

Zentralinstitut für Medizintechnik
Technische Universität München

Entzündungsparameter an oberflächenmodifiziertem TiAl6V4

Sybille Warmuth

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Joachim Heinzl

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. med. Dr.-Ing. habil. Erich Wintermantel
2. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
3. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Horst Kessler

Die Dissertation wurde am 22.03.05 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 15.09.05 angenommen.

Zusammenfassung

Für die erfolgreiche Integration und Verträglichkeit eines Implantates im Körper spielen die Oberflächeneigenschaften der eingesetzten Werkstoffe eine große Rolle. Unmittelbar nach Implantation findet eine Entzündungsreaktion zwischen Werkstoffoberfläche und dem umgebenden Gewebe statt, die wesentlich das Ausmaß der Akzeptanz im Körper bestimmt. Die Modifikation von Implantatoberflächen bietet eine Chance, diese Erstreaktion im Körper positiver zu beeinflussen.

Im Rahmen dieser Arbeit wird ein *in vitro* Untersuchungskonzept zur Biokompatibilitätsprüfung von oberflächenmodifizierten Implantaten aus einer TiAl6V4-Legierung vorgestellt. Dazu werden verschiedene humane Zellkulturmodelle entwickelt und hinsichtlich ihrer Aussagekraft auf die Entzündungsinitialisierung untersucht. Das Prüfmodell wird sowohl an unbeschichteten, als auch protein- und hydroxylapatitbeschichteten Proben erfolgreich angewandt und erweitert damit gängige *in vitro* Biokompatibilitätsuntersuchungen.

Zur Erfassung der Entzündungsantwort wird ein umfangreiches Repertoire an biologischen Parametern untersucht. Dabei erwies sich das Zytokinverhältnis IL-1 β /IL-1ra als aussagekräftig bezüglich der Einschätzung des Entzündungspotentials verschieden modifizierter Implantatoberflächen.

Es wird des Weiteren ein neuer Ansatz zur Ermittlung der Oberflächenkompatibilität vorgestellt, der auf der Annahme besteht, dass bestimmte Rauheitsdimensionen der Implantatoberflächen die Zellreaktion beeinflussen. Diese oberflächenanalytischen Ergebnisse werden vorgestellt und *in vitro* Versuchen gegenübergestellt. Dabei erwies sich insbesondere die Methode der konfokalen Weißlichtmikroskopie als besonders geeignet zur Bestimmung von funktionsrelevanten Oberflächenkenngrößen und liefert damit die Voraussetzung für ein erweitertes Verständnis von Entzündungsprozessen an den Grenzflächen oberflächenstrukturierter Implantate.

Danksagung

Mein großer Dank richtet sich an all diejenigen, die mich während der Arbeit an meiner Dissertation tatkräftig unterstützt und motiviert haben.

Namentlich gilt dieser Dank in erster Linie Herrn Professor Dr. med. Dr.-Ing. habil. Erich Wintermantel für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährten Hilfestellungen. Herrn Professor Dr. Horst Kessler gebührt mein Dank für die Bereitschaft, das Manuskript als Zweitgutachter wissenschaftlich zu beurteilen.

Großer Dank geht ebenfalls an Herrn Dr. Joachim Aigner für die großzügigen Hilfestellungen bei allen biologischen Belangen. Durch die Gewährung meines eigenen Freiraumes war es mir möglich, Schwerpunkte zu setzen und entwickeln zu können. Mein Dank gilt auch allen Kolleginnen und Kollegen, sowie Studenten und Hilfskräften, die mich in meiner Arbeit tatkräftig unterstützt haben. Insbesondere geht dieser Dank an Frau Ursula Hopfner, Frau Susanne Schnell-Witteczek, Frau Dr. Michaela Kosmann, Herrn Dipl.-Ing. Robert Metzke und Herrn Michael Vogel.

Ferner bin ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft DFG für die finanzielle Unterstützung des teilweise begleiteten Forschungsvorhabens zu Dank verpflichtet. Zum Gelingen dieser Arbeit trug auch wesentlich die intensive interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen den Bereichen der Werkstoffwissenschaft, der Physik und der Feinmesstechnik bei.

Der Arbeitsgruppe Biomaterialien, insbesondere Frau Dr. Susanne Bierbaum und Herrn Dr. Thomas Hanke aus dem Institut für Werkstoffwissenschaft der TU Dresden und dem Max-Bergmann-Zentrum für Biomaterialien in Dresden verdanke ich die rasterelektronen- und atomkraftmikroskopischen Aufnahmen der biologisierten TiAl6V4-Oberflächen. Mein herzlicher Dank geht besonders an Herrn PD Dr. Dieter Scharnweber, der diesen Kontakt ermöglichte, mir jederzeit Hilfestellungen und zahlreiche Anregungen gab.

Frau Dr. Susanne Guder, Lehrstuhl für Werkstoffkunde und Werkstoffmechanik der TU München, verdanke ich die Präparation und die Querschnittsaufnahme der gestrahlten TiAl6V4-Probe am Rasterelektronenmikroskop.

Die Elastische Rückstoß Detektions Analyse wurde durch die Unterstützung von Herrn PD Dr. Walter Assmann am 15 MV Tandembeschleuniger, einer gemeinsamen Einrichtung der beiden Münchener Universitäten, ermöglicht. Die Messungen und Auswertungen führte Herr Dr. Andreas Bergmeier durch.

Die kristallographischen Untersuchungen mittels Diffraktometer erfolgten am Lehrstuhl für Experimentalphysik IV der Universität Augsburg durch Herrn Dipl.-Phys. Timo Körner und Herrn Dr. Andreas Heinrich.

Für statistische Fragen konnte ich auf die Beratung von Frau Dipl.-Stat. Regine Hollweck, Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der TU München, zurückgreifen.

Die Messungen am konfokalen Weißlichtmikroskop $\mu\text{Surf}^{\text{®}}$ wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Rainer Brodmann (NanoFocus AG, Ettlingen, Deutschland) durchgeführt. Diese Messwerte waren die Grundlage für die Berechnungen von funktionellen Kenngrößen, die dankenswerterweise in mehreren „Nachtschichten“ von Herrn Dipl.-Ing. Rene Pleul, der Firma TEQ GmbH in Chemnitz durchgeführt wurden.

Ich möchte mich auch noch einmal ausdrücklich für die zahlreichen informativen Gespräche bezüglich der Oberflächenanalytik bei Herrn Dr. Christian Beck und Herrn Rene Pleul (TEQ GmbH, Chemnitz, Deutschland), sowie Herrn Dipl.-Ing. Uwe Popp (Lehrstuhl für Fertigungstechnologie, Universität Erlangen-Nürnberg) bedanken.

Nicht vergessen möchte ich meine Familie und Freunde, die mich die ganze Zeit begleitet und unterstützt haben. Vielen Dank.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND KENNTNISSTAND	3
1.1	Biokompatibilität	3
1.2	Modifikation von Implantatoberflächen	5
1.3	Titan und die TiAl6V4-Legierung	8
1.4	Die Entzündungsphase im Verlauf der Wundheilung	9
1.5	Zytokine	12
1.6	Die Rolle von Entzündungsparametern im Zuge der Wundheilung	14
2	MOTIVATION UND ZIEL DER STUDIE	17
3	WERKSTOFF UND UNTERSUCHUNGSMETHODEN	18
3.1	Experimentelle Vorgehensweise	18
3.2	Herstellung modifizierter TiAl6V4-Oberflächen	18
3.3	Charakterisierung der Oberflächenbeschaffenheit	24
3.4	Zellkulturversuche	30
3.5	Auswahl funktionsrelevanter Oberflächenkenngrößen	34
4	ERGEBNISSE	37
4.1	Strukturierte TiAl6V4-Oberflächen	37
4.2	Biologisierte TiAl6V4-Oberflächen	55
4.3	Spenderabhängiges Verhalten der Monozyten/Makrophagen	64

5	BEWERTUNG DER ERGEBNISSE	67
5.1	Bewertung der Ergebnisse oberflächenstrukturierter TiAl6V4-Proben.....	67
5.2	Bewertung der Ergebnisse biologisierter TiAl6V4-Proben	73
6	DISKUSSION	78
6.1	Strukturierte TiAl6V4-Oberflächen.....	78
6.2	Geometrische Oberflächenanalyse	80
6.3	Biologisierte Oberflächen	83
6.4	Positivkontrollen	88
6.5	Entzündungspotential	89
7	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	91
8	LITERATURVERZEICHNIS	94
9	ANHANG	106
9.1	Biologische Nachweisverfahren	106
9.2	Statistische Verfahren	109
9.3	Tabellen und Abbildungen.....	110
10	LEBENS LAUF	116

1 Einleitung und Kenntnisstand

1.1 Biokompatibilität

Der Einsatz von Biomaterialien ist heute in der Medizin Bestandteil der alltäglichen klinischen Praxis. Der Begriff *Biomaterial* lässt sich folgendermaßen definieren: „A non-viable material, used in an medical device, intended to interact with biological systems“ [1]. Biomaterialien bzw. Biowerkstoffe, natürlichen oder synthetischen Ursprungs, dienen demzufolge als Ersatzstoffe, aus denen biologische Ersatzteile hergestellt werden können [2]. Sie finden als Bauteile von Implantaten und Prothesen in der Medizin seit langer Zeit Verwendung und die meisten Menschen kommen mit ihnen bewusst oder unbewusst in Kontakt (Abbildung 1-1).

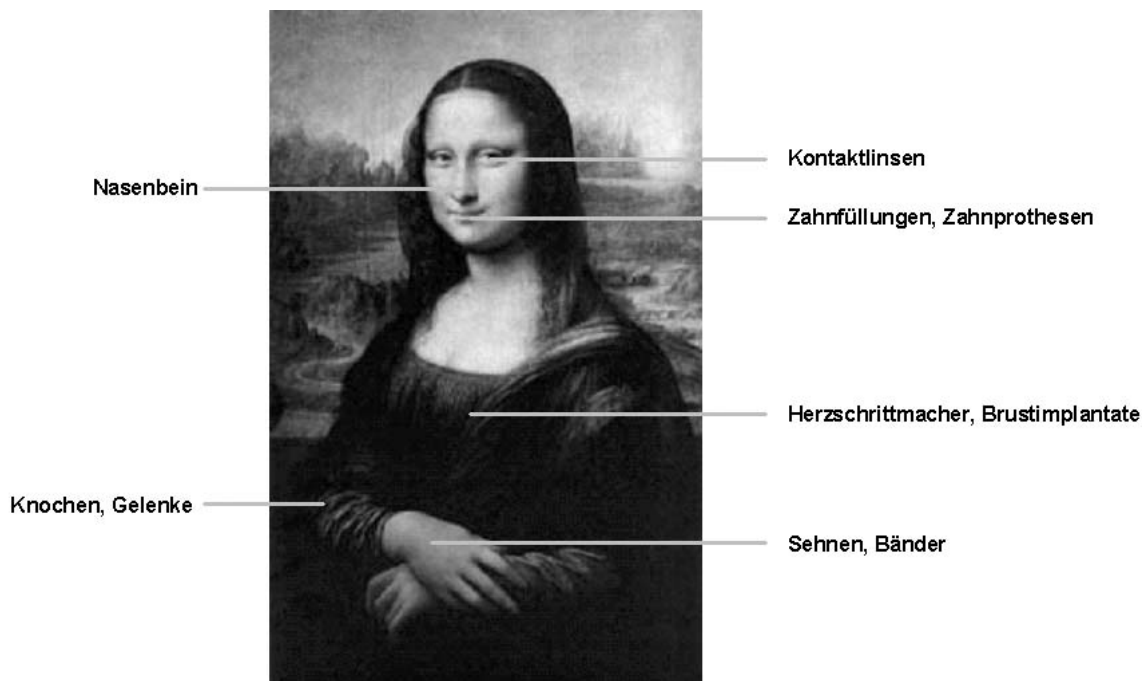


Abbildung 1-1 Die Einsatzmöglichkeiten von Biomaterialien (Mona Lisa von Leonardo da Vinci).

Knochenbrüche werden heute meist mit metallischen Drähten, Nägeln, Schrauben und Platten behandelt, degenerierte Gelenke werden durch Endoprothesen ersetzt und verlorene Zähne können durch metallische Implantate ersetzt werden, um nur einige Beispiele zu nennen.

Neben Langzeit-Implantaten wie Hüftgelenke und Zahnprothesen kommen auch Biomaterialien mit kürzerer Kontaktzeit, wie z.B. chirurgisches Nahtmaterial oder diagnos-

tische Instrumente zum Einsatz. Ein weiteres, zunehmend an Bedeutung gewinnendes Anwendungsgebiet stellen die Systeme mit kontrollierter Wirkstoffabgabe (Drug-Release-Systeme) dar [3].

Neben der Funktionalität des Werkstoffs muss die Verträglichkeit mit dem umgebenden Gewebe sichergestellt werden. Die entwickelten Biomaterialien müssen *biokompatibel* sein, d.h. für den Körper verträglich. Bioverträglich sind sie dann, wenn sie keine Immun- und Entzündungsreaktionen auslösen. *Biokompatibilität* kann folgendermaßen definiert werden: “The ability of a material to perform with an appropriate host response in a specific application” [1]. Der sehr komplexe Begriff *Biokompatibilität* umfasst somit zahlreiche Aspekte, wie z.B. Zytotoxizität, Entzündungspotential und Kanzerogenität. Entscheidend für die Gewebeverträglichkeit eines Implantates sind Struktur- und Oberflächenkompatibilität. Das heißt Implantatstruktur und Implantatoberfläche sollte an das Empfängerewebe angepasst werden, also ein Werkstoff-Mimikry muss angestrebt werden [3].

Neben der Grundeigenschaft des Biomaterials besitzen vor allem die Oberflächen, durch ihre chemischen und topographischen Eigenschaften [4,5] für die Funktionalität eines Implantates entscheidende Bedeutung, da nach der Implantation der erste Kontakt im Körper über die Werkstoffoberfläche erfolgt. Die sich dabei ausbildenden Grenzflächen sind für die anfänglichen Reaktionen, wie z. B. die Fremdkörperreaktion ausschlaggebend. In Abhängigkeit vom verwendeten Biomaterial und der Art und dem Ort der Applikation folgt neben dem Kontakt mit Wasser und Ionen eine Proteinadsorption [6,7]. Entscheidend für die Proteinkonformation (natürliche Faltung, nativ oder denaturiert) sind die physikalisch-chemischen Oberflächeneigenschaften des Implantates. Erst danach treten Zellen (Leukozyten) mit dieser gebildeten Protein-Implantat-Grenzschicht in Wechselwirkung, wobei gleichzeitig komplexe Adsorptionsprozesse ablaufen. Die Zusammensetzung des Biofilms und der Zustand der gebundenen Proteine werden von den Zellen, die das Fremdmaterial umgeben, erkannt und steuern die Zelladhäsion am Substrat sowie deren Differenzierung und Vitalität. Wünschenswert sind daher geeignete Bearbeitungsverfahren, die die Implantatoberflächen so modifizieren, dass das Verhalten von Zellen in eine erwünschte Richtung gesteuert werden kann. Voraussetzung dafür sind jedoch Arbeiten zur Charakterisierung der stofflichen und geometrischen Oberflächenbeschaffenheit technischer Oberflächen.

Ein wichtiges Verfahren zum Studium der Biokompatibilität ist die Untersuchung auf der Ebene von Zellkulturen. Die *in vitro* Testung kann komplexe Prozesse, wie die der Wundheilung und Entzündungsreaktion vereinfachen und erlaubt einem eine Schritt für Schritt Beobachtung der Interaktion zwischen Zellen und Implantatoberflächen. Die Zellen fungieren dabei als Biosensoren.

Biokompatibilität als Messgröße lässt sich jedoch nicht allein durch *in vitro* Untersuchungen quantifizieren. Gründe hierfür liegen in der Komplexität des Sachverhaltes und der unterschiedlichen Bewertungs- und Betrachtungsweisen. Je nach späterem Einsatzort eines Implantates wird der Begriff Biokompatibilität unterschiedlich definiert. Während man in der Orthopädie bei den Endoprothesen ein maximales Anwachsen von Knochenzellen fördern will [8], möchte man z. B. bei Stents (Gefäßimplantat zur Aufdehnung von Herzkranzgefäßen) die Zelladhäsion möglichst unterdrücken [9]. Diese Beispiele verdeutlichen, dass die erwünschten Wechselwirkungen zwischen Implantat und umgebenden Gewebe vom jeweiligen Einsatzgebiet des Biomaterials abhängig sind.

1.2 Modifikation von Implantatoberflächen

Das Ziel der Veränderung von Biomaterialoberflächen liegt in der optimalen Anpassung der Oberflächeneigenschaften von Werkstoffen an die spezifischen Anforderungsbedingungen. Dies kann auf verschiedenen Wegen erreicht werden: durch physikalisch-chemische Veränderung von Implantatoberflächen und durch Beschichtung mit biologischen Komponenten.

1.2.1 Strukturierung

1.2.1.1 Strukturierung mittels physikalisch-chemischer Methoden

Das Zellverhalten, wie Anhaftung, Proliferation und Differenzierung wird maßgeblich durch die Oberflächeneigenschaften eines Implantates beeinflusst [4,10]. Zu den entscheidenden Oberflächeneigenschaften zählen typische Charakteristika, wie Benetzbarkeit und Textur, aber auch die Oberflächengeometrie und Rauigkeit [11].

Die Strukturierungsmöglichkeit von Biomaterialien reicht von Millimetern bis in den Nanometerbereich. Eine Oberflächenstrukturierung kann durch auftragende (Titan-Plasma-

Spraying) oder abtragende Verfahren erreicht werden. Derzeit gängige abtragende industrielle Verfahren stellen das mechanische Aufrauen durch Strahl-Partikel (Strahlverfahren) oder die chemische Behandlung mit Ätzlösungen dar. Aber auch die Oberflächenbehandlung mit Lasern [12-15] und lithographische Verfahren [16] gewinnen immer mehr an Bedeutung.

Die Aufrauung richtet sich vorwiegend auf die Verbesserung des Einwachsens von Hartgewebe. Zahlreiche Autoren zeigten im Tierversuch, dass bestimmte strukturierte Oberflächen sich günstig auf das Einheilverhalten im Knochen auswirkten [17-21]. Im Vergleich zu maschinell bearbeiteten glatten Implantatoberflächen wiesen aufgeraute Oberflächen eine dichtere Knochenanlagerung mit signifikant erhöhten Ausdrehkräften in einem Removal Torque Test auf, was für eine erhöhte Osseointegration spricht [22-24]. Derartig behandelte Implantate werden vor allem im dentalen Bereich, aber auch für Endoprothesen eingesetzt. Die optimale Morphologie und der genaue Grad der Rauigkeit für ein steuerbares Einwachsen von Zellen sind jedoch noch weitgehend unbekannt.

1.2.2 Biologisierung

1.2.2.1 Biologisierung mit anorganischen Substanzen

Bekanntestes und schon länger praktiziertes Beispiel für die Beschichtung von Implantaten ist der Einsatz von Hydroxylapatit als aktive biologische Beschichtung auf chirurgischen und zahnmedizinischen Implantaten [25-29]. Calciumphosphate stellen eine der wesentlichsten anorganischen Komponenten in physiologischen Hartgeweben, wie Knochen und Zähne, dar. Strukturell handelt es sich hauptsächlich um niedrig kristalline nicht stöchiometrische Apatitphasen $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F}, \text{Cl}, \text{OH})]$, die auch Anteile von Natrium, Magnesium und Karbonat enthalten können. Zur Bezeichnung der Calciumphosphate wurden Abkürzungen eingeführt. Entscheidende Parameter sind dabei das molare Ca:P-Verhältnis und die Löslichkeit in Wasser. Beispiele hierfür sind die gelegentlich dem Knochenzement zugesetzten Calciumphosphate: Dicalciumphosphat-Dihydrat *DCPD* $[\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ = Brushit], β -Tricalciumphosphat *β -TCP* $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ und das amorphe Calciumphosphat *ACP* [30]. Stöchiometrisch reines Hydroxylapatit *HA* $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})]$ kommt in biologischen Systemen nicht vor, wird jedoch häufig als biologisch aktive Beschichtung verwendet, da es dem „biologischen Apatit“ sehr nahe kommt. Das wahre Knochenmineral

stellt chemisch ein Calcium-defizitäres Hydroxylapatit *CDHA* dar, der durch Einbau von Fremdionen und Kristallwasser gekennzeichnet ist [31].

Mehrere Arbeitsgruppen untersuchen die Biomineralisierungsprozesse auch hinsichtlich des Einsatzes von verschiedenen Calciumphosphat-Phasen in der Medizintechnik [32,33]. Zur Apatitbeschichtung werden derzeit zwei Verfahren praktiziert: das Aufbringen von geschmolzenem Phosphat durch Hochtemperatur-Plasmaspritzen [34] und die Abscheidung aus übersättigten Calciumphosphatlösungen [33,35]. Insbesondere die elektrochemisch gestützte Abscheidung von HA und dessen Kopplung mit Knochenproteinen zur Herstellung biomimetischer Knochenersatzmaterialien besitzt ein großes Potential für die Medizintechnik und wird derzeit intensiv untersucht [36].

1.2.2.2 Biologisierung mit organischen Substanzen

Die Immobilisierung von biologischen Elementen des lokalen Umgebungsgewebes, wie der extrazellulären Matrix (EZM), als biologische Komponenten auf Implantatoberflächen, stellt gegenüber dem Einsatz von Hydroxylapatitbeschichtungen ein erst in den letzten Jahren bearbeitetes Forschungsgebiet dar.

Die Entwicklung von Zellen, wie z.B. die Proliferation und Differenzierung in einem Gewebe, wird durch die Wechselwirkungen der Zellen mit ihrer Umgebung, der extrazellulären Matrix (EZM), beeinflusst.

Die EZM stellt ein komplexes Maschenwerk aus Proteinen und Polysacchariden dar (Abbildung 1-2). Wesentliche Proteinkomponenten sind die hoch viskösen Proteoglykane (Hyaluronsäure), die Faserproteine der verschiedenen Kollagene und die löslichen Matrixmoleküle (z.B. Fibronectin) [37]. Das Netzwerk umgibt die Zellen, wird von ihnen sezerniert und dient der Kommunikation zwischen Zellen, als Reservoir für zahlreiche Hormone sowie zur räumlichen Trennung der Gewebe [38]. Den verschiedenen Bestandteilen der EZM kommt eine zentrale Bedeutung hinsichtlich der Zellregulation zu. Die EZM ist damit indirekt an einer Induktion oder Inhibition von Signalübertragungsprozessen beteiligt. Die Kenntnis dieser Prozesse ist von großer Wichtigkeit für das Verständnis der Grenzflächenprozesse. Durch eine Beschichtung von Implantaten mit

derartigen Komponenten kann die natürliche Grenzflächenumgebung imitiert und das Zellverhalten gesteuert werden [39,40].

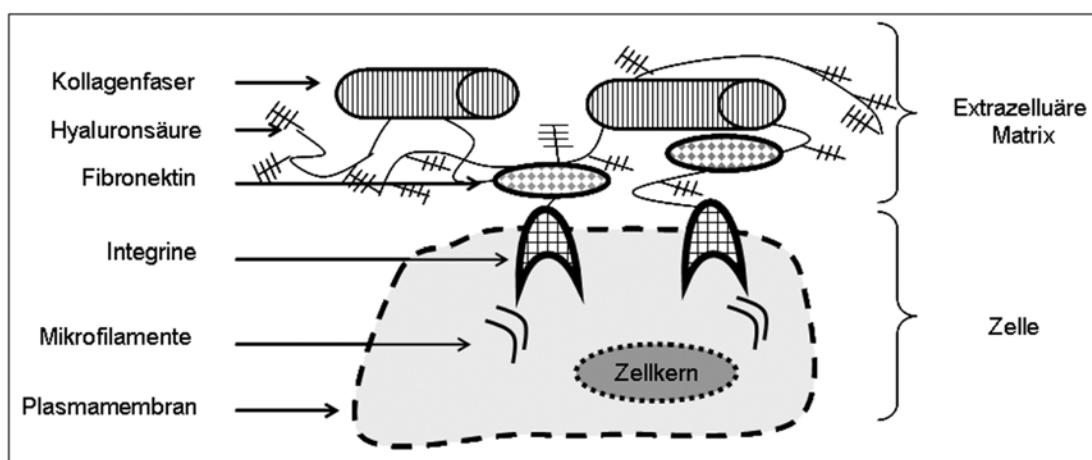


Abbildung 1-2 Die schematische Darstellung der Extrazellulären Matrix (EZM).

Neben dem Beschichten von vollständigen Matrixproteinen, wie Kollagen und dem Adhäsionsprotein Fibronectin [41-44] werden, begünstigt durch die Fortschritte der Molekularbiologie, auch synthetische Peptidsequenzen zur spezifischen Bioaktivierung von Implantaten verwendet [45-48].

1.3 Titan und die TiAl6V4-Legierung

Werkstoffkundlich lassen sich vier Hauptklassen von Biomaterialien unterscheiden: metallische, keramische, polymerchemische und biomolekulare Werkstoffe. Die hauptsächlich in der Orthopädie und Dentaltechnik eingesetzten Biwerkstoffe sind Keramiken und Metalle. Unter den Metallen kommen vor allem reines Titan (Ti) und Titanbasislegierungen als chirurgisches Implantatmaterial zum Einsatz. Sie dominieren aufgrund ihrer hohen Korrosionsbeständigkeit [49] und der günstigen Elastizität und Wechsellastfestigkeit im Bereich mechanisch belasteter Implantate [50].

Die gute Verträglichkeit und die Korrosionsfestigkeit von Titanimplantaten gründet auf der Bildung von Oxidschichten, die sich spontan bilden, geringe Löslichkeitsprodukte aufweisen und damit passivierend im Körper wirken [49,51,52]. Diese Passivschicht besteht hauptsächlich aus Titanoxiden und beträgt anfänglich nur wenige Nanometer (5-10 nm) [53,54]. Sie kann durch elektrochemische anodische Oxidation bis auf 200 nm verdickt werden [55].

Vom chemisch-biologischen Gesichtspunkt aus stellt die Passivschicht eine funktionelle Keramik dar. Es konnte verschiedentlich gezeigt werden, dass die Zusammensetzung, der Kristallzustand und die Dicke der Oxidschicht Einfluss auf die biologische Reaktion nehmen [19,56-58].

Eigenschaft	TiAl6V4
Dichte	4,42 g/cm ³
Elastizitätsmodul	110-114 GPa
Dauerfestigkeit	440-690 MPa
Zugfestigkeit	850-1120 MPa

Tabelle 1-1 Die Eigenschaften der Legierung TiAl6V4 (modifiziert nach [50]).

Durch Zusetzen von Elementen können die mechanischen Eigenschaften von Reintitan erheblich verändert werden. Die TiAl6V4-Legierung zählt neben TiAl6Nb7 zu den Legierungen, die sich im klinischen Einsatz bewährt haben. Bei der TiAl6V4-Legierung handelt es sich um eine Alpha-Beta Phasen Legierung. Einige wichtige Eigenschaften, die diese Legierung als Knochenersatzmaterial attraktiv machen, sind in Tabelle 1-1 aufgelistet. Für weitergehende Detailinformationen wird auf Spezialliteratur verwiesen [50].

1.4 Die Entzündungsphase im Verlauf der Wundheilung

Alle Implantatmaterialien lösen je nach Art des Werkstoffes und der Lokalisation im Körper Entzündungsreaktionen unterschiedlichen Grades aus [59]. Dabei wirkt das mechanisch-chirurgische Einbringen der Fremdwerkstoffe ursächlich mit.

Die Entzündungsreaktion stellt eine Phase im komplexen Verlauf der Wundheilung dar (Abbildung 1-3). Nach der Implantatinsertion sind mehrere biologische Systeme, wie z.B. die Blutgerinnungskaskade, das Komplement- und das Immunsystem beteiligt [60]. Anfänglich kommt es zur Exsudation und zum Abbau von zerstörtem Gewebe. Nachfolgend wird die Reparatur mittels Bindegewebszellen eingeleitet und soweit möglich die ursprüngliche Gewebssituation wiederhergestellt. Daran beteiligt sind auch Prozesse wie die Neubildung von Blutkapillaren, die Vermehrung von Bindegewebs- und Epithelzellen und die Bildung kollagener Fasern [61]. Insbesondere die Angiogenese, die Bildung neuer Blutgefäße aus vorbestehenden Gefäßen [62], ist für eine ungestörte Wundheilung und damit letztendlich für den Implantaterfolg entscheidend.

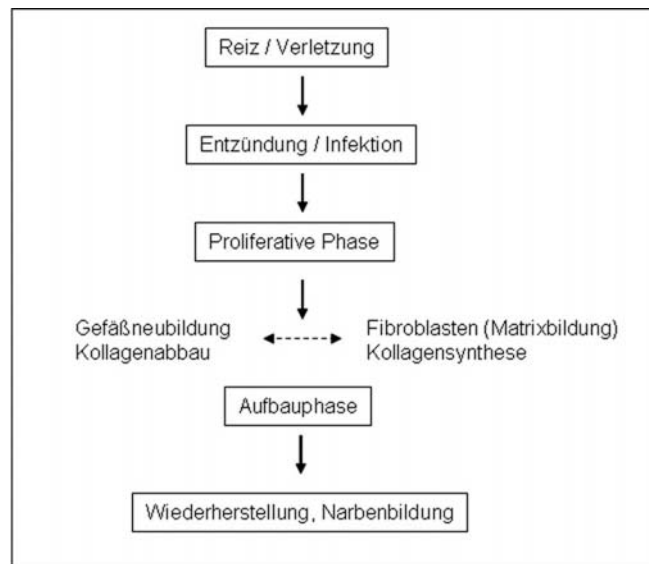


Abbildung 1-3 Der schematische Verlauf der Wundheilung (modifiziert nach [60]).

Die Entzündungsreaktion, als ein Teil der Wundheilung, kann auch als Abwehrreaktion des Organismus gegen fremde Reize wie z.B. durch Fremdkörper, Mikroorganismen und chemische Noxen verstanden werden. Dem Entzündungsprozess folgen verschiedene lokale Prozesse wie z.B. Durchblutungsstörungen und allgemeine Abwehrreaktionen wie z.B. Fieber und Immunreaktionen des Körpers. Die Entzündungsreaktion hat die Beseitigung des Reizes, dessen Auswirkungen und die Wiederherstellung des Ausgangszustandes zum Ziel (Abbildung 1-4). Symptome einer entzündlichen Reaktion stellen Rötung, Schwellung, Erwärmung und Schmerz dar.

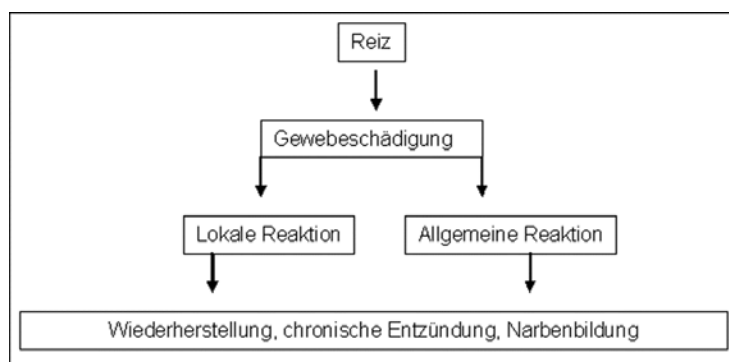


Abbildung 1-4 Der schematische Verlauf einer Entzündungsreaktion.

Im Zuge dieser Reaktion des Körpers werden Leukozyten an den Ort der Entzündung angezogen [37]. Dabei verursacht eine Vielzahl von Molekülen (wie z.B. Serotonin, Histamin etc.) eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität und Vasodilatation. Infolge dessen können

weiße Blutzellen, wie neutrophile Granulozyten und Monozyten aus den Blutgefäßen in das Gewebe austreten (Abbildung 1-5).

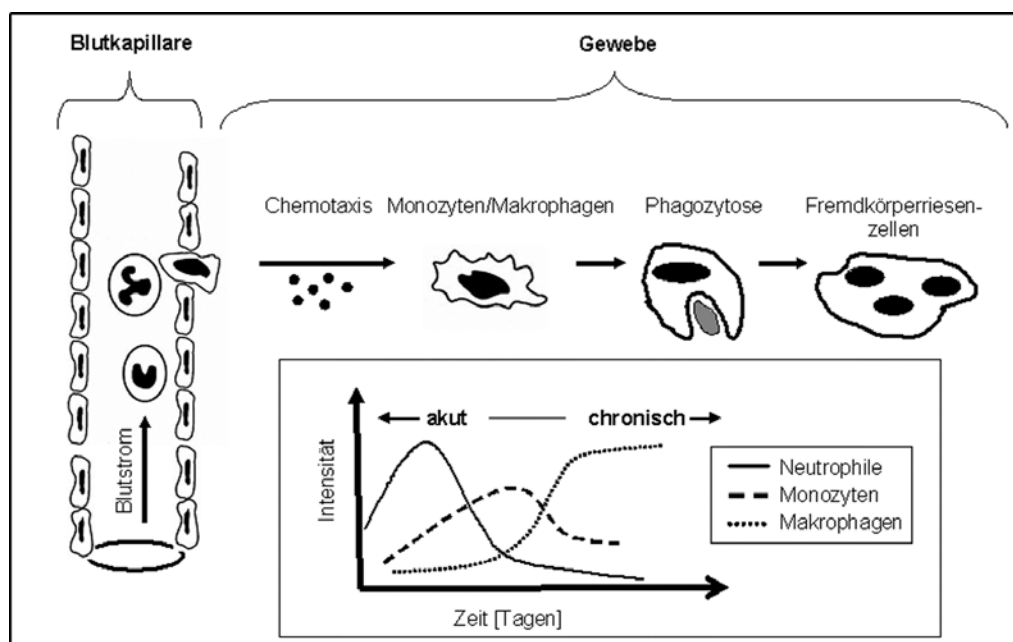


Abbildung 1-5 Die zellulären Reaktionen von Leukozyten und deren zeitliches Auftreten im Zuge einer Entzündungsreaktion (modifiziert nach [63]).

Die Wanderung zum Ort des Reizes erfolgt mittels Lockstoffen entlang eines chemischen Gradienten. Im betroffenen Gewebe kommen dann die Granulozyten und Monozyten ihrer Hauptaufgabe, der Phagozytose nach, d.h. dem Beseitigen von Mikroorganismen, Partikeln oder Zelltrümmern. Die Phagozyten besitzen deshalb auf ihrer Oberfläche ein ganzes Spektrum spezialisierter Rezeptoren, deren Funktion an den Phagozytose-Apparat gekoppelt ist.

Erreichen die Blutzellen, insbesondere die Zellen des phagozytierenden Systems, nicht die vollständige Entfernung des geschädigten Gewebes, bzw. des Fremdkörpers, kommt es zur chronischen Entzündung. Im Falle des implantierten Fremdkörpers wird dieser vom übrigen Organismus fibrös abgekapselt, im Sinne einer Exterritorialisierung [64]. Dabei können die aus Monozyten differenzierten adhärenen Makrophagen unter verschiedenen Einflüssen zu mehrkernigen Fremdkörper-Riesenzellen fusionieren [65,66].

Im Gegensatz zur akuten Entzündungsphase, die meist heftiger als die chronische verläuft, kann die chronische Entzündungsreaktion bis zu mehreren Monaten oder sogar Jahren andauern.

1.5 Zytokine

Der komplexe Entzündungsmechanismus der Leukozyten umfasst nach der Implantation von Ersatzmaterialien Transmigrationsprozesse aus dem Blut und Adhäsionsvorgänge an der Werkstoffseite [67,68]. Im Verlauf dieser Vorgänge werden von mononukleären Zellen, insbesondere den Monozyten/Makrophagen, eine Vielzahl von Signalstoffen, so genannte Zytokine, produziert [69].

Zytokine sind hormonähnliche körpereigene Botenstoffe, die als niedermolekulare Eiweißstoffe mit einem Molekulargewicht < 5 kDa der Kommunikation und Signalgebung der Zellen dienen [70,71]. Ihr Wirkungsspektrum liegt im pico- bis femtomolaren Konzentrationsbereich. Dasselbe Zytokin kann von mehreren Zelltypen gebildet werden (Pleiotropismus). Die Botenstoffe können redundant sein, d.h. sich in ihrem Wirkungsspektrum überlappen. Die Mediatoren sind multifunktionell, sie können mit anderen Mediatoren kooperieren (Synergie) oder sich sogar gegensätzlich verhalten (Antagonismus). Zytokine können auf die produzierende Zelle selbst wirken (autokrin), auf einen anderen Zelltyp in der unmittelbaren Umgebung (parakrin) oder in der weiteren Umgebung (endokrin).

Unter dem Begriff Zytokin werden Interleukine, Interferone und Wachstumsfaktoren zusammengefasst. Die Namensgebung und Einteilung ist aus historischen Gründen nicht einheitlich und wechselt zwischen einfacher Numerierung, wie z.B. beim Interleukin-10 (IL-10) oder der auslösenden Wirkung, wie beim Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α). Die Polypeptidmediatoren können auch nach ihrer entzündlichen Wirkung eingeteilt werden. So unterscheidet man zwischen entzündungshemmend (antiinflammatorisch) und entzündungsfördernden (proinflammatorisch) Zytokinen.

Zytokine wirken entzündlich, wenn sie z.B. Signale an das Knochenmark zur verstärkten Bildung von Leukozyten und deren Freisetzung im Blutstrom liefern, auf das Skelettsystem einwirken [72] oder die Fibro- und Angiogenese beeinflussen [69]. Der Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α) und Interleukin-1beta (IL-1 β) stehen als „early response cytokines“ [73] am Anfang der inflammatorischen Kaskade und werden hauptsächlich von Monozyten/Makrophagen gebildet. Ebenfalls proinflammatorischen Charakter weisen Interleukin-6 (IL-6) und Interferon-alpha (IFN- α) auf. Ihnen ist mehr oder weniger gemeinsam, dass diese Botenstoffe neben weiteren Monozyten/Makrophagen auch weitere

Zelltypen (Fibroblasten, Epithelzellen) aktivieren, die ihrerseits wieder inflammatorische Zytokine produzieren (Tabelle 9-1) und damit die inflammatorische Kaskade vorantreiben [70].

Die Zytokine wirken über einen membranständigen Rezeptor mit dem zytoplasmatischen Anteil. Nach der Bindung eines Zytokins an den Rezeptor werden verschiedene intrazelluläre Reaktionen ausgelöst (Abbildung 1-6).

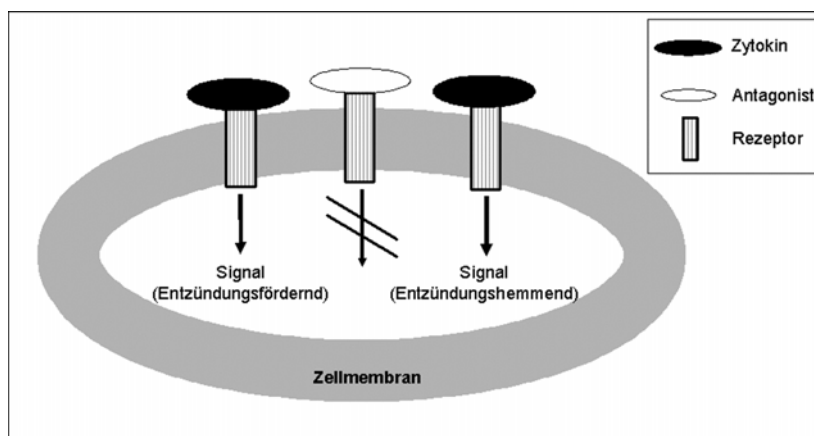


Abbildung 1-6 Das Prinzip der Signalauslösung durch Zytokine (Zeichenerklärung rechts oben).

Neben den Zytokinen, die bestimmte Signale (proinflammatorisch/antiinflammatorisch) in der Zelle auslösen können, gibt es auch Inhibitoren, die als Antagonisten zwar am Rezeptor anbinden können, aber kein Signal auslösen [74-76] (Abbildung 1-6). So wird beispielsweise die Wirkung von Interleukin-1beta (IL-1 β) natürlicherweise durch den IL-1 Rezeptorantagonisten (IL-1ra) reguliert. Beide konkurrieren um die Bindung an den Rezeptor der Zielzellmembran. Je höher die Konzentration IL-1ra ist, desto weniger IL-1 β Moleküle können an den Rezeptor binden und umgekehrt. Demzufolge besitzt der Interleukin-1 Rezeptorantagonist entzündungshemmende Wirkung. Das Verhältnis IL-1 β /IL-1ra liefert damit Hinweise auf die Balance zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Mediatoren [77,78].

