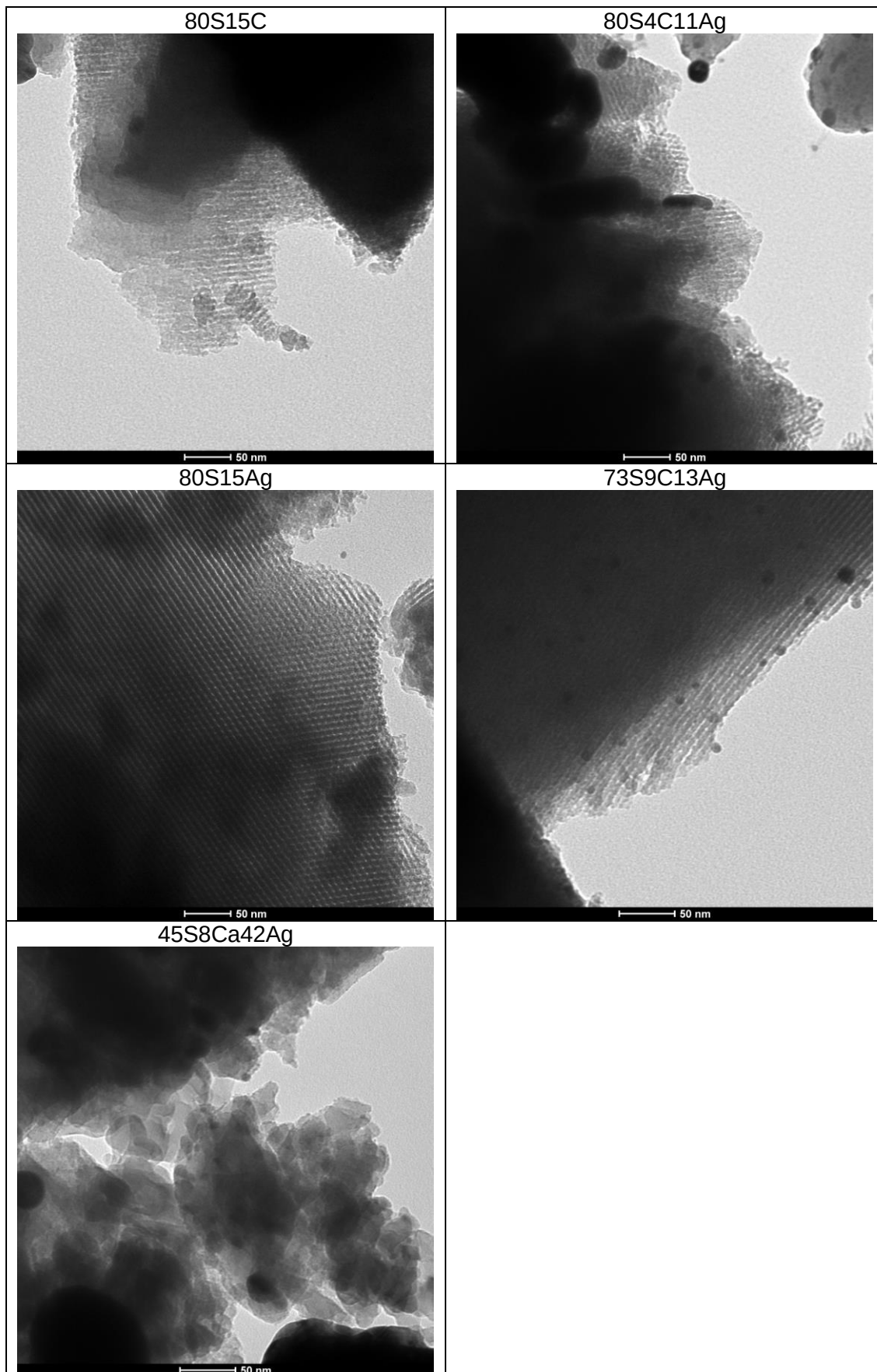


Abb 8: TEM-Aufnahmen von 5 verschiedener Biogläsern zur Untersuchung der Mesoporesität.

