

Aus der Klinik für Orthopädie
(Prof. Dr. med. Wassilew)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Die Untersuchung von laserinduzierten periodischen Oberflächenstrukturen auf
Titanlegierungen und deren Einfluss auf die Funktionalität humaner Osteoblasten
und gingivaler Fibroblasten

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2023

vorgelegt von:
Niklas Dominique Bläß
geb. am: 28.01.1998
in: Flensburg

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich
1. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Georgi Wassilew
2. Gutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Britt Wildemann
Ort, Raum: Greifswald, J02.15 (4.2.21)
Tag der Disputation: 1.12.2023

1. Einleitung:	1
1.1. Orthopädische Implantate	1
1.2. Zahnimplantate	2
1.3. Implantatmaterialien	2
1.4. Fremdkörperreaktion	3
1.5. Periprothetische Infektion	4
1.6. Aseptische periprothetische Entzündung	6
1.7. Osteolyse	7
1.8. Laserinduzierte periodische Oberflächenstrukturen	7
1.9. Forschung zu periodischen strukturierten Oberflächen (<i>LIPSS</i>)	8
1.10. Einfluss der Implantatoberfläche auf Fibroblasten und Osteoblasten	9
1.11. Forschungsmodelle zur Überprüfung der Biokompatibilität	12
1.12. Implantatverträglichkeit	13
1.13. Zielsetzung	15
2. Material und Methoden:	16
2.1. Titanlegierungen	16
2.2. Herstellung der periodischen Oberflächenstrukturen	16
2.3. Oberflächencharakterisierung der Ti6Al4V und Ti6Al4Nb-Oberflächen	17
2.4. Zellkultur	17
2.4.1. Probengewinnung	17
2.4.2. Primärisolation der humanen Osteoblasten	17
2.4.3. Zellkultivierung	18
2.4.4. Passagieren der Zellen	18
2.4.5. Zellzahlbestimmung	18
2.4.6. Kryokonservierung der Zellen	19
2.4.7. Auftauen und Kultivierung der Zellen	19
2.4.8. Vorbereitung der Ti6Al4V und Ti6Al4Nb-Oberflächen	20
2.5. Quantifizierung der Metallfreisetzung	21

2.6. Quantifizierung der Zellviabilität	22
2.7. Quantifizierung der Proliferationskapazität.....	23
2.8. Lebend- / Tot-Färbung und Quantifizierung der Laktatdehydrogenase.....	24
2.9. Morphologie von humanen Osteoblasten und gingivalen Fibroblasten.....	25
2.10. Induktion der osteogenen Matrixmineralisierung.....	26
2.11. Quantifizierung löslicher Zytokine und Wachstumsfaktoren.....	27
2.12. Statistische Analyse	27
3. Ergebnisse	29
3.1. Oberflächencharakterisierung nach Lasertexturierung.....	29
3.2. Metallfreisetzung der verschiedenen Oberflächen im biomimetischen Milieu ..	31
3.3 Quantifizierung der Zellviabilität auf den verschiedenen Oberflächen	33
3.4. Proliferation von humanen Osteoblasten und gingivalen Fibroblasten auf den verschiedenen Oberflächen.....	35
3.5. Zytotoxische Wirkung der verschiedenen Oberflächen auf humane Osteoblasten und gingivale Fibroblasten	38
3.6. Einfluss der verschiedenen Oberflächen auf die Zellmorphologie von humanen Osteoblasten und gingivalen Fibroblasten	41
3.7. Osteogene Kapazität humaner Osteoblasten auf den verschiedenen Oberflächen.....	43
3.8. Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen auf den verschiedenen Oberflächen.....	45
4. Diskussion.....	52
4.2. Fazit und Ausblick	63
5. Zusammenfassung.....	65
6. Literaturverzeichnis	V
Eidesstattliche Erklärung.....	XI
Danksagung	XII

1. Einleitung:

Seit Jahrzehnten werden Implantatsysteme als Therapiemittel in der Zahn- und Humanmedizin unter fortlaufender Qualitätssteigerung eingesetzt [1, 2].

1.1. Orthopädische Implantate

In der Orthopädie haben Implantate heutzutage einen festen Bestandteil in der Therapiestrategie. Bei primären Coxarthrosen, sekundären Coxarthrosen als Folge von entzündlichen Prozessen, posttraumatische Arthrosen oder sekundären Arthrosen zum Beispiel in Folge einer Hüftdysplasie kann das entsprechende Gelenk Schmerzen auslösen und die Mobilität einschränken [3-5]. Ein Ersatz des entsprechenden Gelenks bietet für den Patienten heutzutage eine sichere Möglichkeit, um die Schmerzen zu beseitigen und die Mobilität wiederzuerlangen [3-5]. Die erste künstliche Schulter wurde 1893 erfolgreich eingesetzt [6]. In den 1960ern wurde erstmalig der totale Austausch eines Hüftgelenks durchgeführt [7]. Das erste Kniegelenk wurde in den 1970ern ersetzt [8]. Seitdem wird das Feld der Endoprothetik fortlaufend erforscht, um möglichst lange Standzeiten der Prothesen zu erreichen [7]. Fortlaufende Verbesserungen der Implantatsysteme kennzeichnen das aktuelle Forschungsbestreben.

Am Beispiel der totalen Hüftendoprothese stellt sich der Erfolg der Endoprothetik über die Jahre besonders eindrucksvoll heraus. So konnten die Standzeiten der Hüftprothesen immens verlängert werden. Heutzutage haben Hüftprothesen eine Standzeit von 15 bis 20 Jahren [9]. Patienten können nach erfolgreicher Implantation nahezu ihre volle Mobilität im Hüftgelenk wiedererlangen [10]. Aufgebaut sind diese Endoprothesen aus einem stiel förmigen konischen Schaft, der im Oberschenkelknochen (Femur) verankert wird. Auf diesen konischen Schaft wird ein Prothesenkopf über Klemmpassung befestigt. Dieser Prothesenkopf artikuliert in der Prothesenpfanne, die mit einem Inlay ausgekleidet ist [10]. Zur Befestigung des Schaftes in dem Femur existieren zurzeit zwei etablierte Verfahren. Der Schaft kann zementiert oder zementfrei befestigt werden. Bei der letzteren Methode wird ein, im Verhältnis zur Bohrung größerer und längerer Schaft verwendet. Dieser verkeilt sich zunächst und im Anschluss kann der Knochen an die Implantatoberfläche anwachsen [10]. Als zuverlässiges Material, für die verankernden Teile der Implantatsysteme, die

direkt mit Knochengewebe in Kontakt treten, hat sich Titan etabliert, das nicht nur in der Orthopädie, sondern auch in der Zahnmedizin breite Anwendung findet.

1.2. Zahnimplantate

In der Zahnheilkunde sind die Implantate zum Ersatz von Zähnen aus dem Behandlungskonzept nicht mehr wegzudenken. Erstmals in 1948 wird die erfolgreiche Insertion eines subperiostalen Implantates beschrieben [11]. Von dort an wurde das Feld der Implantation fortwährend weiterentwickelt und erforscht. Heutzutage werden jährlich 450.000 Implantate pro Jahr inseriert [11]. Darunter ist das am meisten verwendete Implantat, das enossale Implantat [11]. Dieses wird unter einem Drehmoment in den Unterkiefer oder Oberkiefer geschraubt und heilt über den Prozess der Osseointegration ein.

Das enossale Implantat besteht aus einem Implantatkörper, einem Implantat-Abutment und der prothetischen Zahnkrone. Der Körper besitzt eine Schraubenform zum Ersatz der Zahnwurzel. Die prothetische Zahnkrone wird meistens über 2 verschiedene Verfahren, Verschrauben oder Zementieren, mit dem Abutment verbunden. Das Implantat-Abutment wird über ein geometrisches Schlüssel-Schloss-Prinzip in den Implantatkörper eingesetzt und verschraubt. So verankert es die prothetische Zahnkrone letztendlich im Knochen [11]. Wichtig für möglichst lange Standzeiten sind unter anderem die verwendeten Materialien, da diese mit dem umliegenden Gewebe in direktem Kontakt stehen.

1.3. Implantatmaterialien

Unterschiedliche Implantatmaterialien spielen eine entscheidende Rolle in der heutigen Zeit. In den letzten Jahrzehnten wurde durch den Fortschritt in der Medizin und in der Fertigungstechnik eine Vielzahl an Materialien entwickelt, die in unterschiedlichsten medizinischen Anwendungen Verwendung finden [12]. In dem Feld der dentalen Implantologie und Endoprothetik sind ausgezeichnete Biokompatibilität, hohe Festigkeit, ein vergleichbares Elastizitätsmodul mit dem Knochengewebe, gute Korrosionsbeständigkeit und hohe Verschleißfestigkeit die Anforderungen an das Material. Durch die Verwendung von hoch biokompatiblen Titanlegierungen wurden große Erfolge bei der Implantation verzeichnet, da Titan und auf Titan basierende Legierungen hervorragende Ergebnisse bei der Osseointegration zeigen. Die Osseointegration ist einer der Parameter, die für den Erfolg eines Implantates entscheidend ist [11].

Am häufigsten wird Reintitan (CP-Titan) in der Zahnheilkunde verwendet [13], aufgrund von zu hoher Steifigkeit im Vergleich zum Kortikal-Knochen kam es zum häufigen Versagen der Implantate an der Implantat-Knochen Grenze durch Resorption [2]. Mit der Gestaltung einer porösen Oberfläche konnte das Einwachsen des Knochens in das Implantat verbessert werden [14]. Ti6Al4V und Ti6Al4Nb finden aufgrund niedrigerer Verschleißraten vermehrt Anwendung in der Endoprothetik [13]. Das hohe Elastizitätsmodul der Ti6Al4V Legierung führt unter Belastung zum Abbau der Knochendichte im periprothetischen Knochen. Im schlimmsten Fall kommt es zur Knochenresorption. Des Weiteren wird Vanadium als toxische Substanz diskutiert, die eine inflammatorische Antwort auslöst [15]. Auch wurde in der Vergangenheit immer wieder eine hohe Konzentration von Aluminium im Hinblick auf die Ausbildung von Morbus Alzheimer beschrieben, wobei ein kausaler Zusammenhang zwischen Aluminiumbelastung und dem Auftreten neurodegenerativer Erkrankungen heute kontrovers diskutiert wird [16]. Aus diesem Grund wird der Austausch der potenziell toxischen Elemente in den Legierungen angestrebt. Vanadium wird durch nicht-toxisches Niob ersetzt. Diese Ti6Al4Nb Legierung zeigt verbesserte Korrosionsbeständigkeit [17]. Durch die Verwendung von Titanlegierungen, deren atomarer Zusammenhalt durch kovalente Bindungen vom β -haltigen Typ gebildet wird, konnte die mechanischen Belastbarkeit und die Biokompatibilität erhöht werden und die Steifheit verringert werden. Gerade Niob und Vanadium scheinen eine stabilisierende Auswirkung auf diesen Bindungstyp zu haben [18]. Die Hauptversager dieser Legierungen sind die hohen Verschleißraten und die hohen Reibungskoeffizienten [18]. Aus diesem Grund ist die Verbesserung dieser Legierungen Gegenstand aktueller Forschung. Ein Ansatz ist die Oberflächenmanipulation, um die Ausprägung der Fremdkörperreaktion auf das Implantatmaterial zu verringern und das Einwachsverhalten, also die Osseointegration, zu verbessern [19]. Trotz sorgfältig ausgewählter und getesteter Materialien kommt es in manchen Fällen zu einer überschießenden Fremdkörperreaktion, die sich in einer chronischen Entzündung manifestieren kann und eine Lockerung des Implantates zur Folge hat.

1.4. Fremdkörperreaktion

Eine Fremdkörperreaktion (FKR) tritt als Endstadium in der Heilungsphase nach Implantation auf [20]. In diesem Kontext wird von Implantatmaterialien als

Biomaterialien gesprochen, die ein Hervorrufen von Fremdkörperreaktionen möglichst vermeiden sollen [21].

Nach Implantation laufen als Reaktion auf das Implantatmaterial folgende Prozesse im Körper ab: Proteinadsorption, akute Entzündung, chronische Entzündung, Bildung von Fremdkörper-Riesenzellen und fibröse Kapselbildung [21]. Jeder dieser Prozesse wird maßgeblich von der Oberflächenbeschaffenheit des verwendeten Materials beeinflusst. Die Oberflächenrauheit führt beispielsweise zu einer erhöhten Proteinabsorption. Zeitgleich wird auch mehr Interleukin-6 (IL-6) gebildet und es können mehr Makrophagen auf die Oberfläche immigrieren. Dadurch wird unter anderem eine chronische Entzündung ausgelöst [21].

Die Bildung von Fremdkörper-Riesenzellen ist das dominante Merkmal der FKR und grenzt die Reaktion von einer chronischen Entzündung ab. Die Riesenzellen bilden sich durch eine Fusion von Makrophagen. Es hat sich gezeigt, dass die Bildung solcher Riesenzellen auf polierten glatten Oberflächen im Vergleich zu hydrophilen rauen Oberflächen höher ist [21]. In der späten Phase der FKR kann eine fibröse Kapselbildung beobachtet werden. Die Bildung dieser Kapsel geht auf eine langanhaltende chronische Entzündung zurück. Ziel ist es, die Bildung einer solchen Kapsel abzuschwächen. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die Porosität der Oberfläche mit einer verringerten Fibrose einhergeht [22-24].

1.5. Periprothetische Infektion

Die Zahl der jährlich implantierten Hüftprothesen und Zahnimplantaten nimmt zu [25-27]. Zahnimplantate perforieren die Schleimhaut und sind ständig der oralen Mikroflora ausgesetzt. Orale Bakterien besiedeln die Oberflächen von Zahnimplantaten und können pathogene Biofilme bilden [28]. In der Endoprothetik kommt es entweder intraoperativ oder durch hämatogene Verschleppung zu einer Kontamination. Dabei ist letztere Möglichkeit deutlich seltener. Das führt entweder zu einer frühen oder verzögerten Infektion [29]. Daher kommt es bei diesen Eingriffen bei einem kleinen Prozentsatz (1-2 %) der Patienten zu Komplikationen in Form einer periprothetischen Infektion [29].

In der Zahnmedizin wird eine solche periprothetische Infektion als Periimplantitis bezeichnet, ein pathologischer Zustand, der in dem Gewebe um das Zahnimplantate herum auftritt und durch eine Entzündung der periimplantären Schleimhaut und einen fortschreitenden Verlust des stützenden Knochens gekennzeichnet ist [30]. Es lassen

sich zwei klinische Varianten unterscheiden, periimplantäre Mukositis und Periimplantitis [30]. Bei beiden Erkrankungen ist eine entzündliche Läsion vorhanden. Es kommt jedoch nur bei der letzteren Form zu einem Verlust des stützenden Knochens, wobei davon ausgegangen wird, dass die Mukositis der Periimplantitis vorausgeht [30]. Zur Diagnostik der Periimplantitis werden folgende klinische Anzeichen für eine Entzündung herangezogen: Rötung, Ödem, Schleimhautschwellung und der positive Bleeding-on-Probing Test (BOP +), mit oder ohne Eiterung. Auch die Sondierungstiefe (SD) um das Implantat herum und der röntgenologische Knochenverlust wird zur Diagnostik herangezogen [30]. Da Implantate generell einer schwankenden SD von 1,6 bis 7,0 mm unterliegen, ist die Grenze, wann von einer Periimplantitis gesprochen wird, nicht klar definiert [31].

In der Humanmedizin betrifft eine periprothetische Infektion die Gelenkprothese und das angrenzende Gewebe [32]. Im wissenschaftlichen und klinischen Diskurs herrscht Uneinigkeit über ein standardisiertes Diagnoseverfahren der periprothetischen Infektion. Das muss bei Betrachtung aktueller Literatur beachtet werden. In den letzten Jahren haben es mehrere Organisationen zur Aufgabe gemacht, standardisierte Diagnoseverfahren zu entwickeln. So kamen die Infectious Diseases Society of America (IDSA) und die Musculoskeletal Infection Society (MSIS) auf folgenden Konsens: Als Hauptkriterium muss ein Sinus-Trakt vorliegen, der mit der Prothese in Verbindung steht oder im Gewebe bzw. in der Flüssigkeit des entsprechenden Gelenkersatzes muss in zwei einzelnen Proben ein pathogener Keim nachgewiesen werden [33].

Nebenkriterien sind:

1. eine erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit und erhöhte Konzentration des c-reaktiven Proteins
2. eine erhöhte Leukozytenzahl und Konzentration in der Synovialflüssigkeit
3. Eiter in dem entsprechenden Gelenk
4. Isolierung eines Mikroorganismus in einer Kultur von periprothetischem Gewebe oder Flüssigkeit
5. fünf Neutrophile pro High-Power-Feld in fünf High-Power-Feldern aus der histologischen Analyse von periprothetischem Gewebe bei 9400-facher Vergrößerung [33]

Dies ist allerdings nur der Konsens von 2 der oben genannten Organisationen und kein international gültiger Goldstandard.

Dem landesweiten Register der Vereinigten Staaten von Amerika zufolge stieg die Inzidenz einer periprothetischen Entzündung nach Implantation einer Hüftprothese ausgedrückt als prozentualer Anteil der gesamt implantierten Hüftprothesen von 1,99 % auf 2,18 % in dem Zeitraum von 2001 bis 2009 [32]. Aus dem Register für Endoprothetik des Vereinigten Königreiches geht hervor, dass 19,8 % der Hüft-Revision aufgrund einer Entzündung im Jahr 2021 durchgeführt wurden [34]. Dem Endoprothesenregister Deutschland (EPRD) zufolge wurden im Jahr 2021 16,76 % aller Revisionseingriffe aufgrund einer Infektion durchgeführt [35]. Der Kostenfaktor und damit die Belastung für das Gesundheitssystem ist nicht unerheblich. Er entspricht, je nach Operationsverfahren, dem 3,4 bis 6-fachen einer Primärimplantation [32]. Der wirtschaftliche Aspekt macht neben dem Patientenwohl die Optimierung der Implantatsysteme noch dringlicher.

Bei den Zahnimplantaten wird die Prävalenz der periprothetischen Entzündung (dort als Periimplantitis bezeichnet) kontrovers diskutiert, da wie in dem Feld der Endoprothetik Uneinigkeit über einen Goldstandard zur Diagnostik herrscht. Je nach Studie gelten unterschiedliche Parameter, bei der die Diagnose Periimplantitis gestellt wird. Die Long-Term-Follow-Up Studie von Dierens et al. zeigt, dass bei einer Stichprobengröße von n=101 Patienten, 5 % der Patienten Zeichen einer Entzündung zeigten [36]. In einer anderen Studie von Pedro Diaz et al. wurden 57 Artikel auf die Prävalenz von Periimplantitis untersucht. Die Studie kam zu dem Schluss, dass 19,53 % der Patienten Zeichen einer Periimplantitis zeigen [37].

1.6. Aseptische periprothetische Entzündung

Neben der septischen Entzündung wird im klinischen Kontext auch eine aseptische Entzündung beschrieben. Bei dieser Form kommt es zu einer Lockerung der Prothese, ohne dass die oben beschriebenen Zeichen einer Infektion nachweisbar sind. Die Ursachen für eine aseptische Lockerung des Implantats sind Störungen an der Knochen-Zement-Grenze, eine periprothetische Fraktur, ein Bruch des prothetischen Materials selbst sowie Abnutzung und Fehlstellung des Implantats oder Materialermüdung [32]. Im Jahr 2021 wurden im Vereinigten Königreich, laut dem landesweiten Register für Endoprothetik, 56,9 % aller Hüft-Revisionseingriffe aufgrund einer aseptischen Entzündung durchgeführt [34]. Dem EPRD zufolge wurden 24,4 % der Revisionseingriffe aufgrund einer aseptischen Lockerung durchgeführt [35]. Anhand dieser Zahlen ist die aseptische Entzündung der Hauptgrund für eine Revisions-Operation, das bestätigen auch andere Studien [38, 39].

1.7. Osteolyse

Wird die beschriebene Entzündung nicht diagnostiziert, therapiert und kuriert, kommt es in umliegenden Knochen zu Osteolysen. Die periprothetische Osteolyse ist, bezogen auf das Implantat oder Endoprothese, definiert als der Prozess der fortschreitenden Zerstörung des Knochengewebes, der sich auf Röntgenbildern als fortschreitende aufgehellte Linien oder Kavitation an der Schnittstelle zwischen Implantat und Knochen zeigt [40]. Eine entscheidende Rolle spielen dabei die Osteoklasten. Die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen führt zu einer Aktivierung dieser Zellart. Die zentralen Steuerproteine sind der Rezeptor-Aktivator des NF- κ B-Liganden (*Receptor Activator of NF- κ B Ligand* (RANKL)), Monozyten-Koloniestimulierender Faktor (M-CSF) und Osteoprotegerin [41]. Durch die Zytokinkonzentration wird der Effekt der Proteine auf die Osteoklastenaktivität moduliert. In hohen Konzentrationen aktiviert beispielsweise RANKL über den Rezeptor-Aktivator von NF- κ B (*Receptor Activator of NF- κ B* (RANK)) Osteoklasten. Die Osteoklasten sorgen für eine Degradation der Knochenmatrix. Langfristig kommt es zur Resorption des periimplantären Knochengewebes, der das Implantat umgibt [41]. Klinisch führt dieser Prozess zu einer Lockerung des Zahnimplantates oder der Endoprothese. Um dem Prozess der Osteolyse entgegenzuwirken, bietet die Manipulation der Oberfläche einen vielversprechenden Ansatz, da dadurch die Entzündungsreaktion gedämpft und die Biokompatibilität erhöht werden kann.

1.8. Laserinduzierte periodische Oberflächenstrukturen

Ein Ansatz zur Modifikation der Oberflächen ist die Behandlung mit periodischen Laserimpulsen. Durch diese Bearbeitung entstehen auf den Oberflächen Strukturen, die in der Literatur als laserinduzierte periodische Oberflächenstrukturen (engl.: laser-induced-periodic surface structure (*LIPSS*)) bekannt sind [42]. Die Untersuchung von solchen *LIPSS* befindet sich seit der Jahrtausendwende im Trend [42]. Periodische Oberflächenstrukturen können auf nahezu allen Materialien durch linear polarisierte Bestrahlung induziert werden. Die Parameter, die zur Entstehung und Charakterisierung der Periodizitäten beitragen, sind: die Wellenlänge der Laserstrahlung, der Winkel, mit dem der Laserstrahl auf die Oberfläche trifft, der Spitzenwert der Fluenz des Lasers und die Zahl der gesetzten Impulse pro Spot [43]. Grundsätzlich wird zwischen zwei Arten periodischer Strukturen unterschieden, den hochfrequenten *LIPSS* (*High-spatial-frequency* (*HSFL*)) und den niederfrequenten *LIPSS* (*Low-spatial-frequency* (*LFSL*)). Bei den *HSFL* entstehen Periodizitäten der

Oberfläche kleiner gleich der verwendeten Wellenlänge zur Bestrahlung ($\Lambda \leq \lambda/2$). Bei *LFSL* entstehen Periodizitäten gleich oder ein wenig kleiner als die verwendete Wellenlänge zur Bestrahlung ($\lambda/2 \leq \Lambda \leq \lambda$). Sowohl *HSFL* als auch *LFSL* treten immer zusammen auf, wobei man beobachten kann, dass *HSFL* vermehrt bei Impulsen im Femtosekunden-pikosekunden Bereich auftreten [43]. Wird diese Oberflächenbehandlung auf Oberflächen einer Titanlegierung angewandt, entstehen *LIPSS* (Abb. 1). Die periprothetische Integration und damit der langfristige Erfolg des Implantates sollen auf diese Weise verbessert werden. Aus Studien ging hervor, dass periodische Strukturierungen, die Periodizitäten im UV-Bereich (355 nm) aufweisen, vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich der Biokompatibilität und Fremdkörperreaktion zeigten [44].

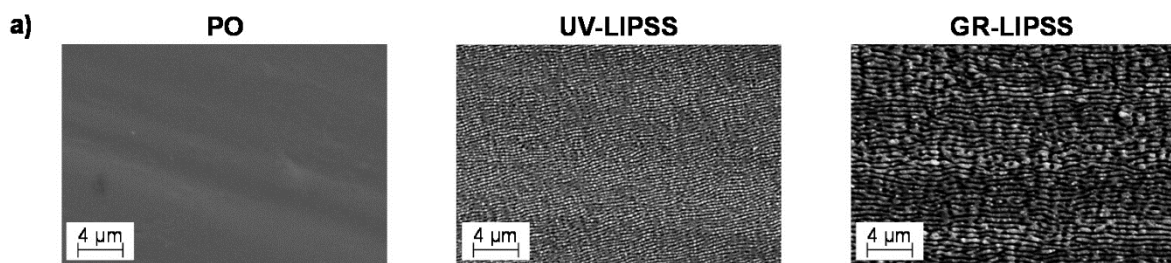


Abb. 1. LIPSS-Oberflächen unterschiedlicher Wellenlänge im Vergleich zu polierten Oberflächen a) REM-Bilder von polierten (PO), UV-LIPSS und GR-LIPSS einer LIPSS Oberflächen bei 15.000-facher Vergrößerung [44].

1.9. Forschung zu periodischen strukturierten Oberflächen (*LIPSS*)

In zahlreichen Arbeiten wurde nachgewiesen, dass auf periodisch strukturierten Oberflächen im Vergleich zu polierten Oberflächen weniger Bakterien adhären [45-48]. Dies ist vor dem Hintergrund einer bakteriell assoziierten Entzündung, im Hinblick auf die FKR, die periprothetische Entzündung und Periimplantitis eine vielversprechende Eigenschaft. Um zu überprüfen, ob neben der antibakteriellen Eigenschaft auch eine unveränderte oder verbesserte Biokompatibilität mit den periodisch strukturierten Oberflächen erreicht werden kann, bedarf es genauen Untersuchungen.

Ophélie Raimbault et al. untersuchte die Benetzbarkeit und das Zellverhalten von mesenchymalen Mäusestammzellen der Zelllinie C3H10 T1/2 auf periodischen Oberflächenstrukturen mit Periodizitäten im Bereich von 25-75 µm, die auf der Titanlegierung Ti6Al4V erzeugt wurden [49]. Die Mäusestammzellen, die auf periodisch strukturierten Oberflächen kultiviert wurden, zeigten eine anisotrope Ausbreitung in Richtung der LIPSS. Das deutet darauf hin, dass die periodisch

strukturierten Oberflächen einen direkten Effekt auf die initiale Zellantwort und die Migration der Zellen haben.