Das Verhältnis zwischen Interleukin und seinem Antagonisten kann bei verschiedenen Krankheitsbildern gestört sein. Die therapeutische Anwendung von Zytokinen hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen [79,80]. Durch Verabreichung von spezifischen Zytokinen wird versucht, die bestehende Zytokin-Disbalance, die zu einem Krankheitsbild führt, auszugleichen und damit die Krankheit zu therapieren [81,82]. Auch für den Verlauf

einer Entzündung ist das Gleichgewicht zwischen proinflammatorischer und antiinflammatorischer Wirkung ausschlaggebend (Abbildung 1-7).

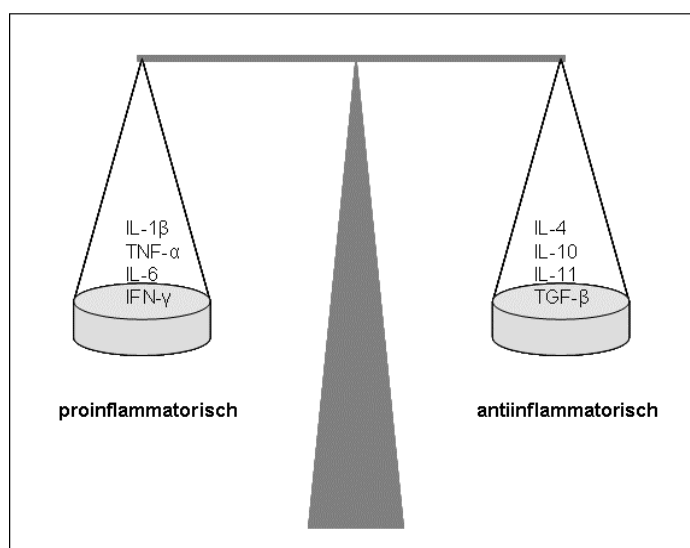


Abbildung 1-7 Eine ausgeglichene Zytokinproduktion ist für den positiven Verlauf einer Entzündung während der Wundheilung entscheidend.

1.6 Die Rolle von Entzündungsparametern im Zuge der Wundheilung

Nach Einbringen eines Implantates entstehen infolge des chirurgischen Eingriffes Gewebsverletzungen, die im Implantationslager eine Wundheilung auslösen. Die Einheilung des Implantates wird durch eine Reparaturphase eingeleitet, die die Gewebe der Implantatumgebung erneuern, reorganisieren und umstrukturieren. Blutergüsse und Nekrosen werden entfernt und aus undifferenziertem Bindegewebe differenziert sich neues Gewebe. Auch die Prozesse der Angiogenese, d.h. die Neubildung von Blutgefäßen aus bestehenden Gefäßen spielen bei der Wundheilung um implantierte Prothesen eine entscheidende Rolle [62].

Eine Störung im Laufe der Wundheilung kann sowohl durch stoffliche, wie durch Korrosion freigesetzte Metallionen, als auch durch geometrische Eigenschaften der Implantatoberflächen ausgelöst werden. Insbesondere die Akkumulation und Aktivierung von Monozyten/Makrophagen im Bereich der Wunde, besonders auch im Zusammenhang mit Abriebpartikeln von Implantaten, hat ungünstige osteolytische Effekte zur Folge, die zum frühzeitigen Versagen von Implantaten führen können [83].

Die Abbildung 1-8 zeigt zur Veranschaulichung eine Röntgenaufnahme einer Hüfte mit einer aseptischen Lockerung der Titanprothese auf der linken Seite. Das Implantat sitzt nicht fest im Knochen, muß wieder entfernt und durch eines mit einem größeren Durchmesser ersetzt werden.



Abbildung 1-8 Das Röntgenbild einer männlichen Hüfte mit aseptischer Lockerung der Hüftprothese auf der linken Seite. Die Osteolysen (Pfeile) sind hauptsächlich am Prothesenschaft zu sehen (Aufnahme mit freundlicher Genehmigung von Dr. H. Anetzberger, TU München).

Untersuchungen des Umgebungsgewebes gelockerter Implantate und immunhistochemische Analysen aus dem Interfacebereich offenbaren die Anwesenheit von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen und demonstrieren die Anwesenheit verschiedener proinflammatorischer Zytokinmediatoren [84-87].

Insbesondere bei der aseptischen Lockerung von Implantaten spielt die Sekretion der Zytokine IL-1 β , TNF- α und IL-6 eine große Rolle [88]. Diese Entzündungsstoffe können auch die Bildung von Osteoklasten, den knochenabbauenden Zellen, die ebenfalls den destruktiven Vorgang am Knochen weiter vorantreiben können, fördern [89,90]. Die für den integrativen Erfolg eines Implantates wesentliche Gefäßneubildung wird ebenfalls durch Zytokine beeinflusst. Beim angiogenen Schritt der Wundheilung exprimieren Endothelzellen proinflammatorische Signalstoffe wie IL-1 β und IL-6 [91].

Auf der Grundlage dieser beobachteten *in vivo* Befunde sind verschiedentlich Zellkulturversuche hinsichtlich der Aktivierung von monozytären Zellen und ihrem Zytokin-spektrum durchgeführt wurden, jedoch hauptsächlich im Zusammenhang mit Abriebpartikeln [92-99].

Den Einfluss der Oberflächengeometrie verschieden strukturierter Silizium-Germaniumproben auf das Entzündungsverhalten untersuchte erstmalig Riedel et al. [78] mit einer monozytären Zelllinie (U937). Die Experimente lassen vermuten, dass es eine Korrelation zwischen einer definierten Siliziumpyramidendichte und dem inflammatorischen Verhalten der U937 Zelllinie gibt. Auch die im Jahre 2004 erschienenen Untersuchungen von Refai et al. mit einer murinen Makrophagenzelllinie (RAW 264.7) legen einen Zusammenhang zwischen der Mediatorensekretion und der Oberflächentopographie nahe [100].

Da in Bezug auf implantierte Biomaterialien die Art und das Ausmaß der optimalen initialen Entzündungsreaktionen unklar sind, um eine langfristige Akzeptanz des Implantats im Biosystem zu gewährleisten, soll im Folgenden ein Zellkulturmodell zur *in vitro* Testung des Entzündungspotentials von unbeschichteten und beschichteten TiAl6V4-Implantaten entwickelt werden.

2 Motivation und Ziel der Studie

Mit allen Implantaten wird eine rasche und dauerhafte Gewebsintegration angestrebt. Der Erstkontakt des Körpers zum implantierten Biomaterial geschieht über die Oberfläche des Werkstoffes. Die Eigenschaften der sich dabei ausbildenden Grenzflächen sind entscheidend für die anfänglichen Reaktionen des Körpers. Nach der Implantation findet im Grenzflächenbereich ein unmittelbarer Kontakt zwischen dem Werkstoff und dem umgebenden durchbluteten Gewebe statt, der das Ausmaß der Fremdkörperreaktion und die Akzeptanz im Heilungsprozess wesentlich bestimmt. Weitgehend unklar sind dabei die Art und das Ausmaß der optimalen initialen Entzündungsreaktionen von Implantaten.

Gegenstand der Untersuchungen ist das Zellverhalten von Monozyten/Makrophagen im direkten Kontakt mit verschiedenen oberflächenmodifizierten TiAl6V4-Legierungen. Diese Leukozyten (weiße Blutkörperchen) spielen als klassische Entzündungszellen eine zentrale Rolle und können bei der aseptischen Lockerung von Implantaten zu einem frühzeitigen Versagen von Endoprothesen führen. Um diese Entzündungsmechanismen besser verstehen zu können, müssen werkstoffabhängige Einflussgrößen analysiert werden. Eine wichtige Voraussetzung hierfür ist die umfassende Charakterisierung der verwendeten TiAl6V4-Oberflächen.

Im Vordergrund dieser Arbeiten steht die Aufgabe, ein vereinfachtes *in vitro* Modell der beginnenden Entzündungskaskade und der anschließenden Wundheilung nach der Implantation von Biomaterialien zu entwickeln. Dazu ist ein Zellsystem zu etablieren, mit dem sich prüfen lässt, ob sich verschiedene Implantatoberflächen, hinsichtlich der Entzündungsinitialisierung als günstig erweisen. Insbesondere sind dazu oberflächenstrukturierte und beschichtete Implantate zu untersuchen.

Neben der Entwicklung eines *in vitro* Untersuchungsverfahrens ist zu klären, welche biologischen Mediatoren die Entzündungsantwort sensitiv erfassen und quantifizieren und ob das entwickelte *in vitro* Zellsystem gängige Biokompatibilitätstests erweitert und dem Screening neuer Implantatbeschichtungen dient. Zu prüfen ist auch, ob eine geeignete Oberflächenanalyse neue Ansätze zur Charakterisierung von Implantatoberflächen liefern kann. Darüberhinaus soll analysiert werden, ob sich aus der Implantatopographie Oberflächenkennwerte ermitteln lassen, die die biologische Funktion widerspiegeln.

3 Werkstoff und Untersuchungsmethoden

3.1 Experimentelle Vorgehensweise

Die Abbildung 3-1 zeigt im vereinfachten Schema die wesentlichen Schritte und Verfahren zur Herstellung und Charakterisierung der verschiedenen modifizierten Oberflächen bis zum Einsatz im Zellkulturlabor. Nach der Herstellung der Ausgangsproben aus einer TiAl6V4-Legierung wurden die Oberflächen entsprechend modifiziert, charakterisiert und im Zellkulturlabor auf ihr Entzündungsverhalten geprüft.

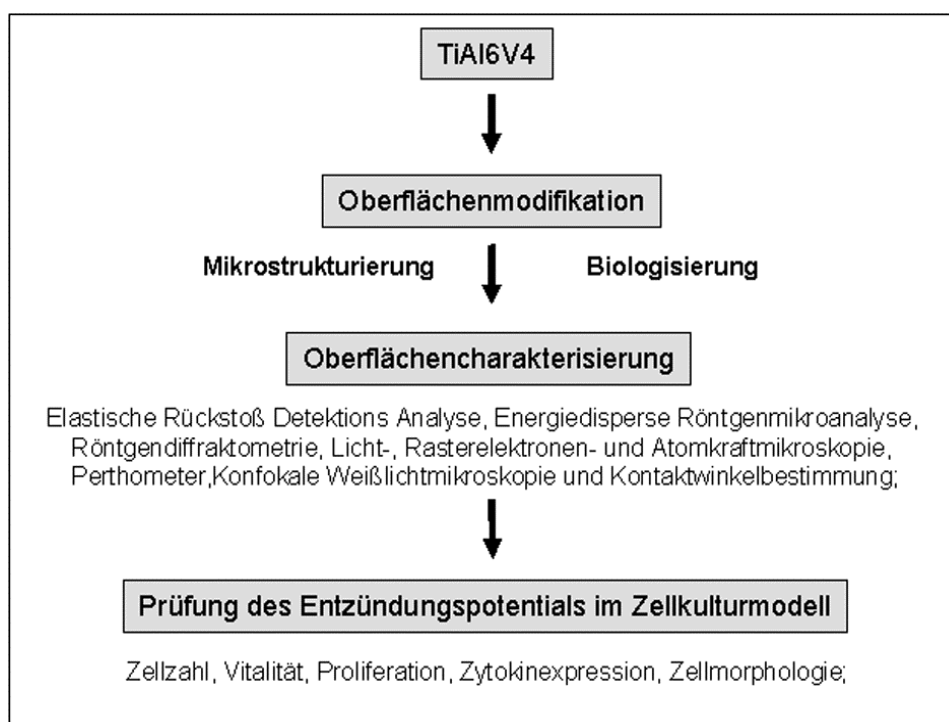


Abbildung 3-1 Die schematische Übersicht der einzelnen durchgeführten Arbeitsschritte.

3.2 Herstellung modifizierter TiAl6V4-Oberflächen

3.2.1 Basiswerkstoff: TiAl6V4-Legierung

Als Ausgangswerkstoff für die Versuche wurde ausschließlich die Legierung TiAl6V4 (ELI = Extra Low Interstitial ASTM 136) verwendet (siehe Anhang Tabelle 9.1-1). Es wurden dazu 250 runde Probenscheiben mit einem Durchmesser von 10 mm und einer Dicke von 2 mm auf einer Drehbank gefertigt [101]. Die Abdreugeschwindigkeit an der Drehbank betrug 1500 Umdrehungen/Minute. Es wurde mit wasserlöslichem Schmier-

mittel gekühlt, um Änderungen im Gefüge zu vermeiden. Am unteren Rand der Probe wurde zur Orientierung eine Fase angebracht (Abbildung 3-2).

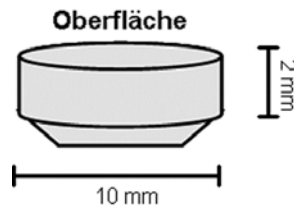


Abbildung 3-2 Eine abgedrehte TiAl6V4-Probe nach Einbringen der Fase am unteren Rand der Proben.

3.2.2 TiAl6V4-Proben: Strukturierung

Vor der Oberflächenbehandlung wurden alle Proben an der Poliermaschine RotoForce-3 und RotoPol-31 (Struers, Willich, Deutschland) mit der Diamant Schleifauflage MD-Piano unter Einsatz von Wasser plan geschliffen. Zur Befestigung auf dem Probenhalter der Schleifvorrichtung wurden alle TiAl6V4-Plättchen mit Siegelwachs befestigt. Nach dem Schleifen wurden die Metallproben je 30 Minuten mit Aceton und Reinstwasser im Ultraschallbad gereinigt. Nach vollständiger Trocknung bei 40°C wurden die Proben bis zur Weiterverarbeitung staubfrei aufbewahrt. Nach erfolgreicher Strukturierung und vor der Sterilisation (poliert, geätzt und gestrahlt) wurde der Reinigungsprozess wiederholt. Pro Oberflächenmodifikation wurden 50 Stück hergestellt.

3.2.2.1 Polierte Oberflächen

Die Polierschritte erfolgten in Anlehnung an die Herstellerempfehlungen (Fa. Struers), wie sie in der nachfolgenden Tabelle 3-1 wiedergegeben sind.

	Feinschleifen	Polieren
Schleifauflage	Kompositmatte (MD-Largo)	Poliermatte (MD-Chem)
Schleifmittel Poliermittel	Diamantsuspension (DiaPro)	Polierlösung: 260 mL OP-S (Herstellerbezeichnung), 40 mL H ₂ O ₂ (30%), 1 mL HNO ₃ (65%), 0,5 mL HF (48%)
Korngröße [µm]	9	0,04
Umdrehungen [rpm]	150	150
Druck [N]	30	30
Zeit [min]	5	30

Tabelle 3-1 Die Rahmenbedingungen der einzelnen Polierschritte an der Struers-Poliermaschine.

3.2.2.2 Geätzte Oberflächen

Nach dem Feinschleifen wurden die Proben bei Raumtemperatur in einem Säurebad fünf Minuten geätzt. Das Säuregemisch wurde auf dem Magnetprüher konstant bewegt. Die Zusammensetzung der Ätzlösung ist in der Tabelle 3-2 angegeben.

Ätzlösung	Anteile für 100 mL Ätzgemisch
65% HNO ₃	35 mL
48% HF	5 mL
Reinstwasser	60 mL

Tabelle 3-2 Die Zusammensetzung des Säurebades zur Herstellung der geätzten Oberflächen.

3.2.2.3 Sandgestrahlte Oberflächen

Zur Herstellung weiterer definierter Oberflächenstrukturen wurden Proben mit drei unterschiedlichen Korngrößen sandgestrahlt. Als Strahlmittel wurde Edelkorund (Al₂O₃) mit vieleckigen und scharfkantigen Einzelkörnern verwendet (Abbildung 3-3).

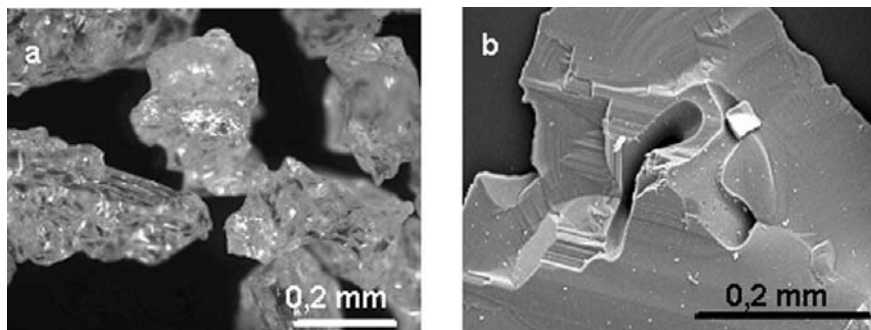


Abbildung 3-3 Die Morphologie des Strahlmittels Edelkorund der Körnung 24 (EK24): a) unregelmäßig geformte Al₂O₃ Körner im Auflichtmikroskop und b) Al₂O₃ Korn mit scharfer Bruchkante im Rasterelektronenmikroskop.

Die Tabelle 3-3 gibt die verschiedenen verwendeten Strahlmittelkorngrößen wieder.

Strahlmittelangabe/Körnung	Mittlerer Korndurchmesser [mm]
Edelkorund 220 (EK220)	0,04 - 0,07
Edelkorund 24 (EK24)	0,6 - 0,8
Edelkorund 8 (EK8)	2,5

Tabelle 3-3 Die verwendeten Strahlmittel zum Aufrauen der TiAl6V4-Proben.

Zum Strahlen wurde die Sandstrahlmaschine SANDMASTER Type 100 S (HaFra Hasenfratz, Aßling, Deutschland) verwendet. Die Proben wurden dazu auf speziell angefertigten Probestellern mit doppelseitigem Klebeband fixiert und in die Anlagenkammer eingebracht (Abbildung 3-4).

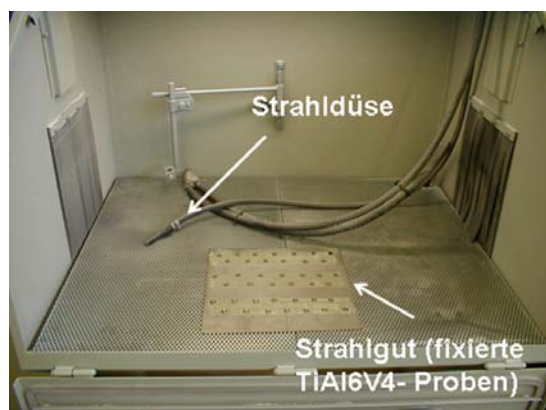


Abbildung 3-4 Auf einer Metallplatte fixierte TiAl6V4-Proben vor dem Bestrahlen in der Sandstrahlkammer.

Der Strahl Druck lag bei 6 bar. Der Abstand der Strahldüse zur Probenoberfläche betrug 50 mm. Der Winkel des auftreffenden Strahlmittels zur Probenoberfläche wies 90 Grad auf. Jede Probe wurde für 10 Sekunden gestrahlt. Für die Charakterisierung und Sterilisation mit Gammastrahlen wurden die fertig strukturierten Proben staubfrei aufbewahrt und verpackt. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden fünf verschiedenen strukturierten Oberflächenzustände eingesetzt (Abbildung 3-5): poliert, geätzt, EK220, EK24 und EK8.

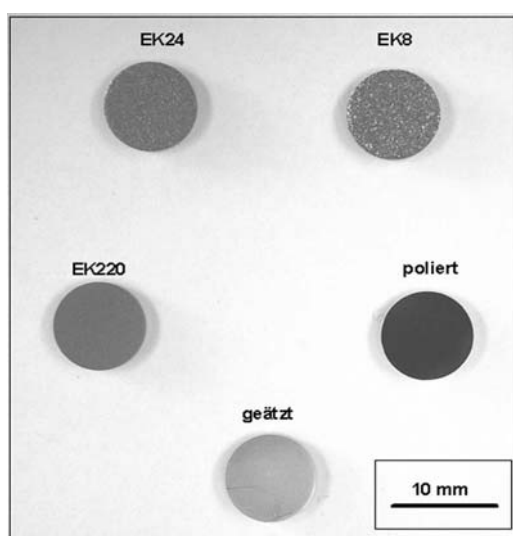


Abbildung 3-5 Strukturierte Proben nach Fertigstellung. Poliert, geätzt, EK220, EK24, EK8.

3.2.3 Sterilisation der strukturierten Proben

Alle für den Einsatz im Zellkulturlabor benötigten Oberflächenproben wurden γ -sterilisiert (Isotron, Allershausen, Deutschland). Als Strahlungsquelle wurde Co^{60} verwendet bei einer Dosis von 40 kGy. Bis zur Verwendung im Zellkulturlabor wurden die Proben steril aufbewahrt (Abbildung 3-6).



Abbildung 3-6 Steril verpackte modifizierte Oberflächenproben vor dem Einsatz im Zellkulturlabor.

3.2.4 TiAl6V4-Proben: Biologisierungen

Die Herstellung der TiAl6V4-Proben und deren Beschichtungen erfolgte am Institut für Werkstoffwissenschaften der TU Dresden. Dazu wurden analog den Vorarbeiten für die strukturierten Oberflächen Metallplättchen aus TiAl6V4-Stangenmaterial (ASTM 136, Durchmesser 10 mm, Dicke 2 mm) hergestellt. Für die Versuche mit der Zelllinie U937 wurden alle Oberflächen poliert. Für die Versuche mit primären Monozyten (Serie-II) wurden alle Probenzustände mit Al_2O_3 gestrahlt. Nach der Strahlbehandlung wurden folgende Rautiefen ermittelt: $R_a = 4,4 \mu\text{m}$ und $R_z = 37,6 \mu\text{m}$.

Als nachfolgende Reinigungsschritte wurden die Präparate mit Triton-X-100, Aceton und 96% Ethanol im Ultraschallbad gereinigt und mit Reinstwasser gespült und luftgetrocknet.

Die Beschichtung der Titanoberflächen mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix, wie Kollagen-I, Kollagen-III und Fibronectin (*Koll-I*, *Koll-III*, *Koll-IFibo*) erfolgte nach dem Adhäsionsverfahren von Geißler et al. [40] und Bierbaum et al. [102]. Zum Einsatz kamen

bovines säurelösliches Haut-Kollagen-I (Fluka, Deisenhofen, Deutschland), Kollagen-III aus humaner Plazenta (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) sowie Fibronectin aus bovinem Serum (Sigma, Deisenhofen, Deutschland).

Die anodische Oxidation (*AnodOx*) erfolgte bei einem pH-Wert von 7,3 in einem 0,133 M Phosphatpuffer. Die Passivierungsschicht der TiAl6V4-Probenkörper wurde dabei vergrößert.

Anodisch gestützte Kollagenschichten (*AnodKoll-I*) wurden in einem 2-Schritt-Prozess hergestellt. Der anodischen Vergrößerung der Oxidschicht folgte die adsorptive Immobilisierung von bovinem Kollagen-I (Fluka) [33].

Zur Erzeugung der hydroxylapatithaltigen Oberflächen, die kommerziell als Bonemaster[®] (*BM*) vertrieben werden (Namos GmbH, Dresden, Deutschland), wurde das von Rößler et al. [103] entwickelte elektrochemische Verfahren angewendet. Dabei wurde an der Kathode durch pH-Wert-Anhebung Hydroxylapatit (HA) abgelagert. Durch Adsorption von bovinem Kollagen-I (Fluka) in einem weiteren Verfahrensschritt wurde die als *BMKoll-I* bezeichnete Oberflächenbeschichtung hergestellt. Die Auskristallisation amorphes Calciumphosphats (ACP) zum karbonathaltigen Hydroxylapatit (HA) erfolgte an den Kollagenfasern, so dass dieser Beschichtungszustand die knochenähnlichste Modifikation darstellt. Zu weiteren Details wird an das von Rößler beschriebene und entwickelte elektrochemische Verfahren verwiesen [103].

Als *Referenz* wurden jeweils Probenkörper ohne Beschichtung eingesetzt.

Die Sterilisation aller Proben für die Zellkulturversuche erfolgte mit Ethylenoxid bei 42°C für 12 Stunden. Damit wurde eine zuverlässige Sterilisation der wärmeempfindlichen Beschichtungen erreicht.

Eine Übersicht aller für die Zellkulturversuche verwendeten modifizierten TiAl6V4-Oberflächen und der verwendeten Abkürzungen finden sich in der Tabelle 3-4.

Modifizierte TiAl6V4-Beschichtungen	Abkürzungen
Referenz (TiAl6V4 ohne Beschichtung)	Referenz
Anodische Oxidation in 0,133 M Phosphatpuffer bei pH 7,4	AnodOx
Anodisch gestützte Immobilisierung von Kollagen-I	AnodKoll-I
Elektrochemisch gestützte Hydroxylapatitbeschichtung (Bonemaster®)	BM
Elektrochemisch gestützte Hydroxylapatitbeschichtung (Bonemaster) mit Kollagen-I	BMKoll-I
Adsorptionsbeschichtung mit Kollagen-I und Fibronectin	Koll-IFibro
Adsorptionsbeschichtung mit Kollagen-III	Koll-III
Adsorptionsbeschichtung mit Kollagen-I	Koll-I

Tabelle 3-4 Hergestellte Oberflächenbeschichtungen mit den dazugehörigen Verfahren und verwendeten Abkürzungen.

3.3 Charakterisierung der Oberflächenbeschaffenheit

Zur Beschreibung von technischen Oberflächen werden geometrische von stofflichen, wie physikalischen und chemischen Eigenschaften unterschieden. Um die konkreten stofflichen Eigenschaften der Proben zu erfassen, wurden die Techniken der Energiedispersen Röntgenmikroanalyse (EDX), die Elastische Rückstoß Detektions Analyse (ERDA), und die Röntgendiffraktometrie (XRD) verwendet. Zur Charakterisierung der geometrischen Oberflächeneigenschaft wurden die qualitativen Methoden der Lichtmikroskopie und der Rasterelektronenmikroskopie, sowie die quantitativen Techniken wie das Tastschnittverfahren, die konfokale Lichtmikroskopie und die Atomkraftmikroskopie herangezogen. Die Benetzbarkeit von Oberflächen wurde mit der Methode der Kontaktwinkelmessung bestimmt. Sie wird durch geometrische, als auch physikalisch-chemische Eigenschaften beeinflusst.

3.3.1 Stoffliche Eigenschaften

3.3.1.1 Elastische Rückstoß Detektions Analyse

Die Elastic Recoil Detection Analysis (ERDA) stellt eine kernphysikalische Methode dar, die tiefenaufgelöst die Elementzusammensetzung mit einer lateralen Auflösung von etwa

5-10 mm² untersucht [104]. Dabei schlägt ein hochenergetischer Ionenstrahl Atome aus den oberflächennahen Schichten (1 µm) der zu untersuchenden Probe heraus. Diese werden hinsichtlich ihrer Kernladungszahl und Energie in einem speziellen Detektor nachgewiesen. Dabei besteht eine eindeutige Beziehung zwischen Energie- und Tiefenskala der verschiedenen Elemente. Das Verfahren ist außerordentlich empfindlich gegenüber leichten Elementen. Die Messungen erfolgten am 15 MV Tandembeschleuniger in Garching, einer gemeinsamen Einrichtung der beiden Münchener Universitäten.

3.3.1.2 Energiedisperse Röntgenmikroanalyse

Zur qualitativen und quantitativen Elementbestimmung der oberflächennahen TiAl6V4-Proben wurden EDX Analysen am Rasterelektronenmikroskop SEM S-3500 N mit dem integrierten EDAX-Mikroanalysesystem Falcon (AMETEK, Taunusstein, Deutschland) durchgeführt. Dazu mussten die Metallproben zur besseren Leitfähigkeit mit Kohlenstoff (Kohlengarn-Verdampfungszusatz CEA 035 der Firma BalTec) am Sputtercoater beschichtet werden. Pro Probe wurde an zwei verschiedenen Stellen EDX-Analysen durchgeführt.

3.3.1.3 Röntgendiffraktometrie

Auskünfte über die Kristallinität der oberflächennahen TiAl6V4-Schichten ermöglichte die Methode der Röntgendiffraktometrie [105]. Die Beugungsanalyse arbeitet mit Röntgenstrahlen (X-Ray Diffraction = XRD). Anhand des austretenden Winkels der Röntgenstrahlung lassen sich Aussagen zur Struktur von Festkörperkristallen erzielen. Die strukturierten Proben wurden mit Hilfe des Diffraktometers D 5000 (Siemens, Erlangen, Deutschland) am Lehrstuhl für Experimentalphysik IV (Prof. Dr. B. Stritzker) der Universität Augsburg analysiert.

3.3.2 Geometrische Oberflächenbeschaffenheit

3.3.2.1 Qualitative Beschreibung

Lichtmikroskopie

Für präparative Arbeiten wurde das Stereolupenmikroskop Stemi 2000-C (Zeiss, Göttingen, Deutschland) mit Vergrößerungen 6,5–50x verwendet. Zur mikroskopischen Feinanalyse der TiAl6V4-Oberflächen wurde im Auflichtverfahren unter Benutzung ver-

schiedener Objektive das Mikroskop AxioskopMat (Zeiss, Göttingen, Deutschland) verwendet. Für die Betrachtung der Zellen im Phasenkontrast stand das Mikroskop AxioVert 200 (Zeiss, Göttingen, Deutschland) zur Verfügung. Beide Mikroskope verfügten auch über eine fluoreszenzoptische Betrachtungsmöglichkeit.

Rasterelektronenmikroskopie

Zur Beurteilung der Oberflächentopographie wurden die nativen oder besiedelten Metallproben im Rasterelektronenmikroskop SEM S-3500 N (Hitachi, Tokio, Japan) bei unterschiedlichen Beschleunigungsspannungen und verschiedenen Vergrößerungen im SE-Modus (Sekundärelektronenmodus) begutachtet. Für reine Materialkontraste wurde der BSE-Modus (Rückstrahlmodus) benutzt.

Atomkraftmikroskopie

Bei der Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy = AFM), die eine Auflösung bis in den Nanometerbereich ermöglicht, wird die Probenoberfläche mit einer feinen Siliziumspitze, die auf einem biegsamen Federarm (Cantilever) sitzt, mechanisch abgetastet. Beim verwendeten Tapping Modus wurde eine Fläche von 60 x 60 µm gescannt und dabei die Auslenkung der Federspitze und folglich die Auflagekraft der Spitze auf die Probe konstant gehalten. Aus der z-Position ergab sich die topographische Abbildung der abgerasterten Probe. Zum Einsatz kam das Rasterkraftmikroskop JSPM-5200 (JEOL, Eching, Deutschland).

3.3.2.2 Quantitative Beschreibung

Die quantitative Beschreibung geometrischer Gestalteigenschaften technischer Oberflächen erfolgt auf der Grundlage der mit einem Messverfahren erfassten Oberflächenmikrostruktur. Als Ergebnis der Messung werden Höhenwerte über ein ortsdiskretes x-y-Raster ermittelt (Abbildung 3-7). Um geometrische Eigenschaften der Gestaltelemente, wie z.B. Anstiege, Höhe und laterale Abstände sowie Krümmungen quantitativ auszudrücken, werden Kennfunktionen und Kenngrößen definiert, die jeweils relevante Gestaltaspekte repräsentieren.

Es steht eine große Vielfalt von Oberflächenkenngrößen zu Verfügung, um geometrische Eigenschaften aus einer messtechnisch erfassten Oberfläche zu extrahieren. Für zweidimensionale Oberflächenmessungen werden im internationalen GPS-Normensystem

(Geometrical Product-Specification) Messung, Auswertung und die Bestimmung von Oberflächenkenngrößen festgelegt. Für die dreidimensionale geometrische Oberflächencharakterisierung werden entweder Kenngrößen aus der 2D-Charakterisierung übertragen, teilweise weiterentwickelt oder neue Kenngrößen definiert.

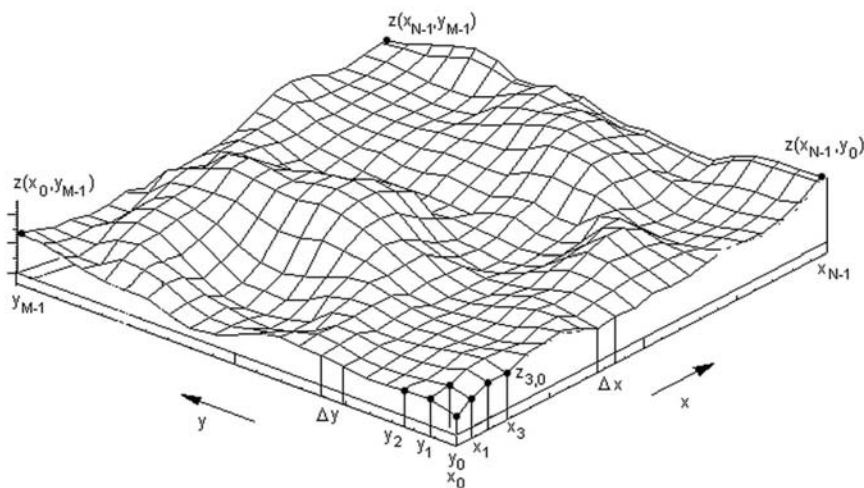


Abbildung 3-7 Das Messverfahren zur Quantifizierung geometrischer Gestalteigenschaften. Die Höhenwerte werden über ein ortsdiskretes x-y-Raster ermittelt (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Christian Beck, TEQ GmbH, Chemnitz).

Die TiAl6V4-Probenoberflächen wurden anhand von 2D-Tastschnittmessungen nach DIN EN ISO 4287 und 4288 sowie durch 3D-Oberflächenmessungen charakterisiert.

3.3.2.2.1 Mechanisches Tastschnittverfahren

Die Messung der Oberflächenrauheiten der verschieden strukturierten Oberflächen wurde mit dem Perthometer M2 (Mahr, Deutschland) vorgenommen. Das Tastschnittverfahren ist eine taktile Methode zur zweidimensionalen Erfassung der Oberflächen (ISO 3274). Dabei bewegte sich eine Vorschubeinrichtung ein Tastsystem (Diamantnadel) mit konstanter Geschwindigkeit horizontal über die Oberfläche.

Aus dem abgetasteten Oberflächenprofil wurden zwei genormte Kenngrößen, R_a und R_z ermittelt (Anhang Tabelle 9-2). Die Wahl der Grenzwellenlänge (Cutt off) erfolgte nach ISO 4288. Es wurden jeweils fünf Werte an verschiedenen Stellen der Oberfläche pro Metallmodifikation gemessen und anschließend der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet.

3.3.2.2.2 Konfokale Weißlichtmikroskopie

Zur geometrischen Oberflächenerfassung wurde in Zusammenarbeit mit der Firma NanoFocus AG (Ettlingen, Deutschland) das Gerät NanoFocus μ Surf[®] verwendet. Die konfokale Weißlichtmikroskopie stellt ein optisches dreidimensionales Messverfahren auf der Basis der von NanoFocus entwickelten Multi-Pinhole-Technik dar [106].

Zur simultanen tiefendiskriminierenden Vermessung von Flächen wird eine mit vielen Pinholes (Raumfilter) versehene Nipkowscheibe (spiralförmig angeordnete Lochblenden) verwendet. Mit Hilfe eines sehr präzisen Mikroskop-Objektives werden aus einer sehr kleinen Umgebung der Schärfenebene die genauen x/y/z Koordinaten eines Oberflächenpunktes ermittelt. Über die Intensität eines vom Messobjekt reflektierten Lichtstrahls werden Höheninformationen gewonnen. Durch vertikales Verschieben der Optik wird die Oberfläche schichtweise abgebildet. Nachgeschaltete Softwareprogramme μ Soft[®] oder wie das vom Lehrstuhl für Fertigungstechnologie der Universität Erlangen Nürnberg entwickelte Programm *WinSAM 2.6*[®] oder *Mountains Map*[®] (DigitalSurf, Les Ulis, Frankreich) erlauben verschiedene Darstellungen und Auswertungen der gewonnenen Topographien.

Zur quantitativen Charakterisierung der Oberflächengestalt der Proben wurde ein großes Spektrum von 3D-Oberflächenkenngrößen verwendet, die teilweise direkt aus den 3D Messergebnissen sowie auch durch die Bildung von Kennfunktionen wie die Materialanteilkurve, den Verlauf des Leerflächenanteils sowie geschlossenen Leerflächenanteils sowie der 3D-Autokorrelationsfunktion ermittelt wurden [107,108] (Anhang Tabelle 9-3). Die genormten Kenngrößen R_a und R_z sind Parameter, die direkt auf 3D-Messungen übertragen werden können. Durch den Buchstaben S für „surface“ werden sie als 3D-Parameter S_a gekennzeichnet.

Ausgehend von dem in der Blechumformung üblichen mechanisch-rheologischen Modell [109-111] werden drei Traganteile, wie die Materialfläche, das geschlossene und offene Leervolumen zur Ermittlung der Kenngrößen herangezogen, aus der sich die bekannte Materialtraganteilkurve (Abbot-Kurve) ergibt (Abbildung 3-8). Als Durchdringung c wird der Abstand der Schnittebene vom höchsten zum niedrigsten Punkt verstanden. Der Anteil der offenen Leerflächen beträgt am höchsten Punkt der Topographie 100% und fällt mit

zunehmender Schnitttiefe auf 0% ab. Geschlossene Leerflächen entstehen erst ab einer bestimmten Schnitttiefe. Der Maximalwert wird als Maximum der geschlossenen Leerflächenanteile α_{clm} bezeichnet. Durch Integration der Kurve der geschlossenen Leerflächenanteile über der Durchdringung c erhält man das geschlossene Leervolumen V_{cl} . Die wahre Fläche A_w berücksichtigt die wahre geometrische Oberfläche und dient zum Berechnen des Oberflächenfaktors α_w der die Arealvergrößerung als Verhältnis: wahre Fläche/scheinbare Fläche angibt.

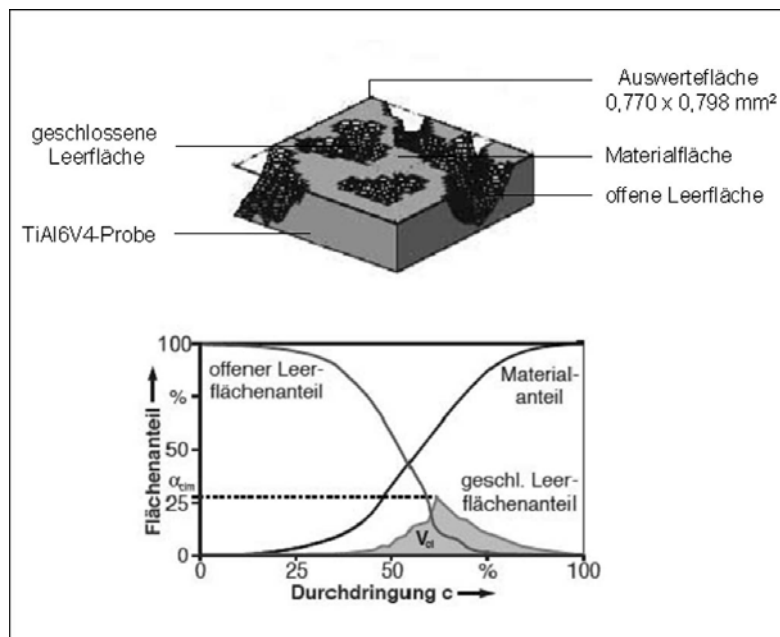


Abbildung 3-8 Die optische Oberflächenanalyse erlaubt die Ermittlung neuer 3D-Kenngrößen (modifiziert aus [109,110]).

Es wurden die Proben mit einem 20-fach vergrößernden Objektiv an fünf verschiedenen Stellen vermessen. Die Auswertefläche betrug $0,770 \times 0,798 \text{ mm}^2$ (Messfeldgröße = $0,6145 \text{ mm}^2$). Die Schrittweite betrug 100 nm. Es wurden verschiedene 3D-Oberflächenkenngrößen zur Auswertung herangezogen.

Die Ermittlung der Oberflächenkenngrößen erfolgte mit der Software *WinSAM 2.6*[®] und *Mountains Map*[®]. Die Messpunkte wurden vor der Auswertung einer Anpassung an ein Polynom 2. Ordnung der Kenngröße unterzogen.

3.3.3 Kontaktwinkelbestimmung

Die Adsorptionseigenschaften von Oberflächen für z.B. Proteine hängen neben der Rauigkeit auch von der Benetzbarkeit ab. Die Benetzung eines Festkörpers lässt sich

durch den Kontaktwinkel Φ , den die Flüssigkeit mit der Oberfläche bildet, beschreiben. Dabei bedeutet ein kleiner Kontaktwinkel gute und ein großer schlechte Benetzung. Je größer der Kontaktwinkel, desto schlechter ist die Benetzung (Abbildung 3-9).

