

**Aus der Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde Tübingen
Abteilung Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik und Propädeutik
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Weber
Sektion für Medizinische Werkstoffkunde und Technologie
Leiter: Professor Dr. J. Geis-Gerstorfer**

Untersuchungen zur Hämokompatibilität von Biomaterialien

**Neue präklinische hämostaseologische Untersuchungsmethoden zur
Evaluierung der Biokompatibilität von dentalen Implantatwerkstoffen**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Steffen Mark Ecker
aus
Schwäbisch Gmünd**

2002

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter:

Professor Dr. J. Geis-Gerstorfer

2. Berichterstatter:

Professor Dr. G. Ziemer

meinen Eltern

| | | |
|----------|--|--------------|
| I | Inhaltsverzeichnis | Seite |
| I | Inhaltsverzeichnis | |
| II | Abkürzungsverzeichnis | |
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1. | Biokompatibilität von Implantatmaterialien | 1 |
| 1.2. | Osseointegration dentaler Implantatmaterialien | 2 |
| 1.3. | Verfahren zur präklinischen Evaluierung der Hämokompatibilität von Biomaterialien | 3 |
| 1.4. | Die Rolle von Komplementsystem/C1-Inhibitor und Immunglobulin G, Fibrinogen, Fibronectin, HMWK und PMNE in der Gewebeantwort | 7 |
| 1.5. | Ziel der Arbeit | 12 |
| 2 | Material und Methoden | 14 |
| 2.1. | Blut-, Plasma-, Serumgewinnung und Heparinisierung | 14 |
| 2.2. | Durchflusszytometrische Untersuchung der Mikropartikel | 15 |
| 2.3. | Komplementaktivierung in Wellplatten | 24 |
| 2.4. | Mikropartikel in Vollblut | 27 |
| 2.5. | Taktile und visuelle Oberflächenanalyse | 28 |
| 3 | Ergebnisse | 30 |
| 3.1. | Durchflusszytometrische Untersuchungen der Mikropartikel | 30 |
| 3.2. | Komplementaktivierung in Wellplatten | 32 |
| 3.3. | Mikropartikel in Vollblut | 33 |
| 3.4. | Taktile und visuelle Oberflächenanalyse | 34 |

| | | |
|--------|--|----|
| 4 | Diskussion | 36 |
| 4.1. | Die humorale und zelluläre Aktivierung | 37 |
| 4.2. | Reaktionen im Blut auf Fremdkörperkontakt | 38 |
| 4.3. | Die Durchflusszytometrie im Vergleich mit anderen Methoden | 41 |
| 4.4. | Vorversuche und Fehlermöglichkeiten | 44 |
| 4.5. | Schlussfolgerungen | 47 |
| 5 | Zusammenfassung | 48 |
| III | Anhang | 51 |
| III.1. | Verwendete Chemikalien, Präparier-, Isolier-, Verbrauchsmaterialien und Geräte | 51 |
| III.2. | Gerätespezifische Einstellungen und deren Erläuterung am Durchflusszytometer | 52 |
| III.3. | Umrechnung der Einheiten beim Durchflusszytometer | 55 |
| III.4. | Testobjekte und deren Beschichtungen im Wellplattenversuch | 55 |
| IV | Literaturverzeichnis | 59 |
| V | Danksagung | 66 |
| VI | Lebenslauf | 67 |

II Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|--|
| AK1 | Primärantikörper |
| AK2 | Sekundärantikörper |
| C1-INH | C1-Inhibitor |
| C3 | Komplementfaktor C3 |
| C3c | Komplementfaktor C3c |
| CkmA | Karboxylierte Polystyrenpartikel mit Albuminbeschichtung |
| <i>cp</i> Titan | commercial pure Titan |
| E | Einheiten |
| EDTA | Äthylendiamintetraessigsäure |
| EIA | Enzym-Immunoassay |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| FITC | Fluorescein-isothiocyanat (Fluoreszenzfarbstoff) |
| Fn | Fibronektin |
| FOG | Fibrinogen |
| FSC | Vorwärtsstreulicht (engl. forward light scatter) |
| HMWK | Hochmolekulares Kininogen |
| HRP | horseradish peroxidase |
| IgG | Immunglobulin G |
| IU | International Unit |
| N ₂ | Stickstoff |
| PMN | Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten |
| REM | Rasterelektronenmikroskop |
| RIA | Radio-Immunoassay |
| RT | Raumtemperatur |
| SD | Standardabweichung (engl. standard deviation) |
| SSC | Seitwärtsstreulicht (engl. side scatter) |
| TCC | Terminal Complement Complex |

1 Einleitung

Die funktionelle und ästhetische Rekonstruktion von verloren gegangenen Zähnen und zahnlosen Kieferkammabschnitten beschränkte sich bis vor wenigen Jahren fast ausschließlich auf die Herstellung und Verwendung von parodontal und gingival getragem Zahnersatz. In vielen Fällen führte dies zu prothetischen Konstruktionen, die in ästhetischer, funktioneller oder phonetischer Hinsicht unbefriedigend waren.

Durch den Einsatz von zahnärztlichen Implantaten besteht die Möglichkeit Zahnersatz einzugliedern, der eine nahezu vollständige Rehabilitation des Kauorgans in allen Bereichen gewährleistet.

Inzwischen ist diese Therapieform weit verbreitet und eine immer größer werdende Nachfrage nach zahnärztlichen Implantaten fordert die Entwicklung von Implantatmaterialien, die den mechanischen Belastungen standhalten und hohe Biokompatibilität besitzen.

Die Biokompatibilität eines dentalen Implantatmaterials ist Voraussetzung für die gute Einheilung und lange Verweildauer eines Implantates im Körper. Sie ist dann gegeben, wenn das Implantat im menschlichen Organismus keine lokalen oder systemischen Schädigungen hervorruft. Das Implantatmaterial darf im Körper keine unerwünschten zellulären oder subzellulären Aktivitäten zur Folge haben (31,32,71).

1.1. Biokompatibilität von Implantatmaterialien

Zahlreiche Untersuchungen zur Erforschung von Gewebe-Material-Interaktionen sind in den letzten Jahrzehnten auf zellulärer und subzellulärer Ebene unternommen worden. Diese hatten das Ziel, die Biokompatibilität von Implantatmaterialien zu verbessern (30,47,50). Viele Untersuchungen dahingehend stützen sich darauf, dass nahezu jedes medizinische Gerät nach dessen Gewebeimplantation zuerst mit Blut in Kontakt kommt. Unmittelbar nach diesem Kontakt adsorbiert eine Schicht aus Plasmaproteinen an die Oberfläche (52,62), die nachfolgend mit der raschen Aktivierung des Gerinnungs- und

Komplementsystems (14,18,53), inflammatorischen Reaktionen (58) und Zellanhaftungen (25) an die Oberfläche assoziiert wird.

Anderen Adsorptionsproteinen (HMWK, Albumin) werden „passivierende“ Eigenschaften nachgesagt (52,69). Aus deren Anlagerung soll eine reduzierte Adhäsion und Aktivierung von Blutzellen (Thrombozyten, Monozyten, Granulozyten) resultieren (29). Die Gewebeantwort auf ein implantiertes Metall hängt demnach nicht nur von der Oberfläche selbst ab, sondern von der spontan entstandenen Schicht adsorbierter Proteine. Für die Zusammensetzung dieser Proteinschicht ist aber wiederum das Material verantwortlich (60,78,19).

Die Klärung der Rolle, die menschliche Plasmaproteine bei der Gewebeantwort spielen, und die Klärung ihrer Zusammensetzung an der Berührungsfläche ist deshalb für die Bestimmung der Biokompatibilität des Materials und damit für dessen klinischen Erfolg von großer Bedeutung (9).

1.2. Osseointegration dentaler Implantatmaterialien

In der enossalen Implantologie wird der klinische Erfolg von Implantaten an ihrer Fähigkeit zur sogenannten „Osseointegration“ gemessen. Die Osseointegration ist von Brånemark definiert als „direkten strukturellen und funktionellen Kontakt zwischen ordentlichem, lebendem Knochen und der Oberfläche eines ladungstragenden Implantates“ (2). Nach dieser Definition verlangt die Osseointegration die Abwesenheit von fibrösem Gewebe (43).

Titan als Implantatmaterial

Titan und Titanlegierungen sind die Materialien, die in der enossalen Implantologie am häufigsten verwendet werden. Neben ihren guten mechanischen Eigenschaften sind Titan und Titanlegierungen die einzigen Materialien, die die Fähigkeit zur Osseointegration haben. Sie sind nach neuesten Untersuchungen die Materialien der Wahl (43).

Verschiedene andere Materialien sind in der Vergangenheit verwendet worden, um enossale Implantate herzustellen. Neben einer ganzen Anzahl von Polymeren, deren Vorteile in der einfachen Herstellung liegen (70), wurden vor allem zahlreiche Metalle

eingesetzt. Auf Gold basierende Legierungen gehörten dabei zu den ersten verwendeten Metallen, die aber in den 40er und 50er Jahren durch Edelstahl und Tantalum ersetzt wurden (36,40). Auch Kobalt-Chrom-Legierungen wurden in dieser Zeit entwickelt und für enossale Implantate verwendet (40). Im Nachhinein war das fundamentale Problem dieser Materialien die Bildung fibrösen Gewebes nach ihrer Insertion in den Knochen (70). Aus jetziger Sicht wurde keines der Materialien osseointegriert, weshalb sie heute größtenteils durch Titan und Titanlegierungen ersetzt sind.

Es gibt zwar histologische Informationen über die Berührungsfläche von Knochen und Implantat (6), die Mechanismen, die sich nach einer Implantatinsertion ereignen, geschweige denn die Mechanismen, die für die Osseointegration eine entscheidende Rolle spielen, sind aber bis heute unbekannt (18,66).

Da das Titanimplantat nach der Insertion zuerst mit Blut in Kontakt kommt, geht man auch hier davon aus, dass die initial adsorbierte Schicht aus Plasma- und Serumproteinen die Antwort des Körpers auf das Implantat dirigieren und verantwortlich für den klinischen Erfolg des Implantates sind (8).

1.3. Verfahren zur präklinischen Evaluierung der Hämokompatibilität von Biomaterialien

Die Adsorption und Denaturierung von Proteinen an Implantatmaterialien ist ein Maß für deren Biokompatibilität. Die Bestimmung ihrer Menge und Zusammensetzung ist ein wichtiger Test für potentielle Biomaterialien (44). Nachfolgend werden einige Verfahren vorgestellt, mit denen man die Proteinkinetik und Proteindichte auf Biomaterialien untersuchen kann. Während die anderen Methoden nur kurz vorgestellt werden, erfolgt im letzten Abschnitt eine detaillierte Beschreibung der durchflusszytometrischen Untersuchung, da die Erprobung dieser Methodik Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist.

Viele Untersuchungen in diesem Gebiet basieren auf Enzym-Immuno-Assay-Techniken (EIA-Techniken), die Proteinkonzentrationen in flüssiger Phase ermitteln. Damit kann beispielsweise die Konzentration eines Proteins nach einer bestimmten Inkubationszeit

in Serum analysiert werden (57). Merritt und ihre Mitarbeiter beschrieben eine Methode mit der man über mehrere Schritte mit Hilfe von EIA und Photometrie die adhärenente Proteinmenge auf der Oberfläche eines Prüfkörpers nach dessen Inkubation in proteinhaltiger Flüssigkeit indirekt bestimmen kann (44).

Unter Verwendung eines sogenannten Radio-Immunoassay (RIA) werden die zu untersuchenden Proteine mit radioaktiven Substanzen gekoppelt. Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgt dann durch die Messung der Strahlungsintensität und dem Vergleich mit Standards bekannter Aktivität (20,60,72).

Oberflächenadhärente Proteine können mit fluoreszierenden Farbstoffen „sichtbar“ gemacht werden. Unter standardisierten Bedingungen werden die Prüfkörper dabei im Fluoreszenzmikroskop fotografiert und die Aufnahmen digital weiterverarbeitet. Mit Unterstützung eines Computers und der notwendigen Software werden Lichtintensitäten gemessen und in Relation gestellt. Im Vergleich mit verschiedenen Materialien können dann Rückschlüsse auf Unterschiede in der Proteinadsorption gezogen werden (46).

Eine andere Methode zur Beurteilung der Proteinschicht auf Oberflächen ist die Ellipsometrie. Dabei handelt es sich um ein optisches Messsystem, bei dem linear polarisiertes Licht von der zu messenden Oberfläche reflektiert und durch einen Photodetektor gemessen wird. Bei dieser Vorgehensweise erhält man detaillierte Informationen über oberflächengebundene Proteine, ohne sie vor der Analyse mit anderen Stoffen koppeln zu müssen wie es bei Immunfluoreszenz- und EIA-Techniken der Fall ist (9).

Zur Bestimmung von Proteinen werden auch die SDS-PAGE-Analyse und das Western-Blotting verwendet. Hier werden Eiweiße nach elektrophoretischer Auftrennung und Transformation auf Membranen qualitativ und quantitativ nachgewiesen (54,68).

Es besteht auch die Möglichkeit die oberflächliche Schicht aus Proteinen elektronenmikroskopisch zu analysieren. Die Untersuchungen werden verbessert, indem die Proteine mit elektronendichten Substanzen behandelt werden. Dadurch wird deren Kontrast verstärkt (42).

Durchflusszytometrische Untersuchung von Biomaterialien

Die Durchflusszytometrie hat sich in einer ganzen Reihe von biomedizinischen und klinischen Bereichen etabliert. Es ist eine Untersuchungsmethode, die es erlaubt mittels Streulicht- und Fluoreszenzintensitätsmessungen einzelne Zellen auf Größe und Beschaffenheit zu untersuchen.

In Abbildung 1 ist schematisch die Anordnung der optischen Elemente im Durchflusszytometer dargestellt. Zellen [3] werden in einer Suspension durch ein Untersuchungsareal geschickt, in welchem sie von einem Laser [1] angestrahlt werden. Die dabei entstehende Streustrahlung und emittiertes Fluoreszenzlicht wird mit Detektoren [7, 9] gemessen und gemäß dieser Eigenschaften in Diagrammen dargestellt.

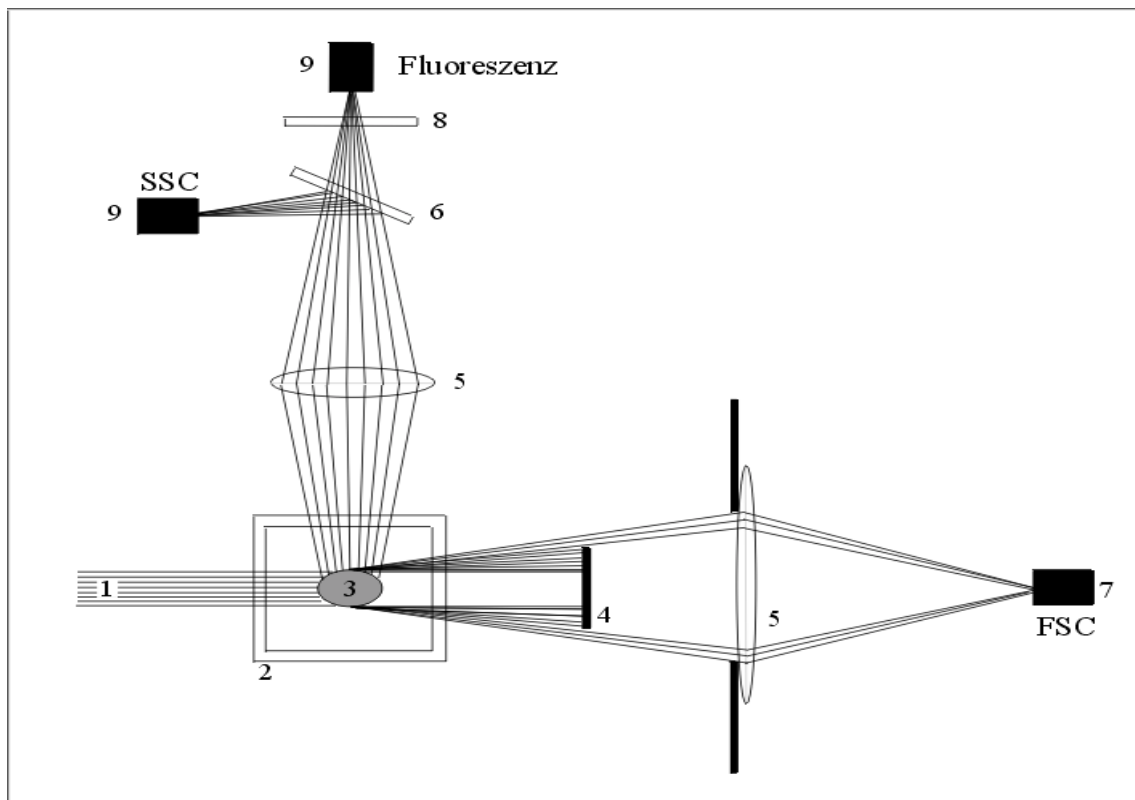


Abbildung 1: Anordnung der optischen Elemente zur Messung von Fluoreszenz- und Streulicht. ([1]: Laserstrahl; [2]: Quarzglaszuvette; [3]: Mikropartikel; [4]: Blockerstreifen; [5]: Sammellinse; [6]: Teilerspiegel; [7]: Photodiode; [8]: Lichtfilter; [9]: Photomultipliertube, kurz PMT) (51).

Jeder Partikel wird gemäß seiner Streulichteigenschaften als Punkt in einem Zwei-parameter-Punktehistogramm (engl. dot plot, siehe Abbildung 4, Seite 21) dargestellt und es können seine chemischen und physikalischen Eigenschaften relativ zu anderen Zelltypen beurteilt werden. Die Lichtstreuung einer Zelle hängt dabei von deren Größe und Granularität ab und wird als Vorwärtsstreuung (FSC) auf der Abszisse und als Seitwärtsstreuung (SSC) auf der Ordinate abgetragen. Im Unterschied zu anderen Methoden, bei denen nur durchschnittliche Werte für Zellpopulationen ermittelt werden können, besteht bei der Durchflusszytometrie die Möglichkeit, jede Zelle in der Population einzeln zu messen.

Für eine genaue Zelltypisierung können mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern analog dem Fluoreszenzmikroskop, Zelleigenschaften auf molekularer Ebene sichtbar gemacht werden.

Das durchflusszytometrische Verfahren fand erst kürzlich Verwendung in einer Untersuchung zur Biokompatibilität von dentalen Implantatmaterialien. Dabei wurden Zellen auf unterschiedlichen Materialien gezüchtet und dann durchflusszytometrisch analysiert (38).

Gemmell (13) bediente sich dieser Methode um adsorbierte Komplementproteine auf polymeren Oberflächen zu bestimmen. Anstelle der Zellen wurden Mikropartikel, die in Form und Größe den festen Blutbestandteilen ähnelten, im Durchflusszytometer analysiert. Nach der Inkubation der Mikropartikel in Serum wurden die oberflächlich adsorbierten Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die dadurch entstehende Fluoreszenzintensität konnte, neben anderen Parametern, im Durchflusszytometer erfasst werden. Im Vergleich mit standardisiert fluoreszenzaktiven Partikeln erhielt Gemzell Aufschluss über die absolute Menge der adhärenenten Komplementproteine und deren Zusammensetzung nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.

1.4. Die Rolle von Komplementsystem/C1-Inhibitor, Immunglobulin G, Fibrinogen, Fibronectin, HMWK und PMNE in der Gewebeantwort

Im Folgenden werden die Proteine vorgestellt, die in dieser Studie auf ihre Aktivierung und ihr Adsorptionsverhalten nach Inkubation in Blut und Blutbestandteilen untersucht wurden. Dargestellt sind deren physiologische Funktionen und die Erkenntnisse anderer Studien bezüglich ihrer Funktion in der Gewebeantwort auf inkorporierte Materialien.