Leonardo Orazi et al. testete die Biokompatibilität und Zytotoxizität von periodisch strukturierten Oberflächen, im Bereich von 1064 nm, auf der Titanlegierung Ti6Al4Nb7. Zur Testung wurden immortalisierten Osteoblastenzelllinien von Ratten verwendet. Die Osteoblasten auf den periodisch strukturierten Oberflächen zeigten signifikant erhöhte Adhäsion und Proliferation [50]. N. Mirhosseini et al. testete periodisch strukturierte Ti6Al4V-Oberflächen, auf denen mittels Laserbearbeitung Periodizitäten von 1064 nm erzeugt wurden, an der Osteoblastenzelllinie 2T3. An den Osteoblasten konnte festgestellt werden, dass ein durchgängiges Muster und die Größe der Poren Grund für eine verbesserte Zelladhäsion sind und weniger der Kontaktwinkel und die daraus abgeleitete Benetzbarkeit [51]. Luiz Schweitzer et al. testeten Biokompatibilität und Zytotoxizität auf periodisch strukturierten Oberflächen, die mittels niederfrequenten Laser im UV-Bereich erzeugt wurden, auf der Titanlegierung Ti6Al4V mit humanen mesenchymale Stammzellen, den Vorläufern von humanen Osteoblasten [44]. Die Ergebnisse der Arbeiten sind vielversprechend. So konnte festgestellt werden, dass von periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen im UV-Bereich weniger Titan jedoch mehr Aluminium in den Kulturüberstand freigesetzt wurde und, dass die auf den Oberflächen kultivierten mesenchymalen Stammzellen weniger Laktatdehydrogenase freisetzen. Das bedeutet, dass weniger Zellen auf diesen Oberflächen sterben als in der entsprechenden Kontrollgruppe. Die metabolische Aktivität der Zellen war auf periodisch strukturierten Oberflächen nicht beeinträchtigt [44]. Daraus kann geschlossen werden, dass die Viabilität, also die Anzahl an gesunden Zellen, auf den periodisch strukturierten Oberflächen besser ist. Die aufgeführten Arbeiten zeigen, dass das zelluläre Verhalten durch die *LIPSS* beeinflusst wird.

1.10. Einfluss der Implantatoberfläche auf Fibroblasten und Osteoblasten

Bei der Einheilung und langfristigen Integration von Implantaten sind matrixmineralisierende Osteoblasten entscheidend [52-54]. Die Aufgabe der Osteoblasten ist die Bildung von Knochenmatrix und die Induktion von Mineralisationsprozessen, die am Ende des Knochenumbaus stattfinden (Abb. 2). Osteoblasten werden entweder durch Osteozyten oder direkt durch das Parathormon aktiviert. Als Antwort setzen sie monozytenchemotaktisches Protein-1 (MCP-1) frei, wodurch Osteoklastenvorläuferzellen angelockt werden [54]. In der

Knochenbildungsphase sekretieren die Osteoblasten organisches Material für die Ersatzknochenbildung. Das organische Material besteht unter anderem aus Kollagen Typ I, Proteoglykanen und glykierten Proteinen. Die Gesamtheit des von Osteoblasten sekretierten organischen Materials wird als Osteoid bezeichnet. Der Ersatzknochen besteht zunächst aus nicht-mineralisiertem Osteoid und wird im Laufe der Zeit durch Einlagerung von Hydroxylapatit mineralisiert [54-56].

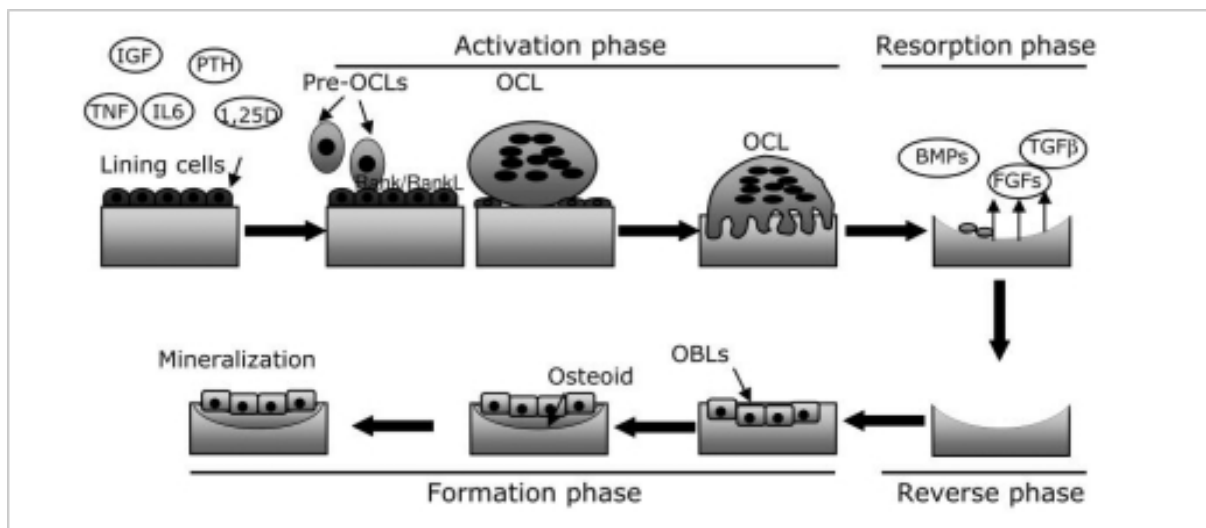


Abbildung 2. Die 4 Phasen des Knochenbaus. Rolle der Osteoklasten und Osteoblasten im Knochenumbauprozess [57].

Bei der Anwendung von dentalen Implantaten spielen gingivale Fibroblasten für einen erfolgreichen postoperativen Heilungsverlauf und die dauerhafte Integration des Implantats eine wichtige Rolle [58]. Die Aufgabe der gingivalen Fibroblasten ist es, bei Verletzung Granulationsgewebe zu bilden, die extrazelluläre Matrix des Bindegewebes zu reorganisieren und die Wunde zu stabilisieren. Tritt bei einer Verletzung Blut ins Interstitium, gelangen Wachstumsfaktoren (z.B. thrombozytärer Wachstumsfaktor (PDGF)) und Chemokine in Kontakt mit Fibroblasten im Ruhezustand. Infolgedessen werden die Fibroblasten aktiviert und produzieren den transformierenden Wachstumsfaktor-beta (TGF-β) sowie Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) (Abb. 3). Durch diese Faktoren wird die extrazelluläre Matrix reorganisiert [59].

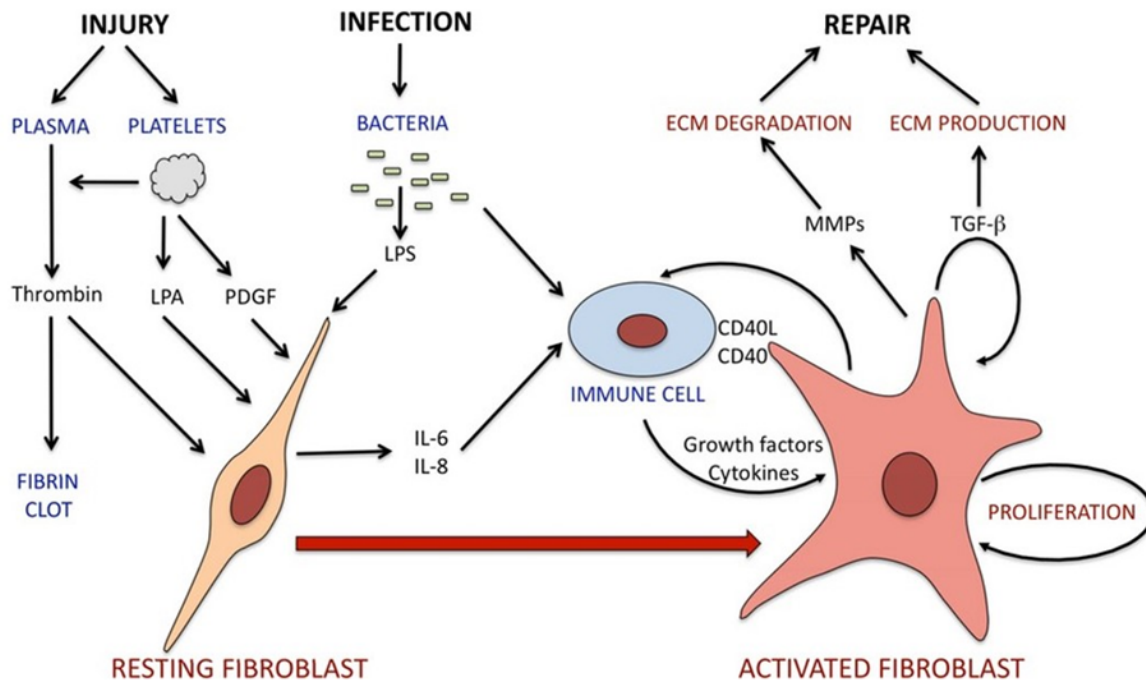


Abbildung 3. Aktivierung der ruhenden Fibroblasten und Rolle der aktivierten Fibroblasten bei Verletzung oder Infektion des Gewebes [59].

Im Zuge der FKR bildet sich auf der Implantatoberfläche eine Proteinschicht, die die Zellen des umliegenden Gewebes beeinflusst. Eine zentrale Rolle spielen dabei die extrazellulär vorliegenden Proteine Fibronectin, Vitronectin und Kollagen-I. Diesen Proteinen ist der Tripeptid aus Arginin, Glycin und Asparagin (RGD-Sequenz) gemeinsam. Das Peptidfragment, das durch diese Aminosäuresequenz gebildet wird, bindet spezifisch an Zellmembranproteine (Integrine). Über die Integrine werden verschiedene Signalkaskaden aktiviert. Über eine solche Signalkaskade kann die Fokale Adhäsionskinase (FAK) in die phosphorylierte Form überführt werden. In dieser aktiven Form werden weitere Integrine aktiviert und so die Adhäsion der Zellen auf der Proteinschicht verstärkt. All die Signalkaskaden haben einen positiven Effekt auf die Zelladhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung [60]. Der Prozess der Adhäsion kann in folgende Phasen unterteilt werden:

1. Vorbeschichtungsphase: In dieser Phase werden spezifische Extrazellulärmatrix (EZM)-Proteine von der Oberfläche absorbiert und bilden die Proteinschicht. Dadurch wird die Adhäsion der Osteoblasten begünstigt.
2. Verankerungsphase: In dieser Phase wandeln sich die absorbierten Proteine in eine aktive Konformation, die es Integrinen ermöglicht, Osteoblasten an EZM-Proteinen zu binden.

3. Fokale Adhäsion: Diese Periode zeichnet sich durch eine Verstärkung der Adhäsion aus. Die Verstärkung wird von der phosphorylierten FAK moduliert.
4. Ausbreitungsphase: Nun kommt es zu einer Reorganisation des Zytoskeletts der Osteoblasten und einer Migration auf der Oberfläche. Die Osteoblasten entfalten dabei ihre volle Funktion [60].

Daraus lässt sich schließen, dass bei Insertion die Topografie der Implantatoberfläche einen entscheidenden Einfluss auf die Bildung der Proteinschicht hat. Die Qualität der Proteinschicht wiederum beeinflusst das Adhäsionsvermögen der Zellen maßgeblich [60, 61]. Bei Insertion und Einheilung des Implantates ist es daher von großer Wichtigkeit, dass beide Zelltypen möglichst wenig durch das Implantatmaterial beeinträchtigt werden, um eine adäquate Fremdkörperreaktion zu erzielen. Eine überschießende Fremdkörperreaktion führt zu einer verzögerten oder ausbleibenden Wundheilung, die sich in einer chronischen Entzündung manifestiert [62]. Das kann zum Verlust des Implantates führen (1.6.). Daher ist die Topografie der Implantatoberfläche entscheidend für den langfristigen Erfolg des Implantates.

1.11. Forschungsmodelle zur Überprüfung der Biokompatibilität

Implantate unterliegen als Medizinprodukte strengen Regularien. In Deutschland muss ein Medizinprodukt eine CE-Kennzeichnung erhalten. Diese Kennung darf nur dann vergeben werden, wenn grundlegende Sicherheits- und Leistungsanforderungen erfüllt sind [63]. Auch auf internationaler Ebene wurden Standards entwickelt, die die Prüfung eines Implantatmaterials genau definieren. Diese Standards sind in der ISO Richtlinie 10993 festgehalten [64], die dem Schutz des Patienten dient, deren Sicherheit an oberster Stelle steht.

Die Reaktion der Zellen auf neuartige Implantatmaterialien oder Oberflächenmodifikationen kann in-vitro simuliert werden. Die meisten Versuche werden in einer sogenannten 2D-Kultur durchgeführt. Das bedeutet, die Versuchsoberfläche ist über eine x- und y-Achse definiert. Dieses Verfahren findet in der Wissenschaft breite Anwendung, da die Methode effizient, reproduzierbar und einfach anzuwenden ist. Allerdings können die 2D-Kultur-Modelle nicht die wechselnden physiologischen Bedingungen, in denen Flüssigkeiten und Zellen nie statisch sind, nachbilden. So kann die komplexe und dynamische in-vivo Situation nicht wiedergegeben werden. Mit diesem Gedanken wurden 3D-Kultur-Verfahren entwickelt. Aus den 3D-Kultur-Verfahren erhält man Ergebnisse, die die

biochemischen und biomechanischen Signale der in-vivo Situation genauer abbilden können. Allerdings werden je nach Zelltyp unterschiedlich 3D-Modelle erforderlich. Das erschwert die Entwicklung standardisierter Verfahren und die Vergleichbarkeit der Studien ist nur bedingt möglich [65].

Unter dem fünften Abschnitt der ISO 10993 wird eine Prüfung der in-vitro Zytotoxizität mit immortalisierten Fibroblasten verlangt [64]. Zelllinien liefern reproduzierbare Ergebnisse, präsentieren jedoch nicht den vollständigen physiologischen und funktionalen Phänotyp primärer Zellen [66]. Aus diesem Grund ist es sinnvoll, die ISO 10993 um relevante präklinische Testalgorithmen über die Zytotoxizität hinaus, zu erweitern, sowie die Verwendung von relevanten primären Zellen des Zielgewebes anzustreben. Für die Testung von Implantatoberflächen werden Zellen benötigt, die eine möglichst realistische Reaktion auf das Implantatmaterial zeigen. In der Endoprothetik und in der Zahnmedizin eignen sich daher Osteoblasten zur Testung, da in beiden Feldern der verankernde Teil des Implantats zum großen Teil Kontakt zum Knochen hat. In der Zahnmedizin hat ein dentales Implantat nach Insertion auch Kontakt mit der Gingiva. Aus diesem Grund eignen sich in diesem Fall zur Überprüfung zusätzlich gingivale Fibroblasten.

Mit der Verwendung von primären Zellen aus dem Gewebe, das in Kontakt mit der Implantatoberfläche steht, und mit erweiterten Testalgorithmen zur Funktionalität der Zellen lassen sich aussagekräftigere Ergebnisse abbilden, die für einen erfolgreichereren Translationsprozess der in-vitro Situation in die in-vivo Situation sorgen können.

1.12. Implantatverträglichkeit

Implantate bestehen aus Biomaterialien, die geeignet sind körpereigenes Gewebe zu ersetzen [67]. Biokompatibilität ist definiert als die Fähigkeit eines Materials unter bestimmter Anwendung eine angemessene Reaktion des Wirtes zu zeigen [68]. Eine angemessene Reaktion des Wirtes bedeutet, dass Materialien, die als Implantate eingesetzt werden, keinen Zelltod hervorrufen, keine chronische Entzündung verursachen oder andere Beeinträchtigung zellulärer Funktion auslösen. Neben der Zytotoxizität und der Abbaubeständigkeit muss das Implantat den biologischen Anforderungen entsprechen. So muss die Form, die innere Struktur und das Design dem ersetzten Gewebe angepasst werden [69]. Vor diesem Hintergrund hat die Implantatoberfläche eine entscheidende Rolle, da sie mit dem umliegenden Gewebe

direkt in Kontakt steht. Daher ist es das Ziel, in der Oberflächenmodifikation nicht nur negative Reaktionen auszuschließen, sondern eine Oberfläche so zu gestalten, dass ein Zusammenspiel zwischen Implantatmaterial und Gewebe erlaubt wird [67].

Soll das Implantat zum Ersatz von Knochengewebe dienen, stellen sich weitere mechanische Forderungen: Das verwendete Implantat soll eine hohe mechanische Resistenz und ein knochenähnliches Elastizitätsmodul haben, um die Last, die auf den Knochen wirkt, über einen langen Zeitraum zu tragen. Korrosionsbeständigkeit des verwendeten Metalls ist eine Hauptvoraussetzung, um zu gewährleisten, dass die Materialoberfläche nicht durch Abbau beeinträchtigt wird. Auf der anderen Seite darf das umliegende Gewebe nicht von austretenden Korrosionsprodukten oder abrasiven Partikeln beeinträchtigt werden [67]. Diese Anforderungen immer weiter zu verbessern, ist Gegenstand des aktuellen Forschungsstrebens [70]. Daraus lassen sich die Ziele dieser Arbeit formulieren.

1.13. Zielsetzung

Vor dem Hintergrund der steigenden Implantationsraten in der Zahnmedizin und Endoprothetik und die hohen Kosten einer Revisionsoperation stellt sich klar die Notwendigkeit heraus, Implantatoberflächen zu optimieren [71].

Viele Studien konnten bestätigen, dass die periodische Oberflächenstrukturierung ein vielversprechender Ansatz ist, um die Fremdkörperreaktion im physiologischen Rahmen zu halten, die Adhäsion der Zellen zu verbessern und damit die Integration des Implantates im umliegenden Gewebe zu erleichtern. Allerdings mangelt es an präklinischen Studien, in deren Rahmen primäre humane Zellen zum Einsatz kommen, um die Zellantwort auf den periodisch strukturierten Oberflächen überprüfen und es fehlt an Daten, die die Metallfreisetzung von den periodisch strukturierten Oberflächen erfassen. Deshalb sind die Ziele der geplanten Arbeit, in einer experimentelle in-vitro Observationsstudie:

1. Die Oberflächen der Titanlegierungen Ti6Al4V und Ti6Al4Nb nach periodischer Oberflächenstrukturierung mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) zu charakterisieren.
2. Die Metallfreisetzung von den periodisch strukturierten Ti6Al4V und Ti6Al4Nb-Oberflächen zu quantifizieren.
3. Die in-vitro Biokompatibilität der Oberflächen mit relevanten Zellen (primäre humane Osteoblasten und gingivale Fibroblasten) zu untersuchen. Es soll die Wirkung der Oberflächen auf das zelluläre Verhalten untersucht werden. Dafür werden die zellulären Parameter Morphologie, Proliferationskapazität, Viabilität, Zytotoxizität, osteogene Kapazität, die Metallanreicherung und das Sekretionsprofil von löslichen Wachstumsfaktoren und Zytokinen herangezogen.

Durch dieses präklinische Testverfahren kann eine möglichst realistische Zellantwort der in-vivo Situation abgebildet werden.

Diese Arbeit identifiziert den Ansatz, der am vielversprechendsten ist. Bei gelingendem Translationsprozess in den klinischen Bereich führt das zu einer Verbesserung der Implantologie und Endoprothetik, ohne die Sicherheit des Patienten zu gefährden.

2. Material und Methoden:

2.1. Titanlegierungen

Für die Experimente wurden die Titanlegierungen Ti6Al4V und Ti6Al4Nb von High-Tech Alloys Sonderwerkstoffe GmbH, Wuppertal verwendet. Diese Titanlegierungen entsprechen der ISO-Norm 5832-3 [71]. Die Norm prüft, ob ein Werkstoff als chirurgisches Implantat-Material geeignet ist. Um die Titanlegierungen in 48-Well-Platten positionieren zu können, wurden Proben als Scheiben hergestellt. Die Maschine, die dafür verwendet wurde, ist die Cincom B12e der Firma Citizen. Die Scheiben hatten einen Durchmesser von 1 cm und eine Höhe von 2 mm. Die Proben der Oberflächen wurden nach dem Fertigungsprozess zuerst mit einer laserinduzierten Politur versehen. Dafür wurde ein Nanosekunden Faserlaser des Typs M7 60W der Marke JPT verwendet. Dieser arbeitete bei einer Frequenz von 200 kHz und einer Leistung von 3 W. Nach Rücksprache mit dem Hersteller, aufgrund von mangelnder Qualität der Oberflächen (3.1.), wurden die Oberflächen ausschließlich mittels der implantatspezifischen Elektrolyt-Lösung „electrolyte ElpoLux TI-Med“ der Firma ElpoChem AG Volketswil behandelt. Diese wurde nach Herstellerangaben angewendet. Die Oberflächen wurden einzeln bei Raumtemperatur (RT) für fünf min mit der Elektrolyt-Lösung behandelt. Die polierten Oberflächen dienen in den Zellkulturexperimenten als Vergleich zu den periodisch strukturierten Oberflächen und werden im Folgenden V-POL und Nb-POL genannt.

2.2. Herstellung der periodischen Oberflächenstrukturen

Die Oberflächenbehandlung wurde durch einen Pikosekundenlaser des Modells LMBS 3W Tricolore bei der Firma Lasermikrotechnik Dr. Kieburg GmbH realisiert. Der Laser arbeitete bei einer Leistung von 3 W, einer Fluenz von 0,07 μJ und einem Laserstrahlendurchmesser von 4 μm . Die Pulsdauer betrug 8 ps bei einer Frequenz von 200 kHz und einer Bearbeitungsgeschwindigkeit von 2000 mm/s. Der Laser erzeugte periodische laserinduzierte Oberflächenstrukturen bei einer Wellenlänge von 355 nm. Diese periodisch strukturierten Oberflächen werden als LIPSS bezeichnet und im Folgenden V-LIPSS und Nb-LIPSS genannt.

2.3. Oberflächencharakterisierung der Ti6Al4V und Ti6Al4Nb-Oberflächen

Die Analyse der Oberflächenmorphologie wurde mittels REM im Laboratorium für Elektronenmikroskopie an der Universität Greifswald durchgeführt. Zur Probenvorbereitung wurden die Oberflächen nach dreimaligem Waschen für je fünf min mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (pH 7,5) (Bio & Cell, C1825) in steigender Konzentration an Ethanol für je 15 min pro Stufe (10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 %) auf Eis entwässert. Vor dem letzten Austausch mit 100 % Ethanol wurden die Proben für zehn min auf Raumtemperatur gebracht und dann einer kritischen Punkttrocknung mit flüssigem CO₂ zugeführt. Anschließend wurden die Proben mittels leitfähiger Kohlenstoffklebepads auf Aluminiumhalter aufgebracht. Das Rasterelektronenmikroskop EVO LS 10 (Karl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen) erstellte die Aufnahmen in 2000- und 8000-facher Vergrößerung unter einer Spannung von 10 kV im Hochvakuum. Alle Aufnahmen wurden final mit Adobe Photoshop CS6 bearbeitet.

2.4. Zellkultur

2.4.1. Probengewinnung

Die primären humanen Osteoblasten wurden aus humanen adulten Spongiosaprobe von sechs Spendern isoliert. Die entsprechenden Knochenmarksproben wurden bei der Implantation von Hüft-Totalendoprothesen (Hüft-TEP) aus dem femoralen Markraum gewonnen. Der OP-Ablauf wurde dadurch nicht beeinträchtigt, da bei einer Implantation zur Verankerung des neuen Schaftes regulär Knochenmarksgewebe anfällt und verworfen wird. Die Patienten wurden zuvor aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis. Dem Vorhaben wurde von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Greifswald zugestimmt (BB 178/20). Die humanen gingivalen Fibroblasten wurden bei Cell lines services (CLS) als Primärzellen in der 4. Passage kommerziell erworben (Human Gingival Fibroblasts Katalog Nummer: 300703).

2.4.2. Primärisolation der humanen Osteoblasten

Nach der Probenentnahme wurden die Spongiosaprobe in ein Falconröhrchen überführt und solange mit PBS gespült, bis ein klarer Überstand zu erkennen war. Die Spongiosaprobe wurden in eine Zellkulturflasche überführt und mit 0,2 ml pro cm² Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) der Fima Pan Biotech (4077), mit den Zusätzen von 10 % fetalem Kalbserum (FCS, Sigma-Aldrich, S0615), 1 % Glutamax (ThermoFischer, 35050-038) und 1 % Penicillin / Streptomycin (Life tech, 15140)

bedeckt. Dieses Medium ist eine Mimikry des physiologischen Milieus, in dem die Osteoblasten in der Lage sind zu expandieren und wird in der weiteren Arbeit als DMEM-FCS bezeichnet. Die Zellen wurden für 21 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ - Atmosphäre kultiviert. Nach dem 21. Tag wurden die kultivierten Zellen passagiert (2.4.4). Die Zellsuspension wurde über ein Zellsieb (VWR International GmbH, GREI542000_50) mit einer Maschenweite von 100 µm in ein Falconröhrchen transferiert. Im Anschluss wurde die Zellzahl bestimmt (2.4.5.), 2,4 x 10³ Zellen pro cm² in entsprechende Zellkulturflaschen ausgesät und als Passage-1 (P-1) deklariert.

2.4.3. Zellkultivierung

Die humanen Osteoblasten und gingivalen Fibroblasten wurden durchweg bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Der erste Wechsel des Mediums erfolgte nach 24 bis 72 Stunden mit DMEM-FCS. Ab dem zweiten Wechsel wurde das Medium zweimal pro Woche ausgetauscht. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von 80 % erreicht hatten, wurden sie passagiert (2.4.4.), die Zellzahl wurde bestimmt (2.4.5.) und mit einer Konfluenz von 30 % in einer neuen Zellkulturflasche ausgesät. Das entspricht einer Dichte von 2,4 x 10³ Zellen pro cm².

2.4.4. Passagieren der Zellen

Osteoblasten und Fibroblasten wachsen adhärent auf der Kunststoffoberfläche der Zellkulturflasche und auf den Oberflächen der Titanlegierungen. Aus diesem Grund benötigt man ein standardisiertes Vorgehen, um die Zellen von der Oberfläche zu lösen. Zuerst wurde das Medium entfernt und der Zellrasen mit 0,2 ml pro cm², 37°C warmen PBS gewaschen. Zur Lösung der Zellen von der Oberfläche wurde ein Teil, 37°C warmes Trypsin (Pan-Biotech GmbH, P10-0235SP) auf die Oberfläche gegeben, sichergestellt, dass die gesamte Oberfläche bedeckt war und die Zellen für vier min bei 37°C, 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach den vier min wurde die Reaktion mit vier Teilen DMEM-FCS abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein Falconröhrchen überführt und die Zellzahl bestimmt (s. 2.2.5.). Bis zum Beginn des jeweiligen Experimentes wurden die humanen Osteoblasten dreimal (P-0 bis P-3) und die Fibroblasten zweimal (P-4 bis P-6) passagiert.

2.4.5. Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung der humanen Osteoblasten aus P-0 wurde eine Zählkammer (Kisker Biotech, M-NZ-4CH) (Neubauer-Prinzip) am Mikroskop verwendet. Für alle weiteren Passagen wurde die Zellzahl über einen automatisierten Zellzähler (TC20

Automated Cell Counter) der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH, München bestimmt. Vorbereitend wurden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypan-Blau (Th.Geyer GmbH & Co.KG, T8154-100ML) versetzt, um vitale und tote Zellen unterscheiden zu können. Nach dem Neubauer-Prinzip wurden 10 µl der Zellsuspension-Trypan-Blau Mischung auf eine Zählkammer pipettiert und die Zellzahl und -konzentration bestimmt. Nach dem automatisierten Verfahren wurden 10 µl der Zellsuspension-Trypan-Blau Mischung auf den Zählchip (Bio-Rad Laboratories GmbH, 1450011) zur Zellzählung gegeben und in den Zellzähler eingesetzt. Der Zähler bestimmte automatisch die Konzentration der lebenden Zellen in der Zellsuspension.