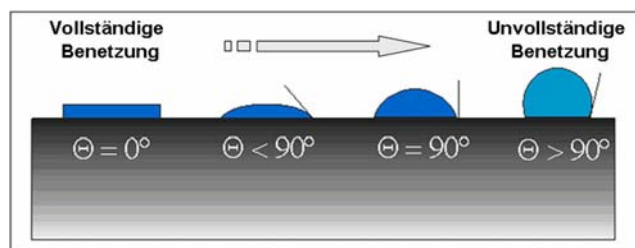


Abbildung 3-9 Das Prinzip der Kontaktwinkelmessung zur Bestimmung des Benetzungsgrades von Oberflächen mit Hilfe der Methode des liegenden Tropfens.

Die Kontaktwinkelmessungen erfolgten am OCA 20 (DataPhysics Instruments, Filderstadt, Deutschland). Zur Auswertung wurde die Software zur Messung des statischen Kontaktwinkels nach der „sessile drop“- Methode (liegender Tropfen) unter Berücksichtigung der Young-Laplace Methode verwendet. Als Testflüssigkeit wurde Reinstwasser verwendet.

Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Es wurden jeweils fünf Werte an verschiedenen Stellen der Oberfläche pro Metallmodifikation gemessen und anschließend der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet.

3.4 Zellkulturversuche

3.4.1 Kultivierung der Zelllinie U937

Zur Testung wurde die Zelllinie U937 (ATCC, Manassas, VA, USA) ausgewählt. Die kommerzielle Zelllinie stellt eine etablierte humane monoblastoide Zelllinie mit monozytärem Charakter dar.

Die Tumorzelllinie U937 wurde bei 37°C , 5% CO_2 – Atmosphäre mit 10% FCS- haltigen (Biochrom, Berlin, Deutschland) RPMI 1640 Medium (Biochrom, Berlin, Deutschland) unter Zusatz von 1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland) und 1% Amphotericin (Biochrom, Berlin, Deutschland) in Kultur gehalten. Zum Einsatz kamen die Passagen 10 bis 70.

Zur Induktion der Reifung wurde dem Medium 0,05 µg/mL 12-O-Tetradecanoyl Phorbol-13-Acetate (TPA, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) für zwei Tage zugesetzt [112]. Zur eindeutigen Zuordnung wird die Zelllinie nach der TPA-Stimulation folgend als **dU937** (differenzierte **U937**) bezeichnet.

3.4.2 Isolation und Kultivierung primärer humaner Monozyten

Aus tagfrischen Buffy coats (angereichertes Leukozytenkonzentrat) gesunder Spender (Deutsches Rotes Kreuz, Ulm, Deutschland) wurden periphere Monozyten isoliert. Da mononukleäre Zellen (Lymphozyten, Monozyten) eine etwas niedrigere Dichte als Granulozyten und Erythrozyten aufweisen, konnten sie bei Verwendung von Percoll (Biochrom, Berlin, Deutschland) durch Zentrifugation als Dichtegradient gewonnen werden.

Zur Separation humaner Monozyten diente Percoll mit einer Dichte von 1,077 g/mL. Die nach der Zentrifugation den Erythrozyten als „weiße Schicht“ aufliegenden Monozyten und Lymphozyten wurden mehrmals mit EDTA-PBS gewaschen, um Percollreste und noch vorhandene Thrombozyten (Blutplättchen) zu entfernen. Für die endgültige Isolierung der humanen Monozyten wurde der Monozytenisolutionskit I und II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet. Die Trennung zwischen Lymphozyten und Monozyten erfolgte mittels „Magnetic Cell Sorting“ (MACS) [113].

Das Trennverfahren beruht auf der negativen Selektion von Zellen, d.h. die Anreicherung von Monozyten, die nicht mit Magnetobeads (mit Antikörpern gecoatete magnetische Partikel) gebunden sind. Die unmarkierten Monozyten können das Magnetfeld ungehindert passieren und somit angereichert werden. Die MACS-Isolation erfolgte nach Herstellerprotokoll. Die Abbildung 3-10 zeigt die wesentlichsten Schritte der Gewinnung von Monozyten in der Übersicht auf.

Die Reinheit der Zellpopulation wurde mittels CD14 Färbung und anhand von May Grünwald gefärbten Zellausstrichen kontrolliert (Abbildung 3-11). Sie lag bei über 90%. Die Kultivierung der Monozyten erfolgte in 10% hitzeinaktiviertem humanem Serum (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) haltigen RPMI 1640 Medium (Sigma, Deisenhofen,

Deutschland und Biochrom, Berlin, Deutschland) unter Verwendung von 1% Penicillin/Streptomycin, Partricin und Gentamycin (Biochrom, Berlin, Deutschland).

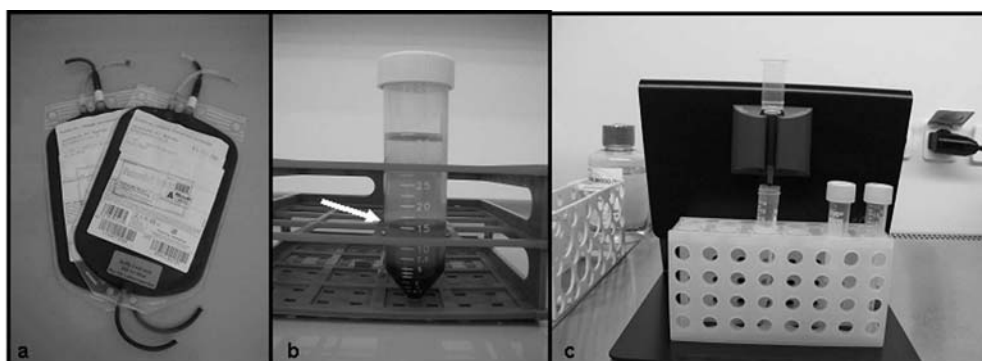


Abbildung 3-10 Die Isolierung von Blutmonozyten. a) Buffy coats dienen als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von Monozyten. b) Nach der Zentrifugation des Blut-Percoll-Gemisches befinden sich vorwiegend mononukleäre Zellen in einer Schicht (Pfeil). c) Die endgültige Trennung der Monozyten von den Lymphozyten erfolgt mittels Magnetic Cell Sorting (MACS).

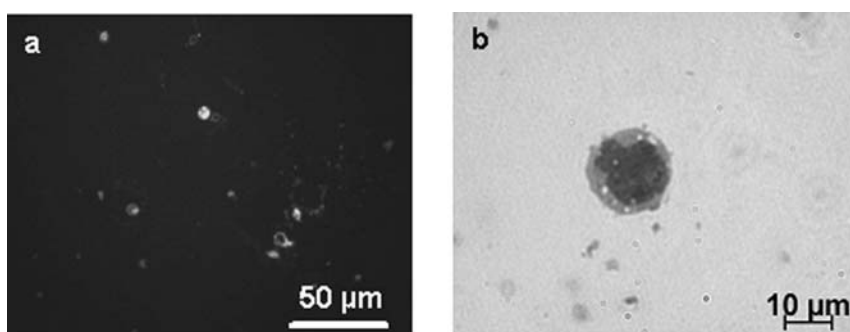


Abbildung 3-11 Der Nachweis von Monozyten nach der Isolation mittels Magnetic Cell Sorting. a) Nach der CD14 Markierung fluoresziert die Zellmembran grün und der Zellkern blau. b) Der Zellausstrich nach Anfärbung mit May Grünwald zeigt klassischen Phänotyp eines Monozyten mit lappenförmigem Kern und vakuolisiertem Zytoplasma.

3.4.3 Zellkulturversuche mit der Zelllinie dU937

Mit der Zelllinie dU937 wurden sechs verschiedene Oberflächenbeschichtungen ausgetestet: Referenz, Koll-I, AnodOx, BM, BMKoll-I und AnodKoll-I.

Pro Oberflächenmodifikation wurden $2,5 \times 10^5$ dU937 Zellen ausgesät. Für das entwickelte Zellkulturmodell wurden die verschiedenen modifizierten TiAl6V4-Proben in speziell zugeschnittenen biokompatiblen Tygon-Silikonschläuchen (Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland) fixiert, um direkten Kontakt der Zellen mit den Oberflächenbeschichtungen zu gewährleisten.

Nach vier Tagen wurden verschiedene Zellanalysen (Vitalität und Stoffwechselaktivität) durchgeführt. Exemplarisch wurden einige besiedelte Oberflächen für die rasterelektronenmikroskopische Begutachtung aufbereitet. Für die Zytokinbestimmung wurde der Zellkulturüberstand abpipettiert, zellfrei zentrifugiert und bei -20°C portioniert eingefroren. Pro Versuchsansatz ($n = 4$) wurden vier bis fünf Titanplättchen analysiert, so dass bis zu zwanzig Titanproben pro Oberflächenbeschichtung zur Auswertung herangezogen werden konnten.

Als Positivkontrolle (LPS-Kontrolle) wurde der Zellsuspension aus $2,5 \times 10^5$ dU937 Zellen/mL ein Mikrogramm Lipopolysaccharid als exogener Stimulus zugesetzt (LPS, Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Für die Negativkontrollen (TCC-Kontrolle) wurden die $2,5 \times 10^5$ Zellen ohne weitere Stimulanzen auf 24 x Tissue Zellkultur Wellplatten (TPP, Trasadingen, Schweiz) für vier Tage kultiviert.

3.4.4 Zellkulturversuche mit primären humanen Monozyten

3.4.4.1 Monozyten auf strukturierten TiAl6V4-Oberflächen (Serie-I)

Die Besiedlung der fünf verschiedenen strukturierten Probengruppen erfolgte mit jeweils 2×10^5 Monozyten (Serie-I) pro Metallplättchen in 1 mL. Zur Testung wurden folgende oberflächenstrukturierte Proben verwendet: poliert, geätzt, EK220, EK24 und EK8. Auch hier wurde der direkte Kontakt der Zellen mit den modifizierten Oberflächen durch die Verwendung von biokompatiblen Silikonschläuchen (Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland) gewährleistet.

Nach drei und sechs Tagen wurden die Zellüberstände für die Zytokinanalyse abgenommen, zentrifugiert und bei -20°C portioniert eingefroren. Im Anschluss wurde die Stoffwechselaktivität der Zellen getestet (WST-1-Test). Pro Versuchsansatz ($n = 5$) wurden drei Titanplättchen analysiert, so dass 15 Titanproben pro Oberflächenmodifikation ausgetestet wurden. Nach sechs Tagen wurden abschließend weitere Vitalitätstests (Live/Dead-Färbung und Annexin-V-Fluos-Färbung) durchgeführt. Ebenfalls nach sechs Tagen wurde die Besiedlungsdichte bestimmt. Nach drei und sechs Tagen wurden die Proben zur rasterelektronischen Untersuchung vorbereitet.

Als LPS-Positivkontrolle wurden 2×10^5 Monozyten in 1 mL mit $1 \mu\text{g}$ LPS (Lipopolysaccharid, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) versetzt. Als weitere Positivkontrolle (TPA-Ko) wurden 2×10^5 Zellen in 1 mL Medium mit $1 \mu\text{g}$ TPA stimuliert (TPA, Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Für die Negativkontrollen (TCC-Kontrolle) wurde kein Stimulus verwendet. Die Kontrollen wurden gleichzeitig auf den 24 x Wellplatten (TPP, Trasadingen, Schweiz) mitgeführt, wie die Testproben.

3.4.4.2 Monozyten auf biologisierten TiAl6V4-Oberflächen (Serie-II)

Die Besiedelung der biologisierten TiAl6V4-Oberflächen erfolgte mit jeweils 1×10^5 Monozyten (Serie-II) pro Metallplättchen in 1 mL RPMI 1640 Medium in 24 x Zellkulturplatten (TPP, Trasadingen, Schweiz). Getestet wurden sechs verschieden beschichtete Oberflächen: Referenz, BM, BMKoll-I, Koll-I+Fibro, Koll-III und Koll-I.

Die Kultivierungsdauer betrug drei Tage, danach wurde der zellfreie Überstand für die Mediatorenanalyse portioniert (bei -20°C). Im direkten Anschluss wurde die Stoffwechselaktivität bestimmt (WST-1 Test). Nach den Analysen wurden die besiedelten Oberflächen für die rasterelektronenmikroskopische Betrachtung aufbereitet.

Insgesamt wurden sechs unabhängige Versuche ($n = 6$) durchgeführt, jeweils im Dreifach-Ansatz, so dass insgesamt 18 Titanplättchen pro Modifikation zur Testung kamen.

In parallelen Versuchsansätzen wurden Negativ- und Positivkontrollen mitgeführt. Als Positivkontrolle (LPS-Ko) wurde 1×10^5 Zellen in 1 mL Medium $1 \mu\text{g}$ Lipopolysaccharid zugesetzt. Den Negativkontrollen (TCC-Ko) wurde kein LPS zugegeben.

Die verwendeten biologischen Nachweisverfahren sind im Anhang beschrieben.

3.5 Auswahl funktionsrelevanter Oberflächenkenngrößen

Um festzustellen, welche Eigenschaften der Oberflächengeometrie sich günstig oder ungünstig auf die Zytokinausschüttung der Monozyten auswirken, können die beobachteten biologischen Reaktionen der Zellen mit den Oberflächenkenngrößen in Zusammenhang gebracht werden. Es ist dabei schwierig aus der Vielzahl der Oberflächenkenngrößen diejenigen auszuwählen, die die funktionalen Gestalteigenschaften der Oberfläche be-

schreiben, da sich die verschiedenen Kenngrößen teilweise überlagern und teilweise unterscheiden.

Das Ziel bei der Bewertung des Einflusses der Oberflächengeometrie auf das Entzündungspotential besteht deshalb darin, diejenigen Oberflächenkenngrößen zu ermitteln, anhand derer das unterschiedliche Entzündungsverhalten der Monozyten auf den Probenoberflächen aus geometrischer Sicht am besten aufgeklärt werden kann.

Dazu wurde in der vorliegenden Arbeit ein Verfahren zur Berechnung funktionsrelevanter Oberflächenkenngrößen verwendet, das von Beck und Pleul entwickelt wurde [114]. Es beruht darauf, dass das Funktionsverhalten von vorliegenden Oberflächen erfasst und in einem Merkmalsraum der Funktionseigenschaften klassifiziert wird. Im Ergebnis entstehen Gruppen sich funktional unterscheidender Oberflächen. In dem darauffolgenden Schritt wird die Oberflächengestalt messtechnisch mit Hilfe der konfokalen Weißlichtmikroskopie erfasst und verschiedene Oberflächenkenngrößen ermittelt. Diese bilden einen geometrischen Merkmalsraum, innerhalb dem alle funktional klassifizierten Oberflächenproben dargestellt werden können. Aufgrund der Lage der Oberflächen im Kenngrößenraum sind geometrische Ähnlichkeitsbeziehungen zwischen den Oberflächen, z.B. betrachtet anhand von Distanzen im Merkmalsraum, beschreibbar.

Durch eine Merkmalsanalyse werden diejenigen Oberflächenkenngrößen bestimmt, anhand derer die Ähnlichkeitsstruktur der funktionalen Klassifikation der Oberflächen im Oberflächen-Kenngrößenraum bestmöglich nachvollzogen werden kann. Die so gefundenen Oberflächenkenngrößen werden als funktionsrelevant betrachtet.

Im Anschluss an die Ermittlung der Oberflächenkenngrößen, die die funktionalen Unterschiede zwischen den Oberflächen beschreiben, können in Abhängigkeit vom verwendeten Ähnlichkeitsmaß Grenzwerte für die Oberflächenkenngrößen ermittelt werden. Durch eine Betrachtung des Aussageinhaltes der selektierten Oberflächenkenngrößen kann auch qualitativ auf günstige bzw. ungünstige Gestalteigenschaften der Oberflächengeometrie rückgeschlossen und entsprechende Schlussfolgerungen für die Herstellung funktionaler Oberflächen geschlossen werden.

Für die Untersuchung des Einflusses der Oberflächengeometrie auf das Entzündungsverhalten von Monozyten/Makrophagen wurde als Funktionsmerkmal die Zytokinexpression nach drei Tagen herangezogen. Anhand der akquirierten Messwerte wurden Gruppen von Proben gebildet, bei dem innerhalb der Gruppen ähnliches und zwischen den Gruppen unterschiedliches Zellverhalten besteht. Im einfachsten Fall wurden die Proben mit hoher Zytokinausschüttung (hohes Entzündungspotential) denen mit niedriger Zytokin-konzentration (niedriges Entzündungspotential) gegenübergestellt.

Der geometrische Merkmalsraum, innerhalb dem die Ähnlichkeit des funktionalen Verhaltens nachvollzogen werden soll, wird durch 3D-Oberflächenkenngrößen gebildet. Aus dieser Vorauswahl herkömmlicher und moderner Oberflächenkenngrößen werden Gestaltmerkmale ermittelt, anhand derer die Proben mit niedrigem (und hohem) Entzündungspotential untereinander nur geringfügig und die Proben mit unterschiedlichem Entzündungspotenzial sich stark voneinander unterscheiden.

Es wird davon ausgegangen, dass Unterschiede im Zellverhalten auf geometrische Eigenschaften zurückgeführt werden können, wenn eine Unterscheidung entzündlich unterschiedlicher Proben anhand von Oberflächenkenngrößen möglich ist.

Die Berechnung der funktionellen Kenngrößen erfolgte ausschließlich mit den durch *Mountains Map*[®] ermittelten Oberflächenkenngrößen. Die Berechnungen wurden freundlicherweise von Herrn Dipl.- Ing. Rene Pleul (TEQ GmbH, Chemnitz, Deutschland) durchgeführt [114].

4 Ergebnisse

4.1 Strukturierte TiAl6V4-Oberflächen

4.1.1 Charakterisierung der Oberflächenbeschaffenheit

4.1.1.1 Elastische Rückstoß Detektionsanalyse

Aussagen zur vertikalen Elementzusammensetzung der TiAl6V4-Proben lieferten ERDA-Messungen. Die Abbildung 4-1 zeigt exemplarisch für eine polierte Probe das zweidimensionale Energiespektrum, aus der die ermittelten Elemente mit den dazugehörigen Intensitäten (Farbskala rechts) hervorgehen. Der Hauptanteil besteht aus den Legierungsbestandteilen Titan (Ti), Aluminium (Al), und Vanadium (V). Es konnten aber auch Silizium (Si), Fluor (F), Sauerstoff (O), Stickstoff (N), Kohlenstoff (C), und Wasserstoff (H) nachgewiesen werden.

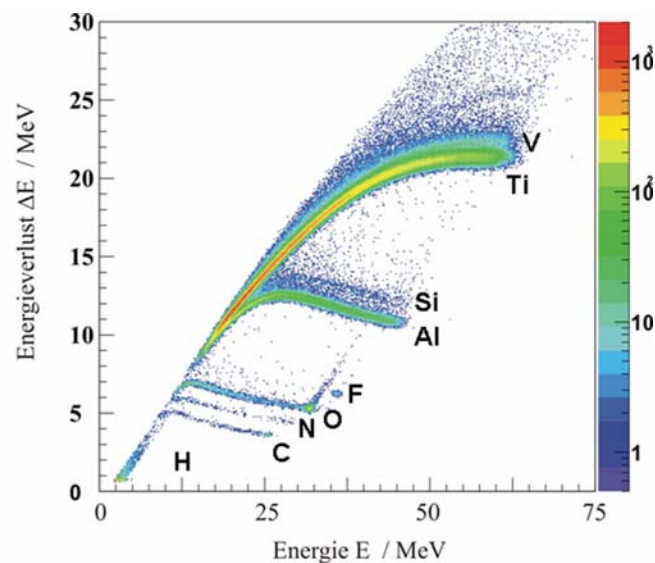


Abbildung 4-1 Das zweidimensionale ERDA-Energiespektrum. Die Darstellung zeigt die nachgewiesenen Elemente mit zugehöriger Intensität bei einer polierten TiAl6V4-Probe.

Die Abbildung 4-2 illustriert das dazugehörige Konzentrationstiefenprofil. Der oberflächige Kohlenstoffgehalt wurde auf etwa 1% quantifiziert, der mit zunehmender Tiefe abnahm.

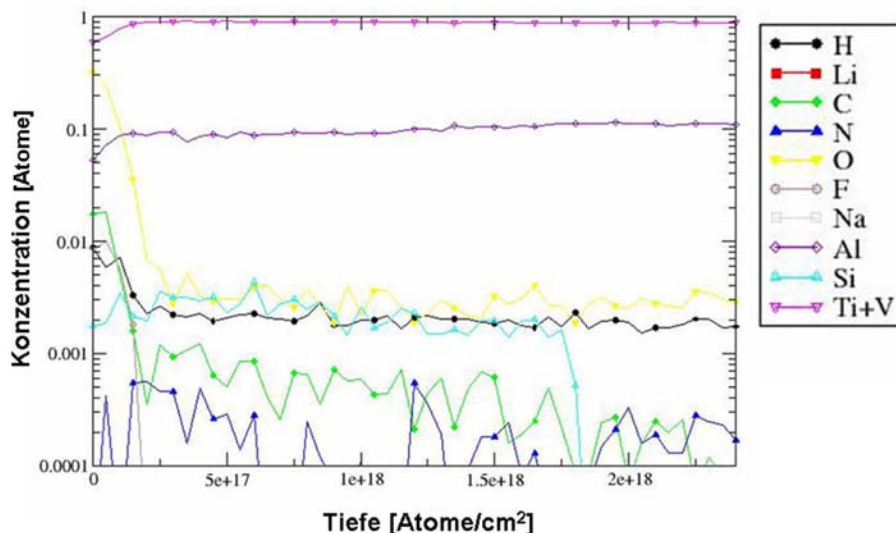


Abbildung 4-2 Das Konzentrations-Tiefenprofil einer polierten Probe zeigt die nachgewiesenen Elemente in Abhängigkeit von der Probentiefe.

4.1.1.2 Rasterelektronenmikroskopische- und energiedisperse Röntgenmikroanalysen

Das zweiphasige Gefüge der Alpha-Beta-Legierung kommt nach dem Ätzprozess klar zum Vorschein (Abbildung 4-3, Probe geätzt). Die beiden Phasen reagieren unterschiedlich auf den chemischen Angriff, so dass die Korngrenzen nach dem Ätzprozess in Form von Stegen deutlich hervortreten. Die durch Aluminium stabilisierte α -Phase wird durch das Ätzmittel verstärkt angegriffen, so dass die vanadiumhaltige β -Phase in der Aufnahme heller hervortritt.

Die sandgestrahlten Metallflächen der Proben EK 200, EK 24 und EK8 (Abbildung 4-3) zeigen eine stark zerklüftete, irreguläre Oberfläche, mit scharfen Kanten und Spitzen, Anrissen und Hohlräumen, die vor allem bei den Proben EK24 und EK8 noch mit Edelmetallkorndbruchstücken des Strahlmittels durchsetzt sind.

Die Abbildung 4-4 verdeutlicht detaillierter, dass durch die Säureätzung eine spezifische Aufrauung entsteht und dabei die vanadiumhaltige β -Phase als helle Komponente im BSE-Modus der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme deutlich hervortritt. Die Mikroanalyse ermöglichte die qualitative und semiquantitative Bestimmung der Legierungselemente, wie Titan (Ti), Aluminium (Al), Vanadium (V), und Kohlenstoff (C) und Sauerstoff (O). Dabei zeigt sich im Spektrum der geätzten TiAl6V4-Probe, dass

Vanadium aufgrund des selektiven Gefügeangriffes zu Gunsten des α -Phase-stabilisierenden Aluminiums angereichert vorliegt.

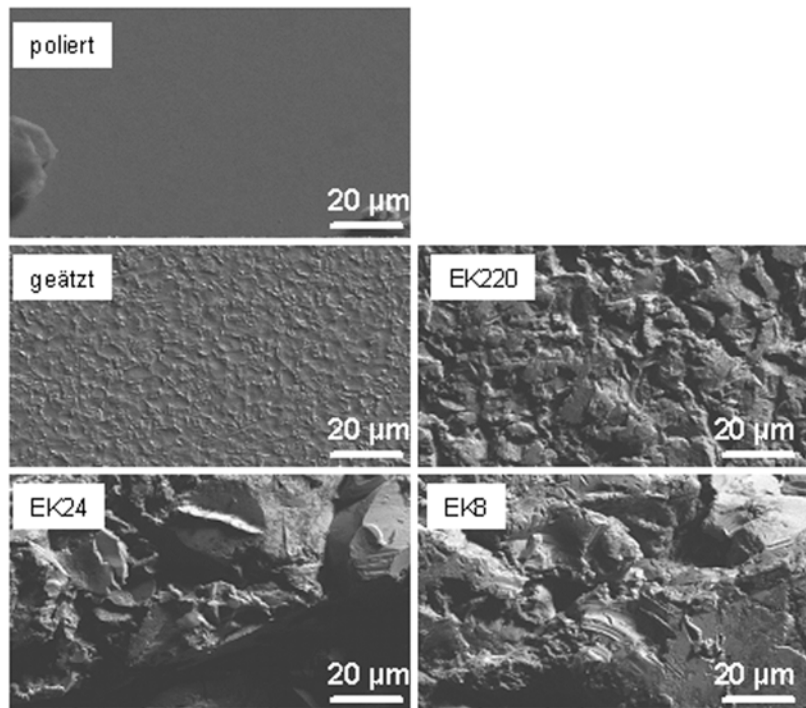


Abbildung 4-3 Die Oberflächentopographie aller strukturierten Proben unter dem Rasterelektronenmikroskop. Die polierten Metallproben besitzen eine spiegelglatte Oberfläche ohne Unregelmäßigkeiten. Durch Ätzen (Probe geätzt) und Sandstrahlen mit Edelmetall (Proben EK220-EK8) nehmen die Profilerhebungen und -vertiefungen zu.

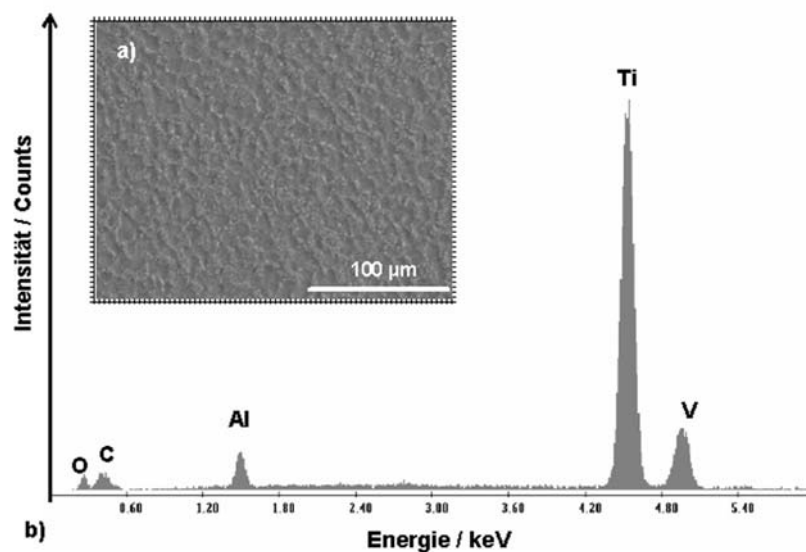


Abbildung 4-4 Die EDX-Analyse der geätzten TiAl6V4-Probe. a) Im BSE-Modus tritt die vanadiumhaltige β -Phase deutlich hervor. b) Die Mikroanalyse zeigt, dass Vanadium aufgrund des selektiven Gefügeangriffes, zu Gunsten des α -Phase-stabilisierenden Aluminiums angereichert vorliegt.

Die Aufnahmen lassen auch erkennen, dass die sandgestrahlten TiAl6V4-Proben, trotz umfangreicher Reinigungsprozeduren, weiterhin mit Edelkorundpartikeln belegt sind.

Das Strahlmittel besitzt auch nach dem Strahlvorgang eine keilförmige, scharfkantige Gestalt (Abbildung 4-5a) und ist zum Teil auf und unter dem Strahlgut fest verankert (Abbildung 4-5b). Beim Aufprall der Korundpartikel wird die Implantatoberfläche stark verformt. Die spröden Keramikpartikel zersplitterten dabei in kleinere Al_2O_3 -Teilchen. Durch den eigenen Kontrast heben sich die Strahlmittelreste im BSE-Modus vom umgebenden Untergrund deutlich ab.

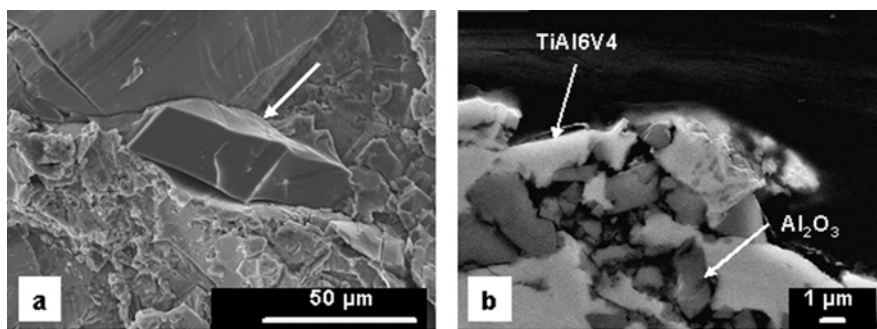


Abbildung 4-5 Die Kontamination mit Edelkorund-Strahlmittelresten auf den sandgestrahlten Proben EK8 und EK220. a) Edelkorundpartikel (Pfeil) befinden sich auf der Probenoberfläche EK8 (im Auflichtmikroskop). b) Materialunterschiede (Pfeile) werden aufgrund des unterschiedlichen Kontrastverhaltens im BSE-Modus im Rasterelektronenmikroskop deutlich: Edelkorundpartikel haften auf und unter der Probenoberfläche EK220 (Querschnittspräparation).

Die Edelkorundkontamination ließ sich, unabhängig von der Rauheit, auf allen gestrahlten Oberflächen EK220, EK24 und EK8 mittels EDX-Analyse nachweisen.

4.1.1.3 Röntgendiffraktometrische Analysen

Trotz Dünnschichtcharakterisierung mittels Röntgenbeugung sind die Titanoxide Rutil und/oder Anatas auf der Oberfläche polierter TiAl6V4-Proben nicht nachweisbar.

Die Abbildung 4-6 zeigt beispielhaft für die polierte TiAl6V4-Oberfläche (benannt als Probe) das gemessene Diffraktogramm, im direkten Vergleich zu den kristallinen Modifikationen Rutil und Anatas, die als Standards mitgeführt wurden. Die Peaklagen können der hexagonalen α -Phase in TiAl6V4 zugeordnet werden.

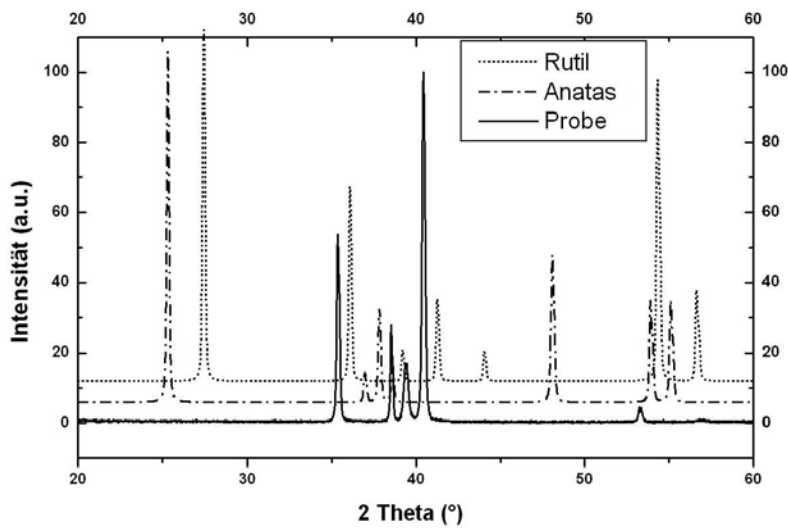


Abbildung 4-6 Das Röntgendiffraktogramm der polierten TiAl6V4-Probe. Im Vergleich zu den Referenzmodifikationen Rutil und Anatas weist die polierte Probe (durchgezogene Linie) Peakpositionen und Intensitätsverhältnisse auf, die für α -Phase der Legierung TiAl6V4 sprechen.

4.1.1.4 Auflichtmikroskopische Untersuchungen

Zum visuellen Vergleich der Oberflächenmorphologie wurden von allen Oberflächen mikroskopische Detailaufnahmen am Auflichtmikroskop erstellt (Abbildung 4-7).

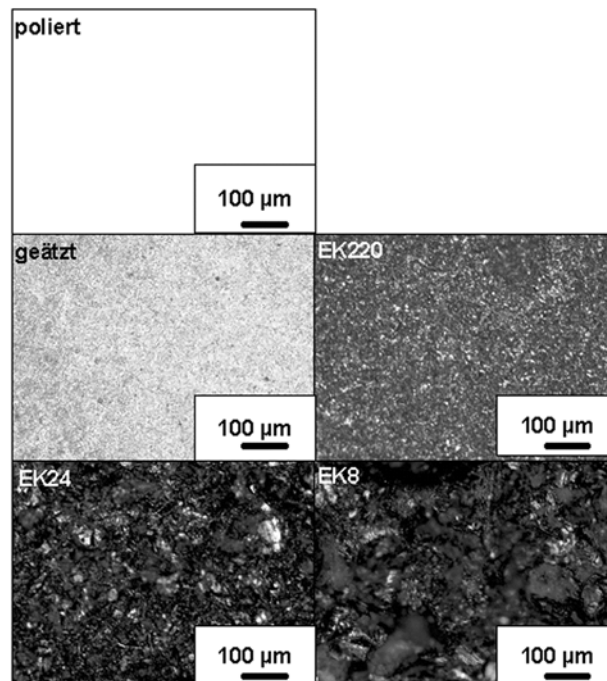


Abbildung 4-7 Strukturierte Oberflächen unter dem Auflichtmikroskop im Hellfeldmodus. In Abhängigkeit von der Rauigkeit nimmt die Inhomogenität zu.

Die geringe Tiefenschärfe am Auflichtmikroskop ließ bei den rauen Proben EK24 und EK8 keine scharfen Abbildungen zu. Die Profilvertiefungen und –erhebungen verschwanden im Unschärfbereich. Eine detailliertere Beurteilung der Oberflächenstrukturen war mit dem Auflichtmikroskop nicht möglich. Deshalb wurde die Oberflächentopographie mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops begutachtet.

4.1.1.5 Atomkraftmikroskopische Analysen

Zur Begutachtung konnten nur die polierte, geätzte und sandgestrahlte Probe EK 220 herangezogen werden. Die EK24- und EK8-Proben waren aufgrund der starken Rauheit für nicht geeignet. Die Oberflächentopographie der polierten, geätzten und sandgestrahlten Probe EK220 zeigt die Abbildung 4-8.

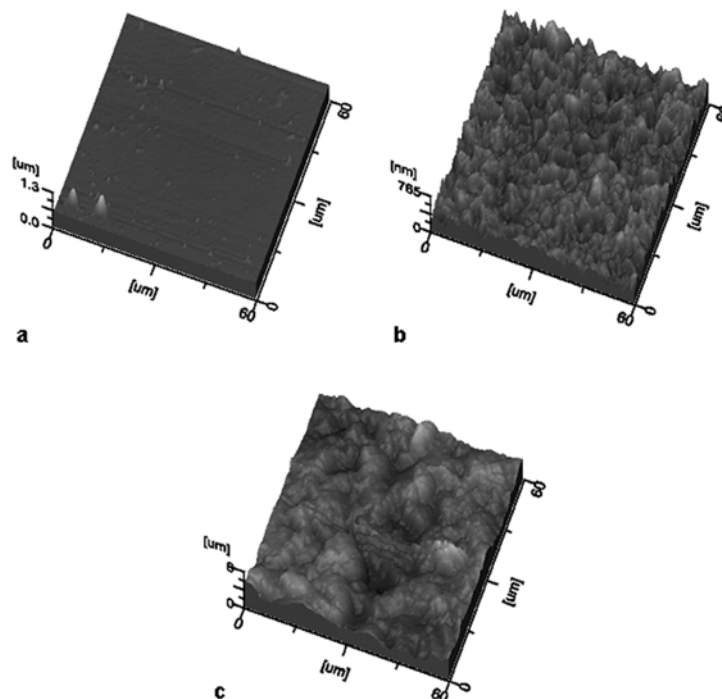


Abbildung 4-8 Die Oberflächentopographie verschiedener strukturierter Oberflächen mittels Atomkraftmikroskop im Tapping Modus. Die polierte Probe (a) weist eine nahezu spiegelglatte Oberfläche auf. Die geätzte Probe (b) und die sehr fein gestrahlte Probe EK220 (c) besitzen mehr oder weniger zerklüftete Oberflächen, die mit scharfen Kanten und Spitzen, sowie unterschiedlich großen Hohlräumen durchsetzt sind.

Die Oberflächenprofile stellen sich in einer unterschiedlichen Abfolge von mehr oder weniger konvexen und konkaven Krümmungen dar. Die polierte Probe besitzt nach dem Herstellungsprozess eine nahezu spiegelglatte Oberfläche. Die kleinen Erhebungen liegen

im nm-Bereich und sind auf Verunreinigungen zurückzuführen. Die geätzten und sandgestrahlten Proben unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Rauheitsdimensionen und ihrer Abfolge konvexer und konkaver Krümmungen.

4.1.1.6 Mechanisches Tastschnittverfahren

Die Ergebnisse der Rautiefenmessung mittels Perthometer sind in der Tabelle 9-4 im Anhang zusammengefasst. Die Oberflächen unterscheiden sich deutlich hinsichtlich der Kenngrößen Ra und Rz. Die Rauheit nimmt von der polierten Probe in Richtung EK8 zu und erstreckt sich über mehrere Größenordnungen. Die Verwendung des größten Strahlmittels ergibt erwartungsgemäß die größten Rautiefen, jedoch weisen diese Proben auch die größten Streubreiten auf.

4.1.1.7 Konfokale Weißlichtmikroskopische Analysen

Die Ergebnisse der aussagekräftigsten 3D-Oberflächenparameter sind in der Tabelle 9-5 im Anhang zusammengefasst. Infolge des Ätz- und Strahlprozesses nehmen die Oberflächenparameter arithmetische Rauheit S_a , geschlossenes Leervolumen V_{cl} und wahre geometrische Fläche A_w kontinuierlich zu. Die Oberflächenvergrößerung im Vergleich der polierten zur rauesten Probe (EK8) beträgt 63 Prozent. Das Diagramm der Abbildung 4-9 zeigt den Zusammenhang zwischen Oberflächenzunahme und der Rauheit. Es ergibt sich eine annähernd lineare Abhängigkeit zwischen beiden Kenngrößen.

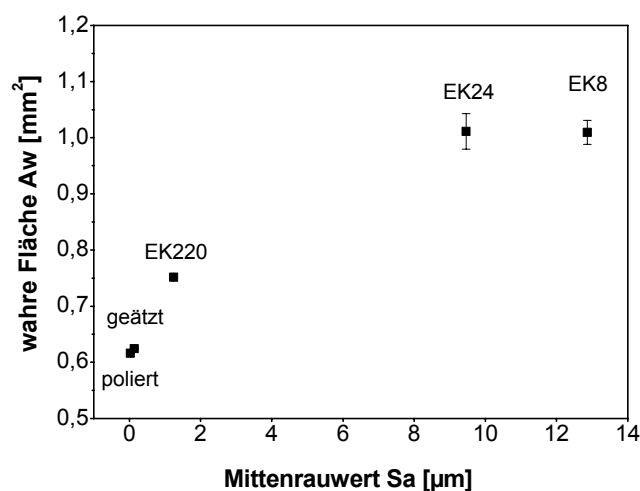


Abbildung 4-9 Die wahre Probenoberfläche A_w in Abhängigkeit des Mittenrauwertes S_a ($n = 5$). Mit zunehmender Rauheit nimmt die wahre Fläche zu.

Auch das geschlossene Leervolumen V_{cl} steigt mit zunehmender Oberfläche A_w annähernd linear an (Abbildung 4-10). Auch hier zeigt sich, dass mit zunehmender Rauigkeit die Streuungsbreiten der Messdaten erheblich ansteigen.