Komplementsystem

Das Komplementsystem ist ein System funktionell gekoppelter Proteine, die in streng geregelter Weise untereinander reagieren und für viele Effektorfunktionen der humoralen Immunität und für Entzündungsvorgänge verantwortlich sind. Die Komplementkaskade, wie sie nach Aktivierung durch einen Mikropartikel abzulaufen scheint, ist in Abbildung 2, Seite 8 schematisch dargestellt. Die Komplementfaktoren C3c, C3, C1-Inhibitor und Immunglobulin G, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sind in Abbildung 2, Seite 8 grau unterlegt.

Die Komplementfaktoren liegen im Blut in schwacher Konzentration oder in ihrer inaktiven Form vor. Bei Fremdkörperkontakt wird das System aktiviert und führt zur Bildung des terminalen Lysekomplexes (sC5b-9, TCC). Dieser auch als MAC (Membrane Attack Complex) bezeichnete Komplex bewirkt die Bildung eines membranintegrierten Proteinkanals und führt schließlich zur vollständigen Lyse der attackierten Zelle (64).

Das Komplementsystem ist aber nicht nur wichtiger Bestandteil der humoralen Abwehr, sondern wirkt zusätzlich als Effektor auf das zelluläre Abwehrsystem. Es fungiert als Aktivator und chemotaktisches Agens für Leukozyten (21) und bewirkt eine Granulozytenaggregation (5) und Leukozytenadhäsion (34). Der Komplementfaktor C5a ruft als Anaphylatoxin eine erhöhte vaskuläre Permeabilität, die Kontraktion der glatten Muskulatur und die Freisetzung von Histamin und anderen inflammatorischen Mediatoren aus basophilen Granulozyten und Mastzellen hervor (61).

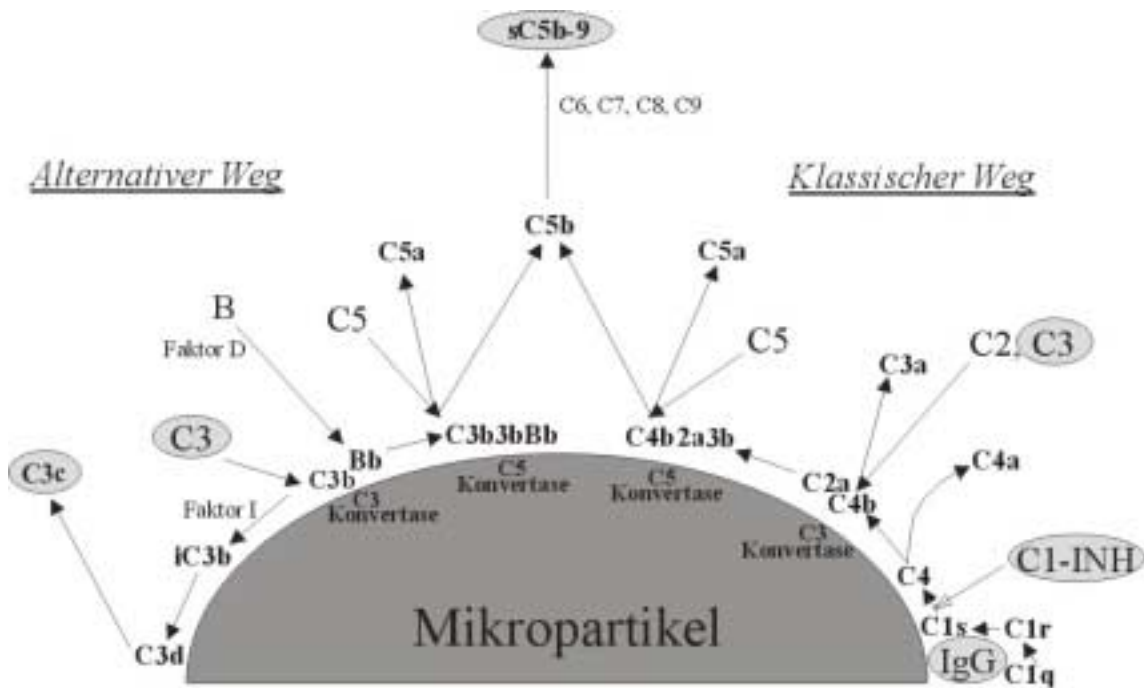


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Komplementkaskade an einem Mikropartikel (modifiziert nach Gemell (13)) (die untersuchten Parameter sind grau unterlegt). Komplementaktivierung durch artifizielle Oberflächen kann durch den alternativen oder klassischen Weg erfolgen. Auslösendes Moment des klassischen Aktivierungsweges ist ein Antigen-IgG-Komplex, der eine enzymatische Aktivierung der drei Komplementproteine C1, C4 und C2 bewirkt. Dies führt zur Bildung der C3-Konvertase, die C3 in die biologisch aktiven Komplementfaktoren C3a und C3b spaltet. C3b ist Bestandteil der C5-Konvertase, die C5 in C5a und C5b spaltet. C5b führt letztendlich zur Formierung des Terminalen-Komplement-Komplex (TCC). TCC ist der zusammenfassende Terminus für C5b-9 (membranständiges Protein) und sC5b-9 (Protein in Phase).

Beim alternativen Aktivierungsweg interagiert C3 mit der artifiziellen Oberfläche um gebundenes C3b zu bilden. Das Proteinfragment Bb (entstanden durch enzymatische Spaltung des Faktors B) bindet an gebundenes C3b um die C3-Konvertase des alternativen Aktivierungsweges zu generieren. Dies mündet, wie beim klassischen Aktivierungsweg, in die Bildung der C5-Konvertase und am Ende in die Bildung des TCC. Der C1-INH stoppt die Komplementaktivierung über seine hemmende Wirkung auf C1r und C1s.

Komplementfaktor C hat die Aufgabe, Antigen-Antikörperkomplexe zu opsonieren, um deren Phagozytose zu begünstigen .

Das Komplementsystem initiiert eine Aktivierung des Gerinnungs- und Kontaktphasensystems, die ihrerseits wieder in positiver Rückkopplung das Komplementsystem aktivieren. Aktivierte Komplementfaktoren können als humorales Abwehrsystem und über ihre Mithilfe im zellulären Abwehrsystem zu pathophysiologischen, inflammatorischen Prozessen führen (17).

Der Körper erkennt auch implantiertes Material als körperfremd und es gilt als nachgewiesen, dass verschiedene Materialien unterschiedlich große Komplementaktivierungen induzieren (23).

Tang unterstreicht mit seinen Untersuchungen, dass eine oberflächeninduzierte Komplementaktivierung verantwortlich sein kann für die Anhäufung von Entzündungszellen auf Implantatoberflächen (57).

Auch durch die Verwendung von Komplementinhibitoren konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Leukozyten an ein Biomaterial hauptsächlich von der Komplementaktivierung nach Blutkontakt abhängt (35,41,45).

C1- Inhibitor (C1-INH)

Der C1-Inhibitor ist der wichtigste Inhibitor aus einer Reihe von Serinprotease-Inhibitoren im Plasma, die eine entscheidene Rolle in der Regulation von inflammatorischen Prozessen, Gerinnung und Fibrinolyse spielen. Im Komplementsystem wirkt der C1-Inhibitor, wie in Abbildung 2, Seite 8 schematisch dargestellt, hemmend auf die Komponenten C1r und C1s des klassischen Aktivierungsweges und reguliert damit die Komplementaktivität.

Immunglobulin G (IgG)

IgG ist ein Antikörper, der in B-Lymphozyten gebildet wird. Auf Oberflächen adsorbiertes IgG ist ein potentieller Komplementaktivator in Serum (37). IgG gehört zu den Opsoninen und besitzt die Möglichkeit an die Fremdoberfläche wie auch an phagozytierende Zellen zu binden. Dadurch erhöht sich die Effizienz der Phagozytose (16).

Fibrinogen (FOG)

Fibrinogen ist Faktor I der Blutgerinnung und wird zu den sogenannten Akute-Phase-Proteinen gezählt. Bei akut entzündlichen Prozessen und akuten Phasen chronisch progredient verlaufender entzündlicher Erkrankungen ist die Serumkonzentration der Akute-Phase-Proteine erhöht. Fibrinogen soll der Hauptaktivator für inflammatorische Vorgänge sein (25). Es wurde berichtet, dass eine Akkumulation von Phagozyten vermittelt wird durch Wechselbeziehungen zwischen oberflächengebundenem Fibrinogen und Phagozyten. Fibrinogen soll deswegen eine Rolle für akut-entzündliche Reaktionen spielen (56,57). Blutplättchen besitzen Rezeptoren für Fibrinogen, die dazu dienen, eine Plättchenaggregation hervorzurufen (25).

Fibronectin (Fn)

Fibronectin ist eines der am besten untersuchten Beispiele eines Zellproduktes, das wichtig für das Phänomen Zell-Substrat-Adhäsion ist (22,74).

Fibronectin existiert als gelöste Form in Plasma (Serumfibronectin, kalteunlösliches Globulin) und als Oberflächenbestandteil normaler Bindegewebszellen. Beide Formen sind gleichermaßen effektiv um die Adhäsion von Zellen auf das Substrat zu verbessern (73). Mit Fibronectin vorbehandelte Oberflächen scheinen die Zellbindung und -adhäsion zu erhöhen (11,33). Cannas et al. haben gezeigt, dass eine oberflächliche Fibronectinschicht zu einer merklich gesteigerten Fibroblastenanhaftung führt (4). Versuche mit bioaktivem Glas und Hydroxylapatit haben gezeigt, dass oberflächlich gebundenes Fibronectin für eine vermehrte Osteoblastenanhaftung verantwortlich sein kann (7). Aufgrund einer deutlichen Erhöhung der Hydrophobie von *cp*Titan nach dessen Fibronectinbeschichtung, wird Fibronectin eine besondere Bedeutung zugesprochen (39). Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit zeigte aber, dass Fibronectin in die Adhäsion von Osteoblasten weder auf einer unbeschichteten noch auf einer beschichteten Titanlegierung involviert zu sein scheint (12).

Hochmolekulares Kininogen (HMWK)

HMWK ist einer von vier Faktoren, die an der Kontaktphasenaktivierung beteiligt sind. Diese vier Proteine zirkulieren in inaktiver Form im Plasma und haben bei Verletzungen die physiologische Funktion, sich zu aktiven Enzymen umzuwandeln und die verschiedenen Regulationskaskaden in Gang zu setzen. HMWK wird wie Albumin passivierende Eigenschaften zugeschrieben (69).

HMWK soll durch Anlagerung an die Fremdoberfläche eine reduzierte Adhäsion und Aktivierung von Blutzellen bewirken, insbesondere von Thrombozyten, Monozyten und Granulozyten (29,76,77).

PMN-Elastase (PMNE)

Bei ihrer Aktivierung setzen Polymorphkernige Granulozyten (PMN) Elastase frei. Die Bestimmung von PMN-Elastase in Vollblut ist somit ein Indikator für die Aktivierung der PMN.

1.5. Ziel der Arbeit

Die Aufgabe der prothetischen Therapie besteht in der Erhaltung und Wiederherstellung der Gesundheit des Kauorgans in funktioneller, ästhetischer und phonetischer Hinsicht unter Schonung und Erhaltung der Zähne und aller Gebilde des mandibulo-maxillären Systems. Die Verwendung von künstlichen Zahnwurzeln in Form von Implantaten erweitert das Spektrum der Therapiemöglichkeiten. Implantate werden daher zunehmend zur Lagerung von festsitzendem und herausnehmbarem Zahnersatz herangezogen.

Die Inkorporation von alloplastischen Materialien in den Kieferknochen ist aber in gewisser Weise das Einbringen eines Fremdkörpers in den menschlichen Körper und wird wie beim Eindringen von Fremdorganismen mit einer mehr oder minder großen Abwehrreaktion beantwortet.

Die ersten Schritte des Immunsystems nach Fremdkörperexposition ist die Aktivierung des humoralen Abwehrsystems, das durch Anhaftung verschiedener Plasmaproteine und deren Konzentrationserhöhung das zelluläre Abwehrsystem unterstützt oder erst in Gang bringt.

Auch beim Kontakt von artifiziellen Oberflächen mit Blut kommt es initial zur Adsorption von Proteinen. Dieses Phänomen wird analog den Abwehrmechanismen bei organischem Fremdkörperkontakt für das Gewebeverhalten während der Exposition von alloplastischen Materialien verantwortlich gemacht. Andererseits gibt es Proteine, die die Einheilung des Implantats unterstützen.

In diesem Bewusstsein beschäftigen sich viele Veröffentlichungen mit verschiedenen präklinischen Untersuchungsmethoden, um die adsorbierten Proteinschichten in Menge und Zusammensetzung zu erfassen.

In dieser Studie sollen Adsorptionsunterschiede bestimmter Plasmaproteine an verschiedenen Materialien anhand des von Gemmell vorgestellten Verfahrens, der durchflusssytometrischen Untersuchung von Mikropartikeln nach deren Inkubation mit Blut und Blutbestandteilen, analysiert werden. Besonderes Augenmerk gilt dabei der Durchführung und Reliabilität dieses Verfahrens im Zusammenhang mit Mikropartikeln anstelle

von Zellen, für deren Untersuchung der Durchflusszytometer eigentlich entwickelt wurde.

Zusätzlich werden vergleichbare Materialien mit Hilfe eines in der Labordiagnostik routinemäßig eingesetzten Verfahrens (EIA) auf deren Komplementaktivierung untersucht.

Referenzmaterial ist bei beiden Methoden das Metall Titan, das wegen seiner hohen Biokompatibilität und seiner ausgezeichneten osseointegrativen Eigenschaften in der enossalen Implantologie und in vielen anderen medizinischen Bereichen Verwendung findet. Im Vergleich mit anderen Materialien, die in histologischen Versuchen gezeigt haben, dass sie nach Knocheninsertion nicht osseointegriert werden, sollen Unterschiede in der Proteinadsorption ausgemacht werden.

Unter den zu untersuchenden Materialien befinden sich auch Titanprüfkörper mit verschiedenen Oberflächenmodifikationen, die teilweise nicht nur in ihrer chemischen Zusammensetzung differieren, sondern auch Unterschiede in ihrer mikromorphologischen Oberflächenbeschaffenheit aufzeigen.

Die verschiedenen Oberflächen werden elektronenmikroskopisch dargestellt und mit einem standardisiertem Verfahren wird deren Rauigkeit gemessen. Dadurch könnte festgestellt werden, ob sich Unterschiede in der Rauigkeit auf die Komplementaktivierung auswirken.

Über die Bestimmung der PMN-Elastasekonzentration nach Inkubation in Vollblut soll die Auswirkung der Materialien auf die Granulozytenaktivierung dargestellt werden. Damit könnten Rückschlüsse auf eine inflammatorische Antwort des Körpers nach Materialkontakt gezogen werden.

2 Material und Methoden

Dieser Abschnitt gliedert sich nach den verschiedenen Versuchen, wobei jede Versuchsbeschreibung in Material, Methode und Datenauswertung und Darstellung der Ergebnisse eingeteilt ist. Im Anhang (Kapitel III.1., Seite 51ff.) befindet sich eine für alle Versuche zusammengefasste Auflistung der verwendeten Chemikalien, Präparier-, Isolier- und Verbrauchsmaterialien sowie der gebrauchten Geräte.

2.1. Blut-, Plasma-, Serumgewinnung und Heparinisierung

Die Blutentnahme erfolgte ausschließlich bei nicht rauchenden Probanden im Alter von 20-30 Jahren, die klinisch gesund waren, bei denen keine Störungen der Blutgerinnung bekannt waren und die mindestens zwei Wochen lang keine Medikamente eingenommen hatten, insbesondere keine Acetylsalicylsäure, oralen Kontrazeptiva und nichtsteroidale Antiphlogistika.

2.1.1. Blutentnahme und Serum- und Plasmagewinnung

Nach Hautdesinfektion und kurzer Stauung wurde eine große Kubitalvene am Arm mit einer Injektionskanüle (Venisystems Butterfly-M9) schonend punktiert und mehrmals 9ml Blut mit Neutralmonovetten für die Serumgewinnung und mit präparierten Heparinmonovetten für die Plasmagewinnung entnommen. Mit einer 1,2-ml-EDTA-Monovette wurde zusätzlich Blut für die Analyse des Blutbildes entnommen.

Nach der Blutentnahme wurden die Heparinmonovetten durch langsames Umschwenken mit dem Antikoagulant vermisch. Dann wurden sie sofort auf Eis gelegt und bei 4°C und 3000U/min 20 Minuten zentrifugiert.

Die Neutralmonovetten wurden nach einsetzender Gerinnung (20 Minuten nach der Entnahme) einer 30-minütigen Zentrifugation bei 3000 U/min unterzogen.

2.1.2. Herstellung von Heparinmonovetten zur Plasmagewinnung, 1IU/ml

Durch eine Verdünnung des handelsüblichen Liquemin[®] (5000 E/ml) von 1:500 mit

physiologischer Kochsalzlösung erhielt man eine Konzentration von 10 E/ml. Von dieser Verdünnung wurden je 0,9 ml unter sterilen Bedingungen in die zu verwendenden 9-ml-Neutralmonovetten pipettiert. Die Monovetten wiesen nach der Blutentnahme eine Heparinkonzentration von 1 IU/ml Volumen auf.

2.1.3. Herstellung von Heparinmonovetten zur Vollblutgewinnung, 3 IU/ml

Um eine Heparinkonzentration von 3 IU/ml Volumen zu erhalten wurde analog dem in Abschnitt 2.1.2. dargestellten Prozedere verfahren, wobei Liquemin[®] im Verhältnis 1:167 verdünnt werden musste.

2.2. Durchflusszytometrische Untersuchung der Mikropartikel

Das Plasma (1 IU/ml Heparin) und Serum von sechs verschiedenen Probanden wurde mit Materialien in Mikropartikelform inkubiert. Bestimmte Plasma- und Serumproteine, die sich auf der Oberfläche ablagern, wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes markiert (siehe Abschnitt *Indirekte Immunfluoreszenz*). Die im Durchflusszytometer entstandenen Fluoreszenzsignale wurden gemessen und entsprechend ihrer Intensität in Histogrammen weiter bearbeitet.

Indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz diente in dieser Studie dem Nachweis von adhärenenten Serum- und Plasmaproteinen auf den Mikropartikeln. Ein erster Antikörper (Primärantikörper, AK1) erkennt bestimmte antigene Determinanten der adhärenenten Blutproteine und bindet an diese. Ein zweiter Antikörper (Sekundärantikörper, AK2), der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, bindet seinerseits an antigene Determinanten des AK1.

