

Aus der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes,
Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. Tim Pohlemann

Untersuchungen zur Zellkompatibilität von nano- und mikrostrukturiertem Aluminiumoxid in Zellkulturversuchen mit humanen Osteoblasten

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2014

vorgelegt von: Benedikt Schwab, geboren am 12.11.1983 in Hannover

Meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungen.....	IV
1. Zusammenfassung / Summary	S. 1
2. Einleitung	S. 5
2.1. Geschichte der Endoprothetik	S. 5
2.2. Zementierte Hüft- und zementfreie Endoprothesenfixation	S. 6
2.3. Relevanz, Epidemiologie und Sozioökonomie	S. 8
2.4. Komplikationen der Hüftendoprothetik	S. 10
2.5. Knochenzellen	S. 13
2.5.1. Übersicht	S. 13
2.5.2. Osteoblasten	S. 14
2.6. Zelluläre Grundlagen der Implantateinheilung	S. 15
2.7. Zell-Oberflächen-Interaktion	S. 17
2.8. Einfluss von Nano- und Mikrotopographie auf die zelluläre Reaktion	S. 18
2.9. Kooperationspartner	S. 20
2.10. Beschichtungen, chemische Gasphasenabscheidung und Aluminiumoxid	S. 20
2.11. Fragestellung	S. 23
3. Material und Methoden	S. 24
3.1. Material	S. 24
3.2. Methoden	S. 30
3.2.1. Herstellung der Al ₂ O ₃ -Proben	S. 30
3.2.2. Materialwissenschaftliche Charakterisierung der Al ₂ O ₃ -Proben	S. 32
3.2.2.1. Transparenz - Transmissionsanalyse	S. 32
3.2.2.2. Benetzbarkeit - Kontaktwinkelmessung	S. 33
3.2.2.3. Oberflächenchemie - Röntgen-Photoelektronenspektroskopie	S. 34
3.2.2.4. Rauheit - Profilometrie	S. 34
3.2.2.5. Morphologie - Rasterelektronenmikroskopie	S. 35
3.2.3. Zellkompatibilität	S. 36
3.2.3.1. Humane Osteoblasten	S. 36
3.2.3.2. Methoden der Zellkulturarbeiten	S. 36
3.2.3.3. Masterzellbank	S. 38
3.2.3.4. Wachstumsverhalten - Vitalfärbung	S. 40

3.2.3.5. Zellviabilität - WST-Test	S. 44
3.2.3.6. Zellmorphologie - Rasterelektronenmikroskopie	S. 46
3.2.3.7. Genexpressionsanalyse zur Bestimmung des Einflusses der Topographie auf die osteogene Differenzierung	S. 49
3.2.3.7.1. RNA-Isolierung	S. 50
3.2.3.7.2. Bestimmung von Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren	S. 51
3.2.3.7.3. Reverse Transkription	S. 52
3.2.3.7.4. Quantitative Real Time-PCR	S. 53
3.2.3.7.5. Auswertung der Genexpression	S. 56
4. Ergebnisse	S. 57
4.1. Materialwissenschaftliche Charakterisierung	S. 57
4.1.1. Transparenz	S. 57
4.1.2. Benetzbarkeit	S. 57
4.1.3. Oberflächenchemie	S. 58
4.1.4. Rauheit	S. 60
4.1.5. Morphologie	S. 60
4.2. Zellkompatibilität	S. 66
4.2.1. Wachstumsverhalten	S. 66
4.2.2. Zellviabilität	S. 69
4.2.2.1. WST-Vorversuch	S. 69
4.2.2.2. WST-Test	S. 70
4.2.3. Zellmorphologie	S. 71
4.2.4. Genexpression	S. 80
5. Diskussion	S. 83
5.1. Einfluss der physikalischen und chemischen Eigenschaften von Oberflächen auf die zelluläre Reaktion	S. 83
5.1.1. Oberflächenchemie der Al ₂ O ₃ -Proben	S. 83
5.1.2. Reproduzierbarkeit der Al ₂ O ₃ -Proben	S. 84
5.1.3. Wachstumsverhalten der HOB	S. 85
5.1.2. Einfluss der Benetzbarkeit	S. 86
5.1.3. Einfluss der Rauheit	S. 87
5.2. Morphologische Untersuchung	S. 90
5.3. Viabilität	S. 92
5.4. Differenzierung	S. 93

5.5. Fazit	S. 96
5.5.1. Resultate	S. 96
5.5.2. Perspektive	S. 97
6. Literaturverzeichnis	S. 99
7. Publikationen	S. 115
8. Danksagung	S. 116
9. Lebenslauf	S. 117

Abkürzungen:

AA: *Englisch: Ascorbic Acid*; Ascorbinsäure

Al₂O₃: Aluminiumoxid

Al₂O₃-LV: Al₂O₃-Laservariation

Al₂O₃-DV: Al₂O₃-Dichtevariation

ALP: Alkalische Phosphatase

ARI: AO Research Institute

Bis(*t*BuOAlH₂)₂: Bis(tert-butoxyaluminiumdihydrid)

BSP2: Bone Sialoprotein 2

cDNA: *Englisch: Complementary Desoxyribonucleic Acid*;
komplementäre Desoxyribonukleinsäure

CMFDA: 5-Chloromethylfluoresceindiacetat

COL1: Collagen 1

CVD: *Englisch: Chemical Vapor Deposition*; chemische Gasphasenabscheidung

DAPI: 4',6-Diamidino-2-Phenylindol

DEPC: Diethyldicarbonat

dH₂O: Destilliertes Wasser

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimethylsulfoxid

DNA: *Englisch: Deoxyribonucleic Acid*; Desoxyribonukleinsäure

dNTP: Desoxyribonukleosidtriphosphat

dUTP: Desoxyuridintriphosphat

E-Modul: Elastizitätsmodul

EZM: Extrazelluläre Matrix

FCS: *Englisch: Fetal Calf Serum*; fötales Kälberserum

FIB: Focused-Ion-Beam-Mikroskopie

HD: *Englisch: High Density*; hohe Dichte

HOB: Humane Osteoblasten

INM: Leibniz-Institut für Neue Materialien, Saarbrücken

LD: *Englisch: Low Density*; niedrige Dichte

MCB: *Englisch: Master Cell Bank*; Masterzellbank

MD: *Englisch: Medium Density*; mittlere Dichte

mRNA: *Englisch: MessengerRNA*; Boten-RNA

Nd:YAG-Laser: Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser

NW: Nanowires

OC: Osteocalcin

OD: Optische Dichte

OPN: Osteopontin

P: Passage

PBS: *Englisch: Phosphate Buffered Saline*; phosphatgepufferte Salzlösung

P/S: Penicillin / Streptomycin

PVD: *Englisch: Physical Vapor Deposition*; physikalische Gasphasenabscheidung

q-PCR: *Englisch: Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*;
Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

R_a: Arithmetische, durchschnittliche Rauheit

REM: Rasterelektronenmikroskop

RNA: *Englisch: Ribonucleic Acid*; Ribonukleinsäure

RT: Raumtemperatur

RUNX2: Runt-Related Transcription Factor 2

SP7: Sp7 Transcription Factor (Osterix)

TEP: Totalendoprothese

UHD: *Englisch: Ultra High Density*; sehr hohe Dichte

WST: *Englisch: Water Soluble Tetrazolium*; wasserlösliches Tetrazolium

XPS: *Englisch: X-Ray Photoelectron Spectroscopy*;
Röntgenphotoelektronenspektroskopie

1. Zusammenfassung

Dauerimplantate zur Wiederherstellung der Gelenkfunktion bekommen vor dem Hintergrund der aktuellen demographischen Entwicklung eine immer größere Bedeutung. Aufgrund hoher Inzidenz und großer Kosten nimmt der künstliche Hüftersatz eine besondere Stellung ein. Trotz intensiver Forschung sind die Prothesenstandzeiten begrenzt und die Rate von Wechseloperationen, verursacht durch aseptische Prothesenlockerungen, ist nach wie vor hoch.

Zum Erhalt einer erfolgreichen Sekundärstabilität ist eine stabile Integration des Implantats durch unmittelbaren Kontakt zwischen Implantat und Knochen nötig. Nano- und Mikrotopographie von Implantatoberflächen nehmen entscheidenden Einfluss auf zelluläre Reaktionen wie Adhäsion, Proliferation und Differenzierung.

In der vorliegenden Studie wurden Auswirkungen nano- und mikrostrukturierten Aluminiumoxids auf humane Osteoblasten untersucht. Aluminiumoxid wurde mittels chemischer Gasphasenabscheidung in Form sogenannter „Nanowires“ in unterschiedlichen Dichtegraden auf Glas abgeschieden und zum Teil durch Laserbehandlung nachfolgend modifiziert. Bei unterschiedlichen Oberflächentopographien blieb die chemische Zusammensetzung der Oberflächen identisch.

So konnte der Einfluss der Topographie unabhängig von dem der Oberflächenchemie auf Osteoblasten im standardisierten Zellkulturversuch untersucht werden.

Untersuchungen zu Zelldichte und Zellfläche humaner Osteoblasten nach 6 h und 48 h nach Aussaat mit Hilfe einer Fluoreszenzfärbung und semiautomatischer Auswertung deuten auf eine gute Zellkompatibilität hin. Zu beiden Untersuchungszeitpunkten kam es zu keiner signifikanten Abnahme der Zelldichte durch den Einsatz der Aluminiumoxidbeschichtungen im Vergleich zur unbeschichteten Glasprobe, aber es zeigten sich Unterschiede in der mittleren Zellfläche. Während nach 6 h die Zellfläche auf zwei der 14 Aluminiumoxidbeschichtungen mit jeweils ca. $700 \mu\text{m}^2$ signifikant kleiner war als auf der Glasprobe (ca. $1500 \mu\text{m}^2$), konnten nach 48 h keine signifikanten Unterschiede in der Zellfläche zwischen den Aluminiumbeschichtungen und der Glasprobe mehr beobachtet werden.

Die Viabilitätsanalyse, die mit einem Water-Soluble-Tetrazolium-Test durchgeführt wurde, ergab, dass die Stoffwechselaktivität der Zellen durch bestimmte Oberflächentopographien signifikant im Vergleich zur Glasprobe reduziert war (bis zu ca. 3-fach niedrigere Stoffwechselaktivität).

Mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops wurde die Zell-Oberflächen-Interaktion der Osteoblasten auf Einzelzellniveau detailliert analysiert. Hierzu wurden verschiedene Parameter definiert. Große Bedeutung haben die Adhärenz, die in diesem Zusammenhang den unmittelbaren Kontakt zwischen Zelle und Oberfläche beschreibt, und die Zellintegrität, die aus der Abwesenheit von Zellschäden durch die Probenpräparation resultiert. Es wurden insgesamt eine reduzierte Adhärenz sowie eine reduzierte Zellintegrität im Vergleich zur Glaskontrolle festgestellt.

Der Differenzierungsgrad der Osteoblasten wurde auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Real Time-PCR untersucht. Dabei konnte eine verstärkte osteogene Differenzierung anhand einer Hochregulation der Alkalischen Phosphatase (max. ca. 10-facher Anstieg), des Bone Sialoproteins 2 (max. ca. 22-facher Anstieg) und von Osteopontin (max. ca. 311-facher Anstieg) zu verschiedenen Zeitpunkten gegenüber Glas festgestellt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten insgesamt auf eine gute Zellkompatibilität und die Förderung osteogener Differenzierungsprozesse von nano- und mikrostrukturierten Aluminiumoxidbeschichtungen hin. Insbesondere nicht lasermodifizierte Beschichtungen, für die eine exakte Reproduzierbarkeit festgestellt wurde, sind ein vielversprechender Ansatz in der Entwicklung neuer, osseointegrativer Biomaterialien und können zusammen mit standardisierten Zellkulturversuchen als ideales Modell für systematische Studien der Zell-Oberflächen-Interaktion in der Grundlagenforschung genutzt werden.

Summary

Permanent implants to recover function of joints are becoming increasingly important due to the demographic change process. Because of a high incidence and high costs the position of hip replacement is outstanding. Despite intensive research in this field the lifetime of such prostheses is limited and the rate of surgical revisions due to aseptic loosening is still high.

A stable osseointegration of the implant by direct bone to implant contact is the key to obtain a successful secondary stability. Both, nano- and microtopography of the implants' surfaces play a crucial role in the influence on cellular reactions like adhesion, proliferation and differentiation.

In this study effects of nano- and microstructured alumina on human osteoblasts were investigated. Alumina was deposited as "nanowires" by Chemical Vapor Deposition in different distribution densities on glass and partly modified by additional laser treatment. This process resulted in different defined topographies of exactly the same surface chemistry as a basis for subsequent cell culture experiments with primary human osteoblasts.

Analyses of cell density and cell area 6 h and 48 h post seeding via fluorescence staining and semiautomatic evaluation revealed good cell compatibility. At both time points no significant decrease in cell density on aluminum oxide coatings compared to non coated glass could be detected. The cell area was significantly reduced at 6 h post seeding on 2 of 14 aluminum oxide coatings (in each case approx. $700 \mu\text{m}^2$) compared to glass (approx. $1500 \mu\text{m}^2$). 48 h post seeding no significant differences in cell areas could be detected.

A Water-Soluble-Tetrazolium-test was used to evaluate overall cell viability. The viability of the cells was reduced by specific topographies compared to glass (max. approx. 3-fold lower metabolic activity).

The osteoblast surface interaction was analyzed by scanning electron microscopy revealing a reduced adherence and cell integrity of the cells compared to the results obtained on glass. Adherence in this context means the direct contact between cell and surface. Cell integrity defines the absence of cellular damage caused by sample preparation.

A gene expression analysis by means of quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction was carried out. Induction of osteogenic differentiation could be shown by up-regulation of alkaline phosphatase (max. approx. 10-fold increase), bone sialoprotein 2 (approx. 22-fold increase) and osteopontin (max. approx. 311-fold increase) at certain time points compared to glass.

In summary, our results indicate a good cell compatibility and osteogenic potential of nano- and microstructured alumina. Especially non laser modified alumina coatings with a good reproducibility represent a promising approach in developing new osseointegrative biomaterials. In combination with standardized cell culture

experiments such alumina coatings are an ideal model to study cell surface interactions systematically.

2. Einleitung

2.1. Geschichte der Endoprothetik

Implantate sind Materialien, die zur Erfüllung verschiedener Ersatzfunktionen wie der Übertragung von Kräften für einen bestimmten Zeitraum oder auf Lebenszeit in den menschlichen Körper eingebracht werden (Pschyrembel 2004). Die wichtigsten Anforderungen an ein Implantat sind verlässliche Funktion bei geringen Nebenwirkungen (Hirner und Weise 2008).

Implantate werden in weiten Feldern der Medizin angewendet. In der Unfallchirurgie und Orthopädie stellen Dauerimplantate zur Wiederherstellung der Gelenkfunktion einen bedeutenden Anteil. Hervorzuheben ist die Stellung des künstlichen Hüftersatzes als herausragendes Beispiel eines lasttragenden orthopädischen Implantates. Lasttragende Implantate müssen hohe statische oder dynamisch aufgebrachte Kräfte übertragen und stehen meist unter zyklischer Belastung (Widmer et al. 2009).

Während Exoprothesen schon seit der Antike breite Anwendung fanden (Wetz und Gisbertz 2000), ist die Endoprothetik eine sehr junge Wissenschaft (Gradinger et al. 2006, a). Der Berliner Chirurg Themistocles Gluck (1890) implantierte 1890 Patienten, deren Kniegelenke durch Tuberkulose zerstört wurden, einen künstlichen Ersatz aus Elfenbein. Smith-Petersen (1939), Judet und Judet (1950) und Moore und Bohlmann (1943) führten Gelenkprothesen aus Materialien wie Vitallium, Plexiglas und Metall ein.

Das größte Problem dieser Endoprothesen war die mangelhafte Verankerung der Prothesenschäfte im knöchernen Lager. Durch unterschiedliche Elastizitätsmoduln (E-Modul) von Metallschaft und Knochen und der daraus resultierenden ungenügenden Kraftübertragung, kam es zu ungünstigen Umbauvorgängen im Knochen und zur Lockerung der Implantate (Gradinger et al. 2006, b). Das E-Modul ist eine materialspezifische Konstante und Maß für die Steifigkeit eines Werkstoffs. Je größer das E-Modul ist, desto geringer ist die Dehnung bei einer gegebenen Spannung (Jacob et al. 2011).

Den entscheidenden Schritt in der Endoprothetik machte zu Beginn der sechziger Jahre der britische Chirurg Charnley, indem er den Hüftkopfersatz aus Metall um eine künstliche Hüftpfanne aus Kunststoff ergänzte und damit günstige Gleitpartner

schuf (Low-friction-Arthroplastie) (Charnley 1960, Charnley 1961). Mindestens ebenso entscheidend für den Erfolg dieser Operation war allerdings die Verankerung der Totalendoprothese (TEP) mit Knochenzement aus Polymethylmetacrylat im Knochenlager.

Mit der Einführung des Knochenzements und der daraus resultierenden Stabilität unmittelbar nach Implantation setzte sich die Hüftendoprothetik weltweit als Standardverfahren durch (Halder et al. 2012). In Langzeitbeobachtungen fiel allerdings eine relativ hohe Rate aseptischer Lockerungen auf, die nach 5 bis 10 Jahren bis zu 19 % betrugen (Halder et al. 2012). Für das damalige Versagen der zementierten Prothesen wurde die mangelhafte Verbundfestigkeit der Knochen-Zement-Grenze verantwortlich gemacht (Gradinger et al. 2006, a). Charnley (1979) selbst empfahl vor diesem Hintergrund, die Indikation der Hüft-Endoprothetik auf ältere Patienten zu beschränken. So war schon damals insbesondere die Versorgung jüngerer Patienten mit defektem Hüftgelenk sehr problematisch.

Viele Arbeitsgruppen sahen in der zementfreien Endoprothesenfixation die einzige Möglichkeit, diese Aufgabe zu lösen. Allerdings blieb anfänglich die ossäre Integration der Implantate aus (Halder et al. 2012). Zur Lösung des Problems wurden seit den siebziger Jahren Modifikationen an den Implantatoberflächen vorgenommen, die darauf abzielten, diese zu vergrößern, eine biomechanische Verbindung zwischen Endoprothese und wachsendem Knochen zu ermöglichen, und die Kraftübertragung zu verbessern.

2.2. Zementierte Hüft- und zementfreie Endoprothesenfixation

Heute werden zementierte Hüftendoprothesen, zementfreie Systeme sowie Kombinationen für Pfanne und Schaft eingesetzt.

Für alle Formen gilt, dass die Stabilität im Knochen über den Erfolg einer Implantation entscheidet. Es wird dabei zwischen Primär- und Sekundärstabilität unterschieden. Die Primärstabilität beschreibt die stabile Verankerung des Implantats unmittelbar nach dem chirurgischen Eingriff; dagegen versteht man unter Sekundärstabilität die langfristige Stabilität, nachdem es zur Knochenneubildung und zu Remodelling-Prozessen in der Grenzschicht zwischen Implantat und Implantatlager (Interface) gekommen ist (Meredith 1998).

Zementierte Endoprothesen bilden zusammen mit dem Knochenzement als eine Einheit das Implantat und erlauben eine frühe Belastung nach der Implantation.

Zementfreie Systeme dagegen stellen durch ihre Bauteile, deren Form, Oberflächen und Werkstoffe ein Konzept dar, das eine primäre und eine sekundäre Fixation ermöglichen muss. Die knöcherne Integration und Belastung des Implantats erfolgt daher in zwei Phasen (Willi et al. 2012). In der ersten Phase soll mit einer primär stabilen Fixation eine Ausschaltung von Relativbewegungen im Interface erreicht werden. Diese stabile Primärverankerung ist die wesentliche Bedingung für ein knöchernes Einwachsen zementfreier Implantate. Die sekundäre Integration soll bei zementfreien Implantaten möglichst knöchern erfolgen und damit eine dauerhafte, stabile Verankerung garantieren (Gradinger et al. 2006, c).

Als potentielle Vorteile der zementfreien Verankerung werden die physiologischere biomechanische Kraftübertragung, kürzere Operationszeiten, geringerer Knochenverlust und günstigere Revisionsbedingungen diskutiert (Morscher 1987).

Die Fixation ohne Verwendung von Knochenzement wird favorisiert, wenn die Erhaltung bzw. Neogenese von Knochen gegenüber einer sofortigen Vollbelastbarkeit des Implantates im Vordergrund steht (Gradinger et al. 2006, c). Des Weiteren richtet sich die Wahl des Verfahrens nach dem biologischen Alter. Biologisch junge Patienten, die keine Osteoporose haben, keine Erkrankung aus dem rheumatoiden Formenkreis und keine Anamnese einer Langzeitkortisoneinnahme aufweisen, können mit zementfreien Systemen behandelt werden (Weigel und Nehrlich 2011). Indikationen zur Implantation zementfreier Hüftendoprothesen gibt es bei allen Formen der Gelenkzerstörung und gleichzeitig erhaltener Knochenqualität des Implantatlagers (Gradinger und Gollwitzer 2006):

- Therapieresistente fortgeschrittene primäre oder sekundäre Koxarthrose im jungen und mittleren Lebensalter bei entsprechendem Leidensdruck
- Koxarthrose bei älteren, rüstigen Patienten mit guter Knochenqualität
- Hüftkopfnekrose
- Schenkelhalsfraktur beim jungen Patienten bei starker Frakturdislokation oder nach Scheitern der osteosynthetischen Versorgung
- Operable proximale Femurmetastasen
- Endoprothesenwechsel bei erhaltenem Knochenlager

Obwohl die Indikationsstellung zum Einsatz von Knochenzement im Einzelfall entschieden wird (Weigel und Nerlich 2011), sollten ältere Patienten allgemein mit zementierbaren Systemen versorgt werden. Neben der Tatsache, dass ältere Patienten bei einer Standzeit der Implantate von über 90 % nach 10 Jahren (Malchau et al. 2002) einen Implantatwechsel mit geringerer Wahrscheinlichkeit erleben werden, sind die Grundsätze der Therapie des alten Menschen hier von großer Bedeutung. Da diese Patienten durch eine längere Immobilisation vital gefährdet werden (Pneumonie, Thromboembolie), sind Verfahren zu bevorzugen, die eine rasche Mobilisation mit Vollbelastung ermöglichen. So hat sich in der Geriatrie der zementierte alloplastische Hüftkopfersatz für hüftnahe Femurfrakturen als Therapie bewährt (Berchtold 2008).

Während vor allem in skandinavischen Ländern weiterhin überwiegend zementierte Prothesen implantiert werden, sind in weiten Teilen Mitteleuropas und den USA größtenteils zementfreie Implantate in Verwendung (Kienapfel et al. 2012).

Weil Langzeitergebnisse zementfreier Schäfte mit einem mittleren Nachuntersuchungszeitraum von 15 Jahren und mehr rar sind (Merle et al. 2010), kann hinsichtlich der Standzeiten der Implantate zum jetzigen Zeitpunkt kein Vergleich gezogen werden. Auf der einen Seite liefert die zementierte Fixation von Hüftendoprothesen in einigen Studien nach wie vor überlegene Ergebnisse. Andererseits besteht eine Korrelation zwischen den Standzeiten zementfreier Implantate und dem Jahr der Publikation (Morshed et al. 2007). Anscheinend führen permanente Weiterentwicklungen zu einer Verbesserung der Standzeiten.

Aufgrund methodischer Schwächen einzelner Untersuchungen können bisher jedoch noch keine Subgruppen definiert werden, bei denen durch zementierte oder zementfreie Implantation einer Hüftendoprothese ein relativer Vorteil hinsichtlich der Langzeitergebnisse erreicht werden könnte (Kienapfel et al. 2012).

2.3. Relevanz, Epidemiologie und Sozioökonomie

Aufgrund verbesserter Prothesenstandzeiten (Malchau et al. 2002), erhöhter Patientenzufriedenheit (Fender et al. 1999, Nilsson et al. 2003) und steigender Kosteneffektivität (Rorabeck et al. 1994, Katz 2001) hat die Gesamtzahl hüftendoprothetischer Operationen massiv zugenommen. Der Einsatz einer Hüftendoprothese gehört zu den 20 häufigsten Operationen an deutschen Kliniken

und nimmt unter den stationären Behandlungsmaßnahmen die Spitzenposition hinsichtlich der Gesamtvergütung im aktuellen DRG-System ein (Merx et al. 2007). Im Jahr 2001 wurden in Deutschland insgesamt ca. 171300 Endoprothesen am Hüftgelenk vorgenommen; das entspricht einer Gesamt-TEP-Rate von 210 auf 100000 Einwohner. Die hohen Operationszahlen werden sich zukünftig noch steigern. So war schon im Zeitraum zwischen 1998 und 2001 in Deutschland eine Zunahme der Eingriffshäufigkeit um 10 % zu verzeichnen (Merx et al. 2007). Da die TEP-Rate mit dem Alter ansteigt, ist insbesondere die Dynamik der demografischen Altersverteilung für die Zunahme verantwortlich. So wird in Deutschland der Anteil der über 80-jährigen von ca. 4 Millionen im Jahr 2008 auf ca. 10 Millionen im Jahr 2050 ansteigen (Statistisches Bundesamt 2009). Amerikanische Analysen gehen von einer Zunahme um 174 % bei der primären Hüftendoprothetik aus: von 208600 (2005) auf 572100 (2030). Revisionen werden um 137 % von 40800 (2005) voraussichtlich auf 96700 (2030) ansteigen (Kurtz et al. 2007).

In ca. 75 % der Fälle ist die ätiologisch multifaktorielle Koxarthrose ursächlich für den TEP-Einsatz (Malchau et al. 2002). In der Therapie rheumatisch entzündlicher Erkrankungen hat der Hüftersatz bei entsprechender Indikation nach wie vor hohen Stellenwert; wegen verbesserter antirheumatischer Therapiekonzepte ist allerdings die Gesamthäufigkeit operativer Eingriffe bei Rheumatikern zurückgegangen. Dagegen nimmt die Hüftendoprothetik als Therapie der hüftnahen Frakturen vor allem bei älteren Patienten zu. Andere Indikationen für einen Hüftgelenkersatz sind die aseptische Femurkopfnekrose, Osteolysen aufgrund pathologischer Knochenveränderungen und gelenknahe Deformitäten. Wechseleingriffe sind häufig - auf sieben Neuimplantate kommt eine Revision (Merx et al. 2007).

Im Zusammenhang mit den hohen und weiter steigenden Fallzahlen stellt die Endoprothetik der Hüfte einen beträchtlichen finanziellen Faktor für das deutsche Gesundheitssystem dar. Im Durchschnitt fielen 2004 beim Einsatz einer Hüftendoprothese Gesamtkosten von 7389 € an deutschen Kliniken an. Bei Wechseloperationen steigen die Gesamtkosten um 25 % (Effenberger et al. 2008).

2.4. Komplikationen der Hüftendoprothetik

Trotz des Erfolges der Endoprothetik am Hüftgelenk kommt es im Zusammenhang mit dem Hüftersatz zu Komplikationen. Bei bis zu 28 % der Fälle treten nach endoprothetischem Hüftgelenkersatz teils persistierende Schmerzen auf (Kälicke et al. 2005, Nikolajsen et al. 2006). Diese Beschwerden haben unterschiedliche Ursachen, die schwierig zu diagnostizieren und zu behandeln sind (Weigel und Nerlich 2011). Eine Untergliederung kann in intraoperative und postoperative Komplikationen sowie Spätfolgen vorgenommen werden.

Intraoperativ können Positionierungsfehler von Komponenten einer Hüft-TEP auftreten. Das kann unmittelbar zu Gelenkinstabilitäten bis hin zu Luxationen, Bewegungseinschränkungen und Beinehlstellungen sowie Beinlängendifferenzen führen. Durch das Ausbleiben einer primären Implantatstabilität bei einer zementfrei verankerten Prothese zum Beispiel auf Grund schlechter Knochenqualität wird auch die sekundäre, stabile Osseointegration (vgl. unten) des Implantats und damit die funktionelle Einheilung ausbleiben. Meist im Zusammenhang mit einer inadäquaten Implantationstechnik zementfreier Prothesen kann es zu knöchernen Verletzungen wie der periazetabulären Fraktur und zu Schaftsprengungen kommen (Förster et al. 2012). Neben implantatassoziierten Komplikation können intraoperative Verletzungen größerer Gefäße und Blutungen auftreten. Sie sind eher selten, können aber, wenn sie unbemerkt bleiben, lebensbedrohliche Folgen haben (Nachbur et al. 1989). Auch Nervenläsionen sowie Muskel- und Sehnenverletzungen und Gerinnungsstörungen gehören zu den Operationsrisiken. Strategien zur Vermeidung der intraoperativen Komplikationen reichen von umfassenden präoperativen Planungen und intraoperativen Kontrollen an Hand periazetabulärer anatomischer Landmarken (Sotereanos et al. 2006) bis hin zum intraoperativen Systemwechsel zur Zementverankerung.

Postoperativ können allgemeine Operationsrisiken wie Nachblutungen, Gerinnungs- und Wundheilungsstörungen zu Komplikationen führen. Operationen am Hüftgelenk gehen mit einem hohen Thrombose- und Embolie-Risiko einher (Förster et al. 2012). Durch den leitliniengetreuen Einsatz von niedermolekularen Heparinen kann die Inzidenz deutlich gesenkt werden (Lassen et al. 2002). Auch die Fettembolie ist eine typische Komplikation. Durch Manipulation am Knochenmark kommt es zu Fettausschwemmungen über die Blutbahn ins Lungenstromgebiet und damit zu

Obstruktionen der Lungenarterien und zu einer akuten Rechtsherzbelastung. Die Therapie richtet sich nach dem Grad der Rechtsherzbelastung. Durch operationstechnische Maßnahmen (z.B. Einsatz einer Jet-Lavage) kann das Risiko vermindert werden (Aebli et al. 2005). Postoperative Instabilitäten von Prothesenkomponenten sind auf eine mangelhafte Primärstabilität zurückzuführen (Patel et al. 2007). Die Behandlung orientiert sich an der Ausprägung der Instabilität und besteht im Allgemeinen in einem Implantatwechsel (Daly und Morrey 1992). Periprothetische Frakturen treten intra- und postoperativ auf, wobei die meisten in der postoperativen Phase entstehen (Berry 2002). Eine intraoperative Fehlpositionierung des Implantats oder intraoperativ entstandene Fissuren können bei Belastung zu Frakturen führen. Zu ihrer Versorgung ist je nach Fraktursituation eine Osteosynthese mit oder ohne Implantatwechsel vorzunehmen (Förster et al. 2012).

Die periprothetische Infektion ist eine der schwerwiegendsten Komplikationen in der Endoprothetik und kann zur Versteifung oder sogar zum Verlust der betroffenen Extremität führen. Ein möglicher septischer Schock ist immer lebensbedrohlich (Perka et al. 2012). Man unterscheidet zwischen Frühinfekt (< 3 Monate postoperativ), dem verzögerten Infekt (> 3 Monate bis < 24 Monate postoperativ) und dem Spätinfekt (> 24 Monate postoperativ). Früh- und verzögerter Infekt sind meist durch das postoperative Hämatom oder durch nicht konsequent behandelte, sezernierende Wunden bedingt, wohingegen der Spätinfekt in der Regel durch hämatogene Streuung ausgelöst wird (Zimmerli et al. 2004). Im Unterschied zur Pathogenese anderer Infektionen im menschlichen Körper ist bei der periprothetischen Infektion ein von Bakterien besiedelter Fremdkörper der Entzündungsherd. Vor allem Staphylokokken sind in der Lage einen „Biofilm“ zu bilden (Gristina und Costerton 1984, Gristina 1987). Neben einer deutlich reduzierten Generationszeit haben die Bakterien in diesem Zustand eine 1000-fach höhere Resistenz gegen wachstumsabhängige Antibiotika (Stewart 2001, Donlan 2002). Bei frühzeitig einsetzender, adäquater Therapie (gezielte Antibiose, Revision mit Debridement) ist beim Frühinfekt oft ein Erhalt des Implantates möglich. Beim verzögerten Infekt und beim Spätinfekt muss davon ausgegangen werden, dass eine Besiedlung der Prothesenoberfläche mit Ausbildung eines „Biofilms“ stattgefunden hat, so dass ein Implantatwechsel erforderlich wird (Friesecke und Wodtke 2008).

Weitere Spätfolgen nach dem Einsatz einer Hüftendoprothese sind heterotope Ossifikationen. Sie sind als Knochenneubildungen innerhalb des Weichteilgewebes definiert und treten je nach Risikoprofil des Patienten und Zugangswahl in einer Häufigkeit von 5 - 90 % auf. Der Anteil klinisch symptomatischer Fälle liegt unter 10 %. Präventive Maßnahmen (präoperative Bestrahlung, postoperative Applikation nichtsteroidaler Antirheumatika) sind entscheidend. Vorhandene Ossifikationen können eine Revision und ihre Entfernung notwendig machen (Schauwecker et al. 2011). Außerdem können auch im weiteren Verlauf Gelenkinstabilitäten beispielsweise aufgrund einer intraoperativ geschädigten muskulären Gelenkführung, Impingement-Syndrome, Stressfrakturen, Bursitiden und Trochanter-major-assoziierte Probleme wie die Coxa Saltans auftreten (Hendel et al. 2002, Perka et al. 2012). Die Iliopsoastendinitis (Kälicke et al. 2005) und die Implantat-assoziierte Allergie (Perka et al. 2012) sind eher seltene Komplikationen. Persistierende Beschwerden trotz korrekt implantierter Endoprothese sind auch zum Teil in einer Fehlindikation bei primär hüftgelenksunabhängigen Schmerzen begründet (Perka et al. 2012).

Viele der beschriebenen Komplikationen münden möglicherweise in einer Revision mit Endoprothesenwechsel. Insgesamt wird in der Literatur von einer Wechselrate von 0,5 - 5,0 % der Prothesen pro Jahr ausgegangen (Perka et al. 2012). Während in den ersten sechs Monaten nach Operation Revisionen hauptsächlich auf Grund rezidivierender Luxationen, periprothetischer Frakturen und tiefer Wundinfektionen vorgenommen werden, ist danach die aseptische Lockerung Hauptgrund für eine Revision (Johnson et al. 2006). Sie tritt im Regelfall erst nach dem fünften Implantationsjahr auf (Bordini et al. 2007) und ist in über 75 % der Fälle Grund eines Wechsels (Malchau et al. 2002).

Die aseptische Prothesenlockerung durch ausbleibende Sekundärstabilität hat ihre Ursache einerseits in einer für die Osseointegration (vgl. unten) ungeeigneten Prothesenoberfläche, andererseits in den unterschiedlichen E-Moduln von Prothese und Knochen (Halder et al. 2012). Weitere Faktoren, die das Auftreten einer aseptischen Prothesenlockerung beeinflussen, sind die biologischen Reaktionen auf anfallende Abriebprodukte und die postoperativen Belastungsverhältnisse im Knochenlager. Die Implantation einer Endoprothese verändert die mechanische Beanspruchungssituation des periprothetischen Knochens, da der Lastfluss über das Implantat zur Entlastung des Knochens („stress shielding“) führt. Aber es können

auch lokale Spannungskonzentrationen zu einer erhöhten Belastung des Knochenlagers führen. Zu große Abweichungen vom natürlichen Belastungsmuster - sowohl eine Mehr- als auch eine durch „stress shielding“ bedingte Minderbeanspruchung führen zu einem resorptiven Knochenumbau mit dem Risiko einer konsekutiven aseptischen Implantatlockerung (Gradinger et al. 2006, c). Patientenbezogene Risikofaktoren für das Auftreten der aseptischen Lockerung sind männliches Geschlecht, Übergewicht, erhöhtes Aktivitätsniveau (Flugsrud et al. 2007) und verminderte Knochenqualität (Nixon et al. 2007). Auch verschiedene Grunderkrankungen sind mit einem erhöhten Risiko für eine Implantatlockerung verbunden (Bordini et al. 2007). Ebenso spielt das Patientenalter eine wichtige Rolle. Während bei älteren Patienten Standzeiten der Implantate von über 90 % nach 10 Jahren die Regel sind, sinkt die Standzeit der Implantate bei Patienten unter 55 Jahren auf unter 80 % nach 10 Jahren (Malchau et al. 2002). Vor allem vor dem Hintergrund, dass die Indikationsstellung zum Gelenkersatz zunehmend auf jüngere Patienten ausgedehnt wird (Ziegler et al. 2007), ist dieser Umstand bedeutend.

2.5. Knochenzellen

2.5.1. Übersicht

Neben Osteoblasten werden Osteozyten, „Lining Cells“ und Osteoklasten zu den Knochenzellen gezählt.

Osteozyten differenzieren sich im Rahmen der Knochenbildung aus Osteoblasten. Sie sind lakunär eingebettet in die Knochengrundsubstanz, haben eine ovale Form und zahlreiche Fortsätze an ihrer Oberfläche. Über die Fortsätze treten sie mit anderen Osteozyten in Kontakt. Die große Kontaktfläche zum mineralisierten Gewebe ermöglicht einen Austausch von Kalzium zwischen sich aufbauendem Knochen und Blut. Möglicherweise registrieren sie über mechanische Belastungen Formveränderungen im Knochen und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Knochenumbaus (Shah-Derler et al. 2009).

„Lining Cells“ gehen von Osteoblasten-Vorläufern aus. Sie liegen Knochenoberflächen, bei denen keine Umbauvorgänge ablaufen, an (Shah-Derler et al. 2009) und können zur Proliferation und zur Differenzierung zu osteogenen Zellen

angeregt werden. Wahrscheinlich spielen „Lining Cells“ auch bei der Initiierung von Knochenumbauvorgängen eine wichtige Rolle (Miller et al. 1989).

Osteoklasten resorbieren Knochen. Sie sind große, meist vielkernige, bewegliche Zellen an der Knochenoberfläche, die sich aus Monocyten differenziert haben. Die Knochenresorption ist, da Auf- und Abbau (Knochen-Remodelling) unter physiologischen Bedingungen immer gleichzeitig ablaufen, wichtig für die Knochen-Homöostase und bei der Anpassung an veränderte mechanische Belastungen (Shah-Derler et al. 2009).

2.5.2. Osteoblasten

Osteoblasten besitzen als knochenbildende Zellen die Fähigkeit zur Synthese und Mineralisation von Osteoid und Knochenmatrix.

Es gibt verschiedene Marker, die für reife Osteoblasten in vitro typisch sind. Unter anderem reagieren sie auf Calcitriol (Vitamin-D₃-Metabolit) mit einem Anstieg in der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) und der Expression von Osteocalcin (OC). Daneben besitzen sie Parathormonrezeptoren, über welche ihre Differenzierung u.a. reguliert wird (Boyan et al. 2001).