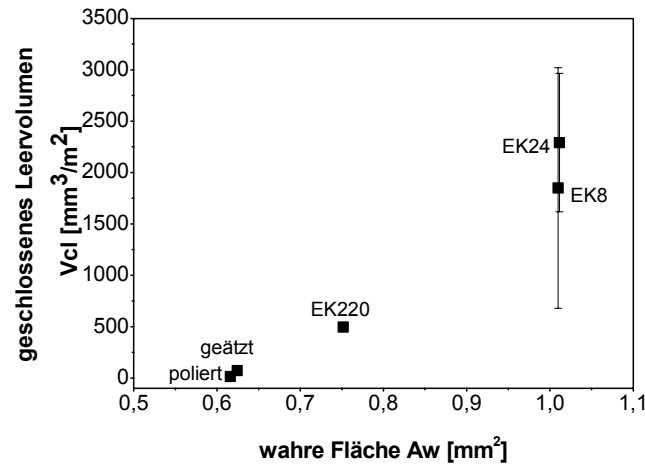


Abbildung 4-10 Das geschlossene Leervolumen V_{cl} nimmt in Abhängigkeit von der wahren Fläche A_w annähernd linear zu ($n = 5$).

Im Vergleich der Rauheitskenngrößen R_a zu S_a , d.h. zweier unterschiedlicher Messverfahren zeigen sich gute Übereinstimmungen vor allem im unteren bis mittelrauen Bereich (bis EK220). Mit zunehmender Rauheit erhöhen sich die Streuungsbreiten beider Messmethoden (Abbildung 4-11).

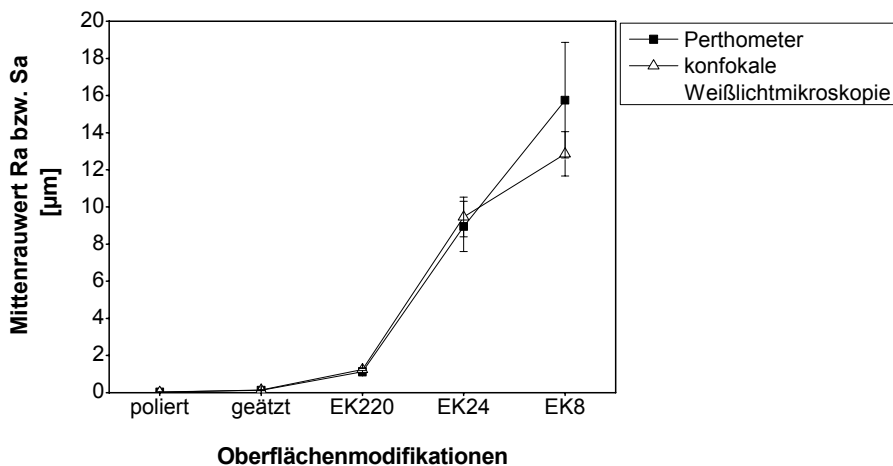


Abbildung 4-11 Der Vergleich des Mittenrauwertes in Abhängigkeit vom verwendeten Messverfahren. Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung des Rauheitskennwertes R_a bzw. S_a zwischen dem mechanischen Tastschnittverfahren mittels Perthometer und dem optischen Messverfahren mittels Weißlichtmikroskopie ($n = 5$).

Zur Berechnung funktionsrelevanter Oberflächenkenngrößen wurden verschiedene 3D-Oberflächenparameter berechnet. Eine Auswahl der ermittelten Parameter zeigt die Tabelle 9-6 im Anhang.

4.1.1.8 Kontaktwinkelbestimmung

Bei der Verwendung von Reinstwasser als Testmedium besitzen alle strukturierten Oberflächenzustände vor dem Einsatz im Zellkulturlabor einen Kontaktwinkel $\phi < 90$ Grad (Anhang Tabelle 9-7).

Der Benetzungsgrad für die polierten, geätzten und gestrahlten Proben lag in den Bereichen von 62° bis 78° . Bis zu Rauheiten von ca. $R_a < 10 \mu\text{m}$ (poliert bis EK24) nimmt der Kontaktwinkel tendenziell ab, was einer zunehmenden Benetzbarkeit der Oberflächen entspricht und steigt mit zunehmender Rauigkeit (EK8) wieder an (Abbildung 4-12).

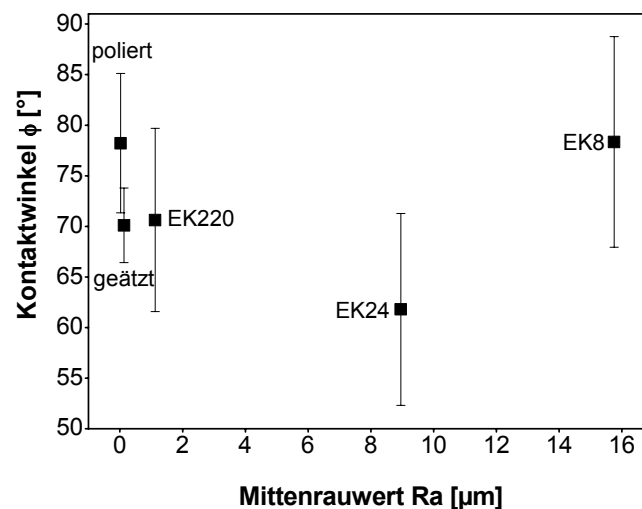


Abbildung 4-12 Der Kontaktwinkel Φ in Abhängigkeit der Mittenrauheit R_a ($n = 5$). Mit zunehmender Rauheit (poliert bis EK24) nimmt der Kontaktwinkel tendenziell ab, steigt jedoch bei der rauesten Probe EK8 wieder deutlich an.

Signifikante Unterschiede des Kontaktwinkels zwischen den einzelnen Oberflächen konnten nicht analysiert werden. Insgesamt weisen alle strukturierten Proben einen guten Benetzungsgrad auf.

4.1.2 *In vitro* Versuche mit strukturierten Oberflächen

4.1.2.1 Stoffwechselaktivität im Kontakt mit den strukturierten Oberflächen

Die mitochondriale Zellaktivität wurde mittels WST-1 Tests nach drei und sechs Tagen der Zellbesiedelung direkt auf den modifizierten Oberflächen analysiert und ist in der Abbildung 4-13 dargestellt. Die Anzahl der stoffwechselaktiven Zellen nahm, außer bei der Probe EK8, im Laufe der Kultivierung von drei zu sechs Tagen ab. Die Proliferation der Zellen auf den TiAl6V4-Oberflächen äußert sich im Vergleich zu den Kontrollen mit erhöhten WST-1-Werten. Signifikante Unterschiede, hinsichtlich des Proliferationsverhaltens konnten jedoch nicht analysiert werden.

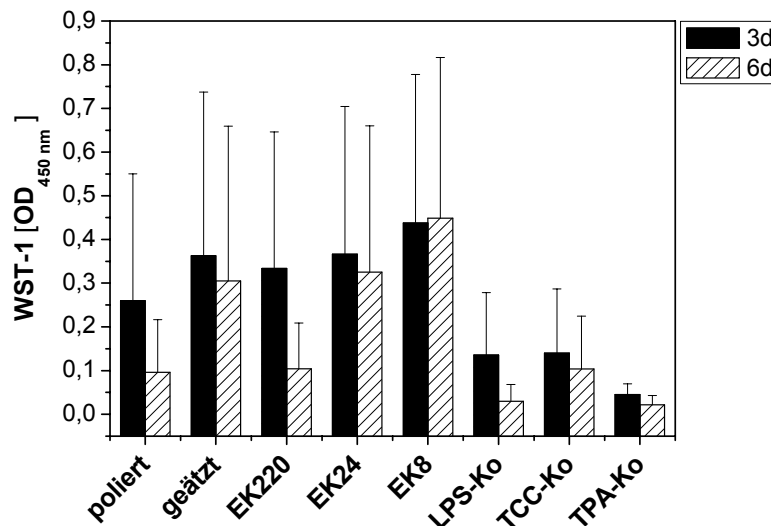


Abbildung 4-13 Proliferationsverhalten der Monozyten/Makrophagen nach direkten Kontakt mit den verschiedenen strukturierten Oberflächen ($n = 5$). Zellkulturkontrollen: Positivkontrollen (LPS-Ko, TPA-Ko) und Negativkontrolle (TCC-Ko) nach drei und sechs Tagen. Außer bei der Probe EK8 nahm die Anzahl der stoffwechselaktiven Zellen im Laufe der Kultivierung von drei zu sechs Tagen ab.

4.1.2.2 Zelladhäsionsverhalten im Kontakt mit den strukturierten Oberflächen

Zur Quantifizierung adhärenter Monozyten/Makrophagen auf allen Oberflächen wurde nach sechs Tagen mit DAPI angefärbt. Die Anzahl adhärenter Zellen beträgt in Richtung polierter zu immer rauer werdender Oberflächen EK8: 12, 41, 54, 82 und 90 adhärenente Zellen/mm². Durch die Vergrößerung der verfügbaren Oberfläche mit zunehmender

Rauheit nimmt die Anzahl der auf den Oberflächen haftenden Zellen kontinuierlich zu (Anhang Tabelle 9-8). Im Vergleich der polierten Oberfläche zur rauesten Probe EK8 hat die Anzahl der DAPI-positiven Zellen um das siebenfache zugenommen (Abbildung 4-14). Die Zellkontrollen in den konventionellen Zellkulturschalen zeigen ein ähnliches Adhärenzverhalten, wie die polierte TiAl6V4-Legierung.

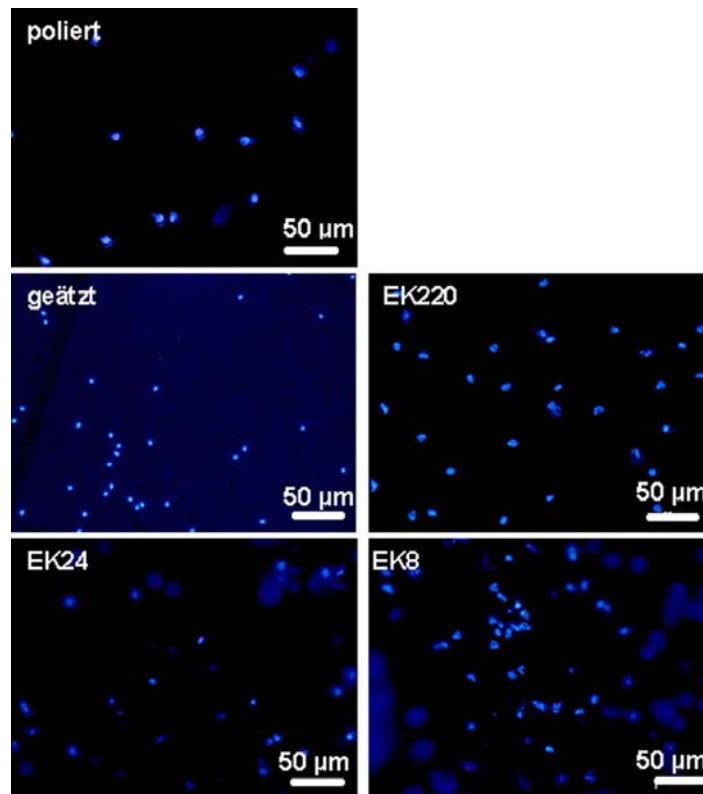


Abbildung 4-14 Die Besiedlungsdichte von Monozyten/Makrophagen auf den verschieden strukturierten Oberflächen im Auflichtmikroskop. Mit zunehmender Rauheit nimmt die Anzahl der auf den Oberflächen haftenden Zellen kontinuierlich zu.

4.1.2.3 Zellvitalitätsverhalten im Kontakt mit den strukturierten Oberflächen

Die Abbildung 4-15 zeigt das Verhältnis lebender (grün) zu toten (rot) Zellen auf der Oberflächenprobe EK8.

Ein direkter Einfluss der strukturierten Oberflächen auf das Verhältnis apoptotischer zu nekrotischen Zellen konnte nicht analysiert werden (Abbildung 4-16). Die Anzahl der vitalen Monozyten/Makrophagen liegt für alle Oberflächen bei über 68% nach sechs Tagen (Tabelle 9-9 im Anhang). Die sehr rauen Oberflächen EK24 und EK8 erreichen ähnliche

Werte wie die mitgeführte Zellkulturkontrolle (TCC-Ko). Die Zellkontrollen LPS-Ko und TPA-Ko besitzen erwartungsgemäß die niedrigste Vitalität.

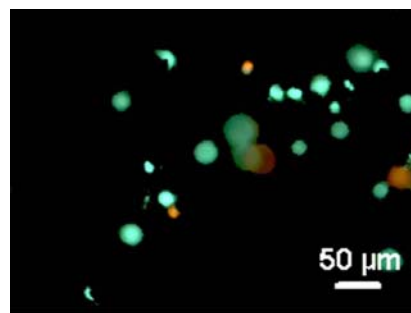


Abbildung 4-15 Der Live/Dead-Test auf der strukturierten TiAl6V-Probe EK8 nach sechs Tagen im Auflichtmikroskop. Vitale Zellen fluoreszieren grün, Zellkerne toter Zellen fluoreszieren rot.

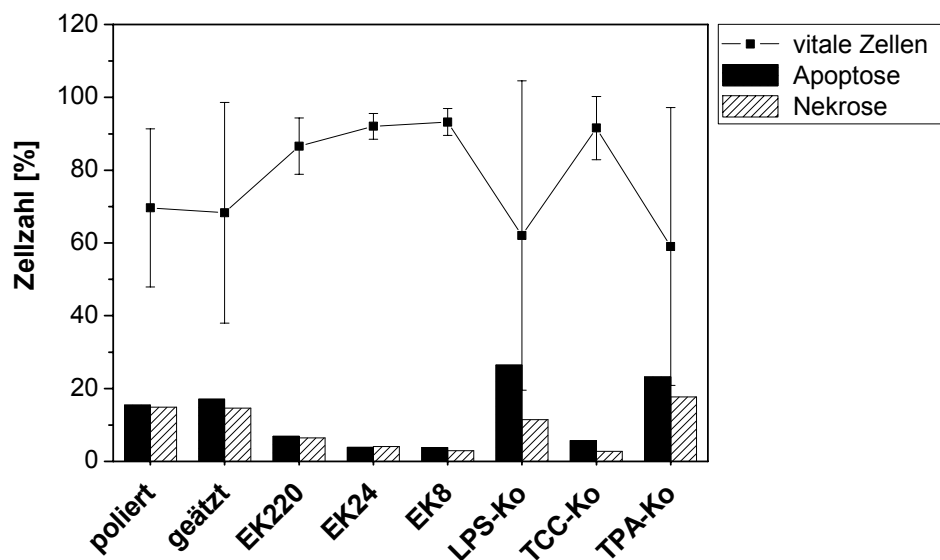


Abbildung 4-16 Die Live/Dead-Färbung im Vergleich zur Annexin-V-Fluos-Färbung auf allen strukturierten Oberflächen nach sechs Tagen ($n = 5$). Die Anzahl der apoptotischen und nekrotischen Zellen wurde auf die Anzahl toter Zellen normiert. Ein Einfluss der Oberflächenbearbeitung auf das Sterbeverhalten der Zellen konnte nicht ermittelt werden.

Die toten Monozyten/Makrophagen setzen sich gleichermaßen aus nekrotischen und apoptotischen Stadien zusammen. Einhergehend mit einer geringeren Vitalität bei den Positivkontrollen LPS-Ko und TPA war das Verhältnis toter Zellen zu Gunsten apoptotischer Zellen verschoben.

Die Abbildung 4-17 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt für die Probe EK8 mit apoptotischen Zellen (grün), wie man sie nach sechs Tagen angefärbt unter dem Fluoreszenzauflichtmikroskop detektieren konnte. Bei der Probe EK24 sieht man einen Monozyten/Makrophagen im nekrotischen Stadium.

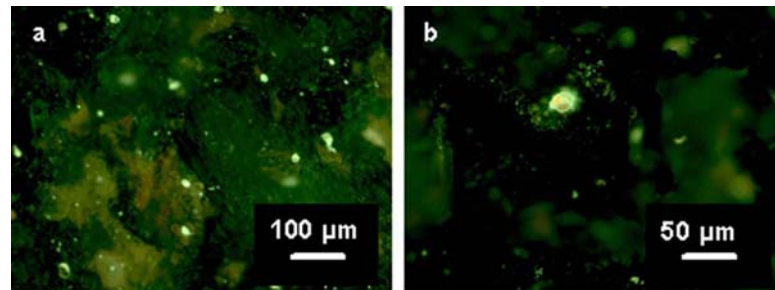


Abbildung 4-17 Zur Diskriminierung zwischen Apoptose und Nekrose wurde die Annexin-V-Fluos-Färbung eingesetzt. Das apoptotisches Stadium fluoresziert dabei nur grün, nekrotische Stadien fluoreszieren rot oder rot und grün im Auflichtmikroskop. a) Probe EK8, b) EK24;

4.1.2.4 Zytokinexpressionen im Kontakt mit den strukturierten Oberflächen

Die Abbildung 4-18 bis Abbildung 4-21 veranschaulichen die Expressionswerte nach drei und sechs Tagen, die auf allen Oberflächen einschließlich der mitgeführten Zellkontrollen bestimmt werden konnten.

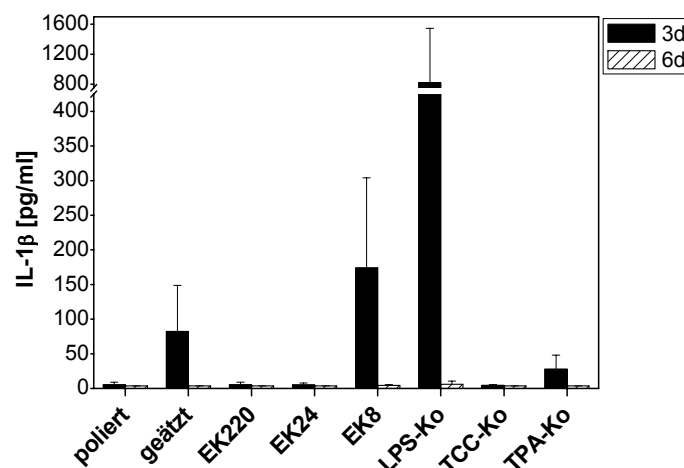


Abbildung 4-18 Der Einfluss der strukturierten Oberflächen auf die Expression von Interleukin-1beta (IL-1 β) nach drei und sechs Tagen, einschließlich der Positivkontrollen (LPS-Ko, TPA-Ko) und der Negativkontrolle (TCC-Ko). Die Oberflächen poliert und EK8 weisen nach drei Tagen deutlich höhere IL-1 β Werte auf ($n = 5$).

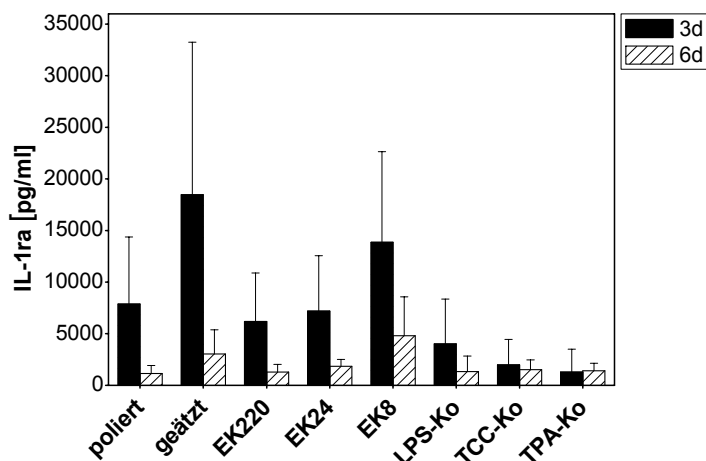


Abbildung 4-19 Der Einfluss der strukturierten Oberflächen auf die Expression von Interleukin-1ra (IL-1ra) nach drei und sechs Tagen, einschließlich der Positivkontrollen (LPS-Ko, TPA-Ko) und der Negativkontrolle (TCC-Ko). Die Oberflächen weisen deutlich messbare und unterschiedlich hohe IL-1ra Werte auf ($n = 5$).

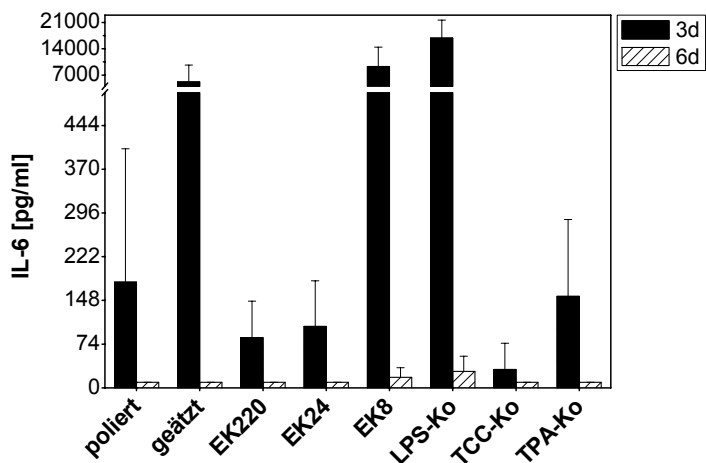


Abbildung 4-20 Der Einfluss der strukturierten Oberflächen auf die Expression von Interleukin-6 (IL-6) nach drei und sechs Tagen, einschließlich der Positivkontrollen (LPS-Ko, TPA-Ko) und der Negativkontrolle (TCC-Ko). Alle Oberflächen weisen nach drei Tagen unterschiedlich hohe IL-6 Werte auf. Nach sechs Tagen konnte nur noch eine geringe Zytokinexpression nachgewiesen werden ($n = 5$).

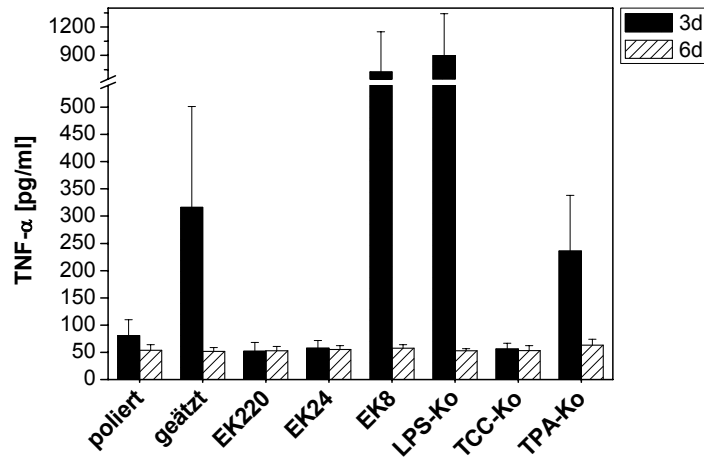


Abbildung 4-21 Der Einfluss der strukturierten Oberflächen auf die Expression des Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α) nach drei und sechs Tagen, einschließlich der Positivkontrollen (LPS-Ko, TPA-Ko) und der Negativkontrolle (TCC-Ko). Die Oberflächen poliert und EK8 weisen nach drei Tagen hohe TNF- α Werte auf ($n = 5$).

Im Vergleich der modifizierten Oberflächen untereinander tritt deutlich hervor, dass nach drei Tagen auf den Proben geätzt und EK8 die höchsten Werte analysiert wurden. Die geätzte Oberflächenprobe erreichte den 16-fachen IL-1 β Wert im Vergleich zu den Modifikationen poliert, EK24 und EK220, beim Oberflächenzustand EK8 sogar das 34-fache. Ein ähnliches Verhalten ist auch für die anderen Zytokine zu beobachten. Die geätzten und die rauesten Oberflächen (EK8) weisen nach drei Tagen im Vergleich zu den restlichen Oberflächenproben die höchsten Werte auf.

Die Ausschüttungshöhe der LPS-Positivkontrolle (LPS-Ko) wurde von keiner Oberflächenmodifikation für die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α erreicht. Die Stimulation mit TPA führte lediglich beim TNF- α Assay zu Erhöhungen. Nach sechs Tagen Besiedlungsdauer der Zellen auf den verschiedenen Oberflächen bzw. den Kontrollen lagen die Zytokinausschüttungen z.T. unter dem Bereich der Nachweisgrenze.

Signifikante Unterschiede innerhalb der modifizierten Oberflächen konnten nach drei Tagen bei der Bestimmung von IL-6 und TNF- α für die Proben EK220 im Vergleich zu EK8 und EK24 im Vergleich zu EK8 bestimmt werden. Für TNF- α wurde darüber hinaus zwischen poliert und EK8 ein signifikanter Unterschied festgestellt.

4.1.2.5 Morphologische Zellanalysen im Kontakt mit den strukturierten Oberflächen

Die Reifung und Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen geht mit Formveränderungen einher. Mit zunehmender Kultivierungsdauer vergrößern sich die Zellen und spreiten sich auf den verschiedenen Oberflächen aus (Abbildung 4-22). Mit Hilfe von Pseudopodien (Ausstülpungen der Zellmembran, Zellausläufer) haften sie am Untergrund.

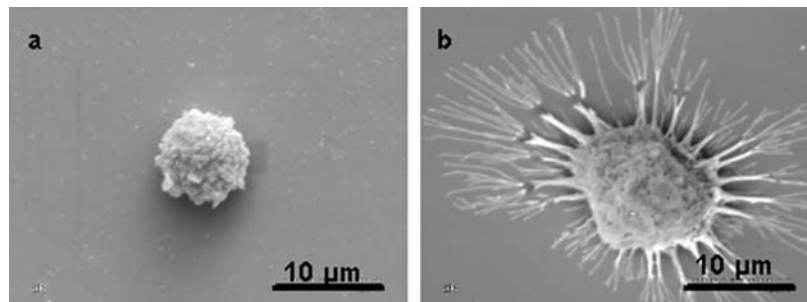


Abbildung 4-22 Die Differenzierung der Zellen auf der polierten TiAl6V4-Oberfläche äußert sich in einer Formveränderung und Größenzunahme im Laufe der Kultivierungsdauer unter dem Rasterelektronenmikroskop. a) kugelförmiger Monozyt/Makrophage nach drei Tagen, b) auf den glatten Untergrund anhaftender Monozyt/Makrophage mit sternförmigen Zellausläufern nach sechs Tagen;

Die Zellgestalt der Monozyten/Makrophagen auf den Metalloberflächen wurde zunächst mit Hilfe der May Grünwald Färbung im Auflichtmikroskop bewertet. Jedoch ließen sich auf Grund der zunehmenden Rauigkeit und der geringen Tiefenschärfe mit diesem mikroskopischen Verfahren nur für sehr glatte Oberflächen (poliert und geätzt) auswertbare Ergebnis erzielen (Abbildung 4-23).

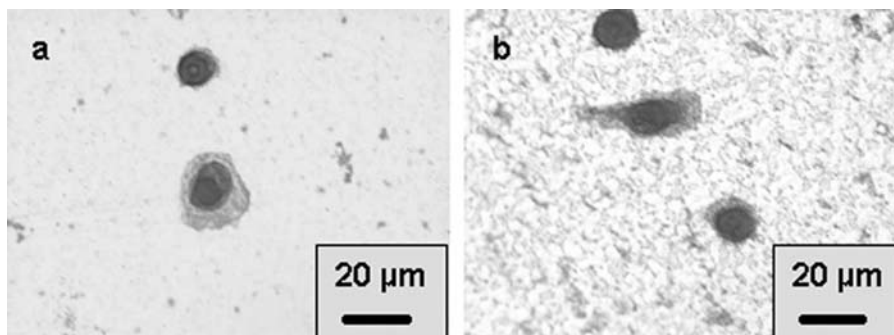


Abbildung 4-23 Das unterschiedliche Wachstum von Monozyten/Makrophagen auf verschiedenen oberflächenstrukturierten TiAl6V4-Probeflächen. Adhärenz Zellen May Grünwald gefärbt nach sechs Tagen a) auf polierter Probe und b) geätzter Probe im Auflichtmikroskop.

Auf der polierten Oberfläche spreizen sich die Zellen mehr oder weniger gleichmäßig rund auf dem planen Untergrund. Auf dem geätzten Untergrund wurden rund-gespreitete und spindelförmige Monozyten/Makrophagen beobachtet.

Auf der Abbildung 4-24 sind die einzelnen Oberflächenzellbesiedlungen nach sechs Tagen einander gegenübergestellt.

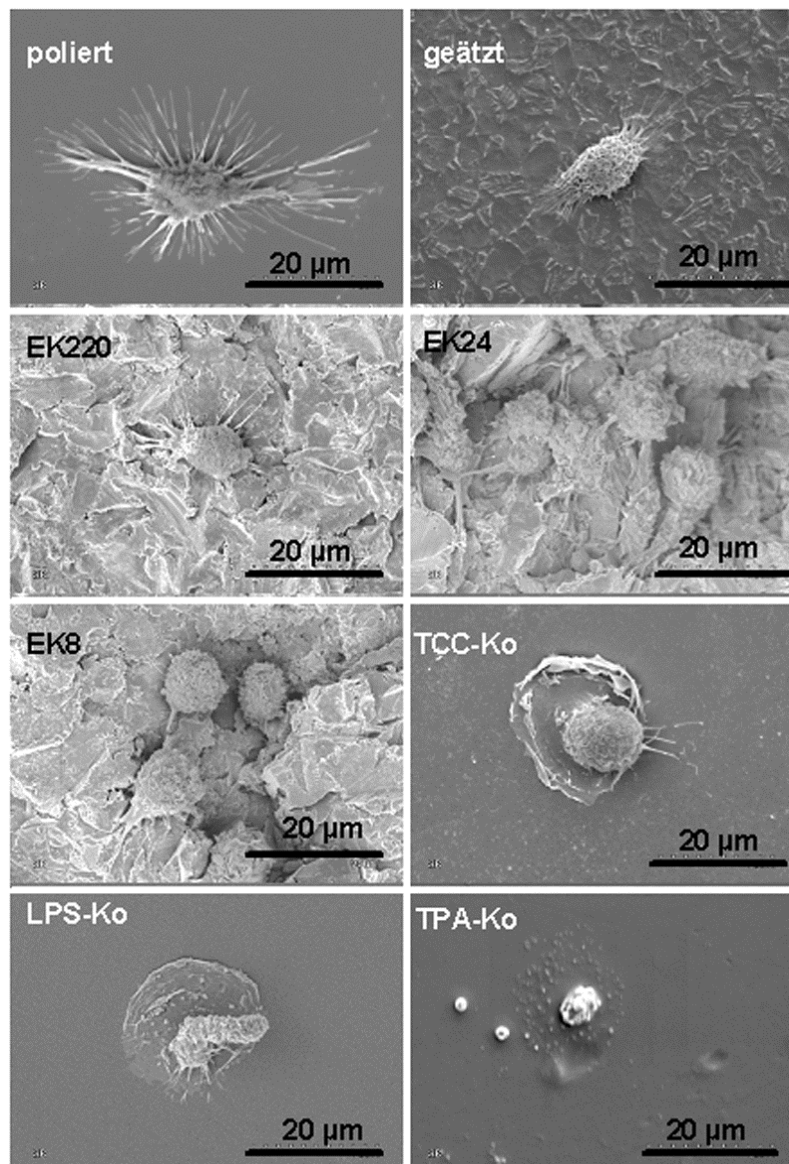


Abbildung 4-24 Die unterschiedliche Zellmorphologie der Monozyten/Makrophagen nach sechstägiger Besiedelung auf verschiedenen strukturierten TiAl6V4-Oberflächen, einschließlich der mitgeführten Zellkulturkontrollen im Rasterelektronenmikroskop. Mit zunehmender Rauigkeit können sich die Zellen auf den strukturierten Oberflächen nicht vollständig spreiten und nehmen einen kugelförmigen Phänotyp an.

Analog zur Abbildung der Auflichtmikroskopie spreizen sich die Monozyten auf den polierten Flächen rundum aus. Die einzelnen Zellausläufer sind dabei sternförmig ausgebildet. Die Anhaftung der Zellen an den Untergrund nimmt mit zunehmender Rauigkeit ab. Die Zellen weisen in Richtung EK8 eine zunehmend kugelige Morphologie (undifferenzierte) auf. Bei den Kontrollen lassen sich hinsichtlich der Zellgestalt zwischen TCC-Ko und LPS-Kontrolle keine markanten Unterschiede feststellen. Die Zell-Leiber sind vollständig am Untergrund ausgebreitet und recken sich z.T. wurmartige aus der Ebene heraus. Die TPA-Kontrolle zeichnet sich durch viele Zellbruchstücke und -reste auf.

Unabhängig vom Spender wiesen die Mehrzahl der Monozyten/Makrophagen auf den geätzten Oberflächen spindelförmige gestreckte Zelleiber auf (Abbildung 4-25).

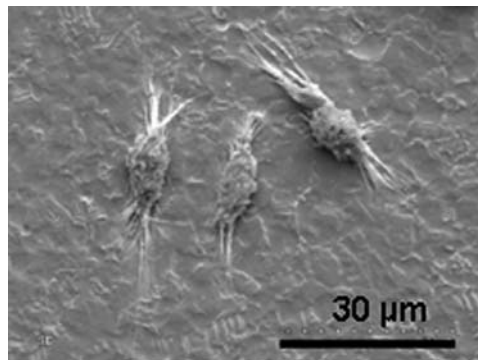


Abbildung 4-25 Nach drei Tagen Wachstum auf den geätzten Oberflächen lassen sich mehrfach Monozyten/Makrophagen mit spindelförmig ausgebildeten Zellausläufern beobachten.

Nur auf den polierten Proben wurden neben ursprünglich sessilen auch motile Stadien beobachtet (Abbildung 4-26).

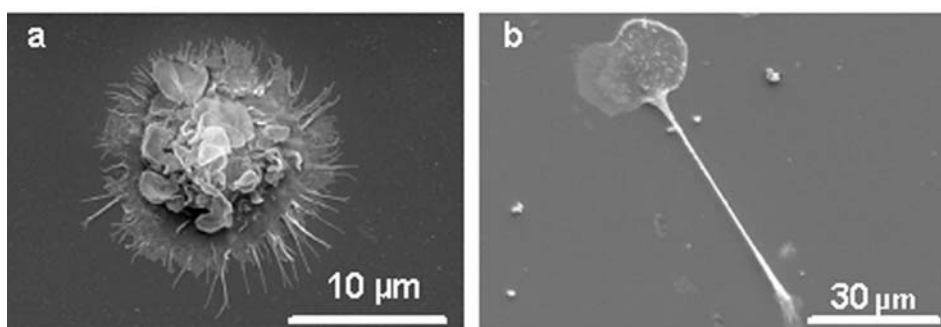


Abbildung 4-26 Das unterschiedliche Motilitätsverhalten von Monozyten/Makrophagen auf einer polierten TiAl6V4-Probe. a) Zeigt eine sessile Zelle mit typischer segelartiger gefalteter Leukozytenmembran und b) ein motiles Stadium mit pfeilförmigen Zellausläufern.

4.2 Biologisierte TiAl6V4-Oberflächen

4.2.1 Bestimmung der Oberflächeneigenschaften

4.2.1.1 Rasterelektronenmikroskopische Analysen vor Besiedelung mit Zellen

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der anodisch gestützten Hydroxylapatit-schichten Bonemaster[®] (BM) und Bonemaster-Kollagen-I (BMKoll-I) zeigt die Abbildung 4-27 vor der Besiedelung mit Zellen.

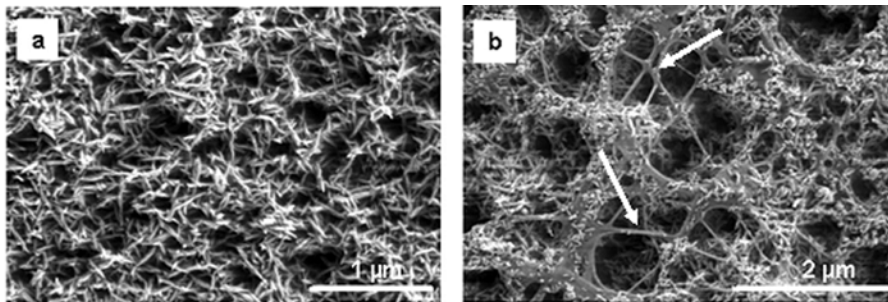


Abbildung 4-27 Hydroxylapatithaltige Oberflächenbeschichtungen vor dem Einsatz im Zellkulturlabor unter dem Rasterelektronenmikroskop. a) Die Beschichtung mit Bonemaster[®] weist eine von Hydroxylapatitnadeln dicht besetzte Oberfläche auf. b) Die Bonemaster-Kollagen-I Beschichtung hat in das Maschenwerk aus Hydroxylapatitnadeln zusätzlich kollagene Fibrillen des Kollagentyps I eingebettet (Pfeile).

Die ca. 5-10 µm starke Schicht [33] besteht aus nadelartigen Calciumphosphatkristallen, die netzartig angeordnet sind. In dieses Maschenwerk wurden bei der Oberflächenbeschichtung BonemasterKollagen-I (BMKoll-I) typische kollagene Fibrillen eingebaut.

4.2.1.2 Atomkraftmikroskopische Analysen vor Besiedelung mit Zellen

Die Abbildung 4-28 zeigt die beschichteten TiAl6V4-Oberflächen Koll-I (Kollagen-I) und Koll-III (Kollagen-III).

Die Immobilisation mit Kollagenfibrillen war homogen und vollständig über die gesamte Substratoberfläche verteilt. Die erzielten Schichtdicken lagen im Bereich von ca. 100 nm [33].

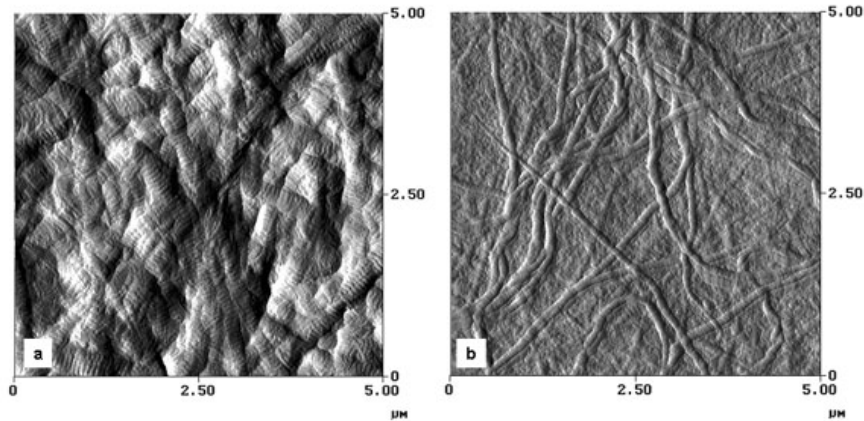


Abbildung 4-28 Die kollagenhaltigen Oberflächenbeschichtungen vor dem Einsatz im Zellkulturlabor unter dem Atomkraftmikroskop im Tapping Modus. a) Die Kollagen-I Beschichtung weist typische Kollagen-I Fibrillen auf. b) Die Kollagen-III Beschichtung besteht aus netzartig angeordneten Kollagen-III Fibrillen.

4.2.2 *In vitro* Versuche der biologisierten Oberflächen mit der Zelllinie dU937

4.2.2.1 Stoffwechselaktivität von dU937 Zellen im Kontakt mit den verschiedenen Oberflächenbeschichtungen

Das Diagramm der Abbildung 4-29 veranschaulicht die gemessenen Extinktionen des WST-1 Tests, als Maß der mitochondrialen Aktivität der Zellen nach vier Tagen in direkten Kontakt mit den verschiedenen Beschichtungen.

Die messbare optische Dichte (OD) liegt bei den Kontrollen deutlich niedriger als bei den Oberflächenbeschichtungen. Auf Grund einer vorangegangenen Proliferationsrate der TCC-Ko liegt die Anzahl metabolisch aktiver Zellen im Bereich der Positivkontrolle (LPS-Ko).

Innerhalb der einzelnen Oberflächenbeschichtungen gibt es jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Proliferationsrate der dU937 Zellen in Abhängigkeit von der Beschichtung.