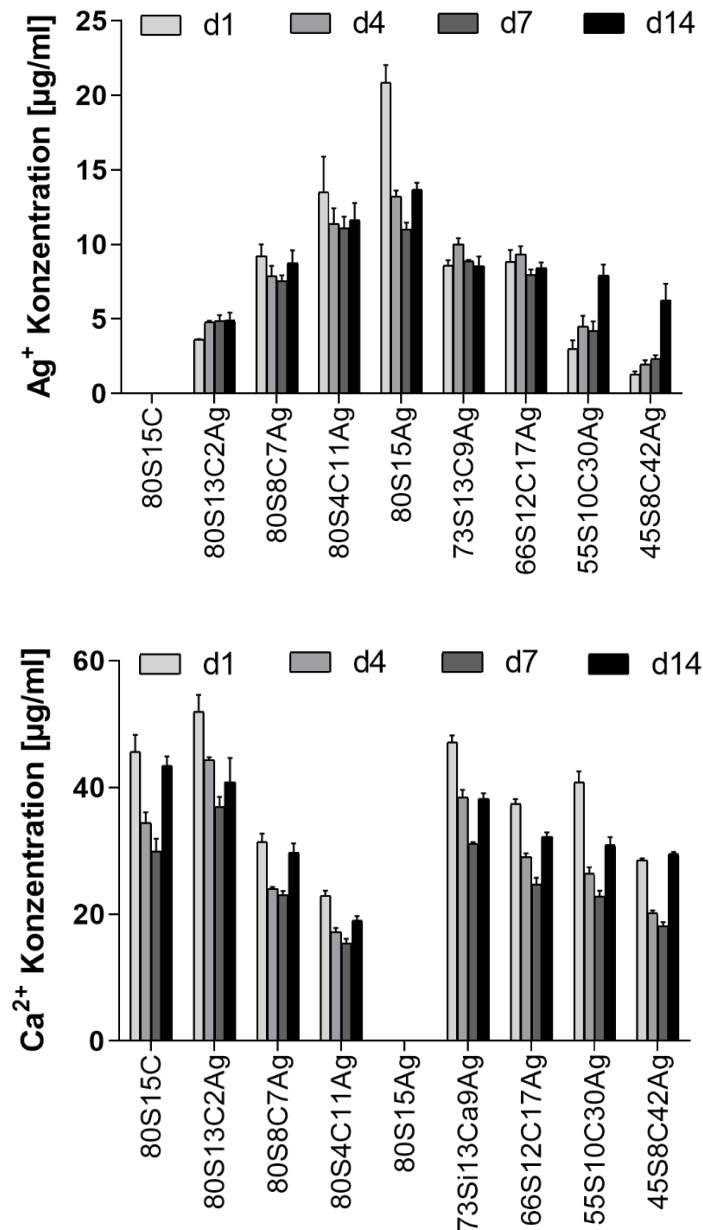


Abb. 9: Freisetzung von Ag⁺ und Ca²⁺ aus verschiedenen MBG-Partikeln nach Auslagerung in Wasser. n=3 +/- Standardabweichung

Die bisher in der Literatur beschriebenen silberhaltigen bioaktiven Gläser enthalten 1 und 2 mol % Silber [8], 1, 3 und 5 mol % Silber [9], 5 mol % Silber [10] bzw. 10 mol % Silber [11].

In der vorliegenden Studie wurde die höchste Ag⁺ Freisetzung mit den Gläsern 80S15Ag und 80S4C11Ag erreicht. Der Favorit für die Verwendung in den Zementkompositen wäre somit 80S4C11Ag, da aus diesem MBG neben Ag⁺- auch Ca²⁺-Ionen freigesetzt werden, die u.a. die Differenzierung von Osteoblasten [12] und somit das Einwachsen des Implantats positiv beeinflussen.

3.4. Herstellung und Charakterisierung der Zement-MBG-Komposite

Für die Herstellung der Komposite wurde ein pastöser Kalziumphosphat-Knochenzement der Firma INNOTERE (Radebeul) verwendet [3]. In der Zementpaste sind alle Prekursoren in einer Ölphase dispergiert, durch Kontakt mit wässrigen Medien kann die Mischung zu einem Hydroxylapatit-haltigen Knochenzement ausgehärtet werden. Für die Komposite wurden jeweils 10 % MBG-Partikel zur Zementpaste gegeben. Der erhöhte Feststoffgehalt wurde durch Zugabe zusätzlicher Ölphase ausgeglichen; dadurch konnte die sehr gute Applizierbarkeit des Zementes, auch durch Kanülen, erhalten werden. Die Mischung wurde in Silikonformen gedrückt und bei hoher Luftfeuchtigkeit für 7 Tage bei 37°C ausgehärtet.