2.2.1. Material

Untersucht wurden Polystyren und albuminbeschichtetes Polystyren, eine Legierung auf Kobaltbasis und cpTitan in Pulverform. Der Teilchendurchmesser betrug bei den Polystyrenpartikeln 10µm, bei den Metallkörnchen zwischen 10 und 20µm.

| <i>Abk.</i> | <i>Bezeichnung</i> | <i>Hersteller</i> |
|-------------|--|--|
| A | Titan (<i>cp</i> Titan, 99,6%, Ø 10 –20µm) | GtE Nürnberg, Deutschland |
| B | Kobaltlegierung “METCO” (<i>METCO</i> 68F-NS- 1HIGH CO, MO, HIGH CR ALLOY POWDER, Ø 10-20µm) | Metco Inc., Westbury/N.Y., USA |
| Cp | Polystyrenpartikel (Polybead polystyrene 10,0 micron microspheres) | Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, D |
| Ck | Karboxylierte Polystyrenpartikel (Polybead carboxylate microspheres 10µm) | Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, D |
| CkmA | Ck mit Aluminbeschichtung (Vorgehensweise bei der Beschichtung siehe Seite 17) | |

Tabelle 1: Testmaterialien für die durchflusszytometrische Analyse

Antikörper

Die gegen menschliche Blutproteine gerichteten Antikörper stammen aus Hasen (engl. rabbit), Ziegen (engl. goat) oder Schafen (engl. sheep). Die Sekundäntikörper richten sich gegen antigene Determinanten von Hasen oder Schafen und Ziegen.

| <i>Abk.</i> | <i>Bezeichnung</i> | <i>Hersteller</i> |
|---------------|--|---|
| C3c | Rabbit anti-human C3c-complement | DAKO, Glostrup, Dänemark |
| C3 | Goat antiserum to human complement C3 | ICN Biomedicals GmbH, Eschwege, D |
| C1-INH | Sheep-anti-human C1-inaktivator | Biodesign Dunn Labortechnik GmbH, Asbach, D |
| FOG | Goat-anti-human fibrinogen | Sigma, Deisenhofen, D |
| Fn | Goat antiserum to human fibronectin | ICN Biomedicals GmbH |
| HMWK | Goat-anti-human HMWK | Nordic, Tilburg, Niederlande |
| IgG | Rabbit anti-human IgG, specific for χ -chains | DAKO |

Tabelle 2: Primäntikörper (AK1)

| <i>Bezeichnung</i> | <i>Hersteller</i> |
|--|-------------------|
| Anti-goat IgG (whole molecule), FITC conjugate, developed in rabbit | Sigma |
| Anti-rabbit IgG (whole molecule), FITC conjugate, developed in goat | Sigma |

Tabelle 3: Sekundärantikörper (AK2)

2.2.2. Methode

In diesem Abschnitt sind die vorbereitenden Maßnahmen beschrieben, die der Inkubation der Mikropartikel in Serum und Plasma vorangehen (*Herstellung der Gebrauchslösungen und Albuminbeschichtung der karboxylierten Polystyrenpartikel*), wie auch das eigentliche Vorgehen zur Proteinmarkierung mit fluoreszenzaktiven Farbstoffen (*Fixierung und Immunfärbung der Mikropartikel*) und die Herstellung der Negativkontrollen.

2.2.2.1. Herstellung der Gebrauchslösungen

Die Herstellung der Gebrauchslösungen, die nötig sind für die Fixierung und Immunfärbung der oberflächenadsorbierten Proteine, erfolgte nach etablierten Verfahren in der Labordiagnostik und Immunfluoreszenzfärbung.

2.2.2.2. Albuminbeschichtung der karboxylierten Polystyrenpartikel

Zur Albuminbeschichtung von karboxylierten Mikropartikeln diente ein Set verschiedener Pufferlösungen und Reagenzien der Firma Polysciences Europe GmbH. Die Vorgehensweise zur Beschichtung und Lagerung der behandelten Mikropartikel erfolgte genau nach den Anweisungen des Herstellers. Die Menge des hinzugefügten Albumins entsprach der vom Hersteller angegebenen Höchstmenge von 400µg.

2.2.2.3. Inkubation der Mikropartikel mit Plasma und Serum

Die verschiedenen Materialien in annähernd gleichen Mengen wurden 60 Minuten bei 37°C mit 1 ml Serum/Plasma in Eppendorfcups inkubiert.

Zur Detektion von C3 und C3c benötigte man mit Serum inkubierte Partikel.

Für die Markierung von IgG, HMWK, C1-Inhibitor, Fibrinogen und Fibronectin dienten die mit Plasma inkubierte Materialien.

2.2.2.4. Fixierung und Immunfärbung der Mikropartikel für das durchflusszytometrische Auswertungsverfahren (siehe Abbildung 3 auf Seite 19)

Nach der einstündigen Inkubation in Serum/Plasma wurden die Partikel dreimal mit TBS/EDTA (0,05M TBS/20mM EDTA, pH 7,4) gewaschen. Es folgte eine 60-minütigen Fixierung bei 10°C durch eine Paraformaldehydlösung (4% PFA in 0,05M PBS/pH 7,4) worauf die Partikel dreimal mit TBS (0,05M, pH 7,4) gewaschen wurden. Um verbliebene Aldehydgruppen zu inaktivieren wurden die Partikel dann 30 Minuten bei RT mit einer Glycinlösung (3,75% Glycin in 0,05M TBS/pH 7,4) versetzt.

Zur Eliminierung unspezifischer Bindungen wurden die Partikel 60 Minuten bei 37°C mit Blockierungslösung (0,1% CWFS Gelatine, 5% BSA, 5% Normalserum aus Hase/Ziege in 0,05M TBS/pH 7,4) inkubiert. Das Normalserum, das für die Blockierungslösung verwendet wurde, stammte aus derselben Tierart, aus der der Sekundärantikörper gewonnen wurde.

Nach einmaligem Waschen mit TBS wurden die Mikropartikel eine Stunde bei 37°C mit dem Primärantikörper (Konzentration 1:500) inkubiert. Nach viermaligem Waschen erfolgte die Inkubation der Mikropartikel mit dem Sekundärantikörper (Konzentration 1:200) bei 37°C. Abschließend wurden die Partikel fünfmal mit TBS gewaschen. Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die Mikropartikel in TBS gegeben und solange lichtgeschützt in Falconröhrchen aufbewahrt bis die Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer gemessen wurde.

2.2.2.5. Antikörperkonzentration und Pufferlösung

Die Konzentration der Primärantikörperflüssigkeit betrug 1:500. In der Sekundärantikörperlösung lag eine Konzentration von 1: 200 vor.

Voruntersuchungen hatten ergeben, dass aus einer Erhöhung der Antikörperkonzentration in der Primär- und Sekundärantikörperlösung (0,2% CWFS Gelatine, 1% BSA, 1%

Normalserum aus Hase/Ziege in 0,05M TBS/pH 7,4) keine Fluoreszenzintensitätsunterschiede resultieren.

Das Normalserum, das für die Antikörperpufferlösung verwendet wurde, stammte aus derselben Tierart, aus der der Sekundärantikörper gewonnen wurde.

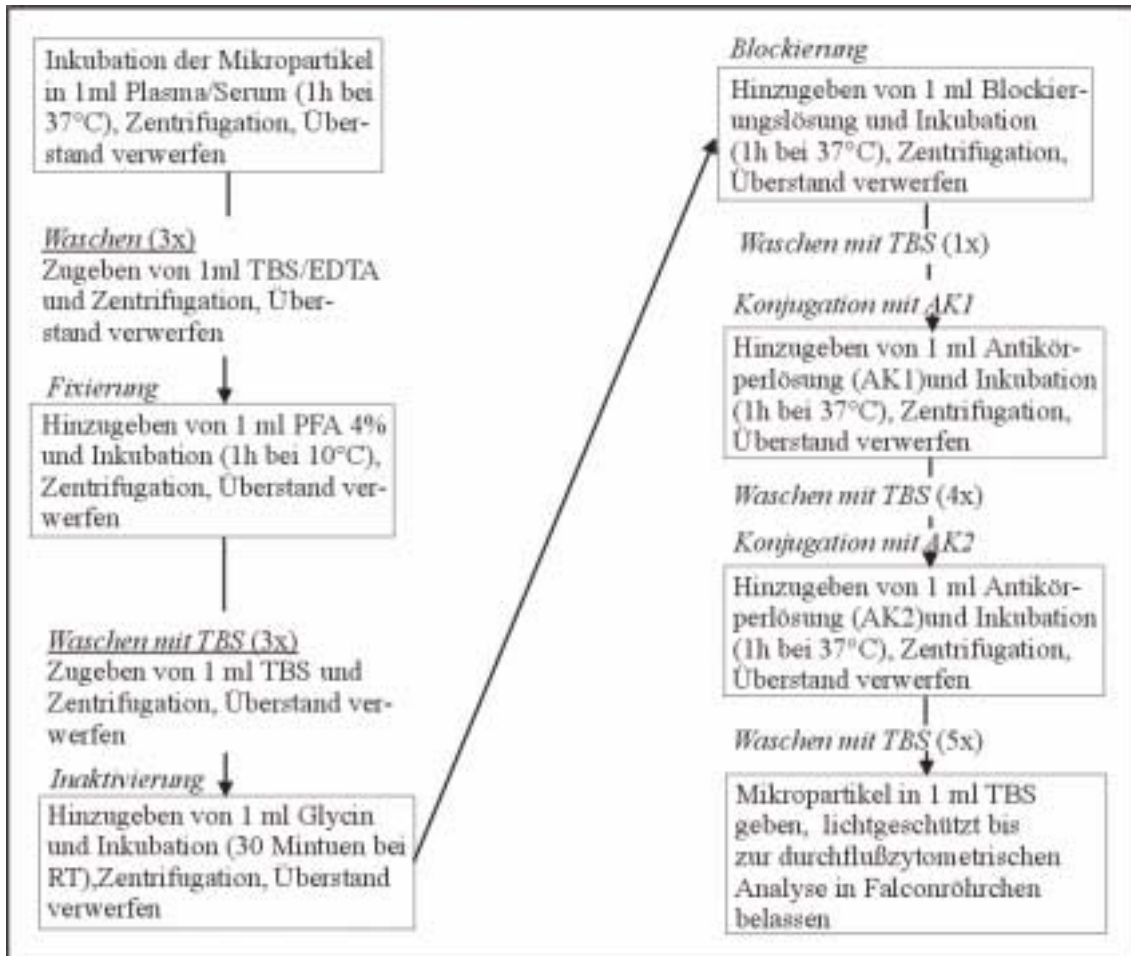


Abbildung 3: Vorgehensweise zur Fixierung und Immunfärbung der Mikropartikel.

2.2.2.6. Negativkontrolle

Zu jeder Mikropartikelanalyse wurde eine Negativkontrolle durchgeführt. Dabei wurden Mikropartikel durchflußzytometrisch untersucht, die nicht fluoreszenzmarkiert waren.

Die Vorbereitung der Mikropartikel für die Negativkontrolle erfolgte parallel und nahezu identisch zur Fixierung und Immunfärbung der Mikropartikel, jedoch ohne Inkubation in Primärantikörperlösung.

2.2.3. Datenauswertung und Darstellung der Ergebnisse

2.2.3.1. Die durchflusszytometrische Analyse

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen erfolgten an einem Durchflusszytometer der Firma Becton-Dickinson (Becton-Dickinson Facscan, Labor der Universitäts-Frauenklinik Tübingen). Um ein Absinken der Metallpartikel zu verhindern und damit einen konstanten Partikelfluss zu gewährleisten, war unter der Ansaugvorrichtung des Geräts ein Magnetrührer positioniert und ein Rührfischchen in die zu messenden Suspensionen gegeben, das die Messobjekte gleichmäßig in der Trägerflüssigkeit verteilte. Von jeder vorbereiteten Probe, einschließlich den Negativkontrollen, wurden 10 000 Mikropartikel gemessen. Die Einstellungen des Gerätes waren so gewählt, dass in einem Punktwolkenhistogramm (engl. dot plot, siehe Abbildung 4, Seite 21) eine gut dargestellte Signalwolke gezeichnet wurde und die Fluoreszenzergebnisse aus der einparametrischen Histogrammanalyse nachbearbeitet werden konnten.

2.2.3.2. Gerätespezifische Einstellungen und Softwareanwendung

Zur Auswertung und Aufnahme von Daten am Durchflusszytometer diente das Anwendungsprogramm Lysis II von Becton-Dickinson. Lysis II besitzt zur Messung von Fluoreszenz- und Streulichtintensitäten den sogenannten „Acquisition Mode“ und zu deren Auswertung den „Analysis Mode“. Die genauen gerätespezifischen Einstellungen und deren Erläuterung befinden sich im Anhang (Kapitel III.2., Seite 52ff.).

Darstellung der Ergebnisse im Acquisition Mode

Die im Durchflusszytometer ermittelten Daten werden in Histogrammen dargestellt. Für die Einfarbenimmunfluoreszenzmessung findet eine Histogramm- oder Häufigkeitsverteilung wie in Abbildung 5, Seite 22 dargestellt Verwendung. Die digitalisierten Werte

einer Messung können bei einer Auflösung von 1024 Klassen Klassenwerte von 0 bis 1023 einnehmen. Jedes gemessene Ereignis wird mit steigender Intensität einer Klasse oder Kanalnummer (engl. channel) von 0 bis 1023 zugeordnet. Die Messwerte fallen gleichsam wie Kugeln in das jeweils ihnen entsprechende Register.

Für die Darstellung der Streulichteigenschaften werden Punktehistogramme verwendet. Abbildung 4 zeigt ein Punktehistogramm nach der Datenerfassung im Acquisition Mode, wobei ein Punkt die Werte zweier Parameter (Vorwärts- und Seitwärtsstreuung) für ein Ereignis repräsentiert.

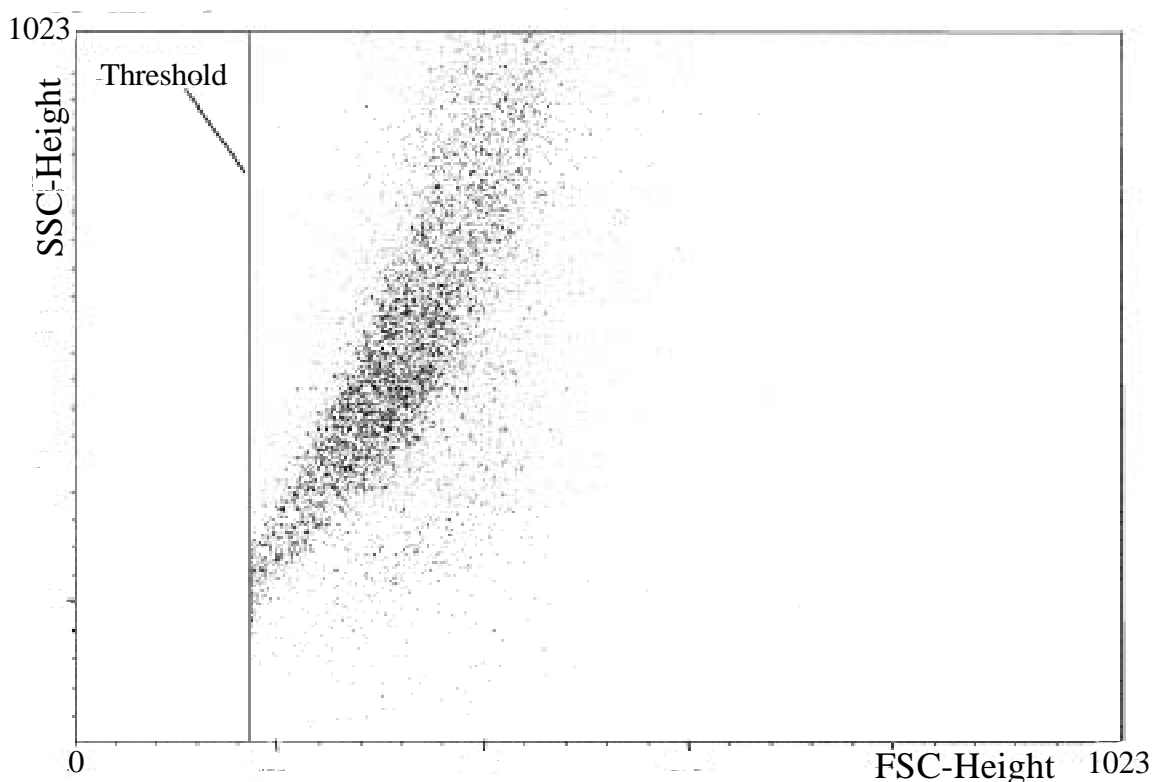


Abbildung 4: Dot Plot nach der Datenerfassung im Acquisition-Mode [channel]. Die Ordinate stellt die Intensität des Seitwärtsstreulichts (SSC) und die Abszisse die des Vorwärtsstreulichts (FSC) dar. Jeder Punkt repräsentiert einen Mikropartikel mit den für ihn charakteristischen Streulichteigenschaften. Insgesamt stellen sich die Streulichtsignale der Partikel nach Einstellung der idealen Detektorempfindlichkeit in einer Punktwolke dar (Threshold bei 172, Erklärung siehe Anhang (Kapitel III.2., Seite 52ff.)).

Bearbeitung im Analysis Mode

Bestandteil der Nachbearbeitung war es, die Häufigkeitsverteilung im Histogramm (Abbildung 5) beidseits mit Markierungen einzugrenzen, um möglichst wenig störende, nicht von fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern kommende, Signale zu erfassen.

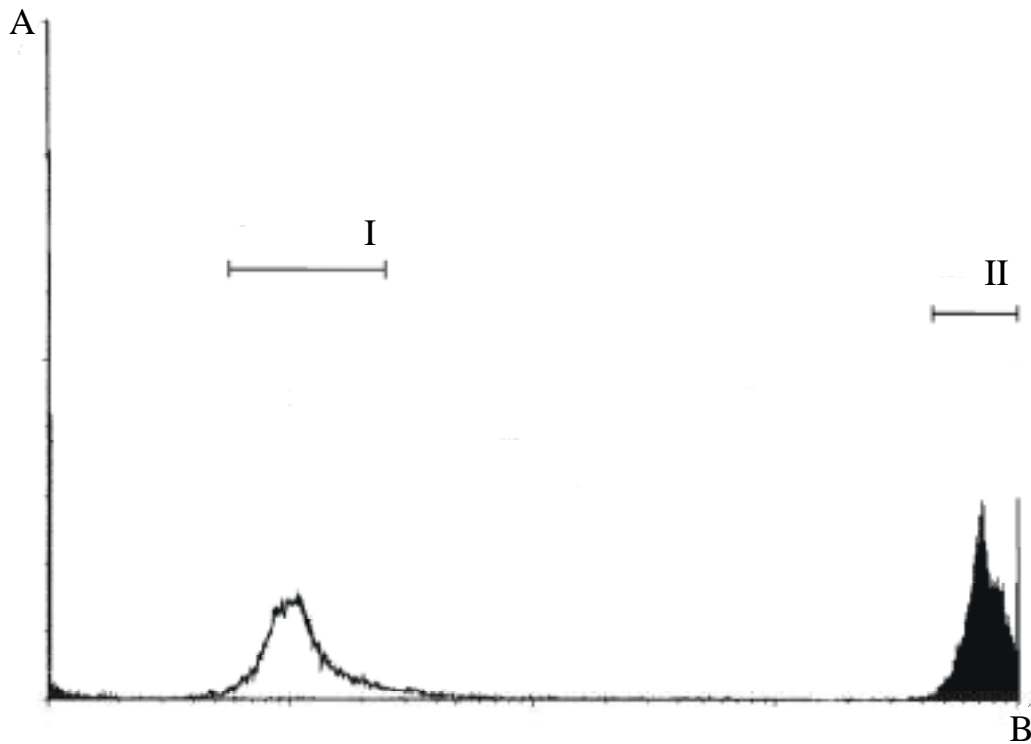


Abbildung 5: Darstellung der Fluoreszenzintensität von Mikropartikeln nach Fluoreszenzfärbung (II) und der Fluoreszenzintensität der dazugehörigen Negativkontrolle (I) in Form eines Histogramms. Das Histogramm stellt die Menge von Partikeln mit gleichen Fluoreszenzeigenschaften auf der Ordinate A und die Höhe dieser Fluoreszenz auf der Abszisse B dar. Dabei ist nicht nur graphisch der Unterschied zwischen Negativkontrolle und eigentlicher Messung erkennbar, sondern auch numerisch in Tabelle 4, Seite 23. Dort beträgt die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (mean) des eingegrenzten Bereichs I 11,36 (Negativkontrolle) und von Bereich II 7334,71. Hier sind die Fluoreszenzintensitäten nicht in Kanalnummern angegeben, sondern in linearen Werten zwischen 1 und 10 000. Die Formel für die Umrechnung befindet sich im Anhang (Kapitel III.3., Seite 55).