2.4.6. Kryokonservierung der Zellen

Nach dem Überführen der Osteoblasten in P-2 und der Fibroblasten in P-5 wurden die Zellen als 500 µl Aliquots eingefroren, um sie zu einem späteren Zeitpunkt für die Experimente zu verwenden. Im Anschluss an die Bestimmung der Zellzahl wurde das Falconröhrchen zentrifugiert (10 min, RT, 400 x g). Das Medium über dem Zellpellet wurde abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 500 µl Einfriermedium, bestehend aus 27 % DMEM (Pan Biotech, 4077), 1 % Penicillin-Streptomycin (Life tech, 15140), 23 % Albiomin 20 % (Biotest AG, 623160), 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, AppliChem GmbH Darmstadt, A3672.0250) und 40 % Albiomin 20 % (Biotest AG, 623160), resuspendiert und in ein Kryovial transferiert. Die Kryovials wurden in einem *CellCamper* der Firma neoLab bei -80°C für 24 Stunden gelagert. Durch den *CellCamper* wurde gewährleistet, dass die Zellen mit einer Einfrierrate von -1°C pro Minute einfrieren. Nach den 24 Stunden wurden die Kryovials in der Gasphase des Stickstofftanks bei -140°C gelagert. In jedem 500 µl Aliquot wurden auf diese Weise 1×10^6 Zellen konserviert.

2.4.7. Auftauen und Kultivierung der Zellen

Von der Stickstoff-Gasphase bei -140°C wurden die Aliquots der humanen P-2 Osteoblasten und der gingivalen P-5 Fibroblasten in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Zur Entfernung des für den erfolgreichen Einfrier- und Auftauprozess essenziellen DMSO wurden die Zellen unmittelbar in DMEM-FCS Medium überführt, zentrifugiert (10 min, RT, 400 x g) und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 2 ml DMEM-FCS resuspendiert und mit einer Zelldichte von $2,4 \times 10^3$ Zellen pro cm^2 in entsprechende Zellkulturflaschen ausgesät. Die Osteoblasten und Fibroblasten

wurden für sieben bis acht Tage expandiert, um eine ausreichende Zellzahl sicherzustellen. Das Medium wurde zweimal pro Woche gewechselt.

2.4.8. Vorbereitung der Ti6Al4V und Ti6Al4Nb-Oberflächen

Die Oberflächen der Titanlegierungen Ti6Al4Nb und Ti6Al4V wurden vor Beginn der Experimente gereinigt, um zu gewährleisten, dass Restpartikel vom Fertigungsprozess sowie anderer Unreinheiten entfernt wurden. Hierzu wurde ein dreistufiges Reinigungsprotokoll durchlaufen. Für jeweils fünf min wurden die Oberflächen mit Isopropyl-Alkohol (Th. Geyer GmbH & Co.KG, 1157-5L), Aceton (Th.Geyer GmbH & Co.KG, 8002 1L) und PBS in einem Ultraschallbad (Elmasonic S10, Elma) bei 80.000 Hz gereinigt. Die Proben für die Oberflächencharakterisierung wurden in einem vierten Schritt mit destilliertem Wasser ebenfalls bei 80.000 Hz für fünf min gereinigt. Durch die PBS-Lösung wurden Alkoholrestbestände entfernt, die die in-vitro Experimente beeinflussen könnten. Jedes Bauteil der jeweiligen Titanlegierung wurde in ein Well gepresst und parallel zur Tischebene ausgerichtet, um eine gleichmäßige Verteilung des Kulturmediums zu gewährleisten. Im Anschluss wurden die Oberflächen mit 200 µl DMEM-FCS bedeckt und für 12 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre gelagert, um die Bildung einer Proteinschicht zu gewährleisten.

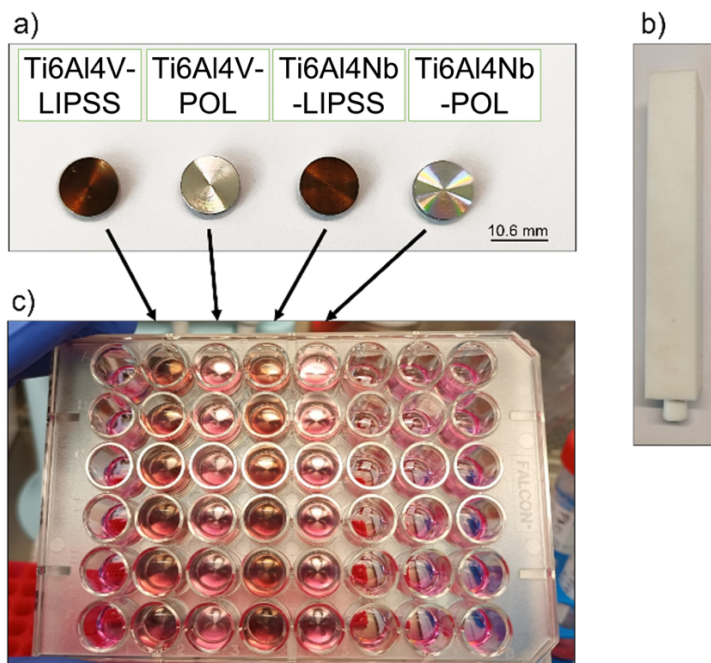


Abbildung 4. Exemplarische Vorbereitung einer 48-Well-Platte für die Zellkulturexperimente. a) Die Bauteile der verschiedenen Oberflächen. b) Stempel zur Positionierung der Bauteile in der 48-Well-Platte. c) 48-Well-Platte mit DMEM-FCS für die Konditionierung der Oberflächen über Nacht.

2.5. Quantifizierung der Metallfreisetzung

Der Kulturüberstand und das Zelllysate wurden durch ein induktiv gekoppeltes Plasma-Massenspektrometer (ICP-MS) im IMD-Labor Berlin analysiert.

Es wurden humane Osteoblasten von einem Spender verwendet. Eine 48-Well-Platte wurde jeweils mit zehn Bauteilen der Ti6Al4V-Oberflächen (V-POL, V-LIPSS) und eine zweite 48-Well-Platte mit zehn Bauteilen der Ti6Al4Nb-Oberflächen (Nb-POL, Nb-LIPSS) bestückt und über Nacht konditioniert (2.4.9.). Als Kontrollgruppe für den Zellkulturüberstand und die Zelllysate wurden zehn Wells *tissue culture plastic* (TCP) auf einer dritten 48-Well-Platte über Nacht konditioniert (2.4.9.). Es wurden zehn technische Replikate der humanen Osteoblasten mit je 200 µl Zellsuspension pro Oberfläche ausgesät. Die Dichte der Zellen betrug 60.000 Zellen pro ml. Um Verdunstungsartefakte zu vermeiden, wurden die übrigen Wells mit DMEM aufgefüllt. Die Zellen wurden für acht Tage kultiviert. Bei jedem Mediumwechsel (Tag 2, 5, 8) wurde konsekutiv der Kulturüberstand von zwei Wells einer Gruppe gepoolt (400 µl), in einem Kryoröhrchen aufgefangen und bei 4°C gelagert. Dadurch konnte die Metallfreisetzung über den gesamten Zeitraum bestimmt werden. Pro Gruppe (V-POL, V-LIPSS, Nb-POL, Nb-LIPSS, TCP) wurde die Metallkonzentration in fünf, 1200 µl Zellkulturüberstand enthaltenden Proben, im induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometer quantifiziert.

Zur Erstellung des Zelllysates wurden die Zellen zunächst trypsiniert (2.2.4.). Im Anschluss wurde die Zellsuspension von je zwei Wells derselben Oberfläche gepoolt. Jede Probe wurde zentrifugiert (10 min, RT, 2000 x g). Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellsuspension mit 4 % Formaldehyd-Lösung über Nacht bei 4°C fixiert. Im Anschluss wurde jede Probe zentrifugiert (10 min, RT, 2000 x g) und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in 100 µl PBS resuspendiert. Von diesem Volumen wurden 50 µl mit weiteren 50 µl Buffer RLT-Plus (QIAGEN, 1053393) versetzt und im Anschluss mittels des neoVortex (neoLab, Typ D-6012) gemischt. Das Volumen wurde mit 900 µl PBS auf 1 ml ergänzt. Der Kulturüberstand und das Zelllysate wurden in 1 % HNO₃ (zur Analyse von Ti, V, Nb) bzw. 1 % HCl (zur Analyse von Al) verdünnt und anschließend mittels ICP-MS (ICapQ, Thermo Fisher GmbH, Bremen) im Kollisions-Reaktionsmodus gemessen, unter Normalisierung auf interne Standards (74Ge und 187Re). Die Präzision der Messung wurde anhand von zertifiziertem Kontrollmaterial überprüft (Lyphochek Urin L1 und L2, Bio-Rad Laboratories GmbH, München).

2.6. Quantifizierung der Zellviabilität

Die Resazurin enthaltene Lösung PrestoBlue Cell Viability Reagenz (Thermo Fisher Scientific, USA, A13262) zeigt die Viabilität der Zellen an, indem es die metabolische Aktivität der Zellen quantifiziert. Durch die mitochondriale Aktivität viabler Zellen wird der blaue Farbstoff Resazurin in Resorufin umgewandelt. Dadurch kann bei entsprechender Anregungswellenlänge die Fluoreszenzintensität bestimmt und darüber die metabolische Aktivität quantifiziert werden.

Es wurden humane Osteoblasten von sechs Spendern und gingivale Fibroblasten von einem Spender verwendet. Für die Zellen jedes Spenders wurde eine 48-Well-Platte vorbereitet. Die 48-Well-Platten wurden mit je vier (humane Osteoblasten) bzw. sechs (gingivale Fibroblasten) Bauteilen der verschiedenen Oberflächen (V-POL, V-LIPSS, Nb-POL, Nb-LIPSS) bestückt. Die verschiedenen Oberflächen und jeweils vier (humane Osteoblasten) bzw. sechs (gingivale Fibroblasten) Wells TCP wurden über Nacht konditioniert (2.4.9.). Es wurden pro Gruppe vier technische Replikate der humanen Osteoblasten eines Spenders und sechs technische Replikate der gingivalen Fibroblasten mit je 200 µl Zellsuspension pro Oberfläche ausgesät. Die Dichte der Zellen betrug 24.000 Zellen pro ml. Die Messung wurde an Tag 0 (24h nach Aussaat), Tag 4, Tag 7, Tag 11 und Tag 14 durchgeführt. Zunächst wurde das vorhandene DMEM-FCS Kulturmedium jedes Wells in je einem 1,5 ml Eppendorfgefäß aufgefangen. Dieser Kulturüberstand wurde genutzt, um die Freisetzung der Laktatdehydrogenase (LDH) zu quantifizieren (2.8.). Nach Herstellerprotokoll wurden 200 µl der Arbeitslösung (Verhältnis PrestoBlue Cell Viability Reagenz zu DMEM-FCS 1:10) auf die Oberflächen und zwei Kontroll-Wells zur Herausstellung der Hintergrundfluoreszenz gegeben und die 48-Well-Platte eine Stunde bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Da die Ti6Al4V und Ti6Al4Nb-Oberflächen eine direkte Messung verhinderten, wurde aus jedem Well 100 µl Arbeitslösung entnommen und auf eine 96-Well-Platte transferiert. Bei einer Anregungswellenlänge von 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm wurde in dem Multimode-Mikroplattenlesegerät Infinite M200 Pro der Tecan Gruppe die Fluoreszenzintensität bestimmt. War die Messung abgeschlossen, wurden die restlichen 100 µl Arbeitslösung abgesaugt, die Oberflächen mit 200 µl DMEM-FCS bedeckt und bis zum nächsten Mess-Tag bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Nach Abschluss des Experiments wurde jedes Well mit 200 µl PBS gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt

und die Zellen im Anschluss mit 200 µl 4 % Formaldehyd-Lösung über Nacht bei 4°C fixiert.

Da die humanen Osteoblasten eines Spenders nicht charakteristisch in der Kontrollgruppe gewachsen sind und aus diesem Grund in den zu untersuchenden Gruppen keine relevanten Ergebnisse lieferten, präsentieren die Ergebnisse der Zellviabilität und LDH-Freisetzung der humanen Osteoblasten (3.3. und 3.5.) eine Stichprobengröße von fünf Osteoblasten-Spendern.

2.7. Quantifizierung der Proliferationskapazität

Die Proliferationskapazität wurde mittels des CyQUANT Cell Proliferation Assays (Life Technologies GmbH, C7026) ermittelt. Diese Messung kann über ein Fluoreszenzsignal den relativen DNA-Gehalt einer Zellpopulation darstellen. So lässt sich die Zellzahl der Zellkulturen quantifizieren. Je höher das Fluoreszenzsignal, desto mehr Zellen befinden sich auf den Oberflächen.

Zur Testung der Oberflächen wurden humane Osteoblasten und gingivale Fibroblasten von einem Spender verwendet. Der relative DNA-Gehalt wurde an Tag 0 (24h nach Aussaat), 4 und 7 quantifiziert. Für jeden Mess-Tag wurde eine 48-Well-Platte vorbereitet. Diese wurde mit je acht Oberflächen der entsprechenden Gruppe (V-POL, V-LIPSS, Nb-POL, Nb-LIPSS) bestückt. Im Anschluss an die Konditionierung der Oberflächen und je acht Wells TCP (2.4.9.) wurden sechs technische Replikate humaner Osteoblasten und gingivaler Fibroblasten pro Gruppe mit je 200 µl Zellsuspension pro Oberfläche ausgesät. Die Dichte betrug 18.000 Zellen pro ml. An dem jeweiligen Mess-Tag wurde zuerst die metabolische Aktivität der Zellen quantifiziert (2.6.). Im Anschluss wurden die verschiedenen Oberflächen und Zellen mit 200 µl PBS gewaschen und für die spätere Bestimmung des relativen DNA-Gehaltes bei -80°C gelagert. Entsprechend des Herstellerprotokolls wurde jede zu testende Oberfläche und zwei Kontroll-Wells der 48-Well-Platten zur Darstellung der Hintergrundfluoreszenz mit 150 µl CyQUANT-Arbeitslösung versehen und für fünf min bei RT inkubiert. Die Arbeitslösung bestand aus Fluoreszenzfarbstoff, Lysispuffer und einem DNA-Standard. Bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm wurde die Fluoreszenzintensität im Multimode-Mikroplattenlesegerät Infinite M200 Pro der Tecan Gruppe quantifiziert.

2.8. Lebend- / Tot-Färbung und Quantifizierung der Laktatdehydrogenase

Die Zytotoxizität wurde über eine Lebend-/Tot-Färbung visualisiert und die Freisetzung der LDH quantifiziert.

Die humanen Osteoblasten für die Lebend-/Tot Färbung stammen von einem Spender. Für jede Gruppe wurden drei Wells einer 48-Well-Platte mit den entsprechenden Oberflächen der verschiedenen Gruppen (V-POL, V-LIPSS, Nb-POL, Nb-LIPSS, TCP) bestückt. Im Anschluss an die Konditionierung der Oberflächen (2.4.9.) wurden drei technische Replikate humaner Osteoblasten mit je 200 µl Zellsuspension pro Oberfläche ausgesät. Die Dichte der Zellen betrug 45.000 Zellen pro ml. Nach 24 Stunden Kulturzeit wurde die Lebend-/Tot Färbung der humanen Osteoblasten nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurde das LIVE/DEAD Cell Imaging Kit der Firma invitrogen (R37601) verwendet. Dies enthielt Calcein-AM (grün) zur Detektion von lebenden Zellen und BOBO3-Iodid (rot) für die Detektion von toten Zellen. Calcein-AM fluoresziert bei einer Wellenlänge von 488 nm und BOBO3-Iodid bei 570 nm. Der Zellrasen wurde mit 200 µl einer 1:1 Mischung aus beiden Farbstoffen benetzt und bei RT für 15 min inkubiert. Die Bilder wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (EvoS FLc, Invitrogen) in 4-facher Vergrößerung aufgenommen.

Für die Quantifizierung von LDH wurde der LDH-Cytox Assay Kit (BioLegend, 426401) verwendet. LDH ist ein zytoplasmatisches Enzym, das nur bei zerstörter Zellmembran in den Extrazellularraum gelangt. Dort katalysiert das Enzym in diesem Assay die Redoxreaktion von wasserlöslichem Tetrazolium-Salz zu orangefarbenem Formazan-Farbstoff. Die Absorption dieses Farbstoffes kann quantifiziert werden. Je mehr Farbstoff gebildet wird, desto höher ist die Absorption und damit die entsprechende LDH-Freisetzung. Die LDH-Quantifizierung erfolgte in dem aufgefangenen Zellkulturüberstand an Tag 0 (24h nach Aussaat), Tag 4, Tag 7, Tag 11 und Tag 14 des Viabilitätsexperiments (2.5.) nach Herstellerprotokoll. Zur Herausstellung der Hintergrund LDH-Aktivität wurde der Kulturüberstand von zwei Kontroll-Wells in je einem 1,5 ml Eppendorfgefäß aufgefangen. Der Überstand wurde zentrifugiert (10 min, RT, 2.000 x g). Der Kulturüberstand jedes Wells wurde mit je 50 µl als Duplikat auf eine 96-Well-Platte pipettiert, mit 50 µl der Arbeitslösung gemischt und für 30 min bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die Arbeitslösung enthielt das Tetrazolium-Salz, Assaypuffer und Lysispuffer. Nach Ablauf der 30 min wurde 25 µl Stopp-Lösung hinzugefügt, um die Umwandlung zum Formazan-Farbstoff zu stoppen. Die Absorption wurde bei einer Messwellenlänge von 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 690

nm im Multimode-Mikroplattenlesegerät Infinite M200 Pro der Tecan Gruppe gemessen.

2.9. Morphologie von humanen Osteoblasten und gingivalen Fibroblasten

Die Morphologie der Zellen wurde mittels REM und Fluoreszenzmikroskopie dargestellt. Als Proben für das REM und die Fluoreszenzmikroskopie wurden die nach Tag 14 fixierten Zellen auf den Oberflächen aus dem Viabilitätsexperiment (2.6.) verwendet.

Die REM-Bilder wurden im Laboratorium für Elektronenmikroskopie an der Universität Greifswald angefertigt. Nach dreimaligem Waschen der Proben für je fünf min mit PBS (pH 7,5) wurden die Proben in steigender Konzentration an Ethanol für je 15 min pro Stufe (10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 %) auf Eis entwässert. Vor dem letzten Austausch mit 100 % Ethanol wurden die Proben für zehn min auf Raumtemperatur gebracht und dann einer kritischen Punkttrocknung mit flüssigem CO₂ zugeführt. Anschließend wurden die Proben mittels leitfähiger Kohlenstoffklebepads auf Aluminiumhalter aufgebracht, mit Gold/Palladium beschichtet (Sputtercoater Polaron SC7640) und an einem Rasterelektronenmikroskop EVO LS10 (Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen) mikroskopiert. Von den gingivalen Fibroblasten auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen waren keine Aufnahmen möglich, da die Zellkultur vor Tag 14 zugrunde gegangen war (Abb. 12). Alle Aufnahmen wurden final mit Adobe Photoshop CS6 bearbeitet. Die Bilder entstanden bei einer 8000-facher Vergrößerung unter einer Spannung von 10 kV im Hochvakuum. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde in der Forschungsabteilung für Orthopädie und orthopädische Chirurgie umgesetzt. Als Farbstoff für den Zellkern wurde 4,6-Diamidin-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) (Sigma-Aldrich, F10236276001) und für das Zytoskelett Phalloidin-iFluor-488 Reagent (Sigma-Aldrich, AB176753) eingesetzt. Die Farbstoffe wurde im Verhältnis 1:1000 mit 1 % bovinem Serumalbumin (BSA) (Pan-Biotech GmbH, P06-139350) enthaltenem Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Puffer (TBS-Puffer), bestehend aus 150 mM Natriumchlorid, 25 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan und deionisiertem Wasser, gemischt. Der Zellrasen wurde mit 100 µl benetzt und bei RT lichtlos für 60 min inkubiert. Um eine Färbung des Hintergrundes zu vermeiden, wurde der Zellrasen für fünf min in 400 µl TBS-Puffer und zweimal für fünf min in 400 µl in deionisierten Wasser gewaschen. Damit die Zellen nicht austrocknen, wurden 200 µl PBS auf die Oberflächen gegeben. Die Oberflächen

wurden aus den Well-Platten entfernt, um bei 4-facher und 20-facher Vergrößerung Bilder unter dem Fluoreszenzmikroskop (Evos FLc, Invitrogen) zu erstellen.

2.10. Induktion der osteogenen Matrixmineralisierung

Die osteogene Kapazität der Osteoblasten wurde über die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) quantifiziert. Zur Quantifizierung wird das Substrat 4-Nitrophenylphosphat (pNPP, Sigma-Aldrich, N1645) verwendet, das von der ALP zu dem gelben Produkt 4-Nitrophenolat (pNP) umgesetzt wird. Der Verbrauch von pNPP kann photometrisch bestimmt und so die Aktivität der ALP quantifiziert werden.

Es wurden humane Osteoblasten von einem Spender verwendet. Zwölf Bauteile jeder zu testenden Oberfläche (V-POL, V-LIPSS, Nb-POL, Nb-LIPSS) wurden auf zwei 48-Well-Platten verteilt. Die Oberflächen und zwölf Wells TCP wurden über Nacht konditioniert (2.4.9.). Es wurden zwölf technische Replikate der humanen Osteoblasten pro Gruppe mit je 200 µl Zellsuspension ausgesät. Die Dichte der Zellen betrug 45.000 Zellen pro ml. 24 Stunden nach Aussaat der Zellen wurde die osteogene Matrixmineralisierung bei sechs technischen Replikaten jeder Gruppe mittels osteogenem Medium (OM), das ein osteogenes Milieu widerspiegelt, indem die Osteoblasten in der Lage sind ihr osteogenes Potential zu entfalten, induziert. Das OM besteht aus DMEM-FCS 0,1 % L-Ascorbinsäure-2-Phosphat-Sesquimagnesium-Salzhydrat (Sigma-Aldrich, A8960-5G), 5 % β-Glycerolphosphat-Dinatriumsalz-Hydrat (Sigma-Aldrich, G9422-10G) und 0,01 % Dexamethason (Sigma-Aldrich, D2115-100MG). Der Mediumwechsel erfolgte zweimal pro Woche mit dem entsprechenden Medium. Zehn Tage nach der Aussaat (neun Tage nach dem osteogenen Stimulus) wurde die ALP-Aktivität quantifiziert. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und jedes Well mit 200 µl PBS gewaschen. Im Anschluss wurde jedes Well mit 37°C warmen ALP-Puffer, bestehend aus Natriumchlorid (Merck, 106404), Tris (Hydroxymethyl)-aminomethan (Merck, 108382) und Magnesiumchlorid (Roth, KK36.2) gewaschen. Zur Messung des pNPP-Verbrauchs wurden 100 µl ALP-Puffer und ALP-Substrat, bestehend aus pNPP (Sigma-Aldrich, N1645) auf jedes Well pipettiert und für exakt zehn min bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Da das Enzym im zu stark alkalischen pH-Bereich nicht funktioniert, wurde die Reaktion mit 200 µl Natriumhydroxid 1M (NaOH) (Sigma-Aldrich, 71463) abgestoppt. Es wurden 100 µl der Lösung in Duplikaten auf eine 96-Well-Platte pipettiert, weil der Zellrasen die Absorption stört, und die Absorption im Multimode-Mikroplattenlesegerät Infinite M200

Pro der Tecan Gruppe bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die Berechnung der pNP-Konzentration erfolgte über den molaren Extinktionskoeffizienten.

2.11. Quantifizierung löslicher Zytokine und Wachstumsfaktoren

Die Reaktion der Zellen auf die Oberflächen wurde auf einen matrix- und immunmodulativen Effekt untersucht.

Es wurde ein bead-basierter Sandwich-Multianalyten-ELISA (LEGENDplex Custom Human 12-plex Panel) (BioLegend, Niederlande, 900001103) nach Herstellerprotokoll verwendet. Dieser Assay basiert auf dem Prinzip eines Sandwich-Immunoassays. Quantifiziert wurde die Konzentration von löslichen Zytokinen und Wachstumsfaktoren in den Zellkulturüberständen des Experimentes zur Proliferationskapazität an Tag 7 (2.6.) und des Experimentes zur Induktion osteogener Matrixmineralisierung an Tag 4 (2.9.). Die Zellkulturüberstände (200 µl) wurden aufgefangen, jeweils sechs technische Replikate einer Gruppe gepoolt und bei 4°C gelagert. Zur Analysevorbereitung wurden jeweils 50 µl pro Gruppe auf eine 96-Well-Platte pipettiert, versiegelt und bei -80°C gelagert. Die Proben wurde mit zwölf verschiedenen Beads, die gegen Gewebeinhibitor der Metalloproteinase-2 (TIMP-2), Osteoprotegerin, Hepatozyten-Wachstumsfaktor, stromazellabgeleiteter Faktor-1 (SDF-1), Stammzellfaktor (SCF), transformierender Wachstumsfaktor-beta-1 (TGF-beta-1), Endothelwachstumsfaktor-A (VEGF-A), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), Monozyten-koloniestimulierender Faktor (M-CSF), monozytenchemotaktisches Protein-1 (MCP-1) und Interleukin-1 Rezeptor Antagonisten Protein (IL-1ra) gerichtet waren, gemischt. Im Anschluss wurden die Beads mit fluoreszierenden Detektionsantikörpern versetzt und die Proben mittels Durchflusszytometrie (CytoFLEX; Beckman-Coulter) erfasst. Die absoluten Konzentrationen der jeweiligen Analyten wurde anhand einer Standardkurve mit einer speziellen Datenanalysesoftware (LegendPLEX 8.0; Vigene Tech, USA) berechnet.

2.12. Statistische Analyse

Die präsentierten Ergebnisse basieren auf einem Mittelwert und sind standardverteilt. Die statistischen Analysen wurden mit einem ungepaarten t-Test in den Experimenten zur Metallfreisetzung und Quantifizierung löslicher Zytokine und Wachstumsfaktoren durchgeführt. In den Experimenten zur Quantifizierung der Viabilität, Proliferationskapazität, Quantifizierung der LDH-Freisetzung und Induktion der osteogenen Matrixmineralisierung wurde eine einfache Varianzanalyse mit post-hoc-Korrektur nach Bonferroni durchgeführt. Dabei wurde ein Ergebnis als nicht signifikant

bewertet, wenn $p > 0,05$. Ein signifikantes Ergebnis wurde, entsprechend dem Niveau mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) oder $p < 0,001$ (***) bewertet. Das entspricht einem Konfidenzniveau von 95 %, 99 % bzw. 99,9 %. Für die statistische Auswertung wurde die GraphPad Prism Software (Version 9) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Oberflächencharakterisierung nach Lasertexturierung

Zur Bewertung der Qualität der Oberflächen wurden Aufnahmen mittels Rasterelektronenmikroskopie angefertigt. Das REM liefert hochauflösende Bilder zur Charakterisierung der polierten und periodisch strukturierten Ti6Al4V und Ti6Al4Nb-Oberflächen.

Auf den polierten Oberflächen der Titanlegierungen Ti6Al4V und Ti6Al4Nb waren mikroskalige kristallartige Artefakte zu erkennen (Abb. 5 a). Diese Oberflächen wurden in einem letzten Fertigungsschritt von einem Nanosekunden-Faserlaser mit einer Frequenz von 200 kHz poliert. Auf den polierten Oberflächen der Titanlegierungen Ti6Al4V und Ti6Al4Nb, die mittels Elektrolyt-Lösung behandelt wurden, waren keine Artefakte vorhanden (Abb. 5 b). Sowohl auf den laser-polierten als auch auf den chemisch polierten Ti6Al4V und Ti6Al4Nb-Oberflächen führte die Laserbearbeitung mit dem Pikosekundenlaser bei einer Wellenlänge von 355 nm zur Entstehung von periodisch strukturierten Oberflächen (*LIPSS*) (Abb. 5 c, d, e, f). Die chemisch induzierte Politur führte zu einer gleichmäßig homogenen Oberfläche, ohne Artefakte. Aus diesem Grund wurden die nachfolgenden Zellexperimente mit den chemisch-induziert polierten Oberflächen durchgeführt.