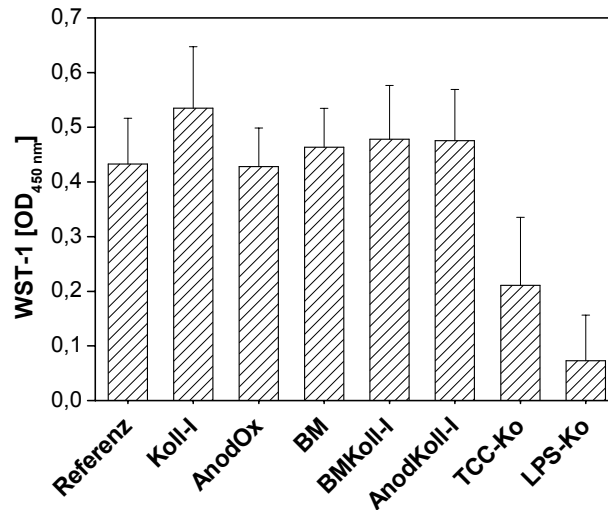


Abbildung 4-29 Die verschiedenen Oberflächenbeschichtungen besitzen keinen signifikanten Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Zelllinie dU937 nach vier Tagen ($n = 4$).

4.2.2.2 Zellvitalitätstest von dU937 Zellen im Kontakt mit den verschiedenen Oberflächenbeschichtungen

Die Abbildung 4-30 zeigt die Erfassung vitaler dU937 Zellen nach vier Tagen in direktem Kontakt mit den Oberflächenbeschichtungen durch die Anfärbung mit Trypanblau.

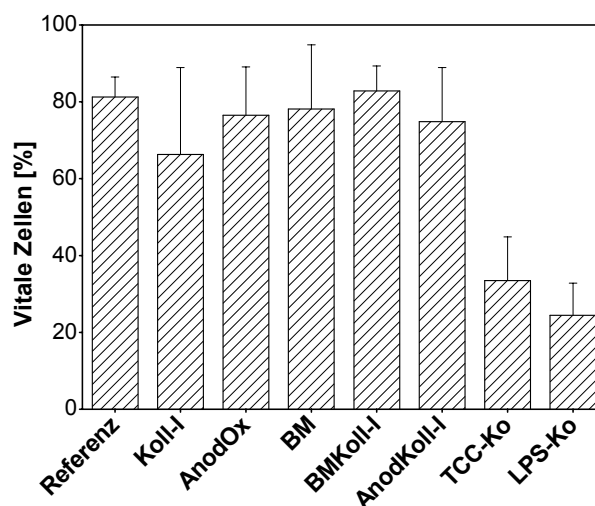


Abbildung 4-30 Die verschiedenen Oberflächenbeschichtungen besitzen keinen signifikanten Einfluss auf das Vitalitätsverhalten der Zelllinie dU937 nach vier Tagen ($n = 4$).

Für alle Probenzustände liegt die Anzahl vitaler Zellen über 65%. Die reine Zellkontrolle (TCC-Ko) unterscheidet sich nicht von der Positivkontrolle (LPS-Ko). Auf Grund einer vorangegangenen starken Proliferationsrate (Zellverdoppelung/Tag) liegt die Anzahl beider Kontrollen unter 40%.

4.2.2.3 REM-Analysen der dU937 Zellen im Kontakt mit den verschiedenen Oberflächenbeschichtungen

Die Abbildung 4-31 zeigt beispielhaft für die übrigen Oberflächenbeschichtungen eine dU937 Zelle nach vier Tagen auf einer mit Kollagen-I gecoateten TiAl6V4-Oberfläche. Die Zelle ist kugelig und besitzt keinen ausgeprägten Adhäsionsaum.

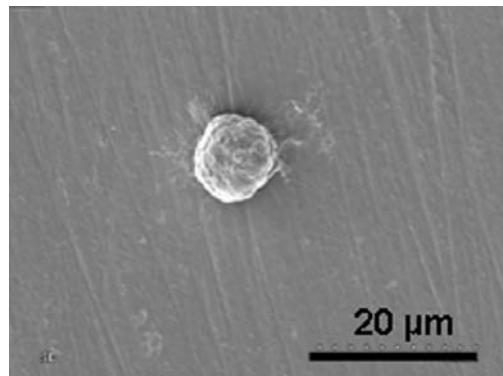


Abbildung 4-31 Die rasterelektronenmikroskopische Analyse der Zellbesiedlung auf Kollagen-I beschichteten Proben zeigt nach vier Tagen vorwiegend kugelige dU937-Zellen, ohne ausgeprägten Adhärenzsaum.

4.2.2.4 Zytokinexpressionen von dU937 Zellen im Kontakt mit den verschiedenen Oberflächenbeschichtungen

Die Versuche ergaben, dass ohne vorherige Stimulation der Zellen mit Phorbol ester (TPA) keine messbare Zytokinexpression erfolgt (Abbildung 4-32) und dass nur mit TPA vorstimulierte Zellen (dU937) in Abhängigkeit vom Entnahmezeitpunkt unterschiedlich messbare Zytokinausschüttungen zeigten.

Dies gilt für die gezeigte TNF- α Zytokinexpression ebenso, wie für IL-1 β . Für die nachfolgenden Versuche wurden deshalb nur vorstimulierte Zellen (dU937) verwendet. Als Ergebnis der Zytokinausschüttung im Verlauf der Zeit wurde der 4. Tag für die Entnahme des Zellüberstandes zur Zytokinanalyse gewählt.

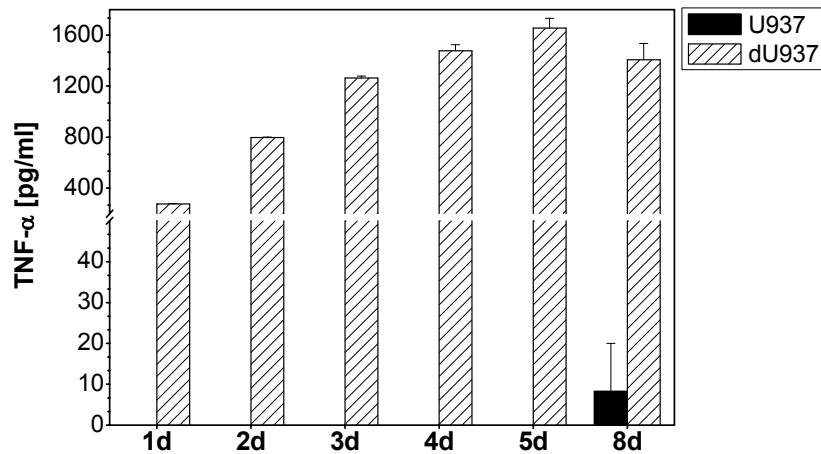


Abbildung 4-32 Die Expression von TNF- α ist abhängig von einer vorhergehenden Stimulation der Zelllinie. Das Diagramm veranschaulicht die unterschiedliche Zytokinausschüttung zu verschiedenen Zeitpunkten im Vergleich unstimulierter Zellen (U937) zu stimulierten Zellen (dU937). Ohne Stimulation erfolgt keine ausgeprägte Zytokinexpression.

In der Abbildung 4-33 bis zur Abbildung 4-35 ist der Einfluss der verschiedenen Oberflächenbeschichtungen auf die Expression der proinflammatorischen Mediatoren IL-1 β und TNF- α und auf den Antagonisten IL-1ra dargestellt.

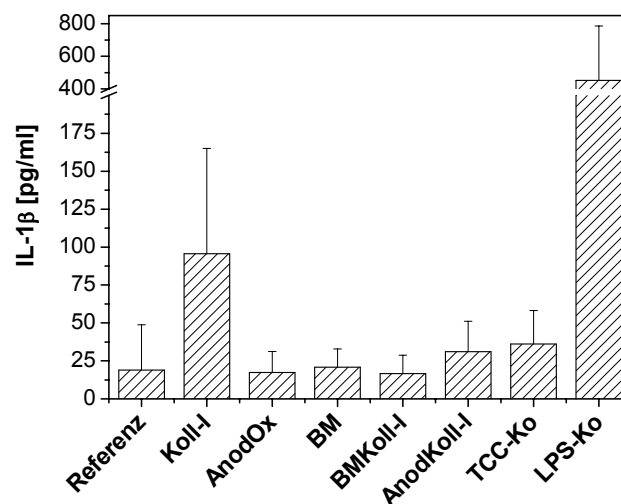


Abbildung 4-33 Der Einfluss der Oberflächenbeschichtungen auf das Interleukin-1 β (IL-1 β) Expressionsverhalten von dU937 Zellen nach vier Tagen Zellbesiedlung ($n = 4$). Außer der kollagenbeschichteten Probe (Koll-I) besitzen die verschiedenen Oberflächen keinen deutlichen Einfluss auf die Ausschüttung des Zytokines auf die Zelllinie.

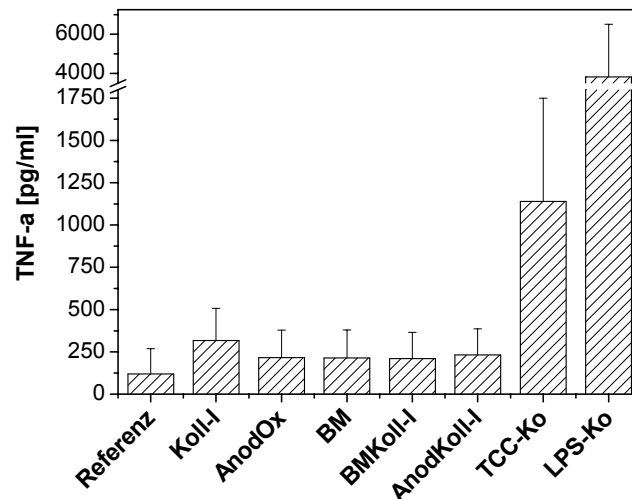


Abbildung 4-34 Der Einfluss der Beschichtungen auf das TNF- α Expressionsverhalten von dU937 Zellen nach vier Tagen ($n=4$). Die verschiedenen Oberflächenbeschichtungen besitzen keinen signifikanten Einfluss auf die Zytokinausschüttung.

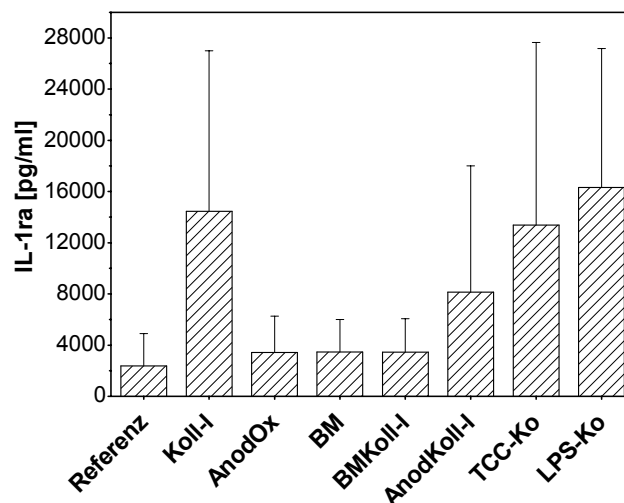


Abbildung 4-35 Der Einfluss der Beschichtungen auf das IL-1ra Expressionsverhalten von dU937 Zellen nach vier Tagen ($n=4$). Außer der Probe Koll-I besitzen die verschiedenen Oberflächen keinen unterschiedlichen Einfluss auf die Zytokinausschüttung.

Innerhalb der biologisierten Proben konnten keine signifikanten Unterschiede analysiert werden. Die Expressionshöhe lag für die proinflammatorischen Zytokine im Bereich der Negativkontrolle (TCC-Ko). Die Positivkontrolle (LPS-Ko) weist die höchsten messbaren Werte auf. Die Diagramme lassen erkennen, dass die Zelllinie dU937 unter diesen *in vitro*

Bedingungen für diese Beschichtungen keine relevanten Aussagen hinsichtlich des Mediatorenspektrums zulässt.

4.2.3 *In vitro* Versuche der biologisierten Oberflächen mit Blutmonozyten

4.2.3.1 Stoffwechselaktivität von Blutmonozyten im Kontakt mit den verschiedenen Oberflächenbeschichtungen

Die Abbildung 4-36 zeigt die Anzahl metabolisch aktiver Zellen nach drei Tagen Zellbesiedlung auf den verschiedenen Beschichtungen. Auch hier zeigt sich, dass keine signifikanten Unterschiede der optischen Dichte innerhalb der verschiedenen Beschichtungen und den Zellkulturkontrollen ermittelt werden konnten.

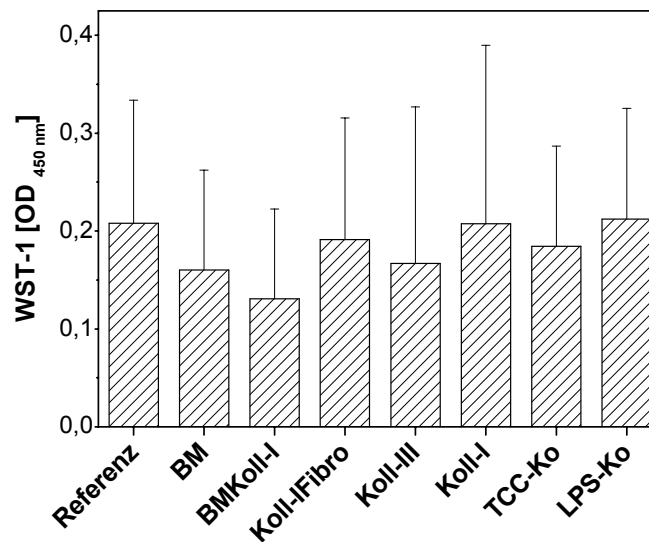


Abbildung 4-36 Der Einfluss der Oberflächenbeschichtungen auf die Anzahl stoffwechselaktiver Zellen nach drei Tagen ($n = 6$). Innerhalb der verschiedenen Beschichtungen lassen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Stoffwechselaktivität nachweisen.

4.2.3.2 Rasterelektronenmikroskopische Analysen von Blutmonozyten im Kontakt mit den Oberflächenbeschichtungen

Zur Analyse der Zellmorphologie wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Die Monozyten/Makrophagen lagen auf allen Oberflächen in vorwiegend kugelig und ungespreiteter Form vor.

Auf den Oberflächen der Zustände BM (Bonemaster®) und BMKoll-I (BonemasterKollagen-I) konnte auch nach drei Tagen Inkubation noch immer die Hydroxylapatitschicht beobachtet werden. (Abbildung 4-37). Abweichend von den meist kugeligen Zellen konnten auf den hydroxylapatithaltigen Beschichtungen lang gestreckte Zellen mit kristallähnliche Strukturen auf der Zelloberfläche, ähnlich der daneben liegenden Hydroxylapatitschicht beobachtet werden (Abbildung 4-37).

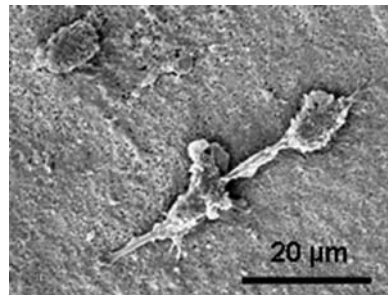


Abbildung 4-37 Nach drei Tagen Zellbesiedlung befinden sich auf der hydroxylapatithaltigen Oberflächenbeschichtung (BM) motile, langgestreckte Monozyten/Makrophagen.

4.2.3.3 Zytokinexpressionen von Blutmonozyten im Kontakt mit den Oberflächenbeschichtungen

Die Sekretion der proinflammatorischen Mediatoren im direkten Kontakt mit den Oberbeschichtungen veranschaulichen die Abbildung 4-38 bis Abbildung 4-40.

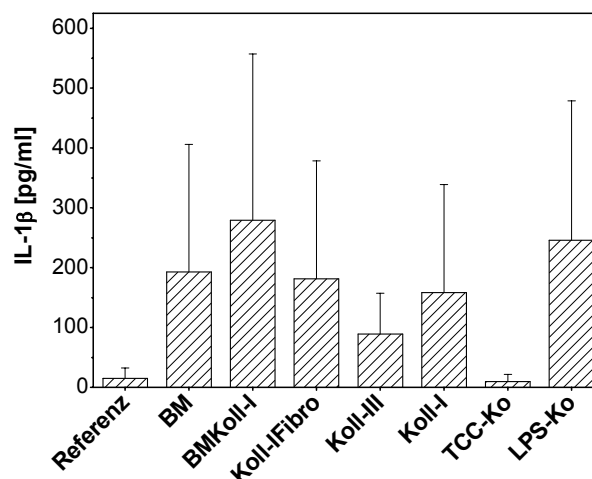


Abbildung 4-38 Der Einfluss der Oberflächenbeschichtungen auf die IL-1 β Expression von Monozyten/Makrophagen nach drei Tagen ($n = 6$).

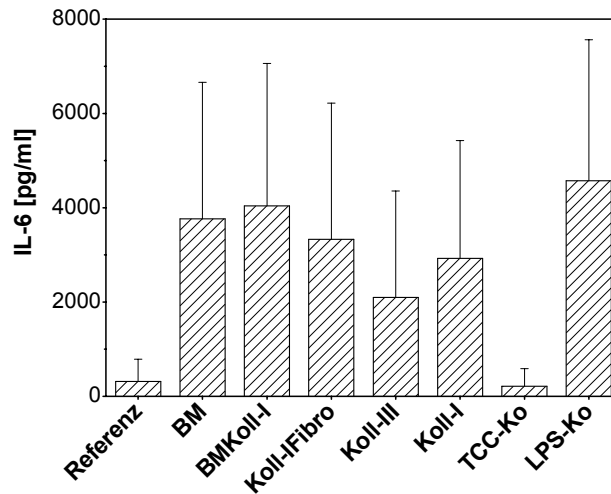


Abbildung 4-39 Der Einfluss der Oberflächenbeschichtungen auf die IL-6 Expression von Monozyten/Makrophagen nach drei Tagen ($n = 6$). Die verschiedenen Oberflächenbeschichtungen lösen unterschiedlich starke Zytokinausschüttungen aus.

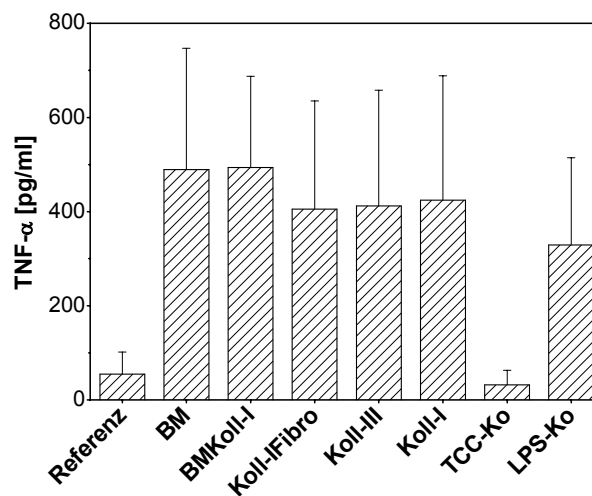


Abbildung 4-40 Einfluss der Oberflächenbeschichtungen auf die TNF- α Expression von Monozyten/Makrophagen nach drei Tagen ($n = 6$). Innerhalb der Beschichtungen konnte kein signifikanter Einfluss auf die TNF- α Ausschüttung analysiert werden.

Die unbeschichtete Referenzprobe lag bei allen Analysen im Bereich der Negativkontrolle (TCC-Ko), d.h. der unbeschichtete Zustand löst die geringsten Zytokinausschüttungen aus. Bei der Positivkontrolle (LPS-Kontrolle) ließen sich erwartungsgemäß hohe Expressionen

nachweisen, die jedoch im Falle von IL-1 β und TNF- α von den hydroxylapatithaltigen Proben (Bonemaster[®] und BonemasterKollagen-I) übertroffen wurden.

Signifikante Unterschiede beim statistischen Vergleich von Referenz zu den übrigen Oberflächen konnten nicht ermittelt werden.

Das Diagramm der Abbildung 4-41 zeigt die Expression des IL-1 Rezeptorantagonisten. Höchste Sekretionsraten von IL-1ra sind auf den proteinhaltigen Beschichtungen (Koll-III und Koll-I) zu finden. Die übrigen Oberflächenzustände unterscheiden sich nicht statistisch voneinander. Den niedrigsten Wert weist erwartungsgemäß die Negativkontrolle (TCC-Ko) auf.

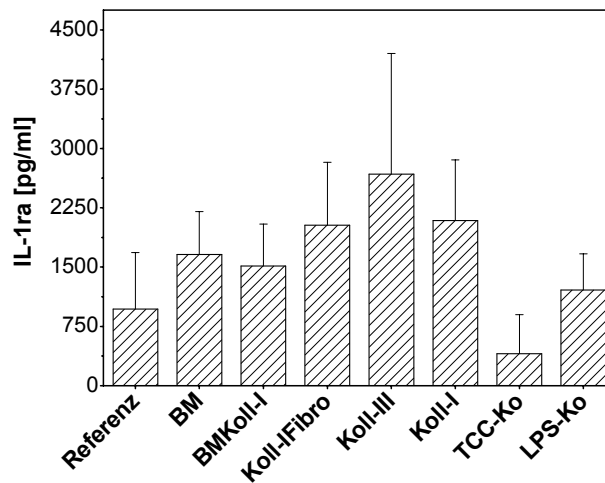


Abbildung 4-41 Einfluss der Oberflächenbeschichtungen auf die IL-1ra Expression von Monozyten/Makrophagen nach drei Tagen ($n = 6$). Die verschiedenen Oberflächenbeschichtungen lösen unterschiedlich hohe Zytokinausschüttungen aus.

4.3 Spenderabhängiges Verhalten der Monozyten/Makrophagen

Die Versuche mit Primärzellen zeigen, dass Zytokinexpression auf den verschiedenen Oberflächen (beschichtet und strukturiert) auch vom Zellmaterial beeinflusst wird (Abbildung 4-42 und Abbildung 4-43).

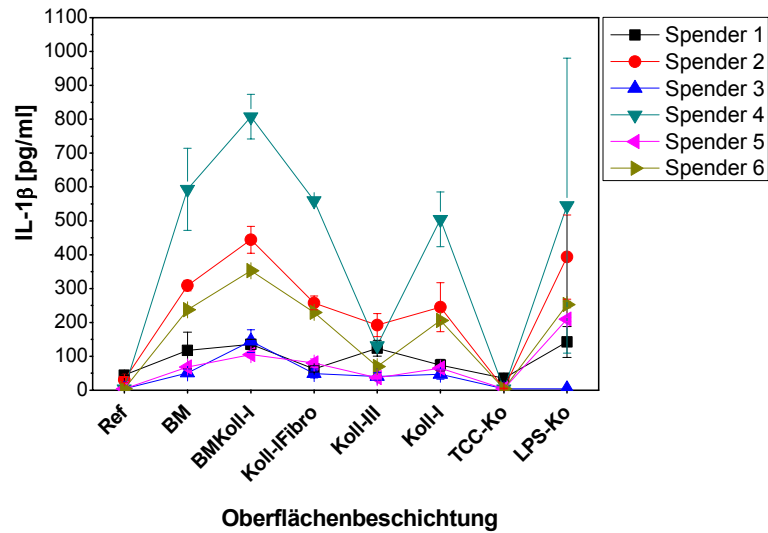


Abbildung 4-42 Die Zytokinexpression von IL-1 β in Abhängigkeit vom Spendertyp. Bei der Verwendung von Primärzellen kann die Zytokinausschüttung zum Teil erheblich schwanken und das Ergebnis beeinflussen.

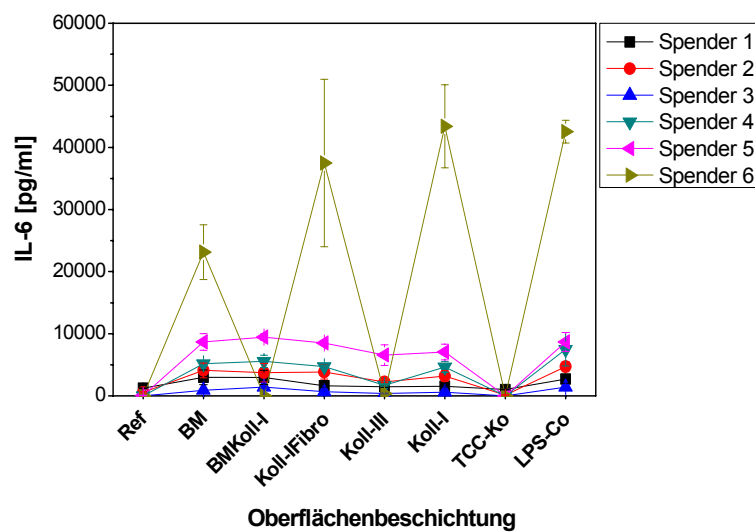


Abbildung 4-43 Die Zytokinexpression von IL-6 in Abhängigkeit vom Spendertyp. Auch in Abhängigkeit von der Zytokinart lassen die verschiedenen Spender ein unterschiedliches Verhaltensrepertoire deutlich werden.

Die verschiedenen Spender, die für die Versuche der Serie-I verwendet wurden, lassen sich drei verschiedenen Gruppen zuordnen: Die erste Spendergruppe umfasst dabei die größte Anzahl der Blutproben insgesamt und vereint diejenigen Zellen, die sich durch die verschiedenen modifizierten Oberflächen wenig beeinflussen lassen, was sich in niedrigen Mediatorausschüttungen äußert.

Zur zweiten Gruppe zählen Spender deren Monozyten/Makrophagen sich durch die verschieden modifizierten Oberflächen moderat stimulieren lassen. Die dritte Spendergruppe beinhaltet Blutspender, die sich durch enorm hohe Zytokinexpressionen im Kontakt mit den Oberflächen auszeichnen. Die Einteilung der Spendertypen hängt auch von der Art des analysierten Zytokins ab (Abbildung 4-43). Das interindividuelle Zellverhalten wurde grundsätzlich auch bei den Oberflächenbeschichtungen beobachtet.

5 Bewertung der Ergebnisse

5.1 Bewertung der Ergebnisse oberflächenstrukturierter TiAl6V4-Proben

Im Zellkulturmodell wurde geprüft, welchen Einfluss die Oberflächentopographie verschieden strukturierter TiAl6V4-Proben auf das Verhalten von Monozyten/Makrophagen hat. Im direkten Vergleich der strukturierten Oberflächen wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Vitalität und der Proliferation festgestellt. Ein Unterschied der Anzahl metabolisch aktiver Zellen in Abhängigkeit des untersuchten Zeitpunktes der Bestimmung (drei und sechs Tage) ließ sich nicht feststellen. Stellt man das Proliferationsverhalten nach drei Tagen Kultivierung in Abhängigkeit der wahren Fläche A_w als $WST-1 = f(A_w)$ dar, erhält man jedoch einen nahezu linearen Zusammenhang (Abbildung 5-1). Je rauer die Oberfläche wird, umso höher ist die Anzahl metabolisch aktiver Zellen nach drei Tagen im direkten Kontakt.

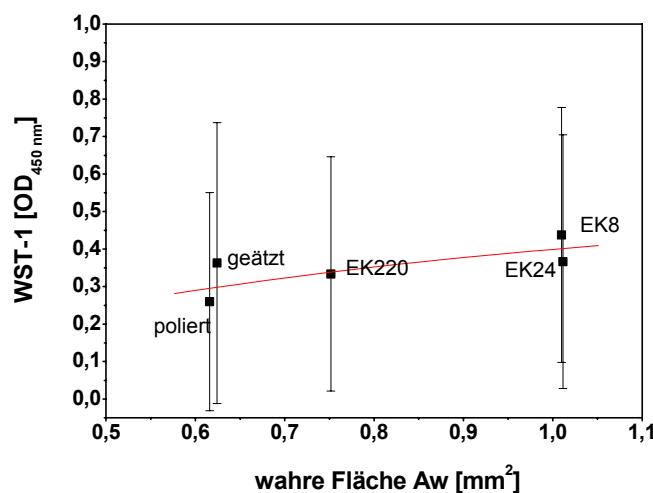


Abbildung 5-1 Die Stoffwechselaktivität von Monozyten/Makrophagen nach drei Tagen Zellbesiedlung auf verschiedenen strukturierten Oberflächen in Abhängigkeit von der wahren Fläche. Mit zunehmender Fläche A_w nimmt die Anzahl metabolisch aktiver Zellen zu.

Mit zunehmender Rauigkeit nahm die Anzahl adhärenter Zellen zu. Ebenfalls in Abhängigkeit von der wahren Fläche nahm die Anzahl der angehafteten Monozyten/Makrophagen zu. Für den untersuchten Rauheitsbereich ergibt sich für die Darstellung $Zellzahl = f(A_w)$ ebenso eine annähernd lineare Beziehung (Abbildung 5-2).

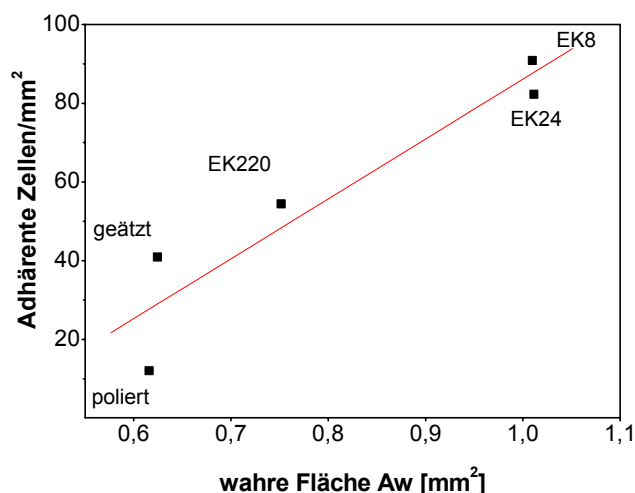


Abbildung 5-2 Das Adhäsionsverhalten in Abhängigkeit von der wahren Fläche A_w nach sechs Tagen Zellbesiedlung auf verschiedenen strukturierten Oberflächen. Mit zunehmender Fläche nimmt die Anzahl adhärenter Zellen zu.

Ein Einfluß der Oberflächengeometrie auf die Art des Zelltodes (Apoptose oder Nekrose), ließ sich wie in Abbildung 4-17 gezeigt, nicht feststellen.

Auch auf den Phänotyp der Zellen scheint die absolute Mittenrauigkeit keinen Einfluss zu besitzen. Lediglich bei den geätzten Proben, die sich in ihrem Herstellungsprozess deutlich von den polierten und den sandgestrahlten Proben unterscheiden, wurde ein verändertes Erscheinungsbild der Zellen beobachtet (Abbildung 4-25).

Die Zunahme adhärenter Monozyten/Makrophagen in Abhängigkeit der Rauigkeit, wie auch die beobachteten morphologischen Unterschiede in Abhängigkeit des Herstellungsprozesses fügen sich jedoch keiner einfachen Argumentationskette und lassen keine Aussagen hinsichtlich einer positiven bzw. negativen Bewertung dieser Oberflächen zu.

Die Bildung des Quotienten IL-1 β zu IL-1 α ermöglichte die Quantifizierung des Entzündungspotentials für einzelne Oberflächen. Erwartungsgemäß nahm dieses Verhältnis für die mitgeführten Positivkontrollen (LPS-Ko und TPA-Ko), sozusagen als Imitatoren des entzündlichen Zustandes, die höchsten Werte ein. Die Negativkontrolle dagegen weist (TCC-Ko) einen deutlich geringeren Wert auf. Im Vergleich der Kultivierungsdauer ist der Trend nach sechs Tagen nicht so deutlich, wie nach drei Tagen. Auch in Anbetracht der

Verdünnungseffekte sind die Werte des 1. Entnahmezeitpunktes (drei Tage) aussagekräftiger, als die nach dem Mediumwechsel nach sechs Tagen.

Die Abbildung 5-3 offenbart den Zusammenhang zwischen Entzündungspotential nach drei Tagen in Abhängigkeit der der Mittenrauigkeit Sa.

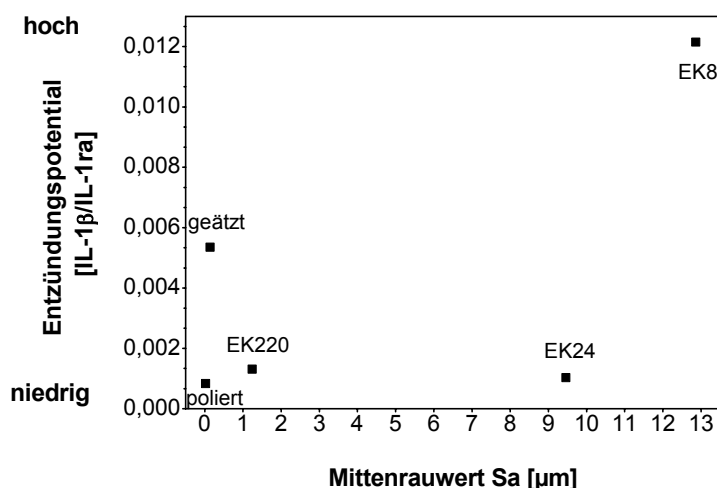


Abbildung 5-3 Der Einfluss der strukturierten Oberflächen auf das Entzündungspotential in Abhängigkeit des Mittenrauwertes nach drei Tagen ($n = 5$). Die Oberflächen poliert, EK220 und EK24 besitzen ein geringes Entzündungspotential, während die geätzten Proben und die rauesten Proben EK8 ein deutlich höheres Entzündungspotential aufweisen.

Die polierte Titanprobe lag dabei im niedrigsten Bereich, was als Oberfläche mit dem geringsten Entzündungspotential zu interpretieren ist. Geordnet nach Höhe des IL-1-Quotienten ergibt sich eine Reihenfolge der strukturierten Oberflächen bei der die *in vitro* Entzündungsinduktion deutlich zunimmt: poliert < EK24 < EK220 < geätzt < EK8.

Ein linearer Zusammenhang zwischen Mittenrauigkeit und Vergrößerung der proinflammatorischen *in vitro* Antwort konnte nicht festgestellt werden. Mittenrauwerte von Sa > 10 µm (EK8) aktivieren demzufolge in diesem Zellkulturmodell die Monozyten/Makrophagen stark, was sich im höchsten Entzündungspotential äußerte. Auch im Hinblick auf die Adsorptionsrate erscheint das Entzündungspotential von Bedeutung, da es bestätigt, dass die Anzahl adhärenter Zellen nicht mit der Höhe des Entzündungspotentials korreliert (Abbildung 5-4). Die Oberflächen fördern mit

zunehmender Rauigkeit die Adhäsion, aktivieren aber die Monozyten/Makrophagen unterschiedlich, was für weitere werkstoffabhängige Einflussgrößen spricht.

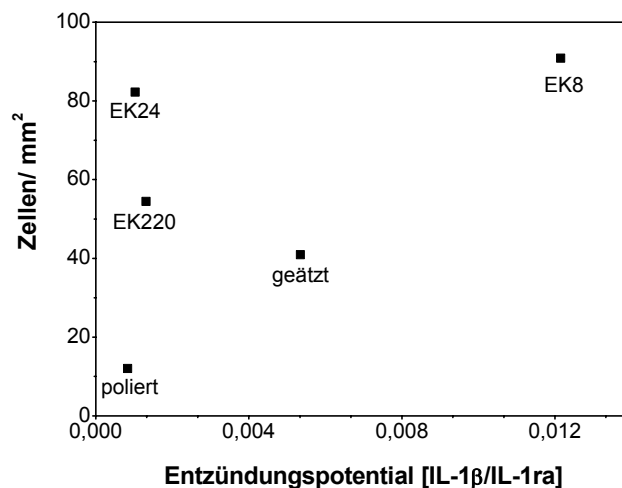


Abbildung 5-4 Der Einfluss der Oberflächenstrukturierung auf die Anzahl adhärenter Zellen und das Entzündungspotential. Zwischen der Anzahl adhärenter Monozyten/Makrophagen und dem Quotienten IL-1β/IL-1ra lässt sich kein Zusammenhang erkennen.

Aber auch die geätzte Probe wies sehr hohe Zytokinexpressionen auf, obwohl sie sich geometrisch sehr gut in die Reihe der polierten und gestrahlten Proben vergleichbarer Mittenrauigkeit einordnen ließ. Die Ergebnisse legen nahe, dass neben der Art der Oberflächenstruktur auch scheinbar der Herstellungsprozess das Entzündungsverhalten von Blutmonozyten beeinflussen kann.

Um die verschiedenen strukturierten Oberflächen auch geometrisch quantifizieren zu können, wurden mit der konfokalen Weißlichtmikroskopie zahlreiche 3D-Oberflächenparameter bestimmt (Anhang Tabelle 9-5 und Tabelle 9-6). Auf der Grundlage mathematischer Verfahren, wurden nachfolgend funktionsrelevante Kenngrößen ermittelt. Voraussetzung zur Bestimmung funktionsrelevanter Kenngrößen, ist die Bestimmung von Funktionsklassen. Mit Funktionsklassen ist die Bewertung der modifizierten Oberflächen mittels der Zytokinexpression gemeint. Zur Veranschaulichung lässt sich das Streudiagramm IL-1β zu IL-6 heranziehen (Abbildung 5-5). Es lassen sich diese Oberflächen zwei Funktionsklassen zuordnen: Einer Klasse (poliert, EK220, EK24) mit geringer Zytokinausschüttung und einer zweite Klasse (geätzt, EK8) mit dem höchsten Mediatorenspektrum.

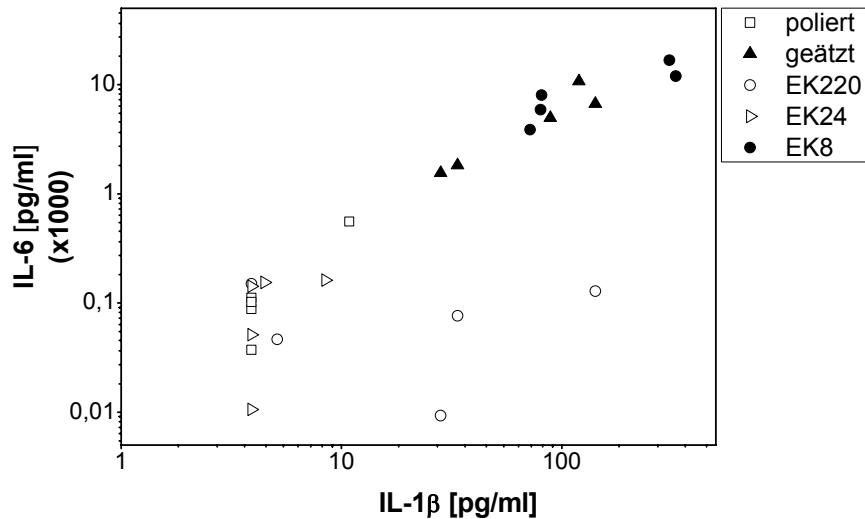


Abbildung 5-5 Die Veranschaulichung der Funktionsklassen durch die Darstellung der Zytokinwerte IL-1 β zu IL-6 für alle strukturierten Oberflächen. Zur Klasse mit niedrigen Zytokinexpressionen zählen die Proben poliert, EK220 und EK24. Zur Klasse, die sich durch hohe Zytokinexpressionen auszeichnen, gehören die Proben geätzt und EK8.

Von den einzelnen berechneten Oberflächenkenngrößen trennen z.B. Sci und Sv die Proben sehr gut, jedoch lassen sich keine trennfähigen Kenngrößen zur Beschreibung der Funktion (Zytokinexpression) bestimmen (Abbildung 5-6).

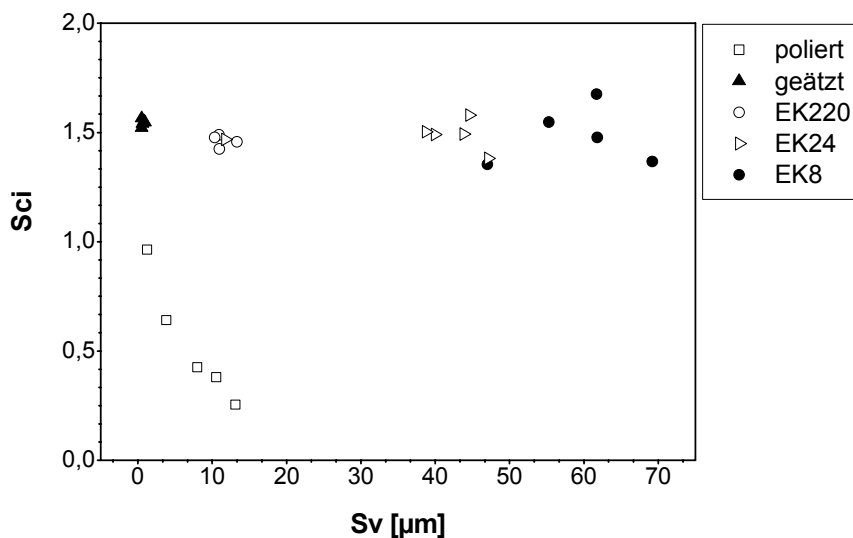


Abbildung 5-6 Die Trennung der oberflächenstrukturierten TiAl6V4-Proben durch die 3D-Oberflächenkenngrößen Sci und Sv. Die Kenngrößen lassen sich gut zur geometrischen Beschreibung der Morphologie heranziehen.