Nachfolgend diente die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der gemessenen Ereignisse (gleichbedeutend mit der durchschnittlichen Kanalnummer, engl. mean) dieses eingegrenzten Bereichs der statistischen Weiterbearbeitung. Darüberhinaus bietet die tabellarische Darstellung (Tabelle 4) der ermittelten Daten eine Reihe anderer Aspekte, die aber für die Weiterbearbeitung in dieser Studie nicht relevant waren. Zur Vollständigkeit und zum besseren Verständnis sind sie in der Legende zu Tabelle 4 erläutert.

| <i>M</i> | <i>Left</i> | <i>Right</i> | <i>Peak</i> | <i>PkChl</i> | <i>Mean</i> |
|----------|-------------|--------------|-------------|--------------|----------------|
| I | 5,62 | 24,80 | 3 | 6,49 | 11,36 |
| II | 4450 | 9910 | 237 | 9910 | 7334,71 |

Tabelle 4: Fluoreszenzintensitäten in linearen Werten. „Left“ gibt den Wert der linken Begrenzung an, „Right“ den Wert der rechten Begrenzung. Der „Peak“ gibt die Anzahl der Ereignisse am höchsten Punkt innerhalb des Histogramms an, der „PeakChl“ die Fluoreszenzintensität des Peak. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität aller Ereignisse spiegelt der „Mean“ wieder.

2.2.3.3. Auswertung

Durch die beidseitige Eingrenzung der Fluoreszenzsignale in Histogrammen wurden etwa 80 % der gemessenen Ereignisse erfasst. Die in diesen Grenzen ermittelten durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten wurden mit Microsoft® Excel 97 weiter bearbeitet. Von den sechs Fluoreszenzwerten (Einheit: Kanalnummer, engl. channel) wurde das arithmetische Mittel und die Standardabweichung (Standardabweichung ausgehend von einer Stichprobe) errechnet und tabellarisch dargestellt. Die Ergebnisse befinden sich in Tabelle 7, Seite 31.

2.3. Komplementaktivierung in Wellplatten

Nach 15-, 60- und 120-minütiger Inkubation verschiedener Materialien mit menschlichem Plasma (Heparinisierung 1 IU/ml Plasma) wurde die Menge an generiertem Komplementfaktor sC5b-9 (TCC) mit Hilfe eines enzymgekoppelten Immunoassay (EIA) bestimmt.

2.3.1. Material

Untersucht wurden Titan, Titan mit unterschiedlichen Beschichtungen, Edelstahl (remanium[®] 2000) mit zwei verschiedenen Rauigkeiten und PVC.

| <i>Abk.</i> | <i>Bezeichnung</i> | <i>Hersteller</i> |
|-------------|---|--------------------------------------|
| 1 | Titan (Reinheitsgrad 99,6%) | Goodfellow, Bad Nauheim, D |
| 2 | Titan mit DLC-Beschichtung | siehe Anhang (Kap. III.4., S. 55ff.) |
| 3 | Titan mit Teflon-I-Beschichtung | |
| 4 | Titan mit Teflon-II-Beschichtung | |
| 5 | Titan mit Silizium-I-Beschichtung | |
| 6 | Titan mit Silizium-II-Beschichtung | |
| 7 | remanium[®] 2000 | Dentaurum, Ispringen, D |
| 8 | remanium[®] 2000 p | |
| 9 | PVC | |

Table 5: Testmaterialien für die Komplementaktivierung in Wellplatten.

2.3.2. Methode

Zuerst erfolgte das Reinigen und Desinfizieren der Plättchen und Silikonschlauchstücke durch Einlegen in 70-prozentigen und 100-prozentigen Ethylalkohol für je 30 Minuten. Die gereinigten Plättchen wurden in drei sterile Wellplatten gelegt. Mit den Silikonschlauchstücken wurde das Probenmaterial gegen die Wellplattenwand isoliert.

Jeweils 2ml des Plasmas wurden direkt nach der Blutentnahme und Gewinnung in die Wells gegeben. Abbildung 6, Seite 25 zeigt den schematischen Versuchsaufbau.

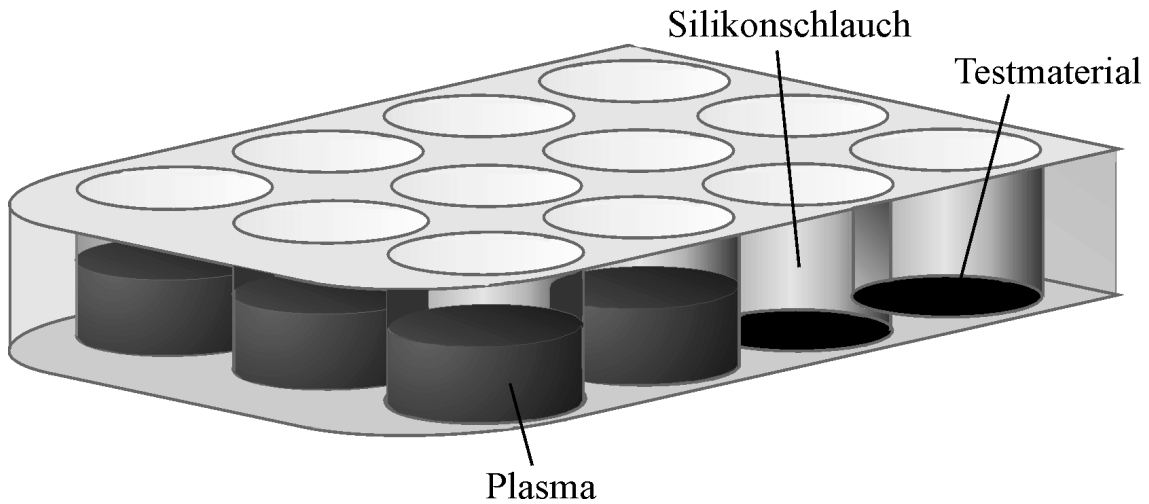


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer 12-Wellplatte. Die vorderen Wells beinhalten Plasma. Die Wände der Wells sind mit Silikonschlauchstücken ausgekleidet. Plasma kam nur mit dem Silikonschlauch und dem am Wellboden liegenden Testmaterial in Kontakt.

Die mit einem Deckel versehenen Wellplatten wurden unter moderaten Schwenkbewegungen bei 37°C (Polymax 1040 und Inkubator 1000 der Firma Heidolph) unterschiedlich lange inkubiert.

Nach 15 Minuten erfolgte das Abstoppen der Reaktion in der ersten Wellplatte durch Zugabe von EDTA (200µl). Das Plasma wurde entnommen, aliquotiert (200 µl) und in flüssigem N₂ schockgefroren. Mit dem Plasma der verbleibenden zwei Wellplatten wurde nach 60 Minuten und 120 Minuten in gleicher Weise verfahren.

Der bei der Inkubation entstandene lösliche Komplementfaktor sC5b-9 wurde mit Hilfe eines EIA (sC5b-9 EIA, Quidel) bestimmt. Die EIA-Analyse erfolgte streng nach Herstellerangaben.

EIA

Das Quidel[®] sC5b-9 (TCC) Enzyme Immunoassay misst die Menge an TCC, die in menschlichen Plasma- oder Serumproben oder in anderen biologischen Flüssigkeiten

oder Versuchsproben gefunden werden. Es gibt damit Aufschluss über den Status der ablaufenden Komplementaktivierung.

Prinzipien des EIA-Prozedere

Die Messung erfolgt in 3 Schritten unter Verwendung

1. einer mit monoklonalen Mouse-Antikörpern beschichteten Mikroassay-Platte, die spezifisch sC5b-9 bindet,
2. HRP- konjugierten Antikörpern mit antigenen Eigenschaften zu sC5b-9 und
3. einem chromogenen Substrat.

Im ersten Schritt wird die sC5b-9-haltige Probe auf die mit Antikörpern gegen sC5b-9 versehene Mikroassayplatte gegeben. Damit werden sC5b-9 Proteine stationär gebunden. Im zweiten Schritt werden Meerrettich-Peroxidase-konjugierte (engl. horseradish peroxidase, kurz HRP) Antikörper hinzugefügt, die an sC5b-9-Antigene und damit an die bereits stationär gebundenen sC5b-9-Komplexe binden. Als dritter Schritt erfolgt das Hinzufügen von chromogenem Enzymsubstrat, das mit HRP-Antikörpern reagiert und mit diesem eine grüne Farbe bildet. Nach Abstoppen der Reaktion wird die Farbin- tensität spektroskopisch gemessen, wobei die Intensität proportional zur Konzentration von sC5b-9 ist. Zwischen den Schritten 1 und 2, sowie den Schritten 2 und 3 werden nach einer Inkubationszeit die ungebundenen Überstände durch einen Waschgang entfernt.

2.3.3. Datenauswertung und Darstellung der Ergebnisse

Das Plasma von sechs Probanden wurde zur Inkubation und sC5b-9-Bestimmung verwendet. Die dargestellten Werte ergaben sich aus der Berechnung des arithmetischen Mittels und der Standardabweichung (Standardabweichung ausgehend von einer Stich- probe). Die Darstellung erfolgte mit Hilfe von Microsoft® Excel 97. Die Ergebnisse sind Kapitel 3.2., Seite 32f. und Abbildung 7, Seite 33 zu entnehmen.

2.4. Mikropartikel in Vollblut

Die zu untersuchenden Materialien waren neben *cpTitan*, Metco und Polystyren (siehe *Durchflusszytometrische Untersuchung der Mikropartikel*, Tabelle 1, Seite 16), Glas und eine Legierung auf Nickelbasis in Pulverform. In Tabelle 6 sind die Testmaterialien aufgeführt. Die Mikropartikel wurden in Eppendorfcups mit heparinisiertem menschlichen Vollblut inkubiert. Über die EIA-Analyse wurde die PMN-Elastase-Konzentration nach einstündiger Inkubation ermittelt. Die PMNE-Konzentration in Vollblut gibt Aufschluss über den Aktivierungsgrad der Granulozyten.

Die bei der Inkubation entstandene PMN-Elastase-Konzentration wurde mit Hilfe eines EIA (Merck) bestimmt. Die EIA-Analyse erfolgte streng nach Herstellerangaben.

2.4.1. Material

| <i>Abk.</i> | <i>Bezeichnung</i> | <i>Hersteller</i> |
|-------------|--|---|
| A | Titan (<i>cpTitan</i> , Reinheitsgrad 99,6% Ø 10 – 20µm) | GtE Nürnberg, D |
| B | Co-Legierung Metco (<i>METCO 68F-NS-1HIGH CO, MO, HIGH CR ALLOY POWDER</i> , Ø10-20µm) | Metco Inc., Westbury/ N.Y., U.S.A. |
| Cp | Polystyrenpartikel (Polybead polystyrene 10,0 micron microsperes) | Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, D |
| D | Glas (Ø 3-10µm) | Polysciences Europe GmbH |
| E | Ni-Legierung (Ø 10-20µm) | Imply GmbH, Düsseldorf, D |

Tabelle 6: Testmaterialien für die Inkubation in Vollblut und EIA-Analyse.

2.4.2. Methode

Das Blut wurde mit Heparinmonovetten (3 IU/ml) entnommen. Anschließend wurden jeweils 1,5 ml des heparinisierten Blutes in Eppendorfcups mit nahezu gleichen Mengen an Mikropartikeln gegeben.

Für jedes Testmaterial wurden fünf gleiche Eppendorfcups benötigt um für die EIA-Analyse eine ausreichende Menge an Plasma zu erhalten. Die Eppendorfcups wurden auf einem Rüttler (Vortex) leicht durchmischt und im Polymax-Inkubator bei 37°C 60 Minuten inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das Blut in 1,4ml-Citrat-Monovetten gegeben. Nach Zentrifugation (3000 U/min, 20 Minuten, 4°C) und Aliquotierung (200µl) wurde das Plasma in flüssigem N₂ schockgefroren und bis zur Auswertung bei -20°C gelagert.

2.4.3. Datenauswertung und Darstellung der Ergebnisse

Die Bestimmung der PMNE-Konzentration erfolgte nach Inkubation der Materialien mit Blut von sieben verschiedenen Probanden. Anschließend wurde daraus das arithmetische Mittel und die Standardabweichung (Standardabweichung ausgehend von einer Stichprobe) errechnet und mit Microsoft[®] Excel 97 graphisch dargestellt. Die Ergebnisse sind Abbildung 8, Seite 34 zu entnehmen.

2.5. Taktile und visuelle Oberflächenanalyse

Mit Hilfe eines Tastnadelgerätes und rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden die Oberflächenmorphologie der Metallplättchen taktil und visuell untersucht.

2.5.1. Messung der Oberflächenbeschaffenheit nach DIN-Norm

Die Oberflächenanalyse der Plättchen wurde mit einem Tastnadelgerät (Perthometer SP6, Perthen Co, Göttingen) und einer Tastnadel in Form einer kegelförmigen 90°-Diamantspitze mit einem Tastschnittradius von 10 µm auf einer Messstrecke (l_m) von 10 mm durchgeführt. Gemessen wurde nach DIN 4768 die gemittelte Rauhtiefe (R_z), die maximale Rauhtiefe (R_{max}) und der Mittelrauhwert (R_a). Nach DIN 4774 wurde die

Wellentiefe (W_t) und nach DIN 4771 die Profiltiefe (P_t) bestimmt. Die Oberflächenmessungen wurden an drei unterschiedlichen Stellen des Prüfkörpers vorgenommen.

Die gemittelte Rauhtiefe (R_z) ist der Mittelwert aus den Einzelrauhtiefen fünf aufeinanderfolgender Einzelmessstrecken im Rauheitsprofil. Die maximale Rauhtiefe (R_{max}) ist dabei die größte der fünf Einzelrauhtiefen. Der Mittenrauhwert (R_a) ist der geometrische Mittelwert aller Abweichungen des Rauheitsprofils von der Mittellinie innerhalb der Gesamtmessstrecke l_m . Die Wellentiefe (W_t) ist der senkrechte Abstand zwischen höchstem und tiefstem Punkt des Welligkeitsprofils W innerhalb der Gesamtmessstrecke l_m . Die Profiltiefe ist der Abstand zwischen zwei parallelen Begrenzungslinien, die das Profil innerhalb der Messstrecke l_m kleinstmöglich einschließen.

Die Prüfbjekte wurden mit handelsüblicher Knetmasse auf einem Träger befestigt und dann mit Hilfe einer Prüfkörperpresse parallel zur Tischebene ausgerichtet. Durch diese Fixierung konnte die vertikale Lage des Prüfkörpers und damit die gleichbleibende Entfernung der Tastnadel zur Oberfläche während der Analyse gewährleistet werden.

Darstellung der Messergebnisse

Die Messergebnisse der Oberflächenparameter wurden mit Microsoft[®] Excel 97 in Tabellenform gebracht und graphisch dargestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung Abbildung 9, Seite 57 dargestellt.

2.5.2. Elektronenmikroskopische Darstellung der Oberfläche

Zusätzlich zur DIN-genormten Oberflächenanalyse wurden im Labor für Elektronenmikroskopie, Zoologisches Institut der Universität Tübingen REM-Aufnahmen der Testmaterialien angefertigt.

Für diese Untersuchung wurden die Metallplättchen auf einen REM-Probenhalter fixiert und mit 99,9%-igem Alkohol gereinigt. Anschließend wurden die Proben mit einem Tropfen Silberleitlack versehen, um sie für die elektronenoptische Bearbeitung elektrisch leitfähig zu machen.

Die Aufnahmen sind in Abbildung 10, Seite 58 dargestellt.

3 Ergebnisse

Die Angabe der Standardabweichung erfolgt in der Einheit des zugehörigen Mittelwerts. Ihrer Berechnung liegt die allgemeine Formel für die Standardabweichung ausgehend von einer Stichprobe zugrunde:

$$G_{n-1} = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

3.1. Durchflusszytometrische Untersuchungen der Mikropartikel

Zur Mengenbestimmung der adsorbierten Proteine nach Inkubation von verschiedenen Materialien in Plasma und Serum wurden die Proteine mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern konjugiert. Die dann im Durchflusszytometer ermittelten Fluoreszenzintensitäten waren Gegenstand der statistischen Nachbearbeitung. Nachfolgend ist der arithmetische Mittelwert von sechs Messungen dargestellt mit Ausnahme der karboxylierten Polystyrenpartikel, bei denen vier Messungen durchgeführt wurden. Die tabellarische Zusammenfassung der durchschnittlichen Fluoreszenzwerte (Einheit: Kanalnummer, engl. channel) ist Tabelle 7, Seite 31 zu entnehmen.

Titan zeigte bei allen untersuchten Parametern höhere Fluoreszenzintensitäten als bei der Kobaltlegierung. Mit einem Titanwert von $549,7 \pm 311,9$ (n=6) lag HMWK dabei nicht nur über dem Wert der Kobaltlegierung ($333,1 \pm 87,3$; n=6), sondern sogar über dem Wert von Polystyren ($398,5 \pm 32,8$; n=6) und den karboxylierten Polystyrenpartikeln mit Albuminbeschichtung ($422,9 \pm 87,9$; n=4).

Ähnlich waren die Relationen bei Betrachtung des Adsorptionsverhaltens beim C1-Inhibitor. Der Wert für Titan ($399,0 \pm 12,0$; n=6) lag über den Werten der Kobaltlegie-

nung ($108,8 \pm 20,5$; $n=6$) und Polystyren ($343,2 \pm 28,9$; $n=6$). Der höchste C1-Inhibitor-Wert ergab sich aber mit $601,6 \pm 68,5$ ($n=4$) bei „Polystyren mit Albumin“ (CkmA).

Unbeschichtetes Polystyren hatte bei allen anderen analysierten Parametern eine weit- aus höhere Fluoreszenzintensität vorzuweisen als Titan und die Kobaltlegierung. Polystyren untersucht auf die Adsorption von IgG zeigte den Wert $528,0 \pm 51,6$ ($n=6$), Titan hatte eine durchschnittliche Kanalnummer von $474,5 \pm 28,72$ ($n=6$) und IgG-Fluoreszenzen waren an der Kobaltlegierung ($268,0 \pm 8,8$; $n=6$) kaum nachweisbar.