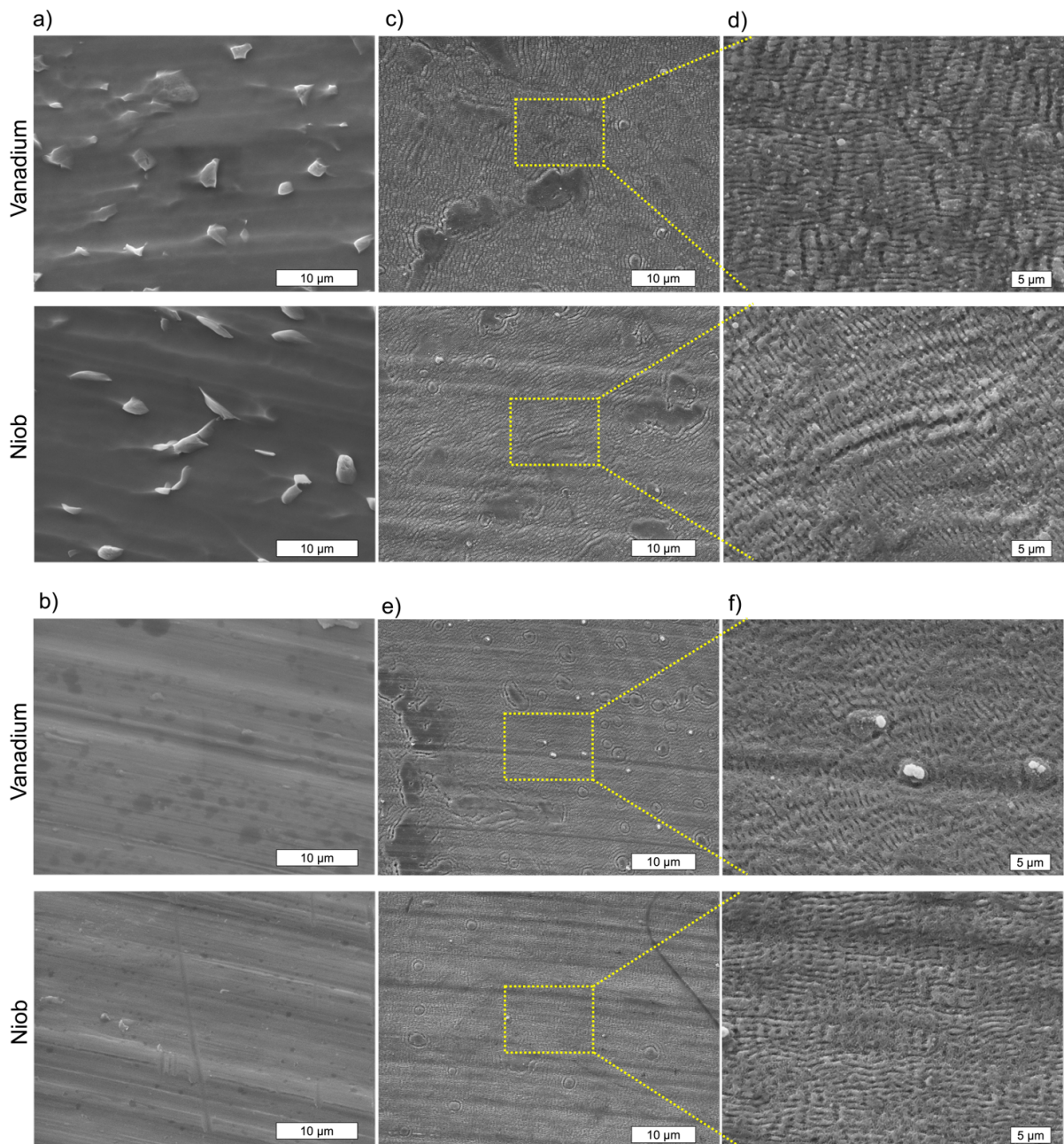


Abbildung 5. Oberflächencharakterisierung der Oberflächen mittels REM aus den Gruppen Ti6Al4V und Ti6Al4Nb. a) REM-Bilder der laser-polierten Oberflächen von der Titanlegierung Ti6Al4V und Ti6Al4Nb bei 8.000-facher Vergrößerung. b) REM-Bilder der periodisch strukturierten Oberflächen von der Titanlegierung Ti6Al4V und Ti6Al4Nb bei 2.000-facher Vergrößerung. c) REM-Bildausschnitt der laserinduzierten, periodisch strukturierten Oberflächen von der Titanlegierung Ti6Al4V und Ti6Al4Nb bei 8.000-facher Vergrößerung. d) REM-Bilder der chemisch polierten Oberflächen von der Titanlegierung Ti6Al4V und Ti6Al4Nb bei 8.000-facher Vergrößerung. e) REM-Bild der laserinduzierten, periodisch strukturierten Oberflächen von der Titanlegierung Ti6Al4V und Ti6Al4Nb bei 2.000-facher Vergrößerung. f) REM-Bildausschnitt der laserinduzierten, periodisch strukturierten Oberflächen von den Titanlegierungen Ti6Al4V und Ti6Al4Nb bei 8.000-facher Vergrößerung.

3.2. Metallfreisetzung der verschiedenen Oberflächen im biomimetischen Milieu

Um zu bewerten, ob durch die laserinduzierte periodische Oberflächenstrukturierung die Freisetzung oder Anreicherung von Metallen im biomimetischen Milieu beeinflusst ist, wurde die Metallfreisetzung quantifiziert. Die Metallfreisetzung ist ein Hauptindikator für mögliche zytotoxische Effekte. Es wurden die in den verwendeten Titanlegierungen (Ti, Al, V, Nb) enthaltenen Metalle jeweils in den Kulturüberständen und in den Zellysaten der auf den Oberflächen kultivierten humanen Osteoblasten quantifiziert.

In den Kulturüberständen auf den periodisch strukturierten Oberflächen der Ti6Al4V-Oberflächen löste sich signifikant mehr Aluminium, Titan und Vanadium als in den Kulturüberständen auf den polierten Oberflächen (Mittlere Aluminium-Konzentration [$\mu\text{g/l}$] \pm Standardabweichung: V-POL, $7,45 \pm 1,19$; V-LIPSS, $16,95 \pm 2,71$. Mittlere Titan-Konzentration [$\mu\text{g/l}$] \pm Standardabweichung: V-POL, $9,95 \pm 2,77$; V-LIPSS, $14,38 \pm 1,54$. Mittlere Vanadium-Konzentration [$\mu\text{g/l}$] \pm Standardabweichung: V-POL, $1,49 \pm 0,21$; V-LIPSS, $2,8 \pm 0,24$) (Abb. 6 a). In die Kulturüberstände auf den periodisch strukturierten Oberflächen der Ti6Al4Nb-Oberflächen wurde signifikant weniger Titan und Niob in den Kulturüberstand freigesetzt als in die Kulturüberstände auf den polierten Oberflächen (Mittlere Titan-Konzentration [$\mu\text{g/l}$] \pm Standardabweichung: Nb-POL, $25,57 \pm 3,76$; Nb-LIPSS, $15,96 \pm 2,57$. Mittlere Niob-Konzentration [$\mu\text{g/l}$] \pm Standardabweichung: Nb-POL, $15,89 \pm 1,51$; Nb-LIPSS, $12,78 \pm 1,38$) (Abb. 6 a). Die Quantifizierung der Metallkonzentrationen in den Lysaten der humanen Osteoblasten, die auf den verschiedenen Oberflächen kultiviert wurden, zeigte keine signifikanten Unterschiede. Es lässt sich festhalten, dass die Oberflächenmodifikation einen Einfluss auf die Metallfreisetzung hat. Es wird signifikant mehr Titan, Aluminium und Vanadium aus der Titanlegierung Ti6Al4V freigesetzt. Titan und Niob wird signifikant weniger aus der Titanlegierung Ti6Al4Nb freigesetzt. Eine gesteigerte Freisetzung der Metalle in das biomimetische Milieu führt zu keiner erhöhten Aufnahme in humane Osteoblasten.

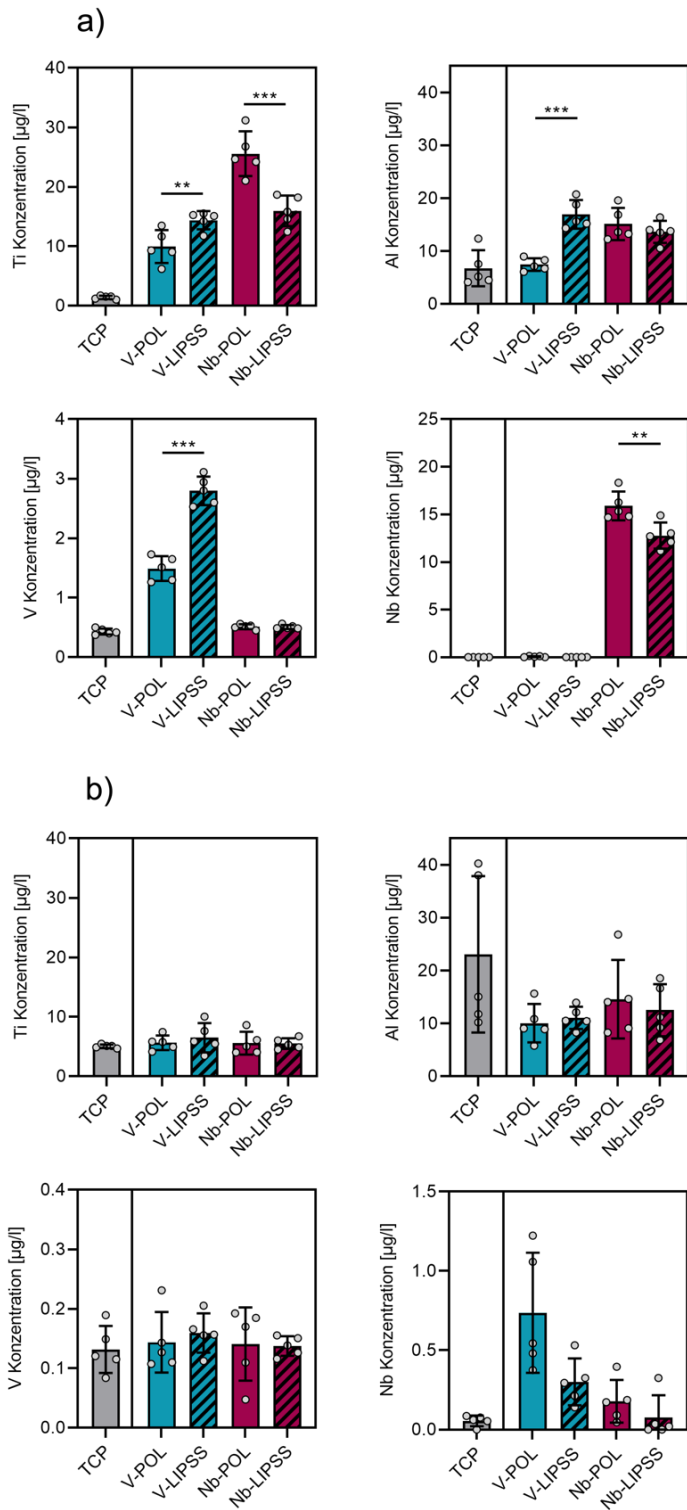


Abbildung 6. Metallquantifizierung von Aluminium, Titan, Vanadium und Niob in Zellkulturüberstand und Zelllysat nach einer Kulturzeit von 7 Tagen. a) Metallfreisetzung im Zellkulturüberstand auf den Oberflächen TCP, V-POL, V-LIPSS, Nb-POL, Nb-LIPSS. b) Metallanreicherung im Zelllysat auf den Oberflächen TCP, V-POL, V-LIPSS, Nb-POL, Nb-LIPSS kultivierter Zellen. Statistische Analysen durchgeführt mit ungepaarten t Test; Mittelwert \pm Standardabweichung; n=10 technische Replikate; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Abkürzungen: TCP, tissue culture plastic; V-POL, polierte Ti6Al4V-Oberflächen; V-LIPSS, periodisch strukturierte Ti6Al4V-Oberflächen; Nb-POL, polierte Ti6Al4Nb-Oberflächen; Nb-LIPSS, periodisch strukturierte Ti6Al4Nb-Oberflächen.

3.3 Quantifizierung der Zellviabilität auf den verschiedenen Oberflächen

Um zu prüfen, ob die Metallfreisetzung einen Einfluss auf die Viabilität von humanen Osteoblasten und gingivalen Fibroblasten hat, wurde die Zellviabilität quantifiziert. Als Indikator der Zellviabilität wurde die metabolische Aktivität der Zellen auf den polierten und periodisch strukturierten Ti6Al4V und Ti6Al4Nb-Oberflächen quantifiziert.

Zu keinem Zeitpunkt wurde ein signifikanter Unterschied der metabolischen Aktivität der Osteoblasten, die auf polierten Oberflächen und periodisch strukturierten Oberflächen kultiviert wurden, festgestellt (Abb. 7 a).

Die metabolische Aktivität der humanen gingivalen Fibroblasten auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V und Ti6Al4Nb-Oberflächen war an Tag 0 signifikant geringer als auf den polierten Oberflächen (Mittlere metabolische Aktivität [FI] \pm Standardabweichung V-POL, 1020 ± 340 ; V-LIPSS, 580 ± 194 ; Nb-POL, 1397 ± 173 ; Nb-LIPSS, 869 ± 138) (Abb. 7 b). Die metabolische Aktivität auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen war an Tag 4 und 14 signifikant geringer als auf den polierten Oberflächen (Mittlere metabolische Aktivität [FI] \pm Standardabweichung: Nb-POL, 19428 ± 6754 ; Nb-LIPSS, 869 ± 138 ; Nb-POL, 33250 ± 9211 ; Nb-LIPSS, 20187 ± 3499) (Abb. 7 b).

Es lässt sich festhalten, dass die metabolische Aktivität der humanen Osteoblasten nicht von der periodischen Strukturierung der Titanlegierungen beeinflusst wird. Die gingivalen Fibroblasten waren auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V und Ti6Al4Nb-Oberflächen signifikant weniger metabolisch aktiv als auf den polierten Oberflächen. Die metabolische Aktivität der humanen Osteoblasten und gingivalen Fibroblasten auf den Ti6Al4Nb-Oberflächen war über das gesamte Experiment im Vergleich höher als auf den Ti6Al4V-Oberflächen.

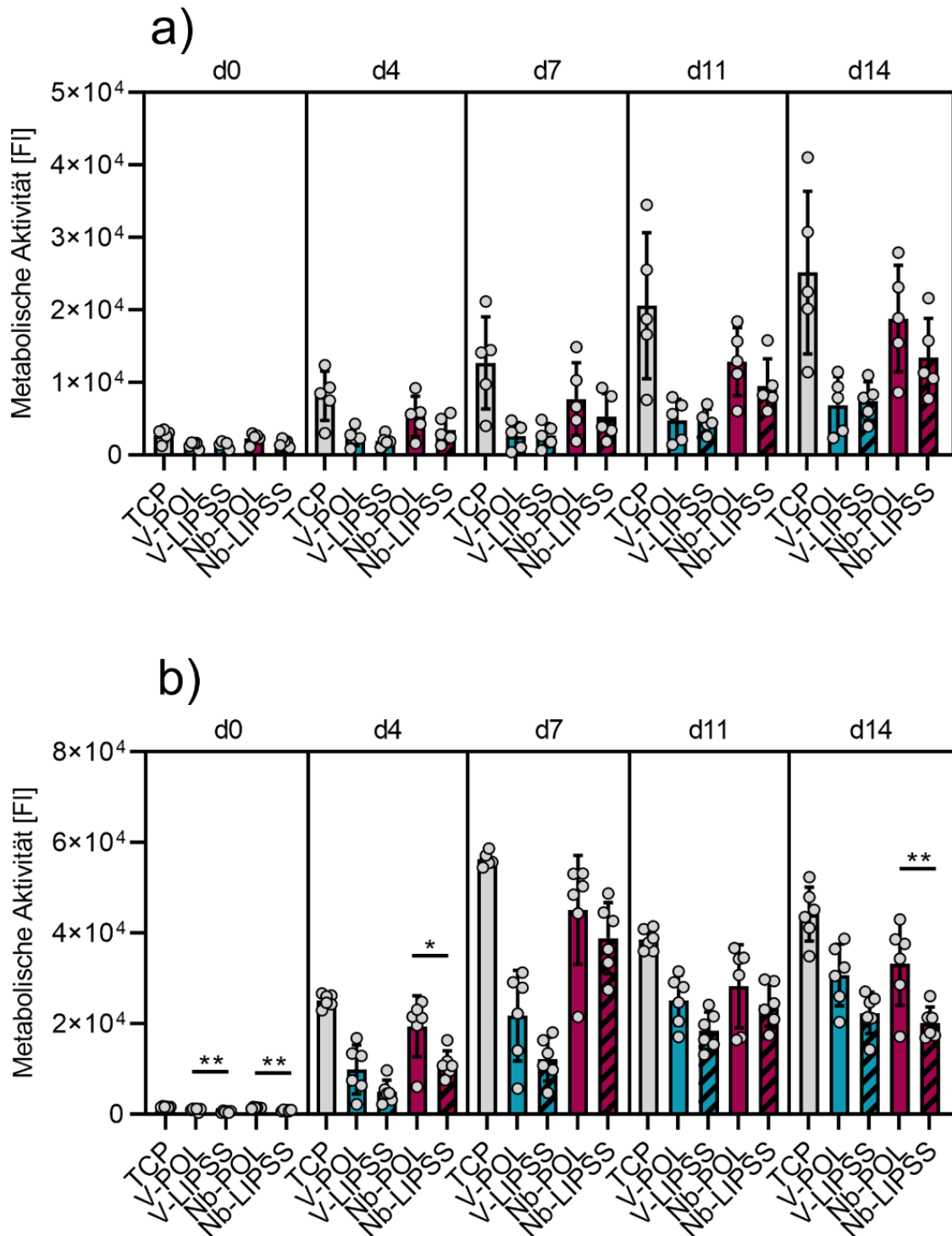


Abbildung 7. Viabilität humaner Osteoblasten und humaner gingivaler Fibroblasten auf den Oberflächen TCP, V-POL, V-LIPSS, Nb-POL, Nb-LIPSS nach einer Kulturzeit von 14 Tagen. a) Metabolische Aktivität der humanen Osteoblasten n=5 Spender. b) Metabolische Aktivität der humanen gingivalen Fibroblasten n=6 technische Replikate. Statistische Analysen durchgeführt mit einer einfachen Varianzanalyse mit post-hoc-Korrektur nach Bonferroni; Mittelwert \pm Standardabweichung; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Abkürzungen: TCP, tissue culture plastic; V-POL, polierte Ti6Al4V-Oberflächen; V-LIPSS, periodisch strukturierte Ti6Al4V-Oberflächen; Nb-POL, polierte Ti6Al4Nb-Oberflächen; Nb-LIPSS, periodisch strukturierte Ti6Al4Nb-Oberflächen.

3.4. Proliferation von humanen Osteoblasten und gingivalen Fibroblasten auf den verschiedenen Oberflächen

Um zu prüfen, ob die Oberflächenmodifikation einen Einfluss auf die Proliferation von humanen Osteoblasten und gingivalen Fibroblasten hat, wurden die DNA-Konzentrationen zu verschiedenen Kulturzeitpunkten, die Populationsverdopplungen und die metabolische Aktivität in Relation zur Zellzahl quantifiziert.

Beide Zellarten waren in der Lage, auf den polierten und periodisch strukturierten Oberflächen zu proliferieren (Abb. 8) Die Zellzahl der humanen Osteoblasten war auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen an Tag 0 und Tag 4 signifikant geringer als auf den polierten Oberflächen (Mittlere Zellzahl Tag 0 [RFU] \pm Standardabweichung: V-POL, 1937 \pm 304; V-LIPSS, 1481 \pm 186. Mittlere Zellzahl Tag 4 [RFU] \pm Standardabweichung: V-POL, 4228 \pm 855; V-LIPSS, 2551 \pm 1029), während dieser Effekt an Tag 7 nicht signifikant war. Auf den Oberflächen von Ti6Al4Nb war der Effekt nicht signifikant (Abb. 8 a).

Die Zellzahl der gingivalen Fibroblasten war auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen an Tag 0, 4 und 7 signifikant geringer als auf den polierten Oberflächen (Mittlere Zellzahl Tag 0 [RFU] \pm Standardabweichung: V-POL, 575 \pm 183; V-LIPSS, 88 \pm 73. Mittlere Zellzahl Tag 4 [RFU] \pm Standardabweichung: V-POL, 4492 \pm 1939; V-LIPSS, 1572 \pm 681. Mittlere Zellzahl Tag 7 [RFU] \pm Standardabweichung: V-POL, 15266 \pm 8284; V-LIPSS, 7252 \pm 3806) (Abb. 8 a). Auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen war die Zellzahl an Tag 0 und Tag 4 signifikant geringer als auf den polierten Oberflächen (Mittlere Zellzahl Tag 0 [RFU] \pm Standardabweichung: Nb-POL, 1268 \pm 218; Nb-LIPSS, 589 \pm 135. Mittlere Zellzahl Tag 4 [RFU] \pm Standardabweichung: Nb-POL, 6784 \pm 2154; Nb-LIPSS, 4550 \pm 2502) (Abb. 8 a). An Tag 7 war dieser Effekt nicht signifikant (Abb. 8 a).

Relativ zur Kontrolle war die Zellzahl der humanen Osteoblasten auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen an Tag 0 signifikant geringer als auf den polierten Oberflächen (Mittlere Zellzahl relativ zu TCP [%] \pm Standardabweichung: V-POL, 109,5 \pm 17; V-LIPSS, 83,8 \pm 11), während derselbe Effekt auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen an Tag 0 nicht signifikant war (Abb. 8 b). Die Berechnung der Populationsverdopplungen ergab keine signifikanten Unterschiede in den Proliferationsraten zwischen den polierten und periodisch strukturierten Oberflächen der Titanlegierung Ti6Al4V und Ti6Al4Nb (Abb. 8 b). Auf den periodisch strukturierten

Ti6Al4V-Oberflächen ergab die Berechnung der Populationsverdopplungen einen negativen Wert (Abb. 8 b).

Relativ zur Kontrolle war die Zellzahl der gingivalen Fibroblasten auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V und Ti6Al4Nb-Oberflächen an Tag 0 signifikant geringer als auf den polierten Oberflächen (Mittlere Zellzahl relativ zu TCP [%] \pm Standardabweichung: V-POL, $64,9 \pm 21$; V-LIPSS, $9,9 \pm 8$; Nb-POL, $143,2 \pm 25$; Nb-LIPSS, $66,5 \pm 15$) (Abb. 8 b). Die Berechnung der Populationsverdopplungen der gingivalen Fibroblasten auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen ergab eine signifikant höherer Proliferationsrate an Tag 4 und Tag 7 im Vergleich zu den polierten Oberflächen (Mittlere Populationsverdopplung Tag 4 [n] \pm Standardabweichung: V-POL, $2,83 \pm 0,72$; V-LIPSS, $4 \pm 0,87$. Mittlere Populationsverdopplung Tag 7 [n] \pm Standardabweichung: V-POL, $4,6 \pm 0,63$; V-LIPSS, $6,05 \pm 1,25$) (Abb. 8 b). Die berechneten Populationsverdopplungen der gingivalen Fibroblasten auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen ergaben eine signifikant höhere Proliferationsrate an Tag 7 im Vergleich zu den polierten Oberflächen (Mittlere Populationsverdopplung [n] \pm Standardabweichung: Nb-POL, $1,94 \pm 0,64$; Nb-LIPSS, $3,96 \pm 0,27$) (Abb. 8 b).

Unterschiede bei der Quantifizierung der metabolischen Aktivität der humanen Osteoblasten auf den Oberflächen der Ti6Al4V-Oberflächen waren in Relation zur Zellzahl an Tag 0, Tag 4 und Tag 7 nicht signifikant (Abb. 8 c). Auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen war die metabolische Aktivität in Relation zur Zellzahl an Tag 0 signifikant niedriger als auf den polierten Oberflächen (metabolische Aktivität relativ zu Zellzahl [-] \pm Standardabweichung: Nb-POL, $2,5 \pm 0,23$; Nb-LIPSS, $1,96 \pm 0,39$) (Abb. 4 c). An Tag 4 und Tag 7 war dieser Effekt nicht signifikant (Abb. 8 c).

Das Ergebnis der Quantifizierung der metabolischen Aktivität der gingivalen Fibroblasten auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V und Ti6Al4Nb-Oberflächen in Relation zur Zellzahl war an Tag 0 und Tag 4 signifikant höher als auf den polierten Oberflächen (Metabolische Aktivität relativ zu Zellzahl Tag 0 [-] \pm Standardabweichung: V-POL, $8,01 \pm 1,21$; V-LIPSS, $17,9 \pm 3,78$; Nb-POL, $4,63 \pm 0,62$; Nb-LIPSS, $7,74 \pm 1,3$. Metabolische Aktivität relativ zu Zellzahl Tag 4 [-] \pm Standardabweichung: V-POL, $2,88 \pm 1,01$; V-LIPSS, $5,95 \pm 2,91$; Nb-POL, $2,38 \pm 0,63$; Nb-LIPSS, $3,12 \pm 1,9$), während dieser Effekt an Tag 7 nicht signifikant war (Abb. 8 c).

Es lässt sich festhalten, dass weniger Zellen, insbesondere gingivale Fibroblasten auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V- und Ti6Al4Nb-Oberflächen adhärten. Die Proliferationsrate und die metabolische Aktivität der adhärten gingivalen Fibroblasten waren auf den periodisch strukturierten Oberflächen höher als auf den polierten Oberflächen.