Vergleicht man allerdings innerhalb gleich bearbeiteter Proben, der gestrahlten Proben EK24 mit geringem Entzündungspotential und EK8 mit hohem Entzündungspotential deutet sich an, dass sich die Kenngrößen S_v und S_a , zum Beschreiben der Funktion bzw. der Zytokinsekretion heranziehen lassen (Abbildung 5-7 und Abbildung 5-8).

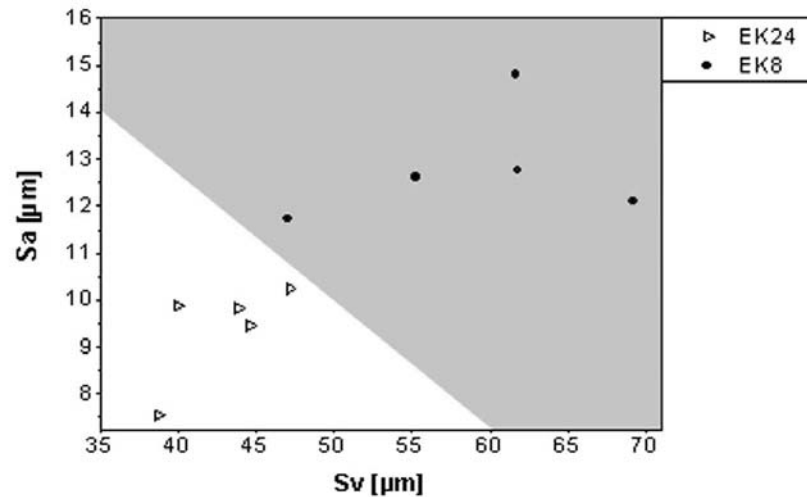


Abbildung 5-7 Die Unterscheidung der Oberflächentextur zwischen den sandgestrahlten Proben EK24 und EK8 durch die funktionellen Oberflächenkenngrößen S_a und S_v . Proben mit höheren S_v -Werten besitzen ein größeres Entzündungspotential (grau unterlegt) als Proben mit geringeren S_v -Werten.

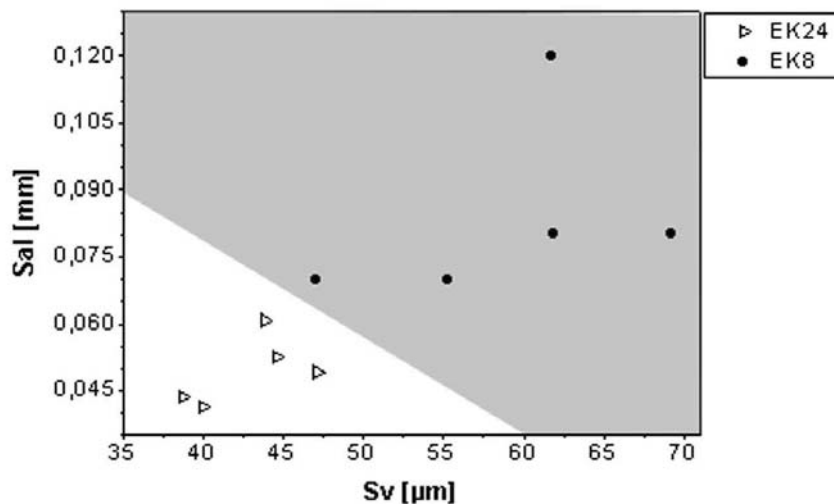


Abbildung 5-8 Die Unterscheidung der Oberflächentextur zwischen den sandgestrahlten Proben EK24 und EK8 durch die funktionellen Oberflächenkenngrößen S_{al} und S_v . Proben mit höheren S_{al} -Werten besitzen ein größeres Entzündungspotential (grau unterlegt) als Proben mit geringeren S_{al} -Werten.

Aus den Diagrammen lässt sich ableiten, dass große Sv und Sal Werte (schmale und tiefe Täler) in der Oberflächengestalt Monozyten/Makrophagen zu einer höheren Mediatorausschüttungen anregen, als Texturen mit kleinen Sv und Sal (flache und weite Täler). Für das Entzündungspotential sind bei diesen Oberflächenbearbeitungen demgemäß die Talprägungen entscheidend.

5.2 Bewertung der Ergebnisse biologisierter TiAl6V4-Proben

5.2.1 Zellkulturversuche mit der Zelllinie dU937

Die Versuche ergaben, dass eine Zytokinexpression von U937 Zellen auf den verschiedenen Oberflächenbeschichtungen nicht ohne vorherige Stimulation mit Phorbol ester (TPA) ausgelöst wird (Abbildung 4-32). Dabei veränderte sich die Zellmorphologie und die Zellen wurden zum Teil adhären (Abbildung 5-9).

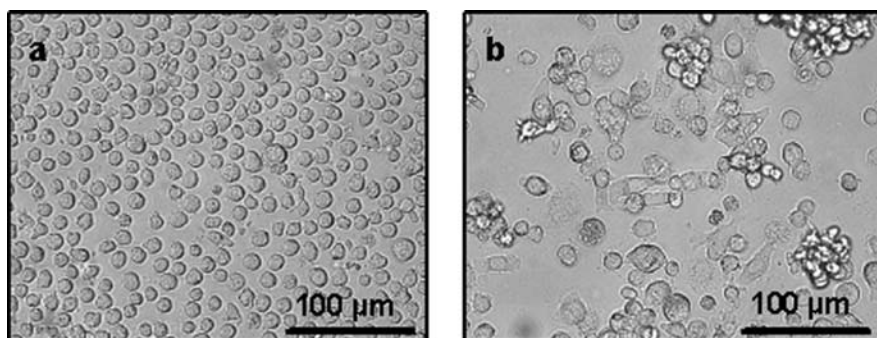


Abbildung 5-9 Die unterschiedliche Morphologie der Zellen der Zelllinie U937 und dU937. a) U937 vor Stimulation: zeigen regelmäßig runde Zellen mit einem ca. 10 µm Durchmesser, b) dU937 nach Stimulation: zeigen unregelmäßig geformte Zellen z.T. > 20 µm, clusterbildend und z.T. adhären.

Dennoch scheint die durch TPA induzierte Reifung nicht auszureichen, um die Beschichtungen hinsichtlich ihrer Entzündungsinitialisierung einzuschätzen (Abbildung 4-33, Abbildung 4-34, Abbildung 4-35). Die Zellvitalität, -proliferation und Expression proinflammatorischer Zytokine erweisen sich bei Benutzung dieser Zellen als wenig aussagkräftige biologische Parameter. Im Vergleich der Zellkontrollen (TCC-Ko) zeigt sich beim WST-1 Test (Abbildung 4-29), bzw. Vitalitätstest (Abbildung 4-30), dass die Testproben Referenz und beschichtete TiAl6V4-Proben die Proliferation verzögern, was sich für die Testproben als höhere WST-1 Extinktionen bzw. eine höhere Anzahl vitaler

Zellen äußerte, im Gegensatz zur deutlich erniedrigten Zahl metabolisch aktiver bzw. vitaler Zellen nach vier Tagen (Zellverdopplungszeit 24 Stunden.).

Auch mit Hilfe des Quotienten IL-1 β /IL-1ra lassen sich bei Verwendung von dU937 Zellen keine eindeutigen Aussagen bezüglich des Entzündungspotentials gewinnen (Abbildung 5-10). Die Werte der verschiedenen Oberflächenbeschichtungen liegen alle unterhalb der unbeschichteten TiAl6V4-Legierung (Referenz). Das stellt ein unerwartetes Ergebnis dar und legt nahe, dass dieses Zellkulturmodell die Entzündungssituation der untersuchten Beschichtungen nicht ausreichend simulieren und erfassen kann.

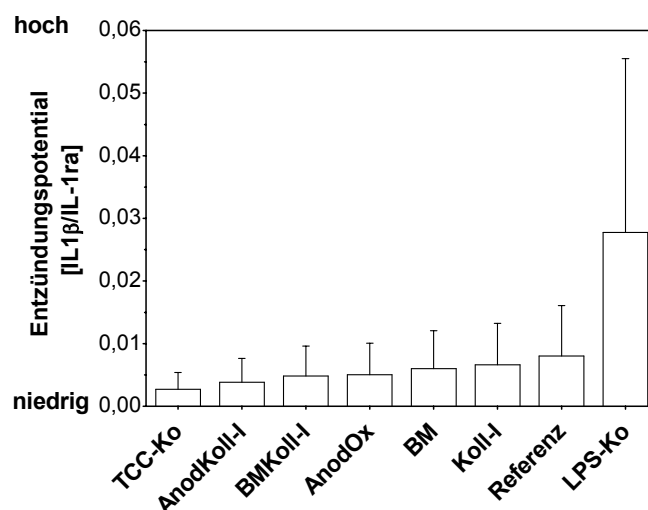


Abbildung 5-10 Der Einfluss der Oberflächenbeschichtung auf das Verhältnis IL-1 β /IL-1ra von dU937 Zellen nach vier Tagen ($n = 4$). Bei der Verwendung der Zelllinie dU937 liegt das Entzündungspotential aller Beschichtungen unterhalb der Referenz.

5.2.2 Zellkulturversuche mit primären Monozyten/Makrophagen

Die *in vitro* Beobachtung der Monozyten/Makrophagenaktivierung an verschiedenen biologisierten TiAl6V4-Proben zeigt keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der metabolisch aktiven Zellen (Abbildung 4-36). Auch auf den Phänotyp der Zellen scheint es keinen Einfluss der Oberflächenbeschichtung zu geben (Abbildung 4-6).

Um die einzelnen Beschichtungen hinsichtlich der Bildung entzündlicher Mediatoren bei primären Monozyten bewerten zu können, wurde wiederum der Quotient aus IL-1 β /IL-1ra

gebildet. Die Abbildung 5-11 zeigt die sechs verschiedenen Oberflächenbeschichtungen nach der Höhe des Entzündungspotentials geordnet.

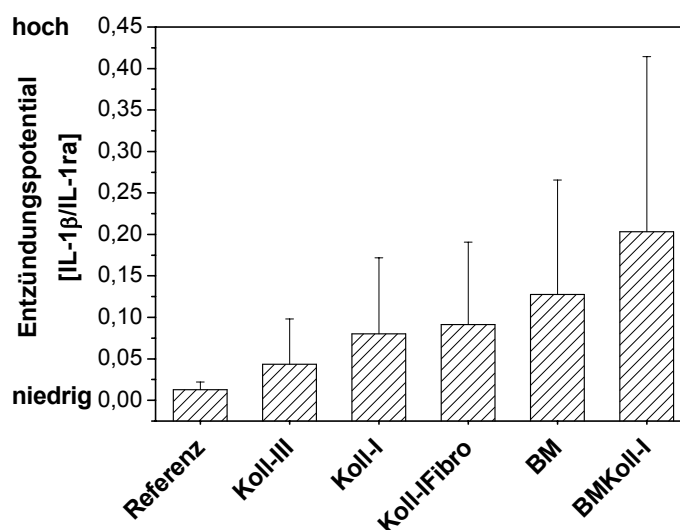


Abbildung 5-11 Der Einfluss der Beschichtung auf das Verhältnis IL-1β/IL-1ra von Blutmonozyten nach drei Tagen (n = 6). Bei der Verwendung von primären Zellen besitzen die hydroxylapatithaltigen Beschichtungen das höchste Entzündungspotential.

Die unbeschichtete Oberfläche (Referenz) zeichnet sich durch den niedrigsten Wert auf. Bei der Biologisierung mit BonemasterKollagen-I ist das Zytokinverhältnis eindeutig zu Gunsten des proinflammatorischen Zytokin IL-1β verschoben. Zusammen mit der Oberflächenprobe BMKoll-I besitzen diese das höchste Entzündungspotential und führen zur stärksten Entzündungsinduktion in diesem Zellkulturmodell. Geordnet nach dem Entzündungspotential ergibt sich für die Beschichtungen folgende Reihenfolge mit zunehmender Stärke: Referenz < Kollagen-III < Kollagen-I < Kollagen-IFibronectin < Bonemaster® < BonemasterKollagen-I.

Es lassen sich die modifizierten Oberflächen in zwei Gruppen einteilen. Dabei wirken sich in diesem *in vitro* Modell die hydroxylapatithaltigen Oberflächen BM und BMKoll-I als Gruppe mit dem höchsten Aktivierungsgrad der Monozyten/Makrophagen aus, im Gegensatz zur Gruppe mit mäßigem Aktivierungsgrad dem die kollagenhaltigen Beschichtungen (Koll-III, Koll-I, Koll-IFibro) zuzuordnen sind.

5.2.3 Zellkulturversuche mit dU937 Zellen im Vergleich zu Blutmonozyten

Die Diagramme der Abbildung 5-12 und Abbildung 5-13 zeigen den Einfluss der Zytokinexpression in Abhängigkeit der verwendeten Zellart für ausgewählte Oberflächenbeschichtungen.

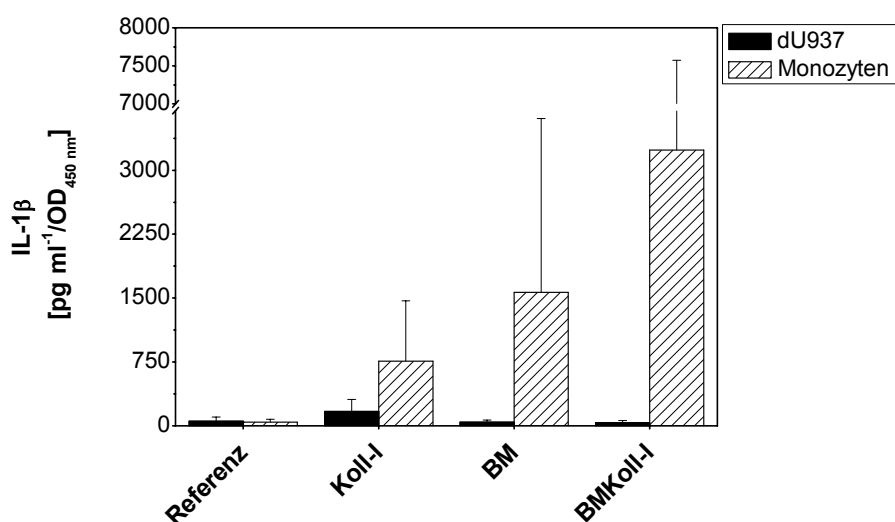


Abbildung 5-12 Der Einfluss der Oberflächenbeschichtung auf die Expression von IL-1β in Abhängigkeit der verwendeten Testzellen (Absolutwerte der Zytokine wurden normiert auf WST-1).

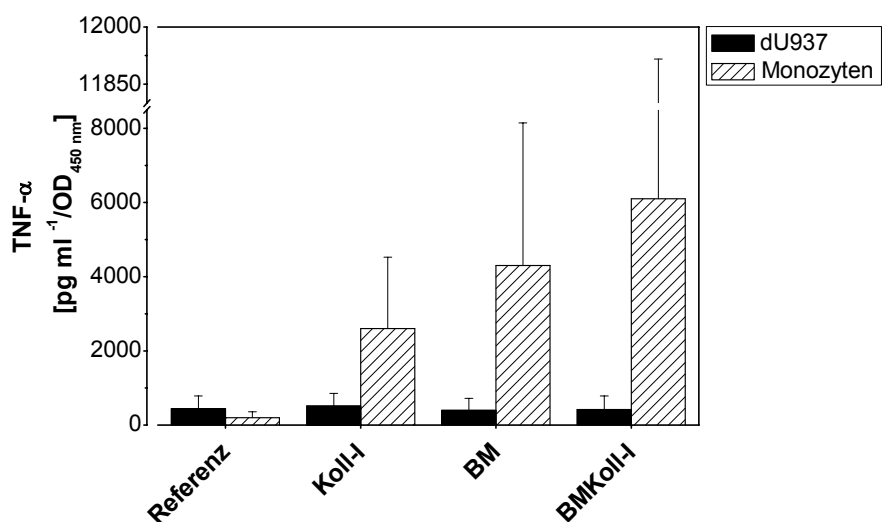


Abbildung 5-13 Der Einfluss der Oberflächenbeschichtung auf die Expression von TNF-α in Abhängigkeit der verwendeten Testzellen (Absolutwerte der Zytokine wurden normiert auf WST-1).

Die dU937 Zellen zeichnen sich im Gegensatz zu den primären Monozyten/Makrophagen durch eine generell niedrigere Ausschüttung von IL-1 β und TNF- α aus.

Die Beschichtungen führen bei der kommerziellen Zelllinie zu keiner deutlich unterscheidbaren Entzündungsinduktion der Zellen. Bei Verwendung von primären Monozyten tritt die Beeinflussung der Zytokinexpression durch die verschiedenen Oberflächenbeschichtungen deutlicher zum Vorschein.

Wie gezeigt, besitzen primäre Monozyten/Makrophagen eine höhere Sensibilität und Aussagekraft bezüglich des Entzündungspotentials der hier verwendeten Beschichtungen, als die kommerzielle Zelllinie U937.

Das U937 Zellkulturmodell lässt damit keine relevanten Aussagen zur Bewertung von Oberflächenbeschichtungen zu und ist dem *in vitro* Entzündungsmodell mit primären Monozyten/Makrophagen unterlegen.

6 Diskussion

6.1 Strukturierte TiAl6V4-Oberflächen

Im ersten Teil der Arbeit wurde geprüft, wie stark das Implantatpografische Profil der strukturierten TiAl6V4-Oberflächen, insbesondere die physikalisch-chemischen Oberflächeneigenschaften, das Zellverhalten beeinflussen konnten. Dazu wurden verschieden tiefenstrukturierte Oberflächen mit unterschiedlicher Mikro- und Makrorauigkeiten in Zellkulturversuchen eingesetzt.

6.1.1 Gestrahlte TiAl6V4-Oberflächen

Die Oberflächenrauheiten der Proben EK220, EK24 und EK8 wurden durch die Verwendung verschieden großer Al_2O_3 -Strahlmittelkörner bei gleichem Strahldruck erreicht. Die Probe EK24 stellte dabei die in der Praxis gebräuchliche Rauheit zementloser Prothesen dar. REM Untersuchungen dieser strukturierten Proben offenbarten nach der Strahlbehandlung implantierte Al_2O_3 -Bruchstücke, die aus dem Strahlprozess herrührten. Der Sandstrahlprozess stellt ein in der Zahnheilkunde und Orthopädie weit verbreitetes kostengünstiges Verfahren zur Aufrauung und Reinigung von Metalloberflächen dar. Das Auftreffen des Strahlmittels bewirkt in Abhängigkeit der Strahlkorngröße und -art, Gefügeänderungen und lokale Schmelzprozesse im Bereich der oberflächennahen Schichten.

Kontaminationen von Implantaten mit Strahlmittelrückständen sind auch aus anderen Arbeitsgruppen mehrfach belegt [115-117]: Aus den Arbeiten von Gbureck und Thull [118] geht hervor, dass Titanproben nach Korundstrahlung bis zu 35% der Oberfläche mit Korund belegt sein können. Die Kontamination ließ sich auch nicht durch intensive Reinigungsschritte entfernen. Böhler et al. [119] zeigten in ihren Untersuchungen über die Frühlockerungen von gestrahlten zementfreien Titanschäften, dass die Lockerung von Implantaten mit Metall-Metallgleitpaarung durch Edelkorundpartikel bewirkt wurde. Dem gegenüber stehen die histologischen Untersuchungen von Piattelli et al. [120] an Kaninchen, die keinen Hinweis auf eine Verschlechterung der Osseointegration nachweisen konnten. Auch in dem hier verwendeten Zellkulturmodell und dem Untersuchungsprozedere lassen sich keine Rückschlüsse hinsichtlich eines negativen Einflusses der Al_2O_3 -Kontaminationen auf Monozyten/Makrophagen beobachten.

6.1.2 Oberflächenstrukturierung, Metallionenabgabe, Adhäsion und Zytokinexpression

Eine gute Verträglichkeit und ein geringes Korrosionsvermögen von Implantaten stehen im engen kausalen Zusammenhang zueinander. Bei der Korrosion von metallischen Biomaterialien kann es zur Freisetzung von Metallionen kommen, die direkt oder nach Bindung von Metall-Protein-Komplexverbindungen oder Metall-Zell-Komplexverbindungen zu lokalen und systemischen biologischen Wirkungen führen können [121,122]. Denkbar wäre auch, dass raue Oberflächen, durch die Oberflächenvergrößerung bedingt, verstärkt Metallionen ins Medium abgeben könnten. Übertragen auf die in dieser Arbeit durchgeführten Zellkulturversuche dürfte dieser Einfluss vermutlich vernachlässigbar sein, da der gewählte Testzeitraum nur wenige Tage umfasste.

Die Interaktion von Monozyten/Makrophagen mit implantierten Biomaterialien ist durch Prozesse wie Adhäsion, Aktivierung und der Sekretion von Mediatoren gekennzeichnet. Wie die Ergebnisse der Versuche mit den verschiedenen strukturierten TiAl6V4-Oberflächen zeigen, wird das Zellverhalten, wie Adhäsion und Zellgestalt durch die geometrische Oberflächenbeschaffenheit unterschiedlich beeinflusst. Ebenso modulieren die strukturierten Oberflächen die Zytokinexpression unterschiedlich stark. Innerhalb der polierten und gestrahlten Proben lässt sich kein linearer Zusammenhang zwischen den Oberflächenkenngrößen Mittenrauigkeit S_a und wahrer Fläche A_w beobachten.

Aus mehrfachen *in vivo* Untersuchungen ist bekannt, dass raue Implantatoberflächen eine höhere Osseointegration aufweisen als glatte Metallimplantate [20,123]. Weitere *in vitro* Experimente bestätigen neben den Versuchen mit Knochenzellen [124-129] auch für Fibroblasten [130], Knorpelzellen [131], Keratinozyten [132] und Zellen des peripheren Blutsystems [100,133] den maßgeblichen Einfluss der Oberflächenstrukturierung.

In den vorliegenden Versuchen wurde eine Zunahme der anhaftenden Monozyten/Makrophagen mit zunehmender Rauheit (Abbildung 5-2), ähnlich den Untersuchungen von Rich erfasst [134]. Er beobachtete, dass Monozyten/Makrophagen eine Affinität zu rauen Oberflächen besitzen, die er als Rugophili bezeichnete. Bei Betrachtung aller Proben (poliert bis EK8) ist mit steigender Rauheit eine zunehmende Präsenz der Zellen zu beobachten, die jedoch nicht zu einem ebenso kontinuierlichen Anstieg der Zytokinexpression führt (Abbildung 5-4). Diese Beobachtungen sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von

Rosengren et al. und Soskolne et al. [85,135]. Die Autoren konnten keine Korrelation der Zellzahl mit der Zytokinexpression feststellen.

Ähnlich den histologischen Untersuchungen von Salthouse et al., der beobachtete, dass die Makrophagentätigkeit in der Umgebung von rauen PTFE-Oberflächen in Rattenmuskeln signifikant höher ist als in Nähe glatter PTFE-Oberflächen, konnten auch für die raueste Probe (EK8) sehr hohe Konzentrationen nachgewiesen werden [66]. Aufgrund nicht publizierter Rauheitsangaben und der Verwendung der nicht humanen RAW 264,7 ist die Deutung der Resultate der *in vitro* Arbeiten von A. Refai et al. nicht möglich [100].

Die geätzte Oberfläche führte im Kontakt mit den Blutmonozyten ebenso zu hohen proinflammatorischen Zytokinexpressionen. Für das Ätzen wurde ein Salpeter-Flußsäuregemisch verwendet, dass auf der Grundlage gebräuchlicher Ätzrezepturen modifiziert wurde [136]. Durch geeignete Wahl der Temperatur und Zeitdauer wurde die Ätzintensität optimiert. Durch den chemischen Angriff auf die instabilere α -Phase der TiAl6V4-Legierung wurde eine feinere Oberflächenrauheit erreicht, die durch Edelkorundstrahlprozesse nicht eingestellt werden konnte. Untersuchungen mittels Diffraktometrie ergaben gleiche kristallographische Eigenschaften. Die rasterelektronenmikroskopische Beobachtung spindelförmig angehafter Monozyten/Makrophagen und das erhöhte Entzündungspotential legen im Vergleich zu den anderen strukturierten Oberflächen jedoch weitere chemische Veränderungen der Oberflächenbeschaffenheit nahe und weisen damit auf die Notwendigkeit umfänglicherer chemischer Oberflächencharakterisierungen hin.

6.2 Geometrische Oberflächenanalyse

6.2.1 Rauheitsmessungen

Neben chemischen und physikalischen Parametern des Werkstoffes bestimmt die Oberflächentopographie den Erfolg eines Implantates. Eine wichtige Grundlage stellt dabei die 2D-Messtechnik dar, mit der ein standardisiertes und weitgehend genormtes Verfahren für die Beschreibung von Oberflächen gegeben ist. Der arithmetische Mittenrauwert (R_a) lässt jedoch bei der Flächenintegration einzelne Profilausreißer weitgehend unberücksichtigt. Der Kennwert R_z dagegen reagiert auf Profilausreißer wesentlich stärker, was aber zu größeren Streubreiten der Messwerte führte (Tabelle 9-4).

Das angewendete Tastschnittverfahren mittels Perthometer ist ein bekanntes Messverfahren, welches in der Lage ist, genormte 2D-Oberflächenkennwerte zu bestimmen. Ein großer Nachteil ist jedoch, dass die Berechnung der Oberflächenkennwerte aus einem zweidimensionalen Profilschnitt erfolgt, obwohl die tatsächliche Oberfläche, die für die biologischen Prozesse eine Rolle spielt, räumlich ist. Die Oberflächenkennwerte werden aus Teilbereichen der Oberfläche berechnet. Die Rauheitsmessung stellt somit eine Stichprobenmessung dar. Eine weitere Ungenauigkeit ergibt sich aus der Geometrie der Tastspitze [137]. Da der Öffnungswinkel von mechanisch bearbeiteten Oberflächen allgemein größer als 120° ist, sind bei einem Tastspitzenradius von $5\ \mu\text{m}$ Rauheitsmessungen von nur R_z größer als $1\ \mu\text{m}$ ohne Verfälschungen möglich. Bei feineren Oberflächen, wie der polierten und geätzten Proben mit einer Rautiefe von R_z kleiner als $1\ \mu\text{m}$, sowie bei Oberflächen mit steilen Profilflanken sind Profilverzerrungen unvermeidbar.

Die taktile Rauheitsmessung, wie sie auch in dieser Arbeit durchgeführt wurde, stellte ein invasives Verfahren dar und führte zu mehr oder weniger starken Verkratzungen auf den vermessenen Oberflächen, so dass diese Proben für keine weiteren Analysen zur Verfügung standen.

Die genannten Nachteile lassen sich vermeiden, wenn ein optisches Messverfahren, wie das verwendete berührungslose Verfahren der konfokalen Weißlichtmikroskopie eingesetzt wird [106]. Bezüglich der Mittenrauheit (R_a vs. S_a) korrelieren beide Messverfahren weitgehend miteinander (Abbildung 4-11).

Der große Vorteil der optischen Messung liegt in der Bestimmung von 3D-Oberflächenkenngrößen in allen Richtungen. Da jedoch die 3D-Oberflächenkenngrößen nicht genormt sind, können in Abhängigkeit der Auswertesoftware und der zu grundlegenden verschiedenen Algorithmen Abweichungen auftreten, wie sie auch in den Messungen mit *WinSam*[®] und *MountainsMap*[®] beobachtet wurden.

6.2.2 Oberflächenkenngrößen

Zur Optimierung von Implantatoberflächen ist es notwendig, neue Lösungen zur Beschreibung der Topographie zu entwickeln. Auch im Hinblick auf eventuell zukünftige

deterministische Texturen durch Laserbehandlung [14,15] oder ähnliche Verfahren, erweist sich die zweidimensionale Charakterisierung als problematisch, da die Rauheitskennwerte von der Lage und Orientierung der Tastschnitte erheblich abhängen [109]. Obwohl zur Charakterisierung stochastischer Texturen, wie den hier durch Al_2O_3 -aufgeraute Proben, genormte Prüfvorschriften vorliegen, erfassen diese jedoch die flächige Anordnung und Ausdehnung von Strukturmerkmalen nicht ausreichend. So gibt es beispielsweise Oberflächen, die gleiche R_a und R_z Werte aufweisen, sich jedoch erheblich in der Morphologie unterscheiden. Zur Beschreibung derartiger Oberflächen ist auch zukünftig eine dreidimensionale Charakterisierung unerlässlich. Ein weiterer Vorteil von 3D-Kenngrößen liegt in der Möglichkeit funktionelle Oberflächenkenngrößen zu berechnen. Die Fertigung von Implantaten erfolgt bislang noch ohne Berücksichtigung des Zusammenhangs zwischen Oberflächengeometrie und den daraus resultierenden Funktionseigenschaften.

In dieser Arbeit wird ein Lösungsansatz zur dreidimensionalen Charakterisierung von verschiedenen bearbeiteten Implantatoberflächen erarbeitet und mittels mathematischer Verfahren funktionelle Oberflächenkenngrößen bestimmt, die Einfluss auf das Entzündungsverhalten von TiAl6V4-Implantaten besitzen. Die genaue Kenntnis der Oberflächentopographie und deren qualitative und quantitative Beschreibung und Erfassung ist eine Voraussetzung für ein erweitertes Verständnis von Entzündungsprozessen an den Grenzflächen strukturierter Oberflächen.

Da aussagekräftige 3D-Oberflächenparameter bei TiAl6V4-Implantaten bislang unbekannt sind, wurden zunächst Messgrößen übernommen, die ursprünglich für die technische Industrie zur Qualitätssicherung gefertigter Metallprodukte entwickelt wurden [109,110]. Aus den dreidimensionalen Datensätzen konnten wichtige Oberflächenparameter gewonnen werden, die es möglich machen, auch verschieden gefertigte Oberflächen objektiv zu vergleichen. So erweist sich die wahre Fläche A_w als gutes und vergleichbares Maß für das Adhärenzverhalten von Zellen auf strukturierten Oberflächen zwischen verschieden bearbeiteten Oberflächen.

Die Analyse funktioneller Oberflächenkenngrößen lässt darüber hinaus erstmalig die Vermutung zu, dass bestimmte Ausprägungen der Tal-Kenngrößen S_v und S_{al} , die Zytokinexpression fördern und das Entzündungsverhalten von Zellen mit beeinflussen

(Abbildung 5-7 und Abbildung 5-8). Des Weiteren besitzt die 3D-Meßtechnik mit Hilfe des konfokalen Mikroskops das Potential zu einer späteren on-line Qualitätsprüfung oberflächenstrukturierter Implantate.

6.2.3 Kontaktwinkelmessung

Neben der Topographie stellt auch das Adhäsionsverhalten ein wichtiges Beurteilungskriterium zur Charakterisierung von Implantatoberflächen dar [138-140]. Die Kontaktwinkelmessungen auf den strukturierten TiAl6V4-Oberflächen ergab für die Proben poliert, geätzt, EK220 und EK24 eine Abnahme des Kontaktwinkels mit steigender Rauigkeit (Abbildung 4-12), was als zunehmende Benetzbarkeit der Metalloberflächen interpretiert werden könnte. Mit zunehmender Rauigkeit (EK8) nahm der Kontaktwinkel dann wieder deutlich zu. Diese Ergebnisse bestätigen die Experimenten von Lim und Kollegen [141], die für Kontaktwinkel größer als 45° mit zunehmender Rauigkeit einen Anstieg des Kontaktwinkel ermittelten. Messungen des Kontaktwinkels und Rückschlüsse auf die Oberflächenenergie bei aufgerauten Proben sind jedoch nach Morra et al. unzulässig, da für die Berechnung glatte Oberflächen vorausgesetzt werden und bei rauen Oberflächen mit einem Korrekturfaktor gearbeitet werden muss [142]. Weitere Ursachen für Fehlmessungen könnten neben der Rauheit auch Gefügeheterogenitäten und Verunreinigungen sein. So wiesen geätzte TiAl6V4-Proben in der rasterelektronenmikroskopischen Analyse Inhomogenitäten im Gefüge auf. Auch die Kontamination und Belegung mit Kohlenstoff und die Belegung mit Strahlmittelresten (Al_2O_3) kann zu Fehlbestimmungen führen.

Das Benetzungsverhalten der verschiedenen strukturierten TiAl6V4-Oberflächen mit Mittenrauwerten von Sa größer $1\ \mu\text{m}$ bis $13\ \mu\text{m}$ erweist sich als wenig geeignete Methode der zur Oberflächencharakterisierung.

6.3 Biologisierte Oberflächen

Die Vorhersage, ob ein Implantat vom Organismus erfolgreich integriert werden kann, hängt auch wesentlich davon ab, ob es gelingt, die physiologischen Bedingungen im Laborversuch nachzuahmen [143,144]. Weiterhin ist es notwendig, Prüfverfahren zu entwickeln, die den Erfolg dieser Implantatmodifikation erfassen. In Erweiterung gängiger Zytotoxizitätstests [145] wurden die fünf verschiedenen Oberflächenbeschichtungen mit

Monozyten/Makrophagen ausgetestet. Das entwickelte Zellkulturmodell verwendet dabei humane Blutmonozyten, die auch *in vivo* zuerst Kontakt mit dem Implantat aufnehmen.

In die Untersuchungen wurden Beschichtungen einbezogen, die schon von Becker et al., Fischer et al. und Geissler et al. in der Zellkultur ausgetestet wurden, jedoch ausschließlich mit Knochenzellen [39,40,146]. Deshalb werden die eigenen Befunde hauptsächlich im Hinblick auf diese Studien diskutiert.

Es kann für den Versuchszeitraum davon ausgegangen werden, dass die Stabilität der aufgetragenen Schichten keine zeitlichen Veränderungen aufweisen. Innerhalb einer einwöchigen Lagerung in verschiedenen Zellkulturmedien unter physiologischen Zellkulturbedingungen wurden keine lytischen Prozesse beobachtet [33].

6.3.1 *In vitro* Versuche mit der Zelllinie dU937

Die Versuche mit der kommerziellen Zelllinie U937 bestätigten auch gemäß anderer Autoren [147-149], dass die Initiierung der Zytokinexpression auf den verschiedenen biofunktionalisierten TiAl6V4-Proben nicht ohne vorherige Stimulation mit TPA erfolgen kann (Abbildung 4-32). Erst nach Phorbolsterzugabe (dU937) wird ein höheres Reifestadium erreicht [150] und die Zellen sind fähig, detektierbare Zytokine zu exprimieren. Die geringen Unterschiede bei der Zytokinsekretion lassen jedoch den Schluss zu, dass die Produktion dieser Mediatoren vermutlich stärker von Passagenzahl und Stimulanzen beeinflusst werden, als durch die verschiedenen Oberflächen (Abbildung 4-33 und Abbildung 4-34).

Im Gegensatz zu den positiven Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen, die diese Zelllinie aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu humanen Blutmonozyten zum Studium von Differenzierungsprozessen einsetzen, erwiesen sie sich unter diesem *in vitro* Testkonzept als zu wenig sensibel, um das Entzündungspotential der verschiedenen Oberflächenbeschichtungen zu erfassen [97,151,152].

6.3.2 *In vitro* Versuche mit periphere Blutmonozyten

Die Erweiterung des entwickelten *in vitro* Entzündungsmodells erfolgte durch die Verwendung primärer Monozyten. Humane Blutmonozyten sind die unreifen Vorläuferzellen

aller Gewebsmakrophagen. Ihr Bildungsort befindet sich im Knochenmark. Im Blut zirkulieren sie bis zu etwa drei Tagen und wandern danach in verschiedene Gewebe und Körperhöhlen aus, wo sie zu Makrophagen differenzieren [63,153].

Neben der Ausschüttung entzündlicher Mediatoren besitzt das permanente Auftreten von Monozyten/Makrophagen meist negative Effekte auf die Langlebigkeit und Histokompatibilität von vielen Implantaten [59,63,67]. Obwohl sich einige Studien mit den Differenzierungsprozessen der Monozyten zu Makrophagen [154-156] und den Interaktionen von Makrophagen mit verschiedenen Implantatoberflächen beschäftigen [157], ist das Verhalten und die Aktivierung von Monozyten/Makrophagen im Kontakt mit Biomaterialien bisher nicht ausreichend verstanden. Die Effekte muriner und humaner Makrophagenaktivierung und deren Zytokinexpression an verschiedenen Werkstoffoberflächen sind *in vitro* untersucht wurden [100,157,158]. Jedoch die Redundanz und der Pleiotropismus der Zytokine erschweren die vollständige Interpretation solcher Daten.

6.3.2.1 Interindividuelle Schwankungen bei der Verwendung von Primärzellen

Die hohen Standardabweichungen bei der Verwendung von peripheren Blutmonozyten erschweren einerseits die Ergebnisinterpretation, zeigen aber andererseits auch auf, womit man beim Einsatz von Primärkulturen, im Gegensatz bei der Verwendung von kommerziellen Zelllinien, konfrontiert wird: Es gilt, einen Kompromiss zu finden zwischen Zellen, die der *in vivo* Situation am nächsten kommen und den interindividuellen Einflüssen des Spenders. Neben verschiedenen Spendertypen (Abbildung 4-42 und Abbildung 4-43) stellt auch die Desensibilisierung auf Endotoxin bei monozytären Zelllinien, eine der vielen Einflussfaktoren auf das Verhaltensrepertoire von Primärzellen dar [159,160].

Das zum Teil enorme spenderabhängige Entzündungsverhalten der Monozyten/Makrophagen im Kontakt mit den verschiedenen Oberflächen kann auch durch eine unterschiedliche Zusammensetzung innerhalb der verwendeten Zellfraktionen erklärt werden. Obwohl für die Gewinnung monozytärer Zellen aufgrund der Microbeads-isolationsstrategie eine hohe Reinheit der Ausgangszellen erzielt wurde, können unterschiedliche Subpopulationen von Blutmonozyten Einfluss auf das Zytokinexpressionsmuster besitzen. Aus den Untersuchungen von Bhardwaj et al. wird deutlich, dass es

unterschiedliche periphere Blutmonozyten gibt, deren Antigenmuster (CD14, CD163 und Calprotectin) sogar unterschiedliche Entzündungsstadien widerspiegeln kann [161]. Auch aus mehreren molekularbiologischen Arbeiten geht hervor, dass Monozyten unterschiedliche Antigenmuster auf der Oberfläche besitzen können, die sich auch in der Freisetzung an Mediatoren unterscheiden können [162-165].

6.3.2.2 Beschichtungen mit Bonemaster®

Ausgehend von der Tatsache, dass Hydroxylapatit den anorganischen Hauptbestandteil des menschlichen Knochens bildet, wird seit vielen Jahren die Beschichtung mit Calciumphosphaten erfolgreich praktiziert [20,166]. Gegenüber der Referenz lösten jedoch beide hydroxylapatithaltigen Oberflächenbeschichtungen (BM und BMKoll-I) die höchsten Zytokinexpressionen aus (Abbildung 5-11). Dieser Befund steht mehr oder weniger im Einklang mit *in vitro* Versuchen vergleichbarer Oberflächenbeschichtungen mit Knochenmarkzellen. Die Mineralisierung der Oberflächen zeigte keinen Einfluss auf die Zellproliferation und reduzierte osteoblastentypische Zellmarker (ALP) und legte die Vermutung nahe, dass die Zellen eventuell zu Fettzellen differenzieren [167].

Eine mögliche Ursache für die hohen ermittelten Zytokinexpressionen könnten bioaktive Calciumphosphatphasen darstellen, die sich nachteilig auf das Verhalten der monozytären Zellen auswirken wie sie aus verschiedenen Arbeiten bekannt sind [168,169]. Zeng und Kollegen fanden für ihre Apatitbeschichtungen hohe Albuminadsorptionsraten, die zu Proteinstrukturveränderungen führten. Das veränderte Adsorptionsverhalten könnte auch für die hier getesteten Bonemasterschichten zutreffen, so dass sich damit das proinflammatorische Zellverhalten erklären ließe.

Ein aktueller Ansatz, Oberflächen biologisch zu verändern, liegt in der Herstellung biomimetischer Beschichtungen. Durch die Kombination von Hydroxylapatit mit Kollagen wurde versucht, die biologischen Verhältnisse am späteren Einsatzort (Zielgewebe) noch besser zu imitieren und der Implantatoberfläche eine Struktur zu geben, die dem normalen Knochengewebe ähnelt. Verschiedene Verfahren wurden dazu von der Dresdner Arbeitsgruppe um Scharnweber et. al entwickelt und etabliert [103,170]. Die Kristallisation von HA auf Kollagen-I (BMKoll-I) erfolgte im zweistufigen elektrochemisch gestützten

Verfahren unter weitgehend physiologischen Bedingungen, wie auch die nativen Kollagenfibrillen im Atomkraftmikroskop belegen.