Gleiches galt für den Nachweis von Fibronectin. Außer bei Polystyren ($437,7 \pm 23,3$; $n=6$) und CkmA ($650,4 \pm 7,7$; $n=4$) waren die Werte der Materialien A und B sehr klein.

| | A (n=6) | B (n=6) | Cp (n=6) | CkmA (n=4) |
|------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| C3 | 495,1 ± 41,6 | 314,7 ± 53,6 | 853,7 ± 19,2 | 996,3 ± 3,8 |
| Negativkontrolle | 41,6 | 35,8 | 19,2 | 556,8 |
| C3c | 547,8 ± 58,6 | 335,2 ± 44,1 | 826,0 ± 33,9 | 996,4 ± 8,1 |
| Negativkontrolle | 50,2 | 28,31 | 232,57 | 292,37 |
| C1-INH | 399,0 ± 12,0 | 108,8 ± 20,5 | 343,2 ± 28,9 | 601,6 ± 68,5 |
| Negativkontrolle | 50,15 | 44,34 | 270,66 | 529,76 |
| IgG | 474,5 ± 28,7 | 268,0 ± 8,8 | 528,0 ± 51,6 | 828,8 ± 81,8 |
| Negativkontrolle | 45,1 | 27,5 | 244,5 | 490,22 |
| HMWK | 549,7 ± 311,9 | 333,1 ± 87,3 | 398,5 ± 32,8 | 422,9 ± 80,1 |
| Negativkontrolle | 43,59 | 57,7 | 247,93 | 319,42 |
| FOG | 558,6 ± 49,3 | 441,1 ± 59,9 | 935,5 ± 18,7 | 645,2 ± 88,5 |
| Negativkontrolle | 39,0 | 47,3 | 251,5 | 303,5 |
| Fn | 310,5 ± 170,8 | 237,1 ± 9,4 | 437,7 ± 23,3 | 650,4 ± 7,7 |
| Negativkontrolle | 36,6 | 62,2 | 259,7 | 471,0 |

Tabelle 7: Durchschnittliche Fluoreszenzwerte \pm SD/Negativkontrolle [channel] aus sechs/vier Messungen aller Parameter und Materialien (A: cpTitan; B: Co-Legierung; Cp: Polystyren; CkmA: karboxylierte Polystyrenpartikel mit Albuminbeschichtung).

Die höchste Fluoreszenz wiesen Polystyrenpartikel/karboxylierte Polystyrenpartikel mit Albuminbeschichtung auch beim Parameter C3c auf. Mit einer durchschnittlichen Fluoreszenzintensität von $826,0 \pm 33,9$ ($n=6$) für Cp und $996,4 \pm 8,1$ ($n=4$) für CkmA lagen sie über den Werten von Titan ($547,8 \pm 58,6$; $n=6$) und der Kobaltlegierung ($335,2 \pm 45,0$; $n=6$).

Auch Komplementfaktor C3 zeigte den höchsten Wert bei Polystyren ($853,7 \pm 19,2$; $n=6$), Titan ($495,1 \pm 41,6$; $n=6$) lag deutlich darunter. Die Fluoreszenzintensität war bei der Kobaltlegierung ($314,7 \pm 53,6$; $n=6$) noch geringer.

Beobachtet wurden bei den karboxylierten Polystyrenpartikeln mit Albuminbeschichtung in fast allen Fällen sehr viel höhere Fluoreszenzintensitäten als bei den anderen Materialien einschließlich der unbeschichteten Polystyrenpartikel.

Die karboxylierten Polystyrenpartikel mit Albuminbeschichtung zeigten bei Fibrinogen mit $645,2 \pm 88,5$ ($n=4$) einen niedrigeren Wert als die Polystyrenpartikel ($437,7 \pm 23,3$; $n=6$).

3.2. Komplementaktivierung in Wellplatten

In diesem Versuchsabschnitt wurde die Aktivierung des Komplementsystemkomplex sC5b-9 in Plasma nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit verschiedenen Materialien und deren Oberflächenmodifikationen gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7, Seite 33 dargestellt.

Die erste Messung nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten zeigte keine großen Unterschiede in der Aktivierung von sC5b-9 durch die unterschiedlichen Materialien.

Erste Differenzen waren nach 60 Minuten Inkubationszeit zu erkennen. Dabei blieb die durch Titan/Teflon I ($444,88 \pm 193,16$; $n=6$) und Titan/Teflon II ($530,03 \pm 228,1$; $n=6$) induzierte Aktivierung unter der von Titan ($722,02 \pm 208,4$; $n=6$), das den höchsten Wert von allen Materialien aufwies. Die siliziumbeschichteten Titanplatten (Titan/Silizium I : $480,0 \pm 333,39$; $n=6$ / Titan/Silizium II: $691,39 \pm 456,89$; $n=6$) und remanium® 2000 ($699,68 \pm 393,75$; $n=6$) zeigten keine merklichen Unterschiede in der sC5b-9-Generierung gegenüber Titan. Dagegen ergab die Inkubation mit Titan/DLC ($539,25 \pm 221,07$; $n=6$) eine geringere Aktivierung. Im gleichen Bereich lagen remanium® 2000 p ($585,53 \pm 90,65$; $n=6$) und PVC ($553,52 \pm 372,23$; $n=6$).

Nach 120 Minuten Inkubationszeit hob sich die Aktivierung durch remanium® 2000 ($2629,53 \pm 1067,57$; $n=6$) deutlich von denen durch Titan/Teflon I ($1742,98 \pm 912,99$; $n=6$) und Titan/Teflon II ($1662,47 \pm 443,52$; $n=6$), Titan/DLC ($1563,57 \pm 270,02$; $n=6$),

Titan/Silizium I ($1942,65 \pm 744,95$; $n=6$) und PVC ($1666,6 \pm 681,82$; $n=6$) hervorgerufenen sC5b-9-Konzentrationen ab. Titan/Silizium II zeigte die geringste Aktivierung ($1434,73 \pm 559,22$; $n=6$). Die Aktivierung durch Titan betrug $1869,18 \pm 543,01$ ($n=6$), der Wert für remanium[®] 2000 p war $1647,45 \pm 344,42$ ($n=6$).

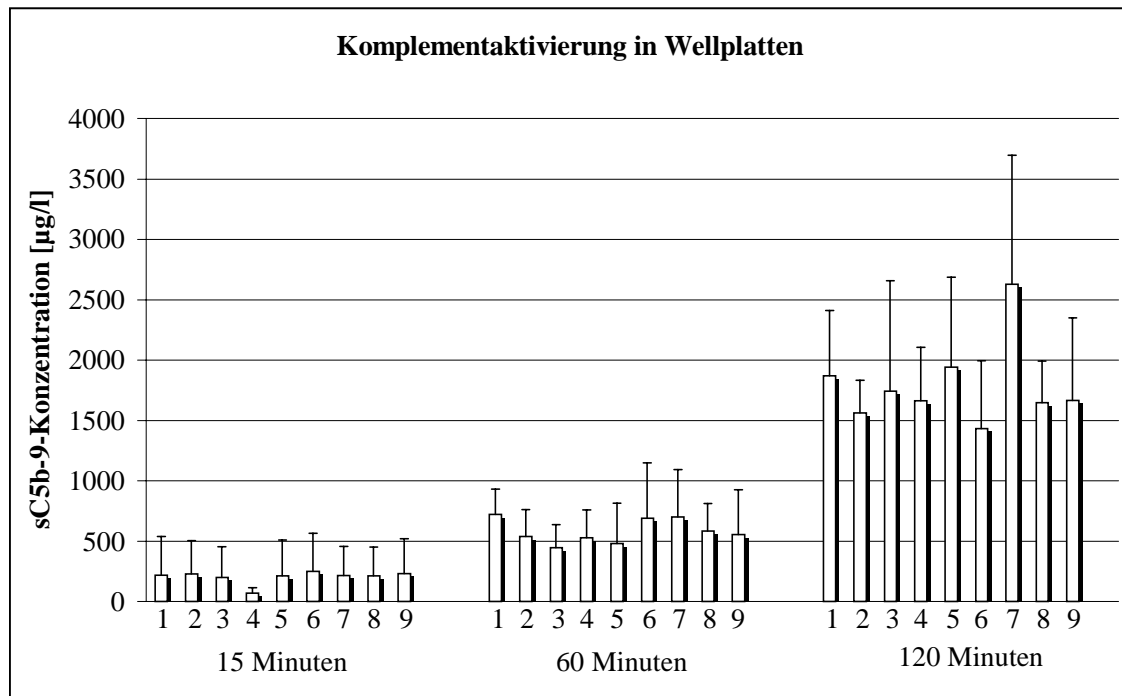


Abbildung 7: Durchschnittliche sC5b-9-Konzentrationen \pm SD ($n=6$) [$\mu\text{g/l}$] nach 15, 60 und 120 Minuten Inkubationszeit verschiedener Materialien in menschlichem Plasma. (1: Titan; 2: Titan/DLC; 3: Titan/Teflon I; 4: Titan/Teflon II; 5: Titan/Silizium I; 6: Titan/Silizium II; 7: remanium[®] 2000; 8: remanium[®] 2000 p; 9: PVC).

3.3. Mikropartikel in Vollblut

Nach einstündiger Inkubation verschiedener Materialien in Pulverform mit hepariniertem Vollblut wurde die Konzentration von PMN-Elastase (PMNE) mit Hilfe eines EIA ermittelt. Abbildung 8, Seite 34 zeigt die durchschnittlichen PMNE-Konzentrationen von sieben Durchgängen. Der gemittelte Leerwert wurde aus vier Messungen errechnet.

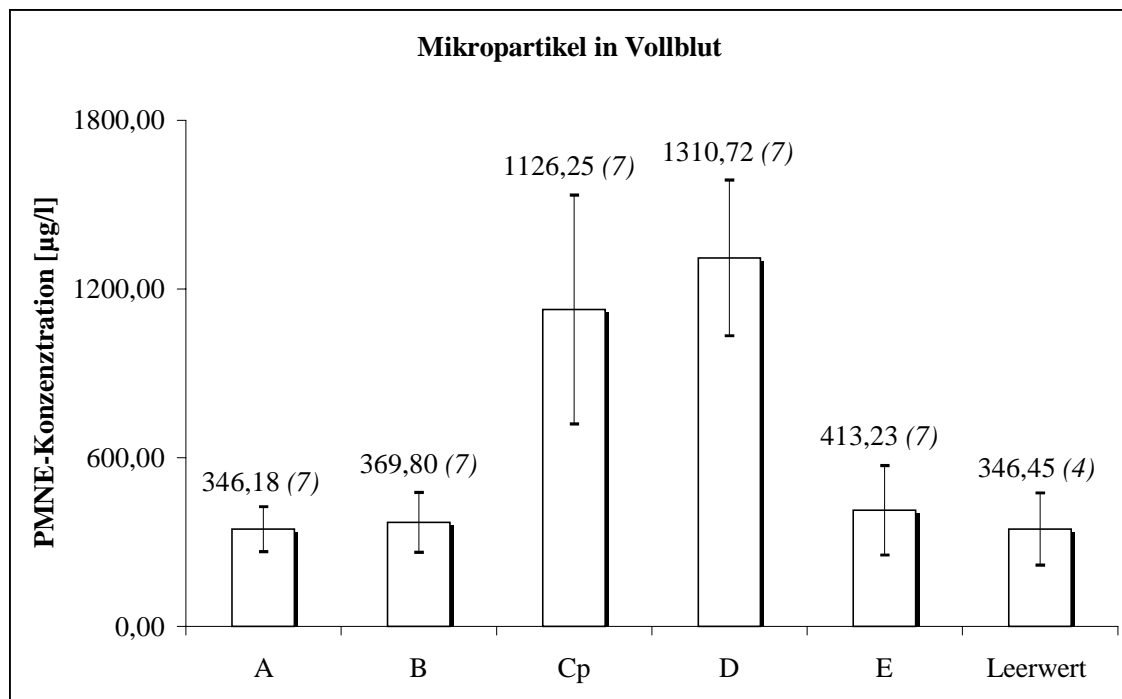


Abbildung 8: Durchschnittliche PMN-Elastase-Konzentrationen \pm SD ($n=7/4$) [$\mu\text{g/l}$] nach einstündiger Inkubation von Mikropartikeln in Vollblut (A: Titan; B: Co-Legierung; Cp: Polystyren; D: Glas; E: Ni-Legierung)

Dabei war die PMNE-Konzentration in menschlichem Vollblut nach einstündigem Kontakt mit Glas und Polystyren ($1310,72 \pm 276,88$; $n=7$ und $1126,25 \pm 407,18$; $n=7$) deutlich gegenüber dem Leerwert und den anderen Materialien erhöht. Der Leerwert betrug $346,45 \pm 128,55$ ($n=4$). Titan ($346,18 \pm 79,73$; $n=7$) und die Co-Legierung ($369,80 \pm 106,18$; $n=7$) ergaben ähnliche Elastasekonzentrationen. Die Ni-Legierung lag mit $413,23 \pm 158,67$ ($n=7$) leicht über diesen beiden Materialien und dem Leerwert.

3.4. Taktile und visuelle Oberflächenanalyse

Die graphische Darstellung der taktilen Oberflächenanalyse mit Hilfe einer Tastnadel wie auch die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen sind auf Abbildung 9 und 10 auf den Seiten 57 und 58 (Anhang, Kapitel III.4.) wiedergegeben.

Mit Ausnahme von Titan/Teflon II und remanium[®] 2000 zeigten die Materialien keine größeren Unterschiede in ihrer Oberflächenmorphologie. Titan/Teflon II wies bei allen

Parametern die höchsten Werte auf. Die Betrachtung der REM-Aufnahmen lassen Unterschiede zwischen den Materialien erkennen, wobei die Oberflächen von Titan/Teflon II und remanium® 2000 analog den DIN-genormten Parametern durch deutlich größere Rauigkeiten auffallen. Remanium® 2000 hob sich sowohl in den REM-Aufnahmen wie auch bei der taktilen Untersuchung von den meisten anderen Materialien ab. Es zeigte in der taktilen Analyse eine erhöhte Rauigkeit gegenüber remanium® 2000 p, PVC, Titan, Titan/DLC, Titan/Teflon I und den siliziumbeschichteten Titanplättchen.

4 Diskussion

Materialien, die in Kontakt mit Blut kommen, adsorbieren initial eine Schicht aus Plasma- und Serumproteinen. Der Blutkontakt führt zur Aktivierung von einer oder mehr Kaskadenreaktionen, wie Koagulation, Fibrinolyse und Komplementsystem und zur Adhäsion von Blutzellen. In welcher Ausdehnung diese initialen Reaktionen positiven oder negativen Einfluss auf die weitere Einheilung von Implantaten haben, ist größtenteils unklar. Als sicher gilt jedoch, dass unterschiedliche Materialien unterschiedliche Gewebe- und Blutreaktionen hervorrufen.

Viele Veröffentlichungen, die sich mit diesem Thema beschäftigen, kommen von Forschungsgruppen, die präklinisch die Hämostasekompatibilität von Polymerwerkstoffen evaluieren. Derartige Polymerwerkstoffe kommen bei extrakorporalen Zirkulationssystemen (zum Beispiel Herz-Lungen-Maschinen, Gefäßprothesen, Herzklappen, etc.) zum Einsatz. Durch die Aktivierung von humoralen und zellulären Abwehrmechanismen während des Kontakts von Blut mit Fremdoberflächen kann es zu massiven pathophysiologisch inflammatorischen Prozessen kommen, die in Form einer dem traumatischen Schock ähnlichen Antwort des Organismus für den Patienten lebensbedrohlich sein können (15,63). Deswegen wurde in den letzten Jahren vermehrt der Versuch unternommen, Materialien zu entwickeln, die hämostaseologische Abwehrreaktionen nicht oder nur sehr gering initiieren. Die Herstellung von biokompatiblen Oberflächen, die das Komplementsystem nicht zu aktivieren vermögen, trägt zweifellos dazu bei, die Morbidität bei akuter und chronischer Exposition von Blut an synthetischen Polymeren herabzusetzen (28).

Es ist anzunehmen, dass die Aktivierung und Adsorption von Blutproteinen auch in der enossalen Implantologie in positiver wie negativer Hinsicht relevant sind. Zellen und Mediatoren des Immunsystems wurden oft am Ort der Implantation beobachtet. Das Immunsystem scheint eine wichtige Rolle in der Bestimmung der Biokompatibilität eines Biomaterials zu spielen, wobei die genauen Mechanismen, die dabei involviert sind, weiterer Klärung bedürfen (49).

Die Bindegewebsschicht um das Implantat, die sich nach der Implantation bildet, könnte eine Abwehrreaktion des Körpers auf das fremde Material sein, wobei der Körper damit versucht, das Implantat vom übrigen Gewebe zu isolieren. Der Einfluss des Komplementsystems auf eine Fremdkörperreaktion an Implantaten ist aber größtenteils unbekannt (10,65). Tang schließt mit seinen Ergebnissen die Formierung fibrösen Gewebes durch adhärenz Entzündungszellen nicht aus (57).

Im Vergleich mit Materialien, die schlechtere osseointegrative Eigenschaften und damit schlechtere Biokompatibilität als Titan besitzen und mit Hilfe eines neuen Verfahrens zur Evaluierung der Hämokompatibilität, wurde im Rahmen dieser Studie versucht aufzuklären, welche Adsorptionseigenschaften mit einer guten Osseointegration in Verbindung gebracht werden können. Besonderes Interesse galt dabei der Erprobung des durchflusszytometrischen Verfahrens, weswegen wir zum Vergleich Untersuchungen mit routinemäßig eingesetzten Standardverfahren anstellten.

4.1. Die humorale und zelluläre Aktivierung

Titan zeigte in den durchflusszytometrischen Untersuchungen zur C1-INH- und HMWK- Adsorption deutlich höhere Werte als die Kobaltlegierung und Polystyren. Auf Titan wurden aber auch höhere Mengen an gebundenem FOG und IgG gefunden als auf der Kobaltlegierung, wobei Polystyren noch mehr FOG und IgG adsorbiert zu haben schien. Sehr hohe Mengen an Komplementfaktor C3 und Komplementfaktor C3c waren auf Polystyren zu finden. Titan lag bei diesen beiden Parametern deutlich darunter, wobei auf der Kobaltlegierung noch weniger C3 und C3c zu finden war. Generell ließen sich auf der Kobaltlegierung wenig adsorbierte Proteinmengen feststellen. Gegenüber der Kobaltlegierung war die Fibronektinanhaftung an Titan nicht merklich erhöht.

Albuminbeschichtete Polystyrenpartikel zeigten bei fast allen untersuchten Parametern höhere Proteindichten als unbeschichtete Polystyrenpartikel. FOG lag als einzigstes Protein auf albuminbeschichteten Partikel in geringeren Mengen vor als auf unbeschichteten Partikeln. (Tabelle 7, Seite 31)

Die Bestimmung der Konzentration von sC5b-9 in flüssiger Phase als Maß für die Komplementaktivierung nach unterschiedlichen Inkubationszeiten in menschlichem Plasma ergab bei den untersuchten Materialien keine großen Unterschiede. Nach einer Stunde Inkubationszeit zeigte *cp*Titan eine leicht erhöhte Konzentration gegenüber Titan mit verschiedenen Beschichtungen, PVC und einer Kobaltlegierung. Die sC5b-9-Konzentrationen der Materialien und Beschichtungen differierten nach zweistündiger Inkubationszeit deutlicher als nach 15 und 60 Minuten Inkubationszeit. Den höchsten Wert wies die unpolierte Kobaltlegierung ($2629,53 \pm 1067,57 \mu\text{g/l}$) auf. Alle anderen Materialien und deren Beschichtungen lagen deutlich unter diesem Wert und waren untereinander vergleichbar hoch. (Abbildung 7, Seite 33)

Die Messung der Elastasekonzentration nach einstündiger Inkubation von Materialien in Pulverform mit Vollblut ergaben hohe Werte für Polystyren und Glas. Eine Nickellegierung und eine Kobaltlegierung wie auch *cp*Titan erhöhten die Elastasekonzentration nicht merklich, es wurden nahezu identische Werte zum Leerwert beobachtet. (Abbildung 8, Seite 34)

Die Oberflächenanalyse mit dem Rasterelektronenmikroskop und die DIN-genormten Rauigkeitsmessungen der Testkörper aus dem Wellplattenversuch zeigten eine deutlich erhöhte Rauigkeit auf remanium[®] 2000 und der Titanbeschichtung „Titan/Teflon II“. Alle anderen Untersuchungsobjekte ergaben weder visuell noch taktil merkliche Unterschiede. (Abbildung 9 und 10, Seite 57 und 58)

4.2. Reaktionen im Blut auf Fremdkörperkontakt

Verschiedene Materialien rufen unterschiedlich große Adsorptionsmengen von Blutproteinen hervor. Die Adsorption von menschlichem Albumin und Fibrinogen auf verschiedenen metallischen Oberflächen verhält sich beispielsweise außerordentlich variabel. Bei dieser von Williams et al. durchgeführten Studie, in der eine große Anzahl von Metallen – nicht nur Metalle von klinischem Interesse - untersucht wurden, zeigten manche Metalle ein ähnliches Verhalten wie Polymere während der Inkubation in pro-

teinhaltigen Lösungen an der artifiziellen Oberfläche (72,77). Verschiedene Adsorptionsmuster von Plasmaproteinen auf Gold und Titan, bei denen nachfolgend Unterschiede in der Zelladhäsion und Zellaktivierung beobachtet wurden, lassen vermuten, dass Proteininteraktionen wichtig sind für später stattfindende Vorgänge an der artifiziellen Oberfläche (25,77).