Zur Untersuchung der Zellkompatibilität in vitro von Materialien für den Knochenersatz werden unterschiedliche Zellkulturmodelle mit verschiedenen knochenbildenden Zellen eingesetzt (Boyan et al. 2001, Vandrovcova und Bacakova 2011). Grundsätzlich unterscheidet man zwischen primären humanen Zellen, wie die in dieser Arbeit eingesetzten humanen Osteoblasten (HOB), die aus gesundem Gewebe (z.B. im Zuge einer Operation) gewonnen werden, und permanenten humanen Zelllinien (osteoblastenähnliche Zellen), die entweder durch Immortalisierung primärer Zellen oder aus Knochentumoren gewonnen werden. Osteoblastenähnliche Zellen besitzen die meisten Marker der osteogenen Zelldifferenzierung, unter anderen die Aktivität der ALP und die OC-Expression. Daneben existieren verschiedene Zellkulturmodelle, in denen Osteoblasten oder osteoblastenähnliche Zellen animalen Ursprungs eingesetzt werden (Zhao et al. 2007, Rudnik et al. 2008).

Primäre Zellen sind im Allgemeinen schwieriger zu kultivieren als Zelllinien. Sie können nur wenige Wochen kultiviert werden und unterliegen einer limitierten Anzahl von Populationsverdopplungen. Permanente Zelllinien verfügen dagegen über

unbegrenzte Proliferationskapazität. Allerdings kann sich ihr Phänotyp vom ursprünglichen bzw. normalen Phänotyp der primären Zellen unterscheiden (Rodan et al. 1988). Diese Unterschiede bestehen insbesondere in ihrer Proliferationsrate, dem Expressionsprofil verschiedener Zytokine und Matrixproteine sowie in ihrer Mineralisierungsaktivität (Saldana et al. 2011). Außerdem besitzen osteoblastenähnliche Zellen ein diffuseres und leichter zu deformierendes Zytoskelett (Ben-Ze'ev 1985).

Diese Umstände haben wiederum großen Einfluss auf die Zellreaktion auf eine Materialoberfläche. So verlieren vor allem Tumorzellen mit der Zunahme ihrer Zellteilungen ihre Fähigkeit, an der extrazellulären Matrix (EZM) anzuhaften (Anselme et al. 2012).

Aus den eben genannten Gründen besteht Konsens darüber, dass primäre Zellen den permanenten vor allem in der Untersuchung von Zell-Oberflächen-Interaktion überlegen sind (Boyan et al. 2001, Meyer et al. 2005, Saldana et al. 2011, Anselme et al. 2012).

2.6. Zelluläre Grundlagen der Implantateinheilung

Die Implantateinheilung ist eng mit den an der Knochenheilung beteiligten Prozessen verbunden. Die Knochenheilung kann in zwei Arten unterteilt werden:

Bei der primären Heilung kommt es zum direkten Zusammenwachsen unter Wiederherstellung der Havers-Kanäle. Hierzu ist ein direkter Kontakt der Knochenenden nötig. Dagegen bildet sich bei der sekundären Heilung im Frakturspalt knorpeliges Gewebe, das wie bei der embryonalen Knochenbildung im weiteren Heilungsverlauf verknöchert. Beide Heilungsformen bedürfen einer Revaskularisierung des neu gebildeten Gewebes.

Hinsichtlich der Implantateinheilung wird in Analogie zur Knochenheilung die Distanzosteogenese von der Kontaktosteogenese unterschieden. Bei beiden Osteogeneseformen kommt es während des Einbringens eines Implantats durch die Zerstörung der Knochenkontinuität und dem Zerreißen von Gefäßen zur Hämatombildung und Inflammation. Dabei infiltrieren vor allem Granulozyten, Monozyten und Mastzellen das lokale Gewebe. Die Mastzellen führen über Histamin- und Heparinfreisetzung zu der Entzündungsreaktion. Im Hämatom befinden sich außerdem pluripotente Stammzellen, die von Zytokinen angeregt zu Osteoblasten,

Fibroblasten und Chondrozyten ausdifferenzieren. Zytokine regulieren außerdem die Zellinfiltration, Angiogenese und Zelldifferenzierung. Das Frakturhämatom wird in der Entzündungsphase phagozytiert.

Bei der Distanzosteogenese kommt es zur Knochenneubildung ausgehend vom Knochen (in einer Distanz zum Implantat), wobei die osteogenen Zellen dem vorhandenen Knochen entstammen. Im Heilungsverlauf wächst schließlich neuer Knochen an das Implantat heran.

Dagegen kommt es bei der Kontaktosteogenese zu einer de-novo-Bildung von Knochen direkt am Implantat. Progenitorzellen migrieren zum Implantat, differenzieren zu Osteoblasten und synthetisieren die EZM, die sich durch zunehmende Mineralisierung zum reifen Knochen entwickelt. Im Heilungsverlauf schließt sich der Spalt zum Knochen hin. Idealerweise finden beide Heilungsformen parallel zueinander statt. Kommt es zu einer Störung in der Kontaktosteogenese, geht unter Umständen der direkte Implantat-Knochen-Kontakt verloren (Implantatlockerung). Dann bildet sich eine fibröse Schicht zwischen Knochen und Implantat, die nicht mineralisiert und deshalb keine Stabilität gewährleistet (Gradinger et al. 2006, d).

Grundvoraussetzung für die Kontaktosteogenese ist die Osteokonduktivität eines Implantates. Unter Osteokonduktion wird ein passiver Prozess verstanden, der auf Grund von Materialeigenschaften das Adhären und das geordnete Heranwachsen von Zellen an eine Struktur erlaubt (Albrektsson und Johansson 2001). Mikrostrukturierte Implantatoberflächen fördern durch Struktur und Porosität Fibrinogenadsorption, Thrombozytenaktivierung und deren Adhäsion. Dadurch begünstigen sie das Anheften von Osteoblasten und die Neusynthese von Knochen unmittelbar an der Implantatoberfläche (Park und Davies 2000).

Demgegenüber beschreibt der Begriff Osteoinduktion einen aktiven Vorgang, bei dem undifferenzierte, pluripotente Zellen durch Reize wie eine bestimmte Oberflächentopographie zur Differenzierung in die Knochen-Zell-Linie angeregt werden.

Als Osseointegration wird die stabile Verankerung eines Implantates bezeichnet, die durch unmittelbaren Implantat-Knochen-Kontakt erreicht wird (Albrektsson und Johansson 2001).

2.7. Zell-Oberflächen-Interaktion

Entscheidend für die initiale, stabile Einheilung von zementfrei eingebrachten Materialien ist deren Oberflächenbeschaffenheit. Unter anderem beeinflussen Oberflächentopographie, Oberflächenladung und chemische Zusammensetzung die biologischen Reaktionen nach Implantation und bestimmen somit über Abstoßung oder Integration (Kieswetter et al. 1996).

Nachdem ein Biomaterial einer biologischen Umgebung ausgesetzt wird, tritt unmittelbar eine rasche Proteinadsorption an seiner Oberfläche auf (Andrade und Hlady 1987). Im Blut befinden sich über 2000 Proteine. Das am höchsten konzentrierte Protein ist Albumin und deshalb in der initialen Phase führend. Das niedriger konzentrierte und größere Fibrinogen erreicht die Oberfläche erst später, besitzt allerdings eine höhere Affinität zur Oberfläche, verdrängt das Albumin teilweise und wird dominierend (Kasemo und Gold 1999, Richards 2008). Die Adsorption wird von physikalisch-chemischen Eigenschaften wie Oberflächenenergie und Hydrophilie sowie von Umgebungsfaktoren (pH-Wert, Ionenkonzentration, Zusammensetzung der Proteine und ihrer funktionellen Gruppen, Lösungskonzentration, Temperatur) beeinflusst (Vroman 1987).

Besonderen Einfluss auf die Adsorption der Proteine nimmt die Nanotopographie der Oberfläche, da ihre Dimensionen im Bereich von Biomolekülen liegen. So konnten deutliche Unterschiede in der Proteinadsorption von nano-strukturierten Oberflächen im Vergleich zu unstrukturierten Oberflächen gleicher Oberflächenchemie nachgewiesen werden (Woo et al. 2003). Während der Adsorption kommt es zu Änderungen in der Konformation der Proteine und teilweise zu ihrer Degradation. Die Proteine bilden eine Matrix, an der später Zellen adhären können.

Es kann zusammengefasst werden, dass die Zusammensetzung dieser durch unterschiedliche Faktoren bestimmten initialen Proteinschicht, die sich mit der Zeit ändern kann (Vroman-Effekt) (Vroman 1987), die erste Reaktion der Zellen auf den Kontakt mit der fremden Oberfläche bestimmt (Sato und Webster 2004, Jäger et al. 2007, Barbosa et al. 2009, Anselme et al. 2012).

Die Interaktion der oberflächengebundenen Proteine mit Zellen wird über Integrine vermittelt. Diese Glykoproteine der Zellmembran erkennen und binden an verschiedene Liganden von Zelloberflächen und der EZM (Ruoslahti 1991). Integrine können sich an bestimmten Bereichen der Zelle zusammenlagern (fokale

Adhäsionspunkte), die auf der intrazellulären Seite über einen aus einer Vielzahl von Proteinen bestehenden Komplex mit dem Zytoskelett interagieren. Osteoblasten bilden verschiedene Integrine, die an zahlreiche EZM-Liganden binden (Hayes et al. 2011). Über die fokalen Adhäsionspunkte werden intrazelluläre Signalwege in Gang gesetzt und Prozesse wie Adhäsion, Proliferation und Differenzierung maßgeblich beeinflusst (Kieswetter et al. 1996).

Nach der Adhäsion der knochenbildenden Osteoblasten an der Implantatoberfläche ist die Bildung einer mineralisierten Matrix der nächste Schritt bei der Bildung von Knochen am Interface (Hayes et al. 2011).

In dieser frühen Phase nach Implantation führen ungünstige Bedingungen wie zum Beispiel eine vorzeitige Belastung zu Mikrobewegungen. Mikrobewegungen unterbrechen das sich bildende Gewebe und begünstigen die Entstehung einer Bindegewebskapsel (Puleo und Nanci 1999) und somit das Auftreten einer aseptischen Prothesenlockerung. Unter der Verwendung von Tiermodellen haben Studien gezeigt, dass Relativbewegungen in der Größenordnung von 150 μm (Pilliar und Lee 1986) bzw. 75 μm (Burke und O'Connor 1991) ein fibröses Interface zwischen Implantat und Knochen entstehen lassen und damit eine ossäre Integration verhindern, während bei Bewegungen unter 28 μm eine direkte ossäre Integration möglich war (Pilliar und Lee 1986). Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Abwesenheit von Mikrobewegungen von mehr als 50 μm eine Grundvoraussetzung für eine stabile Osseointegration eines Implantats ist (Gradinger et al. 2006, e). Ebenso führen Unterschiede in den E-Moduln von Implantat und Knochen zu Mikrobewegungen und fördern die Bildung einer Bindegewebsmembran. Neben diesen biomechanischen Faktoren gibt es allerdings auch lokal vaskuläre, zelluläre und zytotoxische Ursachen, die zu einer verstärkten Bindegewebsproliferation führen (Gradinger et al. 2006, f).

2.8. Einfluss von Nano- und Mikrotopographie auf die zelluläre Reaktion

Sowohl die chemische Zusammensetzung als auch die Topographie einer Oberfläche eines Biomaterials nehmen Einfluss auf die zelluläre Reaktion. Diese Reaktion kann unterteilt werden in Adhäsionsverhalten, Migration, Proliferation und Differenzierung (Jäger et al. 2007).

Zur objektiven Beschreibung der Oberflächentopographie wird meistens die mittlere Rauheit (R_a) als Kenngröße verwendet (Ponche et al. 2010). Sie gibt den durchschnittlichen Abstand einer Messung von der Mittellinie an.

Die Topographie wird nach der Größe, in der sie strukturiert ist, entweder als Makro-, Mikro- oder als Nanotopographie bezeichnet. Der Einfluss der Makrostruktur auf Zellen ist fragwürdig, da Strukturen wie Proteine und Integrine, die mit der zellulären Adhäsion zusammen hängen, viel kleiner skaliert sind (Jäger et al. 2007). Die Grenze zwischen Mikro- und Nanotopographie wird bei einer Strukturgröße von 100 nm gezogen. Eine Nanotopographie ist also eine Struktur, die im Bereich von 1 - 100 nm dimensioniert ist (Sato und Webster 2004, Jäger et al. 2007, Anselme et al. 2012).

Wie schon oben erläutert, bestimmt die Proteinschicht, die initial auf einer Oberfläche adsorbiert, über die folgende Adhäsion der Zellen. Demzufolge kann die zelluläre Reaktion über eine Einflussnahme auf die Proteinadsorption verändert werden. Da Proteine nanoskalig sind (Anselme 2011), ist es unerlässlich, die Oberfläche von Biomaterialien ebenfalls in dieser Dimension zu gestalten.

Über subzelluläre Komponenten wie Filopodien erreichen Zellen Strukturen im Nanometermaßstab (Dalby et al. 2004). Filopodien sind haarartige Ausstülpungen, die von Aktinbündeln durchzogen werden und die Oberfläche abtasten. Sie spielen beim Aufbau von fokalen Adhäsionspunkten und bei der Zellbewegung eine entscheidende Rolle (Roach et al. 2007). Die Zelle untersucht damit Bereiche, bevor sie in diese migriert. Ist der Bereich für die Zelle interessant, zieht sie den Zellleib nach, ist er eher zellinkompatibel, bilden sich die Filopodien wieder zurück und die Migration bleibt aus. Auch in der Migration und in der Adhäsion selbst sind Filopodien von entscheidender Bedeutung (Schäfer et al. 2011).

Es hat sich jedoch gezeigt, dass die zelluläre Reaktion auch durch Veränderungen in der Mikrostruktur beeinflusst wird (Hayes und Richards 2010, Anselme et al. 2012).

Biomaterialien, die das Ziel verfolgen, eine bestimmte Zellreaktion wie die Begünstigung einer osteoblastären Anlagerung hervorzurufen, müssen also sowohl mikro- als auch nanostrukturiert sein.

2.9. Kooperationspartner

In unserer Arbeitsgruppe suchen wir innerhalb der Grundlagenforschung zur Zell-Oberflächen-Interaktion nach einer Implantatoberfläche, die das Risiko für das Auftreten einer aseptischen Prothesenlockerung minimieren kann.

Um dieses komplexe Thema adäquat bearbeiten zu können, gingen wir zwei Kooperationen ein. Auf materialwissenschaftlicher Seite mit dem Leibniz-Institut für Neue Materialien (INM) in Saarbrücken. Das INM war für Herstellung und Charakterisierung der Aluminiumoxid-Proben (Al_2O_3 -Proben) verantwortlich, die nachfolgenden Zellkulturexperimente wurden in unserem Forschungslabor durchgeführt. Bei Untersuchungen zur osteogenen Differenzierung arbeiteten wir mit dem AO Research Institute (ARI) in Davos zusammen. Im eigenen Labor wurden die Zellkultur, die Ribonukleinsäure(RNA)-Isolierung, die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA und die Reverse Transkription durchgeführt. Am ARI wurden die quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (q-PCR) und die Auswertung durchgeführt.

2.10. Beschichtungen, chemische Gasphasenabscheidung und Aluminiumoxid

Grundvoraussetzung von Implantaten ist ihre Biokompatibilität. Hierunter wird die Verträglichkeit zwischen einem technischen und einem biologischen System verstanden (Wintermantel et al. 2009, b). Im Fokus neuer Implantatenwicklungen liegt die Synthese von Biomaterialien, die einerseits gute mechanische Eigenschaften aufweisen und andererseits durch ihre Oberflächenbeschaffenheit eine verbesserte Langzeitverträglichkeit bieten. Vor allem dünne und ultradünne Oberflächenbeschichtungen können die Grenzflächenverträglichkeit verändern, ohne dabei die mechanischen Eigenschaften der Grundsubstanz zu beeinträchtigen. Allgemein sollten Beschichtungen so dünn wie möglich sein, doch müssen Einheitlichkeit, Beständigkeit und Funktion beibehalten werden (Wintermantel et al. 2009, a).

Im Einzelnen sind die Anforderungen, die von Beschichtungen erfüllt werden müssen (modifiziert nach Gradinger et al. 2006, g):

- Die Beschichtung muss biokompatibel sein
- Hohe Haftfestigkeit am Grundmaterial
- Erhalt der Dauerfestigkeit des Grundmaterials
- Keine Mischphasenbildung im Haftbereich zum Grundmaterial
- Die Schicht muss das Grundmaterial lückenlos bedecken und möglichst nanoskaliert sein
- Die Schicht muss nicht-resorbierbar sein

Die chemische Gasphasenabscheidung (englisch: Chemical Vapor Deposition; CVD) hat sich als Vakuumtechnik, mit der dünne Schichten aufgetragen werden, etabliert. Die Schichtdicke dünner Schichten liegt zwischen 1 - 50 µm. Die besonderen Vorteile der CVD-Beschichtung sind (modifiziert nach Wintermantel et al. 2008, a):

- Universelle Anwendbarkeit auf verschiedenen Materialien
- Keine Verwendung von Initiatoren und Additiven
- Anwendbarkeit auf geometrisch anspruchsvollen Oberflächenstrukturen
- Abscheidungsprozess unter Reinraumbedingungen
- Genaue Einstellbarkeit der Schichtdicke
- Chemische Resistenz der Beschichtung

Neben der Tatsache, dass Beschichtungen die Proteinadsorption, zelluläre Adhäsion, Wachstumsverhalten und Differenzierung bei entsprechendem Design positiv beeinflussen können, hat die Oberflächenmodifizierung eines vorhandenen Biomaterials einen weiteren großen Vorteil; sie ist wirtschaftlich günstiger als die Entwicklung neuer Biomaterialien (Wintermantel et al. 2009, a).

Am INM können Al_2O_3 -Beschichtungen mittels CVD hergestellt und anschließender Laserbehandlung modifiziert werden. Die hervorragende Biokompatibilität von Al_2O_3 ist seit langem bekannt und in der Literatur beschrieben (Toni et al. 1994, Ha und Wintermantel 2009, b). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten eine verbesserte Biokompatibilität durch Keramik-Beschichtungen nachweisen (Weidong et al. 2008, Walpole et al. 2009, Wang et al. 2009).

Die Biokompatibilität von Biomaterialien hängt stark vom Zellverhalten auf dem eingebrachten Material ab. Vor allem das Adhäsionsverhalten, das u.a. von

Topographie und Chemie abhängt, spielt hier eine entscheidende Rolle (Anselme 2000). Allerdings ist der Kenntnisstand darüber, inwiefern Topographie und Chemie miteinander interagieren, äußerst gering. Das ist darin begründet, dass es schwierig ist, beide Oberflächeneigenschaften unabhängig voneinander zu variieren (Meyer et al. 2005).

Mit der CVD-Technik können Al_2O_3 -Oberflächen mit unterschiedlichen Oberflächenstrukturen erzeugt werden. Die Oberflächentopographien unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Struktur im Nano- und Mikrometermaßstab (Veith et al. 2010). Das erlaubt uns, den Einfluss der Oberflächentopographie auf die zelluläre Reaktion in den für die zelluläre Reaktion entscheidenden Dimensionen zu untersuchen.

2.11. Fragestellung

Al_2O_3 -Beschichtungen wurden vom INM im Mikro- und Nanometermaßstab hergestellt und materialwissenschaftlich hinsichtlich Transparenz, Benetzbarkeit, Oberflächenchemie und Oberflächentopographie charakterisiert.

In nachfolgenden standardisierten Zellkulturversuchen mit HOB wurde die Zellkompatibilität der Al_2O_3 -Beschichtungen analysiert. An ausgewählten Beschichtungen wurde der Einfluss der Al_2O_3 -Beschichtungen auf die osteogene Differenzierung untersucht, um Antworten auf folgende Fragen zu finden:

1. Lassen sich mittels CVD und nachfolgender Lasermodifikation unterschiedliche Topographien bei gleichbleibender Oberflächenchemie herstellen?
2. Sind die Al_2O_3 -Beschichtungen reproduzierbar?
3. Wie wirken sich Al_2O_3 -Beschichtungen auf die Anzahl initial adhärierender Zellen, ihre Fläche und ihr Proliferationsverhalten aus?
4. Welchen Einfluss nehmen CVD und Lasereinsatz auf die Benetzbarkeit und wie wirkt sich die Benetzbarkeit auf das zelluläre Wachstumsverhalten aus?
5. Welchen Einfluss nehmen CVD und Lasereinsatz auf die Rauheit und wie beeinflusst die Rauheit das zelluläre Wachstumsverhalten?
6. Welchen Effekt haben die Al_2O_3 -Beschichtungen auf die Morphologie der HOB?
7. Beeinflussen Al_2O_3 -Beschichtungen die zelluläre Stoffwechselaktivität?
8. Haben Al_2O_3 -Beschichtungen einen Einfluss auf die osteogene Differenzierung?

3. Material und Methoden

3.1. Material

Tab. 1: Verwendete Geräte

Gerät	Herstellerinformation
3-D-Profilometer	Surfcom 1500 SD3, Carl Zeiss 3D Metrology Services GmbH, Stuttgart, Deutschland
Breitband-Spektrometer	BAKI, Kocaeli, Türkei
ELISA-Reader	TECAN Infinite® M200 microplate reader, Tecan Group Ltd, Männedorf, Schweiz
Fluoreszenzmikroskop	Axioskop, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Hämocytometer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Inkubator	Heracell, Thermo Fisher, Wilmington, DE, USA
Kamera (Fluoreszenz-Mikroskopie)	AxioCam MRm, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Kontaktwinkel-Messsystem	G2, Krüss GmbH, Hamburg, Deutschland
Kritisch-Punkt-Trockner	Polaron CPD 7501, Quorum Technologies, Ontario, Canada
Laborschüttelgerät	Lab Dancer, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Laser (Transmission)	GCL-025-S, CryLaS GmbH, Berlin, Deutschland
Mikroliterpipetten (manuelle)	Eppendorf Research Pipetten 0,5 - 10 / 10 - 100 / 100 - 1000 µl; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Nano-Drop	Thermo Fisher, Wilmington, DE, USA
Nd:YAG-Laser (Modifikation der Al ₂ O ₃ -Proben)	Quanta-Ray PRO 290, Spectra Physics, Santa Clara, CA, USA
Phasenkontrastmikroskop (Zellkultur)	Eclipse TS 100, Nikon, Tokio, Japan
Pipettierhilfe, akkubetrieben	Pipetboy acu, IBS Integra Biosciences, Fernwald, Darmstadt, Deutschland
Rasterelektronenmikroskop (Homburg)	FEI XL 30 ESEM FEG, Hillsboro, OR, USA

Rasterelektronenmikroskop (INM)	JSM-6400 F, Jeol GmbH, Echting, Deutschland
q-PCR System	SDS 7500, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
Röntgenphotoelektronen-spektroskop	PHI 5600, Physical Electronics GmbH, Ismaning, Deutschland
Sputteranlage (Homburg)	Polaron Sputter Coater, Quorum Technologies, Ontario, Kanada
Sputteranlage (INM)	JFC-1300, Jeol GmbH, Echting, Deutschland
Sterilbank	Herasafe, Thermo Fisher, Wilmington, DE, USA
Taumelschüttler	Modell 3017, GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland
Thermocycler	Gene Amp 2400, Perkin Elmer, San Jose, CA, USA
Trockenschrank	Modell 500, Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	TWB 12, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge 15, Hereaus sepatech GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge	CR 412, Jouan, St. Herblain, Frankreich

Tab. 2: Verwendete Software

Programm	Herstellerinformation
Digitale Bildverarbeitung	Axio-Vision, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
ELISA-Reader	Magellan, Tecan Group Ltd, Männedorf, Schweiz
Statistikprogramm	Sigma Stat, Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland

Tab. 3: Verwendetes Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller	Katalognr.
6 / 24 / 96-Well-Zellkulturplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland	657160, 662160, 655180
96-Well-Zellkulturplatte (q-PCR)	Thermo-fast 96 detection plate, ABgene Limited, Epsom, Großbritannien	AB-1100
Eppendorf-Reaktionsgefäß 1,5 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland	616201
Falcon-Gefäß 15 / 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland	188271 / 227621
Humane Osteoblasten (vgl. 3.2.3.1.)	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland	C-12720
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland	122279
Objektträger	Menzel, Vertrieb durch VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	631-1303
PCR-Tubes	Sigma, St. Louis, MO, USA	Z617717
Serologische Pipette 5 / 10 / 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland	606180, 607180, 760180
Pipettenspitzen (Mikroliterpipette) 0,5 - 20 / 10 - 200 / 100 - 1000 µl	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland	765290, 739290, 740290
Selbstklebende Karbonfolie	Science Services, München, Deutschland	E76254
Sekundenkleber Roticoll	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	O258.1
Zellkulturflasche T25 / T75	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland	690175 / 703202

Tab. 4: Verwendete Chemikalien

Stoff	Hersteller	Katalognr.
1-Bromo-3-Chloro-Propan	Sigma, St. Louis, MO, USA	B9673
Ascorbinsäure	Sigma, St. Louis, MO, USA	A92902-25
β -Glycerophosphat	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	36575
Cell-Tracker Green-CMFD	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	VXC 7025
Cryo-SFM, Einfriermedium	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland	C-29910
DAPI-Mounting Medium	Vectashield, Vector Laboratories Inc, Burlingame, USA	VC-H-1200-L010
DMEM	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	E15-810
DEPC-H ₂ O	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	T143.3
Dexamethason	Sigma, St. Louis, MO, USA	D8893
DMSO	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	4720.4
Ethanol, 75 % (q-PCR)	Sigma, St. Louis, MO, USA	32205
Ethanol, 96 %, vergällt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	T171.1
FCS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	A15-101
Gene Expression Master Mix, 2x	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA	4370074
Glutaraldehyd, 2 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	4995.2
HCl, 1 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	4625.1
Hochsalzlösung aus (a) 0,8 M Natriumcitrat (b) 1,2 M Natriumchlorid	Sigma, St. Louis, MO, USA	(a) C8532-100G (b) S3014-500G
Isopropanol, 100 %	Sigma, St. Louis, MO, USA	I9516

Methanol	Universität des Saarlandes, Zentrales Chemikalienlager, Saarbrücken, Deutschland	701226
NaOH, 1 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	T135.1
Natriumcacodylat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	5169.2
Osmiumtetroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	8371.3
Osteoblast-Growth-Medium	Ready-to-use, PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland	C-27001
Paraformaldehyd, 2 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	0335.2
Penicillin / Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	P11-010
PBS	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	OXOIBR0014G
Polyacryl-Carrier	Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA	PC152
RNAse-Exitus Plus	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland	A7153,1000
Primer	Microsynth, Balgach, Schweiz	Siehe Tabelle 14
TaqMan [®] -Probe	Microsynth, Balgach, Schweiz	Siehe Tabelle 14
TRI-Reagenz	Sigma, St. Louis, MO, USA	T9424
Trypanblau 0,4 %	Trypanblau (Sigma, St. Louis, MO, USA) in Natriumchlorid- Lösung (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)	T8154 HN00.1
Trypsin- Ethylendiamintetraessig- säure, UV-inaktiviert (1:250)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	L11-660
WST-1-Test	WST Cell Proliferation Reagent, Roche, Mannheim, Deutschland	1644807001

Tab. 5: Verwendete Kit-Systeme

Kit und Hersteller	Inhalt	Katalognr.
Detach Kit, PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland	- HEPES-BSS - Trypsin / EDTA - TNS (Trypsin Neutralization Solution)	C-41220
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA	- dNTP Mix, 25x, c = 100 mM - RT-Puffer, 10x - RT Random Primer, 10x - MultiScribe Reverse Transcriptase, c = 50 U/μL - RNase Inhibitor	4374966
RNeasy [®] Mini Kit; Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland	- Collection Tubes (2 ml) - H₂O, RNase frei - RNeasy Mini Spin Columns - RPE-Puffer - RW-1-Puffer	74104

3.2. Methoden

3.2.1. Herstellung der Al_2O_3 -Proben

Die Al_2O_3 -Beschichtung wurde mittels CVD hergestellt. Bei der CVD-Technik wird an einer erhitzten Oberfläche eines Substrates durch eine chemische Reaktion ein Feststoff aus der Gasphase abgeschieden (Pierson 1999) (Abb. 1). In Abb. 2 sind schematischer und realer Aufbau der CVD-Apparatur dargestellt.

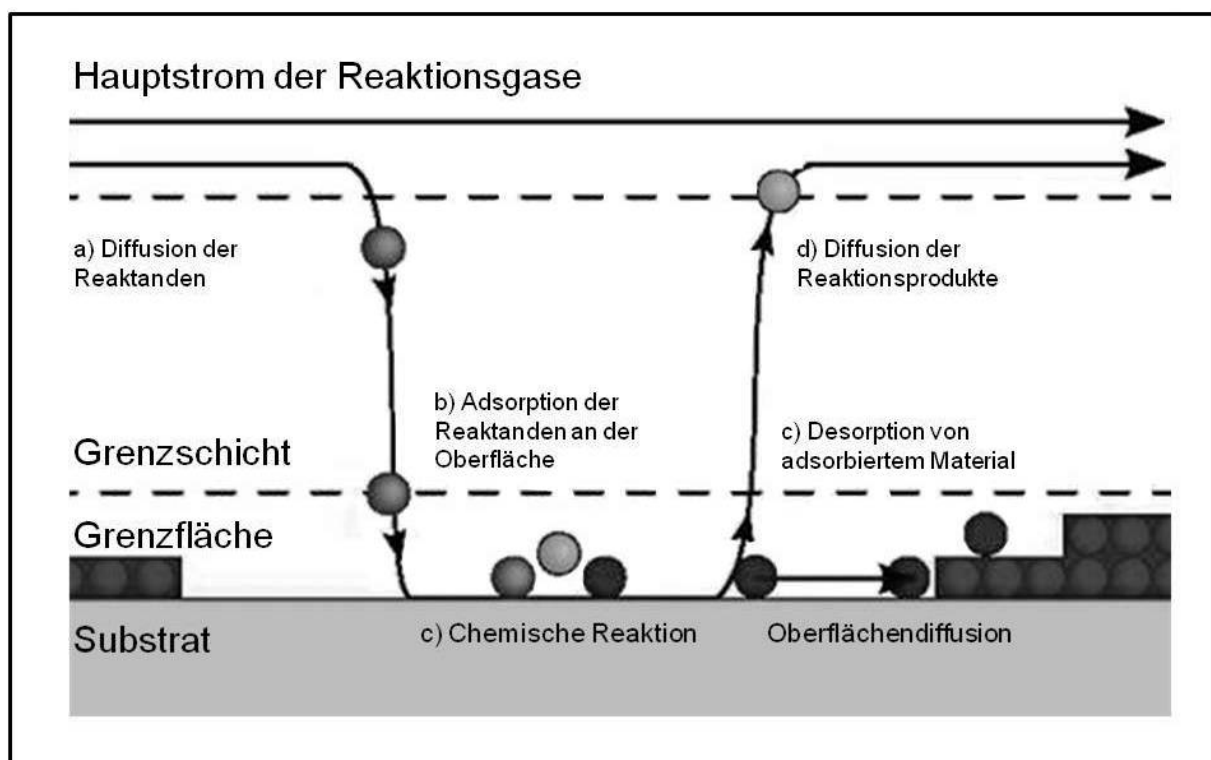


Abb. 1:

Schematische Darstellung der CVD (modifiziert nach Pierson 1999).

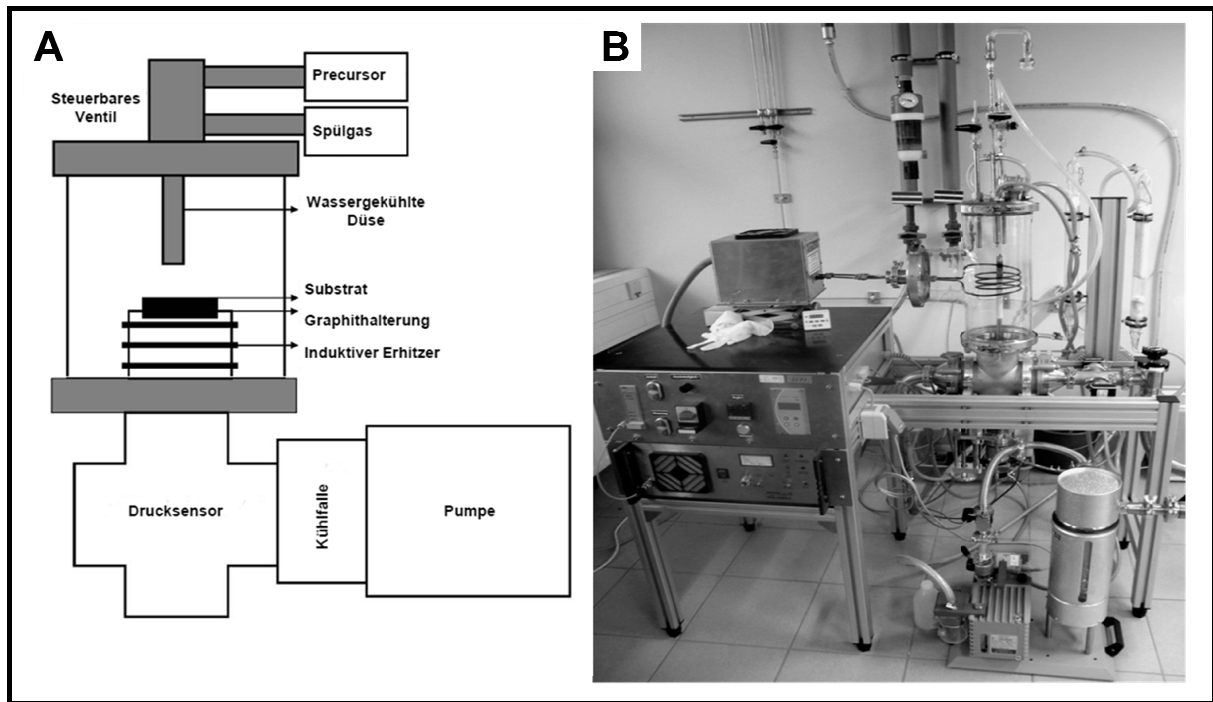


Abb. 2:
Schematischer (A) und realer Aufbau (B) der benutzten CVD-Apparatur. Quelle: INM.

In der Kaltwand-CVD-Kammer wurde im Vakuum ein Substrat (Deckglas) auf 650°C erhitzt. Das Deckglas hatte einen Durchmesser von 15 mm (im Versuchsansatz der Analyse der Genexpression $\varnothing = 32$ mm). Durch chemische Umwandlung des Precursors Bis(tert-butoxyaluminiumdihydrid) ($t\text{BuOAlH}_2$)₂ wurden Al₂O₃-Nanowires (NW) direkt aus der Gasphase auf das Deckglas abgeschieden. NW sind „würmchenartige“ Gebilde, die einen Durchmesser von 20 - 30 nm haben und deren Länge sich im Mikrometerbereich befindet. NW weisen eine typische core-shell-Architektur mit einem Aluminium-Kern und einer Al₂O₃-Hülle auf (Veith et al. 2008). Durch Variation der Beschichtungsdauer können Dichte und Länge der NW variiert werden (Tab. 6). Die beschichteten Deckgläser wurden als Ultra High Density (UHD-Al₂O₃-DV), High Density (HD-Al₂O₃-DV), Medium Density (MD-Al₂O₃-DV) und Low Density (LD-Al₂O₃-DV) bezeichnet. Sie werden im Folgenden als Al₂O₃-Dichtevationen (Al₂O₃-DV) bezeichnet.

Durch den nachfolgenden Einsatz eines gepulsten Neodym-dotierten Yttrium-Aluminium-Granat-Lasers (Nd:YAG-Laser, $\lambda = 532$ nm) konnten die NW geschmolzen und die Topografie der Beschichtungen zusätzlich modifiziert werden.

Derartig hergestellte Proben werden nachfolgend als Al_2O_3 -Laservariationen (Al_2O_3 -LV) bezeichnet. Anzahl der Laserpulse und Terminologie aller Al_2O_3 -Proben sind aus Tab. 6 ersichtlich.

Tab. 6: Übersicht über die Produktionsprotokolle der Al_2O_3 -Proben

Al_2O_3-Probe	Beschichtungszeit [min]	Laserbehandlung
UHD- Al_2O_3 -DV, UHD-1x / 2x / 3x- Al_2O_3 -LV	25 - 30	0, 1, 2, 3 Puls(e)
HD- Al_2O_3 -DV, HD-1x / 2x / 3x- Al_2O_3 -LV	12 - 15	0, 1, 2, 3 Puls(e)
MD- Al_2O_3 -DV, MD-1x- / 2x / 3x- Al_2O_3 -LV	7 - 10	0, 1, 2, 3 Puls(e)
LD- Al_2O_3 -DV, LD-3x- Al_2O_3 -LV	2 - 5	0, 3 Puls(e)
Unbeschichtete Glaskontrolle	keine	keine

3.2.2. Materialwissenschaftliche Charakterisierung der Al_2O_3 -Proben

Um die Materialeigenschaften der Al_2O_3 -Proben zu charakterisieren wurden am INM verschiedene Verfahren eingesetzt.

3.2.2.1. Transparenz - Transmissionsanalyse

Die unterschiedliche Dichte der Al_2O_3 -Proben wurde anhand ihrer Transparenz für Licht klassifiziert.

Die untersuchte Größe - der Transmissionsgrad - ist definiert als der Quotient der Intensität der Lichtenergie vor und nach dem Durchstrahlen durch die Al_2O_3 -Probe. Der Transmissionsgrad wurde mit einem am INM entworfenen System, das mit einem Niedrigenergie-Laser ($\lambda = 532 \text{ nm}$) ausgerüstet ist, bei Dunkelheit ermittelt (Abb. 3). Die Messung wurde dabei mit einem Breitband-Spektrometer vorgenommen.

Durchgeführt wurde die Transmissionsanalyse als Screeningmethode an allen Al_2O_3 -Proben. Die in dieser Arbeit vorliegenden Daten beruhen auf einem Stichprobenumfang von $n = 5$.