Tierversuche mit diesen Implantatbeschichtungen legen auch die hohe Attraktivität für Osteoblasten nahe [36,43,171]. Die Hydroxylapatitbeschichtungen wiesen im Körper für Knochenzellen hohe Biokompatibilität auf und wirkten osteoinduktiv. Diese Ergebnisse stehen auch im Einklang mit den Untersuchungen von Kilapadi et al. Durch die erhöhte Bindung der Serumproteine Fibronectin und Vitronectin an Hydroxylapatit konnten Osteoblasten besser darauf adhären [172].

6.3.2.3 Kollagenbeschichtungen

Während der Knochenheilung werden Matrixproteine und Wachstumsfaktoren in zeitlicher Abfolge exprimiert [173,174]. Die biologisierten Zustände Koll-III, Koll-IFibro und Koll-I trugen dem Rechnung und dienten als Modell der Proteinsynthese während der frühen Heilungsphase von Knochendefekten und damit der Imitation eines Teils der Prozesse während der Knochenheilung.

Gemäß der zeitlichen Expressierung der Matrixproteine *in vivo* zeigte sich in den durchgeführten Zellkulturversuchen ein Anstieg der Entzündungsinitialisierung durch Monozyten / Makrophagen in der gleichen Abfolge (Abbildung 5-11).

Ein detaillierter Vergleich von Schichten aus Kollagen-I und -III [42] mit Knochenzellen zeigte, dass Schichten aus Kollagen Typ III die Proliferation und frühe Stadien der Differenzierung (Matrixproduktion) förderten, wohingegen Schichten aus Kollagen Typ I späte Phasen der Differenzierung (ALP-Expression, Mineralisierung) beschleunigten. Diese Ergebnisse stehen neben *in vitro* Untersuchungen, nach denen Kollagen-I Beschichtungen das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von Osteoblasten nicht beeinflussten [146].

Die Beschichtung mit Kollagen-I, dem Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix, löste in den hier vorliegenden Untersuchungen im Vergleich zu den anderen proteinbeschichteten Oberflächen das höchste Entzündungspotential aus. Tierexperimentelle Untersuchungen für die Beschichtung mit Kollagen-I zeigten jedoch eine beschleunigte

Knochenbildung, die aber mit dem früheren Auftreten von mononukleären phagozytierenden Zellen gekennzeichnet war [44,175]. Diese widersprüchlichen Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass hohe *in vitro* Zytokinexpression scheinbar mit einer erfolgreichen Osseointegration *in vivo* verbunden sind.

Inwieweit die Herkunft der hier zur Beschichtung herangezogenen Proteine eine Rolle auf die Initiierung von Entzündungsprozessen mit humanen Zellen spielt, ist bislang nicht bekannt. Dass die Proteinkomposition der extrazellulären Matrix jedoch ausschlaggebend ist bei der Initiation von *in vitro* Entzündungsprozessen, wiesen Schiffer et al. [176] experimentell nach. Substrate aus Kollagen-I vom Schwein und humanen Fibronectin human lösten im direkten Kontakt mit humanen Blutmonozyten ebenfalls erhöhte Interleukin-1 Werte aus. Aufgrund der unterschiedlichen Prüfmodelle mit Substraten und Zellen verschiedener Spezies bleiben weitere Vergleiche jedoch spekulativ.

Die mikroskopischen Untersuchungen (REM und AFM) zur Adsorption fibrillärer Kollagene (Koll-I und Koll-III) ergaben, dass die native Struktur der Faserproteine weitgehend erhalten blieb. Die korrekte Ausbildung der Kollagenfasern nach Immobilisation auf den Oberflächen stellt eine wesentliche Voraussetzung zur eindeutigen Interpretation dieser *in vitro* Ergebnisse dar. Über den Erhalt biologisch aktiver Domänen, dem Grad der Denaturierung und dem eventuell damit verbundenen immunogenen Potentials der Matrixproteine lassen sich jedoch keine Rückschlüsse ziehen.

Die beobachteten Unterschiede bei der zellbiologischen Bewertung der Oberflächenbeschichtungen und den tierexperimentellen Daten zeigen jedoch, dass weiterführende Arbeiten zum besseren Verständnis der komplexen Wechselwirkungen zwischen Biomaterialoberflächen und biologischen Systemen notwendig sind [144].

6.4 Positivkontrollen

Monozyten können durch eine Reihe stofflich unterschiedlicher Substanzgruppen in ihren Funktionen beeinflusst werden, so z.B. in ihren sekretorischen Leistungen. Als Positivkontrolle wurde deshalb den Zellen Lipopolysaccharid zugesetzt. LPS ist hauptsächlich Zellmembranbestandteil gramnegativer Bakterien. Das Endotoxin führt bei Monozyten, aber auch anderen Zelltypen zur vermehrten Freisetzung von in-

flammatorischen Mediatoren, wie IL-1, IL-6, TNF- α [177,178]. Die für die Zellkulturversuche verwendete Dosis steht im Einvernehmen, mit den in der Literatur verwendeten Gaben zur Induktion der proinflammatorischen Mediatorenausschüttung [99,112,147,179].

Die Gabe von TPA als Positiv-Stimulans führte auch bei den primären Blutmonozyten zu morphologischen Veränderungen (Abbildung 4-24), Änderungen der Stoffwechselaktivität wie der Mediatorenssekretion (Abbildung 4-13). Die Anzahl vitaler Zellen war nach sechs Tagen deutlich reduziert und die TNF- α Expression verzeichnete nach drei Tagen einen deutlichen Anstieg. Dieser Effekt nach Gabe von TPA ist allgemein auch von anderen Arbeitsgruppen für promyeloide Zelllinien beobachtet wurden [180].

6.5 Entzündungspotential

Die so genannten „Early Response Cytokines“ TNF- α und IL1 β stehen am Anfang der inflammatorischen Kaskade. Sie aktivieren *in vivo* neben weiteren Makrophagen auch Fibroblasten und Epithelzellen, die ihrerseits wieder weitere inflammatorische Zytokine produzieren. Für den Verlauf der Entzündungsreaktion ist deshalb die Balance zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Mediatoren bzw. ihren natürlich vorkommenden Inhibitoren, den Rezeptorantagonisten, entscheidend. Deshalb wurde für die verschiedenen Oberflächen das Verhältnis IL-1 β /IL-1ra bestimmt. Der Rezeptorantagonist konkurriert mit IL-1 β um die gleiche Bindungsstelle und ist in der Lage diese zu blockieren [74,76]. Je mehr IL-1ra gebildet wird, umso größer ist die entzündungshemmende Wirkung.

Der berechnete Quotient diente in dem vorliegenden *in vitro* Entzündungsmodell als Maß des Aktivierungszustandes der Monozyten. Er veranschaulichte als aussagekräftiger Indikator das Entzündungspotential und wurde auch vereinzelt von anderen Arbeitsgruppen zum Bewerten verschiedener Oberflächen herangezogen [77,78]. Die Analyse des Entzündungspotentials wurde an zwei Zeitpunkten durchgeführt. Zum Erhalt des 1. Zeitpunktes nach drei Tagen musste der Zellüberstand vollständig abpipetiert werden und neues Zellmedium zugefügt werden. In Anbetracht der Werte nach sechs Tagen erscheint diese Herangehensweise aufgrund von Verdünnungseffekten als nicht optimal.

Mit Hilfe der Zytokine konnte eine klare Abstufung der Entzündungsinitialisierung verschieden modifizierter Oberflächen getroffen werden. Das Verhältnis IL-1 β /IL-1ra erweist sich für das hier vorgestellte Zellkulturmodell auf der Grundlage von Blutmonozyten, als aussagekräftigster Parameter zur Bewertung dieser Oberflächen.

7 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden verschieden oberflächenmodifizierte TiAl6V4-Implantate hinsichtlich ihres Entzündungsverhaltens im Zellkulturlabor untersucht. Für das entwickelte *in vitro* Prüfmodell wurden mononukleäre Zellen verwendet. Diese haben eine besondere Bedeutung beim ersten zellulären Kontakt mit dem implantierten Werkstoff und sind beteiligt an der zellulären Immunantwort. Das Zellkulturmodell simulierte die beginnenden Prozesse der Wundheilung nach Implantation von Biomaterialien und lässt sich auf *in vivo* Situationen des Hartgewebes, als auch des menschlichen Weichgewebes gleichermaßen übertragen. Es erweitert gängige *in vitro* Biokompatibilitätstests und eignet sich besonders zum Screening neuer Implantatbeschichtungen.

Neben der Verwendung von Zellen, die charakteristisch für das Gewebe sind, mit dem die ausgetesteten Werkstoffe später *in situ* in Kontakt kommen sollen, wurde auch auf eine Testmethode zurückgegriffen, die der *in vivo* Situation am nächsten kommt. Durch direkten Kontakt der Zellen mit den verschiedenen Oberflächen wurde die physiologische Situation weitestgehend nachgeahmt. Zur Erfassung der beginnenden Entzündungsinitialisierung wird in diesem Prüfmodell der dritte Tag favorisiert.

Die Untersuchungen zeigten, dass sich nicht alle mononukleären Zellen zum Prüfen des Entzündungspotentials eignen. Mit dem Einsatz von primären Blutmonozyten wurde ein aussagekräftiges und sensibles *in vitro* Prüfmodell entwickelt, das Aussagen zur Entzündungsinitialisierung verschieden strukturierter und beschichteter TiAl6V4-Implantate lieferte. Wie mehrfache Wiederholungen der Versuche gezeigt haben, ist das entwickelte Zellmodell trotz interindividueller Schwankungen der Spenderproben reproduzierbar.

Zur Erfassung der *in vitro* Entzündungsantwort wurde ein umfangreiches Repertoire an biologischen Parametern untersucht. Dabei erwiesen sich zelleigene Signalstoffe, die so genannten Zytokine, als besonders aussagekräftig. Insbesondere die Quantifizierung des Verhältnisses von IL-1 β /IL-1ra diente als Maß des Entzündungspotentials.

Innerhalb der biologisierten Oberflächen konnte eine klare Abstufung des *in vitro* Entzündungspotentials analysiert werden, so dass sich die einzelnen Beschichtungen in zwei Gruppen einordnen lassen. Es wurden Beschichtungen mit a) mäßigem Entzündungs-

potential (Kollagen- und Fibronectinbeschichtungen) und mit b) starkem Entzündungspotential (Hydroxylapatitbeschichtungen) analysiert. Diese Ergebnisse bestätigen zum Teil die Resultate anderer *in vitro* Testsysteme.

In dieser Arbeit wurde darüber hinaus ein neuer Ansatz zur Ermittlung und Auswertung von Implantatoberflächen demonstriert, der auf der Annahme basiert, dass bestimmte Oberflächenparameter das Zellverhalten beeinflussen können. Voraussetzung dafür war die Kombination geeigneter Methoden der Oberflächenanalyse.

Innerhalb der strukturierten TiAl6V4-Proben wiesen die polierten und gestrahlten Oberflächenmodifikationen das niedrigste Entzündungspotential auf. Der geringe Einfluss der Oberflächengeometrie auf das Entzündungsverhalten war jedoch nur bis zu einem Ra größer als 10 μm analysierbar. Sandgestrahlte Proben mit einem größeren Mittenrauwert aktivieren Monozyten/Makrophagen dagegen viel stärker, was sich in deutlich erhöhten Zytokinexpressionen zeigte.

Die Ergebnisse belegen des Weiteren, dass neben der Art der Oberflächenstruktur auch der Herstellungsprozess von Implantaten das Entzündungsverhalten von Blutmonozyten beeinflussen kann. So ließ sich die geätzte TiAl6V4-Oberfläche geometrisch vergleichsweise gut in die Reihe der polierten und gestrahlten Proben einordnen. Sie wies jedoch ein deutlich erhöhtes Entzündungspotential im Vergleich mit Proben ähnlicher Rauheit auf. Die geätzte Probe legt daher nahe, dass zusätzliche Methoden zur Beschreibung der chemischen Oberflächentextur herangezogen werden müssen, um die Aktivierung von Blutmonozyten zu verstehen.

Zur Bestimmung der geometrischen Oberflächenbeschaffenheit erwies sich insbesondere die 3D-Oberflächenanalyse durch die konfokale Weißlichtmikroskopie als besonders geeignetes Verfahren zur Charakterisierung der unterschiedlich bearbeiteten Oberflächentopographien. Die optische Messmethode offeriert darüber hinaus die Bestimmung funktionsrelevanter Oberflächenkenngrößen und ist damit der Tastschnittmethode mittels Perthometer überlegen.

Insbesondere die Oberflächenkenngröße wahre Fläche A_w erweist sich relevant bei der Betrachtung von Zelladhäsionsprozessen auf den verschiedenen strukturierten Oberflächen.

Dagegen ist das geschlossene Leervolumen V_{cl} für biologische Prozesse von untergeordneter Bedeutung.

Neben der Auswahl aussagekräftiger Oberflächenkenngrößen zur Beschreibung der modifizierten Oberflächen wurden mit Hilfe mathematisch-statistischer Berechnungsverfahren funktionsrelevante Oberflächenkenngrößen ermittelt. Es wurde dabei geprüft, welche Oberflächenparameter ein unterschiedliches Zellverhalten hinsichtlich der Zytokinexpression liefern. Die ersten Berechnungen für die Probe EK24 und EK8 legen die Vermutung nahe, dass die beschreibenden Talkenngößen S_v und S_{al} das Entzündungspotential von Monozyten/Makrophagen beeinflussen können. Werte von S_v größer als $50 \mu\text{m}$ und S_{al} größer als $0,068 \mu\text{m}$ wirken entzündungsfördernd und sind damit hinsichtlich des zu erwartenden Einheilvorganges als ungünstige Oberflächen zu bewerten.

Die Chance, durch Korrelation oberflächenspezifischer und biologischer Daten die optimalen Oberflächenkenngrößen für ein entzündungsarmes Einheilen zu bestimmen und damit maßgeschneiderte Implantatoberflächen zu entwickeln, sollte Fokus zukünftiger Arbeiten sein.

Die Zellkulturergebnisse zeigen jedoch auch, dass die komplexe *in vivo* Situation der anfänglichen Einheilung von Implantaten, durch das hier gewählte zelluläre Modellsystem, nicht vollständig beschrieben werden kann und Erweiterungen bedürfen. Alle *in vitro* Modelle sind als stark vereinfachte Ansätze zu sehen [181]. Zukünftig wäre es deshalb wünschenswert, ein *in vitro* Kokulturmodell zu entwickeln, um die direkten Wechselwirkungen der gebildeten proinflammatorischen Mediatoren und der Zellen auf z.B. Knochenzellen studieren zu können, ähnlich des Zellkultursystems von Horowitz und Gonzales [182] und [183]. Im Unterschied dazu, sollte jedoch die Etablierung eines allo-genen (Zellen gleicher Spezies) bzw. autologen Modells (Zellen eines Individuums) Ziel nachfolgender Untersuchungen sein, um sich der *in vivo* Situation weiter anzunähern.

8 Literaturverzeichnis

- [1] Williams, D.F., Consensus and Definitions in Biomaterials, In: Advances in biomaterials, de Putter, C., de Lange, K., de Groot, K.Lee, A.J.C., Editors. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam 1988, pp. 11-16.
- [2] Ondracek, G.: Mensch, Medizin und Material: Biowerkstoffe. *Keram Z*, 40, 3 (1988), 169-176.
- [3] Wintermantel, E.Ha, S.-W.: Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen. 3. überarb. Auflage ed, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2002.
- [4] Curtis, A.Wilkinson, C.: Topographical control of cells. *Biomaterials*, 18, 24 (1997), 1573-1583.
- [5] Collier, T.O., Thomas, C.H., Anderson, J.M.Healy, K.E.: Surface chemistry control of monocyte and macrophage adhesion, morphology, and fusion. *J Biomed Mater Res*, 49, 1 (2000), 141-145.
- [6] Hlady, V., Buijs, J.Jennissen, H.P.: Methods for studying protein adsorption. *Methods Enzymol*, 309, (1999), 402-429.
- [7] Klinger, A., Steinberg, D., Kohavi, D.Sela, M.N.: Mechanism of adsorption of human albumin to titanium in vitro. *J Biomed Mater Res*, 36, 3 (1997), 387-392.
- [8] Roser, K., Johansson, C.B., Donath, K.Albrektsson, T.: A new approach to demonstrate cellular activity in bone formation adjacent to implants. *J Biomed Mater Res*, 51, 2 (2000), 280-291.
- [9] Subramanian, A., Sarkar, S., Woollam, J.A.Nosal, W.H.: Synthesis and characterization of albumin binding surfaces for implantable surfaces. *Biomed Sci Instrum*, 40, (2004), 1-6.
- [10] Brunette, D.M.: The effects of implant surface topography on the behavior of cells. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 3, 4 (1988), 231-246.
- [11] Kasemo, B.Gold, J.: Implant surfaces and interface processes. *Adv Dent Res*, 13, (1999), 8-20.
- [12] Deppe, H., Horch, H.H., Henke, J.Donath, K.: Per-implant care of ailing implants with the carbon dioxide laser. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 16, 5 (2001), 659-667.
- [13] Peto, G., Karacs, A., Paszti, Z., Guzzi, L., Divinyi, T.Joob, A.: Surface treatment of screw shaped titanium dental implants by high intensity laser pulses. *Applied Surface Science*, 186, 1-4 (2002), 7-13.
- [14] Hallgren, C., Reimers, H., Chakarov, D., Gold, J.Wennerberg, A.: An in vivo study of bone response to implants topographically modified by laser micromachining. *Biomaterials*, 24, 5 (2003), 701-710.
- [15] Stangl, R., Pries, A., Loos, B., Muller, M.Erben, R.G.: Influence of pores created by laser superfinishing on osseointegration of titanium alloy implants. *J Biomed Mater Res*, 69A, 3 (2004), 444-453.
- [16] Winkelmann, M., Gold, J., Hauert, R., Kasemo, B., Spencer, N.D., Brunette, D.M.Textor, M.: Chemically patterned, metal oxide based surfaces produced by photolithographic techniques for studying protein- and cell-surface interactions I: Microfabrication and surface characterization. *Biomaterials*, 24, 7 (2003), 1133-1145.
- [17] Cochran, D.L., Nummikoski, P.V., Higginbottom, F.L., Hermann, J.S., Makins, S.R.Buser, D.: Evaluation of an endosseous titanium implant with a sandblasted and acid-etched surface in the canine mandible: radiographic results. *Clin Oral Implants Res*, 7, 3 (1996), 240-252.

- [18] Cochran, D.L., Schenk, R.K., Lussi, A., Higginbottom, F.L., Buser, D.: Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a histometric study in the canine mandible. *J Biomed Mater Res*, 40, 1 (1998), 1-11.
- [19] Larsson, C., Thomsen, P., Aronsson, B.O., Rodahl, M., Lausmaa, J., Kasemo, B., Ericson, L.E.: Bone response to surface-modified titanium implants: studies on the early tissue response to machined and electropolished implants with different oxide thicknesses. *Biomaterials*, 17, 6 (1996), 605-616.
- [20] Buser, D., Schenk, R.K., Steinemann, S., Fiorellini, J.P., Fox, C.H., Stich, H.: Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res*, 25, 7 (1991), 889-902.
- [21] Ronold, H.J., Ellingsen, J.E.: Effect of micro-roughness produced by TiO₂ blasting--tensile testing of bone attachment by using coin-shaped implants. *Biomaterials*, 23, 21 (2002), 4211-4219.
- [22] Cochran, D.L.: A comparison of endosseous dental implant surfaces. *J Periodontol*, 70, 12 (1999), 1523-1539.
- [23] Karacs, A., Joob Fancsaly, A., Divinyi, T., Peto, G., Kovach, G.: Morphological and animal study of titanium dental implant surface induced by blasting and high intensity pulsed Nd-glass laser. *Materials Science and Engineering: C*, 23, 3 (2003), 431-435.
- [24] Cho, S.A., Park, K.T.: The removal torque of titanium screw inserted in rabbit tibia treated by dual acid etching. *Biomaterials*, 24, 20 (2003), 3611-3617.
- [25] Bagambisa, F.B., Joos, U.: Preliminary studies on the phenomenological behaviour of osteoblasts cultured on hydroxyapatite ceramics. *Biomaterials*, 11, 1 (1990), 50-56.
- [26] Ball, M.D., Downes, S., Scotchford, C.A., Antonov, E.N., Bagratashvili, V.N., Popov, V.K., Lo, W.J., Grant, D.M., Howdle, S.M.: Osteoblast growth on titanium foils coated with hydroxyapatite by pulsed laser ablation. *Biomaterials*, 22, 4 (2001), 337-347.
- [27] Block, C.M., Mayo, J.A., Evans, G.H.: Effects of the Nd:YAG dental laser on plasma-sprayed and hydroxyapatite-coated titanium dental implants: surface alteration and attempted sterilization. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 7, 4 (1992), 441-449.
- [28] de Lange, G.L., Donath, K.: Interface between bone tissue and implants of solid hydroxyapatite or hydroxyapatite-coated titanium implants. *Biomaterials*, 10, 2 (1989), 121-125.
- [29] Webster, T.J., Ergun, C., Doremus, R.H., Siegel, R.W., Bizios, R.: Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials*, 21, 17 (2000), 1803-1810.
- [30] Dorozhkin, S.V., Epple, M.: Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed Engl*, 41, 17 (2002), 3130-3146.
- [31] Aoba, T., Shimazu, Y., Taya, Y., Soeno, Y., Sato, K., Miake, Y.: Fluoride and apatite formation in vivo and in vitro. *J Electron Microsc (Tokyo)*, 52, 6 (2003), 615-625.
- [32] Tang, R., Hass, M., Wu, W., Gulde, S., Nancollas, G.H.: Constant composition dissolution of mixed phases. II. Selective dissolution of calcium phosphates. *J Colloid Interface Sci*, 260, 2 (2003), 379-384.

- [33] Scharnweber, D., Born, R., Flade, K., Roessler, S., Stoelzel, M., Worch, H.: Mineralization behaviour of collagen type I immobilized on different substrates. *Biomaterials*, 25, 12 (2004), 2371-2380.
- [34] Souto, R.M., Lemus, M.M., Reis, R.L.: Electrochemical behavior of different preparations of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings on Ti6Al4V substrate. *J Biomed Mater Res*, 70A, 1 (2004), 59-65.
- [35] Barrere, F., van der Valk, C.M., Meijer, G., Dalmeijer, R.A., de Groot, K., Layrolle, P.: Osteointegration of biomimetic apatite coating applied onto dense and porous metal implants in femurs of goats. *J Biomed Mater Res*, 67B, 1 (2003), 655-665.
- [36] Pompe, W., Worch, H., Epple, M., Friess, W., Gelinsky, M., Greil, P., Hempel, U., Scharnweber, D., Schulte, K.: Functionally graded materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering A*, 362, 1-2 (2003), 40-60.
- [37] Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D.: *Molekularbiologie der Zelle*. Vol. 3. Auflage, VCH, Weinheim, 1995.
- [38] Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J.: *Molekulare Zellbiologie*. 4. Auflage ed, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, 2001.
- [39] Fischer, U., Hempel, U., Becker, D., Bierbaum, S., Scharnweber, D., Worch, H., Wenzel, K.W.: Transforming growth factor beta1 immobilized adsorptively on Ti6Al4V and collagen type I coated Ti6Al4V maintains its biological activity. *Biomaterials*, 24, 15 (2003), 2631-2641.
- [40] Geissler, U., Hempel, U., Wolf, C., Scharnweber, D., Worch, H., Wenzel, K.: Collagen type I-coating of Ti6Al4V promotes adhesion of osteoblasts. *J Biomed Mater Res*, 51, 4 (2000), 752-760.
- [41] Degasne, I., Basle, M.F., Demais, V., Hure, G., Lesourd, M., Grolleau, B., Mercier, L., Chappard, D.: Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces. *Calcif Tissue Int*, 64, 6 (1999), 499-507.
- [42] Bierbaum, S., Hempel, U., Geissler, U., Hanke, T., Scharnweber, D., Wenzel, K.W., Worch, H.: Modification of Ti6AL4V surfaces using collagen I, III, and fibronectin. II. Influence on osteoblast responses. *J Biomed Mater Res*, 67A, 2 (2003), 431-438.
- [43] Schliephake, H., Tavassol, F., Gelinsky, M., Dard, M., Sewing, A., Pompe, W.: Use of a mineralized collagen membrane to enhance repair of calvarial defects in rats. *Clin Oral Implants Res*, 15, 1 (2004), 112-118.
- [44] Rammelt, S., Schulze, E., Bernhardt, R., Hanisch, U., Scharnweber, D., Worch, H., Zwipp, H., Biewener, A.: Coating of titanium implants with type-I collagen. *J Orthop Res*, 22, 5 (2004), 1025-1034.
- [45] Zreiqat, H., Akin, F.A., Howlett, C.R., Markovic, B., Haynes, D., Lateef, S., Hanley, L.: Differentiation of human bone-derived cells grown on GRGDSP-peptide bound titanium surfaces. *J Biomed Mater Res*, 64, 1 (2003), 105-113.
- [46] Ferris, D.M., Moodie, G.D., Dimond, P.M., Gioranni, C.W., Ehrlich, M.G., Valentini, R.F.: RGD-coated titanium implants stimulate increased bone formation in vivo. *Biomaterials*, 20, 23-24 (1999), 2323-2331.
- [47] Schliephake, H., Scharnweber, D., Dard, M., Rossler, S., Sewing, A., Meyer, J., Hoogstraat, D.: Effect of RGD peptide coating of titanium implants on periimplant bone formation in the alveolar crest. An experimental pilot study in dogs. *Clin Oral Implants Res*, 13, 3 (2002), 312-319.

- [48] Meyer, J., Schaffner, P., Nies, B., Kantlehner, M., Kessler, H., Spezifische Bioaktivierung von Implantatoberflächen., In: Zelluläre Interaktion mit Biomaterialien. VII. Tagung der Chirurgischen Arbeitsgemeinschaft für Biomaterialien der deutschen Gesellschaft für Chirurgie. Hefte zu Der Unfallchirurg., Meenen NM, K.A., Rueger JM, Editor. Springer 2000, pp. 33 - 40.
- [49] Kuphasuk, C., Oshida, Y., Andres, C.J., Hovijitra, S.T., Barco, M.T., Brown, D.T.: Electrochemical corrosion of titanium and titanium-based alloys. *J Prosthet Dent*, 85, 2 (2001), 195-202.
- [50] Freese, H.L., Volas, M.G., Wood, J.R., Metallurgy and Technological Properties of Titanium and Titanium Alloys, In: Titanium in Medicine, Brunette, D.M., Tengvall, P., Textor, M., Thomsen, P., Editors. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 2001, pp. 25-51.
- [51] Schroeder A. Die Reaktion von Mukosa und Knochen auf Titanplasma bzw. Titanoxide (Rutil). *Fortschr Zahnärztl Implantol*, 1, (1984), 25-27.
- [52] Olefjord, I., Hansson, S.: Surface analysis of four dental implant systems. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 8, 1 (1993), 32-40.
- [53] Machnee, C.H., Wagner, W.C., Jaarda, M.J., Lang, B.R.: Identification of oxide layers of commercially pure titanium in response to cleaning procedures. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 8, 5 (1993), 529-533.
- [54] Textor, M., Sittig, C., Frauchiger, V., Tosatti, S., Brunette, D.M., Properties and Biological Significance of Natural Oxide Films on Titanium and Its Alloys, In: Titanium in Medicine, Brunette, D.M., Tengvall, P., Textor, M., Thomsen, P., Editors. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 2001, pp. 171-230.
- [55] Worch, H., Scharnweber, D.: Biologisierte Titanwerkstoffe. *Werkstoffwissenschaft im Grenzbereich zwischen belebter und unbelebter Materie. Z Metallk*, 89, 2 (1998), 153-163.
- [56] Eisenbarth, E., Velten, D., Schenk-Meuser, K., Linez, P., Biehl, V., Duschner, H., Breme, J., Hildebrand, H.: Interactions between cells and titanium surfaces. *Biomol Eng*, 19, 2-6 (2002), 243.
- [57] Kanagaraja, S., Wennerberg, A., Eriksson, C., Nygren, H.: Cellular reactions and bone apposition to titanium surfaces with different surface roughness and oxide thickness cleaned by oxidation. *Biomaterials*, 22, 13 (2001), 1809-1818.
- [58] Garcia-Alonso, M.C., Saldana, L., Valles, G., Gonzalez-Carrasco, J.L., Gonzalez-Cabrero, J., Marti, M.E., Gil-Garay, E., Munuera, L.: In vitro corrosion behaviour and osteoblast response of thermally oxidised Ti6Al4V alloy. *Biomaterials*, 24, 1 (2003), 19-26.
- [59] Donath, K., Laass, M., Gunzl, H.J.: The histopathology of different foreign-body reactions in oral soft tissue and bone tissue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 420, 2 (1992), 131-137.
- [60] Silver, F., Doillon, C.: Biocompatibility interactions of Biological and Implantable Materials. Vol. volume 1, VCH, Weilheim, 1989.
- [61] Kirkpatrick, C.J., Unger, R.E., Krump-Konvalinkova, V., Peters, K., Schmidt, H., Kamp, G.: Experimental approaches to study vascularization in tissue engineering and biomaterial applications. *J Mater Sci Mater Med*, 14, 8 (2003), 677-681.
- [62] Jackson, J.R., Bolognese, B., Kircher, C.H., Marshall, L.A., Winkler, J.D.: Modulation of angiogenesis in a model of chronic inflammation. *Inflamm Res*, 46 Suppl 2, (1997), S129-130.
- [63] Anderson, J.M.: Inflammatory response to implants. *ASAIO Trans*, 34, 2 (1988), 101-107.

- [64] Donath, K.: Vergleichende histologische Untersuchung verschiedener enossaler Implantattypen. *Z Zahnärztl Implant*, IV, (1988), 106-108.
- [65] Donath, K., Kirsch, A.Osborn, J.-F.: Zelluläre Dynamik um enossale Titanimplantate. *Fortschr Zahnärztl Implantol*, I, (1984), 55-58.
- [66] Salthouse, T.N.: Some aspects of macrophage behavior at the implant interface. *J Biomed Mater Res*, 18, 4 (1984), 395-401.
- [67] Anderson, J.M.Miller, K.M.: Biomaterial biocompatibility and the macrophage. *Biomaterials*, 5, 1 (1984), 5-10.
- [68] Tang, L., Jennings, T.A.Eaton, J.W.: Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 15 (1998), 8841-8846.
- [69] DiPietro, L.A.: Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. *Shock*, 4, 4 (1995), 233-240.
- [70] Meager, T.: *The Molecular Biology of Cytokines*. Wiley & Sons Ltd, Chichester, 1998.
- [71] Burmester, G.-R.Pezzutto, A.: *Taschenatlas der Immunologie - Grundlagen, Labor, Klinik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1998.
- [72] Goldring, S.R.Goldring, M.B.: Cytokines and skeletal physiology. *Clin Orthop*, 324 (1996), 13-23.
- [73] Mizgerd, J.P., Spieker, M.R.Doerschuk, C.M.: Early response cytokines and innate immunity: essential roles for TNF receptor 1 and type I IL-1 receptor during *Escherichia coli* pneumonia in mice. *J Immunol*, 166, 6 (2001), 4042-4048.
- [74] Arend, W.P.: Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol*, 54, (1993), 167-227.
- [75] Arend, W.T., *Cytokine Inhibitors and Receptor Antagonists*, In: *Clinical immunology: principle and practice*, HH, R., Editor 1995, pp. 2049-2055.
- [76] Bresnihan, B.Cunnane, G.: Interleukin-1 receptor antagonist. *Rheum Dis Clin North Am*, 24, 3 (1998), 615-628.
- [77] DeFife, K.M., Shive, M.S., Hagen, K.M., Clapper, D.L.Anderson, J.M.: Effects of photochemically immobilized polymer coatings on protein adsorption, cell adhesion, and the foreign body reaction to silicone rubber. *J Biomed Mater Res*, 44, 3 (1999), 298-307.
- [78] Riedel, M., Muller, B.Wintermantel, E.: Protein adsorption and monocyte activation on germanium nanopylramids. *Biomaterials*, 22, 16 (2001), 2307-2316.
- [79] Malemud, C.J.: Cytokines as therapeutic targets for osteoarthritis. *BioDrugs*, 18, 1 (2004), 23-35.
- [80] Sciacca, F.L., Canal, N.Edoardo Grimaldi, L.M.: Induction of IL-1 receptor antagonist by interferon beta: implication for the treatment of multiple sclerosis. *J Neurovirol*, 6, Suppl 2 (2000), S33-37.
- [81] Yokota, S.: Interleukin 6 as a therapeutic target in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 15, 5 (2003), 581-586.
- [82] Nelson, D.R., Tu, Z., Soldevila-Pico, C., Abdelmalek, M., Zhu, H., Xu, Y.L., Cabrera, R., Liu, C.Davis, G.L.: Long-term interleukin 10 therapy in chronic hepatitis C patients has a proviral and anti-inflammatory effect. *Hepatology*, 38, 4 (2003), 859-868.
- [83] Wang, J.Y., Wicklund, B.H., Gustilo, R.B.Tsukayama, D.T.: Titanium, chromium and cobalt ions modulate the release of bone-associated cytokines by human monocytes/macrophages in vitro. *Biomaterials*, 17, 23 (1996), 2233-2240.

- [84] Lee, S.H., Brennan, F.R., Jacobs, J.J., Urban, R.M., Ragasa, D.R., Glant, T.T.: Human monocyte/macrophage response to cobalt-chromium corrosion products and titanium particles in patients with total joint replacements. *J Orthop Res*, 15, 1 (1997), 40-49.
- [85] Rosengren, A., Danielsen, N., Bjursten, L.M.: Inflammatory reaction dependence on implant localization in rat soft tissue models. *Biomaterials*, 18, 14 (1997), 979-987.
- [86] Boynton, E.L., Henry, M., Morton, J., Waddell, J.P.: The inflammatory response to particulate wear debris in total hip arthroplasty. *Can J Surg*, 38, 6 (1995), 507-515.
- [87] Chiba, J., Rubash, H.E., Kim, K.J., Iwaki, Y.: The characterization of cytokines in the interface tissue obtained from failed cementless total hip arthroplasty with and without femoral osteolysis. *Clin Orthop*, 300 (1994), 304-312.
- [88] Stea, S., Visentin, M., Granchi, D., Ciapetti, G., Donati, M.E., Sudanese, A., Zanotti, C., Toni, A.: Cytokines and osteolysis around total hip prostheses. *Cytokine*, 12, 10 (2000), 1575-1579.
- [89] Neale, S.D., Haynes, D.R., Howie, D.W., Murray, D.W., Athanasou, N.A.: The effect of particle phagocytosis and metallic wear particles on osteoclast formation and bone resorption in vitro. *J Arthroplasty*, 15, 5 (2000), 654-662.
- [90] Quinn, J.M., Neale, S., Fujikawa, Y., McGee, J.O., Athanasou, N.A.: Human osteoclast formation from blood monocytes, peritoneal macrophages, and bone marrow cells. *Calcif Tissue Int*, 62, 6 (1998), 527-531.
- [91] Kirkpatrick, C.J., Barth, S., Gerdes, T., Krump-Konvalinkova, V., Peters, K.: [Pathomechanisms of impaired wound healing by metallic corrosion products]. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 6, 3 (2002), 183-190.
- [92] Granchi, D., Ciapetti, G., Filippini, F., Stea, S., Cenni, E., Pizzoferrato, A., Toni, A.: In vitro cytokine production by mononuclear cells exposed to bone cement extracts. *Biomaterials*, 21, 17 (2000), 1789-1795.
- [93] Blaine, T.A., Rosier, R.N., Puzas, J.E., Looney, R.J., Reynolds, P.R., Reynolds, S.D., O'Keefe, R.J.: Increased levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 protein and messenger RNA in human peripheral blood monocytes due to titanium particles. *J Bone Joint Surg Am*, 78, 8 (1996), 1181-1192.
- [94] Trindade, M.C., Lind, M., Sun, D., Schurman, D.J., Goodman, S.B., Smith, R.L.: In vitro reaction to orthopaedic biomaterials by macrophages and lymphocytes isolated from patients undergoing revision surgery. *Biomaterials*, 22, 3 (2001), 253-259.
- [95] Horowitz, S.M., Luchetti, W.T., Gonzales, J.B., Ritchie, C.K.: The effects of cobalt chromium upon macrophages. *J Biomed Mater Res*, 41, 3 (1998), 468-473.
- [96] Glant, T.T., Jacobs, J.J.: Response of three murine macrophage populations to particulate debris: bone resorption in organ cultures. *J Orthop Res*, 12, 5 (1994), 720-731.
- [97] Matthews JB, G.T., Stone MH, Wroblewski BM, Fisher J, Ingham E.: Comparison of the response of three human monocytic cell lines to challenge with polyethylene particles of particles of known size and dose. *J Mater Sci*, 12, (2001), 249-258.
- [98] Haynes, D.R., Boyle, S.J., Rogers, S.D., Howie, D.W., Vernon-Roberts, B.: Variation in cytokines induced by particles from different prosthetic materials. *Clin Orthop*, 352 (1998), 223-230.
- [99] Gretzer, C., Eriksson, A.S., Allden, B., Ericson, L.E., Thomsen, P.: Monocyte activation on titanium-sputtered polystyrene surfaces in vitro: the effect of culture conditions on interleukin-1 release. *Biomaterials*, 17, 9 (1996), 851-858.

- [100] Refai, A.K., Textor, M., Brunette, D.M., Waterfield, J.D.: Effect of titanium surface topography on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Biomed Mater Res*, 70A, 2 (2004), 194-205.
- [101] Vogel, M., Production and characterization of cell culture specimen using a biocompatible titanium alloy (Ti6Al4V), in Zentralinstitut für Medizintechnik. TU München: München 2003, pp. 1-52.
- [102] Bierbaum, S., Beutner, R., Hanke, T., Scharnweber, D., Hempel, U., Worch, H.: Modification of Ti6Al4V surfaces using collagen I, III, and fibronectin. I. Biochemical and morphological characteristics of the adsorbed matrix. *J Biomed Mater Res*, 67A, 2 (2003), 421-430.
- [103] Roessler, S., Sewing, A., Stolzel, M., Born, R., Scharnweber, D., Dard, M., Worch, H.: Electrochemically assisted deposition of thin calcium phosphate coatings at near-physiological pH and temperature. *J Biomed Mater Res*, 64A, 4 (2003), 655-663.
- [104] Assmann, W., Huber, H., Steinhausen, C., Dobler, M., Gluckler, H., Weidinger, A.: Elastic recoil detection analysis with heavy ions. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 89, 1-4 (1994), 131-139.
- [105] Kleber W., B.H.-J., Bohn J., Einführung in die Kristallographie. 18. bearb. Auflage ed, Oldenbourg, 1998.
- [106] Brodmann, R., Warrender, T., Weber, M. Applications and limits of optical metrology by the confocal multi-pinhole-technique. in XI. Int. Colloquium on Surfaces, Feb. 2nd and 3rd 2004. 2004. Chemnitz.
- [107] Beck, C.: Funktionsgerechte Tolerierung technischer Oberflächen. Studienmaterial der TEQ Chemnitz, Band FMT 7.1/6, (2002).
- [108] Stout, K.J., Dong, W.P., Mainsah, E., et al.: The Development of Methods for the Characterisation of Roughness in Three Dimensions. Report BCR-Eur 15178 EN, (1995).
- [109] Neudecker T, Popp, U., Schiffer, R.U., E.: Meßvorschrift zur Bestimmung funktionaler 3D-Oberflächenkenngrößen für die Blechumformung. UTF Science, II/2001 Teil1 und III/2001 Teil2 (2001), Teil II: 12-17, Teil III: 34-38.
- [110] Engel U, N.T., Popp U.: 3D-Oberflächenanalyse - Methoden, Kenngrößen, Anwendungen. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 31, (2000), 747-753.
- [111] Pfestorf, M., Engel, U., Geiger, M.: Three-dimensional characterization of surfaces for sheet metal forming. *Wear*, 216, 2 (1998), 244-250.
- [112] Garrelds, I.M., van Hal, P.T., Haakmat, R.C., Hoogsteden, H.C., Saxena, P.R., Zijlstra, F.J.: Time dependent production of cytokines and eicosanoids by human monocytic leukaemia U937 cells; effects of glucocorticosteroids. *Mediators Inflamm*, 8, 4-5 (1999), 229-235.
- [113] Thiel, A., Scheffold, A., Radbruch, A.: Immunomagnetic cell sorting--pushing the limits. *Immunotechnology*, 4, 2 (1998), 89-96.
- [114] Beck, C., Pleul, R., Method for selecting function-relevant surface characteristics. in XI. Int. Colloquium on Surfaces, Feb. 2nd and 3rd 2004. 2004. Chemnitz.
- [115] Schuh, A., Holzwarth, U., Kachler, W., Göske, J.: Oberflächenkontamination nach Kugelstrahlen in der Herstellung von Hüftgelenksimplantaten. *BIOMaterialien*, 4, 3 (2003), 292-297.
- [116] Chongthong, P., Guder, S., Bader, R., Warmuth, S., Wintermantel, E., Werner, E.: Mikroschädigung von Implantatoberflächen. *BIOMaterialien*, 4, 4 (2003), 305-313.
- [117] Darvell, B.W., Samman, N., Luk, W.K., Clark, R.K., Tideman, H.: Contamination of titanium castings by aluminium oxide blasting. *J Dent*, 23, 5 (1995), 319-322.