Zeigt sich die durch ein Biomaterial hervorgerufene Komplementaktivierung in Form einer erhöhten Konzentration von sC5b-9, kann das zu einer erhöhten Blutplättchenaktivierung führen (18,77). In den Untersuchungen im Rahmen der jetzigen Studie wurde zwar sC5b-9 generiert und die Menge stieg innerhalb von zwei Stunden Inkubationszeit deutlich an, doch Unterschiede zwischen den Beschichtungen ließen sich nur schwer ausmachen. Selbst Titan mit DLC beschichtet, dem eine hervorragende Biokompatibilität nachgesagt wird (59), unterschied sich nicht wesentlich zu PVC.

Ein ähnliches Ergebnis erzielte auch Hong (18). Hong beobachtete während der Inkubation von Edelstahl, Titan und PVC in Plasma vergleichbare sC5b-9-Aktivierungen unter diesen Materialien. Der Wert für PVC lag sogar etwas unter dem von Titan und Edelstahl, was den Beobachtungen während der jetzigen Studie entspricht. Hong schließt mit seinen anderen Untersuchungen daraus, dass die durch die Komplementaktivierung hervorgerufene Thrombogenität für die osseointegrativen Eigenschaften von Titan verantwortlich sein könnte.

Die Messung der HMWK-Adsorption im Rahmen der jetzigen Studie zeigte die höchsten Werte auf Titan gegenüber den anderen Materialien. Unter Verwendung derselben Methodik wies Bücher auch größere Mengen an adsorbiertem HMWK auf Titan als auf einer Nickellegierung und auf Glas nach (3). Beim Vergleich von Gold und Titan zeigten Kanagaraja und seine Mitarbeiter in ellipsometrischen Untersuchungen ebenfalls eine größere HMWK-Adsorption auf Titan als auf der Goldoberfläche (25). Diese Ergebnisse würden die positiven Eigenschaften einer adsorbierten HMWK-Schicht unterstreichen, von der vermutet wird, dass sie entscheidend verantwortlich ist für die Passivierung einer Fremdoberfläche. Beschichtungen mit HMWK sollen die Granulozytenadhäsion und –aktivierung deutlich reduzieren (29,75,77).

Im Vergleich mit den Ergebnissen aus der PMN-Elastase-Analyse lässt sich keine Analogie zur HMWK-Adsorption feststellen. Weber et al. vermutet aufgrund seiner Experimente eine positive Korrelation zwischen der Elastase-Freisetzung und der Menge an adsorbiertem HMWK (68). Glas- und Polystyrenpartikel haben nach den Beobachtungen von Bücher eine geringere Adsorption von HMWK als Titanpartikel. Beide Materialien zeichnen sich in der jetzigen Studie aber durch weitaus höhere PMN-Elastase-Werte aus als Titan.

Als Inhibitor für den klassischen Aktivierungsweg des Komplementsystems könnte die Adsorption von C1-INH auf der Oberfläche eines inkorporierten Fremdkörpers die humorale Immunreaktion vermindern. Tatsächlich waren die detektierten Mengen an C1-INH auf den Titanpartikeln gegenüber Kobalt und Polystyren am größten. Auch Bücher fand weniger C1-INH-Proteine auf Glas und einer Nickellegierung als auf Titan.

Fibronectin, das durch verschiedene Studien als unterstützender Mediator für die Adhäsion von gewebbildenden Zellen (z. B. Osteoblasten) untereinander und an das Substrat anerkannt ist (4,7,11,33), scheint nicht bevorzugt an Titan zu binden. Alle untersuchten Materialien zeigen die gleichen Adsorptionsmuster wie Titan. Dies bestätigt eine erst kürzlich publizierte Untersuchung, in der gezeigt werden konnte, dass Fibronectin an der Adhäsion von Osteoblasten auf einer Titanlegierung nicht involviert ist (12).

Im Gegensatz zu den bisher genannten Proteinen ist die Adsorption von Fibrinogen und IgG und der Komplementfaktoren C und C3c mit einer schlechteren Hämokompatibilität verbunden (67-69). Die Aufgaben des Komplementsystems und Immunglobulin G in der Abwehr von organischen Fremdkörpern sind hinlänglich bekannt. Auch an der Oberfläche von Biomaterialien könnten inflammatorische Reaktionen durch freiwerdende bioaktive Peptide, wie die Komplementfaktoren C3a und C5a hervorgerufen werden (24). Andere Untersuchungen haben gezeigt, dass oberflächenadhärente Komplementproteine und Fibrinogen eine Rolle in der Monozyten- und Granulozyten-Adhäsion und der weiteren Aktivierung des Komplementsystems spielen (26,27,41). In den durchflusszytometrischen Analysen der jetzigen Studie zeigte Polystyren die größten Mengen an adsorbiertem C3, C3c, IgG und FOG. Dabei schien die Albuminbeschichtung der Polystyrenpartikel keinen Einfluss auf diese Parameter zu haben. Ganz

im Gegenteil, höhere Fluoreszenzaktivitäten bei C3, C3c und IgG weisen auf eine höhere Proteindichte hin als auf unbeschichteten Polystyrenpartikeln. Nach der Albuminbeschichtung wurden auf der Polystyrenoberfläche lediglich weniger FOG beobachtet. Die Werte der Titanpartikel lagen bei C3, C3c, IgG und FOG zwar deutlich unter denen der Polystyrenpartikel, die Kobaltlegierung wies aber zweifellos eine noch geringere Proteinadsorption vor. Im Vergleich mit Glas und einer Nickellegierung zeichnete sich Titan durch ähnlich hohe Proteindichten auf Glas und deutlich höhere Proteindichten auf der Nickellegierung aus (3). Wälivaara wies mit Hilfe von ellipsometrischen Messmethoden erhöhte Mengen an adsorbiertem C3, C3c und IgG auf Titan nach. Selbst HMWK konnte auf diese Weise auf der Titanoberfläche nachgewiesen werden (65).

4.3. Die Durchflusszytometrie im Vergleich mit anderen Methoden

Bisherige Untersuchungen zur Aktivierung von plasmatischen Kaskadenreaktionen basierten auf Radioimmunoassay (RIA)- und Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA/EIA)-Messtechniken, die vornehmlich entstandene Zwischenprodukte in flüssiger Phase und deren Konzentrationsänderung nach unterschiedlichen Inkubationszeiten darzustellen vermögen. Solche Analysen sind sehr nützlich um die von Materialien ausgehende Kaskadenaktivierungen in vitro zu testen, andererseits erweisen sie sich als wenig effizient um Qualität und Menge oberflächenadsorbierter Plasmaproteine zu evaluieren. Die alleinige Analyse von Kaskadenkomponenten in flüssiger Phase könnte dagegen irreführend sein und trägt wenig dazu bei, die genauen molekularen und auch nachfolgend zellulären Vorgänge an inkorporierten Biomaterialien darzulegen.

Die durchflusszytometrische Untersuchung von Materialien in Mikropartikelform stellt eine alternative Evaluierungsmethode zu den bisherigen Verfahren dar. Grundlage fast aller Verfahren zur Detektion bestimmter Proteine sind wie auch in der Durchflusszytometrie Antikörper, die mit fluoreszenzaktiven Farbstoffen oder radioaktiven Substanzen gekoppelt sind. Um die gesuchten Proteine „sichtbar“ zu machen, werden diese Antikörper mit den antigenen Determinanten dieser Proteine verbunden und können

dann als fluoreszierender oder radioaktiver Antigen-Antikörper-Komplex gefunden werden.

RIA-Analysen basieren auf der Messung von radioaktiven Substanzen. Ein hoher finanzieller und apparativer Aufwand ist nötig, um solche Untersuchungen durchführen zu können, wobei nur wenige Laboratorien über die notwendigen Gerätschaften verfügen. Nachteilig wirken sich spezielle Vorgehensweisen während des Gebrauchs und der Beseitigung der radioaktiven Stoffe aus (44).

Mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte Antikörper können mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopen detektiert werden. Das zu untersuchende Material wird mit Blut, Plasma oder Serum inkubiert, wonach oberflächenadsorbierte Proteine mit den Fluoreszenzantikörpern konjugiert werden. Im Fluoreszenzmikroskop werden dann Areale des Materials fotografiert und digital weiterverarbeitet. Die Fluoreszenzintensität des fotografierten Areals wird mit speziellen Softwareprogrammen erfasst und dargestellt. Im Vergleich mit anderen Materialien können dann Unterschiede im Adsorptionsverhalten festgehalten werden (46). Bei diesem Verfahren werden somit Fluoreszenzintensitäten relativiert, die absolute Menge an adsorbierten Proteinen kann damit nicht bestimmt werden.

Die Möglichkeiten des Fluoreszenzmikroskops werden in dem von Gemzell vorgestellten Verfahrens insofern übertroffen, da sie ihre Ergebnisse in absoluten Werten darstellte. Durch den Vergleich der Fluoreszenzintensitäten ihrer Mikropartikel mit Fluoreszenzmikropartikel-Standards konnte sie eine Adsorptionsdichte errechnen. Voraussetzung dafür ist die Fähigkeit des Durchflusszytometers, eine genau vorgegebene Zahl an Mikropartikeln messen zu können.

Ein weiterer Vorteil der Durchflusszytometrie ist die einfache Interpretation der Ergebnisse. Anders als bei Methoden wie der SDS-PAGE-Analyse oder des Western-Blotting, ist das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse nicht schwer zu interpretieren (54,55).

Gemzell unterstreicht die Sensitivität der Durchflusszytometrie im Hinblick darauf, dass beim routinemäßigen Einsatz weniger als eintausend Moleküle auf Blutzellen mittels Fluoreszenzaktivierung gefunden werden.

Nachteilig ist nach Elwing an der Durchflusszometrie und anderen Methoden, das Markieren der gesuchten Proteine (9). Elwing stellt dabei in den Vordergrund, dass die Ellipsometrie die Möglichkeit zur Determination von Proteinen in einer adsorbierten Schicht bietet, ohne die Proteine mit Farbstoffen, Isotopen oder Enzymen zu markieren, geschweige denn die Proteine zu zerstören. Dabei können einige mögliche methodische Fehler vermieden werden. Er weist darauf hin, dass ellipsometrische Messungen auch in situ und in Echtzeit durchgeführt werden können, um präzise Angaben über die Adsorptionskinetik machen zu können. Bei der Analyse der Komplementaktivierung aber scheinen die Möglichkeiten der Ellipsometrie limitiert zu sein. In einer Untersuchung konnte die Komplementaktivierung mit Hilfe der Ellipsometrie nicht nachgewiesen werden (37).

In Hinblick darauf, dass Proteinschichten behandelt werden müssen bevor sie einer Untersuchung unterzogen werden, und diese Behandlung die Proteinschicht verändert oder gar zerstört, stellt die elektronenmikroskopische Untersuchung die denkbar schlechteste Variante dar. Die Proteine werden mit elektronendichten Substanzen versetzt, um den Kontrast der Schicht zu verstärken, was sich sehr nachteilig auf die Aussagekraft der Ergebnisse auswirkt (42). Zudem sind die Geräte, die dafür benötigt werden, sehr teuer und es lassen sich keine Aussagen über die Menge der adsorbierten Proteine treffen (44).

Mit dem Ziel eine Methodik zur Proteinbestimmung auf Oberflächen zu finden, die in finanzieller Hinsicht und Durchführbarkeit auch für kleine Laboratorien interessant ist, stellten Merritt et al. (44) ein Verfahren vor, das auf ELISA-Techniken basiert. Obwohl damit das Ausmaß der Proteinadsorption unmittelbar auf der Oberfläche nicht bestimmt werden kann, lassen entstandene Substanzen Rückschlüsse auf die Menge des adhären-ten Proteins zu. Natürlich ist auch diese Methodik in manchen Punkten limitiert, insbesondere in der detaillierten Analyse der Proteinadhärenz. Zur weitergehenden Analyse sind deswegen immer noch Untersuchungen in speziellen Laboratorien notwendig, die mit speziellen Apparaturen ausgerüstet sind (44).

Detailliertere Aussagen über das Adsorptionsverhalten können auch mit durchflusszometrischen Experimenten gemacht werden. Die schon erwähnte Sensitivität bei der

Detektion kleiner Mengen adhärenter Proteine können weiterführende Analysen unnötig machen. Inzwischen ist für Serum- und Plasmaproteine ein breites Spektrum an Antikörpermarkern mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen erhältlich, die eine fast uneingeschränkte Detektion von adhärennten Proteinen im Durchflusszytometer möglich machen. Die Fähigkeiten des Durchflusszytometers, insbesondere die gleichzeitige Messung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe, kombiniert mit etablierten Methoden aus der indirekten Immunofluoreszenz, lassen eine gleichzeitige Bestimmung verschiedener Parameter zu. Dadurch können genauere Aussagen über die Adsorptionskinetik und Adsorptionsphänome wie dem Vromaneffekt gemacht werden. Neben Mehrfarbenfluoreszenzmessungen und hoher Empfindlichkeit übertreffen auch Analysegeschwindigkeit und objektive Quantifizierung die Möglichkeiten des Fluoreszenzmikroskops (48). Die Durchflusszytometrie hat in die routinemäßige Diagnostik und in vielen wissenschaftlichen Bereichen Einzug gefunden. Aus diesem Grund ist es nicht nur speziellen Laboratorien vorenthalten dieses Verfahren zu verwenden.

4.4. Vorversuche und Fehlermöglichkeiten

In Anlehnung an das von Gemell verwendete Verfahren untersuchten wir Mikropartikel aus verschiedenen Materialien. Neben den von Gemell verwendeten Polystyrenpartikeln wurden *cp*Titan und eine Legierung auf Kobaltbasis getestet.

Um den Bedingungen im menschlichen Körper möglichst nahe zu kommen, erfolgte die Inkubation der Mikropartikel und Plättchen mit Plasma, Serum und Vollblut bei Körpertemperatur (37°C).

Die Vorgehensweise bei der Plasma- und Serumgewinnung erfolgte nach allgemeingültigen Regeln, wobei die Heparinisierung von Plasma und Vollblut so gering wie möglich zu halten war. Für Plasma ergab sich aus Vorversuchen eine optimale Heparinkonzentration von 1IU/ml Blut, für Vollblut 3IU/ml.

Vorversuche zeigten, dass die Zahl der Partikel oder die Menge an Serum und Plasma im Eppendorfcup keine Wirkung darauf haben, wie hoch die Adsorptiondichte auf den Mikropartikeln sein wird. Unterschiedlich große Mengen an Partikeln und gleichbleibendes Flüssigkeitsvolumen, sowie gleichbleibende Mengen an Partikeln und unter-

schiedliches Flüssigkeitsvolumen waren in einem gewissen Rahmen unabhängig voneinander. Die danach gemessenen Fluoreszenzintensitäten unterschieden sich nur wenig. Das weitere Prozedere der Fixierung und Immunfärbung adhärenter Proteine erfolgte identisch zu den Verfahren, wie sie bei der präklinischen Evaluierung von Polymerwerkstoffen angewendet werden. Die Konzentrationen der Primär- und Sekundärantikörperflüssigkeit wurden dabei für die Mikropartikel-Experimente modifiziert. Dabei ergaben Konzentrationen der Primärlösung über 1:500 und der Sekundärlösung über 1:200 keine Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten. Das wurde darauf zurückgeführt, dass bei diesen Konzentrationen die Primärantikörper alle möglichen Bindungen mit den oberflächenadhärenten Proteinen und die Sekundärantikörper alle möglichen Bindungen mit den Primärantikörpern eingegangen waren.

Als äußerst wichtig für die Messungen am Durchflusszytometer erwies sich die Verwendung der 10-20µm Fraktion der Metallmikropartikel, die wir mit Hilfe von Ultraschallsieben gewinnen konnten. Ähnlich große Partikel zeigen eine homogene Signalkurve in Punktehistogrammen (siehe Abbildung 4, Seite 21), was Voraussetzung ist für die Einstellung der optimalen Detektorempfindlichkeit und das Ausblenden fluoreszierender Verunreinigungen, die das Ergebnis verfälschen können. Größere Partikel als die verwendeten sinken trotz Verwendung eines Magnetrührers und einer dichteren Suspension auf den Boden der Falconröhrchen bevor sie von der Ansaugvorrichtung des Durchflusszytometers erfasst werden. Messungen von Mikropartikeln können an einem Durchflusszytometer der Firma Coulter® nicht durchgeführt werden, da bei diesen Geräten keine Möglichkeit besteht, einen Magnetrührer unter die Ansaugvorrichtung zu platzieren.

Gleiche oder ähnliche Korngrößen waren desweiteren nötig, um die Fluoreszenzereignisse in Relation stellen zu können. Größere Oberflächen ziehen eine größere Proteinadsorption und letztendlich größere Fluoreszenzintensitäten nach sich. Bewusst wurde hier auf die Berechnung der Menge an adsorbierten Proteine in Mikrogramm pro Quadratzentimeter Oberfläche verzichtet, da dies bei relativ unterschiedlichen Korngrößen mit unterschiedlicher Oberflächenbeschaffenheit nicht möglich war. Selbst Gem-

mell spricht bei ihren Ergebnissen von geschätzten Werten, obwohl sie durchweg genormte Partikel untersucht hat.

Eine Fehlerquelle stellte sicher das Eingrenzen der Fluoreszenzintensitäten im Histogramm dar. Grund für dieses Vorgehen ist, dass während der Ansaug- und Messungsphase im Durchflusszytometer Fluoreszenzen und Streulicht von Verunreinigungen auftreten, die weit niedrigere und weit höhere Fluoreszenzen als der Großteil der dargestellten Fluoreszenzintensitäten hatten und damit die von den Partikeln ausgehende durchschnittliche Fluoreszenzintensität (mean) verfälschen. Dies ist aber ein Problem, das in durchflusszytometrischen Laboruntersuchungen allgegenwärtig ist und nicht spezifisch für diese Studie. Dennoch stellte das manuelle Eingrenzen der Häufigkeitsverteilung eine Fehlerquelle dar, weil dadurch die Betrachtung der Fluoreszenzintensitäten nicht unter standardisierten Bedingungen erfolgte und den durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten eine gewisse Willkür zugrunde lag.

Obwohl die mit Albumin beschichteten karboxylierten Polystyrenpartikel mit nur vier Messungen sehr geringe Standardabweichungen aufwiesen, ist die Aussagekraft doch beschränkt. Die Negativkontrollen waren bei allen gemessenen Parametern sehr hoch.