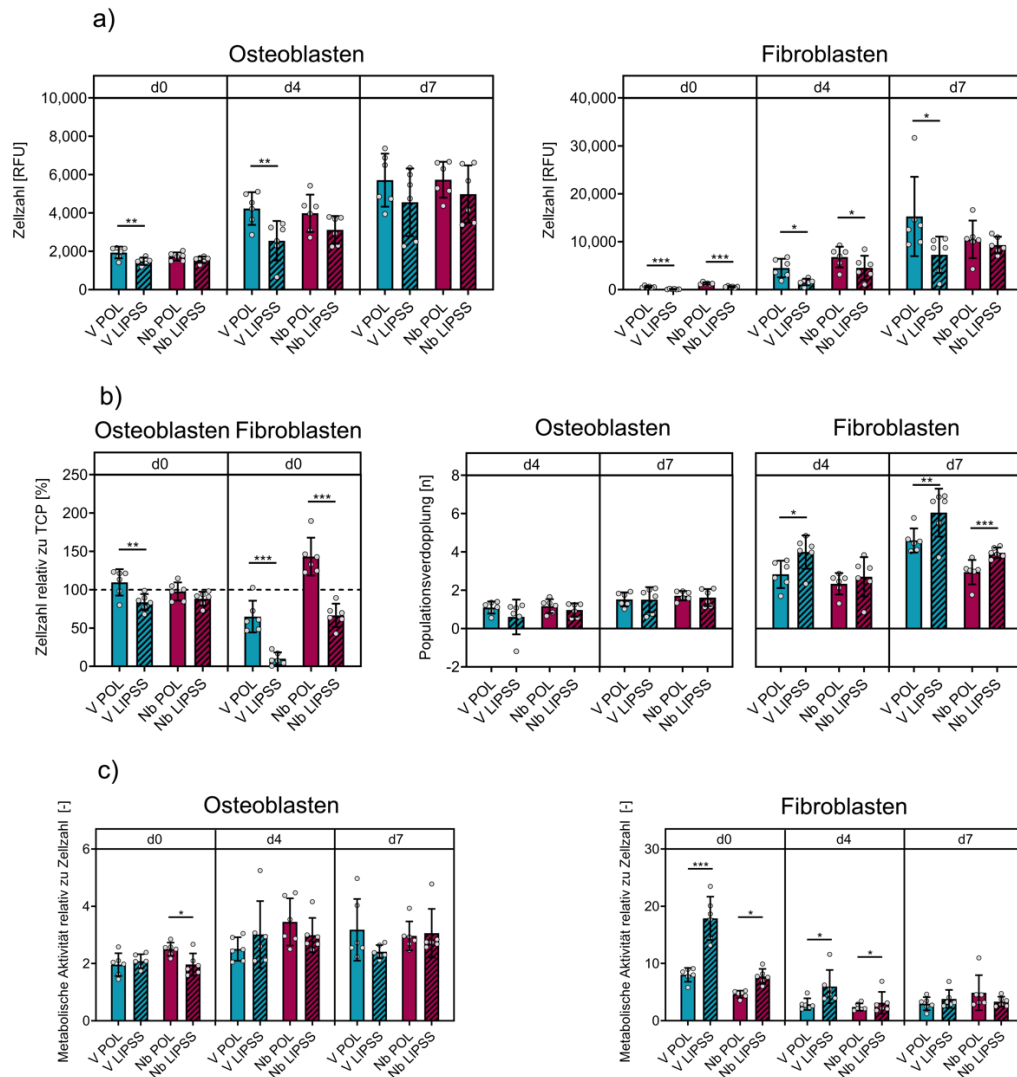


Abbildung 8. Zellzahlbestimmung, Populationsverdopplung und normalisierte metabolische Aktivität von humanen Osteoblasten und gingivalen Fibroblasten auf den Oberflächen V-POL, V-LIPSS, Nb-POL, Nb-LIPSS nach einer Kulturzeit von 7 Tagen. a) Zellzahl von humanen Osteoblasten und humanen gingivalen Fibroblasten an Tag 0, 4 und 7. b) Relative Zellzahl zu TCP von humanen Osteoblasten und humanen gingivalen Fibroblasten an Tag 0. An Tag 4 und 7 die entsprechende Populationsverdopplung der jeweiligen Zellart. c) Metabolische Aktivität von humanen Osteoblasten und humanen gingivalen Fibroblasten an Tag 0, 4 und 7 in Relation zur Zellzahl. Statistische Analysen durchgeführt mit einer einfachen Varianzanalyse mit post-hoc-Korrektur nach Bonferroni; Mittelwert \pm Standardabweichung; n= 6 technische Replikate; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Abkürzungen: TCP, tissue culture plastic; V-POL, polierte Ti6Al4V-Oberflächen; V-LIPSS, periodisch strukturierte Ti6Al4V-Oberflächen; Nb-POL, polierte Ti6Al4Nb-Oberflächen; Nb-LIPSS, periodisch strukturierte Ti6Al4Nb-Oberflächen.

3.5. Zytotoxische Wirkung der verschiedenen Oberflächen auf humane Osteoblasten und gingivale Fibroblasten

Um zu prüfen, ob die periodisch strukturierten Ti6Al4V und Ti6Al4Nb-Oberflächen einen zytotoxischen Effekt auf die humanen Osteoblasten und gingivalen Fibroblasten haben, wurde die Zytotoxizität der Titanlegierung Ti6Al4V und Ti6Al4Nb beurteilt. Dafür wurde die Lebend-Tot-Färbung von humanen Osteoblasten ausgewertet und die Freisetzung der LDH von humanen Osteoblasten und gingivalen Fibroblasten quantifiziert. LDH ist ein zytoplasmatisches Enzym, welches bei Integritätsstörungen der Zellmembran in den Extrazellularraum bzw. in den Kulturüberstand freigesetzt wird und dort quantifiziert werden kann.

Die Aufnahmen der Lebend-/Tot-Färbung zeigten mehr vitale Zellen auf den polierten Ti6Al4V und Ti6Al4Nb-Oberflächen als auf den periodisch strukturierten Oberflächen (Abb. 9 a, b, c, d). Auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen waren mehr vitale Zellen als auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen (Abb. 9 b, d).

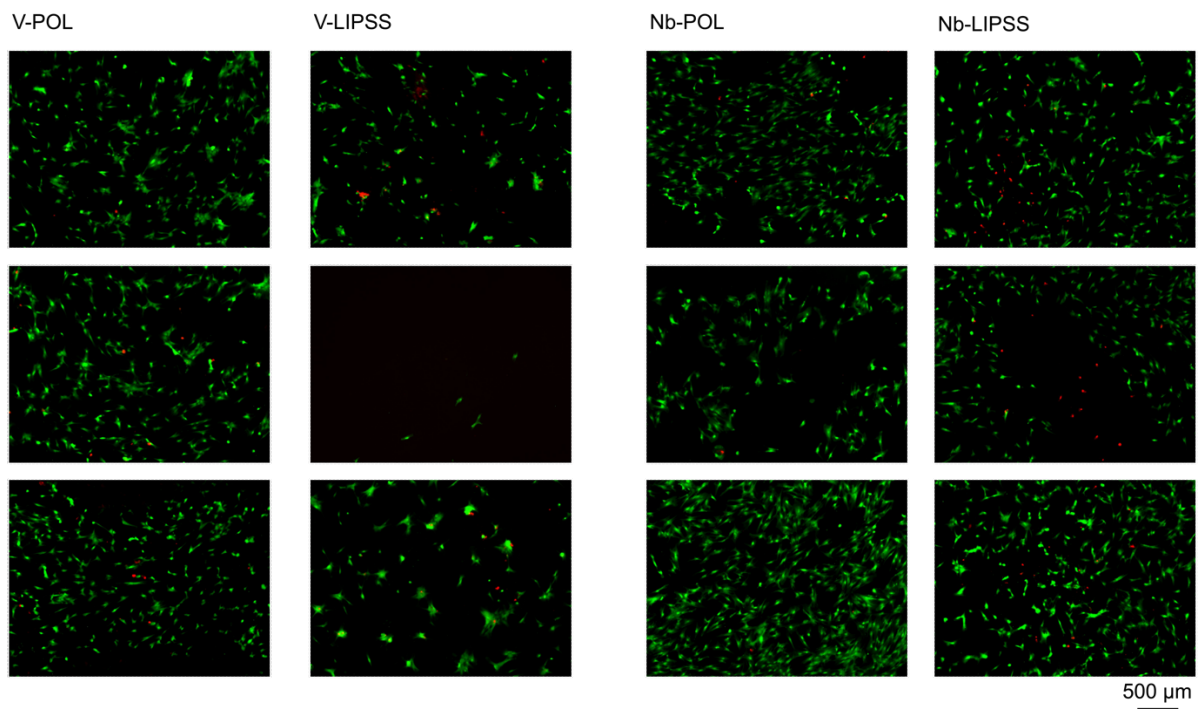


Abbildung 9. Zytotoxischer Einfluss der verschiedenen Ti6Al4V und Ti6Al4Nb-Oberflächen auf humane Osteoblasten nach einer Kulturzeit von 24h. Fluoreszenzaufnahmen bei 4-facher Vergrößerung (grün=vitale Zelle, rot=avitale Zelle); n=3 Spender.

Die Freisetzung von LDH durch die humanen Osteoblasten war auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V- und Ti6Al4Nb-Oberflächen im Vergleich zu den polierten Oberflächen nicht signifikant erhöht (Abb. 10 a).

Die gingivalen Fibroblasten setzten an Tag 7 auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen signifikant weniger LDH frei als auf den polierten Oberflächen (LDH-Freisetzung [OD] \pm Standardabweichung: V-POL, $1,1 \pm 0,39$; V-LIPSS, $0,6 \pm 0,06$) (Abb. 10 b). Dieser Effekt war an Tag 0, 4, 11 und 14 nicht signifikant (Abb. 10 b). Auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen war die Freisetzung von LDH im Vergleich zu den polierten Oberflächen unverändert (Abb. 10 b).

Aus der Quantifizierung der LDH-Freisetzung geht hervor, dass die periodische Strukturierung keinen signifikanten Einfluss auf die Freisetzung von LDH hat. Die Lebend-/Tot-Färbung zeigte weniger humane Osteoblasten auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V- und Ti6Al4Nb-Oberflächen. Es wird bestätigt, dass auf den periodisch strukturierten Oberflächen weniger Zellen adhärieren, jedoch im Verlauf kein signifikant erhöhter Niedergang der auf den Oberflächen adhärenen Zellkulturen festzustellen war.

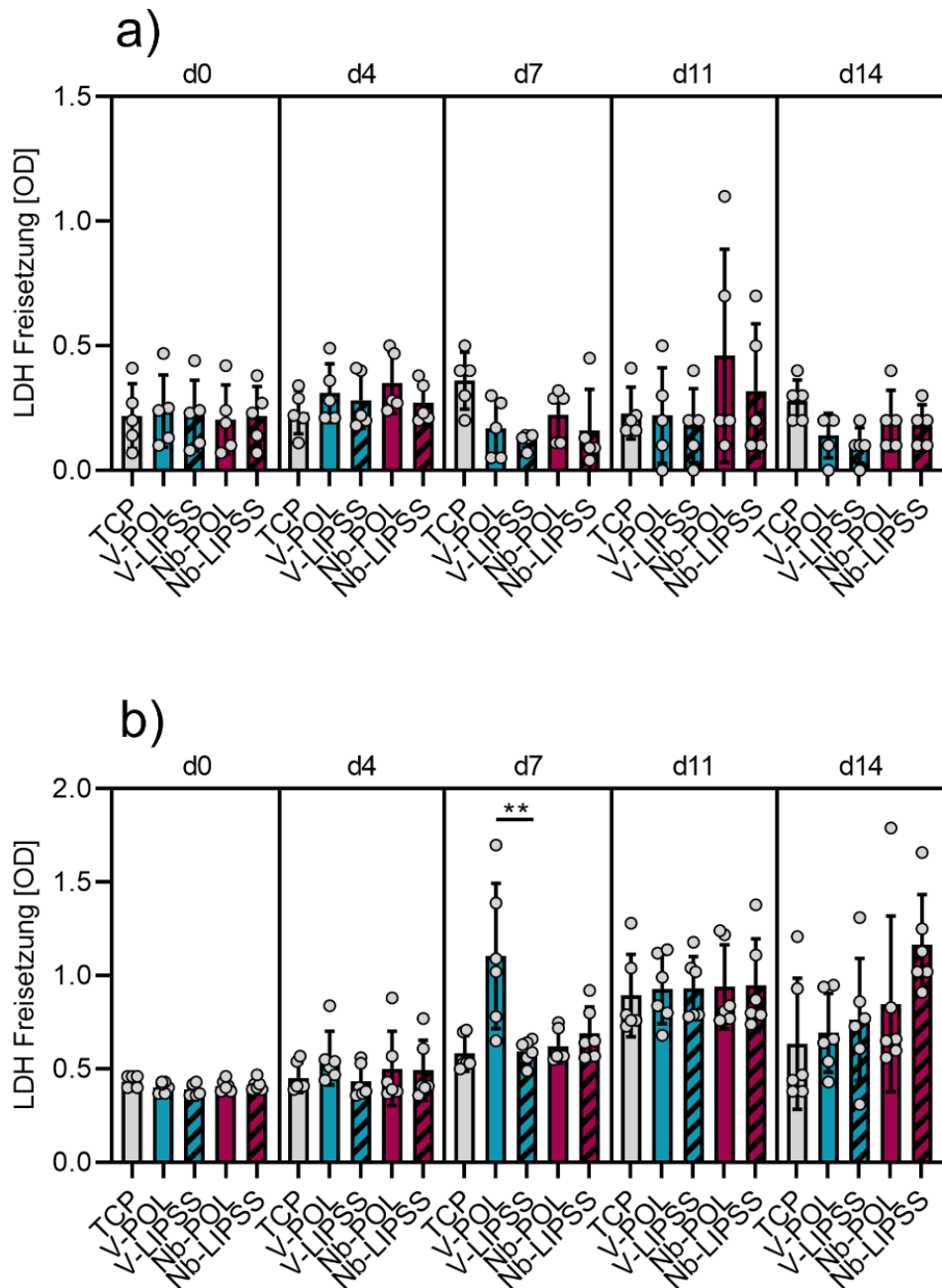


Abbildung 10. Zytotoxischer Einfluss von Ti6Al4V und Ti6Al4Nb auf humane Osteoblasten und gingivale Fibroblasten auf den Oberflächen TCP, V-POL, V-LIPSS, Nb-POL, Nb-LIPSS bei einer Kulturzeit von bis zu 14 Tagen. a) LDH-Freisetzung der humanen Osteoblasten n=5 Spender. b) LDH-Freisetzung der gingivalen Fibroblasten n=6 technische Replikate. Statistische Analysen durchgeführt mit einer einfachen Varianzanalyse mit post-hoc-Korrektur nach Bonferroni; Mittelwert \pm Standardabweichung; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Abkürzungen: LDH, Laktatdehydrogenase; TCP, tissue culture plastic; V-POL, polierte Ti6Al4V-Oberflächen; V-LIPSS, periodisch strukturierte Ti6Al4V-Oberflächen; Nb-POL, polierte Ti6Al4Nb-Oberflächen; Nb-LIPSS, periodisch strukturierte Ti6Al4Nb-Oberflächen.

3.6. Einfluss der verschiedenen Oberflächen auf die Zellmorphologie von humanen Osteoblasten und gingivalen Fibroblasten

Um zu untersuchen, ob die periodisch strukturierten Oberflächen einen Einfluss auf die Zellmorphologie haben, wurden REM-Bilder von humanen Osteoblasten und gingivalen Fibroblasten angefertigt. Von den gingivalen Fibroblasten wurden zusätzlich noch mittels Fluoreszenzfärbung der Zellkern und die Aktinfilamente angefärbt und dargestellt.

Die REM-Bilder zeigten humane Osteoblasten auf den periodisch strukturierten und polierten Ti6Al4V- und Ti6Al4Nb-Oberflächen (Abb. 11 a, b). Es war zu erkennen, dass die Osteoblasten ihre phänotypische polygonale Form mit den charakteristischen Zellfortsätzen ausbildeten (Abb. 11 a, b).

Die Bilder der polierten Ti6Al4V- und Ti6Al4Nb-Oberflächen und der periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberfläche zeigten gingivale Fibroblasten, die ihre spindelförmige, ovale und fibrilläre zellspezifische Morphologie ausbildeten (Abb. 11 c, d). Die Bilder der Fluoreszenzmikroskopie zeigten den Zellkern und das Aktinfilamentnetzwerk des Zellverbandes der gingivalen Fibroblasten (Abb. 12). Auf den polierten Ti6Al4V- und Ti6Al4Nb-Oberflächen war der Fibroblastenzellverband entlang der Oberflächenstruktur elongiert und migriert (Abb. 12 a, c). Auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen war kein Zellverband der gingivalen Fibroblasten zu identifizieren (Abb. 12 b). Auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen war bei 20-facher Vergrößerung ein Zellverband der gingivalen Fibroblasten zu erkennen (Abb. 12 d).

Beide Zellarten waren in der Lage auf den Ti6Al4V- und Ti6Al4Nb-Oberflächen die typischen zellspezifische Merkmale auszubilden. Davon ausgenommen waren die gingivalen Fibroblasten, die auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen nach 14 Tagen nicht mehr als organisierter Zellverband zu identifizieren waren.

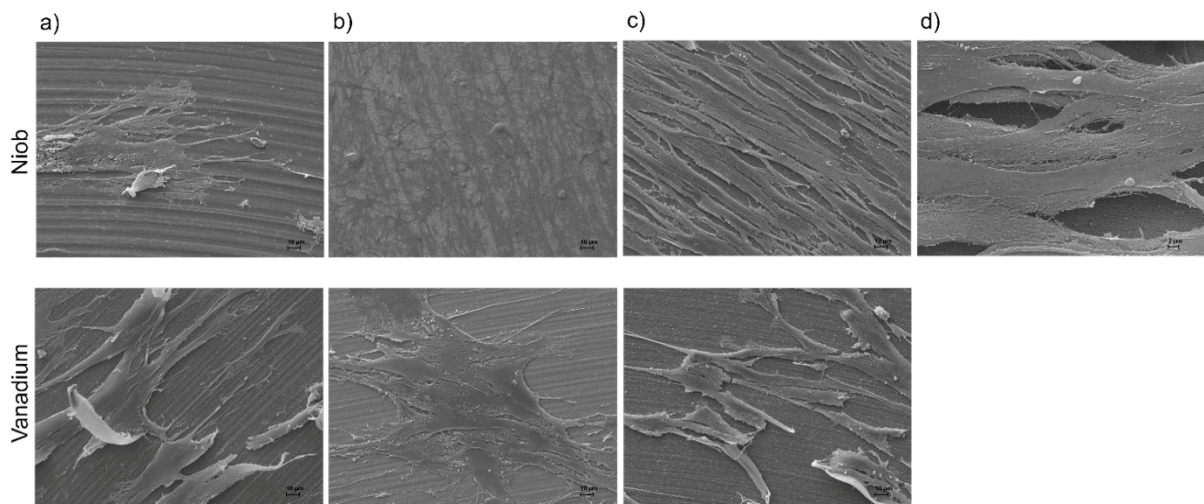


Abbildung 11. Charakterisierung der Zellmorphologie von humanen Osteoblasten und gingivalen Fibroblasten auf den polierten und periodisch strukturierten Ti6Al4V und Ti6Al4Nb-Oberflächen nach einer Kulturzeit von 14 Tagen. a) REM-Bild von humanen Osteoblasten auf polierter Ti6Al4Nb- und Ti6Al4V-Oberfläche bei 2000-facher Vergrößerung. b) REM-Bild von humanen Osteoblasten auf der periodisch strukturierten Ti6Al4Nb- und Ti6Al4V-Oberfläche bei 2000-facher Vergrößerung. c) REM-Bild von gingivalen Fibroblasten auf der polierten Ti6Al4Nb- und Ti6Al4V-Oberfläche bei 2000-facher Vergrößerung. d) REM-Bild von gingivalen Fibroblasten auf der periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberfläche bei 8000-facher Vergrößerung.

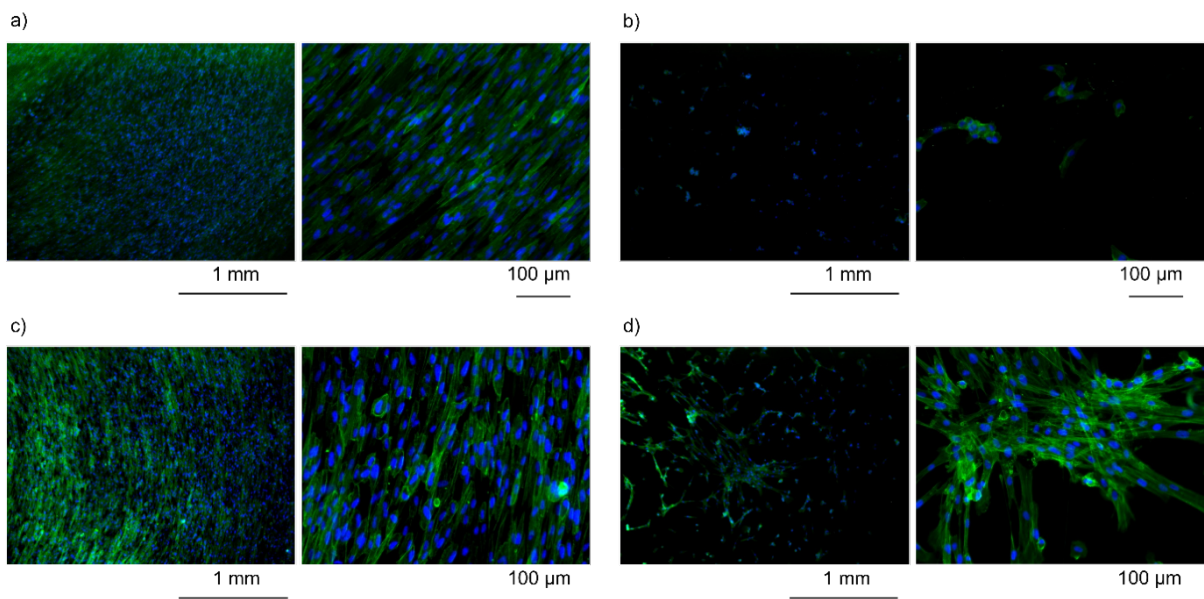


Abbildung 12. Charakterisierung der Zellmorphologie von gingivalen Fibroblasten mittels Fluoreszenzfärbung nach einer Kulturzeit von 14 Tagen. Blaue Färbung des Zellkerns und grüne Färbung der Aktinfilamente. a) Fluoreszenzbild bei 4-facher und 20-facher Vergrößerung einer polierten Ti6Al4V-Oberfläche. b) Fluoreszenzbild bei 4-facher und 20-facher Vergrößerung einer periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberfläche. c) Fluoreszenzbild bei 4-facher und 20-facher Vergrößerung auf einer polierten Ti6Al4Nb-Oberfläche. d) Fluoreszenzbild bei 4-facher und 20-facher Vergrößerung auf einer periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberfläche.

3.7. Osteogene Kapazität humaner Osteoblasten auf den verschiedenen Oberflächen

Um zu untersuchen, ob die periodische Strukturierung der Ti6Al4V- und Ti6Al4Nb-Oberflächen einen Einfluss auf das osteogene Potenzial hat, wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) quantifiziert. ALP ist ein Schlüsselenzym bei der Mineralisierung osteogener Matrix, da es organisches Phosphat und Pyrophosphat zu Phosphat katalysiert, welches dann zur Bildung von Hydroxylapatit zur Verfügung steht. Der Nachweis der ALP-Aktivität erfolgt sowohl in der klinischen Routine als auch in der Zellkultur mit dem Substrat 4-Nitrophenylphosphat (pNPP). Die ALP katalysiert die Reaktion zu 4-Nitrophenolat (pNP). Die Konzentration von pNP kann photometrisch bestimmt werden. Je höher die Konzentration von pNP, umso höher ist die ALP-Aktivität.

Auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V- und Ti6Al4Nb-Oberflächen war die Aktivität der ALP im Expansionsmedium signifikant geringer als auf den polierten Oberflächen (pNPP-Verbrauch / 10 min [ng/well] \pm Standardabweichung: V-POL, $6,77 \pm 1,33$; V-LIPSS, $1,15 \pm 0,51$; Nb-POL, $11,63 \pm 2,25$; Nb-LIPSS, $4,02 \pm 0,49$) (Abb. 13 a). Die humanen Osteoblasten, die im osteogenen Medium kultiviert wurden, zeigten auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen eine signifikant geringere ALP-Aktivität als auf den polierten Oberflächen (pNPP-Verbrauch / 10 min [ng/well] \pm Standardabweichung: V-POL, $11,82 \pm 2,06$; V-LIPSS, $5,62 \pm 2,06$) (Abb. 13 a). Dieser Effekt war auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen nicht signifikant (Abb. 13 a). Das Vervielfachungspotenzial der ALP-Aktivität in dem osteogenen Medium normalisiert über der ALP-Aktivität des Expansionsmediums war auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen signifikant um 4,9-fach höher und auf den Ti6Al4Nb-Oberflächen signifikant um 2,25-fach höher als auf den polierten Oberflächen (ALP-Aktivität rel. zu EM [-] \pm Standardabweichung: V-POL, $1,75 \pm 0,3$; V-LIPSS, $4,9 \pm 1,8$; Nb-POL, $0,76 \pm 0,36$; Nb-LIPSS, $2,25 \pm 0,58$) (Abb. 13 b).

Auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V und Ti6Al4Nb-Oberflächen ist die ALP-Aktivität der humanen Osteoblasten auf den Ti6Al4V-Oberflächen im Expansionsmedium und im osteogenen Medium signifikant geringer als auf den polierten Oberflächen, während auf den Ti6Al4Nb-Oberflächen der Effekt nur im Expansionsmedium signifikant war. Die Steigerung der ALP-Aktivität der humanen Osteoblasten, die im osteogenen Medium auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V und Ti6Al4Nb-Oberflächen kultiviert wurden, war in Relation zum Expansionsmedium

signifikant höher als auf den polierten Oberflächen. Die humanen Osteoblasten, die auf den Oberflächen adhärten waren daher auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V und Ti6Al4Nb-Oberflächen in der Lage einen stärkeren osteogenen Phänotyp auszubilden.

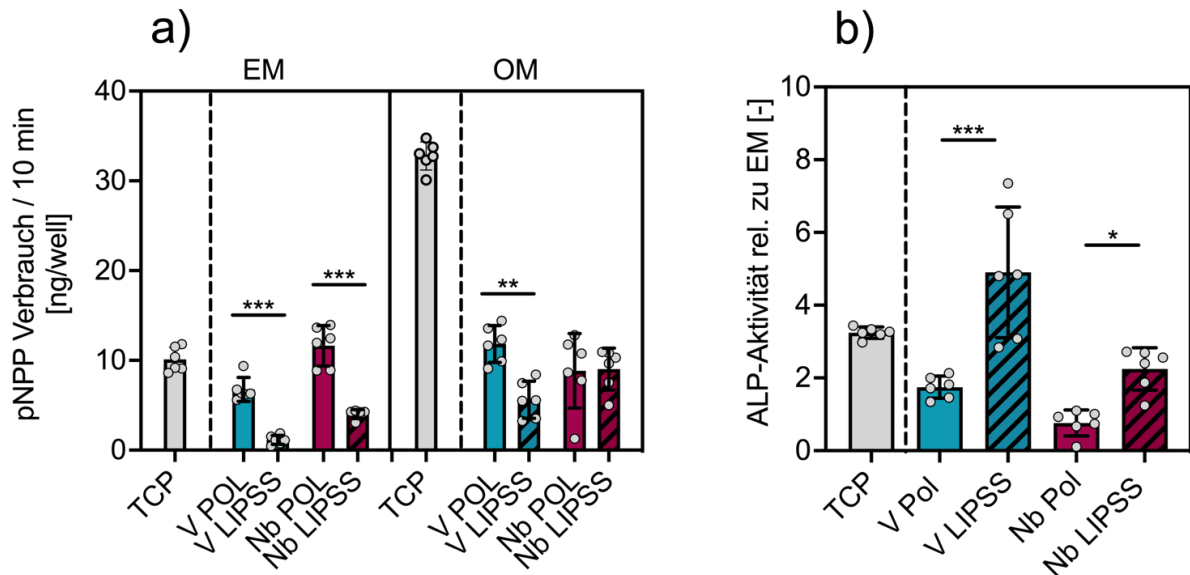


Abbildung 13. Osteogenes Potenzial von humanen Osteoblasten auf den polierten und periodisch strukturierten Oberflächen der Legierungen Ti6Al4V und Ti6Al4Nb. a) pNPP-Verbrauch / 10 min EM und OM nach einer Kulturzeit von 10 Tagen auf den Oberflächen der Gruppen TCP, V-POL, V-LIPSS, Nb-POL, Nb-LIPSS. b) Normalisierte ALP-Aktivität im OM in Relation zum EM. Statistische Analysen durchgeführt mit einer einfachen Varianzanalyse mit post-hoc-Korrektur nach Bonferroni; Mittelwert ± Standardabweichung; n= 6 technische Replikate; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Abkürzungen: EM, Expansionsmedium; OM, osteogenes Medium; pNP, 4-Nitrophenolat; ALP, alkalische Phosphatase; TCP, tissue culture plastic; V-POL, polierte Ti6Al4V-Oberflächen; V-LIPSS, periodisch strukturierte Ti6Al4V-Oberflächen; Nb-POL, polierte Ti6Al4Nb-Oberflächen; Nb-LIPSS, periodisch strukturierte Ti6Al4Nb-Oberflächen.