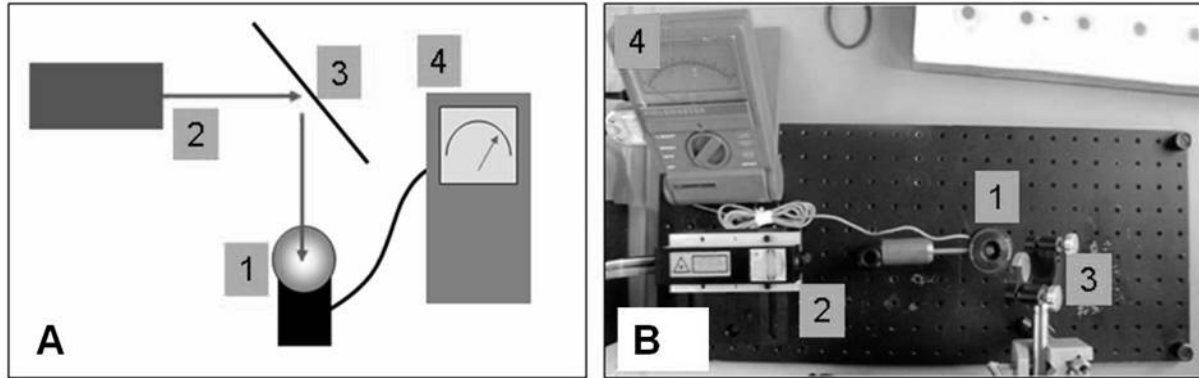


Abb. 3:

Transmissionsanalyse: Schematischer (A) und realer (B) Aufbau
1: Probenhalter, 2: Laserstrahl, 3: Spiegel, 4: Detektor. Quelle: INM.

3.2.2.2. Benetzbarkeit - Kontaktwinkelmessung

Zur Analyse der Benetzbarkeit der Al_2O_3 -Proben wurden die statischen Wasserkontaktwinkel mit einem semiautomatischen Kontaktwinkel-Messsystem (G2, Krüss) gemessen.

Dabei wird durch Anlegen einer Tangente an den Punkt, an dem der Flüssigkeitstropfen die Festkörperoberfläche und die Umgebungsphase (Luft) berührt, der Kontaktwinkel ermittelt (Abb. 4). Dieser nimmt mit zunehmender Hydrophilie des Festkörpers ab.

Die Benetzbarkeit wurde durch fünf Messungen an zufällig ausgewählten Stellen der Oberfläche auf einem Exemplar jeder Probe nach Herstellerprotokoll ermittelt und als durchschnittlicher Kontaktwinkel dargestellt.

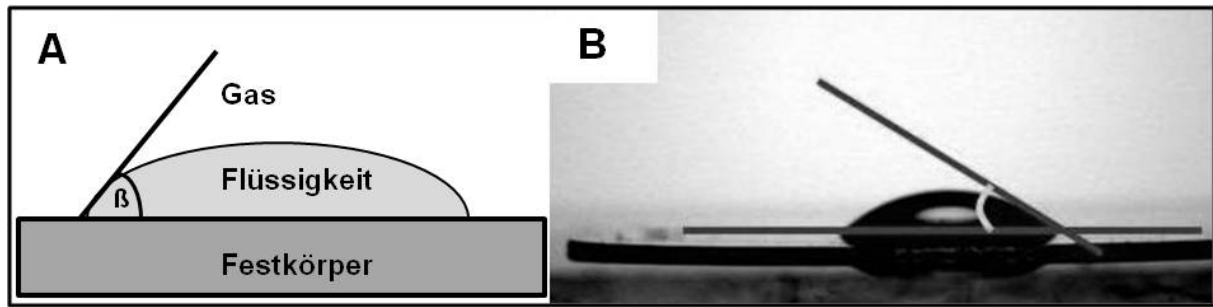


Abb. 4:

Schematische (A) und reale (B) Darstellung der Kontaktwinkelmessung (Kontaktwinkel β). Quelle INM.

3.2.2.3. Oberflächenchemie - Röntgen-Photoelektronenspektroskopie

Mit Hilfe der Röntgen-Photoelektronenspektroskopie (XPS) wurde die Elementzusammensetzung der Oberflächen der CVD-Schichten ermittelt.

Das Messprinzip beruht auf dem elementspezifischen Nachweis von Photoelektronen, die aus der Probenoberfläche durch die Anregung mit Röntgenstrahlen emittiert werden.

Das Spektroskop (PHI 5600, Physical Electronics) wurde an allen Al_2O_3 -Proben nach Herstellerprotokoll eingesetzt. Die Strahlungsquelle erzeugte monochromatische $\text{AlK-}\alpha$ Röntgenstrahlen.

3.2.2.4. Rauheit - Profilometrie

Die Rauheit der Probenoberflächen wurde mit einem 3D-Profilometer (Surfcom 1500 SD3, Carl Zeiss 3D Metrology Services) analysiert. Dieses ist mit einer Diamantspitze ausgerüstet, die über die Oberfläche geführt wird und von dieser mechanisch ausgelenkt wird. Die Auslenkung wiederum wird elektronisch detektiert. So konnte R_a (arithmetisches Mittel der vertikalen Abweichung von der Mittellinie) ermittelt werden.

Die Profilometrie wurde an allen Al_2O_3 -Proben durchgeführt. Es wurden jeweils zwei Messungen nach Herstellerprotokoll auf einer Probe an zufällig ausgewählten Stellen mit einer Messstrecke von 2 mm vorgenommen.

3.2.2.5. Morphologie - Rasterelektronenmikroskopie

Die Morphologie der Al_2O_3 -Proben wurde am INM mittels eines Rasterelektronenmikroskops (REM - JSM-6400 F, Jeol) untersucht.

Im REM wird ein Primärelektronenstrahl, der an einer Glühkathode und durch die Beschleunigung zur Anode hin erzeugt wurde, auf die Oberfläche der zu untersuchenden Probe möglichst fein fokussiert und in einem genau definierten Raster über sie geführt. In der Probe werden in einem von der Beschleunigungsspannung und der Materialzusammensetzung abhängigen Wechselwirkungsvolumen Sekundärelektronen, Rückstreuелеktronen und Röntgenstrahlung erzeugt. Die Energie der Röntgenstrahlung hängt von der Ordnungszahl des emittierenden Atoms ab und ist deshalb für das betreffende Element charakteristisch. Die auftretenden Signale werden mit entsprechenden Detektoren registriert. So können Topographie-, Material- und Elementkontraste am Bildschirm abgebildet werden (Michler 2008) (Abb. 5).

Vor der REM-Analyse wurde auf den Al_2O_3 -Proben mittels physikalischer Gasphasenabscheidung (PVD) eine dünne Goldschicht (ca. 5 nm) (Schädler et al. 2008) abgeschieden (Sputtern; deutsch: Kathodenzerstäubung, JFC-1300, Jeol). Das Sputtern war nötig, um lokale Aufladungsprozesse zu vermeiden.

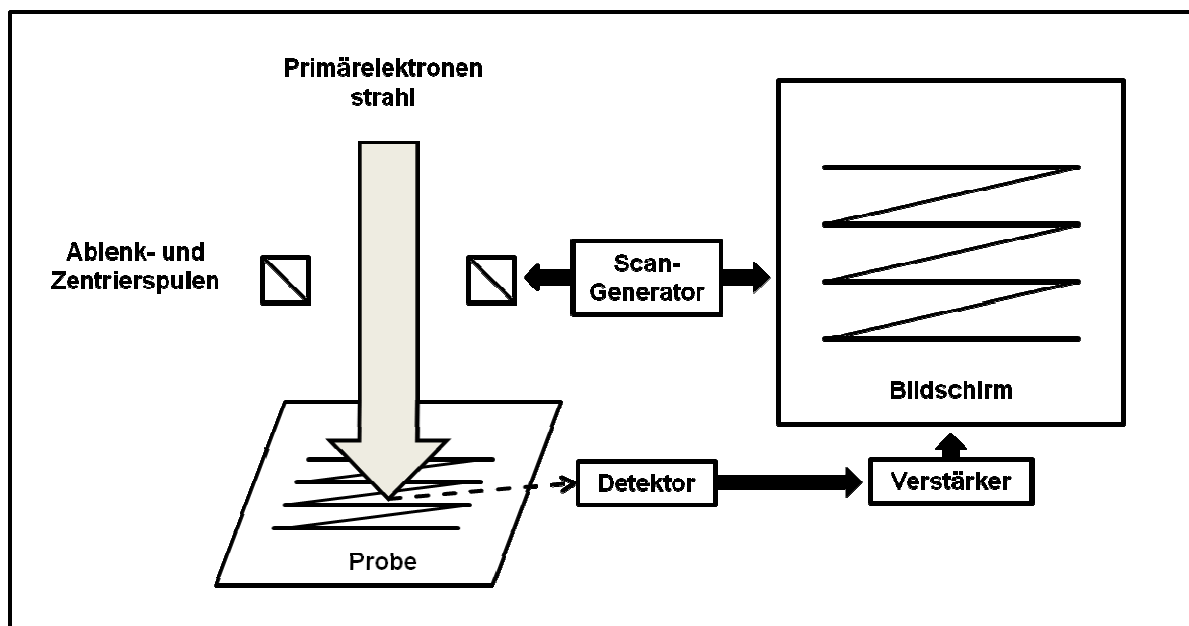


Abb. 5:

Schematische Darstellung des Aufbaus eines REM (modifiziert nach Michler 2008).

3.2.3. Zellkompatibilität

3.2.3.1. Humane Osteoblasten

Zur Minimierung spenderspezifischer Unterschiede kamen drei verschiedene Chargen von HOB zum Einsatz (Tab. 7). Alter, Geschlecht und Rasse der Spender waren zufälliger Natur.

Tab. 7: Übersicht über die eingesetzten HOB

Interne Bezeichnung	Spender	Chargennummer	Versuche
HOB-050808	58 Jahre, weiblich, kaukasisch, Knie	6090607	Frühe Adhäsion Späte Adhäsion q-PCR
HOB-290609	51 Jahre, männlich, kaukasisch, Knie	8042901	Frühe Adhäsion Späte Adhäsion REM WST-Test q-PCR
HOB-050110	51 Jahre, männlich, kaukasisch, Knie	8041704	q-PCR

3.2.3.2. Methoden der Zellkulturarbeiten

Alle Zellkulturexperimente wurden bei sterilen Bedingungen unter der Sicherheitswerkbank bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Die Inkubation fand im Brutschrank bei Standard-Zellkulturbedingungen (5 % CO₂, 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit) statt.

Lösungen und Medien wurden vor Einsatz mit Hilfe des Wasserbades auf 37°C vorgewärmt.

Es wurden 6-Well Kulturgefäße in den Versuchen zu Wachstumsverhalten, Zellmorphologie und Genexpression verwendet. 24-Well Kulturgefäße wurden in dem Versuch zu der Zellviabilität eingesetzt. Expandiert wurden die HOB in T25- und T75-Kulturgefäßen (T25, T75).

Das HOB-Medium wurde aus Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) unter Zusatz von 15 % Fetal Calf Serum (FCS) hergestellt. Mediumwechsel wurde in einem zweitägigen Rhythmus vorgenommen. Für T25 wurden 5 ml und für T75 wurden 10 ml Medium eingesetzt.

Des Weiteren wurden täglich visuelle Kontrollen mit dem Phasenkontrastmikroskop vorgenommen.

Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die HOB unterkultiviert. Die hier beschriebenen Verfahren wurden auch bei der Aussaat einer definierten Anzahl von HOB auf den Al₂O₃-Proben entsprechend angewendet.

Unter Kultivierung:

Nach Entfernen des Mediums wurde der Zellrasen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen (T25: 5 ml, T75: 10 ml). Anschließend wurde Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (T25: 1,5 ml; T75: 3,5 ml) hinzugegeben, die Kulturflasche zur gleichmäßigen Benetzung leicht geschwenkt und für 3 min im Brutschrank inkubiert. Der Erfolg der Trypsinierung wurde mikroskopisch überprüft. Noch haftende Zellen wurden danach durch leichtes Klopfen an den Rand des Kulturgefäßes gelöst. Zur Inhibierung des Trypsins wurde Medium (T25: 3,5 ml; T75: 6,5 ml) hinzugefügt.

Die erhaltene Zellsuspension wurde in ein Falcon (15 ml) überführt und bei 220 g 4 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das erhaltene Zell-Pellet in Medium (T25: 4 ml; T75: 8 ml) resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Hämocytometers und einer Vitalfärbung mittels Trypanblau an 25 µl Zellsuspension ermittelt. Die Zellsuspension wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 25 µl 0,4 % Trypanblau-Lösung vermischt. Nach 2 min Inkubation bei RT und anschließendem Aufschütteln wurde die Zählkammer mit 10 µl der gefärbten Zellsuspension gefüllt. Trypanblau ist ein dunkelblauer Farbstoff, der an Proteine bindet und die Zellmembran lebender Zellen nicht überwinden kann. So können die lebenden, ungefärbten Zellen gezählt werden (Abb. 6).

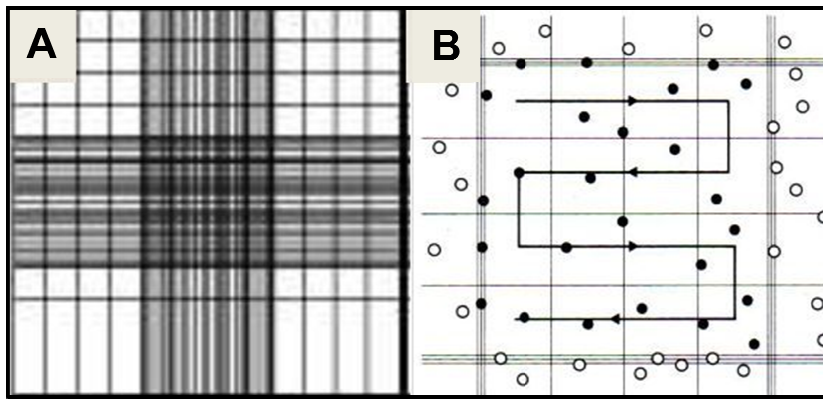


Abb. 6:

Schematische Darstellung eines Hämocytometers in der Übersicht (A) und der Auszählmethode eines Eckquadrates (B). Jeweils 4 Eckquadrate zweier Kammern ($n = 8$) wurden ausgezählt und der Mittelwert gebildet; Multiplikation mit Verdünnungsfaktor (2) und Kammerfaktor (10^4) ergibt die Zellkonzentration der Suspension pro ml (modifiziert nach Wintermantel et al. 2009 b).

3.2.3.3. Masterzellbank

Um eine optimale Vergleichbarkeit in den Experimenten hinsichtlich der eingesetzten Zellen zu schaffen, wurde eine Masterzellbank (MCB) angelegt. So konnten in allen Experimenten Zellen aus der gleichen Passage verwendet werden. Im Folgenden wird das Anlegen einer MCB am Beispiel von HOB-050110 erläutert (Tab. 8).

Tag 0:

HOB in Passage 2 (P2) wurden aufgetaut und ausgesät:

Bei MCB-Anlage wurde das Medium des Herstellers verwendet (Osteoblast Growth Medium, PromoCell). Die kryokonservierten HOB wurden 90 s unter Bewegung in einem Wasserbad aufgetaut. Das Kryoröhrchen wurde außen desinfiziert. HOB wurden in 5 ml vorgewärmten Medium in einer T25 ausgesät (nach Herstellerangabe ca. 200 Zellen/mm²).

Tag 1:

Mediumwechsel zur Entfernung des kryoprotektiven Dimethylsulfoxid (DMSO).

Ab Tag 2 wurde der Mediumwechsel in 2-tägigem Rhythmus vorgenommen.

Tag 6:

HOB erreichten Subkonfluenz (ca. 90 % Konfluenz) in der T25 (Abb. 7). Die Zellen wurden mit dem Detach-Kit (PromoCell) gelöst:

Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit 5 ml HEPES-BSS gewaschen und nach zuvor beschriebenem Muster (vgl. 3.2.3.2.) trypsinisiert. Die Inhibierung des Trypsins erfolgt bei Verwendung des Detach-Kits mit Trypsin-Neutralisationslösung (T25: 1,5 ml; T75: 3,5 ml).

Ermittlung von Zellzahl und Aussaat erfolgten nach dem im vorherigen Kapitel beschriebenen Muster. Ca. $1,54 \times 10^6$ HOB wurden in drei T75 mit jeweils ca. $0,51 \times 10^6$ HOB nach P3 subkultiviert (ca. 68 Zellen/mm²).

Tag 17:

In den drei T75 befanden sich je ca. $2,5 \times 10^6$ HOB. Sie wurden mit einer Aussaatdichte von je ca. $0,625 \times 10^6$ HOB nach P4 in 12 T75 subkultiviert (ca. 83 Zellen/mm²).

Tag 28:

Die Auszählung ergab für die 12 T75 jeweils eine mittlere Zellzahl von ca. $3,625 \times 10^6$.

Insgesamt wurden also $43,5 \times 10^6$ HOB in P5 für die MCB mit Cryo-SFM nach Hersteller-Protokoll (PromoCell) eingefroren (55 Kryoröhrchen mit ca. $0,5 \times 10^6$ HOB-050110 in P5 und 16 Kryoröhrchen mit ca. 1×10^6 HOB-050110 in P5 in jeweils einem Kryoröhrchen mit 1 ml Cryo-SFM).

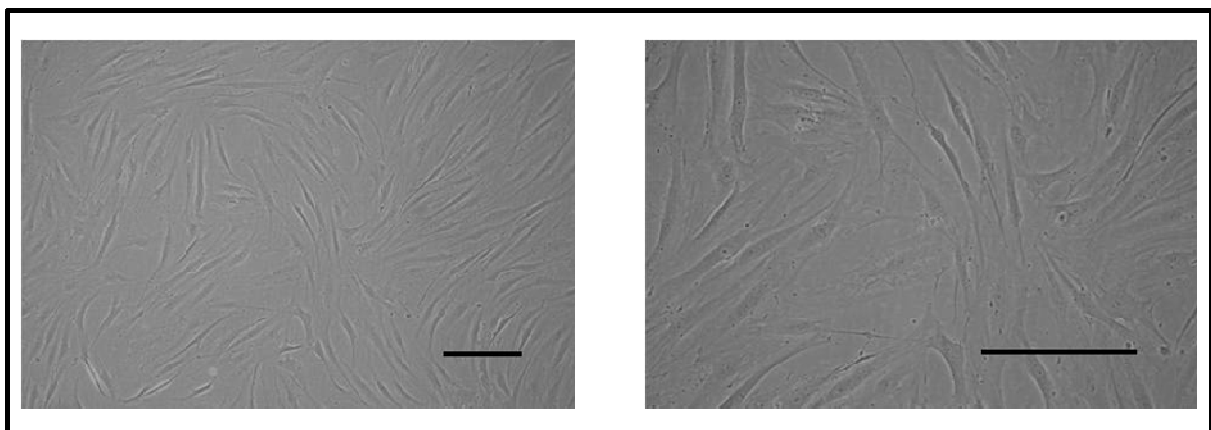


Abb. 7:

Subkonfluente HOB-Kultur in Passage 2 in unterschiedlichen Vergrößerungen. Maßstabsbalken: 200 µm.

Tab. 8: Übersicht über die Herstellung der MCB (HOB-050110)

Tag	Aktion	Zellzahl / Passage nach Aktion
0	Auftauen nach Protokoll und Aussaat in 1 x T25	Ca. 500000 HOB, P2
1	Mediumwechsel	
2	Mediumwechsel (ab jetzt alle zwei Tage)	
6	Subkultivierung (Abösen, Zählen, Aussaat in 3 x T75)	Ca. $1,54 \times 10^6$ HOB, P3
17	Subkultivierung	Ca. $7,5 \times 10^6$ HOB, P4
28	Kryokonservierung (Ablösen, Zählen, Einfrieren in Kryoröhrchen)	Ca. $43,5 \times 10^6$ HOB, P5

3.2.3.4. Wachstumsverhalten - Vitalfärbung

Um die HOB auf den teilweise opaken Al_2O_3 -Proben (Opazität vgl. 4.1.1.) sichtbar zu machen, wurden sie mit dem Lebendfluoreszenzfarbstoff CellTracker Green 5-Chloromethylfluoresceindiacetat (CMFDA) gefärbt.

CMFDA passiert die Zellmembran frei. Im Zytosol entstehen Produkte, die die Zelle nicht mehr verlassen können. Diese Reaktion der Chloromethylgruppe des Farbstoffes mit Thiolen ist wahrscheinlich Glutathion-S-Transferase vermittelt; sowohl Glutathion, als auch Glutathion-S-Transferase sind in den meisten Zellen im Überschuss vorhanden. Im ursprünglichen Zustand ist CMFDA farblos und nicht fluoreszierend. Erst nachdem zytosolische Esterasen die Acetylgruppen entfernt haben, fluoresziert er grün (Abb. 8).

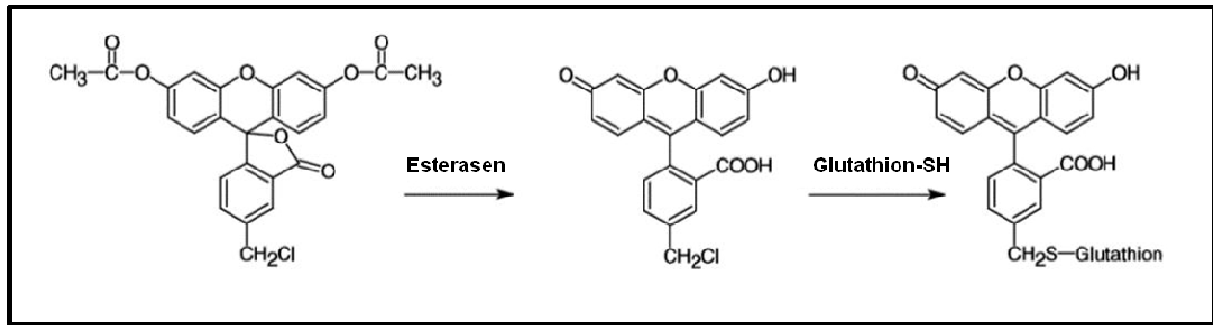


Abb. 8:

Zwei Schritte der intrazellulären Färbereaktion von CMFDA; die Reihenfolge ist variabel. CMFDA ist bis zur Reaktion mit Esterasen (hier erste Reaktion) nicht fluoreszierend (modifiziert nach Invitrogen).

Um das Wachstumsverhalten der HOB auf den Al_2O_3 -Proben in eine Adhäsionsphase und eine daran anschließende Proliferationsphase unterteilen zu können, untersuchten wir ihre Anzahl und ihre Zellfläche zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten („Frühe Adhäsion“ mit einer Inkubationszeit von 6 h und „Späte Adhäsion und Proliferation“ mit einer Inkubationszeit von 48 h).

Unter Zelladhäsion ist der initiale Kontakt zwischen Zelle und der Oberfläche zu verstehen. Unter Proliferation sind die Vorgänge der Zellvermehrung zu verstehen.

Beide Versuchsansätze wurden mit einem Probenumfang von $n = 5$ für die Glaskontrolle und alle Al_2O_3 -Proben durchgeführt.

Zur Reinigung wurden die Proben in die Kavitäten einer 6-Well-Platte gebracht, mit 4 ml sterilen PBS gewaschen (3x), 20 min in 4 ml 70 % Ethanol sterilisiert und abschließend 2x mit 4 ml sterilen PBS gewaschen.

Die Aussaatdichte betrug 100 Zellen/ mm^2 . Als Medium verwendeten wir DMEM mit Zusatz von 15 % FCS und 1 % Penicillin / Streptomycin (P/S).

Nach der Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Probe mit sterilen PBS (4 ml) gewaschen. Danach wurden jeder Probe 2 ml des Färbemediums dazugegeben. Zur Herstellung des Färbemediums wurde 1 μl einer 10 μM CMFDA-Stammlösung in DMSO zu 4 ml serumfreiem DMEM hinzugefügt (Endkonzentration 2,5 μM CMFDA). Es schloss sich eine 30 min Inkubation unter Standardzellkulturbedingungen an, in der der Farbstoff die Zellmembran passieren konnte.

Es folgten zwei Spülungen mit 4 ml sterilen PBS, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen, und anschließend eine Inkubation für 30 min mit Medium bei

Standardzellkulturbedingungen. In dieser Zeit finden die oben beschriebenen Reaktionen im Zytosol statt (Abb. 8).

Schließlich wurden die Zellen nach zwei Waschungen mit 4 ml PBS zur Fixierung 10 min in Methanol bei -20°C inkubiert und dann luftgetrocknet. Die Proben wurden danach zur besseren Handhabbarkeit während der mikroskopischen Auswertung mit Sekundenkleber auf Objektträger geklebt.

Anschließend erfolgte eine Kern-Gegenfärbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI). Hierzu wurden ca. 10 μl Mounting Medium mit DAPI (Vectashield) auf die Proben aufgetragen und diese anschließend mit einem Deckglas versehen. DAPI ist ein fluoreszierender, interkalierender Farbstoff, der spezifisch den Zellkern anfärbt. Er lagert sich bevorzugt an adeninreiche Regionen der Desoxyribonukleinsäure (DNA). Mounting Medium stabilisiert die Fluoreszenz.

Die Proben wurden bis zur Auswertung am Mikroskop im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

Auswerteparameter waren die Zelldichte [Zellen/ mm^2] auf einer untersuchten Al_2O_3 -Probe sowie die mittlere Zellfläche [μm^2].

Es wurden je zehn „Messbilder“ einer Probe mit einer digitalen Kamera (AxioCam MRm, Carl Zeiss) erstellt. Das Untersuchungsfeld wurde mäanderförmig mit dem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung abgefahren und an zufällig ausgewählten Stellen ein Bild generiert (Abb. 9).

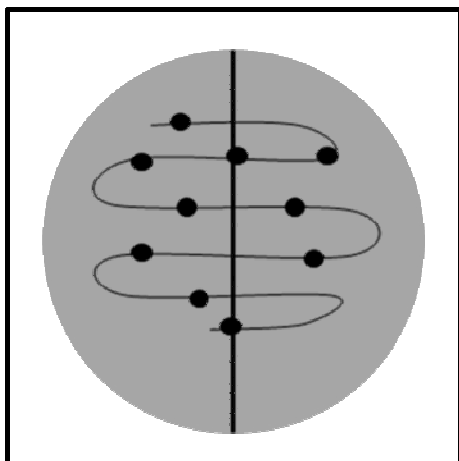


Abb. 9:

Schematische Darstellung der Bilderauswahl: Es wurden je 10 „Messbilder“ (schwarze Punkte) auf einer Probe aufgenommen.

Ein Messbild bestand aus zwei digitalen Aufnahmen, die miteinander kombiniert wurden. In der ersten Aufnahme wurde das blaue Signal der DAPI-gefärbten Zellkerne festgehalten und in der zweiten das grüne Signal der CMFDA-gefärbten Zelleiber (Mehrkanalfluoreszenz, Abb. 10 A).

Zur Auswertung der gewonnenen Bilder setzten wir ein semiautomatisches Messprogramm zur digitalen Bildverarbeitung ein (Axio-Vision, Zeiss). Voraussetzung war das Erstellen einer geeigneten Messroutine in dem Messmodul der Axio-Vision-Software. In einem ersten Schritt wurde die Anzahl der DAPI-Signale auf einem Bild und damit die Anzahl der Zellkerne quantifiziert (Abb. 10 B). Somit konnte die Zelldichte [Zellen/mm²] bestimmt werden. Für den zweiten Schritt wurde die Messroutine so programmiert, dass die CMFDA-gefärbten Flächen aufsummiert wurden. Sie ermittelte also die gesamte Zellfläche aller Zellen auf einem Messbild (Abb. 10 C). So konnte die durchschnittliche Fläche pro Zelle [µm²] errechnet werden.

Statistisch wurden die Ergebnisse mittels One-Way-ANOVA und nachfolgendem Post-hoc-Test (Student-Neuman-Keuls) untersucht. Es wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgelegt.

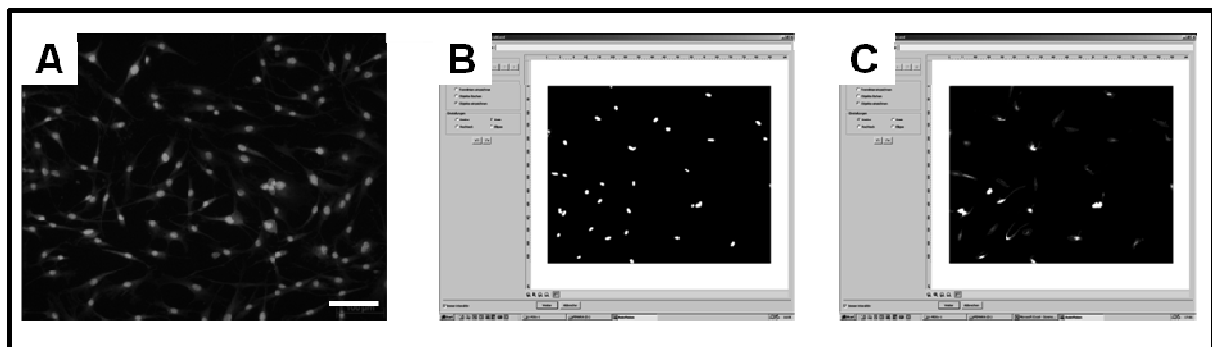


Abb. 10:

Fluoreszenzfärbung: Fixierte HOB nach CMFDA-Färbung und Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (A), Monochromatische Bilder der gefärbten Zellkerne (B) und Zelleiber (C) bei der semiautomatischen Ermittlung der Zelldichte und Zellfläche mit Hilfe der Axio-Vision-Software. Maßstabsbalken: 100 µm.

3.2.3.5. WST-Test - Zellviabilität

Die Zellviabilität wurde anhand der metabolischen Aktivität der HOB nach 48 h auf den Al_2O_3 -Proben mittels Water-Soluble-Tetrazolium (WST)-Test (WST Cell Proliferation Reagent, Roche) untersucht.

Dabei handelt es sich um einen kolorimetrischen Assay zur Quantifizierung der metabolischen Aktivität der Zellen. Durch die Dehydrogenaseaktivität der Mitochondrien wird das eingesetzte Tetrazoliumsalz WST-1 (dunkelrot) reduktiv zu wasserlöslichem Formazansalz (hellrot) aufgespalten (Abb. 11).

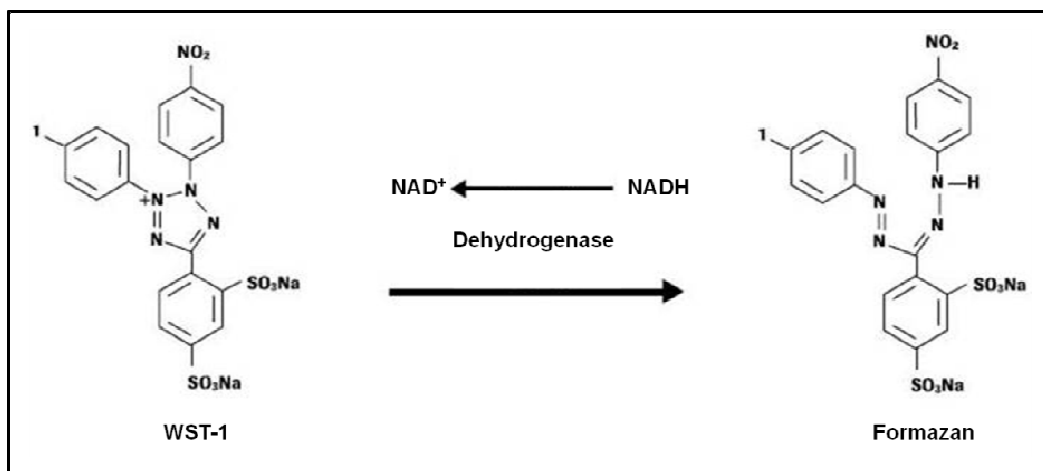


Abb. 11:

Aufspaltung des hellroten Tetrazoliumsalzes WST-1 zu dunkelrotem Formazan (modifiziert nach Roche).

Die Auswertung kann durch Messung der Absorption mittels eines ELISA-Readers bei 420 - 480 nm vorgenommen werden (Abb. 12). Die Absorption ist ein Maß für die allgemeine Zellviabilität.

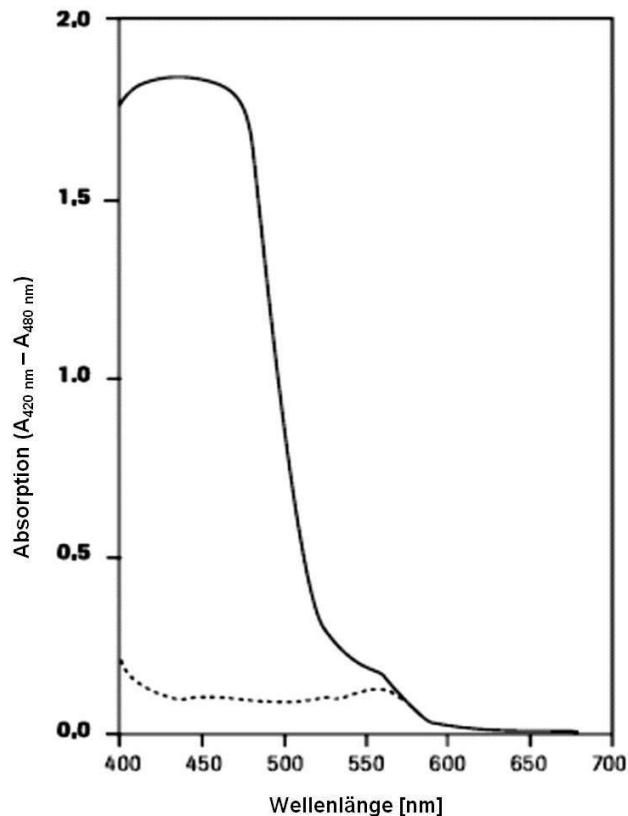


Abb. 12:

Absorptionsspektren vor (.....) und nach (—) Umwandlung von WST-1 zu Formazan (modifiziert nach Roche).

Optimale Aussaatdichte und Inkubationsdauer für den WST-Test variieren in Abhängigkeit des untersuchten Zelltyps und wurden für die eingesetzten HOB in einem Vorversuch ermittelt (Wachstumszeit: 48 h, Zelldichten: 100 / 147 / 294 / 588 / 735 / 1470 / 2941 Zellen/mm², Inkubationszeiten WST-Reagenz: 0,5 / 1 / 2 / 4 h, n = 3). Zielparameter war die erzielte Absorptionsänderung (relative Absorption) am ELISA-Reader.

Um möglichst sensitiv Unterschiede in der allgemeinen Viabilität der HOB zu detektieren, wurden die im Vorversuch als optimal ermittelten Parameter im Hauptversuch eingesetzt (735 Zellen/mm², 4 h Inkubationszeit). Für diese Parameter wurden im Vorversuch eine hohe relative Absorption und ein starker linearer Anstieg der relativen Absorption erzielt. Ein weiterer Grund für den Einsatz von 735 Zellen/mm² war das Ziel, die metabolische Aktivität möglichst vieler Zellen zu erfassen. Der Hauptversuch „WST-Test“ wurde auf den Glas- und allen Al₂O₃-Proben durchgeführt (n = 3).

Nach Reinigung der Al_2O_3 -Proben (vgl. 3.2.3.4.) und 48 h Inkubation unter Standardzellkulturbedingungen wurden die Proben in frische Wells überführt. Dieses Umsetzen war nötig, um nur die Zellen zu analysieren, welche auf den Proben wuchsen und nicht diejenigen, die neben diesen am Boden der Kavitäten angewachsen waren. Es wurden danach 1,5 ml einer Mischung des Mediums und WST-Reagenz (11:1) hinzugegeben. Außerdem wurden Leerkontrollen (Backgroundcontrol) bestehend aus Medium und WST-Reagenz erstellt (keine Glas- / Al_2O_3 -Probe, keine Zellen). Nach erneuter Inkubation für 4 h wurde die 24-Well-Platte zum Mischen auf den Schüttler gestellt (1 min). 100 μl des Überstandes wurden auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt und bei -20°C bis zur Auswertung im ELISA-Reader aufbewahrt.

Ausgewertet wurde der WST-Test am ELISA-Reader (TECAN Infinite[®]M200 microplate reader, Tecan Group Ltd.). Dabei wurde die Absorption ($\lambda = 434 \text{ nm}$) der einzelnen Proben gegen die der Leerkontrolle gemessen.

3.2.3.6. Zellmorphologie - Rasterelektronenmikroskopie

Die Zellmorphologie der HOB nach Kultur auf den Al_2O_3 -Proben wurde am REM untersucht. Die Untersuchungen wurden an Glas- und allen Al_2O_3 -Proben mit einem Probenumfang $n = 2$ durchgeführt.

Nach Reinigung der Al_2O_3 -Proben (vgl. 3.2.3.4.) wurden HOB ausgesät und unter Standardzellkulturbedingungen kultiviert.

Nach 48 h wurden die Präparate fixiert. Das Medium wurde entfernt, die Proben wurden zweimal mit 4 ml sterilem PBS gewaschen und danach aus den Wells in Petrischalen ($\varnothing = 6 \text{ cm}$) überführt. Es wurden 8 ml Fixierlösung modifiziert nach Karnovsky (Karnovsky 1965) hinzugegeben und die Proben für mindestens 20 min schüttelnd bei RT inkubiert.

Fixierlösung nach Karnovsky:

Lösung aus 2 % Glutaraldehyd und 2 % Paraformaldehyd in 0,2 M Natrium-Cacodylatpuffer, pH 7,4.

0,2 M Natrium-Cacodylatpuffer:

21,4 g Na-Cacodylat, dH_2O ad 250 ml. Abpuffern mit 0,1 N HCl auf pH 7,4 (ca. 40 ml). Diese Lösung auf 500 ml auffüllen.

Zur Kontrastverstärkung wurden die Proben anschließend für 1 h bei RT in Osmiumtetroxid (1 % OsO_4 in 0,2 M Natrium-Cacodylat-Puffer) auf dem Schüttler inkubiert. Es folgten drei Spülungen mit je 8 ml dH_2O . Bis zur weiteren Behandlung wurden die Präparate bei 4°C aufbewahrt.

Zur Dehydrierung der Präparate wurde eine Alkoholreihe (Tab. 9) durchgeführt und eine Kritisch-Punkt-Trocknung angeschlossen. Als Kritischer Punkt wird der thermodynamische Zustand eines Stoffes bezeichnet, bei dem sich die Dichten der flüssigen und der Gas-Phase angleichen. Es gibt an ihm keine Unterschiede der beiden Aggregatzustände.

Der Vorteil dieser Methoden ist, dass sie vorhandenes Wasser schonend aus biologischen Proben entfernen und das Auftreten von Artefakten reduzieren. Bei einer Lufttrocknung käme es durch Oberflächenspannungseffekte zu Deformierungen und Schäden.