- [118] Gbureck, U.Thull, R.: Tribochemische TiO₂-Beschichtungen. *BIOMaterialien*, 2, 2/3 (2001), 93-98.
- [119] Bohler, M., Kanz, F., Schwarz, B., Steffan, I., Walter, A., Plenk, H., Jr.Knahr, K.: Adverse tissue reactions to wear particles from Co-alloy articulations, increased by alumina-blasting particle contamination from cementless Ti-based total hip implants. A report of seven revisions with early failure. *J Bone Joint Surg Br*, 84, 1 (2002), 128-136.
- [120] Piattelli, A., Degidi, M., Paolantonio, M., Mangano, C.Scarano, A.: Residual aluminum oxide on the surface of titanium implants has no effect on osseointegration. *Biomaterials*, 24, 22 (2003), 4081-4089.
- [121] Tengvall, P.Lundstrom, I.: Physico-chemical considerations of titanium as a biomaterial. *Clin Mater*, 9, 2 (1992), 115-134.
- [122] Granchi, D., Verri, E., Ciapetti, G., Savarino, L., Cenni, E., Gori, A.Pizzoferrato, A.: Effects of chromium extract on cytokine release by mononuclear cells. *Biomaterials*, 19, 1-3 (1998), 283-291.
- [123] Ronold, H.J., Lyngstadaas, S.P.Ellingsen, J.E.: Analysing the optimal value for titanium implant roughness in bone attachment using a tensile test. *Biomaterials*, 24, 25 (2003), 4559-4564.
- [124] Martin, J.Y., Schwartz, Z., Hummert, T.W., Schraub, D.M., Simpson, J., Lankford, J., Jr., Dean, D.D., Cochran, D.L.Boyan, B.D.: Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res*, 29, 3 (1995), 389-401.
- [125] Schwartz, Z., Lohmann, C.H., Vocke, A.K., Sylvia, V.L., Cochran, D.L., Dean, D.D.Boyan, B.D.: Osteoblast response to titanium surface roughness and 1 α ,25-(OH)₂D₃ is mediated through the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. *J Biomed Mater Res*, 56, 3 (2001), 417-426.
- [126] Boyan, B.D., Bonewald, L.F., Paschalis, E.P., Lohmann, C.H., Rosser, J., Cochran, D.L., Dean, D.D., Schwartz, Z.Boskey, A.L.: Osteoblast-Mediated Mineral Deposition in Culture is Dependent on Surface Microtopography. *Calcif Tissue Int*, 18, (2002), 18.
- [127] Lohmann, C.H., Tandy, E.M., Sylvia, V.L., Hell-Vocke, A.K., Cochran, D.L., Dean, D.D., Boyan, B.D.Schwartz, Z.: Response of normal female human osteoblasts (NH₂Ost) to 17 β -estradiol is modulated by implant surface morphology. *J Biomed Mater Res*, 62, 2 (2002), 204-213.
- [128] Khakbaznejad, A., Chehroudi, B.Brunette, D.M.: Effects of titanium-coated micromachined grooved substrata on orienting layers of osteoblast-like cells and collagen fibers in culture. *J Biomed Mater Res*, 70A, 2 (2004), 206-218.
- [129] Perizzolo, D., Lacefield, W.R.Brunette, D.M.: Interaction between topography and coating in the formation of bone nodules in culture for hydroxyapatite- and titanium-coated micromachined surfaces. *J Biomed Mater Res*, 56, 4 (2001), 494-503.
- [130] Kononen, M., Hormia, M., Kivilahti, J., Hautaniemi, J.Thesleff, I.: Effect of surface processing on the attachment, orientation, and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. *J Biomed Mater Res*, 26, 10 (1992), 1325-1341.
- [131] Schwartz, Z., Martin, J.Y., Dean, D.D., Simpson, J., Cochran, D.L.Boyan, B.D.: Effect of titanium surface roughness on chondrocyte proliferation, matrix production, and differentiation depends on the state of cell maturation. *J Biomed Mater Res*, 30, 2 (1996), 145-155.

- [132] Raisanen, L., Kononen, M., Juhanoja, J., Varpavaara, P., Hautaniemi, J., Kivilahti, J., Hormia, M.: Expression of cell adhesion complexes in epithelial cells seeded on biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res*, 49, 1 (2000), 79-87.
- [133] Park, J.Y., Gemmell, C.H., Davies, J.E.: Platelet interactions with titanium: modulation of platelet activity by surface topography. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Biomaterials*, 22, 19 (2001), 2671-2682.
- [134] Rich, A., Harris, A.K.: Anomalous preferences of cultured macrophages for hydrophobic and roughened substrata. *J Cell Sci*, 50, (1981), 1-7.
- [135] Soskolne, W.A., Cohen, S., Sennerby, L., Wennerberg, A., Shapira, L.: The effect of titanium surface roughness on the adhesion of monocytes and their secretion of TNF-alpha and PGE2. *Clin Oral Implants Res*, 13, 1 (2002), 86-93.
- [136] Lausmaa, J., Mechanical, Thematic, Chemical and Electrochemical Surface Treatment of Titanium, In: *Titanium in Medicine*, Brunette, D.M., Editor. Springer, Berlin 2001.
- [137] Sander, M.: *Oberflächemess-technik für den Praktiker*. 2. Auflage ed, Feinprüf Perthen, Göttingen, 1993.
- [138] Mekayarajananonth, T., Winkler, S.: Contact angle measurement on dental implant biomaterials. *J Oral Implantol*, 25, 4 (1999), 230-236.
- [139] Lim, Y.J., Oshida, Y.: Initial contact angle measurements on variously treated dental/medical titanium materials. *Biomed Mater Eng*, 11, 4 (2001), 325-341.
- [140] Lampin, M., Warocquier, C., Legris, C., Degrange, M., Sigot-Luizard, M.F.: Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. *J Biomed Mater Res*, 36, 1 (1997), 99-108.
- [141] Lim, Y.J., Oshida, Y., Andres, C.J., Barco, M.T.: Surface characterizations of variously treated titanium materials. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 16, 3 (2001), 333-342.
- [142] Morra, M.; Della Volpe, C.: Letter to the editor: Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. *J Biomed Mater Res*, 42, 3 (1998), 473-474.
- [143] Kirkpatrick, C.J., Krump-Konvalinkova, V., Unger, R.E., Bittinger, F., Otto, M., Peters, K.: Tissue response and biomaterial integration: the efficacy of in vitro methods. *Biomol Eng*, 19, 2-6 (2002), 211-217.
- [144] Morra, M., Cassinelli, C., Cascardo, G., Cahalan, P., Cahalan, L., Fini, M., Giardino, R.: Surface engineering of titanium by collagen immobilization. Surface characterization and in vitro and in vivo studies. *Biomaterials*, 24, 25 (2003), 4639-4654.
- [145] DIN-EN-ISO-Normung, DIN EN ISO 10993-5 Biologische Beurteilung von Medizinprodukten. Beuth-Verlag, Berlin 1999.
- [146] Becker, D., Geissler, U., Hempel, U., Bierbaum, S., Scharnweber, D., Worch, H., Wenzel, K.W.: Proliferation and differentiation of rat calvarial osteoblasts on type I collagen-coated titanium alloy. *J Biomed Mater Res*, 59, 3 (2002), 516-527.
- [147] Simbirtsev, A., Prokopieva, E., Ivanova, E., Konusova, V., Perumov, N.D., Ketlinsky, S.: Interleukin-1 and tumour necrosis factor production by human monocytoid cells: study on a single cell level. *Eur Cytokine Netw*, 3, 4 (1992), 421-428.
- [148] Hass, R., Lonnemann, G., Mannel, D., Topley, N., Hartmann, A., Kohler, L., Resch, K., Goppelt-Strube, M.: Regulation of TNF-alpha, IL-1 and IL-6 synthesis in differentiating human monoblastoid leukemic U937 cells. *Leuk Res*, 15, 5 (1991), 327-339.

- [149] Warmuth, S., Kosmann, M., Aigner, J., Scharnweber, D., Bernhardt, R., Worch, H., Wintermantel, E.: Einfluss verschieden modifizierter Titanimplantate auf das Verhalten mononukleärer Zellen. *BIOMaterialien*, 4, 4 (2003).
- [150] Pucillo, C.E., Colombatti, A., Vitale, M., Salzano, S., Rossi, G., Formisano, S.: Interactions of promonocytic U937 cells with proteins of the extracellular matrix. *Immunology*, 80, 2 (1993), 248-252.
- [151] Sundstrom, C., Nilsson, K.: Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer*, 17, 5 (1976), 565-577.
- [152] Hetland, G.: Cytotoxic effect of dibutyryl cAMP, phorbol-12-myristate-13-acetate and lipopolysaccharide, but not interferon-gamma, on promonocytic cell lines in vitro. *Anticancer Drugs*, 8, 6 (1997), 618-622.
- [153] Andreesen, R., Kreutz, M.: Differentiation of Human Monocytes In Vitro: A Model of Macrophage Ontogeny, In: *Cell culture in Pharmaceutical Research*, Fusenig N E, G.H., Editor. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1994, pp. 9-27.
- [154] Andreesen, R., Brugger, W., Scheibenbogen, C., Kreutz, M., Leser, H.G., Rehm, A., Lohr, G.W.: Surface phenotype analysis of human monocyte to macrophage maturation. *J Leukoc Biol*, 47, 6 (1990), 490-497.
- [155] Kreutz, M., Krause, S.W., Hennemann, B., Rehm, A., Andreesen, R.: Macrophage heterogeneity and differentiation: defined serum-free culture conditions induce different types of macrophages in vitro. *Res Immunol*, 143, 1 (1992), 107-115.
- [156] Brugger, W., Reinhardt, D., Galanos, C., Andreesen, R.: Inhibition of in vitro differentiation of human monocytes to macrophages by lipopolysaccharides (LPS): phenotypic and functional analysis. *Int Immunol*, 3, 3 (1991), 221-227.
- [157] Thomsen, P., Gretzer, C.: Macrophage interactions with modified material surfaces. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 5, 2-3 (2001), 163-176.
- [158] Gretzer, C., Gisselbalt, K., Liljensten, E., Ryden, L., Thomsen, P.: Adhesion, apoptosis and cytokine release of human mononuclear cells cultured on degradable poly(urethane urea), polystyrene and titanium in vitro. *Biomaterials*, 24, 17 (2003), 2843-2852.
- [159] Schachtrupp, A., Klinge, U., Junge, K., Rosch, R., Bhardwaj, R.S., Schumpelick, V.: Individual inflammatory response of human blood monocytes to mesh biomaterials. *Br J Surg*, 90, 1 (2003), 114-120.
- [160] Haas, J.G., Thiel, C., Blomer, K., Weiss, E.H., Riethmuller, G., Ziegler-Heitbrock, H.W.: Downregulation of tumor necrosis factor expression in the human Mono-Mac-6 cell line by lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol*, 46, 1 (1989), 11-14.
- [161] Bhardwaj, R.S., H.U.: Monocyte-biomaterial interaction inducing phenotypic dynamics of monocytes: a possible role of monocyte subsets in biocompatibility. *Journal of materials science. Materials in medicine.*, 8, (1997), 737-742.
- [162] Ziegler-Heitbrock, H.W., Strobel, M., Kieper, D., Fingerle, G., Schlunck, T., Petersmann, I., Ellwart, J., Blumenstein, M., Haas, J.G.: Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations. *Blood*, 79, 2 (1992), 503-511.
- [163] Belge, K.U., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., Espevik, T., Ziegler-Heitbrock, L.: The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol*, 168, 7 (2002), 3536-3542.
- [164] Peters, K.M., Koberg, K., Rosendahl, T., Klosterhalfen, B., Straub, A., Zwadlo-Klarwasser, G.: Macrophage reactions in septic arthritis. *Arch Orthop Trauma Surg*, 115, 6 (1996), 347-350.

- [165] Zwadlo, G., Schlegel, R., Sorg, C.: A monoclonal antibody to a subset of human monocytes found only in the peripheral blood and inflammatory tissues. *J Immunol*, 137, 2 (1986), 512-518.
- [166] Hayashi, K., Matsuguchi, N., Uenoyama, K., Kanemaru, T., Sugioka, Y.: Evaluation of metal implants coated with several types of ceramics as biomaterials. *J Biomed Mater Res*, 23, 11 (1989), 1247-1259.
- [167] Scharnweber, D., Verbesserung der Biokompatibilität und -funktionalität von Titan und Titan-Basislegierungen für Implantatanwendungen durch Bio Surface-Engineering., in Fakultät Maschinenwesen. Technische Universität Dresden: Dresden 2002.
- [168] Harada, Y., Wang, J.T., Doppalapudi, V.A., Willis, A.A., Jasty, M., Harris, W.H., Nagase, M., Goldring, S.R.: Differential effects of different forms of hydroxyapatite and hydroxyapatite/tricalcium phosphate particulates on human monocyte/macrophages in vitro. *J Biomed Mater Res*, 31, 1 (1996), 19-26.
- [169] Zeng, H., Chittur, K.K., Lacefield, W.R.: Analysis of bovine serum albumin adsorption on calcium phosphate and titanium surfaces. *Biomaterials*, 20, 4 (1999), 377-384.
- [170] Roessler, S., Zimmermann, R., Scharnweber, D., Werner, C., Worch, H.: Characterization of oxide layers on Ti6Al4V and titanium by streaming potential and streaming current measurements. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 26, 4 (2002), 387-395.
- [171] Schliephake, H., Scharnweber, D., Dard, M., Robetaler, S., Sewing, A., Huttmann, C.: Biological performance of biomimetic calcium phosphate coating of titanium implants in the dog mandible. *J Biomed Mater Res*, 64A, 2 (2003), 225-234.
- [172] Kilpadi, K.L., Chang, P.L., Bellis, S.L.: Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel. *J Biomed Mater Res*, 57, 2 (2001), 258-267.
- [173] Hiltunen, A., Aro, H.T., Vuorio, E.: Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing in mice. *Clin Orthop*, 297 (1993), 23-27.
- [174] Kurdy, N.M., Bowles, S., Marsh, D.R., Davies, A., France, M.: Serology of collagen types I and III in normal healing of tibial shaft fractures. *J Orthop Trauma*, 12, 2 (1998), 122-126.
- [175] Rammelt, S., Schulze, E., Wolf, E., Scharnweber, D., Holch, M., Worch, H., Zwipp, H.: Immunohistochemical characterization of the bone-implant interface of collagen-coated titanium pins in the undecalcified rat-tibia. *European Journal of Trauma (Abstract CAB 002)*, 2, (2002), 125-126.
- [176] Schiffer, R., Klein, B., Klosterhalfen, B., Zwadlo-Klarwasser, G.: The contact of human macrophages with extracellular matrix proteins selectively induces expression of proinflammatory cytokines. *Pathobiology*, 67, 5-6 (1999), 233-235.
- [177] Kreutz, M., Ackermann, U., Hauschildt, S., Krause, S.W., Riedel, D., Bessler, W., Andreesen, R.: A comparative analysis of cytokine production and tolerance induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharides and *Staphylococcus aureus* in human monocytes. *Immunology*, 92, 3 (1997), 396-401.
- [178] Chakravorty, D., Kumar, K.S.: Interaction of lipopolysaccharide with human small intestinal lamina propria fibroblasts favors neutrophil migration and peripheral blood mononuclear cell adhesion by the production of proinflammatory mediators and adhesion molecules. *Biochim Biophys Acta*, 1453, 2 (1999), 261-272.
- [179] Izeboud, C.A., Mocking, J.A., Monshouwer, M., van Miert, A.S., Witkamp, R.F.: Participation of beta-adrenergic receptors on macrophages in modulation of LPS-induced cytokine release. *J Recept Signal Transduct Res*, 19, 1-4 (1999), 191-202.

- [180] Horiguchi, J., Spriggs, D., Imamura, K., Stone, R., Luebbers, R.Kufe, D.: Role of arachidonic acid metabolism in transcriptional induction of tumor necrosis factor gene expression by phorbol ester. *Mol Cell Biol*, 9, 1 (1989), 252-258.
- [181] Hartung, T., Hermening, S., Sauer, A.Wendel, A.: [The formation of a mediator of inflammation]. *Altex*, 13, 1 (1996), 17-23.
- [182] Horowitz, S.M.Gonzales, J.B.: Inflammatory response to implant particulates in a macrophage/osteoblast coculture model. *Calcif Tissue Int*, 59, 5 (1996), 392-396.
- [183] Attawia, M.A., Nicholson, J.J.Laurencin, C.T.: Coculture system to assess biocompatibility of candidate orthopaedic materials. *Clin Orthop*, 365, 365 (1999), 230-236.
- [184] Fahrmeir, L., Künstler, R., Pigeot, I.Tutz, G.: *Statistik – Der Weg zur Datenanalyse*. 5. Auflage ed, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York., Berlin, Heidelberg, New York., 2004.
- [185] Kruskal, W.H.Wallis, W.A.: Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J. Amer. Stat. Ass.*, 47, (1952), 583-621.
- [186] Büning, H.Trenkler, G.: *Nichtparametrische statistische Methoden*. 2. Auflage ed, de Gruyter Verlag, Berlin, 1994.
- [187] Scheffe, H.: A Method of Judging All Contrasts in the Analysis of Variance. *Biometrika*, 40, (1953), 87-104.
- [188] Bland, J.M.Altman, D.G.: One and two sided tests of significance. *Bmj*, 309, 6949 (1994), 248.

9 Anhang

9.1 Biologische Nachweisverfahren

9.1.1 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung (Trypanblaufärbung)

Die Zellzahlbestimmung und Vitalitätsbestimmung erfolgte mittels Zählkammer und dem Farbstoff Trypanblau (Biochrom, Berlin, Deutschland). Die Zellzahl wurde auf Zellen/mL bezogen. Die routinemäßige Bestimmung wurde für die Zählung der Suspensionszellen (U937) und der humanen Monozyten während der Isolation angewendet.

9.1.2 Vitalitätsfärbung

Zur Analyse des Verhältnisses lebender Zellen zu toten Zellen wurde die Live/Dead-Färbung (MolecularProbes, Eugene, Origin, USA) durchgeführt. Die Anfärbung vitaler Zellen erfolgte durch die enzymatische Umsetzung von Calcein AM zu grün fluoreszierendem Calcein (Excitation: 495 nm, Emission: 515 nm), während sich bei toten Zellen Ethidiumbromid in die DNA einlagern konnte, welches rot fluoreszierte (Excitation 495 nm, Emission: 635 nm).

9.1.3 Stoffwechselaktivität

Der WST-1 Test (Roche, Mannheim, Deutschland) diente zur Quantifizierung der Zellproliferation und Zellvitalität stoffwechselaktiver Zellen, unabhängig vom Adhärenzvermögen. Er basiert auf der Grundlage der Spaltung des hellgelben Tetrazoliumsalzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) zum dunkelroten Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen vitaler Zellen. Der Nachweis wurde gemäß Vorschrift durchgeführt und die Farbintensität bzw. die Optische Dichte (OD) wurde mittels Photometer Sunrise (Tecan, Crailsheim, Deutschland) nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C und 450 nm gemessen.

9.1.4 Zelltod-Analyse

Zellen können durch Nekrose oder Apoptose sterben. Beim nekrotischen Zelltod werden Stoffe aus dem Zytoplasma freigesetzt, die eine Entzündungsreaktion hervorrufen können. Im Gegensatz dazu versteht man unter der Apoptose den programmierten Zelltod der genetisch gesteuert wird und bei dem es zu keinen Entzündungsreaktionen kommt.

Zur Differenzierung zwischen Nekrose und Apoptose wurde der Annexin-V-Fluos Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) direkt auf den besiedelten TiAl6V4-Oberflächen eingesetzt. Sein Prinzip beruht auf der Grundlage, dass bei apoptotischen Zellen Phosphatidylserin (PS), das unter normalen Bedingungen auf der zytoplasmatischen Innenseite der Zellmembran lokalisiert ist, vermehrt in der nach außen gerichteten Membranseite auftritt. Das mit Fluorescein (Excitation: 488 nm, Emission: 518 nm) gekoppelte Protein Annexin-V kann sich spezifisch an das PS der äußeren Membran binden und mikroskopisch detektiert werden. Der Test wurde gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt und unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet.

9.1.5 Zellkernmarkierung

Zur Bestimmung adhärenter Zellen wurde der Nukleinsäurefarbstoff DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dilactate) (MolecularProbes, Eugene, Origin, USA) genutzt. Der blau fluoreszierende Farbstoff (Excitation: 358 nm, Emission: 461 nm) kann in die Zellmembran eindringen und die DNA anfärben. Die Färbung wurde in Anlehnung an das Herstellerprotokoll direkt auf den besiedelten TiAl6V4-Oberflächen durchgeführt. Unter dem Aufrichtfluoreszenzmikroskop wurden die Zellkerne/Mikroskopblickfeld ausgezählt. Die Werte ergaben die Anzahl adhärenter Zellen/Mikroskopblickfeld. Diese Werte wurden auf die Zellzahl/mm² bezogen oder auf die wahre Oberfläche normiert.

9.1.6 Monozytenmarker CD14 Nachweis

Zum Nachweis von humanen Monozyten können charakteristische Moleküle der Zellmembran, so genannte Oberflächenmarker (Oberflächenantigene), detektiert werden. Diese Antikörper werden oft mit einer CD-Nummer gekennzeichnet (CD = Cluster of Differentiation). Monozyten im peripheren menschlichen Blut sind in der überwiegenden Zahl stark positiv für den Oberflächenmarker CD14, der als LPS-Rezeptor (Rezeptor für bakterielles Endotoxin/Lipopolysaccharid) fungiert.

Um die Reinheit der Monozytenfraktion nach der Isolation zu prüfen, wurde die angereicherte Zellpopulation nach der MACS-Trennung CD14 gefärbt. Dazu mussten die Zellen zunächst mit 4% Paraformaldehyd fixiert werden. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 5% BSA (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) für eine Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Als Primärantikörper wurde ein CD14 Mab-1 Antikörper der Maus

(Dianova, Hamburg, Deutschland) in einer 1:200 Verdünnung für eine Stunde bei 37°C gewählt. Nach mehreren Waschschritten mit PBS wurde der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 goat anti mouse (MolecularProbes, Eugene, Origin, USA) 1:400 verdünnt für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach weiteren Waschschritten wurde mit DAPI gegengefärbt. Die CD14⁺⁺ Monozyten fluoreszierten grün, während die Zellkerne blau gegengefärbt sind.

9.1.7 May Grünwald Färbung

Zur mikroskopischen Kontrolle der einzelnen Zellisolationsschritte wurden Zellausstriche (Smears) auf Objektträgern angefertigt und mit May Grünwald Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) gefärbt.

9.1.8 Enzyme-linked immunosorbent assay

Der Enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA) stellt ein biologisches Nachweisverfahren von Proteinen auf der Grundlage der Antigen-Antikörper-Reaktion dar. Das Verfahren wurde zur quantitativen Analyse der Zytokinexpression der Zytokine Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra), Interleukin-1beta (IL-1 β) und der Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α) auf Proteinebene (extrazellulär) verwendet. Die Sandwich ELISA Kits wurden von der Firma R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) bezogen.

Der Zytokinnachweis erfolgte mit den zellfreien (abzentrifugierten) Überständen der Zellkulturversuche gemäß der Anleitung von R & D Systems. Die Messung des Farbumschlages bzw. der Extinktionen erfolgte im Photometer Sunrise (Tecan, Crailsheim, Deutschland) bei $\lambda = 450$ nm und wurde auf mitgeführte Standards bezogen. Die Zytokine sind als Absolutwerte in pg/mL angegeben oder wurden auf die Anzahl metabolisch aktiver Zellen (pg/OD_{450 nm}) bezogen.

Zur internen Qualitätsüberprüfung wurde zusätzlich ein interner Standard generiert, der routinemäßig bei den Ansätzen mit primären Monozyten mitgeführt wurde. Dazu wurden 1×10^5 Monozyten für drei Tage mit 1 μ g/mL LPS stimuliert. Der Überstand wurde zentrifugiert und bis zur ELISA Analyse bei -20°C eingefroren. Schwankungen der Messungengenauigkeit über 20% konnten lediglich für IL-1ra (24,6%) festgestellt werden.

9.1.9 Rasterelektronenmikroskopische Analysen

Das Rasterelektronenmikroskop (REM) SEM S-3500 N wurde eingesetzt, um Abbildungen nach Besiedelung der Proben zu erhalten.

Zur Begutachtung der verschieden modifizierten Oberflächen wurden nach Beendigung der Kultivierungszeit die Proben mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gespült und für 24 Stunden bei 4°C mit 3% Glutaraldehyd (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) fixiert. Nachfolgend wurden die Präparate mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe in mehreren Fraktionen (50, 70, 80, 90 und 100%) bei Raumtemperatur dehydriert. Die vollständige Entwässerung der Probe erfolgte mittels Kritisch-Punkt-Trocknung am CPD 030 (BalTec, Schalksmühle, Deutschland). Im Anschluss daran wurden die Proben mit Gold am Sputtercoater SCD 005 (BalTec, Schalksmühle, Deutschland) beschichtet. Bis zur rasterelektronenmikroskopischen Begutachtung wurden die Proben staubfrei und trocken in einem Exsikkator aufbewahrt.

9.2 Statistische Verfahren

Zur statistischen Analyse wurde das Programm SPSS 11.5 für Windows verwendet. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mit der Varianzanalyse ANOVA (**A**nalysis of **V**ariance) bestimmt [184]. Dazu galten die folgenden Annahmen, die explorativ überprüft wurden:

1. die Beobachtungen innerhalb jeder Gruppe sind unabhängig,
2. die Messwerte in den einzelnen Gruppen sind symmetrisch verteilt und
3. die Verteilung zwischen den Gruppen ist identisch.


Bei Verletzung der Voraussetzung für Normalverteilung und Homogenität der Varianzen wurde der nichtparametrische Test nach Kruskal Wallis angeschlossen [185]. Das zu prüfende Signifikanzniveau lag bei $p = 0,05$.

Im Falle signifikanter Unterschiede folgten paarweise Vergleiche mit dem T- bzw. Mann-Whitney-U-Test [186]. Dabei wurde mit Hilfe der Methode nach Scheffe [187] auf das multiple Testproblem adjustiert. Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt [188], d.h. es wurde auf Gruppenunterschied getestet.

9.3 Tabellen und Abbildungen

Zytokin	Abkürzung	Funktion
Interleukin-1alpha und Interleukin-1beta	IL-1 α und IL-1 β	<ul style="list-style-type: none"> ○ Freisetzung von Zytokinen aus mehreren Zelltypen ○ Freisetzung des Acute-Phase-Proteins aus Hepatozyten ○ Fieberauslösend
Interleukin-6	IL-6	<ul style="list-style-type: none"> ○ Induktion der Differenzierung von B-Zellen in antikörperproduzierende Plasmazellen ○ Steigerung der Phagozytose von Monozyten/Makrophagen ○ Freisetzung des Akute-Phase-Protein aus Hepatozyten
Interleukin-8	IL-8	<ul style="list-style-type: none"> ○ Chemotaktisch für neutrophile Granulozyten und T-Zellen
Interleukin-10	IL-10	<ul style="list-style-type: none"> ○ Hemmung der Zytokinproduktion durch Monozyten/Makrophagen ○ Hemmung der Produktion von Sauerstoffradikalen durch Makrophagen
Tumor-Nekrose-Faktor-alpha	TNF- α	<ul style="list-style-type: none"> ○ Steigerung der Phagozytose und Zytotoxizität bei Monozyten/Makrophagen ○ Steigerung der Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und Granulozyten ○ Nekrosen in Tumoren ○ Induktion der Bildung von Zytokinen
Interferon-alpha	IFN- α	<ul style="list-style-type: none"> ○ Proliferationshemmung von Zellen
Transformierender Wachstumsfaktor - α	TGF- α	<ul style="list-style-type: none"> ○ Wachstum und Differenzierung von Zellen
Transformierender Wachstumsfaktor - β	TGF- β	<ul style="list-style-type: none"> ○ Proliferationshemmend

Tabelle 9-1 Die Wirkungsweise der von Monozyten/Makrophagen gebildeten Zytokine (modifiziert nach [70-71]).



**Verkhaya Salda Metallurgical
Production Association**

**INSPECTION
CERTIFICATE**

EN 10204-3.1B COC 103

CERTIFICATE 8288 date 13.11.2000

Purchaser: TSAI4V ELI Condition of delivery Annealed hot rolled, machined, ground, pickled Contract / order: № 2802908T, annex 7

Quality/alloy: TSAI4V ELI Requirement: ASTM F-136 According to ASTM F-136; ISO 5832/3 Purchaser order: _____

Item №	Units	Weight, (kg)	Object		Dimensions (mm) or Drawing №	Heat №	Lot №
	226	193	BARS		dia 10 X 2000 - 3000	8-11-1907-2	822

Chemical Composition, %	Requirement: ASTM F-136		Object		Heat treatment T, °C time	Residuals, max, % (in part, %)		
	Al	V	C	Fe		O ₂	N ₂	each
5,5-5,5	3,5-4,5	<0,08	<0,25	<0,13	<0,05	<0,012		
6,4	4,1	0,005	0,17	0,112	0,011	0,0001		
BOTTOM	6,4	4,2	0,008	0,20	0,010	0,0002		

Requirement	Tensile strength		Elongation		Reduction		Hardness		Reb- transit T°C	Heat treatment T, °C time
	1	2	1	2	1	2	HRC			
ASTM F 136	>795	>860	>10	>25	%	%				
1	876	946	14,6	49,6					973	730 1 hour
2	899	943	14,6	47,0					973	air cooling

ISO 5832/3	Tensile strength		Elongation		Reduction	
	1	2	1	2	1	2
1	>780	>860	>10	>25		
2	881	937	15,0	50,8		
2	895	947	15,0	49,8		

Prepared by Lidina E.V. signature [Signature]

Name Mitrokhina O.K. stamp [Stamp]

Macrostructure testing

Microstructure testing According with to drawing A3 (ETIC-2)
para B. 3 (free of alpha-casts) ASTM F 136.

Ultrasonic Inspection

Heat-resistance testing

Certified that, unless otherwise stated above, the whole of the above-mentioned materials have been manufactured, tested and inspected in accordance with the terms of contract/order applicable thereto and conform fully to the standards/specification quoted hereon and the requirements of the Civil Aviation Authority.

Abbildung 9-1 Das Herstellerzertifikat der für die Versuche verwendeten TiAl6V4-Legierung.

3D-Kenngröße	Einheit	Geometrische Bedeutung
Ra	μm	Mittenrauwert: arithmetischer Mittelwert aller Abweichungen von der Mittellinie des Profils
Rz	μm	Rautiefe: arithmetischer Mittelwert der Einzelrautiefen fünf aufeinander folgender Einzelmeßstrecken

Tabelle 9-2 Definition der ermittelten 2D-Rauheitskenngrößen Ra und Rz mittels mechanischem Tastschnittverfahren.

3D-Kenngröße	Einheit	Geometrische Bedeutung
Sa	μm	wie Ra: arithmetischer Mittenrauwert
Sq	μm	Standardabweichung um das Oberflächenmittel
St	μm	Gesamthöhe der Oberfläche
Sp	μm	Höhe des höchsten Peaks über dem Oberflächenmittel
Sv	μm	Tiefe des tiefsten Tales unter dem Oberflächenmittel
Sz	μm	Durchschnitt der fünf höchsten Peaks und fünf tiefsten Täler
Sk	μm	Kernrautiefe
Ssk		Schiefe der Verteilungsfunktion
Sku		Kurtosis (Wölbung)
Sci		Flüssigkeitshaltesindex
Smvr	mm^3/mm^2	durchschnittliche Leeranteil
Smmr	mm^3/mm^2	durchschnittliche Materialanteil
Sds	$1/\text{mm}^2$	Anzahl der Spitzen
Sal	mm	Autokorrelationslänge bei Korrelationswert 0,2
Sdq	$\mu\text{m}/\mu\text{m}$	quadratischer Anstiegsmittelwert der Oberfläche
Ssc	$1/\mu\text{m}$	arithmetischer Krümmungsmittelwert der Gipfel
α_{clm}	%	geschlossener Leerflächenanteil
Vcl	mm^3/m^2	geschlossenes Leervolumen
cclm	μm	absolute Durchdringung
Vma	mm^3/m^2	Materialvolumen der Oberfläche
Vop	mm^3/m^2	offenes Leervolumen
Aw	mm^2	wahre Fläche
α_{w}		Oberflächenfaktor

Tabelle 9-3 Die 3D-Oberflächenkenngrößen, die mittels konfokaler Weißlichtmikroskopie ermittelt wurden.

Strukturierte Oberflächen	Rautiefen	
	Ra [μm]	Rz [μm]
poliert	0,027 \pm 0,007	0,21 \pm 0,07
geätzt	0,132 \pm 0,021	0,99 \pm 0,17
EK220	1,122 \pm 0,220	7,92 \pm 1,45
EK24	8,953 \pm 1,349	59,11 \pm 8,25
EK8	15,751 \pm 3,105	94,91 \pm 21,73

Tabelle 9-4 Die ermittelten Rauheitskenngrößen Ra und Rz der strukturierten TiAl6V4-Proben (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n = 5$).

3D-Kenngrößen [®]	Strukturierte Oberflächen				
	poliert	geätzt	EK220	EK24	EK8
Sa [μm]	0,02 \pm 0,00	0,14 \pm 0,01	1,24 \pm 0,06	9,46 \pm 1,06	12,86 \pm 1,19
Sq [μm]	0,11 \pm 0,05	0,18 \pm 0,01	1,59 \pm 0,08	12,06 \pm 1,29	16,49 \pm 1,93
St [μm]	13,52 \pm 5,82	3,36 \pm 1,15	26,16 \pm 6,67	95,06 \pm 6,55	128,66 \pm 17,80
Sk [μm]	0,14 \pm 0,02	0,44 \pm 0,02	3,88 \pm 0,17	29,24 \pm 3,99	37,72 \pm 2,25
Ssk	-35,21 \pm 20,77	-0,27 \pm 0,08	-0,24 \pm 0,06	-0,16 \pm 0,25	-0,073 \pm 0,35
Sku	2550,88 \pm 1170,5	4,21 \pm 0,23	3,95 \pm 0,30	3,35 \pm 0,39	3,44 \pm 0,46
αclm [%]	10,30 \pm 9,53	29,95 \pm 4,11	26,75 \pm 3,78	15,60 \pm 3,15	11,41 \pm 7,76
Vcl [mm^3/mm^2]	13,30 \pm 10,43	71,02 \pm 6,05	495,75 \pm 22,65	2291,43 \pm 673,7	1850,02 \pm 1171,0
Aw [mm^2]	0,62 \pm 0,00	0,62 \pm 0,00	0,75 \pm 0,01	1,01 \pm 0,03	1,01 \pm 0,02
αw	1,00 \pm 0,00	1,01 \pm 0,00	1,22 \pm 0,01	1,64 \pm 0,05	1,64 \pm 0,03

Tabelle 9-5 Die berechneten 3D-Oberflächenkenngrößen der strukturierten TiAl6V4-Proben mittels Softwareprogramm WinSam 2.6[®] (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n = 5$).

3D-Kenngrößen	Strukturierte Oberflächen				
	poliert	geätzt	EK220	EK24	EK8
Sa [μm]	0,02 $\pm 0,00$	0,08 $\pm 0,01$	1,24 $\pm 0,06$	9,39 $\pm 1,07$	12,80 $\pm 1,20$
Sv [μm]	7,35 $\pm 4,84$	0,69 $\pm 0,20$	11,46 $\pm 1,16$	42,85 $\pm 3,44$	59,01 $\pm 8,35$
Sci	0,53 $\pm 0,27$	1,54 $\pm 0,01$	1,46 $\pm 0,02$	1,49 $\pm 0,07$	1,48 $\pm 0,13$
Sds [$1/\text{mm}^2$]	8286,59 $\pm 288,50$	12.642,54 $\pm 96,51$	20.243,00 $\pm 296,23$	3890,99 $\pm 218,02$	3740,92 $\pm 263,46$
Sal [mm]	0,01 $\pm 0,00$	0,05 $\pm 0,03$	0,02 $\pm 0,01$	0,05 $\pm 0,01$	0,08 $\pm 0,02$

Tabelle 9-6 Ausgewählte 3D-Oberflächenkenngrößen mittels Mountains Map[®] zur Berechnung funktioneller Oberflächenkenngrößen (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n = 5$).

Strukturierte Oberflächen	Kontaktwinkel Φ [°]
poliert	78,22 \pm 6,88
geätzt	70,10 \pm 3,69
EK220	70,63 \pm 9,04
EK24	61,79 \pm 9,49
EK8	78,33 \pm 10,40

Tabelle 9-7 Der ermittelte Kontaktwinkel Φ aller strukturierten Oberflächen (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n = 5$). Mit zunehmender Rauheit (poliert bis EK24) nimmt der Kontaktwinkel tendenziell ab, steigt jedoch bei der rauesten Probe EK8 wieder deutlich an.

Strukturierte Oberflächen und Zellkulturkontrollen	Zellen/ mm^2
poliert	12
geätzt	41
EK220	54
EK24	82
EK8	91
LPS-Ko	12
TCC-Ko	13
TPA-Ko	11

Tabelle 9-8 Adhärenz Zellen/ mm^2 nach sechs Tagen Zellbesiedelung auf verschiedenen strukturierten Oberflächen und einschließlich der Zellkontrollen. Die Anzahl der auf den Oberflächen haftenden Zellen nimmt kontinuierlich zu ($n = 5$).

Strukturierte Oberflächen und Zellkulturkontrollen	Vitale Zellen [%]
poliert	70 ± 21,7
geätzt	68 ± 30,3
EK220	87 ± 7,7
EK24	92 ± 3,5
EK8	93 ± 3,5
LPS-Ko	62 ± 42,5
TCC-Ko	92 ± 8,6
TPA-Ko	59 ± 38,1

Tabelle 9-9

Die Anzahl vitaler Zellen mittels Live/Dead-Test nach sechs Tagen Besiedelung auf verschiedenen strukturierten Oberflächen, einschließlich der mitgeführten Zellkulturkontrollen TCC-Ko als Negativkontrolle, LPS- und TPA-Ko als Positivkontrollen: (Mittelwerte ± Standardabweichung, n = 5).

10 Lebenslauf

Sybille Warmuth

geb. 09.04.1969 in Dessau

verheiratet, 1 Kind

- 1986-1988 Ausbildung zur Medizinisch-Technischen-Laborassistentin (MTA)
an der Medizinischen Fachschule der MLU Halle/Saale
- 1988-1990 MTA am Städtischen Klinikum Dessau
- 1988-1990 Hochschulreife am Abendgymnasium Dessau
- 1991-1998 MTA an der Anatomischen Anstalt der LMU München (Prof. Dr. R.
Putz)
- 1994-2000 Biologiestudium an der LMU München
- 1999-2000 MTA am Institut für Anthropologie und Humangenetik der LMU
München (Prof. Dr. G. Grupe)
- 2000-2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Zentralinstitut für Medizin-
technik der TU München (Prof. Dr. E. Wintermantel)
- 2001-2002 Mutterschutz und Elternzeit
- 2003-2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Zentralinstitut für Medizin-
technik der TU München (Prof. Dr. E. Wintermantel)