3.8. Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen auf den verschiedenen Oberflächen

Um zu prüfen, ob die periodisch strukturierten Ti6Al4V und Ti6Al4Nb-Oberflächen einen Einfluss auf die Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokine haben, wurden die Konzentrationen von 12 verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen des Zellkulturüberstandes der humanen Osteoblasten und gingivalen Fibroblasten des Proliferationskapazitätsexperimentes und des Zellkulturüberstandes der humanen Osteoblasten des osteogenen Differenzierungsexperimentes quantifiziert. Die 12 quantifizierten Wachstumsfaktoren und Zytokine sind: Gewebeinhibitor der Metalloproteinase-2 (TIMP-2), Osteoprotegerin, Hepatozyten-Wachstumsfaktor, stromazellabgeleiteter Faktor-1 (SDF-1), Stammzellofaktor (SCF), transformierender Wachstumsfaktor-beta-1 (TGF-beta-1), Endothelwachstumsfaktor-A (VEGF-A), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), Monozyten-kolonienstimulierender Faktor (M-CSF), monozytenchemotaktisches Protein-1 (MCP-1) und Interleukin-1 Rezeptor Antagonisten Protein (IL-1ra). Anhand der Konzentrationen dieser Wachstumsfaktoren und Zytokine im Zellkulturüberstand können Aussagen über etwaige matrix- und immunmodulative Effekte getroffen werden. Die Ergebnisse aus dem Proliferationskapazitätsexperimentes wurden auf der Zellzahl normalisiert dargestellt und zeigen die Konzentration der Wachstumsfaktoren und Zytokine in dem Zellkulturüberstand an Tag 4. Die Ergebnisse aus dem Experiment zur osteogenen Kapazität zeigen die Konzentration von Wachstumsfaktoren und Zytokinen in dem Zellkulturüberstand an Tag 7.

Die Konzentration in Relation zur Anzahl der humanen Osteoblasten von TIMP-2 und Osteoprotegerin war auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V- und Ti6Al4Nb-Oberflächen signifikant geringer als auf den polierten Oberflächen (Mittlere TIMP-2 Konzentration rel. zur Zellzahl [pg/ μ l] \pm Standardabweichung: V-POL, $7,8 \pm 1,01$; V-LIPSS, $5,84 \pm 1,22$; Nb-POL, $9,8 \pm 2,35$; Nb-LIPSS, $5,25 \pm 1,57$. Mittlere Osteoprotegerin Konzentration rel. zur Zellzahl [pg/ μ l] \pm Standardabweichung: V-POL, $9,1 \pm 0,59$; V-LIPSS, $6,38 \pm 0,98$; Nb-POL, $11,48 \pm 1,52$; Nb-LIPSS, $7,45 \pm 1,04$) (Abb. 14). Die Konzentration in Relation zur Anzahl der humanen Osteoblasten von IL-1ra war auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen signifikant höher als auf den polierten Oberflächen (Mittlere IL-1ra Konzentration rel. zur Zellzahl [pg/ μ l] \pm Standardabweichung: V-POL, $0,09 \pm 0,00$; V-LIPSS, $0,11 \pm 0,01$; Nb-POL, $0,09 \pm 0,01$; Nb-LIPSS, $0,09 \pm 0,01$) (Abb. 14). Derselbe Effekt war für die Konzentration in

Relation zur Anzahl der humanen Osteoblasten von MCP-1 auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen signifikant (Mittlere MCP-1 Konzentration rel. zur Zellzahl [pg/μl] ± Standardabweichung: V-POL, 1,32 ± 0,06; V-LIPSS, 1,27 ± 0,10; Nb-POL, 0,91 ± 0,07; Nb-LIPSS, 1,06 ± 0,1) (Abb. 14).

Die Konzentration in Relation zur Anzahl der gingivalen Fibroblasten von TIMP-2 war auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V- und Ti6Al4Nb-Oberflächen signifikant niedriger als auf den polierten Oberflächen (Mittlere TIMP-2 Konzentration rel. zur Zellzahl [pg/μl] ± Standardabweichung: V-POL, 16,27 ± 1,26; V-LIPSS, 7,61 ± 0,79; Nb-POL, 45,70 ± 9,42; Nb-LIPSS, 16,49 ± 4,14) (Abb. 14). Die Konzentration in Relation zur Anzahl der gingivalen Fibroblasten von Osteoprotegerin war auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V- und Ti6Al4Nb-Oberflächen signifikant höher als auf den polierten Oberflächen (Mittlere Osteoprotegerin Konzentration rel. zur Zellzahl [pg/μl] ± Standardabweichung: V-POL, 7,11 ± 0,93; V-LIPSS, 15,41 ± 0,69; Nb-POL, 8,88 ± 0,58; Nb-LIPSS, 11,68 ± 0,55) (Abb. 14). Die Konzentration in Relation zur Anzahl der gingivalen Fibroblasten von Hepatozyten-Wachstumsfaktor war auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen signifikant höher als auf den polierten Oberflächen (Mittlere Hepatozyten-Wachstumsfaktor Konzentration rel. zur Zellzahl [pg/μl] ± Standardabweichung: V-POL, 0,06 ± 0,00; V-LIPSS, 0,16 ± 0,03; Nb-POL, 45,70 ± 9,42; Nb-LIPSS, 16,49 ± 4,14), während dieser Effekt auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen signifikant niedriger war (Mittlere Hepatozyten-Wachstumsfaktor Konzentration rel. zur Zellzahl [pg/μl] ± Standardabweichung: Nb-POL, 0,18 ± 0,04; Nb-LIPSS, 0,13 ± 0,01) (Abb. 14). Die Konzentration in Relation zur Anzahl der gingivalen Fibroblasten von SCF war auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen signifikant niedriger als auf den polierten Oberflächen (Mittlere SCF-Konzentration rel. zur Zellzahl [pg/μl] ± Standardabweichung: Nb-POL, 0,01 ± 0,00; Nb-LIPSS, 0,01 ± 0,00) (Abb. 14). Die Konzentration in Relation zur Anzahl der gingivalen Fibroblasten von IL-8 und IL-1ra war auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen signifikant höher als auf den polierten Oberflächen (Mittlere IL-8 Konzentration rel. zur Zellzahl [pg/μl] ± Standardabweichung: V-POL, 0,09 ± 0,00; V-LIPSS, 0,12 ± 0,02. Mittlere IL-1ra Konzentration rel. zur Zellzahl [pg/μl] ± Standardabweichung: V-POL, 0,03 ± 0,00; V-LIPSS, 0,06 ± 0,00) (Abb. 14). Die Konzentration in Relation zur Anzahl der gingivalen Fibroblasten von MCP-1 war auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen signifikant höher als auf den polierten Oberflächen (Mittlere MCP-1 Konzentration rel. zur Zellzahl [pg/μl] ±

Standardabweichung: V-POL, $0,49 \pm 0,02$; V-LIPSS, $0,8 \pm 0,06$) (Abb. 14). Die Konzentration in Relation zur Anzahl der gingivalen Fibroblasten von VEGF-A war auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen signifikant höher als auf den polierten Oberflächen (Mittlere VEGF-A Konzentration rel. zur Zellzahl [pg/ μ l] \pm Standardabweichung: V-POL, $0,04 \pm 0,00$; V-LIPSS, $0,07 \pm 0,01$) (Abb. 14).

Es lässt sich festhalten, dass die humanen Osteoblasten, die auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V- und Ti6Al4Nb-Oberflächen kultiviert wurden, signifikant weniger Wachstumsfaktoren (TIMP-2, Osteoprotegerin) sekretierten und signifikant mehr Zytokine auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V (IL-1ra) und Ti6Al4Nb (IL-8, MCP-1) Oberflächen als auf den polierten Oberflächen. Die gingivalen Fibroblasten, die auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen kultiviert wurden, sekretierten signifikant mehr Wachstumsfaktoren (Osteoprotegerin, Hepatozyten-Wachstumsfaktor, VEGF-A), signifikant weniger Wachstumsfaktor TIMP-2 und signifikant mehr Zytokine (IL-8, IL-1ra, MCP-1) als auf den polierten Oberflächen. Die gingivalen Fibroblasten, die auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen kultiviert wurden, sekretierten signifikant mehr Wachstumsfaktoren (Osteoprotegerin, SCF) als auf den polierten Oberflächen.

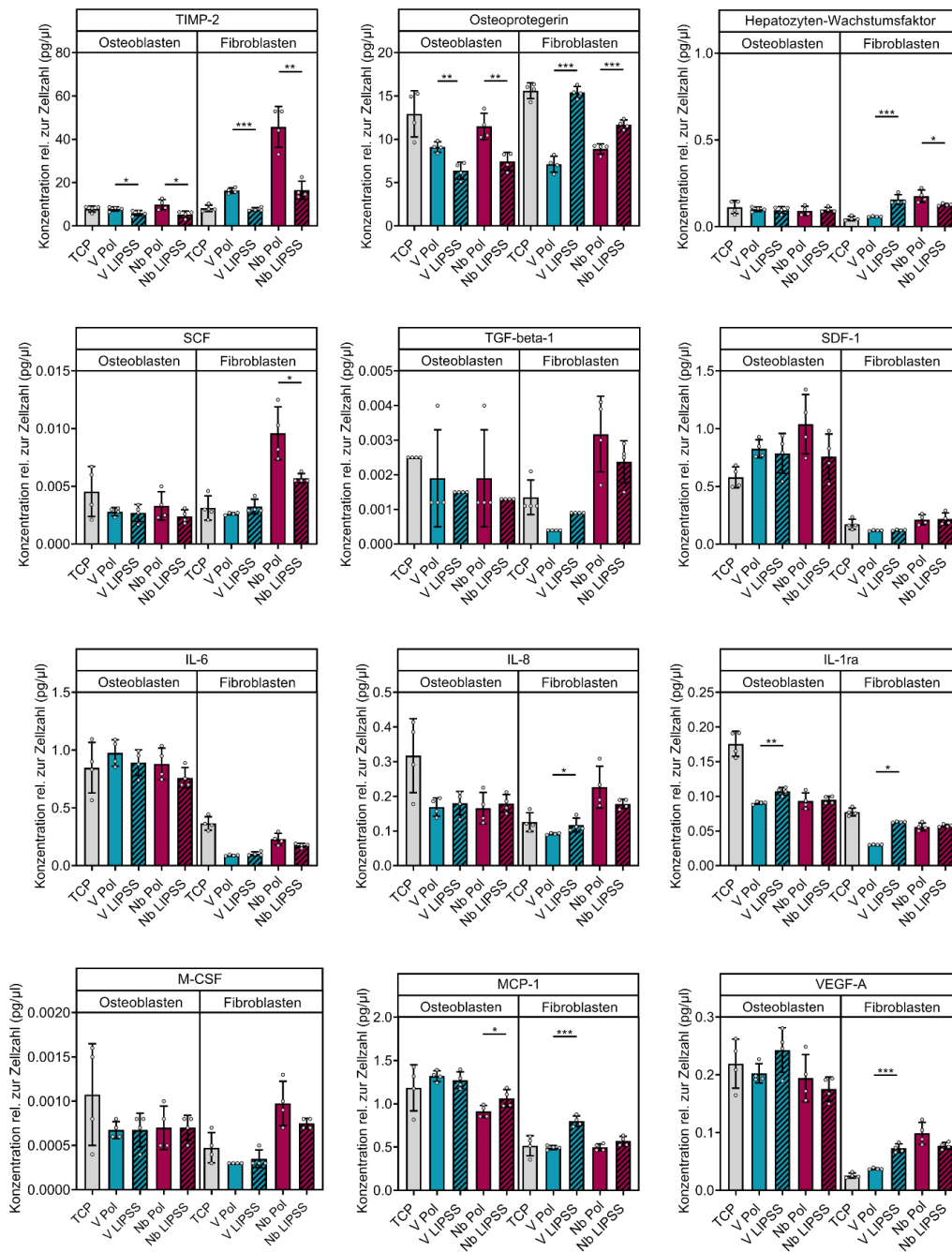


Abbildung 14. Konzentration der Wachstumsfaktoren und Zytokine Timp-2, Osteoprotegerin, Hepatozyten-Wachstumsfaktor, SCF, TGF-beta-1, SDF-1, IL-6, IL-8, IL-1ra, M-CSF, MCP-1 und VEGF-A, in Relation zur Zellzahl im Zellkulturüberstand humaner Osteoblasten und gingivaler Fibroblasten auf den Oberflächen TCP, V-POL, V-LIPSS, Nb-POL, Nb-LIPSS an Tag 7 des Proliferationskapazitätsexperimentes (3.4.). Statistische Analysen durchgeführt mit ungepaarten t Test; Mittelwert ± Standardabweichung; n=6 technische Replikate; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Abkürzungen: Timp-2, Gewebehinhibitor der Metalloproteinase-2; SDF-1, stromzellabgeleiteter Faktor-1; SCF, Stammzellfaktor; TGF-beta-1, transformierender Wachstumsfaktor-beta-1; VEGF-A, Endothelwachstumsfaktor-A; IL-6, Interleukin-6; IL-8, Interleukin-8; M-CSF, Monozytenkolonienstimulierender Faktor; MCP-1, monozytenchemotaktisches Protein-1; IL-1ra, Interleukin-1 Rezeptor Antagonisten Protein; TCP, tissue culture plastic; V-POL, polierte Ti6Al4V-Oberflächen; V-LIPSS, periodisch strukturierte Ti6Al4V-Oberflächen; Nb-POL, polierte Ti6Al4Nb-Oberflächen; Nb-LIPSS, periodisch strukturierte Ti6Al4Nb-Oberflächen.

Die Konzentration von Osteoprotegerin im Zellkulturüberstand der im osteogenen Medium kultivierten humanen Osteoblasten war auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen signifikant geringer als auf den polierten Oberflächen (Mittlere Osteoprotegerin Konzentration [pg/ μ l] \pm Standardabweichung: Nb-POL, 26271,31 \pm 985,31; Nb-LIPSS, 22099,24 \pm 2165,80) (Abb. 15). Die Konzentrationen von Hepatozyten-Wachstumsfaktor und SCF im Zellkulturüberstand der im Expansionsmedium kultivierten humanen Osteoblasten war auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen signifikant höher als auf den polierten Oberflächen (Mittlere Hepatozyten-Wachstumsfaktor Konzentration [pg/ μ l] \pm Standardabweichung: Nb-POL, 246,36 \pm 45,72; Nb-LIPSS, 393,17 \pm 74,47. Mittlere SCF Konzentration [pg/ μ l] \pm Standardabweichung: Nb-POL, 1453,90 \pm 142,35; Nb-LIPSS, 3062,29 \pm 691,92), während dieser Effekt im osteogenen Medium signifikant niedriger war (Mittlere Hepatozyten-Wachstumsfaktor Konzentration [pg/ μ l] \pm Standardabweichung: Nb-POL, 157,46 \pm 15,83; Nb-LIPSS, 43,10 \pm 9,01. Mittlere SCF Konzentration [pg/ μ l] \pm Standardabweichung: Nb-POL, 1331,85 \pm 133,21; Nb-LIPSS, 203,65 \pm 35,46) (Abb. 15). Die Konzentration von IL-6 im Zellkulturüberstand der im Expansionsmedium kultivierten humanen Osteoblasten war auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen signifikant höher als auf den polierten Oberflächen (Mittlere IL-6 Konzentration [pg/ μ l] \pm Standardabweichung: Nb-POL, 398,03 \pm 90,70; Nb-LIPSS, 1957,31 \pm 430,90), während dieser Effekt im osteogenen Medium signifikant niedriger war (Mittlere IL-6 Konzentration [pg/ μ l] \pm Standardabweichung: Nb-POL, 761,35 \pm 62,53; Nb-LIPSS, 131,92 \pm 29,50) (Abb. 15). Die Konzentration von IL-8 im Zellkulturüberstand der im Expansionsmedium kultivierten humanen Osteoblasten war auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen signifikant niedriger als auf den polierten Oberflächen (Mittlere IL-8 Konzentration [pg/ μ l] \pm Standardabweichung: Nb-POL, 326,92 \pm 64,80; Nb-LIPSS, 143,34 \pm 43,09), dabei war dieser Effekt im osteogenen Medium signifikant höher (Mittlere IL-8 Konzentration [pg/ μ l] \pm Standardabweichung: Nb-POL, 76,56 \pm 6,05; Nb-LIPSS, 164,72 \pm 30,33) (Abb. 15). Die Konzentration von IL-1ra im Zellkulturüberstand der im Expansionsmedium kultivierten humanen Osteoblasten war auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen signifikant höher als auf den polierten Oberflächen (Mittlere IL-1ra Konzentration [pg/ μ l] \pm Standardabweichung: Nb-POL, 350,33 \pm 34,68; Nb-LIPSS, 448,99 \pm 29,85), während dieser Effekt im osteogenen Medium signifikant niedriger war (Mittlere IL-1ra Konzentration [pg/ μ l] \pm

Standardabweichung: Nb-POL, $356,01 \pm 4,12$; Nb-LIPSS, $199,10 \pm 24,68$) (Abb. 15). Die Konzentration von M-CSF im Zellkulturüberstand der im Expansionsmedium kultivierten humanen Osteoblasten war auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen signifikant niedriger als auf den polierten Oberflächen (Mittlere M-CSF Konzentration [pg/ μ l] \pm Standardabweichung: Nb-POL, $1,21 \pm 0,15$; Nb-LIPSS, $0,62 \pm 0,17$) (Abb. 15). Die Konzentration von MCP-1 im Zellkulturüberstand der im Expansionsmedium kultivierten humanen Osteoblasten war auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen signifikant höher als auf den polierten Oberflächen (Mittlere MCP-1 Konzentration [pg/ μ l] \pm Standardabweichung: Nb-POL, $618,89 \pm 92,75$; Nb-LIPSS, $2042,47 \pm 173,73$), während dieser Effekt im osteogenen Medium signifikant niedriger war (Mittlere MCP-1 Konzentration [pg/ μ l] \pm Standardabweichung: Nb-POL, $1106,61 \pm 66,54$; Nb-LIPSS, $198,64 \pm 129,55$) (Abb. 15). Die Konzentration von VEGF-A im Zellkulturüberstand der im Expansionsmedium kultivierten humanen Osteoblasten war auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen signifikant höher als auf den polierten Oberflächen (Mittlere VEGF-A Konzentration [pg/ μ l] \pm Standardabweichung: Nb-POL, $481,29 \pm 41,20$; Nb-LIPSS, $870,68 \pm 144,40$), wohingegen dieser Effekt im osteogenen Medium signifikant niedriger war (Mittlere VEGF-A Konzentration [pg/ μ l] \pm Standardabweichung: Nb-POL, $380,95 \pm 7,43$; Nb-LIPSS, $173,31 \pm 34,82$) (Abb. 15).

Es lässt sich festhalten, dass die humanen Osteoblasten, die im osteogenen Medium auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen kultiviert wurden, signifikant weniger Wachstumsfaktoren Osteoprotegerin, Hepatozyten-Wachstumsfaktor und VEGF-A sekretierten und signifikant weniger Zytokine IL-6, IL-1ra, SCF und MCP-1 als auf den polierten Oberflächen. Das Zytokin IL-8 wurde von den humanen Osteoblasten auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen signifikant mehr sekretiert als auf den polierten Oberflächen.

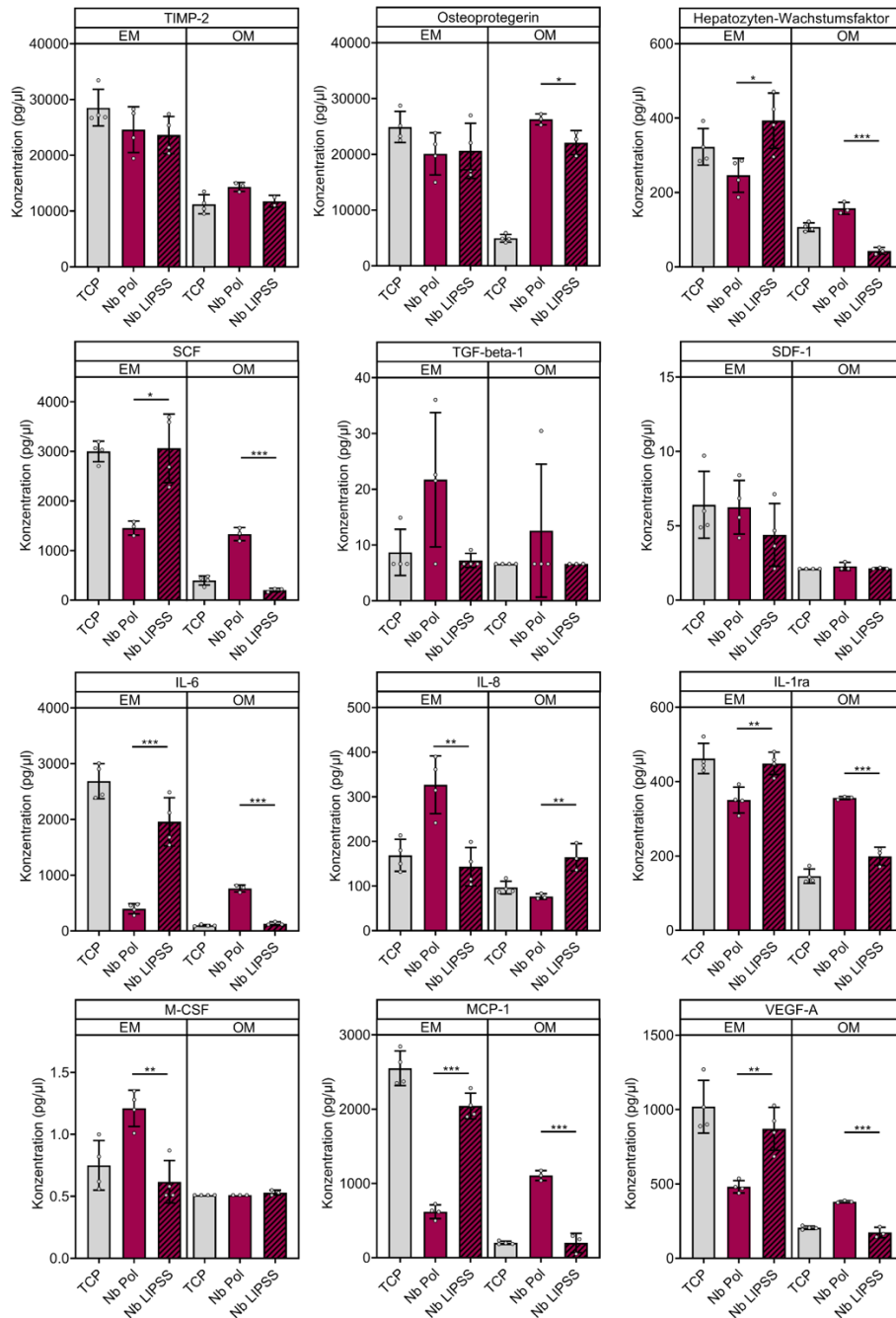


Abbildung 15. Konzentration der Wachstumsfaktoren und Zytokine TIMP-2, Osteoprotegerin, Hepatozyten-Wachstumsfaktor, SCF, TGF-beta-1, SDF-1, IL-6, IL-8, IL-1ra, M-CSF, MCP-1 und VEGF-A im EM und im OM kultivierter humaner Osteoblasten auf den Oberflächen TCP, V-POL, V-LIPSS, Nb-POL, Nb-LIPSS an Tag 4 des Experimentes zur Induktion osteogener Matrix. Statistische Analysen durchgeführt mit ungepaarten t Test; Mittelwert \pm Standardabweichung; n=6 technische Replikate; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Abkürzungen: EM, Expansionsmedium; OM, osteogenes Medium; TIMP-2, Gewebeinhibitor der Metalloproteinase-2; SDF-1, stromzellabgeleiteter Faktor-1; SCF, Stammzellfaktor; TGF-beta-1, transformierender Wachstumsfaktor-beta-1; VEGF-A, Endothelwachstumsfaktor-A; IL-6, Interleukin-6; IL-8, Interleukin-8; M-CSF, Monozytenkoloniestimulierender Faktor; MCP-1, monozytenchemotaktisches Protein-1; IL-1ra, Interleukin-1-Rezeptor-Antagonisten Protein; TCP, tissue culture plastic; V-POL, polierte Ti6Al4V-Oberflächen; V-LIPSS, periodisch strukturierte Ti6Al4V-Oberflächen; Nb-POL, polierte Ti6Al4Nb-Oberflächen; Nb-LIPSS, periodisch strukturierte Ti6Al4Nb-Oberflächen.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die präklinische Testung von Ti6Al4V und Ti6Al4Nb Titanlegierungen mit polierten und periodisch strukturierten Oberflächen. Im ersten Schritt wurden die Oberflächen mittels Rasterelektronenmikroskopie charakterisiert. In einem zweiten Schritt wurde die Metallfreisetzung und -anreicherung im biomimetischen Milieu der verschiedenen Oberflächen quantifiziert und in einem dritten Schritt die in-vitro Biokompatibilität der Oberflächen, anhand relevanter Stoffwechsel- und Funktionalitätsparameter, mit humanen Osteoblasten und gingivalen Fibroblasten getestet. Zu den Parametern zählten die Visualisierung von zytotoxischen Effekten sowie die Quantifizierung der Zytotoxizität, der Viabilität, der Proliferationskapazität, der osteogenen Kapazität und der Freisetzung von löslichen Wachstumsfaktoren und Zytokinen im Zellkulturüberstand.

Die präklinische Testung der verschiedenen Ti6Al4V- und Ti6Al4Nb-Oberflächen wurde in dieser Arbeit erfolgreich und umfassend dargestellt. Anhand der Ergebnisse der Experimente auf den entsprechenden Oberflächen kann die Zellantwort und -funktionalität der humanen Osteoblasten und gingivalen Fibroblasten im Hinblick auf die Biokompatibilität und die Antiinfektionsfunktionalisierung eingeordnet und interpretiert werden.

Die umfangreichen Analysen zeigen, dass die periodische Strukturierung der Ti6Al4V- und Ti6Al4Nb-Oberflächen mittels Laserbearbeitung bei einer Wellenlänge von 355 nm erfolgreich war und zur Entstehung von *LIPSS* geführt hat. Die Politur über einen chemisch-induzierten Poliervorgang führte zu einer Oberfläche ohne Artefakte. Bonse et al. stellten in einer Übersichtsarbeit verschiedene Formen von *LIPSS* vor [72]. Die dort gezeigten Strukturen gleichen den Strukturen, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Schell et al. zeigten ebenfalls periodisch strukturierte Oberflächen, die bei einer Wellenlänge von 355 nm auf Titanoberflächen erzeugt wurden [73]. Diese periodischen Strukturen gleichen denen, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Die klar zu erkennenden Artefakte auf den laser-polierten Oberflächen verschwinden durch die Anwendung einer chemisch induzierten Politur. Aus diesem Grund wurden die Zellkulturexperimente mit den technisch einwandfreien polierten Oberflächen durchgeführt.