Tab. 9: Alkoholreihe zur Dehydrierung im Zuge der Probenvorbereitung für das REM

Konzentration	Anzahl der Anwendungen	Dauer der Anwendungen
30 % Ethanol	1	5 min
40 % Ethanol	1	5 min
50 % Ethanol	1	5 min
60 % Ethanol	1	5 min
70 % Ethanol	2	5 min; 10 min
80 % Ethanol	1	5 min
90 % Ethanol	1	5 min
96 % Ethanol	1	5 min
100 % Ethanol	2	10 min; 10 min

Nach der Alkoholreihe wurden die Präparate in die Druckkammer des Kritisch-Punkt-Trockners (Polaron CPD 7501, Quorum Technologies) überführt und die Kammer anschließend mit Aceton gefüllt und verschlossen. Danach wurde die Kammer auf 6°C gekühlt und das Aceton durch flüssiges CO_2 ausgetauscht. Bei einer Temperatur von 31°C und einem Druck von 73,8 bar ist der kritische Punkt für CO_2 erreicht und der Aggregatzustand schlägt von der flüssigen zur gasförmigen Phase um. Die Präparate waren nun trocken. Temperatur und Druck wurden noch weiter erhöht, um

Feuchtigkeitseffekte beim Gasablassen zu vermeiden. Das Gas wurde langsam abgelassen und die Proben nach erfolgtem Druckausgleich entnommen.

Die Präparate wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei RT trocken gelagert. Am folgenden Tag wurden die Proben mit einer selbstklebenden Karbonfolie auf REM-Proben-Tellern befestigt. Vor Auswertung am REM wurden die Präparate mittels PVD gesputtert (Polaron Sputter Coater, Quorum Technologies). Dabei wurde eine dünne Metallschicht (Gold-Palladium) auf die Präparate gebracht (Abb. 13).

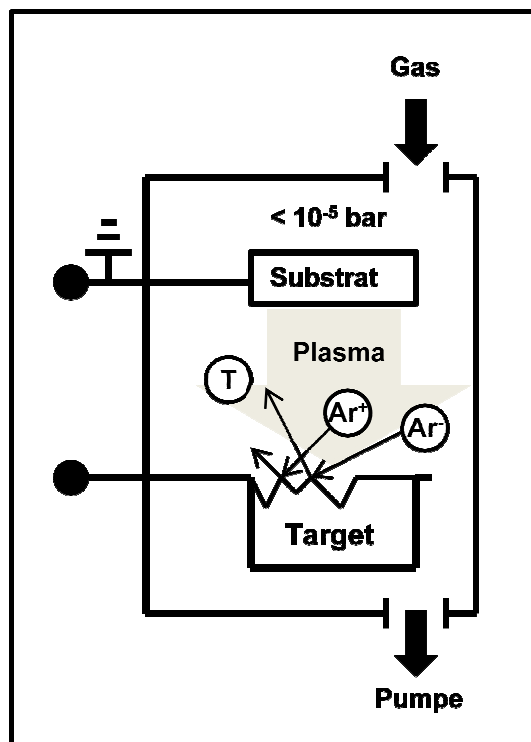


Abb. 13:

Schematische Darstellung der PVD: Durch Glimmentladung erzeugte Ionen schlagen aus der Targetplatte (Kathode) Atome heraus, die sich auf dem Substrat (Anode) absetzen (modifiziert nach Ilschner und Singer 2004).

Bei der Auswertung am REM (FEI XL 30 ESEM FEG, Hillsboro) wurde die vorherrschende Morphologie der HOB auf den Al_2O_3 -Proben exemplarisch im sogenannten SE-Modus fotodokumentiert. Dabei dienen Sekundärelektronen (vgl. oben) als Informationsquelle.

Von allen Proben wurde ein Übersichtsbild in 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Es schlossen sich Aufnahmen in 500-, 1000-, 2000-, 5000-, und 10000-facher Vergrößerung an, in denen einzelne Zellen und Zellregionen näher

betrachtet wurden. Besonders großer Wert wurde auf die Untersuchung der Interaktion zwischen der Zelle und der Al_2O_3 -Proben-Oberfläche gelegt.

Zur systematischen Beschreibung der mittels REM abgebildeten HOB wurden Auswerteparameter gewählt, die hier definiert werden:

Zellintegrität: Sie wird durch Präparationsschäden bestimmt. Eine hohe Zellintegrität weisen diejenigen HOB auf, die während der Probenpräparation nicht beschädigt wurden.

Präparationsschäden: Sie entstehen während der Probenpräparation (z.B. Artefakte durch die Dehydrierung). Sie äußern sich durch Risse in den Zellkörpern und durch Unterbrechungen im Verlauf der Filopodien.

Adhärenz: Eine hohe Adhärenz weisen diejenigen HOB auf, die ohne Abhebungen der Probenoberfläche anliegen.

Abhebungen: Sie stellen eine besondere Form eines Präparationsschadens dar. Es handelt sich um Freiräume zwischen der Probenoberfläche und der Zelle.

Flächige Zellform: Als flächig werden die Zellen bezeichnet, deren Zellkörper sich vor allem horizontal auf der Oberfläche ausbreitet.

Voluminöse Zellform: Als voluminös werden Zellen bezeichnet, die neben der Ausbreitung in die horizontale Richtung auch eine deutliche Ausbreitung in die vertikale Richtung zeigen.

Filopodienbildung: HOB, die viele Filopodien (vgl. 2.8.) ausbilden werden als HOB mit intensiver Filopodienbildung bezeichnet (> 40 pro Zelle nach semiquantitativer Abschätzung).

3.2.3.7. Genexpressionsanalyse zur Bestimmung des Einflusses der Topographie auf die osteoogene Differenzierung

Den Einfluss der Oberflächentopographie der Al_2O_3 -Proben auf die osteogene Differenzierung untersuchten wir in Kooperation mit dem ARI. Dazu wurden die Expressionsmuster verschiedener Markergene der osteogenen Differenzierung analysiert. Am ARI wurden die quantitative Real Time-Polymerasekettenreaktion (q-PCR) und die Auswertung durchgeführt; alle anderen Arbeitsschritte wurden im eigenen Labor geleistet.

Bei den untersuchten Genen handelte es sich um Bone Sialoprotein 2 (BSP2), Collagen 1 (COL1), Osteocalcin (OC), Osteopontin (OPN), Runt-Related

Transcription Factor 2 (RUNX2), Osterix (Sp7 Transcription Factor, SP7) und die Alkalische Phosphatase liver / bone / kidney (ALP).

Der Versuch wurde durchgeführt mit Proben dreier Spender (vgl. 3.3.2.); von diesen Spendern wurden wiederum jeweils zwei Proben untersucht (n = 6). Untersucht wurde das Expressionsmuster der HOB auf den Al₂O₃-DV (UHD- / HD- / MD- / LD-Al₂O₃-DV) und einer Glasprobe.

Um RNase-Freiheit zu garantieren, wurden die Proben gereinigt (vgl. 3.2.3.4) und anschließend 4 h auf 240°C erhitzt. Alle eingesetzten Verbrauchsmaterialien und Lösungen waren laut Hersteller RNase-frei.

Die HOB wurden in einer Dichte von 400 Zellen/mm² ausgesät und unter Standardzellkulturbedingungen inkubiert.

Das Medium wurde aus DMEM und Zusätzen von 15 % FCS und 1 % P/S hergestellt und wurde nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens an Tag 0 (72 h) supplementiert mit Ascorbinsäure (c = 50 µg/ml), Dexamethason (c = 10 nM) und β-Glycerophosphat (c = 5 mM) (Hayes et al. 2010). Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Untersuchungszeitpunkte waren an Tag 0, 7, 14 und 21.

3.2.3.7.1. RNA-Isolierung

Die Proben wurden aus den 6-Wells in frische Wells überführt (vgl. 3.2.3.5.) und jeweils 600 µl TRI-Reagenz und 5 µl Polyacryl-Carrier zugesetzt. Durch mehrmaliges Pipettieren dieser Lösung kommt es zusätzlich zu einer mechanisch bedingten Lyse der Zellen.

TRI-Reagenz ist eine Lösung, die aus Guanidiniumisothiocyanat und Phenol besteht. Es führt zur Lyse der Zellen und löst RNA, DNA und Proteine.

Die Lösung wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und 300 µl 1-Brom-3-Chlorpropan (BCP) zugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden anschließend 15 s manuell geschüttelt und danach für 10 min bei RT inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 12000 g und 4°C. Es bildeten sich drei Phasen aus. In der oberen, wässrigen Phase befindet sich die RNA, in der Interphase die DNA und in der unteren, organischen Phase befinden sich die Proteine.

Zur Fällung der RNA wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und 250 µl Isopropanol (100 %) und 250 µl Hochsalzlösung (0,8 M Natrium-Citrat und 1,2 M Natrium-Chlorid) hinzugefügt. Anschließend wurde

durch Invertieren vermischt, für 10 min bei RT inkubiert und zentrifugiert (vgl. oben). Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet wurde mit 300 µl Ethanol (75 %) gereinigt.

Zur weiteren Aufreinigung der RNA setzten wir ein Kit-System (RNeasy® Mini Kit, Qiagen) gemäß Herstellerangaben ein. Dabei werden die RNA-haltigen Proben auf Säulen gegeben, in denen sich eine Matrix befindet, die RNA spezifisch bindet. Die gebundene RNA wird in mehreren Schritten wieder von der Matrix eluiert (Tab. 10).

Schließlich erhielten wir etwa 50 µl des Eluats, wovon zwei Aliquots zu je 23 µl bei -80°C eingefroren wurden. Der Rest wurde für die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung verwendet.

Tab. 10: Arbeitsschritte RNeasy column zur RNA-Aufreinigung

Schritt	Zentrifugation (8000 g, RT)	Reagens, das auf Säule gegeben wird	Eluat
1	15 s	RNA in 300 µl Ethanol	Verworfen
2	15 s	700 µl RW1-Puffer	Verworfen
3	15 s	500 µl RPE-Puffer	Verworfen
4	2 min	500 µl RPE-Puffer	Verworfen
5	1 min	55 µl DEPC-H ₂ O	In Schritt 6 auf Säule
6	1 min	Eluat aus Schritt 5	Aliquotierung, Reinheits- und Konzentrationsbestimmung

3.2.3.7.2. Bestimmung von Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der isolierten RNA wurden an einem Nanodrop-System (Thermo Fisher, Wilmington) durchgeführt.

Dieses Verfahren nutzt zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösung die Messung der optischen Dichte (OD). Gemessen wurde die Absorption von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm, bei der die aromatischen Ringe der Nukleinsäuren ihre maximale Absorption erreichen. Anhand des Verhältnisses der OD_{260nm} und der OD_{280nm} konnte die Reinheit der Nukleinsäuren bestimmt werden, da Proteine ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm aufweisen. Von uns benutzte RNA sollte einen 260/280 Quotienten im Bereich von 1,8 - 2,2 aufweisen.

3.2.3.7.3. Reverse Transkription

Die Reverse Transkription der isolierten RNA wurde mit einem Kit-System (High-Capacity cDNA Reverse Transcription KIT, Applied Biosystems) durchgeführt. Für die Reverse Transkription von 10 µl RNA wurden 10 µl des 2x RT Master Mixes benötigt (Tab. 11).

Tab. 11: Zusammensetzung des 2x RT Mastermixes

Einzelvolumina
2,0 µl 10x RT Puffer
0,8 µl 25x dNTP Mix (100mM)
2,0 µl 10x RT Random Primer
1,0 µl MultiScribe Reverse Transkriptase
1,0 µl RNase Inhibitor
3,2 µl DEPC-H ₂ O

Der Mastermix wurde durchmischt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. 10 µl des 2x RT Mastermixes wurden mit 10 µl der RNA-Probe in ein PCR-Tube gegeben, sorgfältig gemischt und zentrifugiert (10 s, 8000 g, RT). Bis zur weiteren Analyse im Thermocycler (Gene Amp 2400, Perkin Elmer) wurden die Proben eiskühlt (Tab. 12).

Tab. 12: Temperaturzyklus für die Reverse Transkription

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur [°C]	25	37	85	4
Dauer	10 min	120 min	5 s	∞

Die Reverse Transkriptase synthetisiert analog zur mRNA einzelsträngige cDNA. Die aus maximal sechs Basenpaaren bestehenden Random-Primer sind in der Lage, relativ unspezifisch zu binden. Damit wird gewährleistet, dass die gesamte RNA umgeschrieben wird.

Die gewonnenen cDNA-Proben wurden bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.3.7.4. Quantitative Real Time-PCR

Die Quantifizierung des Genexpressionsmusters wurde von unseren Kooperationspartnern am ARI mittels quantitativer Real Time-PCR (q-PCR) durchgeführt. Sie funktioniert nach den gleichen Prinzipien wie eine herkömmliche PCR. Zudem kann die gewonnene Nukleinsäure mit Hilfe einer Fluoreszenz-Messung quantifiziert werden. Aufgrund seiner hohen Spezifität wurde der TaqMan[®]-Assay (Abb. 14) angewendet. Neben Komponenten für die PCR werden der Probe hierbei TaqMan-Sonden beigefügt. Diese sind wie die Primer für bestimmte Sequenzen der untersuchten Gene komplementär und lagern sich diesen an. Am 5'-Ende besitzen sie einen fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (6-Carboxy-Fluorescein) und am 3'-Ende einen Quencher-Fluoreszenzfarbstoff (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamine). Solange die Sonde intakt ist, unterdrückt die Nähe des Quenchers zum Reporter dessen Fluoreszenz. Sobald die Taq-Polymerase, die neben ihrer Polymeraseaktivität eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbaut, entfernen sich Reporter- und Quencherfarbstoff voneinander. Am Ende der Elongation wird eine steigende Reporter-Fluoreszenz gemessen.

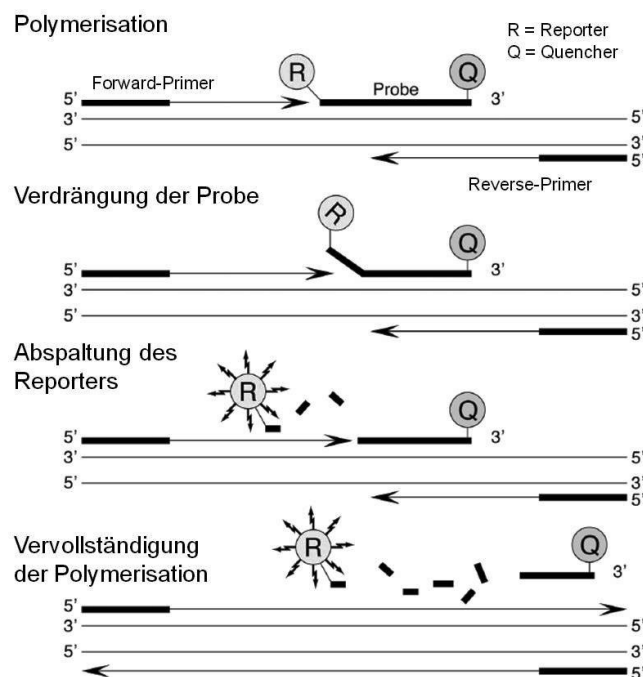


Abb. 14:

Schematische Darstellung eines TaqMan[®]-Real-Time-PCR-Assays. Beschreibung siehe Text (modifiziert nach Applied Biosystems).

Die q-PCR wurde mit einem Real-Time-PCR-System (SDS 7500, Applied Biosystems) durchgeführt. Außerdem wurden ein 2x Gene Expression Master Mix (Tab. 13) sowie Primer-Systeme (Tab. 14) für die entsprechenden Gene eingesetzt.

Tab. 13: Inhaltsstoffe des Gene Expression Master Mix (2x)

Reagens	Funktion
AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, UP (Ultra Pure)	Replikation
Uracil-DNA Glycosylase	Vermeidung von Kontamination
Desoxyuridintriphosphat (dUTP)	Vermeidung von Kontamination
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Bausteine
ROX™ Passive Reference	Interne Referenz zur Normalisierung des Signals des Reporter-Farbstoffes
Puffer	Stabilisierung

Tab. 14: qPCR Primer und TaqMan® Proben zur Analyse der Genexpressionsprofile;
F = Forward, **R** = Reverse

Gen Accession Nr.	Nukleotidsequenzen der Primer (5' zu 3') oder Gene Expression Assay number
BSP2 NM_004967	F TGC CTT GAG CCT GCT TCC R GCA AAA TTA AAG CAG TCT TCA TTT TG Probe CTC CAG GAC TGC CAG AGG AAG CAA TCA
COL1 NM_000088	F CCC TGG AAA GAA TGG AGA TGA T R ACT GAA ACC TCT GTG TCC CTT CA Probe CGG GCA ATC CTC GAG CAC CCT
OC NM_199173	F AAG AGA CCC AGG CGC TAC CT R AAC TCG TCA CAG TCC GGA TTG Probe ATG GCT GGG AGC CCC AGT CCC
OPN NM_000582	F CTC AGG CCA GTT GCA GCC R CAA AAG CAA ATC ACT GCA ATT CTC Probe AAA CGC CGA CCA AGG AAA ACT CAC TAC C
RUNX2 NM_001024630	F AAG CAG TAT TTA CAA CAG AGG GTA CAA G R GGT GCT CGG ATC CCA AAA Probe CAT CAA ACA GCC TCT TCA GCA CAG TGA CAC
Osterix NM_152860	F CCT GCT TGA GGA GGA AGT TCA R GGC TAG AGC CAC CAA ATT TGC Probe TCC CCT GGC CAT GCT GAC GG
ALP	Gene expression assay Nr. Hs00758162_m1
18S rRNA	Gene expression assay Nr. 4310893E

Für die Versuchsdurchführung wurden 2 µl cDNA jeder Probe in jeweils eine Kavität der 96-Well-Mikrotiterplatte zusammen mit der PCR-Reaktionslösung (Tab. 15) gegeben. Das Reaktionsvolumen betrug insgesamt 20 µl.

Das Real-Time-PCR-System erhitze die Proben erst für 10 min auf 95°C, um die Polymerase zu aktivieren. Dem folgten 45 Zyklen, in denen die Proben 15 s zur Denaturierung der DNA auf 95°C und 60 s auf 60°C für das Annealing (Anlagerung des Primers an das DNA-Template) und die Synthese erwärmt wurden.

Tab. 15: Zusammensetzung der PCR-Reaktionslösung

Reagens	Endkonzentration in DEPC-H ₂ O
Forward-Primer	900 nM
Reverse-Primer	900 nM
TaqMan [®] probe (oder 1 µL 20x primer-probe concentrate for gene expression assays)	250 nM
Gene Expression Master Mix	1x

3.2.3.7.5. Auswertung der Genexpression

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte ebenfalls beim Kooperationspartner ARI. Die Expressionsmuster der untersuchten Gene wurde nach der Methode zur relativen Quantifizierung ($\Delta\Delta C_t$) an denen der ribosomalen 18S-RNA normalisiert (Hayes et al. 2010). Die unterschiedliche Genexpression wurde dann als n-fache Expression gegenüber den Werten der Glasprobe der entsprechenden Zeitpunkte mit Hilfe des $\Delta\Delta C_t$ -Wertes angegeben. So konnten Differenzen in der Genexpression unabhängig von der Menge der eingesetzten RNA untersucht werden.

Zur statistischen Analyse wurden die Ergebnisse Log2 transformiert. Anschließend wurde eine ANOVA mit nachfolgendem Post-hoc-Test durchgeführt, um Unterschiede in der Genexpression der HOB auf den untersuchten Oberflächen im Vergleich zur Glasprobe zu identifizieren. Das Signifikanzniveau betrug $p < 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1. Materialwissenschaftliche Charakterisierung

4.1.1. Transparenz

Während UHD- Al_2O_3 -DV als opake Probe beinahe lichtundurchlässig ist, ist LD- Al_2O_3 -DV zu etwa 90 % lichtdurchlässig. Die als Hintergrundkontrolle eingesetzte Glasprobe wies erwartungsgemäß einen Transmissionsgrad von 100 % auf.

Der Einsatz des Lasers erhöht zum Teil die Transparenz der Proben. Dieser Trend konnte allerdings nicht für HD-3x / MD-3x- Al_2O_3 -LV beobachtet werden (Abb. 15).

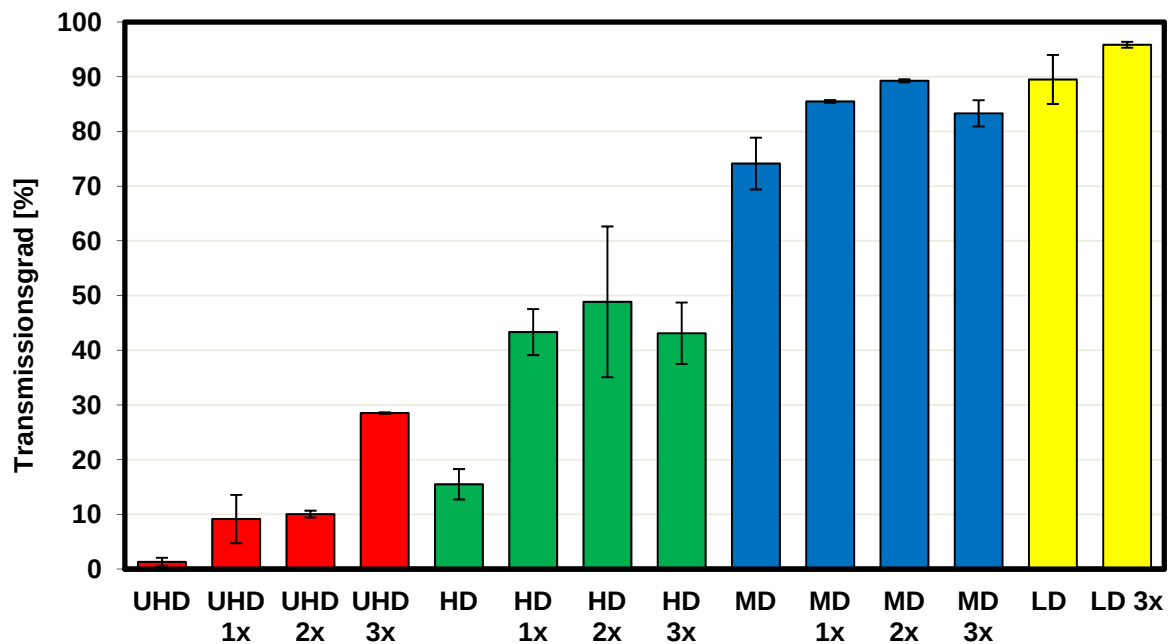


Abb. 15:

Transmissionsgrade der Al_2O_3 -Proben. Gezeigt ist der mittlere Transmissionsgrad ($n = 5$) mit Standardabweichung. Der Transmissionsgrad sinkt mit zunehmender Abscheidungsdauer und NW-Dichte.

4.1.2. Benetzbarkeit

Die durchschnittlichen Wasserkontaktwinkel der Proben sind im Bereich zwischen 5° und 90° . Dem entsprechend lassen sich alle Oberflächen als hydrophil

charakterisieren. Die Oberfläche von HD- Al_2O_3 -DV weist als einzige superhydrophile Eigenschaften auf ($4,3^\circ$). Die Wasserkontaktwinkel der Al_2O_3 -DV wiesen Werte in dem Bereich $< 10^\circ$ auf. Al_2O_3 -LV waren immer hydrophober als die entsprechenden Al_2O_3 -DV. Allerdings konnte kein konsequenter Zusammenhang zwischen Anzahl der Laserpulse und Zunahme der Hydrophobie hergestellt werden (Abb. 16).

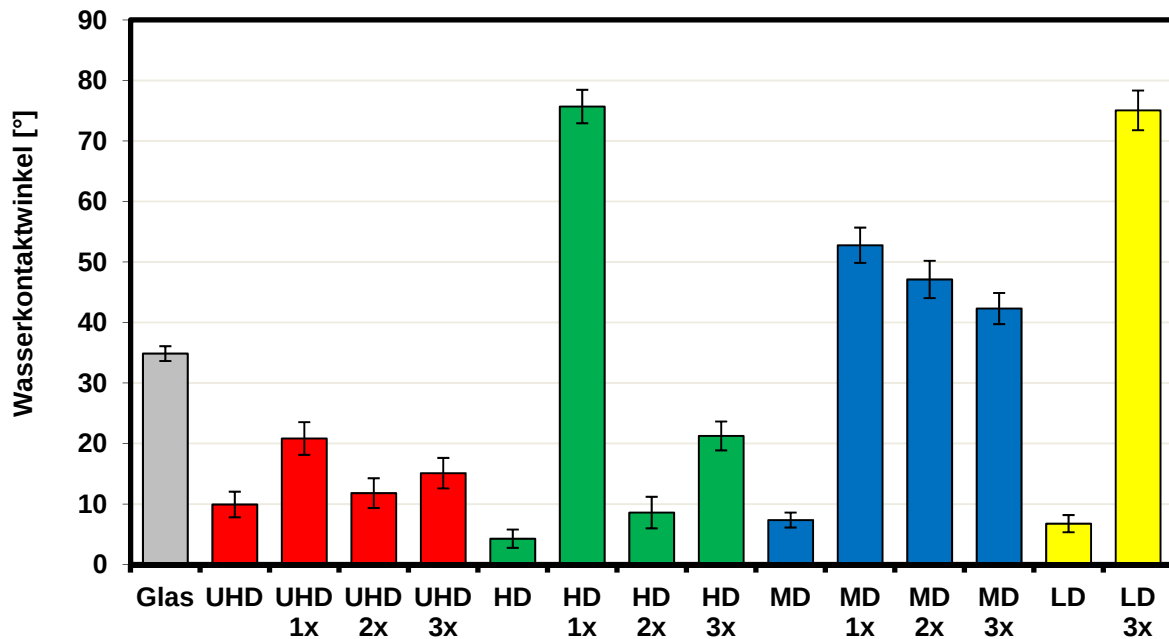


Abb. 16:

Wasserkontaktwinkel der Glas- und Al_2O_3 -Proben. Gezeigt ist der mittlere Wasserkontaktwinkel ($n = 5$) und die Standardabweichung. Alle Proben sind hydrophil, wobei der Lasereinsatz die Hydrophilie generell herabsetzt.

4.1.3. Oberflächenchemie

Mittels XPS konnte nachgewiesen werden, dass sich die unterschiedlichen Al_2O_3 -Proben hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung nicht unterscheiden. Die XPS-Spektren der Al_2O_3 -Proben weisen charakteristische Verläufe auf; dabei beruhen die Peaks auf $\text{Al}2p$ -, $\text{Al}2s$ -, $\text{O}1s$ - und $\text{C}1s$ -Kern-Elektronen (Abb. 17). Außerdem wurden O (KKL) Auger-Signale detektiert. Die Spektren aller Al_2O_3 -Proben wiesen gleiche Verhältnisse der Peaks zueinander auf. Das lässt den Schluss zu, dass alle Beschichtungen eine identische chemische Zusammensetzung aufweisen.

Exemplarisch sind die Spektren für UHD- Al_2O_3 -DV und deren Laservariationen (UHD-1x / 2x / 3x- Al_2O_3 -LV) abgebildet. Die nicht abgebildeten Spektren für die restlichen Al_2O_3 -Proben sind entsprechend.

Der C1s-Peak steht für die Anwesenheit von Kohlenstoff. Der Kohlenstoffgehalt der Proben blieb immer (Laser-unabhängig) unter 5 %.

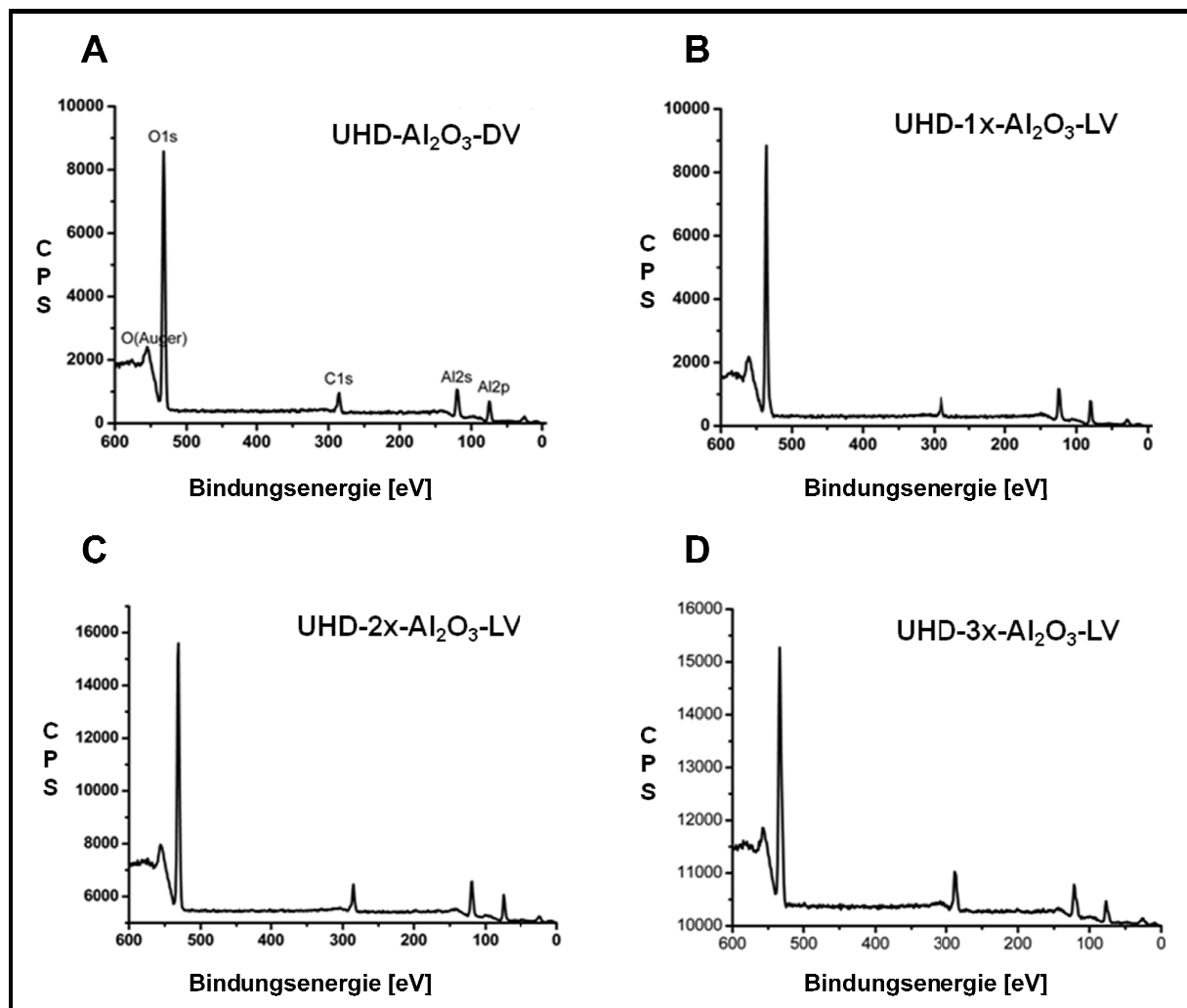


Abb.17:

XPS-Spektren UHD- Al_2O_3 -DV (A), UHD-1x (B) / 2x (C) / 3x (D)- Al_2O_3 -LV. Die Verhältnisse der Peaks entsprechen einander und beweisen die identische chemische Zusammensetzung der Al_2O_3 -Proben. CPS = Counts per second (dt.: Zählimpulse pro Sekunde). Quelle: INM.

4.1.4. Rauheit

Die mittlere Rauheit R_a der Al_2O_3 -DV befindet sich stets in einem Bereich zwischen 6 und 10 nm. Also beeinflusst die Länge der Abscheidungsdauer die Rauheit nicht oder nur minimal. R_a wird durch Lasereinsatz größer und nimmt mit Anzahl der Laserpulse zu (Abb. 18). Diese Tendenz konnte nicht immer bestätigt werden (Ausnahmen: HD-2x / 3x- Al_2O_3 -LV; MD-2x / 3x- Al_2O_3 -LV; LD- Al_2O_3 -DV / LD-3x- Al_2O_3 -LV). Am stärksten war die Zunahme der Rauheit durch den Lasereinsatz bei UHD- und HD- Al_2O_3 -LV im Vergleich zu den entsprechenden Dichtev Variationen.

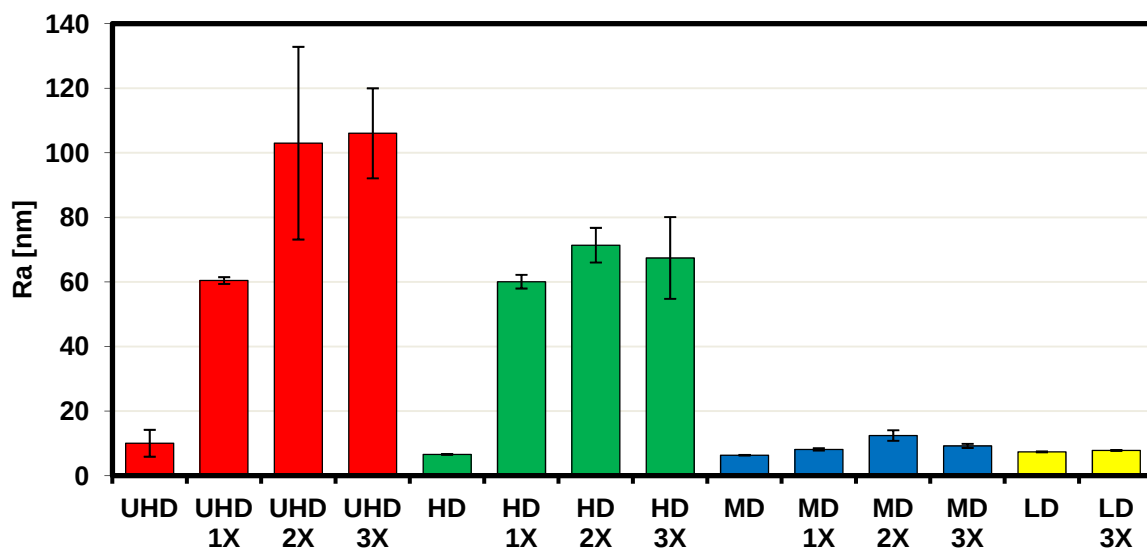


Abb. 18:

Rauheit der Al_2O_3 -Proben. Gezeigt ist die mittlere Rauheit ($n = 5$) und die Standardabweichung. Während sich die Rauheit der Al_2O_3 -DV kaum unterscheidet, steigt sie durch Lasereinsatz vor allem bei UHD- / HD- Al_2O_3 -LV.

4.1.5. Morphologie

UHD- Al_2O_3 -DV und Laservariationen (UHD-1x / 2x / 3x- Al_2O_3 -LV):

Makroskopisch sind UHD- Al_2O_3 -DV opake, schwarze Schichten (Abb. 19). Im REM zeigt sich das Bild der Oberfläche durch NW geprägt. Sie haben einen Durchmesser von 20 - 30 nm (Abb. 20 A) und ihre Länge beträgt wenige Mikrometer. Ihre Dichte ist so hoch, dass keine Zwischenräume in der Aufsicht erkennbar sind. Sie sind sehr chaotisch angeordnet und erinnern an Spaghetti.

Nach einem Laserimpuls (UHD-1x-Al₂O₃-LV) offenbarte sich makroskopisch eine Farbveränderung von Schwarz zu Weiß (Abb. 19). In der REM-Aufnahme imponierte ein erstarrter Layer, der die NW zu bedecken scheint (Abb. 21 A, B, C).

Nach zwei Laserimpulsen (UHD-2x Al₂O₃-LV) verstärkte sich die Farbveränderung in Richtung Weiß (Abb. 19). In der REM-Aufnahme wurde die Oberfläche glatter. Allerdings ließen sich zum Teil noch NW in den Poren des Layers erkennen (Abb. 22 A, B, C). Außerdem fielen Mikropartikel auf (Abb. 22 A, B), deren Größe bei ca. 3 - 5 µm liegt.

Nach drei Laserimpulsen wurde die Al₂O₃-Probe (UHD-3x-Al₂O₃-LV) noch heller (Abb. 19). Im REM waren ebenso wie nach zwei Laserimpulsen Mikropartikel zu sehen (Abb. 23 A, B, C).

HD-Al₂O₃-DV und Laservariationen (HD-1x / 2x / 3x-Al₂O₃-LV):

Makroskopisch war für HD-Al₂O₃-DV im Vergleich zu UHD-Al₂O₃-DV eine Abnahme der Opazität auffällig (Abb. 19). Die REM-Aufnahmen zeigten eine verminderte Länge und Dichte bei gleichbleibendem Durchmesser der NW (Abb. 20 B). NW bedecken die gesamte Oberfläche und lassen keine Zwischenräume erkennen. Sie erscheinen wegen der geringeren Länge weniger chaotisch.

Nach einem Laserimpuls wurde die Al₂O₃-Probe (HD-1x-Al₂O₃-LV) heller (Abb. 19). Im REM konnte auch hier ein Layer ausgemacht werden (Abb. 21 D, E, F). Die von ihm bedeckten NW können in der Aufsicht hinsichtlich ihrer Beschaffenheit nicht beurteilt werden.

HD-2x-Al₂O₃-LV nimmt an Transparenz zu (Abb. 19). Mikroskopisch ist eine glatte Oberfläche zu erkennen (Abb. 22 D, E, F); NW sind nicht erkennbar.

Nach dem dritten Laserimpuls wurde die Al₂O₃-Probe (HD-3x-Al₂O₃-LV) noch transparenter. (Abb. 19). Hier scheinen sich kleinere Mikropartikel (ca. 300 nm) aus dem Layer gebildet zu haben (Abb. 23 D, E, F).

MD-Al₂O₃-DV und Laservariationen (MD-1x / 2x / 3x-Al₂O₃-LV):

MD-Al₂O₃-DV imponiert durch eine höhere Transparenz (Abb. 19) als die zuvor genannten Al₂O₃-DV. Im REM wird Abnahme von Länge und Dichte der NW deutlich (Abb. 20 C), wobei der Durchmesser der NW unverändert ist. Es sind zwischen den einzelnen NW freie Bereiche erkennbar. Dennoch wird der Großteil der Oberfläche von NW bedeckt.

MD-1x / 2x / 3x-Al₂O₃-LV nehmen makroskopisch jeweils an Transparenz zu (Abb. 19).

Unter REM-Betrachtung wies MD-1x-Al₂O₃-LV eine recht glatte Oberfläche auf (Abb. 21 G, H, I). Layer, Mikropartikel oder Strukturen, die den NW ähneln, waren nicht zu sehen.

Weitere Laserbehandlungen hinterließen mikroskopisch eine ungleichmäßige Oberfläche (Abb. 22 G, H, I / 23 G, H, I).

LD-Al₂O₃-DV und Laservariation (LD-3x-Al₂O₃-LV):

LD-Al₂O₃-DV zeichnet sich durch ihre hohe Transparenz aus (Abb. 19).