Es wurden quaderförmige Proben ($4 \times 4 \times 6 \text{ mm}^3$) und zylindrische Proben ($d = 10 \text{ mm}$, $h = 1 \text{ mm}$) hergestellt. Die Druckfestigkeit der Komposite wurde an den quaderförmigen Proben untersucht (Abb. 10). Alle Komposite wiesen eine etwas geringere Druckfestigkeit auf als der MBG-freie Zement („CPC“).

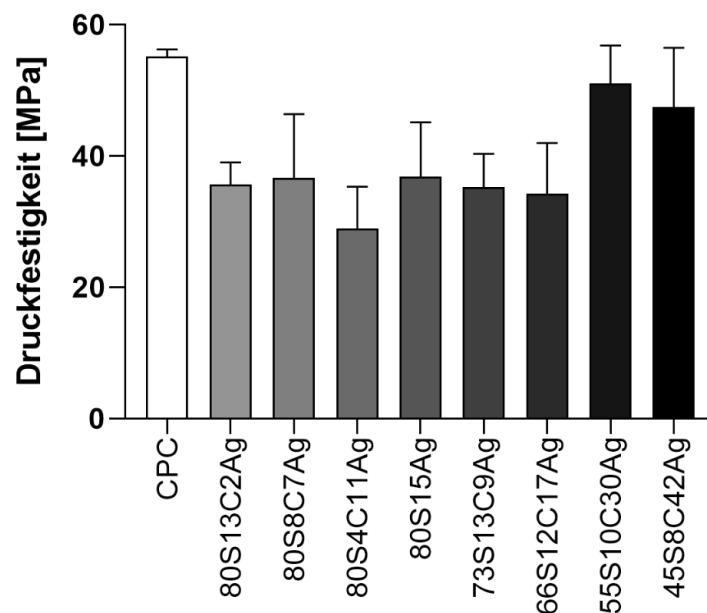


Abb. 10: Druckfestigkeit der Zement-MBG-Komposite. $n=3 \pm$ Standardabweichung

Die Freisetzung von Ag^+ - und Ca^{2+} -Ionen aus den Kompositen wurde nach Auslagerung in Wasser über 14 Tage untersucht. Hierzu wurden die o.g. zylinderförmigen Proben mit je 3.5 ml Wasser geschüttelt und nach 1, 4, 7 und 14 Tagen die Überstände entnommen, in denen mittels ICP-OES die Ag^+ - und Ca^{2+} -Konzentration gemessen wurde (Abb. 11).