Durch die Oberflächenmodifikation wurde signifikant mehr Titan, Aluminium und Vanadium in die Kulturüberstände auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-

Oberflächen freigesetzt und signifikant weniger Titan und Niob in die Kulturüberstände auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen als auf den polierten Oberflächen. Dabei führte eine gesteigerte Metallfreisetzung in das biomimetische Milieu zu keiner erhöhten Aufnahme in die humanen Osteoblasten. Die Freisetzung von Metall wird untersucht, um einen Rückschluss auf das periimplantäre Entzündungsgeschehen zu ziehen [74]. Die Folge der Freisetzung von Titan aus Implantatoberflächen konnte nach Wachi et al. den Gewebeabbau und die Ausbildung einer Mucositis fördern [75]. Wilson et al. berichteten, dass in ihrer Arbeit in 94 % der Fälle Titanpartikel von Entzündungsgewebe umgeben war [76]. Fretwurst et al. untersuchten Gewebeproben von Patienten mit einer Periimplantitis [77]. In 75 % der Fälle wurden in dem Entzündungsgewebe Titanpartikel gefunden. Vor diesem Hintergrund ist die erhöhte Freisetzung von Titan der Ti6Al4V-Oberflächen kritisch zu betrachten. Die niedrigere Freisetzung von Titan von den periodisch strukturierten Oberflächen der Ti6Al4Nb-Oberflächen im Vergleich zu den polierten Oberflächen spricht für eine Möglichkeit, die Zahl periimplantärer / periprothetischer Entzündungen zu reduzieren. Darüber hinaus ist anzumerken, dass die Freisetzung von Aluminium und Vanadium aus den periodisch strukturierten Oberflächen der Ti6Al4V-Oberflächen im Vergleich zu den polierten Oberflächen ebenfalls signifikant höher war. Es gab immer mehr Hinweise auf die Neurotoxizität von Aluminium bei Menschen und Nagern [78]. In der Vergangenheit wurden neurologische Störungen bei Dialysepatienten mit hohen Al-Konzentrationen im Dialysat in Verbindung gebracht [79]. Diese Kausalität wurde mittlerweile widerlegt. Allerdings beeinträchtigt Aluminium den Mineralisationsprozess im Zuge des Knochenbaus [80, 81]. Willis et al. untersuchten die Legierung Ti6Al4V auf mögliche zytotoxische Effekte [82]. Die Studie kam zu dem Schluss, dass unter Last und Korrosion aus der Titanlegierung Vanadiumpartikel frei werden und dies einen zytotoxischen Effekt auslöst. Vanadium ist auch als Auslöser einer allergischen Reaktion Typ IV beschrieben [83]. Vor diesem Hintergrund ist der Legierung Ti6Al4Nb, als Material für Implantate, die einer kontinuierlichen Last ausgesetzt sind, der Vorzug zu gewähren [83].

Auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V- und Ti6Al4Nb-Oberflächen adhärten signifikant weniger Zellen. Die Proliferationsraten der humanen Osteoblasten zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den periodisch strukturierten und polierten Oberflächen. Dabei fällt an Tag 4 auf, dass die Verdopplungsrate einer Zellpopulation

auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen negativ war. Die verminderte Adhäsion der humanen Osteoblasten auf den periodisch strukturierten Oberflächen wird durch die Lebend- / Tot-Färbung bestätigt, die weniger vitalen Zellen, insbesondere auf den periodischen Oberflächenstrukturen der Titanlegierung Ti6Al4V zeigt. Cunha et al. untersuchten periodisch strukturierte Oberflächen der Legierung Ti6Al4V, die mit einer Wellenlänge von 1030 nm induziert wurden, und deren Einfluss auf die osteogene Kapazität von humanen mesenchymalen Stammzellen [84]. Die Ergebnisse zeigen ebenfalls eine verminderte Adhäsion auf den periodisch strukturierten Oberflächen. Kumari et al. beobachteten in ihrer Untersuchung ebenfalls eine niedrige Zelldichte von Maus-Osteoblasten (Zelllinie: MC3T3) auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen, die mit einer Wellenlänge von 193 nm induziert wurden [85]. Durch das verminderte Adhäsionsvermögen der humanen Osteoblasten auf den periodisch strukturierten Oberflächen wird die Bildung von Ersatzknochenmaterial in-vivo langsamer ablaufen, da sich aus den wenigen Zellen zunächst ein organisierter Zellverband mittels Proliferation formen muss. Dies führt zu einer langsameren Integration der Implantatoberfläche.

Insbesondere die gingivalen Fibroblasten adhärten auf den periodisch strukturierten Oberflächen signifikant schlechter. Kunzler et al. bestätigten dies mit ihrer Arbeit [86]. In dieser Studie wurde der Einfluss der Oberflächenrauheit auf die Zellantwort von Ratten-Osteoblasten und humanen gingivalen Fibroblasten untersucht. Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass Zellen mit fibroblastischem Charakter besser auf glatten Oberflächen und Osteoblasten besser auf rauen Oberflächen adhärten. Papa et al. kamen zu einem widersprüchlichen Ergebnis [87]. Sie untersuchten ebenfalls den Einfluss von periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen auf gingivale Fibroblasten. Die Ergebnisse zeigen, dass bei Periodizitäten von 1053 nm die Adhäsion der Fibroblasten verbessert ist. Hadzik et al. testeten Reintitan-(cp-Titan) Implantatoberflächen, die in fünf verschiedenen Oberflächenmodifikationen vorlagen [88]. Zwei Oberflächen wurden mit grobkörnigem Sand abgestrahlt und im Anschluss säuregeätzt (*Sand-blasted, Large-grit, Acid-etched* (SLA)-Technik). Drei Oberflächen wurden mit periodisch strukturierten Oberflächen der Kategorie *LSFL LIPSS* versehen. Zwei der drei periodisch strukturierten Oberflächen wurden mit Hydroxylapatit beschichtet. Zur Untersuchung der Zytotoxizität und dem Adhäsionsverhalten wurden humane dermale Fibroblasten verwendet. Die Untersuchung konnte zeigen, dass die Fibroblasten auf den zwei periodisch

strukturierten Oberflächen, die mit Hydroxylapatit beschichtet wurden, am besten adhärten und stärker proliferierten als auf den SLA-Oberflächen. Ein Grund dafür ist der osteokonduktive Effekt von Hydroxylapatit [89]. Allerdings wurden in dieser Arbeit keine polierten Titan Oberflächen als Referenz getestet. Die wenig adhärten Fibroblasten auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V- und Ti6Al4Nb-Oberflächen proliferierten signifikant stärker als auf den polierten Oberflächen. Zu der gleichen Schlussfolgerung kamen auch Hadzik et al. in der oben aufgeführten Arbeit [88]. Gnilitzkyi et al. untersuchten die Zell- und Gewebeanantwort von humanen dermalen Fibroblasten auf periodisch strukturierte Ti6Al4V- und Zirkon-Oberflächen, die mit einer Wellenlänge von 1030 nm mittels Femtosekunden Laser induziert wurden [90]. Die Autoren schlussfolgern, dass dermale Fibroblasten auf periodisch strukturierten Oberflächen ein verbessertes Adhäsionspotenzial, eine erhöhte Proliferationsrate und eine erhöhte Viabilität haben. Die Dicke der Oxidationsschicht auf der periodisch strukturierten Oberfläche und deren gleichmäßige Struktur wird als Grund für die erhöhte Proliferation angegeben. Der wesentliche Unterschied zwischen den Ergebnissen von Gnilitzkyi et al. und dieser Arbeit ist die Periodizität der Oberflächen. Cunha et al. untersuchten periodisch strukturierte Oberflächen, erzeugt im Wellenlängenbereich von 1030 nm, und ihren Einfluss auf humane mesenchymale Stammzellen [91]. Die erzeugten periodisch strukturierten Oberflächen führten zu einer Zunahme der Proliferation der Zellen. Darauf deutet auch die Analyse des Sekretionsprofil von matrixmodulativen Faktoren im Zellkulturüberstand der gingivalen Fibroblasten hin. Die gingivalen Fibroblasten auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V- und Ti6Al4Nb-Oberflächen sekretierten signifikant mehr Wachstumsfaktor Osteoprotegerin als auf den polierten Oberflächen. Osteoprotegerin besitzt die Eigenschaft als Decoy-Rezeptor die durch den Tumornekrosefaktor-verwandten Apoptose-induzierenden Ligand (TRAIL) vermittelte Apoptose zu unterdrücken [92]. Eine höhere Konzentration von Osteoprotegerin auf den periodisch strukturierten Oberflächen bedeutet weniger Apoptose der gingivalen Fibroblasten. Diese Tatsache passt zu den Proliferations-Ergebnissen der gingivalen Fibroblasten, die auf den periodisch strukturierten Oberflächen signifikant stärker proliferierten als auf den polierten Oberflächen. Auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen sekretierten die gingivalen Fibroblasten zusätzlich signifikant mehr Wachstumsfaktoren (Hepatozyten-Wachstumsfaktor, VEGF-A) und antiinflammatorische Zytokine (IL-1ra). Der Hepatozyten-Wachstumsfaktor ist ein

multifunktionales Mitogen, Motogen und Morphogen [93]. Hohe Konzentrationen in der Mundhöhle wirken chemotaktisch auf gingivale Epithelzellen [94]. VEGF-A fördert die Angiogenese im Zuge der Wundheilung [95]. Die Angiogenese ist ein wichtiger Bestandteil bei der Integration der Oberfläche. IL-1ra bindet an den Interleukin-1 (IL-1) Rezeptor ohne eine intrazelluläre Antwort zu generieren [96]. Durch die Blockierung des IL-1 Rezeptors wirkt IL-1ra in einem Kontext mit Immunzellen antiinflammatorisch. Vor diesem Hintergrund deuten die höheren Konzentrationen von IL-1ra auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen auf einen antiinflammatorischen Effekt hin. Gegen den proliferativen Effekt spricht die signifikant niedrigere Konzentration von TIMP-2 auf den periodisch strukturierten Oberflächen. TIMP-2 inhibiert die Metalloproteinasen und sorgt im gesunden Gewebe für eine Homöostase zwischen Gewebedegradation und Gewebeaufbau [97]. Die niedrige Konzentration auf den periodisch strukturierten Oberflächen spricht daher für ein Ungleichgewicht, dass in Richtung der Gewebedegradation verschoben ist. Der proliferative Effekt ist auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen weniger stark ausgeprägt, da dort signifikant weniger Hepatozyten-Wachstumsfaktor und SCF sekretiert wurde. SCF wirkt proliferativ und schützt über den c-kit-Pfad die Zellen vor oxidativem Stress [98]. Neben dem proliferativen Effekt deutet die Analyse des Sekretionsprofils der gingivalen Fibroblasten auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen auf einen inflammatorischen Effekt hin. Das kann durch die signifikant höheren Konzentrationen von IL-8 und MCP-1 begründet werden. Als klassisches inflammatorisches Zytokin begünstigt IL-8 über die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten die Ausbreitung des Entzündungsgeschehens [99]. MCP-1 sorgt für die Anreicherung von Monozyten und Makrophagen, die ebenfalls das Entzündungsgeschehen begünstigen [100]. Der inflammatorische Effekt zeigt sich auf den Ti6Al4Nb-Oberflächen nicht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Adhäsionsvermögen von humanen Osteoblasten und gingivalen Fibroblasten durch die periodische Strukturierung im UV-Bereich negativ beeinträchtigt wird. Andere Arbeiten konnten zeigen, dass in größeren Wellenlängenbereichen des Pikosekundenlasers, mit dem die periodisch strukturierten Oberflächen induziert wurden, bessere Adhäsionsergebnisse erzeugt werden konnten [84, 90]. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass mit einer größeren Unebenheit der Oberflächen auch das Potenzial für mikrobielle Besiedelung steigt [101, 102]. Die Proliferation der gingivalen Fibroblasten wurde positiv durch die

periodische Oberflächenstrukturierung beeinflusst. Das bestätigen die Populationsverdopplungen und die Konzentration der Wachstumsfaktoren auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V- und Ti6Al4Nb-Oberflächen. Die höhere Konzentration von inflammatorischen Zytokinen auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen deutet auf eine inflammatorische Antwort hin. Auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen zeigt die Analyse des Sekretionsprofils keine signifikant erhöhten Konzentrationen von inflammatorischen Zytokinen.

Die Zellviabilität gibt an, wie hoch der Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtpopulation ist. Je höher die Zellviabilität ist, desto schneller kann der Zellverband auf die körperfremde Oberfläche reagieren und so die Integration der Oberfläche in das umliegende Gewebe beginnen. Die Viabilität der humanen Osteoblasten wurde durch die periodische Oberflächenstrukturierung nicht beeinflusst, da keine signifikanten Unterschiede zwischen periodisch strukturierten und polierten Oberflächen auftreten. Durch die unbekannte Zellzahl kann argumentiert werden, dass die metabolische Aktivität ein Effekt von wenig adhären Zellen war. Allerdings zeigt die quantifizierte metabolische Aktivität in Relation zur Zellzahl an Tag 4 und Tag 7 ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen periodisch strukturierten und polierten Oberflächen. Aus der oben angesprochenen Lebend- / Tot-Färbung geht hervor, dass auf den periodisch strukturierten Oberflächen nach 24 Stunden weniger Zellen adhären. Im weiteren Verlauf war jedoch anhand der Quantifizierung der LDH-Freisetzung kein signifikant erhöhter Untergang der adhären Zellen festzustellen. Das Ergebnis wird gestützt durch die REM-Bilder der Zellmorphologie. Die Aufnahmen von den periodisch strukturierten Ti6Al4V- und Ti6Al4Nb-Oberflächen zeigen Osteoblasten, die ihre zellspezifischen Merkmale ausbildeten und nach 14 Tagen Kulturzeit als organisierter Zellverband vorlagen. Kumari et al., die den Einfluss von der periodisch strukturierten Titanlegierung Ti6Al4V mit Osteoblasten von der Maus (Zelllinie: MC3T3-E1) untersuchten, bestätigten die Beobachtung, dass die Viabilität von humanen Osteoblasten nicht durch die periodische Oberflächenstrukturierung beeinflusst wird [85]. Höhere Werte der metabolischen Aktivität auf den Oberflächen der Titanlegierung Ti6Al4Nb im Vergleich zu den Oberflächen der Titanlegierung Ti6Al4V stützen die Tatsache, dass die Biokompatibilität der Titanlegierung Ti6Al4Nb besser ist. Die bessere Biokompatibilität von Titanlegierungen, die Vanadium durch Niob ersetzen, ist belegt [82, 103].

Die Viabilität der gingivalen Fibroblasten scheint im Vergleich zu den polierten Oberflächen negativ durch die periodische Oberflächenstrukturierung beeinflusst zu werden. Das kann begründet werden durch signifikant niedrigere Werte der metabolischen Aktivität der gingivalen Fibroblasten, die auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen an Tag 0, Tag 4 und Tag 14 kultiviert wurden. Die metabolische Aktivität, normalisiert über der bekannten Zellzahl, widerlegt dies. Die metabolische Aktivität der, auf den periodisch strukturierten Oberflächen kultivierten, gingivalen Fibroblasten war an Tag 0 und Tag 7 in Relation zur Zellzahl signifikant höher als auf den polierten Oberflächen. Aus diesem Grund war die metabolische Aktivität der ersten Messung ein Effekt von wenig adhärennten Zellen. Die verbesserte Viabilität der gingivalen Fibroblasten wird durch die Arbeiten von Hadzik et al., Gnilitzkyi et al., Marques et al. und Chikarakara et al. bestätigt [88, 90, 104, 105]. Alle kamen zu dem Schluss, dass die Viabilität durch die periodische Oberflächenstrukturierung verbessert wird. Aus der Quantifizierung der LDH-Freisetzung geht hervor, dass die gingivalen Fibroblasten auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen zu einem Messpunkt signifikant weniger LDH freisetzen. Damit reagieren die Fibroblasten sensibel auf die Titanlegierung Ti6Al4V. Der Nutzen von Vanadium als Bestandteil von Implantaten wird immer wieder kontrovers diskutiert, da es neurotoxisch ist [106]. In ihrer Arbeit untersuchten Costa et al. die Zytotoxizität von Vanadium in Abhängigkeit von der Konzentration im Kulturmedium [107]. Dabei wurde die Zytotoxizität von Vanadium-Ionen, die sich aus der Legierung Ti6Al4V herausgelöst haben, evaluiert und es konnte bestätigt werden, dass Konzentrationen von 2,3 μM in dem Kulturmedium ausreichen, um die Viabilität von Fibroblasten einzuschränken. Durch die Fluoreszenz-Bilder nach 14 Tagen Kulturzeit wird bestätigt, dass die gingivalen Fibroblasten sensibel auf die Legierung Ti6Al4V reagieren, da auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen kein organisierter Zellverband vorhanden war. Das Sekretionsprofil der gingivalen Fibroblasten auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen zeigte eine signifikant höhere Konzentration von inflammatorischen Zytokinen (IL-8 und MCP-1). Das passt zu den Fluoreszenz-Bildern, da auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen kein organisierter Zellverband vorlag. Trotz sorgfältiger Experimentdurchführung und Herausstellung der Hintergrund-LDH-Aktivität, ist zu berücksichtigen, dass das in der Zellkultur verwendete FCS einen hohen LDH-Hintergrund erzeugt und daher bei langen Kulturzeiten die Messergebnisse beeinflusst

werden können [108]. Aus den genannten Gründen sollten die Ergebnisse der Quantifizierung der LDH-Freisetzung mit einer, in diesem Kontext, robusteren Methode verifiziert werden. Auf den polierten Ti6Al4V- und Ti6Al4Nb-Oberflächen migrierten die gingivalen Fibroblasten entlang der Oberflächenstruktur. Das zeigen die REM- und Fluoreszenz-Bilder der Zellmorphologie nach 14 Tagen. Kumari et al. machten dieselbe Beobachtung [85]. Auch Chandra et al. konnten zeigen, dass Fibroblasten auf Poly(ethylenterephthalat)-Folien, die mittels UV-Strahlung texturiert wurden, entlang der erzeugten Strukturen migrierten [109]. Der beschriebene Effekt war in dieser Arbeit nur auf den polierten Oberflächen zu beobachten. Um zu untersuchen, ob die Zellen auch auf den periodisch strukturierten Oberflächen entlang der Periodizitäten migrieren, muss die Bildgebung zu einem früheren Zeitpunkt erfolgen, da nach 14 Tagen einige Zellpopulationen schon untergegangen waren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Viabilität der adhären humanen Osteoblasten nicht durch die periodische Oberflächenstrukturierung beeinflusst wurde. Die Viabilität der adhären gingivalen Fibroblasten war auf den periodisch strukturierten Oberflächen verbessert. Wird die Viabilität der Zellen durch die periodische Oberflächenstrukturierung nicht signifikant beeinträchtigt (im Falle der humanen Osteoblasten) oder verbessert sich (im Falle der gingivalen Fibroblasten), kann der organisierte Zellverband sich bilden und die Integration der Oberfläche beginnen. Im besonderen Falle des enossalen dentalen Implantates bedeutet eine schnelle Organisation der gingivalen Wunde, eine schnellere Integration und Abschirmung gegenüber oralen Bakterien, die eine potenzielle Entzündung auslösen könnten.

Das osteogene Potenzial der adhären humanen Osteoblasten war auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V- und Ti6Al4Nb-Oberflächen signifikant höher als auf den polierten Oberflächen. Ein hohes osteogenes Potenzial ist gleichzusetzen mit einem osteoinduktiven Effekt der periodisch strukturierten Oberflächen. Dies wird unterstützt durch die REM-Bilder. Die humanen Osteoblasten bildeten auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V- und Ti6Al4Nb-Oberflächen ein typisches organisiertes Netzwerk von Zellen. Daraus lässt sich ableiten, dass auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V- und Ti6Al4Nb-Oberflächen, auch bei einem geringeren Adhäsionsvermögen, die humanen Osteoblasten in der Lage sind, osteogene Extrazellulärmatrix aufzubauen. Vor dem Hintergrund der Integration der Implantatoberfläche ist dies ein osteoinduktiver Effekt, durch den die Zellen schneller

reifen und die Funktion von adulten Osteoblasten aufnehmen können. Cunha et al. kamen zu dem Schluss, dass durch die periodische Strukturierung das osteogene Potenzial verbessert wird [84]. Maalouf et al. untersuchten den Einfluss von zwei unterschiedlich ausgerichteten periodischen Ti6Al4V-Oberflächenstrukturen auf humane mesenchymale Stammzellen [110]. Die Oberflächenstrukturen wurden bei einer Wellenlänge von 1030 nm erzeugt und wurden jeweils in eine lineare und radiale Richtung ausgerichtet. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass sowohl auf den linear als auch auf den radial erzeugten periodischen Oberflächenstrukturen die Marker für Mineralisation ALP, Osteopontin und Osteocalcin erhöht waren. Dabei war die Konzentration auf den radialen periodisch strukturierten Oberflächen höher als auf den linearen periodisch strukturierten Oberflächen. Die Autoren schlussfolgern, dass die Osteoinduktivität maßgeblich von der Anordnung der Periodizitäten beeinflusst wird und die gezielte Anordnung heterogener / nicht-linearer Oberflächenstrukturen den besten osteoinduktiven Effekt hat [111]. Die Analyse des Sekretionsprofils der humanen Osteoblasten von matrixmodulativen Faktoren auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V und Ti6Al4Nb-Oberflächen im biomimetischen und osteogenen Kulturüberstand wies allerdings auf ein vermindertes osteoinduktives Profil hin. Dies kann dadurch begründet werden, dass die humanen Osteoblasten, die auf den periodisch strukturierten Oberflächen kultiviert wurden, im biomimetischen Milieu signifikant weniger TIMP-2 und Osteoprotegerin und im osteogenen Milieu signifikant weniger Osteoprotegerin, Hepatozyten-Wachstumsfaktor und VEGF-A als auf den polierten Oberflächen sekretierten. TIMP-2 inhibiert die Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen und wirkt damit osteoinduktiv [112]. Osteoprotegerin wirkt als Decoy-Rezeptor für RANKL. Über diesen Weg wird eine Bindung von RANKL und RANK verhindert und damit die Differenzierung von Osteoklasten unterdrückt. Dieser Effekt wirkt osteoinduktiv. Der Hepatozyten-Wachstumsfaktor stimuliert nachweislich die Osteoblastenproliferation und nimmt am Knochenumbau teil, indem über den PI3K-Signalweg die Bildung von Osteopontin gefördert wird [113, 114]. VEGF-A fördert die Angiogenese im Zuge der Wundheilung und de novo Knochenbildung [95]. Auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen im osteogenen Milieu wurde zusätzlich weniger SCF von den humanen Osteoblasten sekretiert. SCF schützt über den c-Kit-Pfad die Osteoblasten vor oxidativem Stress [115]. Niedrigere Konzentrationen dieses Faktors im osteogenen Milieu auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen zeigen an, dass humane Osteoblasten dort schlechter gegen oxidativen Stress

geschützt sind als auf den polierten Oberflächen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Vaskularisierung und der Aufbau der de novo Knochensubstanz zur Integration der Implantatoberfläche weniger unterstützt wird. Das Sekretionsprofil der humanen Osteoblasten von immunmodulativen Faktoren auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V- und Ti6Al4Nb-Oberflächen im biomimetischen und osteogenen Milieu zeigte eine ausgeglichene inflammatorische / antiinflammatorische Antwort. Auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen wurde von den humanen Osteoblasten im biomimetischen Milieu mehr IL-1ra und auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen mehr MCP-1 im Vergleich zu den jeweiligen polierten Oberflächen sekretiert. Im osteogenen Milieu war dieser Effekt auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen genau umgekehrt. Wie oben besprochen besitzt IL-1ra durch die Blockade des IL-1 Rezeptors eine antiinflammatorische Eigenschaft [96]. Mehr Freisetzung von IL-1ra auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen weist auf eine dämpfende Modulation der Immunreaktion hin, wohingegen bei einer niedrigeren Konzentration auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen im osteogenen Milieu diese Wirkung weniger stark ausgeprägt ist. MCP-1 wirkt als chemoattraktives Zytokin selektiv rekrutierend auf Monozyten, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten. Es ist das wichtigste Chemokin, das die Migration von Monozyten / Makrophagen aus dem Blutstrom in das Interstitium reguliert [100]. Monozyten fördern indirekt die Proliferation von Osteoblasten [116]. Eine höhere Konzentration von MCP-1 im biomimetischen Milieu auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen deutet auf eine höhere Anzahl von Monozyten und damit einhergehend auch auf eine höhere Anzahl von Osteoblasten hin. Im osteogenen Milieu migrieren weniger Monozyten und Makrophagen und damit wird die inflammatorische Antwort weniger gefördert. IL-6 wird bei Gewebeerletzungen gebildet und trägt durch die Stimulierung von Akut-Phase-Reaktionen zur Hämatopoese und Immunreaktion bei [117]. Eine geringere Konzentration auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen spricht für einen antiinflammatorischen Effekt. IL-8 ist bekannt dafür, neutrophile Granulozyten zu akkumulieren und zu aktivieren [99]. Da signifikant mehr IL-8 von den humanen Osteoblasten auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen sekretiert wurde als auf den polierten Oberflächen, spricht dieser Effekt für eine inflammatorische Eigenschaft der periodisch strukturierten Oberflächen.

Durch diese Ausführungen wird klar, dass die Frage, ob die periodisch strukturierten Oberflächen einen inflammatorischen oder antiinflammatorischen Effekt haben, nicht

einfach zu beantworten ist. In diesem Fall kann man von einer ausgeglichenen immunmodulativen Antwort sprechen. Es bleibt zu beachten, dass die Ergebnisse nur die Wachstumsfaktoren und Zytokine zu einem bestimmten Messpunkt zeigen und die Wachstumsfaktoren und Zytokine im osteogenen Medium vor unbekannter Zellzahl bestimmt wurden. Aus diesem Grund muss, um den Zusammenhang zwischen Osteogenese und Sekretionsprofil von matrix- und immunmodulativen Faktoren zu präzisieren, die Konzentration dieser Faktoren in einem nächsten Schritt über der Zellzahl normiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass von den periodisch strukturierten Oberflächen ein osteoinduktiver Effekt ausgeht. Aus der Analyse der Wachstumsfaktoren und Zytokine leitet sich eine ausgewogene immunmodulative Antwort ab.

4.2. Fazit und Ausblick

Durch diese Arbeit konnte die Wissenslücke um die Metallfreisetzung von periodisch strukturierten Oberflächen und die Auswirkung auf relevante Zellen mit weiteren Ergebnissen gefüllt werden. Die verminderte Freisetzung von Titan und Niob der Ti6Al4Nb Titanlegierung von den periodisch strukturierten Oberflächen ist ein vielversprechendes Ergebnis im Hinblick auf die lokale und systemische Metallfreisetzung und muss in weiterführenden Modellen, die zum Beispiel den dreidimensionalen Raum einschließen und das Verhalten unter Last überprüfen, weiterverfolgt werden.

Die Viabilität von humanen Osteoblasten wurde von den periodisch strukturierten Oberflächen nicht beeinträchtigt und die Viabilität der gingivalen Fibroblasten war sogar verbessert. Im Hinblick auf den Integrationsprozess der Implantatoberfläche sind die Ergebnisse der Viabilität der Primärzellen ein vielversprechendes Ergebnis.