Rasterelektronenmikroskopisch sind Kürze und geringe Dichte bei unverändertem Durchmesser der NW auffallend (Abb. 20 D). Zwischen NW befinden sich größere Zwischenräume, die die einzelnen NW isolieren.

Nach drei Laserimpulsen (LD-3x-Al₂O₃-LV) wurde die Transparenz höher (Abb. 19). Mikroskopisch ist die Oberfläche relativ gleichmäßig (Abb. 23 J, K, L). NW, ein Layer oder Mikropartikel sind nicht zu sehen.

Zusammenfassung:

- Al₂O₃-DV:

- Abnahme der Opazität mit abnehmender Abscheidungszeit
- Abnahme der Dichte der NW mit abnehmender Abscheidungszeit
- Abnahme der Länge der NW mit abnehmender Abscheidungszeit
- Abnahme der chaotischen Anordnung der NW mit abnehmender Abscheidungszeit
- Unveränderter Durchmesser der NW (ca. 20 - 30 nm) (Veith et al. 2008)

- Al₂O₃-LV:

- Laserbehandlung führt teilweise zu mikro- und nanostrukturierten Oberflächen
 - o Layer-Bildung (UHD-1x / 2x-Al₂O₃-LV und HD-1x / 2x-Al₂O₃-LV)
 - o NW werden durch Laser zerstört (zumindest der „oberste Bereich“ - bei UHD-Al₂O₃-LV sind unter dem Layer noch persistierende NW zu sehen)
 - o Mikropartikel auf UHD-2x / 3x-Al₂O₃-LV (3 - 5 µm) und auf HD-3x-Al₂O₃-LV (ca. 300 nm)
- Laserbehandlung von MD-Al₂O₃-DV führt teilweise zu einer ungleichmäßigen Oberfläche (MD-2x / 3x-Al₂O₃-DV)

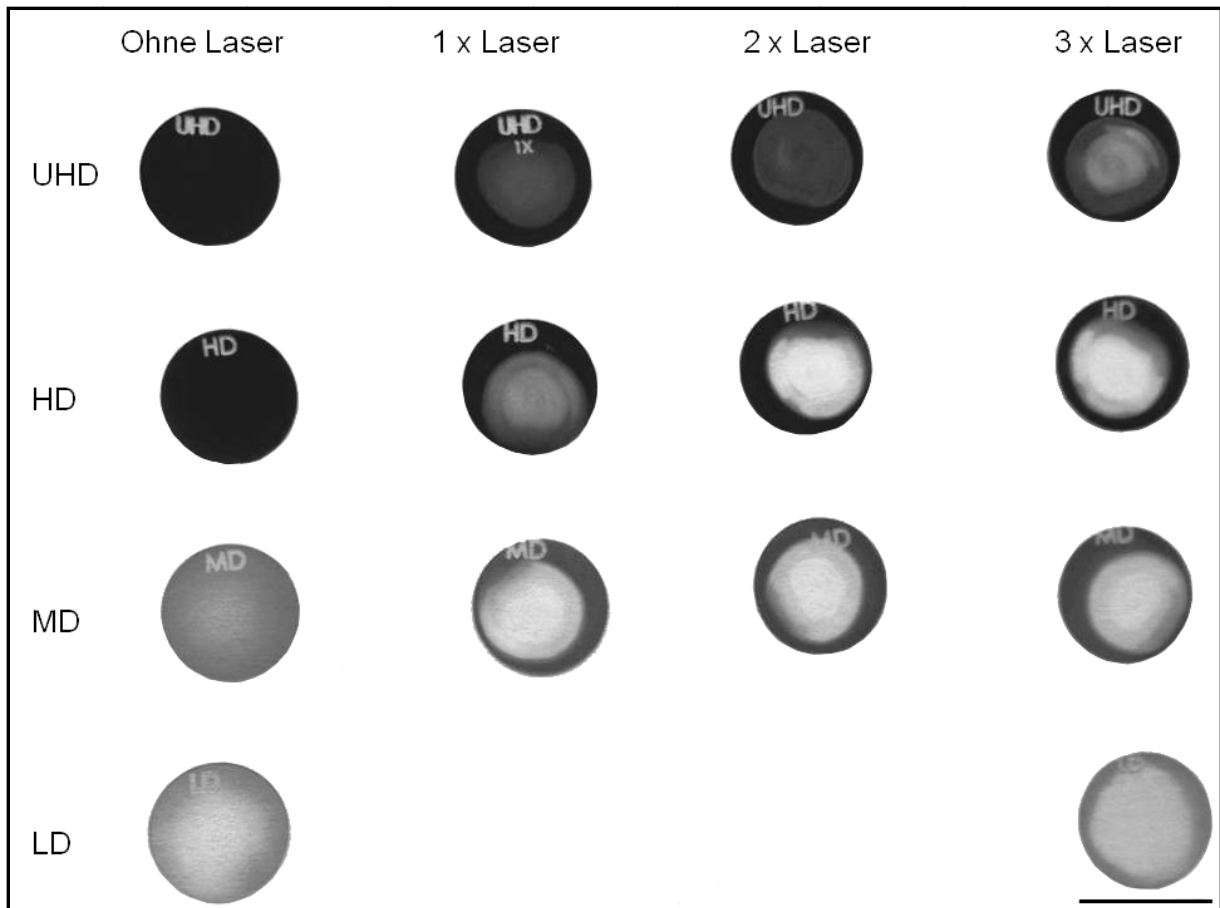


Abb. 19:

Makroskopische Darstellung der Al_2O_3 -Proben. Mit abnehmender Dichte und zunehmender Anzahl der Laserpulse nimmt die Opazität ab. Maßstabsbalken: 15 mm.

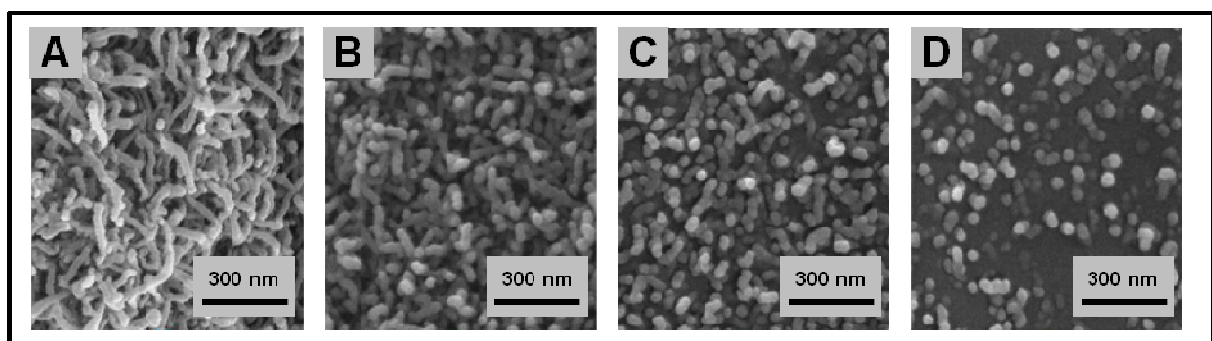


Abb. 20:

REM-Aufnahmen der Al_2O_3 -DV: UHD- Al_2O_3 -DV (A), HD- Al_2O_3 -DV (B), MD- Al_2O_3 -DV (C) und LD- Al_2O_3 -DV (D). Auffallend sind abnehmende Länge und Dichte der NW. Quelle: INM.

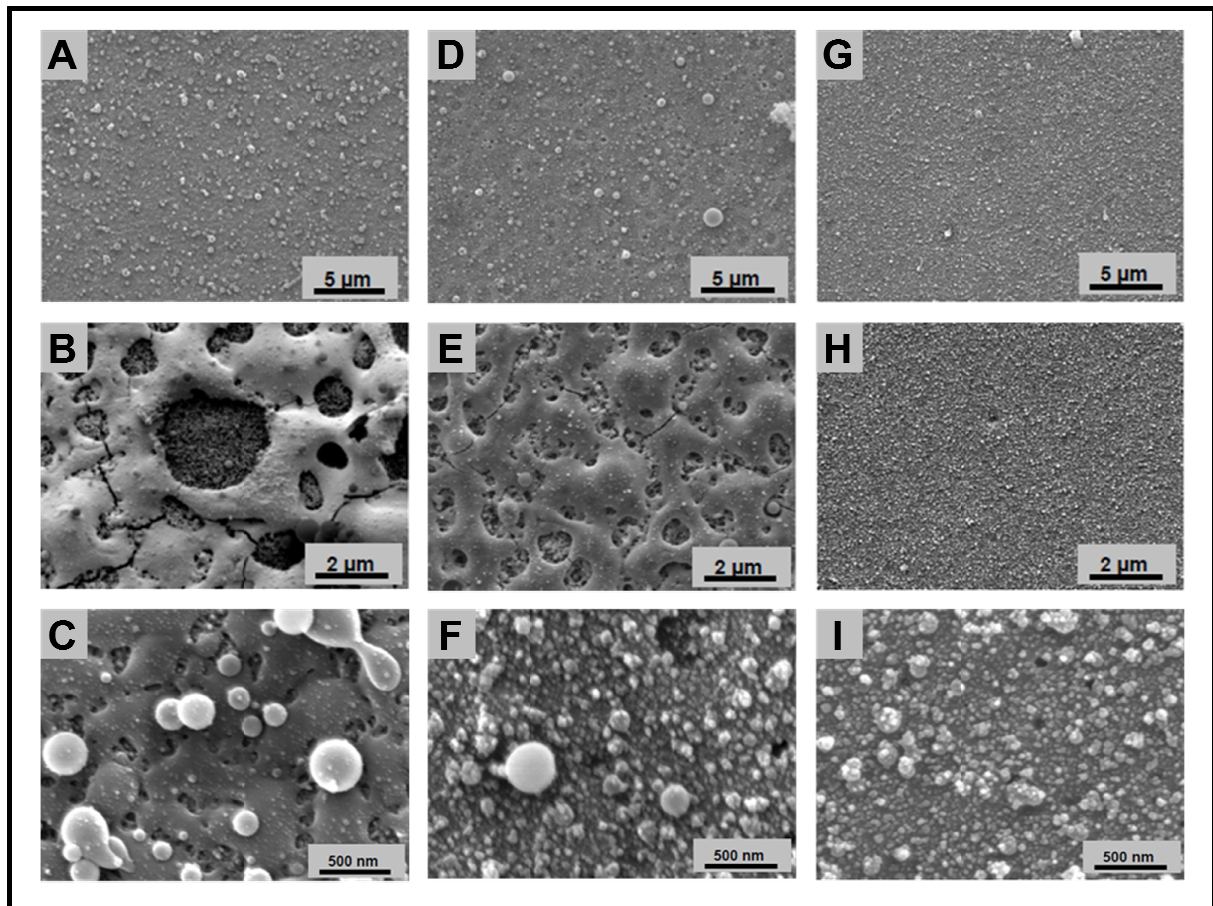


Abb. 21:

REM-Aufnahmen der 1x-Al₂O₃-LV in unterschiedlichen Vergrößerungen: UHD-1x-Al₂O₃-LV (A, B, C), HD-1x-Al₂O₃-LV (D, E, F) und MD-1x-Al₂O₃-LV (G, H, I). Beschreibung siehe Text. Quelle: INM.

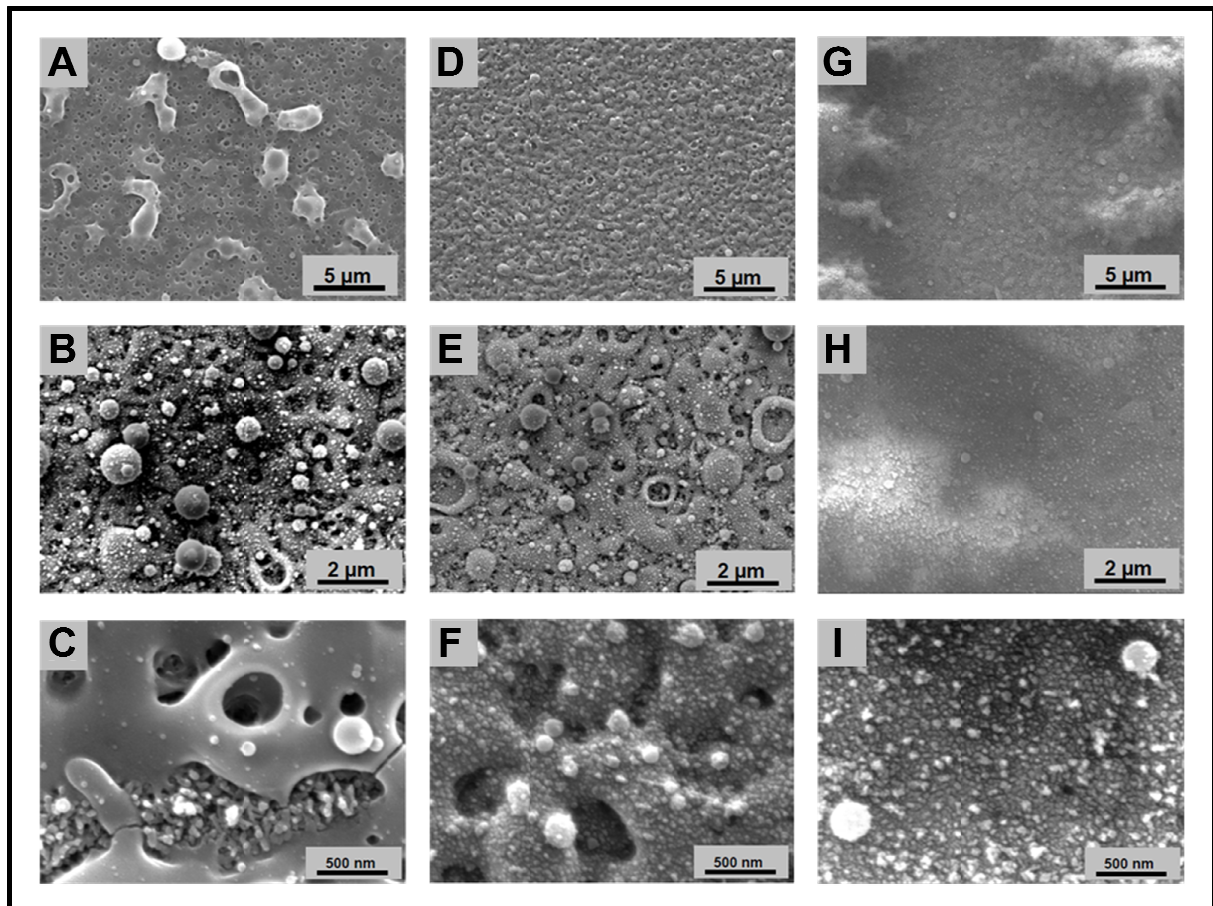


Abb. 22:

REM-Aufnahmen der $2x\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-LV}$ in unterschiedlichen Vergrößerungen: UHD- $2x\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-LV}$ (A, B, C), HD- $2x\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-LV}$ (D, E, F) und MD- $2x\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-LV}$ (G, H, I). Beschreibung siehe Text. Quelle: INM.

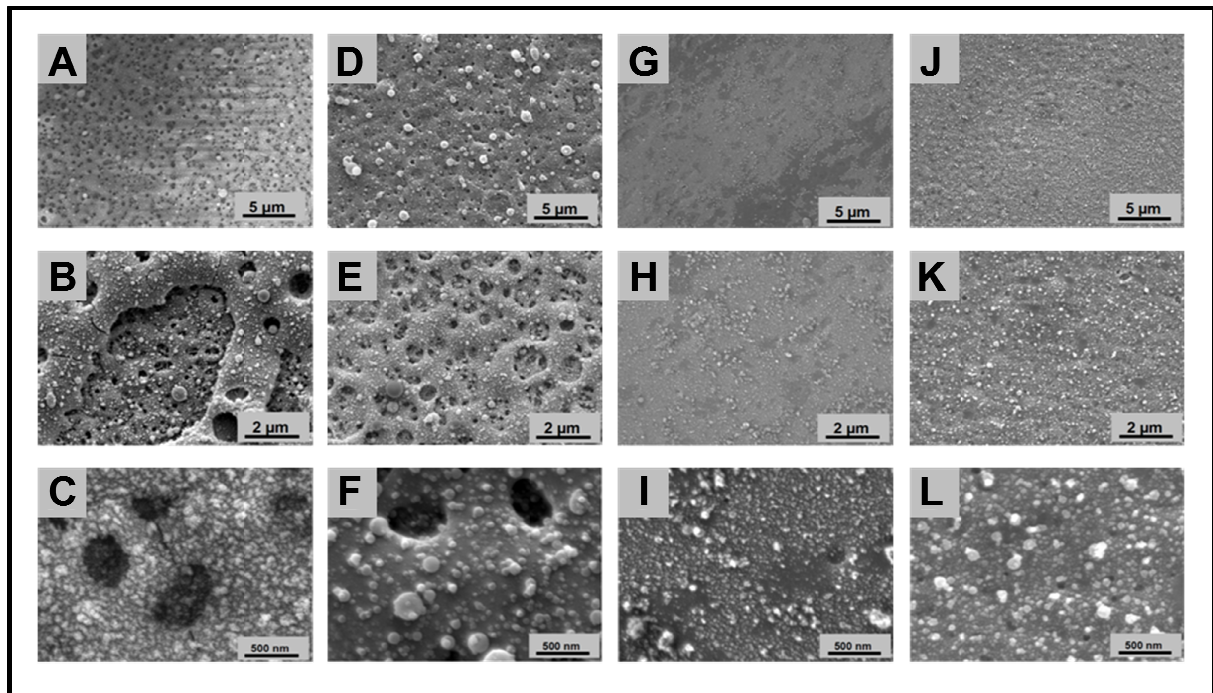


Abb. 23:

REM-Aufnahmen der 3x-Al₂O₃-LV in unterschiedlichen Vergrößerungen: UHD-3x-Al₂O₃-LV (A, B, C), HD-3x-Al₂O₃-LV (D, E, F), MD-3x-Al₂O₃-LV (G, H, I) und LD-3x-Al₂O₃-LV (J, K, L). Beschreibung siehe Text. Quelle: INM.

4.2. Zellkompatibilität

4.2.1. Wachstumsverhalten

Erwartungsgemäß wurde nach 48-stündiger Kultivierung auf allen untersuchten Schichten eine höhere Zelldichte und höhere mittlere Zellfläche im Vergleich zu den Werten nach 6-stündiger Inkubation festgestellt (Abb. 24 - 27). Insgesamt zeigte sich für beide untersuchten Zeitpunkte keine signifikante Verschlechterung des Zellwachstums gegenüber Glas. Zum Teil waren Zelldichte und Zellfläche auf den Al₂O₃-Proben gegenüber der Glasprobe erhöht.

Auch Zwischen den verschiedenen Al₂O₃-Proben gab es zu beiden Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede in der Zelldichte (Abb. 24 und 25).

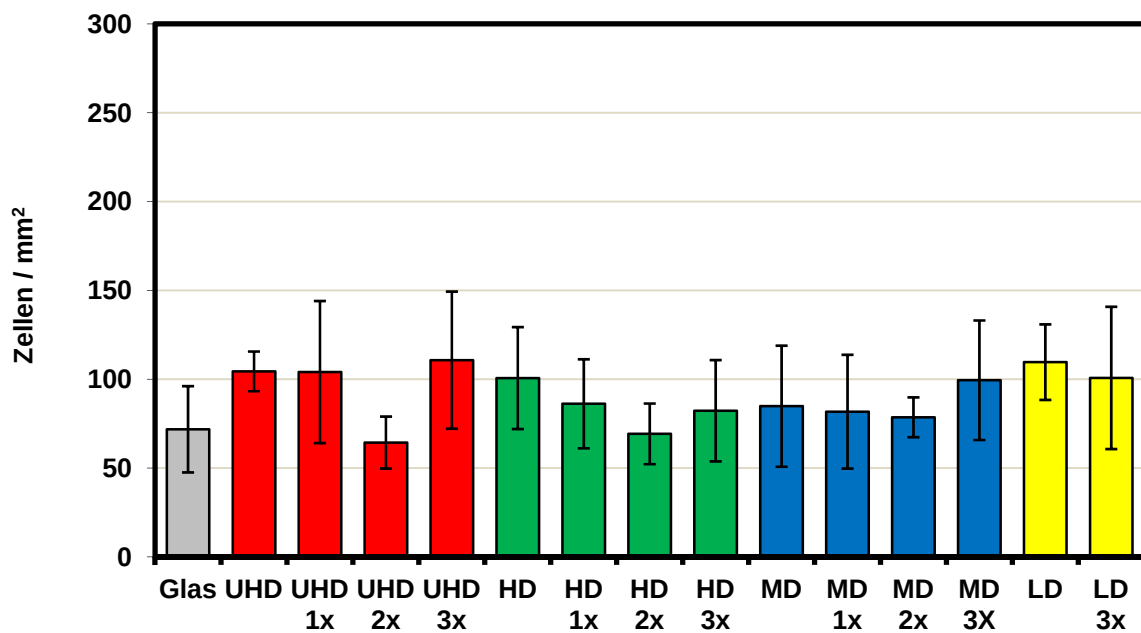


Abb. 24:

Zelldichte („frühe Adhäsion“, 6 h nach Aussaat). Gezeigt ist die mittlere Zelldichte und die Standardabweichung ($n = 5$; $p < 0,05$). Die Zelldichte ist auf den Al_2O_3 -Proben nicht vermindert im Vergleich zur Glasprobe.

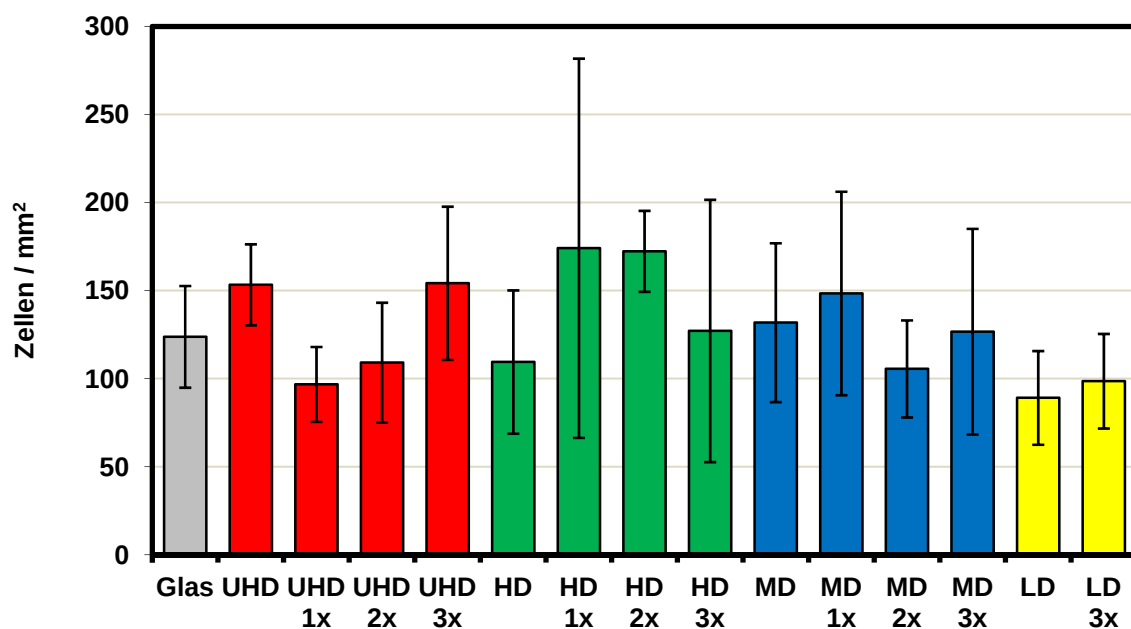


Abb. 25:

Zelldichte („späte Adhäsion“, 48 h nach Aussaat). Gezeigt ist die mittlere Zelldichte und die Standardabweichung ($n = 5$; $p < 0,05$). Die Zelldichte ist auf den Al_2O_3 -Proben nicht vermindert im Vergleich zur Glasprobe.

Die mittlere Zellfläche war zum früheren Zeitpunkt signifikant ($p < 0,05$) größer auf der Glasprobe sowie auf HD- Al_2O_3 -DV im Vergleich zu UHD- Al_2O_3 -DV und UHD-1x- Al_2O_3 -LV (Abb. 26). Dieses Adhäsionsverhalten konnte zum späten Zeitpunkt nicht bestätigt werden (Abb. 27). Hier war die Zellfläche auf UHD-2x- Al_2O_3 -LV signifikant größer als auf UHD-3x- Al_2O_3 -LV, HD-1x / 2x / 3x- Al_2O_3 -LV, MD-1x / 2x / 3x- Al_2O_3 -LV und LD-3x- Al_2O_3 -LV.

Bemerkenswert ist die Zunahme der mittleren Zellfläche von UHD- Al_2O_3 -DV und UHD-1x- Al_2O_3 -LV. 6 h nach Aussaat war sie signifikant reduziert, nach 48 h waren die Zellflächen auf diesen Proben (tendenziell) größer als auf Glas.

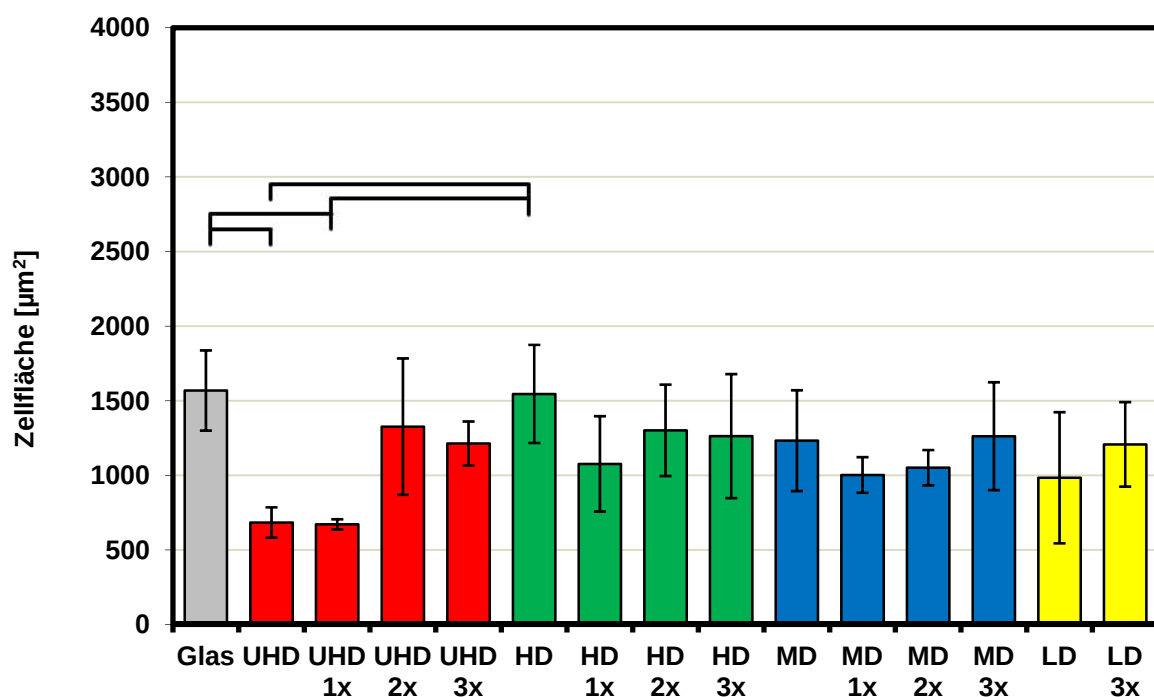


Abb. 26:

Zellfläche („frühe Adhäsion“, 6 h nach Aussaat). Gezeigt ist die mittlere Zellfläche und die Standardabweichung ($n = 5$; $p < 0,05$). Im Allgemeinen ist die Zellfläche auf Al_2O_3 -Proben nicht reduziert im Vergleich zur Glasprobe. Signifikant geringere Zellflächen waren lediglich auf UHD- Al_2O_3 -DV und UHD-1x- Al_2O_3 -LV vorhanden.

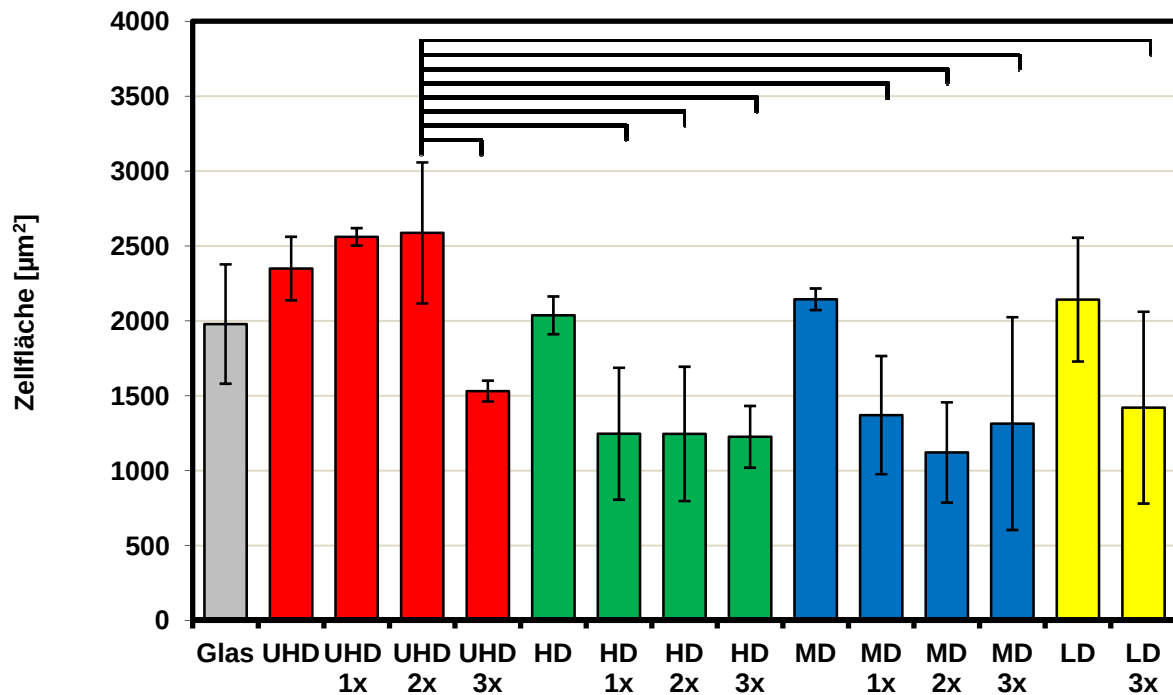


Abb. 27:

Zellfläche („späte“ Adhäsion, 48 h nach Aussaat). Gezeigt ist die mittlere Zellfläche und die Standardabweichung ($n = 5$; $p < 0,05$). Im Allgemeinen ist die Zellfläche auf Al_2O_3 -Proben nicht reduziert im Vergleich zur Glasprobe. Die Zellfläche ist auf UHD-2x- Al_2O_3 -LV signifikant größer als auf UHD-3x- Al_2O_3 -LV, HD-1x / 2x / 3x- Al_2O_3 -LV, MD-1x / 2x / 3x- Al_2O_3 -LV und LD-3x- Al_2O_3 -LV.

4.2.2. Zellviabilität

4.2.2.1. WST-Vorversuch

Im WST-Vorversuch wurden optimale Aussaatdichte und Inkubationsdauer ermittelt. Diese Parameter haben im Bereich eines starken linearen Anstiegs der relativen Absorption bei hohen absoluten Werten eine sehr gute Sensitivität, um Unterschiede in der allgemeinen Viabilität der HOB zu detektieren.

Die relative Absorption nahm mit steigender Aussaatdichte und mit der Inkubationsdauer zu (Abb. 28). Bei der Aussaatdichte von 588 bis 1470 Zellen/ mm^2 und einer 4 h Inkubationsdauer liegen zugleich hohe Werte der relativen Absorption und eine starke Zunahme der relativen Absorption vor.

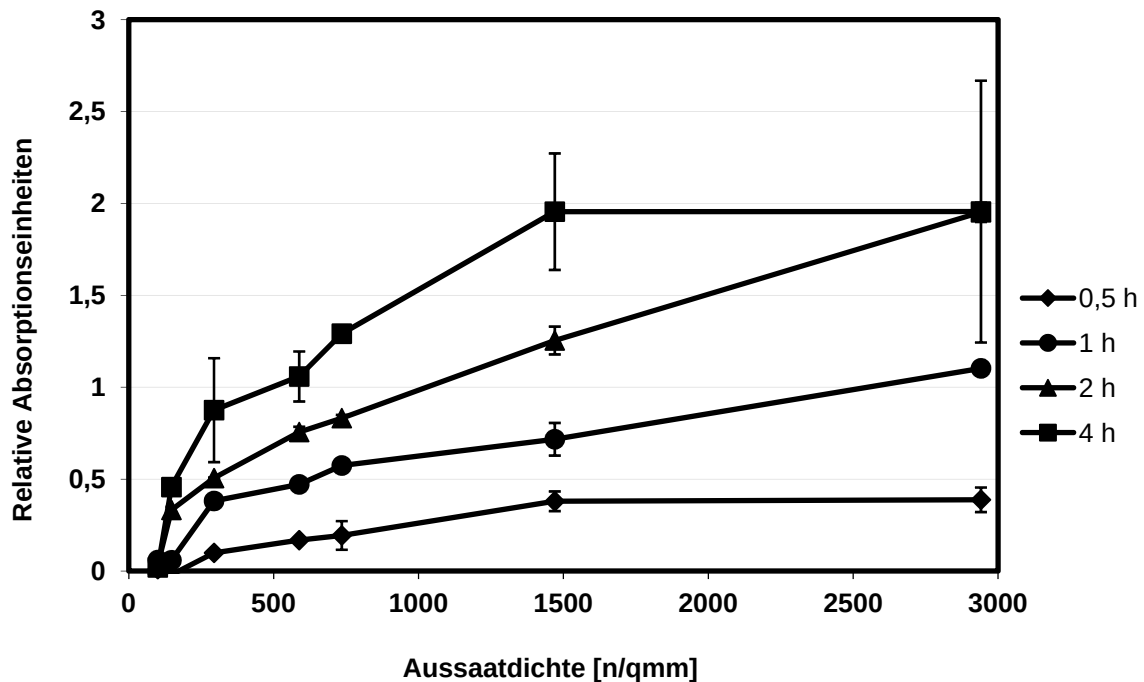


Abb. 28:

Relative Absorption bei verschiedenen Aussaatdichten und Inkubationszeiten. Gezeigt sind die mittleren relativen Absorptionseinheiten ($n = 3$) und die Standardabweichung. Die relative Absorption weist um 735 Zellen/mm² und einer Inkubationszeit von 4 h hohe Werte auf und ändert sich in diesem Bereich deutlich.

4.2.2.2. WST-Test

Mit Hilfe des WST-Tests wurde mit den im Vorversuch als optimal ermittelten Parametern (735 Zellen/mm², 4 h Inkubationszeit) die allgemeine metabolische Aktivität der auf der Glas- und den Al₂O₃-Proben kultivierten HOB als Maß ihrer Viabilität untersucht. Je nach Probe konnten Aktivitätsniveaus nachgewiesen werden, die sich teils signifikant ($p < 0,05$) voneinander unterscheiden. Aufgrund der besseren Übersichtlichkeit werden hier nur entscheidende Trends erläutert. In der Abbildung 29 sind alle Signifikanzen beinhaltet.

UHD-Al₂O₃-DV und ihre Laservariationen unterschieden sich weder signifikant in ihrem Aktivitätsniveau untereinander noch von der Glasprobe. HD-Al₂O₃-DV und die entsprechenden Laservariationen unterschieden sich nicht signifikant untereinander und mit der Ausnahme von HD-3x-Al₂O₃-LV auch nicht von der Glasprobe. Zwischen LD-Al₂O₃-DV und LD-3x-Al₂O₃-LV und der Glasprobe gab es keine signifikanten Unterschiede. Auf MD-Al₂O₃-DV und deren Laservariationen unterschieden sich die

Aktivitäten nicht signifikant untereinander; im Vergleich zur Glasprobe wiesen diese Proben alle eine reduzierte Aktivität auf. Auch der Vergleich von MD-Al₂O₃-DV und entsprechenden Laservariationen mit anderen Proben ergab, dass hier die Aktivität niedriger ist; so war sie auf MD-2x / 3x-Al₂O₃-LV signifikant geringer als auf den meisten übrigen Proben.

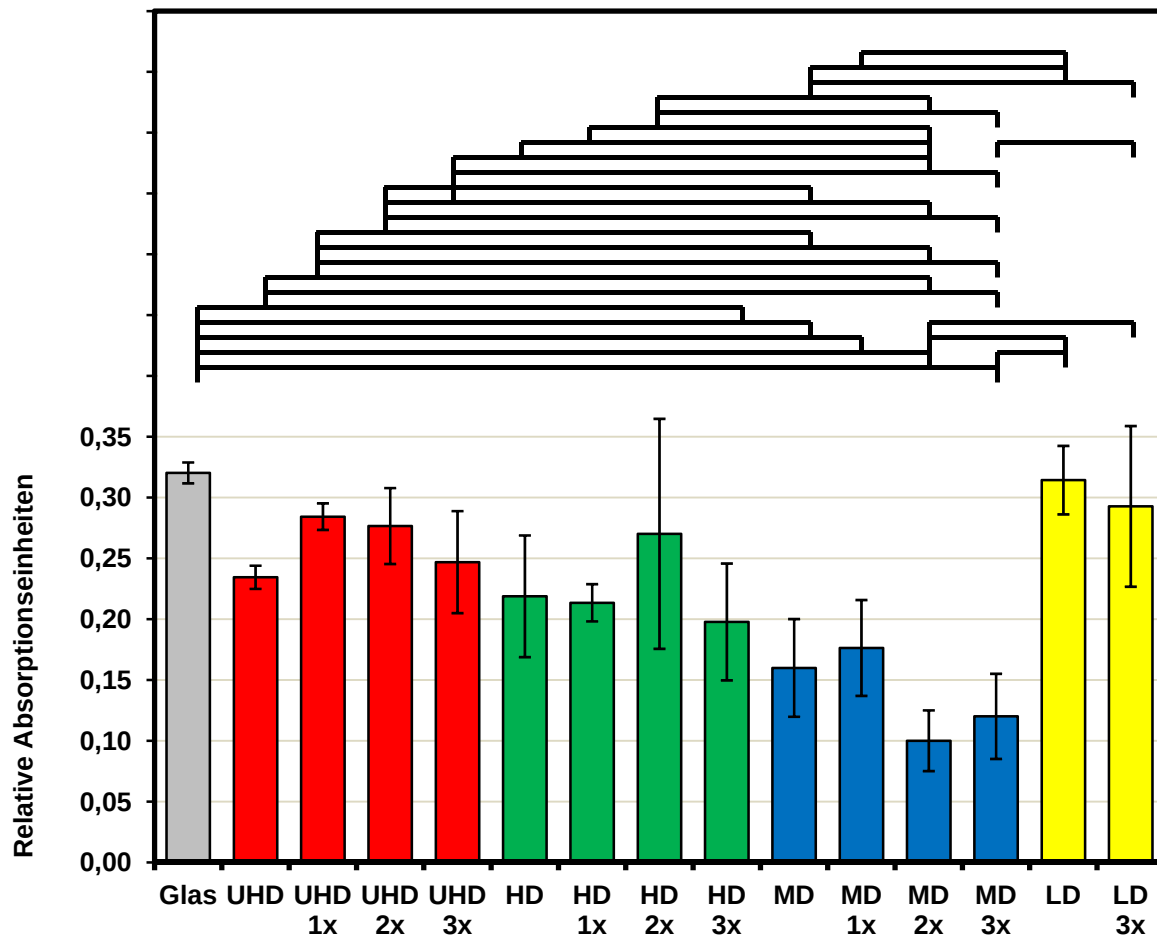


Abb. 29:

Relative Absorption im WST-Test. Gezeigt sind die mittleren relativen Absorptionseinheiten und die Standardabweichung (n = 3; p < 0,05). Besonders geringes Aktivitätsniveau der HOB war auf MD-2x / 3x-Al₂O₃-LV zu sehen.