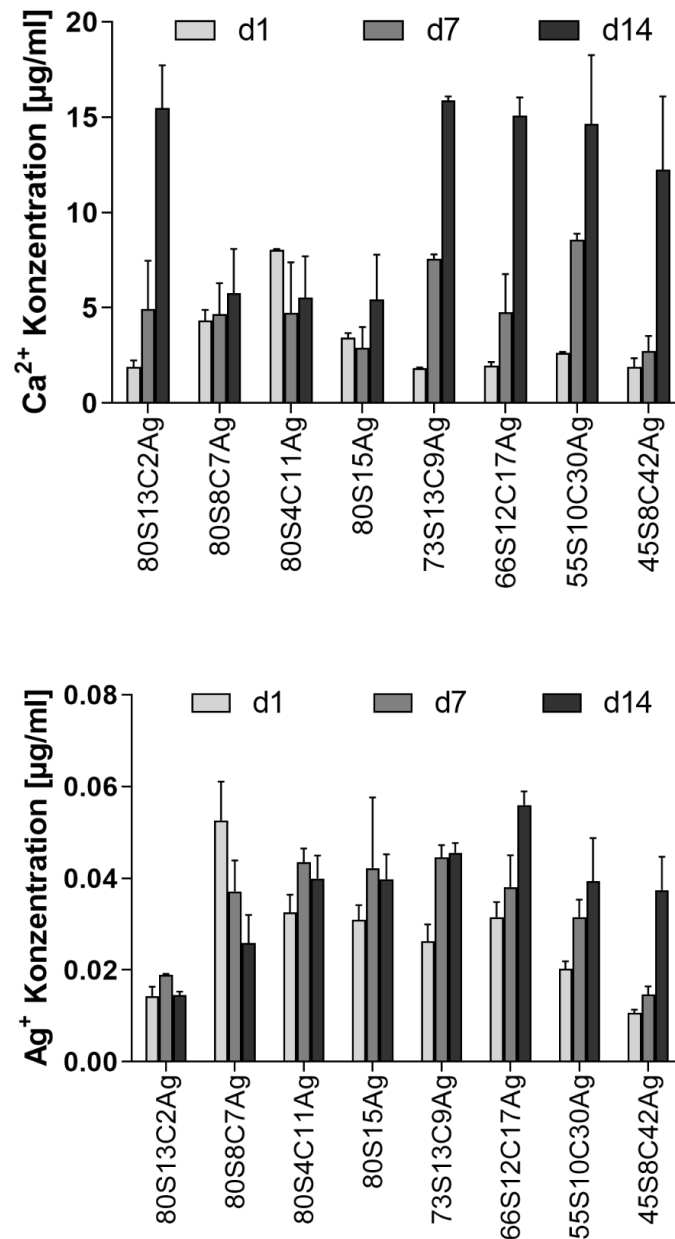


Abb. 11: Freisetzung von Ag⁺ und Ca²⁺ aus den Zement-MBG-Kompositen. n=4, die Überstände zweier Proben wurden für die Messung jeweils vereinigt, +/- Standardabweichung

Die Konzentration beider Ionen ist nach Freisetzung aus den Zement-MBG-Kompositen deutlich niedriger verglichen zur Freisetzung aus reinen MBG-Proben. Während die Ca²⁺-Konzentration in den Überständen der Komposite etwa halb so hoch ist wie in den Überständen der MBG-Partikel, sinkt die freigesetzte Ag⁺-Menge aus den Kompositen im Vergleich zum reinen MBG um zwei Größenordnungen. Dies könnte zum einen auf eine schlechtere Zugänglichkeit der MBG-Partikel im Komposit zurückzuführen sein, andererseits

könnten weitere Auflösungsprodukte der Zemente die Freisetzung von Ag^+ -Ionen verhindern oder dafür sorgen, dass freigesetztes Ag^+ wieder ausfällt.

In weiteren Zellexperimenten mit DPSC wurde die Biokompatibilität für 2 ausgewählte Komposite untersucht, die die stärkste Freisetzung von Ag^+ -Ionen zeigten: 80S4C11Ag und 80S15Ag; als silberfreie Referenz wurde das Komposit 80S15C mitgeführt. Die Zellen konnten auf allen drei Materialien adhärieren und zeigten eine Zunahme der Zellzahl über die Kultivierungszeit (Abb. 12). Die biochemische Analyse der Zellzahl mittels Quantifizierung des DNA-Gehaltes und der LDH-Aktivität bestätigte, dass die erzeugten silberhaltigen Zement-MBG-Komposite keinen zytotoxischen Effekt haben.

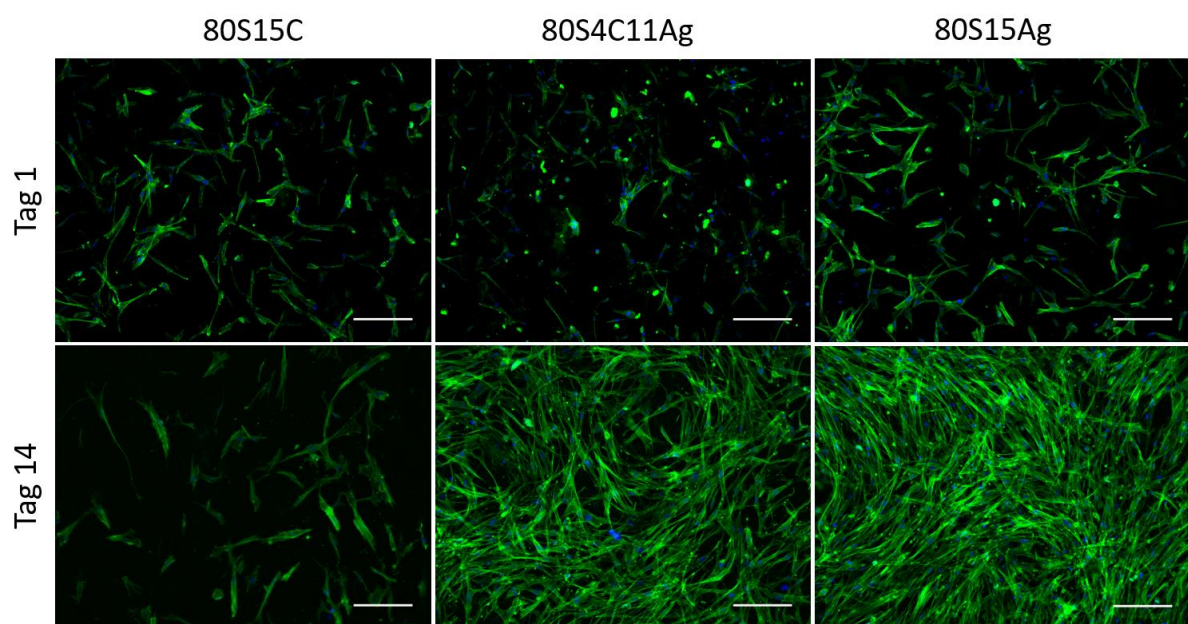


Abb. 12: Wachstum von DPSC auf Zement-MBG-Kompositen unterschiedlicher Zusammensetzung: fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Anfärbung der Aktin-Zellskelette (grün) und Zellkerne (blau).