In den Wellplattenversuchen verzichteten wir auf die Messung eines Leerwerts, da der Schwerpunkt dieser Untersuchung im Vergleich der sC5b-9-Generierung durch die verschiedenen Materialien lag und die Vorbereitungen für einen Leerwert mit einem erheblich höheren Mehraufwand verbunden gewesen wäre.

Größere Unterschiede in der sC5b-9 Konzentration zeigten sich lediglich bei der zweistündigen Inkubation von remanium[®] 2000 mit einer polierten und einer unpolierten Oberfläche. Dabei stellten sich nicht nur bei remanium[®] 2000 große Standardabweichungen ein, sondern auch bei den anderen Materialien und kürzeren Inkubationszeiten. Aussagen über höhere Aktivierungen hervorgerufen durch eine höhere Oberflächenrauigkeit haben deswegen eher spekulativen Charakter.

4.5. Schlussfolgerungen

Natürlich ist die Aussagekraft von hämostaseologischen Forschungsarbeiten mit Serum oder Plasma anstelle von Vollblut in gewisser Weise immer beschränkt. Querverbindungen zwischen Proteinkaskaden, die physiologisch in Vollblut ablaufen, werden durch Verwendung von Blutbestandteilen gezielt ausgeklammert, weil sie aufgrund der Komplexität der ablaufenden Vorgänge nicht berücksichtigt werden können.

Dennoch kann unter standardisierten Bedingungen im Labor festgestellt werden, ob Unterschiede im Adsorptionsverhalten nach Inkubation verschiedener Materialien im gleichen Medium auftreten.

Die Durchflusszytometrie, die seit Jahren fester Bestandteil in Diagnostik und Forschung von korpuskulären Blutbestandteilen ist, stellt dabei eine Methode dar, mit der relativ einfach die Adsorptionskinetik auf Biomaterialien untersucht werden kann.

In Kombination mit der indirekten Immunfluoreszenz lassen sich genaue Aussagen über molekulare Veränderungen auf der artifiziellen Oberfläche treffen. Im Vergleich mit ELISA/EIA stechen durchflusszytometrische Ergebnisse zusätzlich durch eine hohe Reproduzierbarkeit hervor, was durch die relativ niedrigen Werte der Standardabweichungen gezeigt werden konnte.

Inwieweit die Oberflächenmorphologie Einfluss auf die Proteinadsorption und Proteinaktivierung hat, bleibt unklar. Trotzdem sollte bei weiterführenden Untersuchungen, die sich schwerpunktmäßig nicht mit der Etablierung der Methodik beschäftigen, darauf geachtet werden, Materialien in identischer Partikelform und –morphologie für die Analyse im Durchflusszytometer zu verwenden.

5 Zusammenfassung

Studien über Wechselwirkungen zwischen Blutproteinen und artifiziellen Oberflächen sind eine Möglichkeit die Einheilungsvorgänge nach der Implantatinserktion besser verstehen zu lernen. Blut ist das erste Medium mit dem das Implantat nach dem chirurgischen Eingriff in Kontakt kommt, um anschließend die Wundheilung, Zellanhaftung und Gewebeintegration zu steuern.

Obwohl Metalle und ihre Legierungen neben der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde in vielen medizinischen Bereichen zur Inkorporation in den menschlichen Körper eingesetzt werden, gibt es nur wenige Untersuchungen, die sich mit der Proteinadsorption und den Vorgängen an der Berührungsfläche von Blut und Metall beschäftigen. Die Verfahren, die zur Detektion von Proteinschichten eingesetzt werden, sind teilweise mit einem enormen apparativen und finanziellen Aufwand verbunden, dessen Durchführung nur wenigen Laboratorien möglich ist.

Titan und seine Legierungen sind bekannte Biomaterialien und ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften sind eingehend untersucht worden. Sie haben sich aufgrund ihrer klinischen Erfolge als Materialien der Wahl in der enossalen Implantologie etabliert. Die Mechanismen, die zu einer guten Einheilung und zu einer langen Verweildauer im Knochen führen, sind aber bis heute nicht geklärt.

Mit Hilfe eines neuen Verfahrens in der Detektion von oberflächlichen Proteinschichten wurde in dieser Studie versucht, Unterschiede in der Proteinadsorption während der Inkubation mit Blut und Blutbestandteilen bei unterschiedlichen Materialien auszumachen. Im Vergleich mit Materialien, die in der Vergangenheit bewiesen haben, schlechtere hämostaseologische und osseointegrative Eigenschaften als Titan zu besitzen, könnte letztendlich abgeleitet werden, welche Blutparameter ausschlaggebend für eine mehr oder minder gute Einheilung sind. Bei der Untersuchung der Materialien in Mikropartikelform lag der Schwerpunkt in der Erprobung und Etablierung der Durchfluss-

zytometrie als neues In-vitro-Verfahren für die Evaluierung von oberflächenadsorbierten Proteinen.

Nach Inkubation von Mikropartikeln in menschlichem Serum oder Plasma erfolgte die Markierung bestimmter oberflächenadhärenter Proteine mit fluoreszenzaktiven Farbstoffen. Die Fluoreszenzintensitäten der Partikel wurden durchflusszytometrisch gemessen, um Aufschluss über Qualität und Quantität adhärenter Proteine zu erhalten.

Überwiegend positive Eigenschaften für die Biokompatibilität von Biomaterialien werden der Adsorption von hochmolekularem Kininogen (HMWK), Fibronectin (Fn) und Komplementfaktor C1-Inhibitor (C1-INH) zugeschrieben, wohingegen die Adsorption von Fibrinogen, der Komplementfaktoren C3 (C3) und C3c (C3c) und Immunglobulin G (IgG) mit einer schlechteren Hämokompatibilität assoziiert werden.

Titan zeigte höhere Adsorptionsdichten von HMWK und C1-Inhibitor als eine Kobaltlegierung und Polystyren, wobei auf Titan auch größere Mengen an adhärentem Fibrinogen und Immunglobulin G als auf der Kobaltlegierung zu finden waren. Erwartungsgemäß lag bei Polystyren bei denen als negativ eingestuften Blutproteinen durchweg die höchste Adsorptionsdichte vor. Generell zeichnete sich die Kobaltlegierung durch sehr wenig oberflächenadhärenter Proteine aus, denn neben FOG und IgG waren auch deutlich weniger C3 und C3c als auf der Titanoberfläche nachzuweisen. In der Fibronectinanhaftung konnte zwischen den Metallen kein Unterschied ausgemacht werden, wobei Polystyren mehr Fibronectin adsorbiert zu haben schien.

Die durchflusszytometrische Analyse von albuminbeschichteten Polystyrenpartikeln zeigte im Vergleich zu unbeschichteten Polystyrenpartikeln wie auch im Vergleich zu *cp*Titan und einer Kobaltlegierung hohe Fluoreszenzintensitäten bei allen untersuchten Parametern. Die Albuminbeschichtung eines Biomaterials ist als positiv für dessen Hämokompatibilität zu werten. Bis auf die Messung von HMWK, bei der Titan die höchste Fluoreszenzintensität zeigte, schien die Adsorptionsmenge aller anderen Proteine (C3, C3c, C1-INH, IgG, FOG, Fn) auf den albuminbeschichteten Polystyrenpartikeln am größten zu sein.

Die Messung eines löslichen Aktivierungsmarkers des Komplementsystem (sC5b-9/EIA-Analyse) zeigte nach 15-minütiger und 60-minütiger Inkubation in Plasma keine Unterschiede in seiner Konzentration bei Titan mit verschiedenen Beschichtungen im Vergleich mit einer Co-Cr-Mo-Legierung (in polierten und unpolierten Zustand) und einem Polymer (PVC). Nach 120minütiger Inkubation ließ sich lediglich ein deutlicher Unterschied zwischen der polierten und unpolierten Co-Cr-Mo-Oberfläche feststellen, wobei sich die polierte Co-Cr-Mo-Oberfläche weder zu Titan und dessen Beschichtungen noch zu PVC wenig variabel zeigte.

Die Ermittlung der PMN-Elastase-Konzentration (EIA-Analyse) als Indikator für die Granulozytenaktivierung nach einstündiger Inkubation verschiedener Mikropartikel (Titan, Kobaltlegierung, Polystyren, Glaspartikel, Nickellegierung) in heparinisiertem Vollblut zeigten bei Titan, der Kobalt- und der Nickellegierung keine erhöhten PMN-Elastasekonzentrationen gegenüber dem Leerwert. Die Werte für Polystyren und Glas dagegen waren ein Vielfaches höher als der Leerwert, was auf eine deutlich höhere Granulozytenaktivierung hinwies.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die durchflusszytometrische Analyse von Materialien in Mikropartikelform ein gutes Verfahren zur präklinischen Evaluierung von Biomaterialien darstellt. Im Vergleich mit anderen Methoden zur Untersuchung einer initial adsorbierten Proteinschicht besticht es durch seine relativ einfache, zeit- und kostensparende Anwendung. Die Ergebnisse sind dabei einfach zu deuten und zeigen aufgrund der niedrigen Standardabweichung eine hohe Reproduzierbarkeit. Inzwischen hat die Durchflusszytometrie in der Blut- und Transfusionsmedizin breite Zustimmung gefunden und ist daher weit verbreitet. Selbst kleinere Laboratorien, die keinen Durchflusszytometer besitzen, haben daher die Möglichkeit in Zusammenarbeit mit den entsprechenden Instituten durchflusszytometrische Untersuchungen durchzuführen.

III Anhang

III.1. Verwendete Chemikalien, Präparier-, Isolier-, Verbrauchsmaterialien und Geräte

III.1.1. Chemikalien

| | |
|--|-----------------------------------|
| Ampuwa (Aqua ad Injectabilia) | Fresenius, Bad Homburg, D |
| BSA (bovine serum albumin) | Sigma, Deisenhofen, D |
| NaOH (2M) | Merck, Darmstadt, D |
| HCL (1M) | Merck |
| CWFS-Gelatine 40 % | Biotrend, Köln, D |
| EDTA (Titrplex III p. a.) | Merck |
| Glycin | Merck |
| Liquemin 5000 I.E. | Hoffmann La Roche, Basel, Schweiz |
| Natriumchloridlösung 0,9% | Fresenius |
| Paraformaldehyd | Merck |
| PBS (phosphate buffered saline) | Life Technologies, Karlsruhe, D |
| TBS (Tris-buffered saline) | Sigma |
| Albumin | Sigma |
| Carboiimide Kit for Carboxylated Micropartikels | Polysciences Europe, Eppelheim, D |
| Enzyme Immunoassay sC5b-9 | Quidel, San Diego, CA, USA |
| PMN-Elastase EIA | Merck |
| Goat Serum | Sigma |
| Rabbit Serum | Sigma |
| Ethylalkohol 100% | Merck |

III.1.2. Präparier-, Isolier-, Verbrauchsmaterial

| | |
|-------------------------------------|---|
| Eppendorfcups 1,5ml <i>und</i> 2 ml | Eppendorf, Köln, D |
| Falconröhrchen | Becton Dickinson-European HQ, Erembodegem-Aalst, Belgien |
| Heparinmonovetten für Kinder 1,2ml | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| Neutralmonovetten 9ml | Sarstedt |
| 12-Wellplatten | Costar Corporation |
| Pipettenspitzen | Eppendorf |
| EDTA-Monovetten 1,2ml | Sarstedt |
| Citratmonovetten 1,4ml | Sarstedt |
| Venisystems Butterfly-M9 | Abbott Ireland, Sligo, Ireland |

III.1.3. Geräte

| | |
|--|--------------------------------|
| Brutschrank Incubat | Melag, Berlin,D |
| Durchflußzytometer Model Facscan | Becton Dickinson |
| Inkubator mit Rütteltisch (Polymax 1040, Heidolph, Schwabach, D Inkubator 1000) | |
| Vortex | Scientific Industries, NY, USA |
| Zentrifuge | Eppendorf |
| ELISA-reader Model MR5000 | Dynatech, Chantilly, VA, USA |

III.2. Gerätespezifische Einstellungen und deren Erläuterung am Durchflußzytometer

Zur Auswertung und Aufnahme von Daten am Durchflußzytometer diente das Anwendungsprogramm Lysis II von Becton-Dickinson. Lysis II besitzt zur Messung von Fluoreszenz- und Streulichtintensitäten den *Acquisition Mode* und zu deren Auswertung den *Analysis Mode*.

III.2.1. Acquisition Mode

Im Acquisition Mode werden die Einstellungen für die Photodiode und die Photomultipliertubes (PMT) vorgenommen. Mit der Photodiode wird das Signal der Vorwärtsstreuung (FSC) erfasst. Mit den PMT werden die Signale der Seitwärtsstreuung (SSC) und die Signale des fluoreszierenden Farbstoffs (FL1) gemessen. Um die Signale der Zellen oder Mikropartikel, die von Interesse sind, zu erfassen und diese dann auf dem Punktehistogramm in einer gut eingrenzenden Signalwolke erscheinen zu lassen, wird einerseits die Spannung der PMT verändert. Andererseits kann die Empfindlichkeit der Photodiode in fünf verschiedenen Stufen (E-01, E00 – E03) variiert werden.

Um schwache Messsignale darzustellen, kann mit einer Signalverstärkung gearbeitet werden. Bei der Signalverstärkung unterscheidet man zwischen der linearen und der logarithmischen Signalverstärkung. Linear kann zwischen den Werten 1,00 und 9,99 verstärkt werden. Im logarithmischen Modus besteht keine Möglichkeit die Verstärkung zu variieren.

Eine andere Möglichkeit, bestimmte Signale besser analysieren zu können, ist das Setzen einer elektronischen Schwelle (engl. threshold). Bei dieser Funktion werden unter-schwellige Fluoreszenzintensitäten ausgeklammert. Mit dieser Funktion kann eingestellt werden, welche Intensitäten (ausgedrückt in Kanalnummern/Channels) nicht gemessen werden sollen. Alle Intensitäten, Eigenfluoreszenzen oder andere störende Einflüsse unterhalb des Threshold werden dann ignoriert. In dieser Studie wurde ein Threshold bei Kanal 172 in der Vorwärtsstreulichtmessung (FSC) eingestellt (siehe Abbildung, Seite 21).

Bei der Untersuchung von mehreren, mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen versehenen Partikeln besteht die Gefahr, dass sich manche Wellenlängen des einen Farbstoffes mit den Wellenlängen des anderen Farbstoffes überschneiden. Um dies zu verhindern, kann ein elektronischer Fluoreszenzfilter dazwischen geschaltet werden. Im Acquisition Mode wird dieser unter *FACScan Compensation* eingestellt.

Im Einzelnen wurden in dieser Studie folgende *Acquisition*-Einstellungen gewählt:

Unter FACScan DETEKTORS

- 1) Threshold in FSC bei Kanalnummer 172
- 2) Empfindlichkeit der Photodiode: E00 (multipliziert das Signal mit $10^0 = 1$)
- 3) PMT-Spannungen (PMT Volts):

SSC: 245 Volt

FL1: 592 Volt

FL2/FL3: 150 Volt

Unter FACScan PARAMETERS

- 4) Signalverstärkung (Amp Gains):

FSC: 2,21

SSC: 4,06

Das Signal von FL1 ist logarithmisch verstärkt und kann deshalb nicht variiert werden.

Unter FACScan COMPENSATION

- 5) Der Fluoreszenzfilter ist abgestellt (alle Regler in FACScan COMPENSTATION bei 0,0%)

III.2.2. Analysis Mode

Im *Analysis Mode* werden die eingegangenen Signale bearbeitet. Dazu gehört das beidseitige Eingrenzen der Fluoreszenzintensitäten im Histogramm wie in Abschnitt 2.2.3.2 auf Seite 20ff. erklärt. Alle weiteren Funktionen des *Analysis Mode* sind für diese Studie irrelevant und werden an dieser Stelle nicht weiter erläutert.

III.3. Umrechnung der Einheiten beim Durchflusszytometer

Die Fluoreszenzintensitäten können in Kanalnummern (engl. channel numbers) oder in linearen Werten (engl. linear value) dargestellt werden. Die Kanalnummern sind proportional zum Logarithmus der linearen Werte:

$$\text{CHANNEL NUMBERS} = \text{LOG}(\text{LINEAR VALUE}) * \text{SCALING FACTOR}$$

Für die in diesen Untersuchungen verwendete 1024-Kanal-Auflösung beträgt der SCALING FACTOR 256 (1).

III.4. Testmaterialien und deren Beschichtungen im Wellplattenversuch

Nachfolgend sind die Materialien und Beschichtungen aufgelistet. Die in eckigen Klammern hinter der Bezeichnung stehende Ziffer ist die Abkürzung des Material und dessen Beschichtung wie sie in dieser Arbeit verwendet wurde.

Titan [1]

cpTitan, Reinheitsgrad 99,6%

Kommerziell erhältliche Titanplättchen der Firma Goodfellow (Stärke 0,3mm, Ø 21mm) ohne Beschichtung. Diese Plättchen sind Basiswerkstoff der folgenden Beschichtungen.

Titan/DLC [2]

Titan mit Diamond-Like-Carbon-Beschichtung

Musterbeschichtung von Buck Plasma Elektronik GmbH, 79395 Neuenburg

Titan/Teflon I [3]

Titan mit Teflon-AF-Beschichtung (Teflon[®] Amorphous Fluoropolymers)

Titanplättchen [1] wurden zunächst mit Aceton gereinigt und entfettet. Danach wurden sie in das vorbereitete Bad eingetaucht und 5 bis 10 Minuten bei einer Temperatur von 25-30°C getrocknet. Im Anschluss daran wurden die Proben für 5 bis 10 Minuten im

Ofen bei einer Temperatur erwärmt, die knapp über dem Siedepunkt der Lösungsflüssigkeit liegt. Dann erfolgte das eigentliche Aufbacken der Teflonschicht (Teflon[®] AF 1601S, DuPont de Nemours GmbH, Bad Homburg, D) knapp über dem Glasfließpunkt bei 166°C über 5 Minuten.

Im Anschluss daran wurden die Proben für 10 bis 15 Minuten auf eine Temperatur von 330°C erwärmt, um eine einheitliche Beschichtungsstärke zu erzielen.

Titan/Teflon II [4]

Titan mit Teflon-Beschichtung

Musterbeschichtung von Gutbrod GmbH & Co. KG, 72581 Dettingen/Erms

Titan/Silizium I [5] und Titan/Silizium II [6]

Beschichtung mit Siliziumoxid (SiO_x)

Um die Titanplättchen mit SiO_x zu beschichten wurden sie wie folgt behandelt:

- 10 min Reinigen mit Ethanol im Ultraschall
- 15 min Ar-Plasma (auch zum Reinigen)
- 2 min O₂ – Plasma (zum Aktivieren und zur Bildung von TiO)
- Titan/Silizium I: 30 min 100 sccm O₂/10 sccm HMDSO 100W *oder*
Titan/Silizium II: 40 min 200 sccm O₂/25 sccm HMDSO + Ar 15 sccm 400 W

Die Beschichtung erfolgte im Fraunhofer-Institut für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik, 70569 Stuttgart.

remanium[®] 2000 [7] und remanium[®] 2000 p [8]

Die Herstellung der Testplättchen aus der dentalen Co-Cr-Mo-Legierung *remanium[®] 2000* erfolgte gemäß den Herstellerangaben im zahntechnischen Labor. Die Oberfläche von *remanium[®] 2000* war sandgestrahlt. Die Oberfläche von *remanium[®] 2000 p* wurde nach der Sandbestrahlung mechanisch poliert.

PVC [9] Die PVC-Plättchen wurden mit Hilfe eines Aushauers aus einer Folie (Stärke 0,5mm) gestanzt.