4.2.3. Zellmorphologie

In den Übersichtsaufnahmen, erstellt mit einer niedrigen Vergrößerung (100-fach) von HOB, die 48 h auf Glas- und Al₂O₃-Proben kultiviert wurden, zeigten sich deutliche Unterschiede in der Adhärenz abhängig von der untersuchten Probe.

Aufgrund der besseren Übersichtlichkeit sind exemplarische Abbildungen gezeigt (Abb. 30).

Einerseits adhärten die Zellen so stark auf den Oberflächen, dass sie sich auch nach der Probenpräparation für das REM nicht oder nur minimal von der Oberfläche abhoben (Glasprobe, UHD-1x / 2x / 3x-Al₂O₃-LV, HD-1x / 2x / 3x-Al₂O₃-LV, MD-Al₂O₃-DV, MD-1x / 2x / 3x-Al₂O₃-LV, LD-Al₂O₃-DV, LD-3x-Al₂O₃-LV). Andererseits gab es Oberflächen, auf denen HOB, schon in der Übersicht erkennbar, teilweise Abhebungen aufwiesen (UHD- und HD-Al₂O₃-DV).

Weiter fiel bereits bei niedriger Vergrößerung wie in der materialwissenschaftlichen Charakterisierung (vgl. 4.1.5) auf, dass die Laserbehandlung bei bestimmten Proben (MD-2x / 3x-Al₂O₃-LV) eine ungleichmäßige Oberfläche hinterließ.

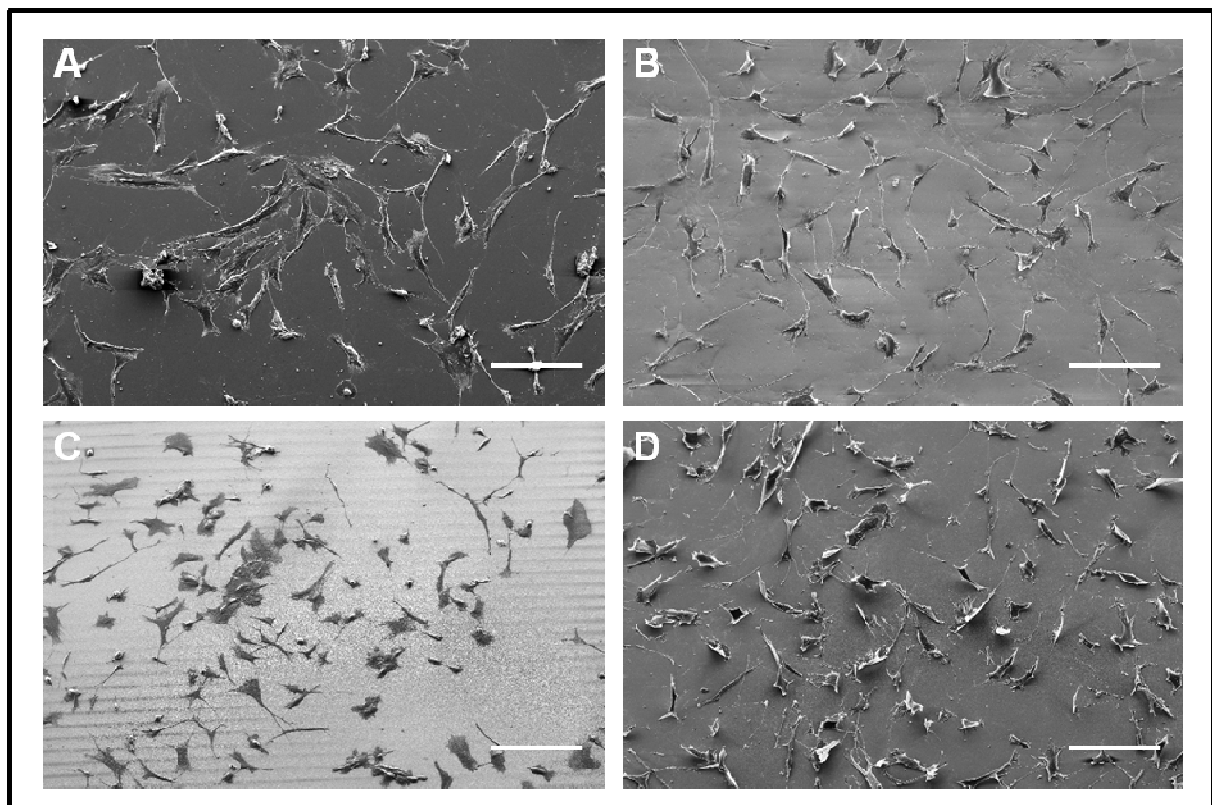


Abb. 30:

REM-Übersichtsaufnahmen (100-fach). HOB adhärten auf Glas (A), LD-Al₂O₃-DV (B) und MD-2x-Al₂O₃-LV (C) stark, auf HD-Al₂O₃-DV (D), erkennbar an Abhebungen, nur schwach. Bei MD-2x-Al₂O₃-LV (C) war die Unregelmäßigkeit nach Laser auffallend. Maßstabsbalken: 200 µm.

Bei stärkerer Vergrößerung wurden morphologische Eigenheiten der HOB in Abhängigkeit von den eingesetzten Oberflächen deutlich. Diese werden im Folgenden an einzelnen Abbildungen exemplarisch für die vorherrschenden Zellausprägungen gezeigt.

HOB auf der Glasprobe nahmen meist eine große, flächige Form an und hatten keine Abhebungen (Abb. 31 A); voluminöse Zellen bildeten sich selten aus (Abb. 31 B). Das Verhältnis voluminöse Zellen zu flächigen Zellen betrug ca. 2:10. Beide Formen hatten sehr viele lange, dünne Filopodien, die einen intensiven Zell-Oberflächen-Kontakt ermöglichen (Abb. 31 A, B). Große Teile der Filopodien standen in unmittelbaren Kontakt zur Oberfläche (Abb. 31 C). Der Großteil der Zellen wies eine hohe Zellintegrität auf (Abb. 31 A, B). Insgesamt kann von einer starken Adhärenz der Zellen auf der Glasprobe ausgegangen werden.

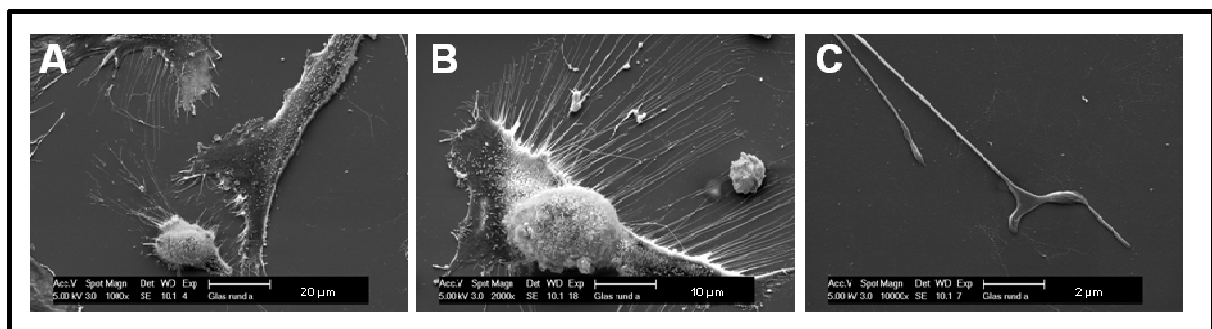


Abb. 31:

REM-Aufnahmen von HOB auf Glasproben in unterschiedlichen Vergrößerungen. Neben der überwiegenden flachen Form waren auch voluminöse Zellen vorhanden (A, B). Die zahlreichen Filopodien (A, B) liegen flächig auf der Oberfläche (C).

Auch auf LD-Al₂O₃-DV nahmen die HOB entweder eine große, flächige oder eher kleine voluminöse Form an (Abb. 32 A). Das Verhältnis zwischen der voluminösen und der flächigen Zellform betrug ca. 1:10. Die meisten HOB hatten eine hohe Zellintegrität, dennoch waren die Präparationsschäden größer als bei der Glasprobe. Die Adhärenz der Zellen war stark, aber doch schwächer als auf der Glasprobe; flächige Zellen neigten häufig zu Abhebungen an ihren Rändern (Abb. 32 A). Die Filopodienbildung war ähnlich der auf der Glasprobe stark ausgebildet (Abb. 32 B, C), allerdings war die Fläche der Filopodien, die direkt mit der Oberfläche in Verbindung stand, geringer als bei der Glasprobe (Abb. 32 C).

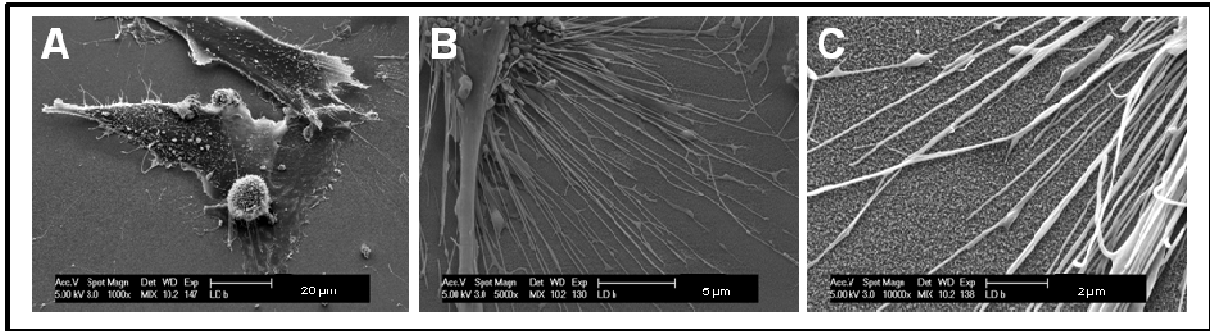


Abb. 32:

REM-Aufnahmen von HOB auf LD-Al₂O₃-DV in unterschiedlichen Vergrößerungen. Die meisten Zellen waren flächig und hoben sich leicht von der Oberfläche ab (A). Es wurden viele Filopodien gebildet (B, C), deren Kontaktfläche auf der Oberfläche im Vergleich zur Glasprobe reduziert war (C).

Voluminöse Zellformen waren auf LD-3x-Al₂O₃-LV nicht zu finden. Hier bildeten HOB eine flache Form mit teilweise langen Ausläufern aus (Abb. 33 A, B). Die Zellen hatten meist eine hohe Integrität, wenn diese auch im Vergleich zur Glasprobe herabgesetzt war, und sie adhärten ohne Abhebungen auf der Oberfläche (Abb. 33 A). Filopodien waren in Anzahl und Kontaktfläche mit denen auf der Glasprobe vergleichbar hoch (Abb. 33 B); jedoch wurden sie durch die Probenpräparation mehr in Mitleidenschaft gezogen (Abb. 33 C).

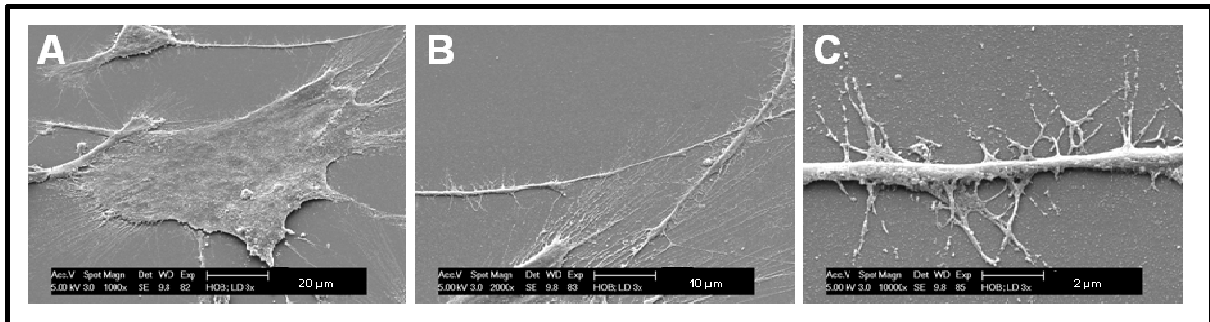


Abb. 33:

REM-Aufnahmen von HOB auf LD-3x-Al₂O₃-LV in unterschiedlichen Vergrößerungen. Die Zellform war flach (A) und ohne Abhebungen. Die zahlreichen Filopodien (B) waren präparationsbedingt beschädigt (C).

Auf MD-Al₂O₃-DV nahmen HOB flächige, langgezogene Formen an (Abb. 34 A). Präparationsschäden traten häufig auf und die Adhärenz war eher schwach. Zellen hoben sich von der Oberfläche ab (Abb. 34 A). Die Filopodien waren zum einen in

ihrer Anzahl herabgesetzt und zum anderen häufig beschädigt (Abb. 34 B); außerdem schien ihre Kontaktfläche mit der Oberfläche im Vergleich zu den bisher beschriebenen Al_2O_3 -Proben deutlich geringer zu sein (Abb. 34 C).

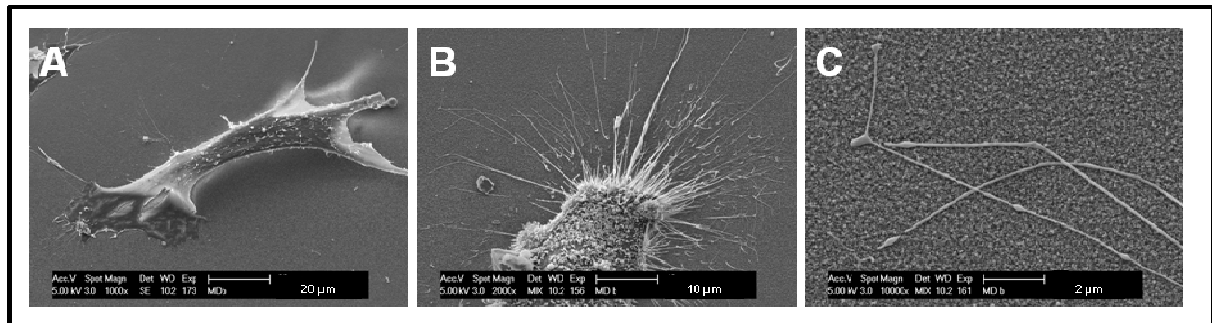


Abb. 34:

REM-Aufnahmen von HOB auf MD- Al_2O_3 -DV in unterschiedlichen Vergrößerungen. Die flächigen Zellen waren in ihrer Adhärenz (A) und Filopodienbildung (B) reduziert. Die Filopodien waren wenig flächig (C).

HOB besaßen auf MD- Al_2O_3 -LV die niedrigste Zellintegrität (Abb. 35 A - C). Die Zellen nahmen keine einheitliche Form an. Die Filopodienbildung war deutlich reduziert (Abb. 35 A - C).

Bei MD-2x / 3x- Al_2O_3 -LV fielen Unregelmäßigkeit der Oberfläche nach Lasereinsatz auf. Bei MD-2x- Al_2O_3 -LV wurde die Beschichtung zerstört und der Glasträger freigelegt (Abb. 35 B) und auf MD-3x- Al_2O_3 -LV hinterließ der Laser eine ungleichmäßige Beschichtung (Abb. 35 C).

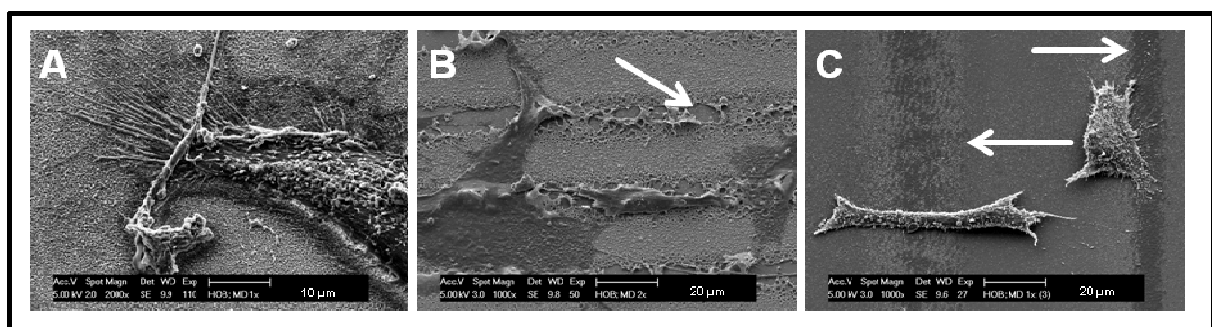


Abb. 35:

REM-Aufnahmen von HOB auf MD-1x- Al_2O_3 -LV (A), MD-2x- Al_2O_3 -LV (B) und MD-3x- Al_2O_3 -LV (C) in unterschiedlichen Vergrößerungen. Auf allen Al_2O_3 -Proben war die Zellintegrität herabgesetzt (A, B). Bei MD-2x- Al_2O_3 -LV zerstörte der Laser die Beschichtung, der Glasträger ist zu sehen (Pfeil in B). Bei MD-3x- Al_2O_3 -LV hinterließ der Laser eine ungleichmäßige Oberfläche (Pfeile in C).

HOB auf HD-Al₂O₃-DV hatten lange, flächige Formen (Abb. 36 A). Ihre Zellintegrität war im Vergleich zu der von HOB auf Glas reduziert (Abb. 36 B). Trotz intensiver Filopodienbildung (Abb. 36 B, C) war die Adhärenz eher gering ausgeprägt: Viele Zellen hoben sich, wie es schon in der Übersicht aufgefallen war, von der Probenoberfläche ab (Abb. 36 A).

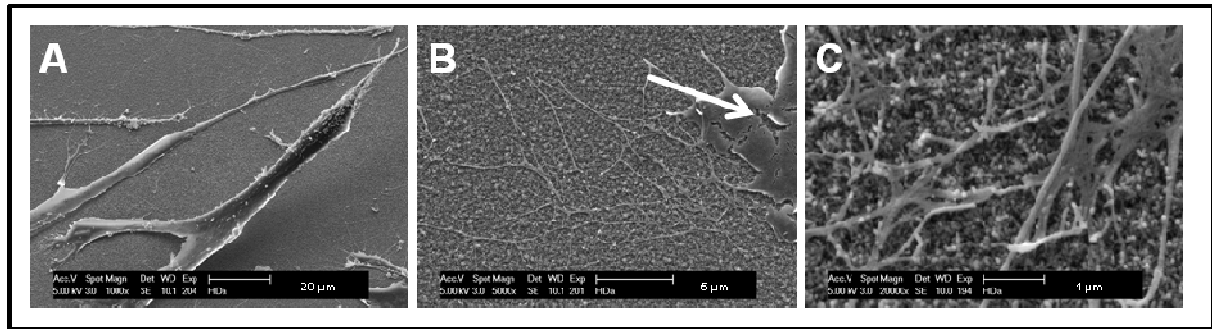


Abb. 36:

REM-Aufnahmen von HOB auf HD-Al₂O₃-DV in unterschiedlichen Vergrößerungen. Bei intensiver Filopodienbildung (B, C) hoben sich die Zellen, die in ihrer Integrität reduziert waren (Pfeil in B), größtenteils ab (A).

Auf HD-1x-Al₂O₃-LV waren mehr flächige, teilweise auch langgezogene Zellen als voluminöse Zellen zu finden (Abb. 37 A). Das Verhältnis der voluminösen Zellen zu flächigen Zellen betrug ca. 1:10. Die Zellintegrität war geringer als auf Glas. Die Adhärenz der Zellen war stark und ein Abheben wurde nicht beobachtet (Abb. 37 B). Die Zellen bildeten viele Filopodien, die in engem Kontakt mit der Oberfläche standen (Abb. 37 C).

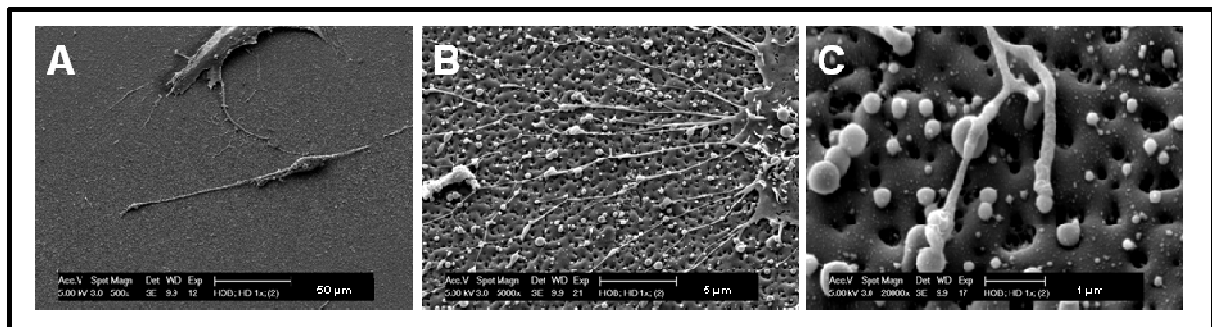


Abb. 37:

REM-Aufnahmen von HOB auf HD-1x-Al₂O₃-LV in unterschiedlichen Vergrößerungen. Die stark adhätierenden Zellen waren überwiegend flach (A, B) teilweise auch voluminös (A). Zahlreich gebildete Filopodien standen in engem Kontakt mit der Oberfläche (B, C).

Erscheinungsbild, Zustand und Adhäsionsverhalten der HOB und ihrer Filopodien auf HD-2x-Al₂O₃-LV (Abb. 38) entsprachen dem der Zellen auf HD-1x-Al₂O₃-LV (vgl. oben).

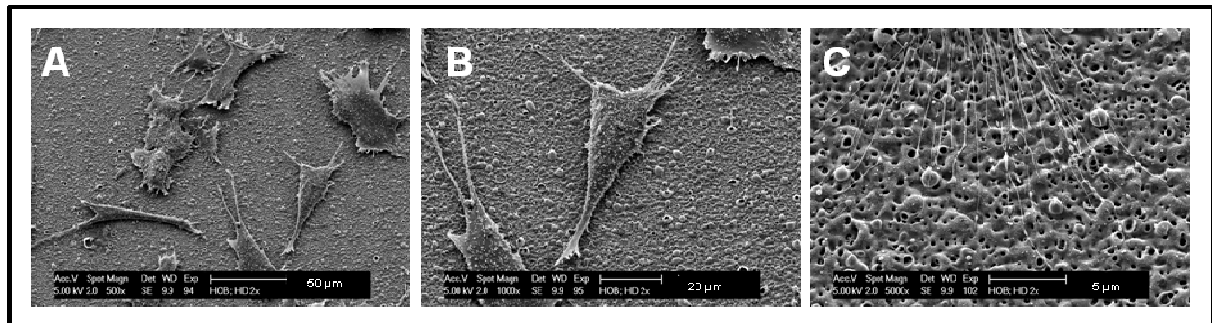


Abb. 38:

REM-Aufnahmen von HOB auf HD-2x-Al₂O₃-LV in unterschiedlichen Vergrößerungen. Die überwiegend flachen Zellen adhärten stark (A, B) und bildeten zahlreiche Filopodien (C).

Auf HD-3x-Al₂O₃-LV bildeten HOB kleinere, voluminöse, wie auch großflächige Formen aus (Abb. 39 A). Das Verhältnis voluminöser Zellen zu flächigen Zellen betrug ca. 3:10. Präparationsschäden waren im Vergleich zur Glasprobe häufiger zu finden (Abb. 39 A). Die Adhärenz war vergleichbar stark mit der auf den übrigen HD-Al₂O₃-LV. Die zahlreichen Filopodien (Abb. 39 B) scheinen insbesondere an den Mikropartikeln gut zu haften (Abb. 39 C).

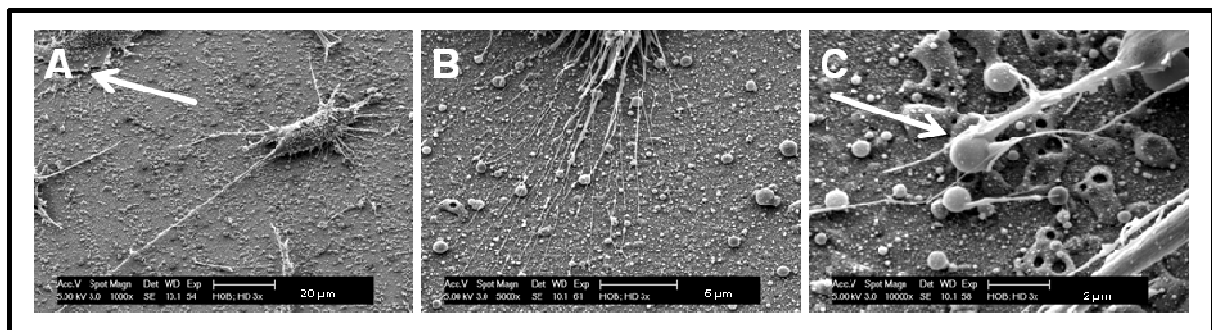


Abb. 39:

REM-Aufnahmen von HOB auf HD-3x-Al₂O₃-LV in unterschiedlichen Vergrößerungen. Die Zellformen waren flächig oder voluminös (A). Zahlreich gebildete Filopodien (B) hafteten insbesondere an Mikropartikeln (C). Präparationsschäden (Pfeil in A) waren häufig.

Die vorherrschende Form der HOB auf UHD- Al_2O_3 -DV war flach (Abb. 40 A). Die Zellintegrität war im Vergleich zur Glasprobe reduziert. Die Zellen adhärten nur schwach und hoben sich meist von der Probenoberfläche ab (Abb. 40 A). Die Filopodienbildung war herabgesetzt (Abb. 40 C). Möglicherweise bestehen Freiräume zwischen den Filopodien und der Oberfläche. Zudem fielen Unregelmäßigkeiten in der Beschichtung in Form von ca. $20 \times 30 \mu\text{m}$ großen Erhebungen auf, die selbst wiederum von NW bedeckt waren (Abb. 40 B).

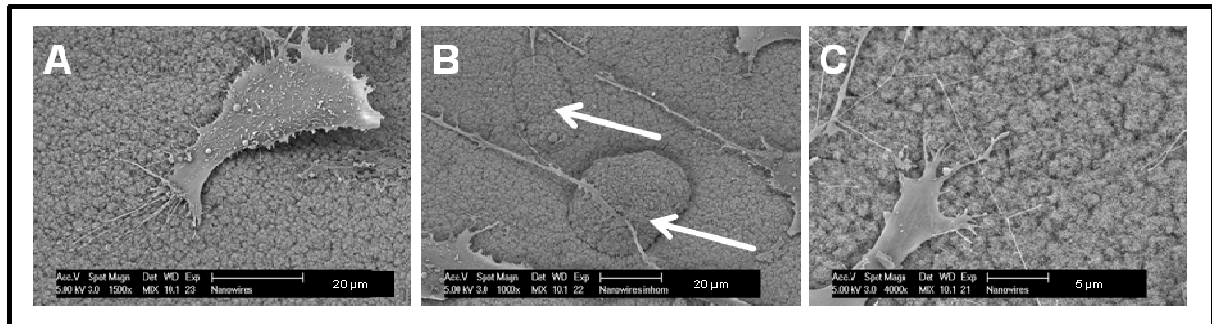


Abb. 40:

REM-Aufnahmen von HOB auf UHD- Al_2O_3 -DV in unterschiedlichen Vergrößerungen. Die schwach adhärierenden Zellen waren flach (A). Die wenigen Filopodien bildeten keinen flächigen Kontakt mit der Oberfläche (C). Unregelmäßigkeiten in der Beschichtung sind mit Pfeilen gekennzeichnet (B).

Auf UHD-1x- Al_2O_3 -LV waren vor allem flächige Zellen zu finden (Abb. 41 A). Auch hier gab es mehr Präparationsschäden als auf der Glasprobe (Abb. 41 A). Die Zellen adhärten intensiv auf der Oberfläche (Abb. 41 C). Die in ihrer Anzahl im Vergleich zur Glasprobe verminderten Filopodien standen über große Bereiche in engem Kontakt mit der Probenoberfläche (Abb. 41 B, C).

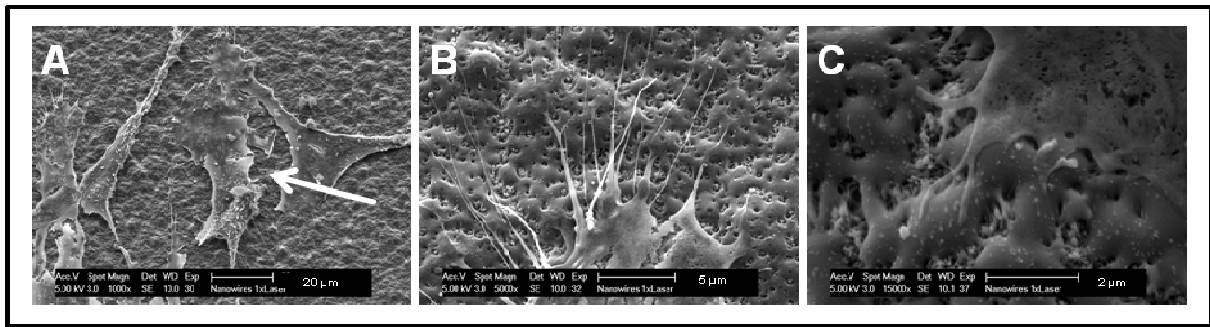


Abb. 41:

REM-Aufnahmen von HOB auf UHD-1x-Al₂O₃-LV in unterschiedlichen Vergrößerungen. Die teilweise bei der Präparation beschädigten (Pfeile in A), flachen Zellen (A, B) hoben sich nicht ab. Die mäßig gebildeten Filopodien (B) waren in engem Kontakt mit der Oberfläche (C).

Morphologie und Zustand der HOB und ihrer Filopodien auf UHD-2x-Al₂O₃-LV (Abb. 42) entsprachen denen auf UHD-1x-Al₂O₃-LV (vgl. oben). Auffällig wurden Unregelmäßigkeiten in der Oberflächenbeschaffenheit entsprechend denen auf UHD-1x-Al₂O₃-DV in Form von ca. 20 x 40 µm großen Erhebungen (Abb. 42 C).

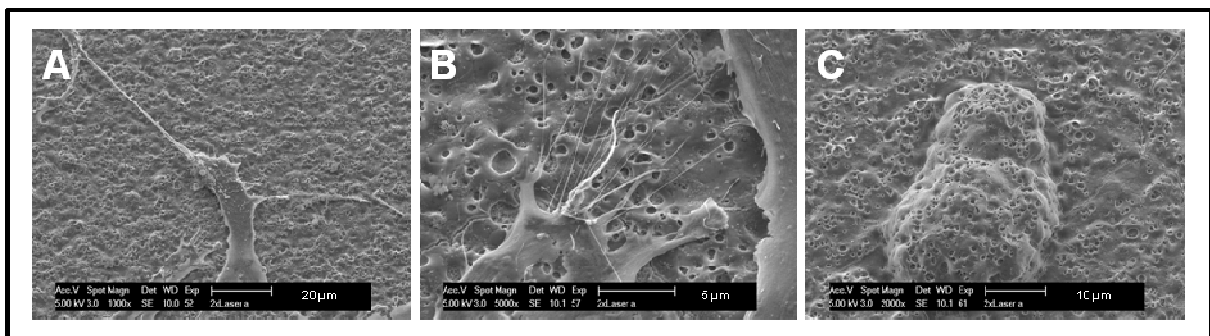


Abb. 42:

REM-Aufnahmen von HOB auf UHD-2x-Al₂O₃-LV in unterschiedlichen Vergrößerungen. Die flachen Zellen (A) bildeten mäßig Filopodien (B). Die Oberflächenbeschaffenheit war unregelmäßig (C).

Auf UHD-3x-Al₂O₃-LV bildeten die Zellen flächige und langgezogene Formen aus (Abb. 43 A, B). Ihre Zellintegrität war im Vergleich der von HOB auf Glas reduziert (Abb. 43 B). Die auf dieser Laservariation in großer Zahl gebildeten Mikropartikel ließen keinen flächigen Kontakt zwischen Zelle und Substrat zu (Abb. 43 A, B); die Zellen „schwebten“ scheinbar über der Oberfläche. Filopodien hafteten gut an den

Mikropartikeln (Abb. 43 C). Allerdings stellen die großen Zwischenräume generell wohl ein Hindernis für die Adhärenz der Zellen dar.

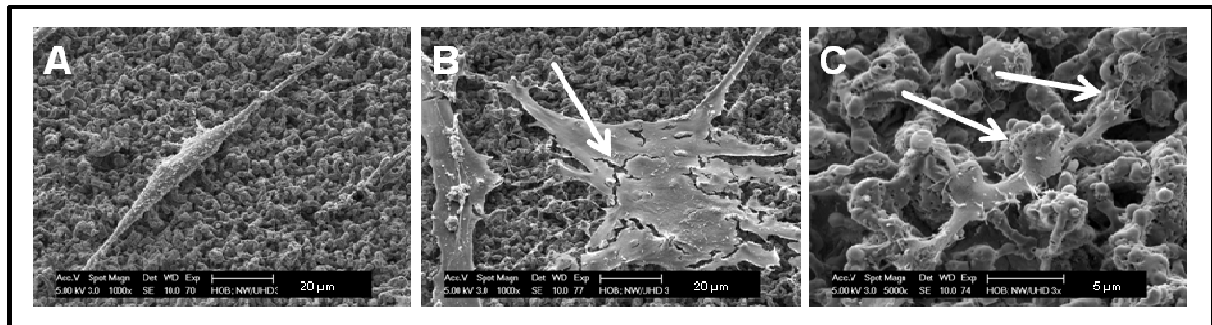


Abb. 43:

REM-Aufnahmen von HOB auf UHD-3x-Al₂O₃-LV in unterschiedlichen Vergrößerungen. Die langen (A) oder flächigen (B) Zellen waren präparationsbedingt beschädigt (Pfeil in B) und hatten eine reduzierte Kontaktfläche zur Oberfläche. Die wenigen Filopodien hafteten gut an Mikropartikeln (Pfeile in C).

4.2.4. Genexpression

Die Expression der ALP-mRNA war an Tag 7 für Zellen, die auf UHD-Al₂O₃-DV und MD-Al₂O₃-DV kultiviert wurden, im Vergleich zu den Zellen, die auf der Glasprobe wuchsen, signifikant hochreguliert. Während die ALP an Tag 14 auf UHD-Al₂O₃-DV und LD-Al₂O₃-DV noch signifikant erhöht war, konnten an Tag 21 keine Unterschiede in der Expression der mRNA zwischen Al₂O₃-DV und der Glasprobe ausgemacht werden (Abb. 44).

Die BSP2-Expression war an Tag 14 auf allen Al₂O₃-DV signifikant erhöht im Vergleich zur Glasprobe (Abb. 45).

Die Expression der OPN-mRNA war schon an Tag 0 bei HOB, die auf UHD-Al₂O₃-DV, MD-Al₂O₃-DV und LD-Al₂O₃-DV kultiviert wurden, signifikant gesteigert. An Tag 21 war die OPN-Expression bei Zellen, die auf UHD- und HD-Al₂O₃-DV wuchsen, signifikant hochreguliert im Vergleich zur Expression der Zellen auf der Glasprobe (Abb. 46).

HOB, die auf UHD-Al₂O₃-DV kultiviert wurden, wiesen außerdem an Tag 14 signifikant gesteigerte mRNA-Expressionen für RUNX2, COL1 und OC auf (ohne graphischer Darstellung).

Für die Genexpression von Osterix konnten keine unterschiedlichen Ausprägungen auf den Al₂O₃-DV im Vergleich zur Glasprobe auf mRNA-Ebene ausgemacht werden.

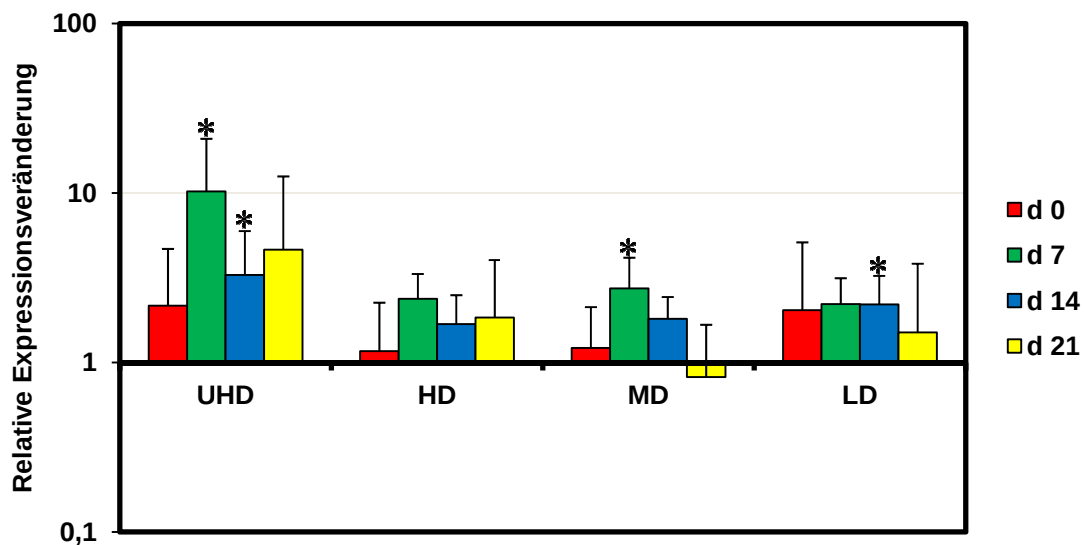


Abb. 44:

ALP-Expressionsprofil von HOB auf Al_2O_3 -DV an vier Zeitpunkten. Die Daten sind an der ribosomalen 18S-RNA normalisiert und als n-facher Anstieg der mRNA-Expression im Vergleich zur Glasprobe zum selben Zeitpunkt mit Standardabweichung dargestellt ($n = 6$, $* p < 0,05$ vs. Glas).