Es hat sich gezeigt, dass die periodisch strukturierten Oberflächen die Adhäsion der humanen Osteoblasten und gingivalen Fibroblasten beeinträchtigen. In der initialen Knochenbildung durch Osteoblasten, die geprägt ist durch Proliferation und Kondensation, erschwert die periodisch strukturierte Oberfläche die Integration der Implantatoberfläche. Einige Studien konnten mit Fibroblasten verbesserte Adhäsionsergebnisse mit radial ausgerichteten Periodizitäten im Bereich von 1030 nm zeigen. Das muss mit humanen Osteoblasten im Hinblick auf Adhäsions- und Proliferationsverhalten verifiziert werden.

Des Weiteren hat sich gezeigt, dass die Bildung von osteogener Matrix durch die periodisch strukturierten Oberflächen verbessert und beschleunigt wird. Allerdings spiegelt sich dieser Effekt nicht eindeutig im Sekretionsprofil von Wachstumsfaktoren und Zytokinen wider. Um diesen Zusammenhang zu präzisieren, muss eine Bestimmung der Wachstumsfaktoren und Zytokine im osteogenen Milieu in Relation zur Zellzahl erfolgen. Weiterführend ist es interessant zu untersuchen, wie sich die periodisch strukturierten Oberflächen auf die Immunreaktion auswirken und ob das verbesserte osteogene Potenzial die verminderte Adhäsion ausgleicht und damit die Integration der Oberfläche beschleunigt. Für die formulierten offenen Fragen eignet sich zur Präzisierung ein Tiermodell.

Die präklinische in vitro Bewertung der periodisch strukturierten Titanlegierungen zur Antiinfektionsfunktionalisierung zeigt, dass Ti6Al4Nb-Oberflächen, auf denen periodische Strukturen erzeugt wurden, eine bessere Biokompatibilität als periodisch

strukturierte Ti6Al4V-Oberflächen aufweisen. Aus den Ergebnissen der humanen Osteoblasten kann das durch eine geringere Metallfreisetzung im Vergleich zur polierten Oberfläche, eine unveränderte Viabilität und Zytotoxizität sowie ein besseres osteogenes Potenzial, zelluläre Funktionalität und ein ausgeglichenes immunmodulatives Sekretionsprofil abgeleitet werden. Aus den Ergebnissen der gingivalen Fibroblasten kann die bessere Biokompatibilität der periodischen Strukturierung zusätzlich durch eine erhöhte Viabilität und ein besseres Proliferationsverhalten begründet werden.

Ziel des nächsten Schrittes muss es sein, zu überprüfen, ob die verbesserte Matrixbildung die verminderte Adhäsion kompensieren kann, die Adhäsion von relevanten Zellen auf den periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen zu verbessern, die Funktionalität im Hinblick auf matrix- und immunmodulative Prozesse zu präzisieren und die Applikation der periodischen Oberflächenstrukturen auf 3D-Oberflächen zu ermöglichen.

Gelingt der Translationsprozess, profitieren der Patient und der klinische Anwender von sicheren Implantaten und Endoprothesen mit einer längeren Standzeit.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die periodische Oberflächenstrukturierung von Ti6Al4V und Ti6Al4Nb-Oberflächen mittels UV-Strahlung, die präklinische Charakterisierung dieser hinsichtlich der Freisetzung von Metallionen und der Funktionalität humaner Osteoblasten und gingivaler Fibroblasten im Vergleich zu polierten Standardoberflächen.

Die Topografie der Oberflächen wurde mittels REM charakterisiert. Die Freisetzung von Metallionen wurde mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma quantifiziert. Zur Untersuchung der Biokompatibilität wurden das Adhäsionsvermögen, die metabolische Aktivität, die Proliferationskapazität, die Zytotoxizität, die Aktivität der ALP und Wachstumsfaktoren und Zytokine in Zellkulturüberständen quantifiziert.

Nach Kultivierung der humanen Osteoblasten wurde signifikant mehr Ti, Al und V von periodisch strukturierten Ti6Al4V-Oberflächen und signifikant weniger Ti und Nb von periodisch strukturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen freigesetzt. Auf periodisch strukturierten Ti6Al4V- und Ti6Al4Nb-Oberflächen adhärten beide Zellarten signifikant schlechter. Die adhärten Fibroblasten proliferierten dabei signifikant schneller und zeigten eine bessere Viabilität auf den periodisch strukturierten Ti6Al4V- und Ti6Al4Nb-Oberflächen. Die Osteoblasten auf periodisch strukturierten Oberflächen wiesen nach osteogenen Stimulus eine signifikant höhere ALP-Aktivität auf. Das Sekretionsprofil von Wachstumsfaktoren und Zytokinen der humanen Osteoblasten und gingivalen Fibroblasten deutet auf einen ausgeglichenen immunmodulativen Effekt hin.

Die Ergebnisse der texturierten Ti6Al4Nb-Oberflächen zeigen eine bessere Biokompatibilität auf. Das kann durch weniger Metallfreisetzung im Vergleich zur polierten Oberfläche, unveränderte zelluläre Viabilität (humane Osteoblasten) und verbesserte Viabilität (gingivale Fibroblasten), verbesserter Proliferationskapazität (gingivale Fibroblasten) und ein ausgeglichenes immunmodulatives Sekretionsprofil begründet werden.

Damit die verbesserte Osteogenese in der Klinik genutzt werden kann, muss in einem nächsten Schritt überprüft werden, ob die verbesserte Matrixbildung die verminderte Adhäsion der Zellen kompensiert und die Applikation der periodischen Oberflächenstrukturen auf 3D-Oberflächen ermöglicht werden. Hierfür ist eine Testung der Ti6Al4Nb Titanlegierung am Tiermodell denkbar.

6. Literaturverzeichnis

1. Wang, J.L., et al., *Biodegradable Magnesium-Based Implants in Orthopedics-A General Review and Perspectives*. Adv Sci (Weinh), 2020. **7**(8): p. 1902443.
2. Accioni, F., et al., *Latest Trends in Surface Modification for Dental Implantology: Innovative Developments and Analytical Applications*. Pharmaceutics, 2022. **14**(2).
3. Ferguson, R.J., et al., *Hip replacement*. Lancet, 2018. **392**(10158): p. 1662-1671.
4. Pandya, J., T. Johnson, and A.K. Low, *Shoulder replacement for osteoarthritis: A review of surgical management*. Maturitas, 2018. **108**: p. 71-76.
5. Carr, A.J., et al., *Knee replacement*. Lancet, 2012. **379**(9823): p. 1331-40.
6. Zilber, S., *Shoulder Arthroplasty: Historical Considerations*. Open Orthop J, 2017. **11**: p. 1100-1107.
7. Learmonth, I.D., C. Young, and C. Rorabeck, *The operation of the century: total hip replacement*. Lancet, 2007. **370**(9597): p. 1508-19.
8. Ranawat, C.S., *History of total knee replacement*. J South Orthop Assoc, 2002. **11**(4): p. 218-26.
9. Evans, J.T., et al., *How long does a hip replacement last? A systematic review and meta-analysis of case series and national registry reports with more than 15 years of follow-up*. Lancet, 2019. **393**(10172): p. 647-654.
10. Guo, L.Y., et al., *On the design evolution of hip implants: A review*. Materials & Design, 2022. **216**.
11. Gaviria, L., et al., *Current trends in dental implants*. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg, 2014. **40**(2): p. 50-60.
12. Marin, E., F. Boschetto, and G. Pezzotti, *Biomaterials and biocompatibility: An historical overview*. J Biomed Mater Res A, 2020. **108**(8): p. 1617-1633.
13. Shah, F.A., et al., *Commercially pure titanium (cp-Ti) versus titanium alloy (Ti6Al4V) materials as bone anchored implants - Is one truly better than the other?* Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016. **62**: p. 960-6.
14. Trueba, P., et al., *Fabrication and characterization of superficially modified porous dental implants*. Surface and Coatings Technology, 2021. **408**: p. 126796.
15. Assem, F.L. and A. Oskarsson, *Chapter 60 - Vanadium*, in *Handbook on the Toxicology of Metals (Fourth Edition)*, G.F. Nordberg, B.A. Fowler, and M. Nordberg, Editors. 2015, Academic Press: San Diego. p. 1347-1367.
16. Sjögren, B., et al., *Chapter 26 - Aluminum*, in *Handbook on the Toxicology of Metals (Fourth Edition)*, G.F. Nordberg, B.A. Fowler, and M. Nordberg, Editors. 2015, Academic Press: San Diego. p. 549-564.
17. Kaur, S., K. Ghadirinejad, and R.H. Oskouei, *An Overview on the Tribological Performance of Titanium Alloys with Surface Modifications for Biomedical Applications*. Lubricants, 2019. **7**(8).
18. Kirmanidou, Y., et al., *New Ti-Alloys and Surface Modifications to Improve the Mechanical Properties and the Biological Response to Orthopedic and Dental Implants: A Review*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 2908570.
19. Chouirfa, H., et al., *Review of titanium surface modification techniques and coatings for antibacterial applications*. Acta Biomater, 2019. **83**: p. 37-54.
20. Anderson, J.M., A. Rodriguez, and D.T. Chang, *Foreign body reaction to biomaterials*. Semin Immunol, 2008. **20**(2): p. 86-100.

21. Klopffleisch, R. and F. Jung, *The pathology of the foreign body reaction against biomaterials*. J Biomed Mater Res A, 2017. **105**(3): p. 927-940.
22. MacDonald, D.E., et al., *Surface analysis of human plasma fibronectin adsorbed to commercially pure titanium materials*. J Biomed Mater Res, 1998. **41**(1): p. 120-30.
23. Szott, L.M. and T.A. Horbett, *Protein interactions with surfaces: cellular responses, complement activation, and newer methods*. Curr Opin Chem Biol, 2011. **15**(5): p. 677-82.
24. Mayer, A., et al., *Pro-angiogenic CD14(++) CD16(+) CD163(+) monocytes accelerate the in vitro endothelialization of soft hydrophobic poly (n-butyl acrylate) networks*. Acta Biomater, 2012. **8**(12): p. 4253-9.
25. OECD and E. Union, *Health at a glance: Europe 2018 state of health in the EU cycle*. 2018: OECD.
26. OECD and E. Union, *Health at a Glance: Europe 2022*. 2022.
27. Saghiri, M.A., et al., *Current technology for identifying dental implants: a narrative review*. Bulletin of the National Research Centre, 2021. **45**(1): p. 1-11.
28. Dreyer, H., et al., *Epidemiology and risk factors of peri-implantitis: A systematic review*. J Periodontal Res, 2018. **53**(5): p. 657-681.
29. Kuiper, J.W., et al., *Treatment of acute periprosthetic infections with prosthesis retention: Review of current concepts*. World J Orthop, 2014. **5**(5): p. 667-76.
30. Schwarz, F., et al., *Peri-implantitis*. J Periodontol, 2018. **89** Suppl 1: p. S267-S290.
31. Fuchigami, K., et al., *A diversity of peri-implant mucosal thickness by site*. Clin Oral Implants Res, 2017. **28**(2): p. 171-176.
32. Tande, A.J. and R. Patel, *Prosthetic joint infection*. Clin Microbiol Rev, 2014. **27**(2): p. 302-45.
33. Oussedik, S., et al., *Defining peri-prosthetic infection: do we have a workable gold standard?* J Bone Joint Surg Br, 2012. **94**(11): p. 1455-6.
34. Ben-Shlomo, Y., et al., in *The National Joint Registry 19th Annual Report 2022*. 2022: London.
35. Grimberg, A., et al., *German Arthroplasty Registry (Endoprothesenregister Deutschland - EPRD) - Annual Report 2022*. 2023.
36. Dierens, M., et al., *Long-term follow-up of turned single implants placed in periodontally healthy patients after 16-22 years: radiographic and peri-implant outcome*. Clin Oral Implants Res, 2012. **23**(2): p. 197-204.
37. Diaz, P., et al., *What is the prevalence of peri-implantitis? A systematic review and meta-analysis*. BMC Oral Health, 2022. **22**(1): p. 449.
38. Ulrich, S.D., et al., *Total hip arthroplasties: what are the reasons for revision?* Int Orthop, 2008. **32**(5): p. 597-604.
39. Feng, X., J. Gu, and Y. Zhou, *Primary total hip arthroplasty failure: aseptic loosening remains the most common cause of revision*. Am J Transl Res, 2022. **14**(10): p. 7080-7089.
40. Saleh, K.J., I. Thongtrangan, and E.M. Schwarz, *Osteolysis: medical and surgical approaches*. Clin Orthop Relat Res, 2004(427): p. 138-47.
41. Mbalaviele, G., et al., *Inflammatory osteolysis: a conspiracy against bone*. J Clin Invest, 2017. **127**(6): p. 2030-2039.
42. Bonse, J., *Quo Vadis LIPSS?-Recent and Future Trends on Laser-Induced Periodic Surface Structures*. Nanomaterials (Basel), 2020. **10**(10).
43. Bonse, J., et al., *Laser-Induced Periodic Surface Structures-A Scientific Evergreen*. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, 2017. **23**(3).

44. Schweitzer, L., et al., *Preclinical In Vitro Assessment of Submicron-Scale Laser Surface Texturing on Ti6Al4V*. Materials (Basel), 2020. **13**(23).
45. Shivakoti, I., et al., *Laser surface texturing for biomedical applications: A review*. Coatings, 2021. **11**(2): p. 124.
46. Luo, X., et al., *Biocompatible nano-ripples structured surfaces induced by femtosecond laser to rebel bacterial colonization and biofilm formation*. Optics & Laser Technology, 2020. **124**: p. 105973.
47. Nanduru, V.S.P.S., et al., *Laser surface texturing inhibits biofilm formation*. Materials Chemistry and Physics, 2021. **271**: p. 124909.
48. Uhlmann, E., et al., *The effects of laser microtexturing of biomedical grade 5 Ti-6Al-4V dental implants (abutment) on biofilm formation*. Procedia CIRP, 2018. **68**: p. 184-189.
49. Raimbault, O., et al., *The effects of femtosecond laser-textured Ti-6Al-4V on wettability and cell response*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016. **69**: p. 311-20.
50. Orazi, L., et al. *Osteoblast cell response to LIPSS-modified Ti-implants*. in *Key Engineering Materials*. 2019. Trans Tech Publ.
51. Mirhosseini, N., et al., *Laser surface micro-texturing of Ti-6Al-4V substrates for improved cell integration*. Applied Surface Science, 2007. **253**(19): p. 7738-7743.
52. Davies, J.E., *Understanding peri-implant endosseous healing*. J Dent Educ, 2003. **67**(8): p. 932-49.
53. Wilson, C.J., et al., *Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review*. Tissue Eng, 2005. **11**(1-2): p. 1-18.
54. Raggatt, L.J. and N.C. Partridge, *Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling*. J Biol Chem, 2010. **285**(33): p. 25103-8.
55. Rosenberg, N., O. Rosenberg, and M. Soudry, *Osteoblasts in bone physiology-mini review*. Rambam Maimonides Med J, 2012. **3**(2): p. e0013.
56. Hadjidakis, D.J. and Androulakis, II, *Bone remodeling*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1092**: p. 385-96.
57. Rucci, N., *Molecular biology of bone remodelling*. Clin Cases Miner Bone Metab, 2008. **5**(1): p. 49-56.
58. Basso, F.G., et al., *In vitro wound healing improvement by low-level laser therapy application in cultured gingival fibroblasts*. Int J Dent, 2012. **2012**: p. 719452.
59. Chiquet, M., C. Katsaros, and D. Kletsas, *Multiple functions of gingival and mucoperiosteal fibroblasts in oral wound healing and repair*. Periodontol 2000, 2015. **68**(1): p. 21-40.
60. Chen, S., et al., *Tuning surface properties of bone biomaterials to manipulate osteoblastic cell adhesion and the signaling pathways for the enhancement of early osseointegration*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2018. **164**: p. 58-69.
61. Norowski, P.A., Jr. and J.D. Bumgardner, *Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: a review*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2009. **88**(2): p. 530-43.
62. Smeets, R., et al., *Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis--a review*. Head Face Med, 2014. **10**: p. 34.
63. Handorn, B., *Die Medizinprodukte-Verordnung (EU) 2017/745: Ein Leitfaden für Wirtschaftsakteure zur MDR*. 2021: Beuth Verlag GmbH.
64. *DIN EN ISO 10993-1:2021-05, Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 1: Beurteilung und Prüfungen im Rahmen eines Risikomanagementsystems*. 2021, Berlin, Deutschland, Beuth.

65. Duval, K., et al., *Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture*. Physiology (Bethesda), 2017. **32**(4): p. 266-277.
66. Schulze, F., et al., *Noninfectious tissue interactions at periprosthetic interfaces*. Orthopadie (Heidelb), 2023. **52**(3): p. 186-195.
67. Bauer, S., et al., *Engineering biocompatible implant surfaces: Part I: Materials and surfaces*. Progress in Materials Science, 2013. **58**(3): p. 261-326.
68. Crawford, L., et al., *Biocompatibility Evolves: Phenomenology to Toxicology to Regeneration*. Adv Healthc Mater, 2021. **10**(11): p. e2002153.
69. Wintermantel, E. and S.-W. Ha, *Medizintechnik: Life Science Engineering*. 2009: Springer Science & Business Media.
70. Raut, H.K., et al., *Biocompatibility of Biomaterials for Tissue Regeneration or Replacement*. Biotechnol J, 2020. **15**(12): p. e2000160.
71. Beuth, *DIN EN ISO 5832-3:2022-02, Chirurgische Implantate - Metallische Werkstoffe - Teil 3: Titan 6-Aluminium 4-Vanadium Knetlegierung*. 2021.
72. Bonse, J., S.V. Kirner, and J. Krüger, *Laser-induced periodic surface structures (LIPSS)*. Handbook of laser micro-and nano-engineering, 2020: p. 1-59.
73. Schell, F., et al., *Fabrication of four-level hierarchical topographies through the combination of LIPSS and direct laser interference patterning on near-beta titanium alloy*. Materials Letters, 2022. **306**: p. 130920.
74. Furrer, S., et al., *Metal hypersensitivity in patients with orthopaedic implant complications-A retrospective clinical study*. Contact Dermatitis, 2018. **79**(2): p. 91-98.
75. Wachi, T., et al., *Release of titanium ions from an implant surface and their effect on cytokine production related to alveolar bone resorption*. Toxicology, 2015. **327**: p. 1-9.
76. Wilson, T.G., Jr., et al., *Foreign bodies associated with peri-implantitis human biopsies*. J Periodontol, 2015. **86**(1): p. 9-15.
77. Fretwurst, T., et al., *Metal elements in tissue with dental peri-implantitis: a pilot study*. Clin Oral Implants Res, 2016. **27**(9): p. 1178-86.
78. Becaria, A., A. Campbell, and S.C. Bondy, *Aluminum as a toxicant*. Toxicol Ind Health, 2002. **18**(7): p. 309-20.
79. Jack, R., P.L. Rabin, and T.D. McKinney, *Dialysis encephalopathy: a review*. Int J Psychiatry Med, 1983. **13**(4): p. 309-26.
80. W. Nicholson, J., *Titanium alloys for dental implants: A review*. Prosthesis, 2020. **2**(2): p. 11.
81. Klein, G.L., *Aluminum toxicity to bone: A multisystem effect? Osteoporosis and sarcopenia*, 2019. **5**(1): p. 2-5.
82. Willis, J., et al., *Is titanium alloy Ti-6Al-4 V cytotoxic to gingival fibroblasts-A systematic review*. Clin Exp Dent Res, 2021. **7**(6): p. 1037-1044.
83. Shukla, A., R. Balasubramaniam, and S. Bhargava, *Effect of replacement of V by Fe and Nb on passive film behavior of Ti-6Al-4V in simulated body fluid conditions*. Journal of alloys and compounds, 2005. **389**(1-2): p. 144-152.
84. Cunha, A., et al., *Human mesenchymal stem cell behavior on femtosecond laser-textured Ti-6Al-4V surfaces*. Nanomedicine (Lond), 2015. **10**(5): p. 725-39.
85. Kumari, R., et al., *Laser surface textured titanium alloy (Ti-6Al-4V)-Part II-Studies on bio-compatibility*. Applied Surface Science, 2015. **357**: p. 750-758.
86. Kunzler, T.P., et al., *Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients*. Biomaterials, 2007. **28**(13): p. 2175-82.

87. Papa, S., et al., *Dual-functionalized titanium by ultrafast laser texturing to enhance human gingival fibroblasts adhesion and minimize Porphyromonas gingivalis colonization*. Applied Surface Science, 2022. **606**: p. 154784.
88. Hadzik, J., et al., *Fractal Dimension and Texture Analysis in the Assessment of Experimental Laser-Induced Periodic Surface Structures (LIPSS) Dental Implant Surface-In Vitro Study Preliminary Report*. Materials (Basel), 2022. **15**(8).
89. Chang, B.S., et al., *Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations*. Biomaterials, 2000. **21**(12): p. 1291-8.
90. Gnilitzkyi, I., et al., *Cell and tissue response to nanotextured Ti6Al4V and Zr implants using high-speed femtosecond laser-induced periodic surface structures*. Nanomedicine, 2019. **21**: p. 102036.
91. Cunha, A., *Multiscale femtosecond laser surface texturing of titanium and titanium alloys for dental and orthopaedic implants*. 2015, Bordeaux.
92. Habibie, H., et al., *The role of osteoprotegerin (OPG) in fibrosis: its potential as a biomarker and/or biological target for the treatment of fibrotic diseases*. Pharmacol Ther, 2021. **228**: p. 107941.
93. Ohnishi, T. and Y. Daikuhara, *Hepatocyte growth factor/scatter factor in development, inflammation and carcinogenesis: its expression and role in oral tissues*. Arch Oral Biol, 2003. **48**(12): p. 797-804.
94. Ohshima, M., et al., *Hepatocyte growth factor secreted by periodontal ligament and gingival fibroblasts is a major chemoattractant for gingival epithelial cells*. J Periodontal Res, 2001. **36**(6): p. 377-83.
95. Suthin, K., et al., *Enhanced expression of vascular endothelial growth factor by periodontal pathogens in gingival fibroblasts*. J Periodontal Res, 2003. **38**(1): p. 90-6.
96. Gabay, C., C. Lamacchia, and G. Palmer, *IL-1 pathways in inflammation and human diseases*. Nat Rev Rheumatol, 2010. **6**(4): p. 232-41.
97. Balli, U., et al., *Assessment of MMP-1, MMP-8 and TIMP-2 in experimental periodontitis treated with kaempferol*. J Periodontal Implant Sci, 2016. **46**(2): p. 84-95.
98. Gagari, E., et al., *Expression of stem cell factor and its receptor, c-kit, in human oral mesenchymal cells*. Eur J Oral Sci, 2006. **114**(5): p. 409-15.
99. Baggiolini, M. and I. Clark-Lewis, *Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine*. FEBS Lett, 1992. **307**(1): p. 97-101.
100. Deshmane, S.L., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview*. J Interferon Cytokine Res, 2009. **29**(6): p. 313-26.
101. Bollen, C.M., P. Lambrechts, and M. Quirynen, *Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature*. Dent Mater, 1997. **13**(4): p. 258-69.
102. Melo, M.A., *Bacterial Interactions with Dental and Medical Materials*. J Funct Biomater, 2020. **11**(4).
103. Shapira, L., et al., *Effect of a niobium-containing titanium alloy on osteoblast behavior in culture*. Clin Oral Implants Res, 2009. **20**(6): p. 578-82.
104. Marques, A.F.S., et al., *Nd-YAG Laser Texturing of Zirconia Implant Surfaces*. Lasers in Manufacturing and Materials Processing, 2023. **10**(1): p. 1-18.
105. Chikarakara, E., et al., *In vitro fibroblast and pre-osteoblastic cellular responses on laser surface modified Ti-6Al-4V*. Biomed Mater, 2014. **10**(1): p. 015007.
106. Fatola, O.I., et al., *Trends in vanadium neurotoxicity*. Brain Res Bull, 2019. **145**: p. 75-80.

107. Costa, B.C., et al., *Vanadium ionic species from degradation of Ti-6Al-4V metallic implants: In vitro cytotoxicity and speciation evaluation*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2019. **96**: p. 730-739.
108. Adan, A., Y. Kiraz, and Y. Baran, *Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays*. Curr Pharm Biotechnol, 2016. **17**(14): p. 1213-1221.
109. Chandra, P., et al., *UV laser-ablated surface textures as potential regulator of cellular response*. Biointerphases, 2010. **5**(2): p. 53-9.
110. Maalouf, M., et al., *Polarization of Femtosecond Laser for Titanium Alloy Nanopatterning Influences Osteoblastic Differentiation*. Nanomaterials (Basel), 2022. **12**(10).
111. Faia-Torres, A.B., et al., *Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in the absence of osteogenic supplements: A surface-roughness gradient study*. Acta Biomater, 2015. **28**: p. 64-75.
112. Weiss, S., et al., *Systemic regulation of angiogenesis and matrix degradation in bone regeneration--distraction osteogenesis compared to rigid fracture healing*. Bone, 2005. **37**(6): p. 781-90.
113. Chen, H.T., et al., *Hepatocyte growth factor increases osteopontin expression in human osteoblasts through PI3K, Akt, c-Src, and AP-1 signaling pathway*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e38378.
114. Zhen, R., et al., *Hepatocyte growth factor improves bone regeneration via the bone morphogenetic protein-2-mediated NF-kappaB signaling pathway*. Mol Med Rep, 2018. **17**(4): p. 6045-6053.
115. Yang, L., et al., *Stem cell factor (SCF) protects osteoblasts from oxidative stress through activating c-Kit-Akt signaling*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **455**(3-4): p. 256-61.
116. Posner, L.J., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 induces monocyte recruitment that is associated with an increase in numbers of osteoblasts*. Bone, 1997. **21**(4): p. 321-7.
117. Tanaka, T., M. Narazaki, and T. Kishimoto, *IL-6 in inflammation, immunity, and disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. **6**(10): p. a016295.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

Danksagung

Für die freundlich Überlassung des Themas und das mir entgegen gebrachte Vertrauen bedanke ich mich ausdrücklich bei Prof. Dr. med. Georgi Wassilew. Dr. rer. medic. Janosch Schoon danke ich herzlich für die unermüdliche Hilfestellung bei der Durchführung der Arbeit. Ein weiterer Dank geht an Dr. med. dent. Lucas für die Unterstützung bei der Themenfindung.

Dem Team des orthopädischen Forschungslabors, ganz besonders Leona Berndt und Dirk Stobbe, danke ich für die Unterstützung bei Fragen zur Durchführung der Experimente immer hilfsbereit zur Seite standen. Ein großer Dank gebührt Susanne Kühl, die mich bei organisatorischen Aufgaben entlastete und immer ein offenes Ohr hatte.

Für die Besichtigung der Produktionsanlagen, die geduldige Beantwortung von Nachfragen und die zuverlässige Zusammenarbeit möchte ich mich bei Luiz Schweitzer und Peter Schneider bedanken.

Diese Arbeit wäre ohne externe Analysen nicht zustande gekommen. Dafür möchte ich mich bei Dr. Rabea Schlüter aus dem Institut für Elektronenmikroskopie, dem Team der Immuntoxikologie des IMD in Berlin, insbesondere Dr. rer. nat. Katrin Hüsker, und dem Team des „Life Science Applikationslabor“ des INP Greifswald, insbesondere Lea Miebach, bedanken.