4. Zusammenfassung und Ausblick

Im vorliegenden Projekt wurden erfolgreich mesoporöse, Ag^+ -freisetzende bioaktive Gläser entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Zugabe von mehr als 15 mol % Silber, sowie eine Reduktion des Siliziumgehalts keine Steigerung der Ag^+ -Freisetzung bewirkt, jedoch die Ausbildung der gewünschten mesoporösen Struktur ausbleibt. Die Favoriten für die weitere Anwendung in Kompositen sind die Gläser 80S4C11Ag und das kalziumfreie 80S15Ag, die neben einer hohen Ag^+ Freisetzung (15-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Wasser) auch eine deutliche mesoporöse Struktur aufweisen.

Das Einbringen der MBG-Partikel (10 Gew.%) in den Zement führte zu Kompositmaterialien die hinsichtlich Applizierbarkeit, Handhabung und Eigenschaften im ausgehärteten Zustand den MBG-freien Zementen vergleichbar sind. Allerdings ist die Ag^+ -Freisetzung aus den Kompositen im Vergleich zu den reinen MBG-Partikeln stark herabgesetzt; es werden keine antibakteriell wirksamen Konzentrationen freigesetzt. Auch wenn das von uns verwendete *in vitro*-Testsystem die komplexe *in vivo*-Situation nicht vollständig widerspiegelt, in der das Implantat in Kontakt mit verschiedenen Körperflüssigkeiten kommt und lokal auch Konzentrationsgradienten eine Rolle spielen können, muss man davon ausgehen, dass die entwickelten Komposite für die anvisierte Anwendung nicht geeignet sind. Aus der jetzigen Sicht erscheinen zwei weiterführende Wege aussichtsreich: (1) Ag^+ -dotierte MBG-Partikel können in andere Biomaterialien eingebracht werden, die die Freisetzung weniger bzw. gar nicht beeinflussen. Dies können z.B. Hydrogele sein – erste Versuche wurden bereits mit Alginategelen durchgeführt, aber auch klinisch zugelassene Biopolymere wie Fibrin sind denkbar. Ein positiver Einfluss von bioaktiven Gläsern auf die Knochenregeneration ist bekannt [13]. (2) MBG-Partikel können aufgrund ihrer Mesoporen sehr effizient mit anderen antibakteriellen Wirkstoffen beladen werden, z.B. mit klassischen Antibiotika, und diese verzögert freisetzen. Hier muss ebenfalls untersucht werden, inwieweit wirksame Dosen erreicht werden können.

Die Testung der antibakteriellen Wirkung von Ag^+ zeigte übereinstimmend zur Literatur, dass bereits Konzentrationen von 1 $\mu\text{g/ml}$ toxisch auf *Staphylococcus aureus* wirken. Allerdings ist einerseits die Wirkung der Ag^+ -Ionen als auch deren Freisetzung aus den Materialien in Gegenwart von Zellkulturmedium deutlich geringer. Dies erklärt sich aus einer Reduktion der Ionenkonzentration im Überstand, da schwerlösliches Silberchlorid ausfällt.

In Zellkulturversuchen mit humanen mesenchymalen Stammzellen und humanen dentalen Pulpastammzellen haben wir gezeigt, dass auch eukaryontische Zellen durch hohe Ag^+ -Konzentrationen (<2.5 $\mu\text{g/ml}$) abgetötet werden. Unsere Daten zeigen, dass es zumindest unter den getesteten *in vitro*-Bedingungen kein Konzentrationsfenster gibt, in dem Bakterien bereits abgetötet, Zellen aber noch vital bleiben. Offen bleibt die Frage, wie sich die Situation *in vivo* darstellt; trotzdem können die Beobachtungen im vorliegenden Projekt als deutlicher Hinweis gewertet werden, dass antibakteriell wirksame Ag^+ -Konzentrationen auch die Zellvitalität beeinträchtigen. Weiterführende Untersuchungen in unserem Labor mit Cerium- und Zinkionen identifizierten Zn^{2+} als aussichtsreiche Komponente für die Entwicklung antibakteriell wirksamer und zellkompatibler Knochenzemente. Für die Entwicklung von Kompositen mit Zn^{2+} -dotiertem MBG stellen die im vorliegenden Projekt gewonnenen Erkenntnisse eine wertvolle Grundlage dar.