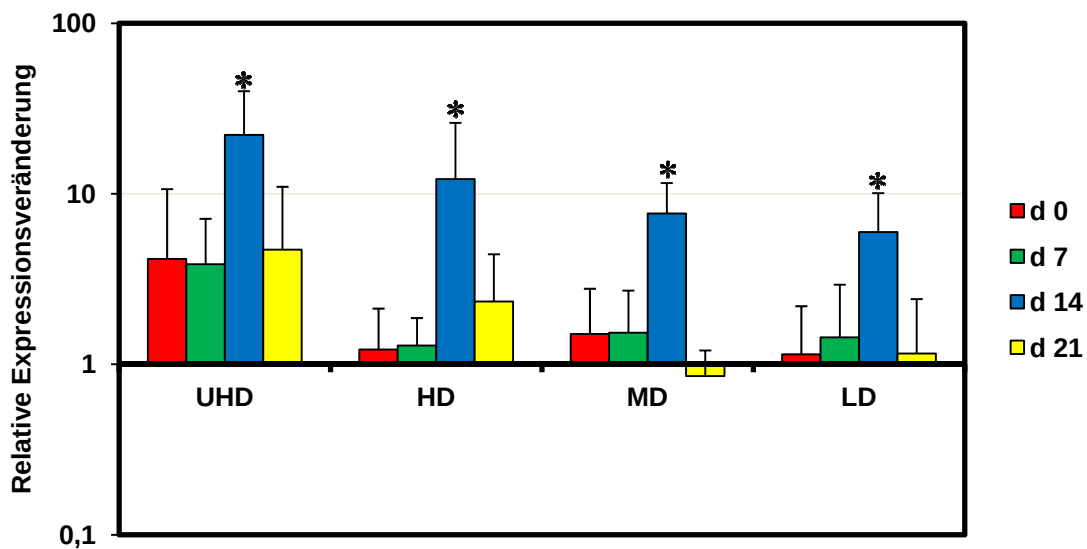


Abb. 45:

BSP2-Expressionsprofil von HOB auf Al_2O_3 -DV an vier Zeitpunkten. Die Daten sind an der ribosomalen 18S-RNA normalisiert und als n-facher Anstieg der mRNA-Expression im Vergleich zur Glasprobe zum selben Zeitpunkt mit Standardabweichung dargestellt ($n = 6$, $* p < 0,05$ vs. Glas).

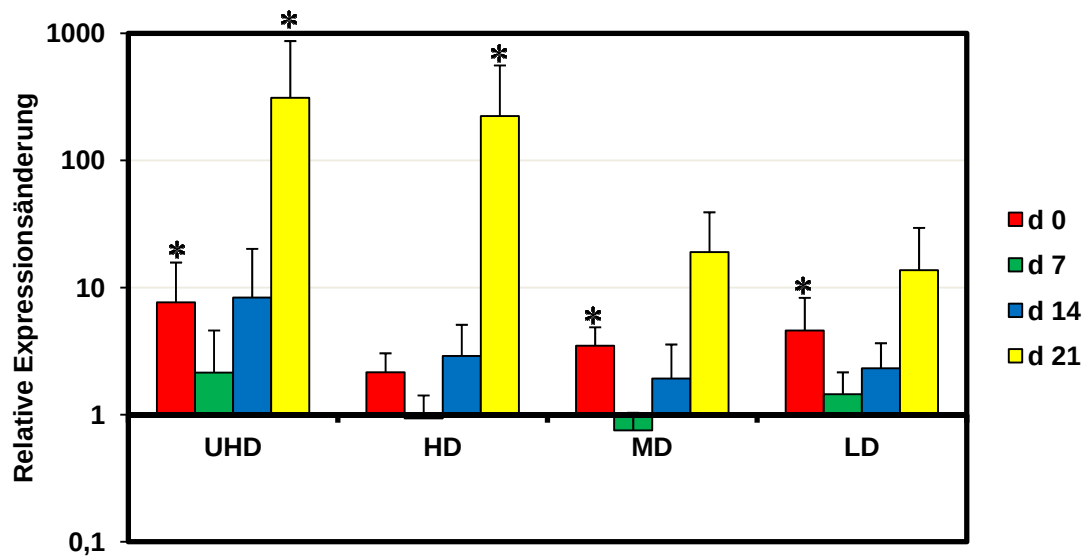


Abb. 46

OPN-Expressionsprofil von HOB auf Al_2O_3 -DV an vier Zeitpunkten. Die Daten sind an der ribosomalen 18S-RNA normalisiert und als n-facher Anstieg der mRNA-Expression im Vergleich zur Glasprobe zum selben Zeitpunkt mit Standardabweichung dargestellt (n = 6, * p < 0,05 vs. Glas).

5. Diskussion

5.1. Einfluss der physikalischen und chemischen Eigenschaften von Oberflächen auf die zelluläre Reaktion

Es wird allgemein anerkannt, dass Oberflächeneigenschaften wie Topographie und Chemie die Interaktion zwischen Zellen und Fremdmaterial maßgeblich bestimmen. Allerdings ist eine Einordnung der relativen Effekte einzelner Materialeigenschaften aufgrund der Komplexität ihrer Zusammensetzung und der Prozesse, die zum Erreichen einer Veränderung in ihrer Topographie oder Chemie eingesetzt werden, sehr schwierig. Umso wichtiger ist eine umfassende Analyse der untersuchten Implantatmaterialien, bevor sie in den Zellkulturversuch eingeführt werden (Ponche et al. 2010).

5.1.1. Oberflächenchemie der Al_2O_3 -Proben

Mit Hilfe der XPS werden chemische Zusammensetzungen von Oberflächen zerstörungsfrei mit einer Eindringtiefe von 0,5 - 3 nm bestimmt. Lediglich Wasserstoff und Helium werden von der Methode nicht direkt nachgewiesen. Aufladungsprobleme sind klein, daher können auch Nichtleiter wie Al_2O_3 -Proben ohne Weiteres analysiert werden (Seah 1984).

Nicht nur eine Bearbeitung der Oberfläche führt potentiell zu Veränderungen im XPS-Signal (Ponche et al. 2010); auch morphologische Parameter wie unterschiedliche Oberflächenrauheiten können zu einer Signaländerung bei dennoch gleicher chemischer Zusammensetzung führen (De Bernardez et al. 1984).

In vielen Studien haben sich Forscher mit dem Effekt der Oberflächentopographie auf die Zell-Oberflächen-Interaktion beschäftigt. In den allermeisten Fällen wurden allerdings mit der Topographie auch die Chemie der Oberfläche verändert (Ball et al. 2004, Stöver et al. 2006). Es scheint beinahe unmöglich, die Topographie unabhängig von der Oberfläche zu alternieren (Meyer et al. 2005). Die Ergebnisse der XPS im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich mittels CVD und Lasereinsatz unterschiedliche Topographien bei gleichbleibender Oberflächenchemie herstellen lassen.

Dieses Ergebnis wurde erzielt, trotz des oben erwähnten Umstandes, dass morphologische Unterschiede in der Rauheit zu XPS-Ergebnisveränderungen führen können. Eine Variation der Abscheidungsdauer, die die Änderung der Dichte und Länge der NW mit sich führt, beeinflusst die chemische Zusammensetzung nicht. Bemerkenswert ist vor allem die Tatsache, dass es auch durch Laserpulse zu keiner Veränderung in der chemischen Zusammensetzung der Oberfläche kommt.

Der konstante Kohlenstoffgehalt wird auf eine Kontamination während der Verarbeitung der Proben durch restliches Öl in der Pumpe der CVD-Einheit zurückgeführt.

5.1.2. Reproduzierbarkeit der Al_2O_3 -Proben

In dieser Studie liegen REM-Aufnahmen aus verschiedenen Quellen vor. Ein Vergleich der morphologischen Untersuchungen der Materialwissenschaftler des INM mit unseren morphologischen Untersuchungen liefert Schlüsse über die Reproduzierbarkeit der Al_2O_3 -Proben.

Die Al_2O_3 -DV besitzen eine gleichmäßige Topographie und entsprechen einander in beiden Untersuchungen. Demnach kann von einer guten Reproduzierbarkeit der Herstellung der Al_2O_3 -DV ausgegangen werden. Nur bedingt gilt dieser Schluss für UHD- Al_2O_3 -DV, da wir in unseren Analysen ca. $20 \times 30 \mu\text{m}$ große Erhebungen fanden (Abb. 40 B). Werden derartig unregelmäßige Al_2O_3 -DV durch Laserpulse modifiziert, werden auch die erhaltenen Proben unregelmäßig sein, wie es unsere REM-Aufnahmen von UHD-2x- Al_2O_3 -LV zeigen (Abb. 42 C).

Die einmalig gelaserten Al_2O_3 -LV gleichen sich in beiden Untersuchungen. So ist auch für sie von einer guten Reproduzierbarkeit auszugehen.

Die Betrachtung der zweimalig gelaserten Al_2O_3 -LV kommt zu einem anderen Ergebnis: REM-Aufnahmen des INM zeigten eine ungleichmäßige Laserung für MD-2x- Al_2O_3 -LV. In unseren REM-Untersuchungen traten in einzelnen Exemplaren zusätzlich Schäden auf MD-2x- Al_2O_3 -LV auf. HD-2x- Al_2O_3 entsprachen sich weitgehend in den beiden Untersuchungen. UHD-2x- Al_2O_3 -LV unterschieden sich in den Untersuchungen: Die in den materialwissenschaftlichen Untersuchungen aufgefallenen Mikropartikel wurden in unseren Untersuchungen nicht gefunden.

Stellt man die Untersuchungen der dreimalig gelaserten Al_2O_3 -LV einander gegenüber, fallen mehrere Ungleichmäßigkeiten auf. Während diese sich bei

LD-3x-Al₂O₃-LV auf eine geringere Dichte der Oberflächenstrukturen und bei MD-3x-Al₂O₃-LV auf eine höhere Ungleichmäßigkeit der Topographie nach Laserung in unseren Studien beschränkten, unterschieden sich UHD-3x-Al₂O₃-LV deutlich. Am INM fand man eine Oberfläche, die aus einem Layer und darauf aufliegenden Mikropartikeln bestand. Wir hingegen konnten keinen Layer erkennen und sahen eine äußerst raue Oberfläche, die aus andersartig strukturierten Mikropartikeln bestand.

Aus diesen Ergebnissen kann folgender Schluss gezogen werden: Während durch CVD hergestellte Al₂O₃-DV und einmalig gelaserte Al₂O₃-LV insgesamt gut reproduzierbar sind, war zum Zeitpunkt der Untersuchung für Al₂O₃-LV, die mehrmals mit Laser modifiziert wurden keine exakte Reproduktion möglich.

Allerdings darf nicht außer Acht gelassen werden, dass im Gegensatz zu den REM-Untersuchungen, die am INM stattfanden, vor den an unserem Institut geleisteten Analysen Zellkultivierungen und Probenpräparationen auf den Al₂O₃-Proben erfolgten, die möglicherweise die erwähnten Unterschiede in der Morphologie verursacht haben könnten.

Neben einer zuverlässigen Reproduzierbarkeit müssten Al₂O₃-Beschichtungen weitere Ansprüche (vgl. 2.10.) erfüllen, damit sie zur Modifikation von Implantatoberflächen geeignet sind. In der vorliegenden Studie liegt das Hauptaugenmerk auf der Biokompatibilität der Oberflächenbeschichtungen. Zur Beantwortung weiterer entscheidender Fragen, wie zum Beispiel der nach der Haftfestigkeit am Grundmaterial, wären weitere, biomechanisch orientierte Untersuchungen wünschenswert.

5.1.3. Wachstumsverhalten der HOB

Die Anzahl adhärrierender Zellen unterschied sich sowohl nach 6-stündiger („frühe Adhäsion“) als auch nach 48-stündiger („späte Adhäsion“) Kultivierung auf den Al₂O₃-Proben nicht signifikant von der Anzahl adhärrierender Zellen auf der Glasprobe. Das weist darauf hin, dass Al₂O₃-Oberflächenbeschichtungen sich nicht negativ auf das Adhäsionsverhalten der HOB auswirken.

Ebenso wurde die Zellfläche an den beiden Untersuchungspunkten durch Al₂O₃ nicht signifikant reduziert. Davon auszunehmen sind UHD-Al₂O₃-DV und UHD-1x-Al₂O₃-LV, die signifikant geringere Zellflächen zum frühen Zeitpunkt im

Vergleich zur Glasprobe zeigten. Da sich zum späteren Zeitpunkt die Werte für die Zellflächen dieser beiden Proben denen der übrigen wieder annäherten und sich keine signifikanten Unterschiede mehr ergaben, kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen eine längere Zeit benötigen, sich auf diesen beiden Schichten auszubreiten, auch wenn die Anzahl initial adhärrierender Zellen nicht signifikant beeinflusst wird. Es kann insgesamt davon ausgegangen werden, dass die Zellfläche der HOB durch Al_2O_3 -Oberflächenbeschichtungen nicht reduziert wird.

Das Proliferationsverhalten wurde ebenfalls nicht signifikant beeinflusst. Möglicherweise erbrächten spezifische Proliferationsmarker wie Ki-67, Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) oder Bromdesoxyuridin (BrdU), die die Bestimmung der zellulären Proliferation auf Einzelzell-Ebene nach Immunfluoreszenzfärbung ermöglichen und im Zuge weiterführender Arbeiten etabliert werden könnten, zusätzlich wertvolle Ergebnisse.

Die Tatsache, dass Adhäsion, Fläche und Proliferation durch Al_2O_3 -Oberflächenbeschichtungen nicht beeinflusst werden, ist ein deutlicher Hinweis auf eine gute Zellkompatibilität von Al_2O_3 -Oberflächenbeschichtungen.

5.1.4. Benetzbarkeit

Im Allgemeinen wird in der Literatur eine hohe Hydrophobie mit einer hohen Rauheit in Verbindung gebracht (Ponsonnet et al. 2003, Rupp et al. 2006). Dieser Zusammenhang wird von den Untersuchungen des INM bestätigt. Alle Al_2O_3 -DV besaßen Wasserkontaktwinkel $< 10^\circ$ und ihre R_a lag stets zwischen 6 und 10 nm. Die raueren Al_2O_3 -LV wiesen tendenziell höhere Wasserkontaktwinkel auf und waren also hydrophober als die entsprechenden Al_2O_3 -DV. Allerdings konnte kein Zusammenhang zwischen Anzahl der Laserpulse und Zunahme der Hydrophobie hergestellt werden. Die Hydrophobie der UHD- Al_2O_3 -DV steigt nach dem ersten Laserpuls und sinkt nach einem weiteren, um nach einem abermaligen Laserpuls wieder zu steigen. Demgegenüber stieg die R_a für diese Proben mit jedem Laserpuls. Ähnlich verhielten sich Benetzbarkeit und R_a der HD- Al_2O_3 -DV und MD- Al_2O_3 -DV / -LV. Insbesondere muss an dieser Stelle auf LD- Al_2O_3 -DV und LD-3x- Al_2O_3 -LV eingegangen werden; während nach den Laserpulsen die Hydrophobie deutlich zunahm, blieb die Rauheit in etwa gleich.

Eine mögliche Erklärung für diese Untersuchungsergebnisse liegt darin, dass eine exakte Reproduktion nicht für alle Al_2O_3 -LV gegeben war (vgl. oben).

Es wird allgemein anerkannt, dass die Benetzbarkeit einer Oberfläche die Zellreaktion beeinflusst (Jäger et al. 2007, Vandrovcova und Bacakova 2011, Anselme et al. 2012). Worin die Zellreaktion genau besteht, wird kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite haben Arbeitsgruppen gezeigt, dass hydrophobe Oberflächen die Adhäsion von osteoblastären Zellen fördern (Bumgardner et al. 2003). Andere fanden keinen direkten Zusammenhang zwischen der Hydrophobie einer Oberfläche und der zellulären Adhäsion (Möller et al. 1994). In der überwiegenden Anzahl der Untersuchungen ergab sich, dass eine hohe Hydrophobie der Oberflächen die Adhäsion herabsetzt und hydrophile Oberflächen diese fördern (Redey et al. 2000, Zhao et al. 2005, Jäger et al. 2008).

In dieser Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen Benetzbarkeit und Adhäsion der HOB hergestellt werden.

Ein Grund besteht sicherlich darin, dass sich die reproduzierbar herzustellenden Al_2O_3 -DV nur gering in ihrer Benetzbarkeit unterscheiden (Wasserkontaktwinkel immer $< 10^\circ$). Größere Unterschiede gab es bei den Al_2O_3 -LV (ca. $9^\circ - 76^\circ$). Wie oben diskutiert, war hier allerdings in den überwiegenden Fällen keine exakte Reproduktion der Oberflächen möglich; ein Umstand, der maßgeblichen Einfluss auf die Ergebnisse der Zellkultur nehmen kann.

5.1.5. Rauheit

Um eine Oberflächentopographie objektiv beschreiben zu können, werden Kenngrößen aus der Oberflächenphysik genutzt. Der gebräuchlichste Parameter in der Charakterisierung der Rauheit von Biomaterialien ist die mittlere Rauheit R_a (Ponche et al. 2010). Er gibt den durchschnittlichen Abstand einer Messung von der Mittellinie an. Die Mittellinie wird so positioniert, dass die Summe der Abweichungen von ihr minimal wird.

Dieser Parameter weist Schwächen auf: Mit R_a können weder Schrägen charakterisiert werden noch kann mit ihm zwischen Erhebungen und Tiefen der Oberfläche unterschieden werden. Aus diesem Grund wurde der Parameter in der vorliegenden Arbeit ergänzend zur Rasterelektronenmikroskopie eingesetzt.

Prinzipiell werden zur Analyse der Rauheit drei Methoden eingesetzt: Die Kontaktprofilometrie, die Rasterkraftmikroskopie und nicht auf Kontakt basierende, optische Methoden. Da in der vorliegenden Arbeit nur Ergebnisse der Kontaktprofilometrie beschrieben sind, sollen im Folgenden Vor- und Nachteile dieser Methode diskutiert werden.

Die Diamantspitze des Profilometers ist permanent in Kontakt mit der Oberfläche und gibt unabhängig von optischen Eigenschaften des Materials recht genau Information über die Amplitude der Rauheit. Ein weiterer Vorteil ist der große Bereich (10 nm - 1 mm), in dem R_a -Messungen vorgenommen werden können. Nachteilig ist, dass die Kraft, die über die Diamantspitze auf die Oberfläche übertragen wird, dort zu Deformationen führt und diese zerstören kann. Bei elastischen Oberflächen kann es so zu Artefakten kommen. Weitere Artefakte treten wegen des Designs der Spitze selbst auf, die eine genaue Messung behindert, da tiefere, schmale Täler nicht erreicht werden (Ponche et al. 2010). Zuletzt kann die relativ hohe Geschwindigkeit, mit der die Spitze über die Oberfläche geführt wird, zu Messfehlern führen, indem sie manchmal Spitzen im Profil (Erhebungen oder Tiefen) überspringt (Pawlus und Śmieszek 2005).

Neben den apparatspezifischen Beschränkungen unterliegt die Profilometrie weiteren, allgemeinen Beschränkungen. Eine genaue Feststellung der Rauheit ist unmöglich, wenn die Oberfläche kavernös ist. In diesem Fall detektiert die Diamantspitze zwar Unterschiede im Höhenprofil der Oberfläche, Teile kavernöser Strukturen, die sich lateral ausbreiten und von der Oberfläche bedeckt werden, werden aber nicht detektiert. Die im Ergebnisteil gezeigten REM-Aufnahmen (Abb. 20 - 23) machen deutlich, dass diese Einschränkung zu einem Informationsverlust bei der Charakterisierung der Al_2O_3 -Proben in dieser Arbeit geführt haben könnte. Um kavernöse Strukturen korrekt zu analysieren, bieten sich Methoden an, die mit hoher Präzision orthogonale Schichten von der Oberfläche abtragen und die dann offenliegenden kavernösen Strukturen untersuchen. Am INM wird dazu die Focused-Ion-Beam-Mikroskopie (FIB) angewandt, bei der mittels fokussiertem Ionenstrahl die Probe schichtweise geschnitten und direkt mit dem REM analysiert wird. Damit ist auch eine nachträgliche dreidimensionale Rekonstruktion der Probe möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden allerdings keine FIB-Messungen durchgeführt. Die hier gezeigten Probleme bei der

materialwissenschaftlichen Charakterisierung lassen FIB-Messungen für weiterführende Arbeiten jedoch als sinnvoll erscheinen.

Neben dem schon angestellten Vergleich von Rauheit und Benetzbarkeit auf der materialwissenschaftlichen Seite wird die Rauheit in der Fachliteratur mit verschiedenen zellbiologischen Parametern in Verbindung gebracht. Allerdings ist die Interpretation dieser Studien äußerst schwierig, weil sie nicht oder nur teilweise vergleichbar sind. Insbesondere die vergleichende Darstellung vom Einfluss der Rauheit auf die Zellreaktion ist problematisch, da hier kontroverse Ergebnisse vorliegen. Begründet sind diese Ergebnisunterschiede zum einen durch den Einsatz verschiedener Zelltypen. Während einige Forschergruppen primäre Zellen gebrauchen, favorisieren andere den Einsatz von osteoblasten-ähnlichen Zelllinien (vgl. 2.5.2.). Wichtiger ist jedoch, dass es keine Übereinstimmung darin gibt, wie eine Oberfläche charakterisiert werden muss. Das häufigste Versäumnis ist wohl, dass sie nicht anhand ihrer Topographie, sondern durch den Herstellungsprozess beschrieben wird (Cooper 2000). Des Weiteren setzte man sich in älteren Studien mehrheitlich mit Makro- und Mikrostruktur auseinander, während heute immer mehr nanostrukturierte Oberflächen und deren Einfluss auf die zelluläre Reaktion in den Fokus geraten (Meyer et al. 2005, Vandrovcova und Bacakova 2011, Variola et al. 2011).

Insgesamt scheinen rauere Oberflächen Proliferation, Ausbreitung und Differenzierung von Osteoblasten günstig zu beeinflussen, allerdings deren Adhäsion herabzusetzen (Anselme et al. 2012). Diese Ergebnisse wurden unabhängig voneinander in verschiedenen Untersuchungen erzielt (Martin et al. 1995, Deligianni et al. 2001, Brett et al. 2004, Anselme und Bigerelle 2005, Hamilton und Brunette 2007, Wirth et al. 2008). Wie erwähnt, gibt es auch Studien, die zeigen konnten, dass diese Zusammenhänge nicht bestehen (Rosa und Beloti 2003, Setzer et al. 2009).

Der Versuch, das Zellverhalten in einen Zusammenhang mit der Rauheit der Proben zu bringen, führt in der vorliegenden Studie leider nicht zu einheitlichen Ergebnissen. Es gab für die Zelldichte weder in der frühen noch in der späten Adhäsion signifikante Unterschiede zwischen rauen und weniger rauen Proben.

Wie oben beschrieben, fanden wir hinsichtlich des Parameters Zellfläche signifikante Unterschiede, die jedoch nicht auf die Rauheit zurückzuführen sind. Geringe Zellflächen hatten die HOB zum frühen Zeitpunkt auf UHD-Al₂O₃-DV und UHD-1x-Al₂O₃-LV. Diese beiden Proben unterscheiden sich aber deutlich in ihren

R_a -Werten voneinander. Also kann der Grund für unterschiedliche Zellflächen nicht in der Rauheit alleine liegen.

Besonders groß war die Zellfläche auf UHD-2x- Al_2O_3 -LV zum späteren Zeitpunkt. Da andere Proben mit entsprechenden R_a -Werten allerdings diesen Trend nicht aufwiesen, kann der Grund dafür ebenfalls nicht in der Rauheit liegen.

Es gibt verschiedene mögliche Gründe für den uneinheitlichen Zusammenhang zwischen Rauheit und zellulärem Adhäsions- und Wachstumsverhalten.

Ein Grund ist sicherlich, dass sich die R_a der Al_2O_3 -Proben nur geringfügig unterscheiden. Andere Forschergruppen vergleichen in ihren Untersuchungen die zellulären Reaktionen auf Oberflächen, die weitaus größere Unterschiede in ihrer Rauheit besitzen (Webster et al. 1999, Kalbacova et al. 2009) als die von uns untersuchten Al_2O_3 -Proben, die sich um maximal 100 nm unterscheiden. Ein weiterer Grund könnte darin bestehen, dass vor allem verschieden organisierte Oberflächen (z.B. Rillen versus Poren) die Zellreaktion jeweils andersartig beeinflussen (Anselme et al. 2012). Al_2O_3 -DV sind jedoch ähnlich organisiert - mit längerer Abscheidungsdauer ändert sich zwar die Dichte, aber nicht die Organisation der NW. Also wäre ein unterschiedliches Zellwachstum in Abhängigkeit von der Abscheidungsdauer eher überraschend.

Mittels Lasereinsatz können Unterschiede in der Organisation erreicht werden. Wie weiter oben gezeigt, ist zum jetzigen Zeitpunkt eine exakte Reproduktion allerdings nicht für alle Al_2O_3 -LV möglich.

5.2. Morphologische Untersuchung

Vorteile des REM sind ein weiter Vergrößerungsbereich, große Tiefenschärfe und hohe Auflösung (Michler 2008). Damit ist es geeignet, die Morphologie der HOB und deren Interaktion mit den Al_2O_3 -Proben zu analysieren. Die Untersuchung der Morphologie von Zellen liefert wertvolle Antworten auf die Frage, ob Biomaterialien zellkompatibel sind (Portan et al. 2012). Hierzu wurden in dieser Arbeit, wie weiter oben beschrieben (vgl. 3.2.3.6.), die Parameter Zellintegrität, Adhärenz und Filopodienbildung definiert.

Die Zellintegrität war bei allen Al_2O_3 -Proben im Vergleich zur Glasprobe herabgesetzt. Untersuchungen zu Zelldichte und -fläche sowie der Viabilität unterstützen diesen Zusammenhang nur teilweise.

HOB, die auf MD-Al₂O₃-LV kultiviert wurden, hatten von allen untersuchten HOB die niedrigste Zellintegrität. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in anderen Untersuchungen wider: Bei gleicher Zelldichte wiesen diese HOB besonders kleine Zellflächen in der späten Adhäsion auf. Außerdem war die Viabilität im WST-Test ebenfalls deutlich reduziert bei MD-2x / 3x-Al₂O₃-LV im Vergleich zu allen anderen Proben.

Die Adhärenz der Zellen war bei allen Al₂O₃-Proben im Vergleich zur Glasprobe herabgesetzt. Besonders auffallend waren Abhebungen auf HD- und UHD-Al₂O₃-DV. Das sind Al₂O₃-Proben mit besonders dichten NW. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Adhärenz durch CVD herabgesetzt wird und eine längere Abscheidungsdauer einen negativen Effekt auf die Adhärenz hat. Um diesen Effekt objektiv zu quantifizieren, wären weitere Untersuchungen notwendig. Garcia et al. (1997) setzen hierzu z.B. eine mechanische Methode ein, bei der Zellen durch eine Drehscheibe definierten Zentrifugalkräften ausgesetzt werden.

Die entscheidende Bedeutung der Filopodien wurde in der Einleitung erläutert. Oberflächen, auf denen zahlreiche Filopodien gebildet werden, sind für Zellen besonders interessant und bieten mehr Möglichkeiten zur Anhaftung als solche, auf denen weniger Filopodien gebildet werden (vgl. 2.8.).

Die Filopodienbildung war abhängig von der untersuchten Oberfläche unterschiedlich ausgeprägt. Auf der Glasprobe und LD-3x-Al₂O₃-LV wurden viele Filopodien gebildet, die in weiten Bereichen mit der Oberfläche in direktem Kontakt standen. Auf den übrigen Proben waren Kontaktfläche oder Anzahl der Filopodien reduziert. Interessanterweise konnten Oberflächen, die Mikropartikel besaßen, den Filopodien damit Angriffspunkte bieten (HD-3x- und UHD-3x-Al₂O₃-LV). Das unterstützt die These einiger Forscher, dass die Zellreaktion vor allem durch Strukturen > 0,2 µm beeinflusst wird, da kleinere Strukturen komplett von Proteinen maskiert werden (Richards 2008).

Viele Forschergruppen untersuchen die Morphologie von HOB oder HOB-ähnlichen Zellen mittels REM und setzen die vorherrschende Zellform mit Parametern für die Rauheit der Oberfläche in Verbindung (Jayraman et al. 2004, Webster und Ejiofor 2004, Anselme und Bigerelle 2005, Balasundaram und Webster 2007, Wirth et al. 2008, Hayes et al. 2010).

Hayes und Richards fanden heraus, dass die Zellform von Osteoblasten vor allem durch Mikrostrukturen in einem Spektrum der R_a im Bereich von 0,2 - 2 µm

beeinflusst wird. Dort nehmen Osteoblasten eine kubische Form an (Hayes und Richards 2010). Außerhalb des Bereichs sind Osteoblasten ausgebreitet und flach. Es darf nicht vergessen werden, dass generelle Aussagen kaum möglich sind, da in verschiedenen Studien unterschiedliche Zelltypen mit unterschiedlichen Reifegraden und verschiedene Chargen eingesetzt werden und der Phänotyp der Zellen immer von vielen weiteren Einflüssen wie der Oberflächenchemie und Oberflächentopographie abhängt (Anselme et al. 2012).

Dennoch wird die These von Hayes und Richards in der vorliegenden Studie bestärkt: Die untersuchten Al_2O_3 -Proben lagen in ihren R_a -Werten zwischen 6 nm (MD- Al_2O_3 -DV) und 106 nm (UHD-3x- Al_2O_3 -LV) und damit unterhalb des genannten Spektrums. Auf allen Al_2O_3 -Proben bildete sich überwiegend eine flächige, ausgebreitete Zellform aus. Kubische Formen wurden weniger gefunden. Es kann also festgehalten werden, dass sich die Morphologie der HOB unabhängig von den erzielten R_a -Werten einstellte. HOB scheinen alle Al_2O_3 -Proben als ähnlich glatt zu erkennen. So reagieren sie uniform mit einer überwiegend flachen, ausgebreiteten Morphologie. Auch dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Zellen eher von größeren Strukturen beeinflusst werden.

Wie in der Einleitung beschrieben, beeinflussen Zusammensetzung und Konformation der die Oberflächen „maskierenden“ Proteine die zelluläre Reaktion maßgeblich. Es ist klar, dass über eine Veränderung diese Proteine auch ein Effekt auf Zellen ausgeübt wird. Das führt zu dem Schluss, dass sich entweder die Proteinschichten auf den Al_2O_3 -Proben gleichen, unterschiedliche Proteinschichten ähnliche Effekte auf die Osteoblasten hinsichtlich ihrer Morphologie haben können oder die Morphologie eher von anderen Faktoren beeinflusst wird. Bei dieser Fragestellung wären weitere Untersuchungen der adsorbierten Proteine auf Al_2O_3 -Proben hilfreich.

5.3. Viabilität

Der WST-Test ist eine gebräuchliche Methode zur Untersuchung kultivierter Zellen. Wu et al. (2012) setzten ihn ein, um die Anzahl sich auf einer Oberfläche anlagernder Zellen zu bestimmen, indem sie die metabolische Aktivität der untersuchten Zellen mit der metabolischen Aktivität einer Referenzpopulation mit bekannter Zellzahl

verglichen. Andere schließen von der Zunahme der metabolischen Aktivität kultivierter Zellen auf deren Proliferation (Holthaus et al. 2013).

Der Test dient der Messung der metabolischen Aktivität der Zellen, indem er Aussagen über die Dehydrogenaseaktivität der Mitochondrien macht (vgl. 3.2.3.5.). Daher setzten wir den WST-Test nicht zur Analytik von Zellzahlen ein, sondern nutzten ihn zur Beurteilung der Zellviabilität der HOB. Diese Sichtweise ist dadurch begründet, dass auch wenige Zellen, die besonders metabolisch aktiv sind, eine gleiche oder sogar höhere Dehydrogenaseaktivität als weniger aktive aber zahlreiche Zellen aufweisen können. Unserer Meinung nach kann der WST-Test nur ergänzend zu Methoden, die zuverlässig Aussagen über die Zelldichte machen, eingesetzt werden.

Die Viabilität der HOB war für MD-Al₂O₃-DV und alle MD-Al₂O₃-LV im Vergleich zu den meisten anderen Proben herabgesetzt, während die Zelldichte für diese Proben an beiden Untersuchungszeitpunkten vergleichbar mit der Zelldichte auf anderen Proben war. So kann davon ausgegangen werden, dass MD-Al₂O₃-DV und die entsprechenden Laservariationen die Viabilität von HOB negativ beeinflussen. Dazu passt auch die relativ geringe Zellfläche (nur für MD-Al₂O₃-LV) zum Zeitpunkt nach 48-stündiger Kultivierung („späte Adhäsion“). Wie oben gezeigt, war auch die Zellintegrität der HOB auf MD-Al₂O₃-LV in den REM-Untersuchungen deutlich reduziert im Vergleich zu den HOB auf allen anderen untersuchten Proben.

Die übrigen Al₂O₃-Proben hatten keinen negativen Einfluss auf die Viabilität der HOB im Vergleich zur Glasprobe. Das deutet auf eine hohe Zellkompatibilität dieser Oberflächenbeschichtungen hin.

5.4. Differenzierung

Eine stabile Integration osteosynthetischer Biomaterialien bedarf der Aktivierung bestimmter Gene, die für die Induktion osteogener Differenzierungsvorgänge charakteristisch sind. Mesenchymale Stammzellen und osteogene Progenitorzellen müssen osteogen differenzieren, um Knochen bilden zu können. Die verwendeten HOB sind proliferierende Zellen, die die typischen osteoblastären Marker noch nicht exprimieren. Eine Analyse verschiedener Genprodukte auf mRNA-Ebene, wie sie von uns durchgeführt wurde, liefert wertvolle Hinweise auf den Differenzierungsgrad der Osteoblasten. Die Untersuchung des Einflusses der Oberflächentopographie auf

die Genexpression soll außerdem Informationen über die Regulationsmechanismen, die die Knochenbildung am Interface bestimmen, liefern (Hayes et al. 2010).

Vor allem soll im Hinblick auf den klinischen Einsatz untersucht werden, ob die Oberflächentopographie eine osteogene Differenzierung induzieren kann.

In Anlehnung an Hayes et al. 2010 wurden für diesen Versuch eine minimale osteogene Supplementierung des Mediums vorgenommen; auf einen Einsatz von Vitamin D3 wurde verzichtet (Metzger et al. 2013). Dadurch können die Versuche zur osteogenen Differenzierung nicht direkt mit den Ergebnissen der Wachstums- und Proliferationsversuche in der vorliegenden Arbeit verglichen werden, was aber auch nicht Ziel dieser Studie war.

Zur relativen Quantifizierung nutzten unsere Kooperationspartner am ARI die ribosomale 18S-RNA als Housekeeping-Gen. Der große Vorteil der ribosomalen 18S-RNA ist seine hohe Stabilität (Lee et al. 2005).

RUNX2 ist ein Schlüssel-Transkriptionsfaktor für die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen. Außer bei der Differenzierung zu Präosteoblasten spielt er auch in der Entwicklung von Chondroblasten eine wichtige Rolle. RUNX2 kontrolliert verschiedene Ereignisse während der osteogenen Differenzierung und wird selbst durch verschiedene Mechanismen (Interaktion mit Kofaktoren und posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung) kontrolliert (Franceschi et al. 2007). Osterix ist ebenfalls ein Marker der frühen osteogenen Differenzierung. Er wird für die Differenzierung vom Präosteoblasten zum reifen Osteoblasten, der sich durch die Expression verschiedener osteoblastärer Markergene auszeichnet, benötigt (Nakashima et al. 2007). ALP ist ein früher Marker osteogen differenzierter Zellen. In Osteoblastenkulturen wird ein Anstieg der ALP-Konzentration kurz vor der Matrixmineralisierung verzeichnet (Zhao et al. 2005). Col1 stellt 90 % des organischen Teils der extrazellulären Knochen-Matrix. Die Kollagensynthese ist die primäre Funktion differenzierter Osteoblasten (Mathews et al. 2011). Col1 ist dementsprechend ein Marker differenzierter Osteoblasten. Der organische Teil der extrazellulären Matrix besteht neben Col1 auch aus anderen Proteinen wie OPN und OC. Sie werden als späte Marker der osteogenen Differenzierung angesehen (Byun et al. 2010). OPN spielt eine entscheidende Rolle in der Zelladhäsion, da es an Integrine binden kann (Denhardt und Guo 1993). OC dagegen bindet an die mineralische Phase der extrazellulären Matrix (Schwartz et al. 1999). BSP2, das ebenfalls zu den nicht kollagenen Proteinen der Matrix gehört, tritt vor allem zu

Mineralisationsbeginn auf. Es besitzt verschiedene Domänen, die an Strukturen der extrazellulären Matrix und Zellen binden. Dennoch ist seine Funktion unklar (Gordon et al. 2007).

In unterschiedlichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass nano- und mikrostrukturierte Oberflächentopographien osteogene Differenzierungsprozesse anstoßen können (Boyan et al. 2001, Jäger et al. 2007).

In dieser Studie wurde der Differenzierungsgrad der HOB für Al_2O_3 -DV untersucht. Obwohl es tendenziell für alle Al_2O_3 -DV eine Hochregulation mit ähnlichem Muster gab, war sie auf UHD- Al_2O_3 -DV am stärksten ausgeprägt.

Die R_a -Werte der Al_2O_3 -DV unterschieden sich kaum voneinander. So können die Unterschiede, die in den Expressionsmustern bestanden, nicht auf die Rauheit alleine zurückgeführt werden. Eventuell wirken sich die geringen Unterschiede in den R_a -Werten auf die Zusammensetzung der initial adsorbierten Proteinschicht aus. Es besteht Einigkeit darin, dass über eine Veränderung der Proteinschicht die zelluläre Genexpression beeinflusst wird (Woo et al. 2003, Jäger et al. 2007, Anselme et al. 2012). In diesem Zusammenhang wäre eine detaillierte Analyse der adsorbierten Proteinschichten sehr hilfreich, was jedoch nicht Bestandteil der vorliegenden Studie war. Nichtsdestotrotz bleibt festzuhalten, dass die Expression osteoblastärer Markergene von HOB auf mRNA-Ebene durch die Kultivierung auf Al_2O_3 -NW zum Teil signifikant hochreguliert wird.

Unabhängig von Zeitpunkt und osteoblastärem Marker wurden die meisten signifikanten Anstiege der mRNA-Konzentration für HOB auf UHD- Al_2O_3 -DV verzeichnet. Wenn außerdem auf den anderen Al_2O_3 -DV eine Hochregulation vorhanden war, stieg die mRNA-Konzentration auf UHD- Al_2O_3 -DV im Vergleich zu den weniger dichten Al_2O_3 -DV stärker an. Folglich kann man davon ausgehen, dass eine längere Abscheidungsdauer und eine damit verbundene höhere Dichte und Länge der NW den Anstieg tendenziell verstärkt. Also beeinflussen raue, mittels CVD hergestellte Al_2O_3 -Proben die osteogene Differenzierung positiv.

Besonders interessant ist die signifikante Hochregulation der OPN-mRNA-Expression in HOB auf UHD- Al_2O_3 -DV, MD- Al_2O_3 -DV und LD- Al_2O_3 -DV an Tag 0. Vor diesem Zeitpunkt wurde noch keine osteogene Supplementierung des Mediums vorgenommen. So kann die Hochregulation alleine auf das osteogene Potential der Oberfläche zurückgeführt werden.

Die Induktion osteogener Differenzierung durch Strukturierung der Oberfläche könnte eine interessante Alternative zum Einsatz rekombinanter Zytokine darstellen. Bestimmte rekombinante Zytokine (z.B. knochenmorphogenetische Proteine), werden seit Längerem hinsichtlich ihres Potentials zur Knochenheilung untersucht und sind sogar für den klinischen Einsatz zugelassen. Es mangelt aber an Verabreichungssystemen, die der natürlichen Knochenmatrix in der Freisetzungskinetik und in deren physikalischen Eigenschaften entsprechen (Meikle 2006). Außerdem verhindern extrem hohe Kosten rekombinanter Zytokine den routinemäßigen klinischen Einsatz (Axelrad et al. 2007). Vor diesem Hintergrund erlangt die CVD-Technik, mit der geometrisch anspruchsvolle dreidimensionale Strukturen wie bestehende Knochenimplantate, deren gute physikalische Eigenschaften bekannt sind, modifiziert werden können, eine besondere Bedeutung.

5.5. Fazit

5.5.1. Resultate

In dieser Arbeit sollten Al_2O_3 -Beschichtungen materialwissenschaftlich charakterisiert und in nachfolgenden standardisierten Zellkulturversuchen mit HOB ihre Zellkompatibilität sowie ihr Einfluss auf die osteogene Differenzierung untersucht werden. Es haben sich folgende entscheidende Resultate ergeben:

Mit der CVD-Technik können unterschiedliche Oberflächenstrukturen erzeugt werden, deren chemische Zusammensetzung konstant bleibt.

Eine exakte Reproduzierbarkeit ist für Nanotopographien auf Al_2O_3 -DV im Allgemeinen gegeben. Modifikationen mittels Laser hin zu Mikrotopographien sind möglich. Bei mehrfachem Lasereinsatz ist eine exakte Reproduktion derzeit nicht gegeben.

CVD verändert die Benetzbarkeit des beschichteten Trägermaterials (in dieser Studie Glas). Unterschiede in der Abscheidungsdauer bewirken allerdings nur minimale Unterschiede in der Benetzbarkeit. Durch den Lasereinsatz dagegen wird die Benetzbarkeit verändert und die Oberflächen werden hydrophober.

Eine unterschiedlich lange Abscheidungsdauer beeinflusst die Rauheit nur minimal, soweit es mittels Kontaktprofilometrie detektierbar ist. Eine Lasermodifikation führt tendenziell zu einer rauerer Oberfläche.

HOB nehmen auf Al_2O_3 -Proben eine flache, ausgebreitete Zellform an. Die Zellintegrität ist bei allen Al_2O_3 -Proben im Vergleich zur Glasprobe reduziert (besonders bei MD- Al_2O_3 -LV). Die Adhärenz ist bei allen Al_2O_3 -Proben im Vergleich zur Glasprobe reduziert. Proben mit hoher NW-Dichte setzen die Adhärenz mehr herab als Proben mit niedrigerer Dichte. Die Filopodienbildung wird durch CVD im Vergleich zu Glas reduziert. Jedoch bieten durch CVD und Laser produzierte Mikropartikel den Filopodien Haftpunkte.

Die Anzahl adhärrierender Zellen, ihre Fläche und Proliferation werden durch CVD nicht beeinflusst. Das ist insgesamt ein deutlicher Hinweis auf eine gute Zellkompatibilität von Al_2O_3 -Beschichtungen.

Die Viabilität wird durch CVD mit Ausnahmen (MD- Al_2O_3 -DV und MD- Al_2O_3 -LV) nicht beeinflusst. Auch das deutet auf eine gute Zellkompatibilität von Al_2O_3 -Beschichtungen hin.

CVD beeinflusst die Differenzierung: Verschiedene osteoblastäre Marker sind auf mRNA-Ebene hochreguliert. Eine unterschiedlich lange Abscheidungsdauer beeinflusst dabei die Differenzierung. Die Hochregulation von OPN an Tag 0 ohne Supplementierung beweist einen reinen Topographieeffekt. Diese Ergebnisse sprechen für ein gegebenes Potential von Al_2O_3 -Beschichtungen, eine osteogene Differenzierung auszulösen oder zu verstärken.

5.5.2. Perspektive

Al_2O_3 -Beschichtungen, die mittels CVD hergestellt werden, sind ein interessanter Ansatz in der Entwicklung neuer, osteointegrativer Biomaterialien. Vor allem Al_2O_3 -DV, die nicht durch Lasereinsatz modifiziert wurden, sind gut reproduzierbar herzustellen.

Untersuchungen zum Adhäsionsverhalten, der Zellfläche und dem Proliferationsverhalten sowie zur Viabilität von humanen Osteoblasten deuten auf eine hohe Zellkompatibilität hin. Untersuchungen zur osteogenen Differenzierung erbrachten sogar den Hinweis, dass insbesondere dichte Al_2O_3 -Beschichtungen hohes osteogenes Potential besitzen.

Dennoch dürfen die Ergebnisse der REM-Untersuchungen nicht außer Acht gelassen werden, die ergaben, dass Integrität und Adhärenz der Zellen im Vergleich zur Glasprobe reduziert waren.

In weiterführenden Studien wäre eine genauere materialwissenschaftliche Charakterisierung insbesondere der Rauheit wünschenswert (z.B. durch FIB). So könnte ein definiertes Modell zur systematischen Untersuchung der Zell-Oberflächen-Interaktion bei gleichbleibender Chemie im standardisierten Zellkulturversuch für die Grundlagenforschung etabliert werden.

Die vorliegende Arbeit kann nur einen ersten Schritt darstellen in der Entwicklung von Biomaterialien, die mit CVD-Technik beschichtet wurden. Weitere Schritte, die sich unter anderen mit folgenden Fragen auseinandersetzen müssten, sollten sich anschließen: Wie ist die Reaktion von Fibroblasten, die in der Entstehung der aseptischen Prothesenlockerung mitentscheidend sind, auf derartige Al_2O_3 -Beschichtungen? Wie stabil haften NW am Substrat? Wie ist die Biokompatibilität der Al_2O_3 -Beschichtungen im Tierversuch?

Der klinische Einsatz und das erklärte Ziel, das Auftreten der aseptischen Prothesenlockerung zu reduzieren, liegen in einer gewissen Ferne. Dennoch hat die vorliegende Arbeit grundlegende Erkenntnisse erbracht und kann als erster Schritt auf diesem Weg gesehen werden.

6. Literaturverzeichnis

Aebli N, Pitto R, Krebs J (2005) Fettembolie - eine potentiell tödliche Komplikation während orthopädischen Eingriffen. Schweiz Med Forum 5: 512-518

Albrektsson T, Johansson C (2001) Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. Eur Spine J 10 Suppl 2:96-101

Andrade JD, Hlady V (1987) Plasma protein adsorption: the big twelve. Ann N Y Acad Sci 516:158-172

Anselme K (2000) Osteoblast adhesion on biomaterials. Biomaterials 21:667-681

Anselme K, Bigerelle M (2005) Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion. Acta Biomater 1:211-222

Anselme K (2011) Biomaterials and interface with bone. Osteoporos Int 22:2037-2042

Anselme K, Ponche A, Bigerelle M (2012) Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 2: biological aspects. Proc Inst Mech Eng 224H:1487-1507

Axelrad TW, Kakar S, Einhorn TA (2007) New technologies for the enhancement of skeletal repair. Injury 38:49-62

Balasundaram G, Webster TJ (2007) Increased osteoblast adhesion on nanograined Ti modified with KRSR. J Biomed Mater Res 80:602-611

Ball MD, Sherlock R, Glynn T (2004) Cell interactions with laser-modified polymer surfaces. J Mater Sci Mater Med 15:447-449

Barbosa MA, Martins MCL, Barbosa JN (2009) Cellular response to the surface chemistry of nanostructured biomaterials. In: Di Silvio L (ed) Cellular response to nanostructured biomaterials. Woodhead Publishing

Ben-Ze'ev A (1985) The cytoskeleton in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 780:197-212

Berchtold, R (2008) *Chirurgie*. Elsevier 6:273

Berry DJ (2002) Management of periprosthetic fractures: the hip. *J Arthroplasty* 17:11-13

Bordini B, Stea S, De Clerico M, Strazzari S, Sasdelli A, Toni A (2007) Factors affecting aseptic loosening of 4750 total hip arthroplasties: multivariate survival analysis. *BMC Musculoskelet Disord* 8:69

Boyan BD, Lohmann CH, Dean DD, Sylvia VL, Cochran DL, Schwartz Z (2001) Mechanisms involved in osteoblast response to implant surface morphology. *Annu Rev Mater Res* 31:357-371

Brett PM, Harle J, Salih V, Mihoc R, Olsen I, Jones FH (2004) Roughness response genes in osteoblasts. *Bone* 35:124-133

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

Burke DW BC, O'Connor DO (1991) Dynamic measurement of interface mechanics in vivo and the effect of micromotion on bone ingrowth into a porous surface device under controlled loads in vivo. *Trans Orthop Res Soc* 16:103

Byun IS, Sarkar S, Anirban Jyoti M, Min YK, Seo HS, Lee BT (2010) Initial biocompatibility and enhanced osteoblast response of Si doping in a porous BCP bone graft substitute. *J Mater Sci Mater Med* 21:1937-1947

Charnley J (1960) Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. J Bone Joint Surg Br 42B:28-30

Charnley J (1961) Arthroplasty of the hip. A new operation. Lancet. 1:1129-1132

Charnley J (1979) Low friction arthroplasty of the hip: theory and practice. Springer

Cooper LF (2000) A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. J Prosthet Dent 84:522-534

Dalby MJ, Riehle MO, Johnstone H, Affrossman S, Curtis AS (2004) Investigating the limits of filopodial sensing: a brief report using SEM to image the interaction between 10 nm high nano-topography and fibroblast filopodia. Cell Biol Int 28:229-236

Daly PJ, Morrey BF (1992) Operative correction of an unstable total hip arthroplasty. J Bone Joint Surg Am 74:1334-1343

De Bernardez LS, Ferrón J, Goldberg EC, Buitrago RH (1984) The effect of surface roughness on XPS and AES. Surface Science 139:541-548

Deligianni DD, Katsala ND, Koutsoukos PG, Missirlis YF (2001) Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. Biomaterials 22:87-96

Denhardt DT, Guo X (1993) Osteopontin: a protein with diverse functions. FASEB J 7:1475-1482

Donlan RM (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis 8:881-890

Effenberger H, Zumstein MD, Reinart S, Schuh A (2008) Benchmarking in der Hüftendoprothetik. OUP 44:213-225

Fender D, Harper WM, Gregg PJ (1999) Outcome of Charnley total hip replacement across a single health region in England: the results at five years from a regional hip register. *J Bone Joint Surg Br* 81:577-581

Flugsrud GB, Nordsletten L, Espehaug B, Havelin LI, Meyer HE (2007) The effect of middle-age body weight and physical activity on the risk of early revision hip arthroplasty: a cohort study of 1535 individuals. *Acta Orthop* 78:99-107

Förster G, Hundt G, Schmidt M, Claes L, Kirschner P, Perka C (2012) Besonderheiten, Komplikationen und Komplikationsmanagement. In: Claes L, Kirschner P, Perka C, Rudert M (eds) *AE-Manual der Endoprothetik*. Springer:325

Franceschi RT, Ge C, Xiao G, Roca H, Jiang DI (2007) Transcriptional Regulation of Osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci* 1116:196

Friecke C, Wodtke J (2008) Management des Protheseninfektes. *Chirurg* 79:777

Garcia AJ, Ducheyne P, Boettiger D (1997) Quantification of cell adhesion using a spinning disc device and application to surface-reactive materials. *Biomaterials* 18:1091-1098

Gradinger R, Gollwitzer H (2006) Hüfte: Standardimplantat. In: Gradinger R, Gollwitzer H (eds) *Ossäre Integration*. Springer:99

Gradinger R, Gollwitzer H, Burgkart R, Glisson R (2006, e) Spannungsverteilung und Primärstabilität bei vollstrukturierten versus teilstrukturierten Femurkomponenten. In: Gradinger R, Gollwitzer H (eds) *Ossäre Integration*. Springer:126

Gradinger R, Gollwitzer H, Grunke H (2006, a) Geschichtliche Entwicklung der Endoprothetik und der Fixation durch Spongiosa-Metal[®]. In: Gradinger R, Gollwitzer H (eds) *Ossäre Integration*. Springer:2

Gradinger R, Gollwitzer H, Kerschbaumer S (2006, f) Histologische Untersuchungen von Implantaten. In: Gradinger R, Gollwitzer H (eds) *Ossäre Integration*. Springer:38

Gradinger R, Gollwitzer H, Repenning D (2006, g) Beschichtungen auf Implantaten. In: Gradinger R, Gollwitzer H (eds) Ossäre Integration. Springer:53

Gradinger R, Gollwitzer H, Schmidmaier G, Wildemann B (2006, d) Biologische und physiologische Grundlagen In: Gradinger R, Gollwitzer H (eds) Ossäre Integration. Springer:24

Gradinger R, Gollwitzer H, Staubach KH, Grunzei H, Aschoff H (2006, b) Endo-/Exoprothese. In: Gradinger R, Gollwitzer H (eds) Ossäre Integration. Springer:190

Gradinger R, Gollwitzer H, Steinhauser E (2006, c) Biomechanische Grundlagen der Implantatverankerung. In: Gradinger R, Gollwitzer H (eds) Ossäre Integration. Springer:16

Gristina AG (1987) Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. Science 237:1588-1595

Gristina AG, Costerton JW (1984) Bacterial adherence and the glycocalyx and their role in musculoskeletal infection. Orthop Clin North Am 15:517-535

Gluck T (1890) Autoplastik-Transplantation: Implantation von Fremdkörpern. Berliner Klinische Wochenschrift 27:421-427

Gordon JA, Tye CE, Sampaio AV, Underhill TM, Hunter GK, Goldberg HA (2007) Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. Bone 41:462-473

Hamilton DW, Brunette DM (2007) The effect of substratum topography on osteoblast adhesion mediated signal transduction and phosphorylation. Biomaterials 28:1806-1819

Ha S-W, Wintermantel E (2009) Biokompatible Keramische Werkstoffe. In: Wintermantel E, Ha S-W (eds) Medizintechnik - Life Science Engineering. Springer 5:277

Halder AM, Stiehler M, Günther KP, Claes L, Kirschner P, Perka C (2012) Historie und Epidemiologie. In: Claes L, Kirschner P, Perka C, Rudert M (eds) AE-Manual der Endoprothetik. Springer:1

Hayes JS, Czekanska EM, Richards RG (2011) The cell-surface interaction. Adv Biochem Eng Biotechnol 126:1-31

Hayes JS, Khan IM, Archer CW, Richards RG (2010) The role of surface microtopography in the modulation of osteoblast differentiation. Eur Cell Mater. 20:98-108

Hayes JS, Richards RG (2010) Surfaces to control tissue adhesion for osteosynthesis with metal implants: in vitro and in vivo studies to bring solutions to the patient. Expert Rev Med Devices 7:131-142

Hendel D, Yasin M, Garti A, Weisbort M, Beloosesky Y (2002) Fracture of the greater trochanter during hip replacement: a retrospective analysis of 21/372 cases. Acta Orthop Scand 73:295-297

Hirner A, Weise K (2008) Chirurgie. Thieme 2:233

Holthaus MG, Treccani L, Rezwan K (2013) Osteoblast viability on hydroxyapatite with well-adjusted submicron and micron surface roughness as monitored by the proliferation reagent WST-1. J Biomater Appl 7:791-800

Ilchner B, Singer R (2004) Herstellungs- und verarbeitungstechnische Verfahren. Werkstoffwissenschaften und Fertigungstechnik 4. Springer:263

Jacob HAC, Grifka J, Kuster M (2011) Materialverhalten (Knochen und Implantatwerkstoffe) bei mechanischer Beanspruchung. In: Grifka J und Kuster M (eds) Orthopädie und Unfallchirurgie. Springer:29

Jäger M, Urselmann F, Witte F, Zanger K, Li X, Ayers DC (2008) Osteoblast differentiation onto different biometals with an endoprosthetic surface topography in vitro. *J Biomed Mater Res A* 86:61-75

Jäger M, Zilkens C, Zanger K, Krauspe R (2007) Significance of Nano- and Microtopography for Cell-Surface Interactions in Orthopaedic Implants. *J Biomed Biotechnol* 8:69036

Jayaraman M, Meyer U, Buhner M, Joos U, Wiesmann HP (2004) Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials* 25:625-631

Johnsen SP, Sorensen HT, Lucht U, Soballe K, Overgaard S, Pedersen AB (2006) Patient-related predictors of implant failure after primary total hip replacement in the initial, short- and long-terms. A nationwide Danish follow-up study including 36984 patients. *J Bone Joint Surg Br* 88:1303-1308

Judet J, Judet R (1950) The use of an artificial femoral head for arthroplasty of the hip joint. *J Bone Joint Surg Br* 32-B:166-173

Kälicke T, Wick M, Frangen T, Muhr G, Seybold D (2005) Iliopsoastendinitis - seltene Schmerzursache nach Implantation einer Hüfttotalendoprothese. *Unfallchirurg* 108:1078

Kalbacova M, Rezek B, Baresova V, Wolf-Brandstetter C, Kromka A (2009) Nanoscale topography of nanocrystalline diamonds promotes differentiation of osteoblasts. *Acta Biomater* 5:3076-3085

Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:137-138

Kasemo B, Gold J (1999) Implant surfaces and interface processes. *Adv Dent Res* 13:8-20

Katz JN (2001) Preferences, quality and the (under)utilization of total joint arthroplasty. *Med Care* 39:203-205.

Kienapfel H, Becker A, Claes L, Kirschner P, Perka C, Rudert M (2012) Prothesenregister und Langzeitergebnisse. In: Claes L, Kirschner P, Perka C, Rudert M (eds) *AE-Manual der Endoprothetik*. Springer:419

Kieswetter K, Schwartz Z, Dean DD, Boyan BD (1996) The role of implant surface characteristics in the healing of bone. *Crit Rev Oral Biol Med* 7:329-345

Kurtz S, Ong K, Lau E, Mowat F, Halpern M (2007) Projections of Primary and Revision Hip and Knee Arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *J Bone Joint Surg Am* 89:780-785

Lee CR, Grad S, Maclean JJ, Iatridis JC, Alini M (2005) Effect of mechanical loading on mRNA levels of common endogenous controls in articular chondrocytes and intervertebral disk. *Anal Biochem* 341:372-375

Lassen MR, Bauer KA, Eriksson BI, Turpie AG (2002) Postoperative fondaparinux versus preoperative enoxaparin for prevention of venous thromboembolism in elective hip-replacement surgery: a randomised double-blind comparison. *Lancet* 359:1715-1720

Malchau H, Herberts P, Eisler T, Garellick G, Soderman P (2002) The Swedish Total Hip Replacement Register. *J Bone Joint Surg Am* 84-A Suppl 2:2-20

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

Mathews S, Bhonde R, Gupta PK, Totey S (2011) A novel tripolymer coating demonstrating the synergistic effect of chitosan, collagen type 1 and hyaluronic acid on osteogenic differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 414:270-276

Meikle MC (2007) On the transplantation, regeneration and induction of bone: The path to bone morphogenetic proteins and other skeletal growth. *Surgeon* 5:232-243

Meredith N (1998) Assessment of implant stability as a prognostic determinant. *Int J Prosthodont* 11:491-501

Merle C, Clarius M, Aldinger PR (2010) Langzeitergebnisse zementfreier Hüftendoprothesenschnäbe. *Orthopäde* 39:80-86

Metzger W, Schwab B, Miro MM, Grad S, Simpson A, Veith M, Wennemuth G, Zaporozhchenko V, Verrier, S, Hayes JS, Bubel M, Pohlemann T, Oberringer M, Aktas C (2013) Induction of Osteogenic Differentiation by Nanostructured Alumina Surfaces. *J Biomed Nanotechnol* 9:1-15

Merx H, Dreinhofer KE, Gunther KP (2007) Sozialmedizinische Bedeutung der Arthrose in Deutschland. *Z Orthop Unfall* 145:421-429

Meyer U, Buchter A, Wiesmann HP, Joos U, Jones DB (2005) Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces. *Eur Cell Mater* 9:39-49

Michler GH (2008) Scanning Electron Microscopy (SEM). *Electron Microscopy of Polymers*. Springer:87

Miller SC, de Saint-Georges L, Bowman BM, Jee WS (1989) Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microsc* 3:953-960

Möller K, Meyer U, Szulczewski DH, Heide H, Priessnitz B, Jones DB (1994) The influence of zeta-potential and interfacial-tension on osteoblast-like cells. *Eur Cell Mater* 4:263-274

Moore A, Bohlmann, HR (1943) Metal hip joint. A case report. *J Bone Joint Surg Br* 25:688-692

Morscher E (1987) Experiences, requirements and development of cement-free hip endoprostheses. *Orthopäde* 16:185-196

Morshed S, Bozic KJ, Ries MD, Malchau H, Colford JM (2007) Comparison of cemented and uncemented fixation in total hip replacement: a meta-analysis. *Acta Orthop* 78:315-326

Nachbur B, Meyer RP, Baumgartner J (1989) Vascular complications in surgery of the hip joint. *Orthopäde* 18:552-558

Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108:17-29

Nikolajsen L, Brandsborg B, Lucht U, Jensen TS, Kehlet H (2006) Chronic pain following total hip arthroplasty: a nationwide questionnaire study. *Acta Anaesthesiol Scand* 50:495-500

Nilsson AK, Petersson IF, Roos EM, Lohmander LS (2003) Predictors of patient relevant outcome after total hip replacement for osteoarthritis: a prospective study. *Ann Rheum Dis* 62:923-930

Nixon M, Taylor G, Sheldon P, Iqbal SJ, Harper W (2007) Does bone quality predict loosening of cemented total hip replacements? *J Bone Joint Surg Br* 89:1303-1308

Park JY, Davies JE (2000) Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res* 11:530-539

Patel PD, Potts A, Froimson MI (2007) The dislocating hip arthroplasty: prevention and treatment. *J Arthroplasty* 22:86-90

Pawlus P, Śmieszek M (2005) The influence of stylus flight on change of surface topography parameters. *J precisioneng* 29:272-280

Perka C, Thiele K, Matziolis G, Gehrke T, Claes L, Kirschner P (2012) Spätfolgen - Diagnose und Therapie. In: Claes L, Kirschner P, Perka C, Rudert M (eds) AE-Manual der Endoprothetik. Springer:37

Pierson HO (1999) Handbook of Chemical Vapor Deposition; Principles, Technology, and Applications. Noyes Publications 2:45

Pilliar RM, Lee JM, Maniopoulos C (1986) Observations on the effect of movement on bone ingrowth into porous-surfaced implants. Clin Orthop Relat Res 208:108-113

Ponche A, Bigerelle M, Anselme K (2010) Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 1: physico-chemical effects. Proc Inst Mech Eng 224H:1471-1486

Ponsonnet L, Reybier K, Jaffrezic N, Comte V, Lagneau C, Lissac M, Martelet C (2003) Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. Mater Sci Eng C 23:551-560

Portan DV, Kroustalli AA, Deligianni DD, Papanicolaou GC (2012) On the biocompatibility between TiO₂ nanotubes layer and human osteoblasts. J Biomed Mater Res A 100:2546:2553

Pschyrembel (2004) Klinisches Wörterbuch. Walter de Gruyter 260:855

Puleo DA, Nanci A (1999) Understanding and controlling the bone-implant interface. Biomaterials 20:2311-2321

Redey SA, Nardin M, Bernache-Assolant D, Rey C, Delannoy P, Sedel L (2000) Behavior of human osteoblastic cells on stoichiometric hydroxyapatite and type A carbonate apatite: Role of surface energy. J Biomed Mater Res 50:353-364

Richards RG (2008) The relevance of implant surfaces in hand fracture fixation. Osteosynthesis in the hand: current concepts: FESSH instructional course 2008. Karger:20-30

Roach P, Eglin D, Rohde K, Perry C (2007) Modern biomaterials: a review-bulk properties and implications of surface modifications. *J Mater Sci Mater Med* 18:1263-1277

Rodan GA, Heath JK, Yoon K, Noda M, Rodan SB (1988) Diversity of the osteoblastic phenotype. *Ciba Found Symp* 136:78-91

Rorabeck CH, Bourne RB, Laupacis A, Feeny D, Wong C, Tugwell P (1994) A double-blind study of 250 cases comparing cemented with cementless total hip arthroplasty. Cost-effectiveness and its impact on health-related quality of life. *Clin Orthop Relat Res* 298:156-164

Rosa AL, Beloti MM (2003) Rat bone marrow cell response to titanium and titanium alloy with different surface roughness. *Clin Oral Implants Res* 14:43-48

Rudnik V, Sanyal A, Syed FA, Monroe DG, Spelsberg TC, Oursler MJ (2008) Loss of ERE binding activity by estrogen receptor-alpha alters basal and estrogen-stimulated bone-related gene expression by osteoblastic cells. *J Cell Biochem* 103:896-907

Ruoslahti E (1991) Integrins. *J Clin Invest* 87:1-5

Rupp F, Scheideler L, Olshanska N, de Wild M, Wieland M, Geis-Gerstorfer J (2006) Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. *J Biomed Mater Res A* 76:323-334

Saldana L, Bensiamar F, Bore A, Vilaboa N (2011) In search of representative models of human bone-forming cells for cytocompatibility studies. *Acta Biomater* 7:4210-4221

Sato M, Webster TJ (2004) Nanobiotechnology: implications for the future of nanotechnology in orthopedic applications. *Expert Rev Med Devices* 1:105-114

Schädler S, Burkhardt C, Kappler A (2008) Evaluation of Electron Microscopic Sample Preparation Methods and Imaging Techniques for Characterization of Cell-Mineral Aggregates. *Geobiology* 25:228-239

Schäfer C, Faust U, Kirchgeßner N, Merkel N, Hoffmann B (2011) The filopodium - A stable structure with highly regulated repetitive cycles of elongation and persistence depending on the actin cross-linker fascin. *Cell Adh Migr* 5:431-438

Schauwecker J, Pohlig F, Toepfer A, Gollwitzer H, von Eisenhart-Rothe R (2011) Heterotope Ossifikationen im Rahmen der Hüftendoprothetik. *Orthopäde* 40:500-505

Schwartz Z, Lohmann CH, Oefinger J, Bonewald LF, Dean DD, Boyan BD (1999) Implant Surface Characteristics Modulate Differentiation Behavior of Cells in the Osteoblastic Lineage. *Adv Dent Res* 13:38-48

Seah MP (1984) A review of the analysis of surfaces and thin films by AES and XPS. *Vacuum* 34:463-478

Setzer B, Bachle M, Metzger MC, Kohal RJ (2009) The gene-expression and phenotypic response of hFOB 1.19 osteoblasts to surface-modified titanium and zirconia. *Biomaterials* 30:979-990

Shah-Derler B, Wintermantel E, Ha S-W (2009) Gewebe. In: Wintermantel E, Ha S-W (eds) *Medizintechnik - Life Science Engineering Medizintechnik*. Springer 5:163

Smith-Petersen MN (1939) Arthroplasty Of The Hip A New Method. *J Bone Joint Surg Am* 21:269-288

Sotereanos NG, Miller MC, Smith B, Hube R, Sewecke JJ, Wohlrab D (2006) Using intraoperative pelvic landmarks for acetabular component placement in total hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 21:832-840

Statistisches Bundesamt (18.11.2009) Bevölkerung Deutschlands bis 2060. 12. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung:16-17

Stewart PS, Costerton JW (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358:135-138

Stöver M, Renke-Gluszko M, Schratzenstaller T, Will J, Klink N, Behnisch B (2006) Microstructuring of stainless steel implants by electrochemical etching. *J Mater Sci* 41:5569-5575

Toni A, Lewis CG, Sudanese A, Stea S, Calista F, Savarino L (1994) Bone demineralization induced by cementless alumina-coated femoral stems. *J Arthroplasty* 9:435-444

Vandrovcova M, Bacakova L (2011) Adhesion, growth and differentiation of osteoblasts on surface-modified materials developed for bone implants. *Physiol Res* 60:403-417

Variola F, Brunski JB, Orsini G, Tambasco de Oliveira P, Wazen R, Nanci A (2011) Nanoscale surface modifications of medically relevant metals: state-of-the art and perspectives. *Nanoscale* 3:335-353

Veith M, Aktas OC, Metzger W, Sossong D, Ullah Wazir H, Grobelsek I, Pütz, Wennemuth G, Pohlemann T, Oberringer M (2010) Adhesion of fibroblasts on micro- and nanostructured surfaces prepared by chemical vapor deposition and pulsed laser treatment. *Biofabrication* 2:035001

Veith M, Sow E, Werner U, Petersen C, Aktas O (2008) The Transformation of Core/Shell Aluminium/Alumina Nanoparticles into Nanowires. *Eur J Inorg Chem* 33:5181-5184

Vroman L (1987) The importance of surfaces in contact phase reactions. *Semin Thromb Hemost* 13:79-85

Walpole AR, Briggs EP, Karlsson M, Pålsgård E, Wilshaw PR (2003) Nano-porous Alumina Coatings for Improved Bone Implant Interfaces. *Mat-wiss. u Werkstofftech* 34:1064-1068

Wang C, Karlis GA, Anderson GI, Dunstan CR, Carbone A, Berger G (2009) Bone growth is enhanced by novel bioceramic coatings on Ti alloy implants. J Biomed Mater Res A 90:419-428

Webster TJ, Eijofor JU (2004) Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti₆Al₄V, and CoCrMo. Biomaterials 25:4731-4739

Webster TJ, Siegel RW, Bizios R (1999) Osteoblast adhesion on nanophase ceramics. Biomaterials 20:1221-1227

Weidong Z, Qibin L, Min Z, Xudong W (2008) Biocompatibility of a functionally graded bioceramic coating made by wide-band laser cladding. J Biomed Mater Res A 87:429-433

Weigel B, Nerlich M (2011) Praxisbuch Unfallchirurgie: Springer 2:532-533

Wetz HH, Gisbertz D (2000) History of artificial limbs for the leg. Orthopäde 29:1018-1032

Widmer M, Felten-Rösler U, Wintermantel E, Ha S-W (2009) Hüftgelenks-Endoprothesen. In: Wintermantel E, Ha S-W (eds) Medizintechnik - Life Science Engineering. Springer 5:1611

Willi R, Rieker C, Thomsen M, Thomas P, Claes L, Kirschner P (2012) Implantate. In: Claes L, Kirschner P, Perka C, Rudert M (eds) AE-Manual der Endoprothetik. Springer:47

Wintermantel E, Ha S-W, Klee D, Lahann J, Plüster W (2009, a) Dünne Beschichtungen auf Biomaterialien. In: Wintermantel E, Ha S-W (eds) Medizintechnik - Life Science Engineering. Springer 5:707

Wintermantel E, Shah-Derler B, Bruinink A, Petitmermet M, Blum J, Ha S-W (2009, b) Biokompatibilität. In: Wintermantel E, Ha S-W (eds) Medizintechnik - Life Science Engineering. Springer 5:83

Wirth C, Groszogaeta B, Lagneaua C, Jaffrezic-Renaultc N, Ponsonnet L (2008) Biomaterial surface properties modulate in vitro rat calvaria osteoblasts response: Roughness and or chemistry? Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 28:990-1001

Woo KM, Chen VJ, Ma PX (2003) Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. J Biomed Mater Res A 67:531-537

Wu CL, Lee SS, Tsai CH, Lu KH, Zhao JH, Chang YC (2012) Platelet-rich fibrin increases cell attachment, proliferation and collagen-related protein expression of human osteoblasts. Aust Dent J 57:207-212

Zhao G, Raines AL, Wieland M, Schwartz Z, Boyan BD (2007) Requirement for both micron- and submicron scale structure for synergistic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography. Biomaterials 28:2821-2829

Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL (2005) High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. J Biomed Mater Res A 74:49-58

Ziegler J, Amlang M, Bottesi M, Kirschner S, Witzleb WC, Günther KP (2007) Ergebnisse endoprothetischer Versorgung bei Patienten vor dem 50. Lebensjahr. Orthopäde 36:325-336

Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE (2004) Prosthetic-joint infections. N Engl J Med 351:1645-1654

7. Publikationen

Wissenschaftliche Publikationen:

Metzger W, Schimmelpfennig L, Schwab B, Sossong D, Dorst N, Bubel M, Görg A, Pütz N, Wennemuth G, Pohlemann T, Oberringer M (2013) Expansion and differentiation of human primary osteoblasts in 2D and 3D culture. Biotech Histochem 88:86-102

Metzger W, Schwab B, Miro MM, Grad S, Simpson A, Veith M, Wennemuth G, Zaporojtchenko V, Verrier, S, Hayes JS, Bubel M, Pohlemann T, Oberringer M, Aktas C (2013) Induction of osteogenic differentiation by nanostructured alumina surfaces. J Biomed Nanotechnol. Zur Publikation angenommen 31. Juli 2013, voraussichtliche Veröffentlichung März 2014

Veröffentlichte Kongressbeiträge:

Schimmelpfennig L, Schwab B, Metzger W, Sossong D, Aktas C, Miro MM, Lee J, Veith M, Pohlemann T, Oberringer M (2011) Cell compatibility of micro- and nanostructured alumina surfaces prepared by chemical vapor deposition. Tissue Eng Part A 17:568-569

BioStar 2010-Science in Exchange, 4th Congress on Regenerative Biology and Medicine, 13. - 15.10.2010, Stuttgart.

Metzger W, Schwab B, Schimmelpfennig L, Aktas C, Miro MM, Oberringer M. Generierung zellselektiver Aluminiumoxid-Beschichtungen durch chemische Gasphasenabscheidung.

DOI: 10.3205/11dkou613, URN: urn:nbn:de:0183-11dkou6138

<http://www.egms.de/static/de/meetings/dkou2011/11dkou613.shtml>

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, 75. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, 97. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie, 52. Tagung des Berufsverbandes der Fachärzte für Orthopädie und Unfallchirurgie, 25. - 28.10.2011, Berlin.

8. Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde im molekular- und zellbiologischen Forschungslabor der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes, erstellt. Mein herzlicher Dank gilt:

Prof. Dr. med. Tim Pohlemann. Für die großzügige Unterstützung meiner wissenschaftlichen und studentischen Tätigkeiten, für die Überlassung des Themas und die ausgezeichneten Möglichkeiten diese Arbeit in seiner Abteilung zu bearbeiten.

PD Dr. rer. nat. Martin Oberringer. Für die exzellenten Arbeitsbedingungen in den von ihm geleiteten Laboreinrichtungen sowie für fruchtbare Diskussionen und Anregungen und das schnelle Gegenlesen.

Dr. rer. nat. Wolfgang Metzger. Für die Einarbeitung in die Thematik, das wissenschaftliche Arbeiten und für das Lehren der nötigen Methoden sowie die väterliche Betreuung zu jeder Zeit und das schnelle Gegenlesen.

Monika Bubel, Daniela Sossong und Norbert Pütz. Für tatkräftige Unterstützung in verschiedenen Bereichen dieser Arbeit und wertvolle Anregungen.

Dr.-Ing. Oral Cenk Aktas und Dr.-Ing. Marina Martinez Miró. Als Kooperationspartner am Leibniz-Institut für Neue Materialien für die erfolgreiche Zusammenarbeit und Hilfe in den materialwissenschaftlichen Bereichen dieser Arbeit

Dr. rer. Nat. Sibylle Grad. Als Kooperationspartnerin am AO Research Institute für die erfolgreiche Zusammenarbeit, gegenseitige Unterstützung und hilfreiche Ratschläge.

.

9. Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Benedikt Schwab
Geburtsdatum	12. November 1983
Geburtsort	Hannover
Familienstatus	Ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch

PRAKTISCHES JAHR

08/2010 - 12/2010	Wahlfach Radiologie Klinik für diagnostische und interventionelle Radiologie Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg
12/2010 - 03/2011	Pflichtfach Innere Medizin Gastroenterologie / Kardiologie Medizinische Universität Innsbruck, Österreich
04/2011 - 07/2011	Pflichtfach Chirurgie Unfallchirurgie / Allgemeinchirurgie Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg

FAMULATUREN, PRAKTIKA, ZIVILDIENT

08/2003 - 05/2004	Zivildienst in der Kinderrheumaklinik Garmisch (Bayern)
02/2005 - 04/2005	Pflegepraktikum (drei Monate) Krankenhaus Weilheim (Bayern)
03/2008	Unfall- und Allgemeinchirurgie (vierwöchige Famulatur) Chirurgische Klinik Seefeld (Bayern)
03/2009	Herzchirurgie (vierwöchige Famulatur) Medizinische Universität Innsbruck, Österreich
08/2009	Radiologie (vierwöchige Praxisfamulatur) Radiologie und Nuklearmedizin Landsberg (Bayern)

03/2010 Radiologie (vierwöchige Praxisfamulatur)
Radiologie und Nuklearmedizin Landsberg (Bayern)

AUSBILDUNG

1994 - 2003 Rhabanus- Maurus- Gymnasium St. Ottilien (Bayern);
humanistischer Zweig

2005 - 2011 Studium der Humanmedizin, Universität des Saarlandes

BERUF

Seit 01/2013 Assistenzarzt an der Klinik für diagnostische und
interventionelle Radiologie am Universitätsklinikum Ulm