Referenzen:

- [1] Striegler C, Schumacher M, Effenberg C, Müller M, Seckinger A, Schnettler R, et al. Dendritic Glycopolymers as Drug Delivery System for Proteasome Inhibitor Bortezomib in a Calcium Phosphate Bone Cement: First Steps Toward a Local Therapy of Osteolytic Bone Lesions. *Macromol Biosci* 2015;15:1283–95. doi:10.1002/mabi.201500085.
- [2] Schumacher M, Henß A, Rohnke M, Gelinsky M. A novel and easy-to-prepare strontium(II) modified calcium phosphate bone cement with enhanced mechanical properties. *Acta Biomater* 2013;9:7536–44. doi:10.1016/j.actbio.2013.03.014.
- [3] Heinemann S, Rössler S, Lemm M, Ruhnnow M, Nies B. Properties of injectable ready-to-use calcium phosphate cement based on water-immiscible liquid. *Acta Biomater* 2013;9:6199–207. doi:10.1016/j.actbio.2012.12.017.
- [4] Jimenez J, Chakraborty I, Rojas-Andrade M, Mascharak PK. Silver complexes of ligands derived from adamantylamines: Water-soluble silver-donating compounds with antibacterial properties. *J Inorg Biochem* 2017;168:13–7. doi:10.1016/j.jinorgbio.2016.12.009.
- [5] Kawahara K, Tsuruda K, Morishita M, Uchida M. Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dent Mater Off Publ Acad Dent Mater* 2000;16:452–5.
- [6] Böcker W, Yin Z, Drosse I, Haasters F, Rossmann O, Wierer M, et al. Introducing a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral gene transfer. *J Cell Mol Med* 2008;12:1347–59. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00299.x.
- [7] Zhu Y, Wu C, Ramaswamy Y, Kockrick E, Simon P, Kaskel S, et al. Preparation, characterization and in vitro bioactivity of mesoporous bioactive glasses (MBGs) scaffolds for bone tissue engineering. *Microporous Mesoporous Mater* 2008;112:494–503. doi:10.1016/j.micromeso.2007.10.029.
- [8] Gholipourmalekabadi M, Sameni M, Hashemi A, Zamani F, Rostami A, Mozafari M. Silver- and fluoride-containing mesoporous bioactive glasses versus commonly used antibiotics: Activity against multidrug-resistant bacterial strains isolated from patients with burns. *Burns* 2016;42:131–40. doi:10.1016/j.burns.2015.09.010.
- [9] Jung J-H, Kim D-H, Yoo K-H, Yoon S-Y, Kim Y, Bae M-K, et al. Dentin sealing and antibacterial effects of silver-doped bioactive glass/mesoporous silica nanocomposite: an in vitro study. *Clin Oral Investig* 2019;23:253–66. doi:10.1007/s00784-018-2432-z.
- [10] Moosazadeh Moghaddam M, Eftekhary M, Erfanmanesh S, Hashemi A, Fallah Omrani V, Farhadihosseiniabadi B, et al. Comparison of the antibacterial effects of a short cationic peptide and 1% silver bioactive glass against extensively drug-resistant bacteria, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*, isolated from burn patients. *Amino Acids* 2018;50:1617–28. doi:10.1007/s00726-018-2638-z.
- [11] Vale AC, Pereira PR, Barbosa AM, Torrado E, Alves NM. Optimization of silver-containing bioglass nanoparticles envisaging biomedical applications. *Mater Sci Eng C* 2019;94:161–8. doi:10.1016/j.msec.2018.09.027.
- [12] Welldon KJ, Findlay DM, Evdokiou A, Ormsby RT, Atkins GJ. Calcium induces pro-anabolic effects on human primary osteoblasts associated with acquisition of mature osteocyte markers. *Mol Cell Endocrinol* 2013;376:85–92. doi:10.1016/j.mce.2013.06.013.
- [13] Hoppe A, Boccaccini AR. Biological impact of bioactive glasses and their dissolution products. *Front Oral Biol* 2015;17:22–32.