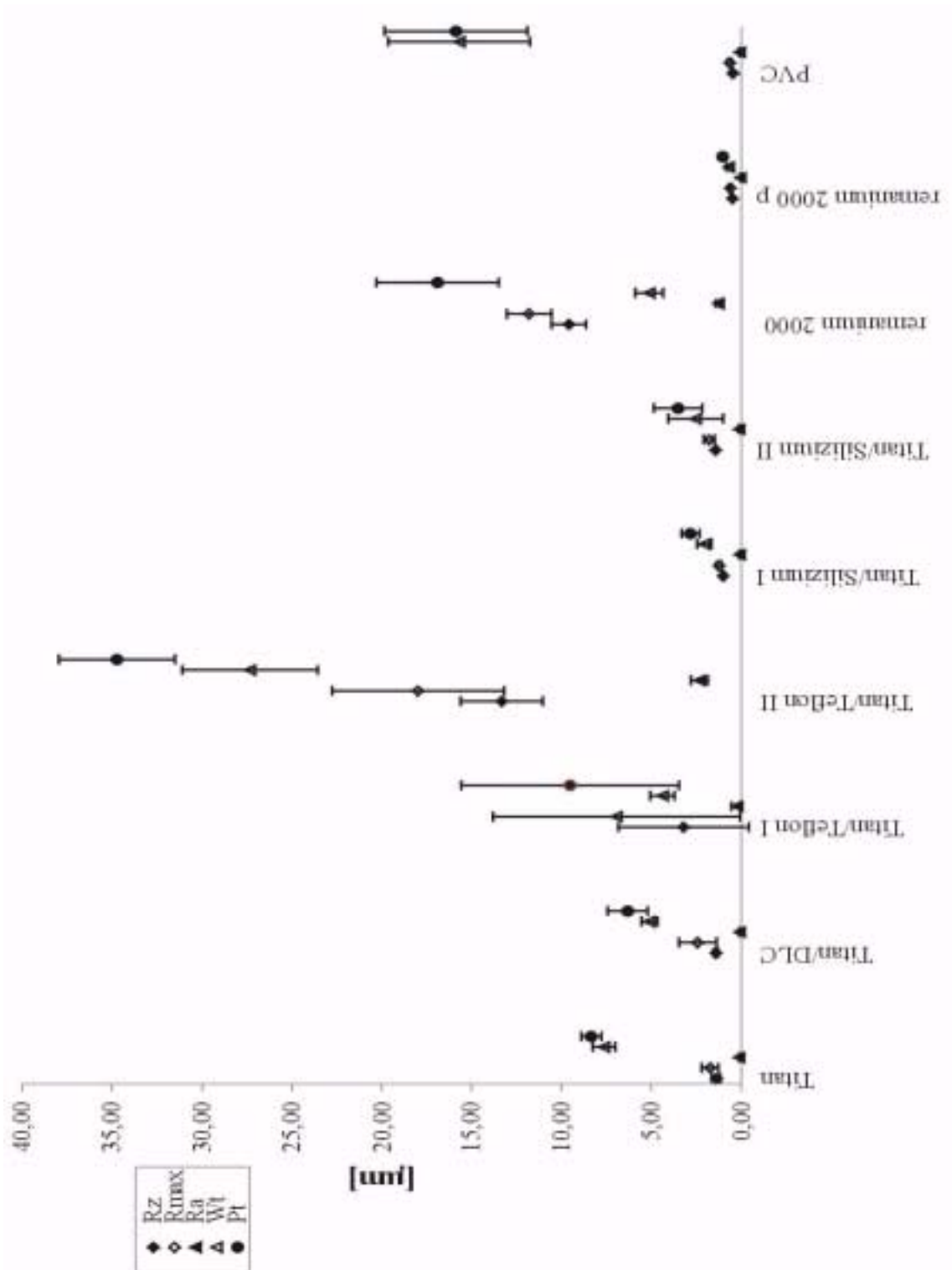


Abbildung 9: Graphische Darstellung von R_z , R_{max} , R_a , W_t und P_t

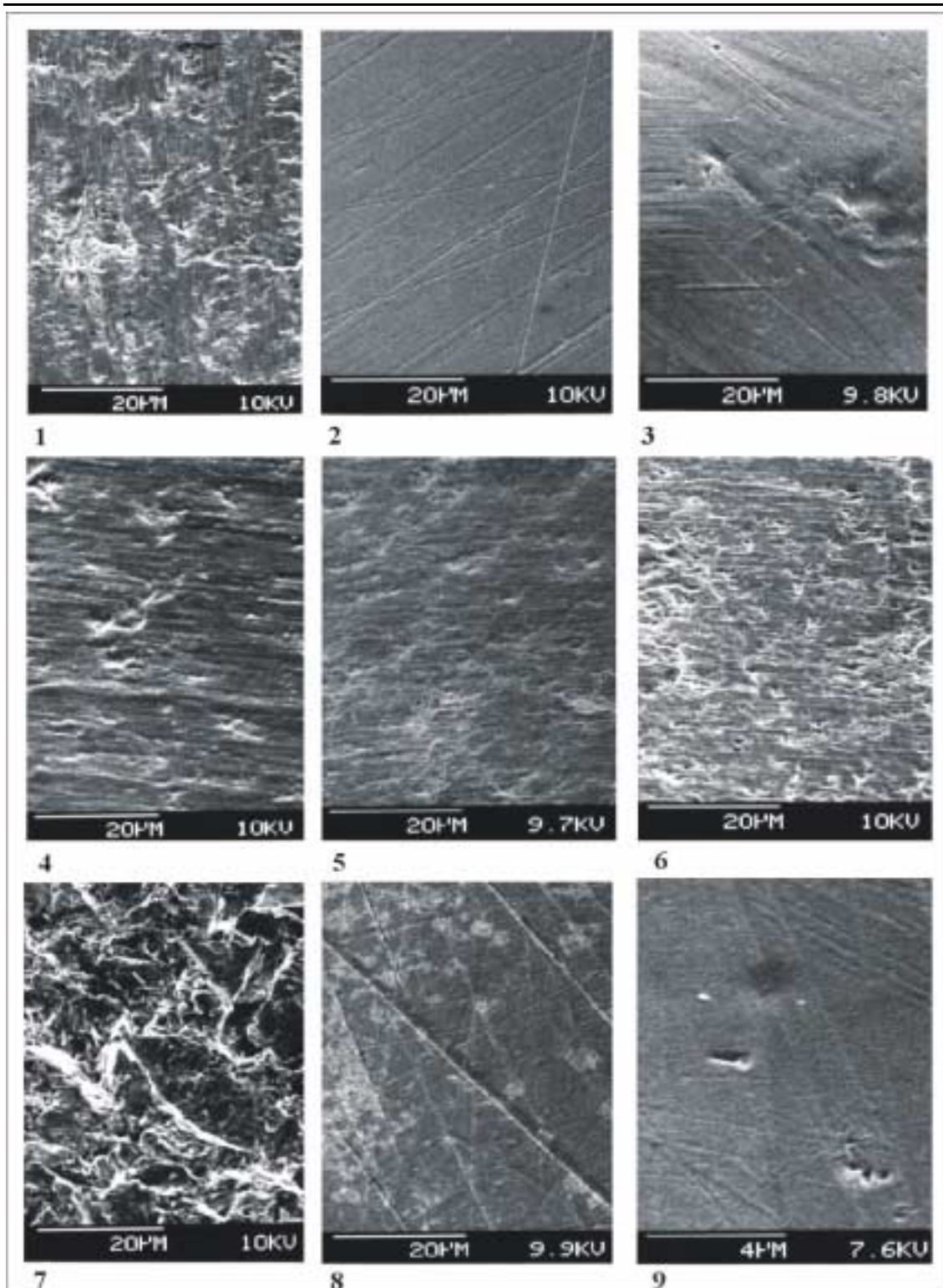


Abbildung 10: REM-Aufnahmen der untersuchten Materialien und Beschichtung.

(1: Titan; 2: Titan/DLC; 3: Titan/Teflon I; 4: Titan/Teflon II; 5: Titan/Silizium I; 6: Titan/Silizium II; 7: remanium[®]2000; 8: remanium[®] 2000 p; 9: PVC).

IV Literaturverzeichnis

1. Becton & Dickinson (1991) Lysis II Software User's Guide. *Becton & Dickinson*, Erembodegem-Aalst, Belgien.
2. Brånemark, P.I., Adell R., Albrektsson, T., Lekholm, U., Lundkvist, S. & Rockler, B. (1983) Osseointegrated titanium fixtures in the treatment of edentulousness. *Biomaterials*, 4, 25.
3. Bücher, K. (2002) Untersuchung potentieller Screeningverfahren für die Biokompatibilitätsprüfung von Dentalwerkstoffen unter Anwendung der Flowzytomtrie und der Chemilumineszenz. *Med. Dissertation*, Universität Tübingen.
4. Cannas, M., Denicolai, F., Webb, L.X. & Gristina, A.G. (1988) Bioimplant surfaces: binding of fibronectin and fibroblast adhesion. *J.Orthop.Res.*, 6, 58-62.
5. Craddock, P.R., Hammerschmidt, D., White, J.G., Dalmosso, A.P. & Jacob, H.S. (1977) Complement (C5-a)-induced granulocyte aggregation in vitro. A possible mechanism of complement-mediated leukostasis and leukopenia. *J.Clin.Invest.*, 60, 260-264.
6. Donley, T.G. & Gillette, W.B. (1991) Titanium endosseous implant-soft tissue interface: a literature review. *J Periodontol.*, 62, 153-160.
7. El-Ghannam, A., Ducheyne, P. & Shapiro, I.M. (1999) Effect of serum proteins on osteoblast adhesion to surface-modified bioactive glass and hydroxyapatite. *J.Orthop.Res.*, 17, 340-345.
8. Ellingsen, J.E. (1991) A study on the mechanism of protein adsorption to TiO₂. *Biomaterials*, 12, 593-596.
9. Elwing, H. (1998) Protein adsorption and ellipsometry in biomaterial research. *Biomaterials*, 19, 397-406.
10. Elwing, H., Ivarsson, B. & Lundstrom, I. (1987) Serum complement deposition on platinum and titanium oxide surfaces measured by ellipsometry at liquid-solid interface. *J.Biomed.Mater.Res.*, 21, 263-267.
11. Garcia, A.J., Ducheyne, P. & Boettiger, D. (1998) Effect of surface reaction stage on fibronectin-mediated adhesion of osteoblast-like cells to bioactive glass. *J.Biomed.Mater.Res.*, 40, 48-56.

-
12. Geissler, U., Hempel, U., Wolf, C., Scharnweber, D., Worch, H. & Wenzel, K. (2000) Collagen type I-coating of Ti6Al4V promotes adhesion of osteoblasts. *J.Biomed.Mater.Res.*, 51, 752-760.
 13. Gemmell, C.H. (1997) A flow cytometric immunoassay to quantify adsorption of complement activation products (iC3b, C3d, SC5b-9) on artificial surfaces. *J.Biomed.Mater.Res.*, 37, 474-480.
 14. Gong, J., Larsson, R., Ekdahl, K.N., Mollnes, T.E., Nilsson, U. & Nilsson, B. (1996) Tubing loops as a model for cardiopulmonary bypass circuits: both the biomaterial and the blood-gas phase interfaces induce complement activation in an in vitro model. *J.Clin.Immunol.*, 16, 222-229.
 15. Hamsten, A. (1993) The hemostatic system and coronary heart disease. *Thromb Res*, 70, 1-38.
 16. Hart, P.H., Spencer, L.K. & Nikoloutsopoulos, A. (1986) Role of cell surface receptors in the regulation of intracellular killing of bacteria by murine peritoneal exudate neutrophils. *Infect.Immun.*, 52, 245-251.
 17. Heimburger, N. (1994) Entzündungsreaktionen und Hämostase. *Haemostasiologie*, 14, 1-6.
 18. Hong, J., Andersson, J., Ekdahl, K.N., Elgue, G., Axen, N., Larsson, R. & Nilsson, B. (1999) Titanium is a highly thrombogenic biomaterial: possible implications for osteogenesis. *Thromb.Haemost.*, 82, 58-64.
 19. Horbett, T.A. (1993) Principles underlying the role of adsorbed plasma proteins in blood interaction with foreign materials. *Cardiovasc.Pathol.*, 2, 137-148.
 20. Horbett, T.A. & Weathersby, P.K. (1981) Adsorption of proteins from plasma to a series of hydrophilic-hydrophobic copolymers. I. Analysis with the in situ radioiodination technique. *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol.15, 403-423.
 21. Hugli, T.E. (1975) Anaphylatoxins: C3a and C5a. *Adv.Immunol.*, 115, 425-430.
 22. Hynes, R.O. (1976) Cell Surface Proteins and Malignant Transformation. *Biochim.Biophys.Acta*, 458, 73-107.
 23. Janatova, J. (1988) C3, C5, C3a, C4a, and C5a fragments of the complement system. *Meth Enzymol*, 162, 579-625.
 24. Janatova, J., Cheung, A.K. & Parker, C.J. (1991) Biomedical polymers differ in their capacity to activate complement. *Complement Inflamm.*, 8, 61-69.

-
25. Kanagaraja, S., Lundstrom, I., Nygren, H. & Tengvall, P. (1996) Platelet binding and protein adsorption to titanium and gold after short time exposure to heparinized plasma and whole blood. *Biomaterials*, 17, 2225-2232.
 26. Kao, W.J. (2000) Evaluation of leukocyte adhesion on polyurethanes: the effects of shear stress and blood proteins. *Biomaterials* 2000.Nov.;21.(22.):2295.-303., 21, 2295-2303.
 27. Kao, W.J., Sapatnekar S, Hiltner A. & Anderson, J.M. (1996) Complement-mediated leukocyte adhesion on poly(etherurethane ureas) under shear stress in vitro. *J Biomed.Mater.Res.*, 32, 99-109.
 28. Kazatchkine, M.D. & Carreno, M.P. (1988) Activation of the complement system at the interface between blood and artificial surfaces. *Biomaterials*, 9, 30-35.
 29. Khan, M.M., Kunapuli, S.P., Lin, Y., Majluf-Cruz, A., Cadena, R.A., Cooper, S.L. & Colman, R.W. (1998) Three noncontiguous peptides comprise binding sites on high-molecular-weight kininogen to neutrophils. *Am.J.Physiol.*, 275, H145-H150
 30. Kieswetter, K., Schwartz, Z., Dean, D.D. & Boyan, B.D. (1996) The role of implant surface characteristics in the healing of bone. *Crit.Rev.Oral Biol.Med.*, 7, 329-345.
 31. Klötzer, W.T. & Reuling, N. (1990) Biokompatibilität dentaler Materialien: Teil II. Materialien mit Schleimhautkontakt. *Dtsch Zahnärztl Z*, 45, 437-442.
 32. Klötzer, W.T. & Schmalz, G. (1986) DIN-Vornorm 13930: Biologische Prüfung von Dentalwerkstoffen. Teil II. Anwendungsprüfungen. Vergleichbare Normen. *Dtsch Zahnärztl Z*, 41, 1248-1252.
 33. Kornu, R., Maloney, W.J., Kelly, M.A. & Smith, R.L. (1996) Osteoblast adhesion to orthopaedic implant alloys: effects of cell adhesion molecules and diamond-like carbon coating. *J.Orthop.Res.*, 14, 871-877.
 34. Kottke-Marchant, K., Anderson, J.M., Miller, K.M., Marchant, R.E. & Lazarus, H. (1987) Vascular graft-associated complement activation and leukocyte adhesion in an artificial circulation. *J Biomed.Mater.Res.*, 21, 379-397.
 35. Larsson, R., Elgue, G., Larsson, A., Ekdahl, K.N., Nilsson, U.R. & Nilsson, B. (1997) Inhibition of complement activation by soluble recombinant CR1 under conditions resembling those in a cardiopulmonary circuit: reduced up-regulation of CD11b and complete abrogation of binding of PMNs to the biomaterial surface. *Immunopharmacology*, 38, 119-127.

-
36. Lemons, J.E. (1990) Dental implant biomaterials. *Journal of the American Dental Association*, 121, 716.
 37. Liu, L. & Elwing, H. (1994) Complement activation on solid surfaces as determined by C3 deposition and hemolytic consumption. *J.Biomed.Mater.Res.*, 28, 767-773.
 38. Lopes, M.A., Knowles, J.C., Kuru, L., Santos, J.D., Monteiro, F.J. & Olsen, I. (1998) Flow cytometry for assessing biocompatibility. *Journal of Biomedical Materials Research*, 649-656.
 39. MacDonald, D.E., Markovic, B., Allen, M., Somasundaran, P. & Boskey, A.L. (1998) Surface analysis of human plasma fibronectin adsorbed to commercially pure titanium materials. *J.Biomed.Mater.Res.*, 41, 120-130.
 40. Mah, C. (1990) The evolution of implants over the fifty years. *Australian Prosthodontic Journal*, 4, 47
 41. McNally, A.K. & Anderson, J.M. (1994) Complement C3 participation in monocyte adhesion to different surfaces. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 91, 10119-10123.
 42. McNamara, A. & Williams, D.F. (1982) Scanning electron microscopy of metal-tissue interface. II. Observations with lead, copper, nickel, aluminium and cobalt. *Biomaterials*, 3, 165-176.
 43. Meffert, M.R., Langer, B. & Fritz, E.M. (1992) Dental Implants: A Review. *Journal of Periodontology*, Vol. 63, 859-870.
 44. Merritt, K., Edwards, C.R. & Brown, S.A. (1988) Use of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for quantification of proteins on the surface of materials. *J Biomed.Mater.Res.*, 22, 99-109.
 45. Nilsson, B., Larsson, R., Hong, J., Elgue, G., Ekdahl, K.N., Sahu, A. & Lambris, J.D. (1998) Compstatin inhibits complement and cellular activation in whole blood in two models of extracorporeal circulation. *Blood*, 92, 1661-1667.
 46. Nygren, H., Tengvall, P. & Lundstrom, I. (1997) The initial reactions of TiO₂ with blood. *J.Biomed.Mater.Res.*, 34, 487-492.
 47. O'Neal, R.B., Sauk, J.J. & Somerman, M.J. (1992) Biological requirements for material integration. *J Oral Implantol.*, 18, 243-255.
 48. Raffael, A. (2001) Grundlagen der analytischen Durchflußzytometrie. *Schwanznase*, 69, 00-007.

-
49. Remes, A. & Williams, D.F. (1991) Neutrophil polarization and immunoelectrophoresis assays in the study of complement activation by biomaterials. *Biomaterials*, 12, 607-613.
 50. Remes, A. & Williams, D.F. (1992) Immune response in biocompatibility. *Biomaterials*, 13, 731-743.
 51. Schmitz & Rothe (1994) Durchflußzytometrie in der klinischen Diagnostik. *Schattauer Verlagsgesellschaft*, Stuttgart, New York.
 52. Sevast'ianov, V.I. (1988) Role of protein adsorption in blood compatibility of polymers. *Crit.Rev.Biocompat.*, 4, 109-154.
 53. Sevast'ianov, V.I. & Tseytlina, E.A. (1984) The activation of the complement system by polymer materials and their blood compatibility. *J.Biomed.Mater.Res.*, 18, 969-978.
 54. Söderling, E., Herbst, K., Larmas, E. & Yli-Urpo, A. (1996) Protein adsorption to a bioactive glass with special reference to precorrosion. *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol.31, 525-531.
 55. Stanislawski, L., De Nechaud, B. & Christel, P. (1995) Plasma protein adsorption to artificial ligament fibers. *J.Biomed.Mater.Res.*, 29, 315-323.
 56. Tang, L. (1996) Molecular Determinants of Acute Inflammatory Responses. *J.Clin.Invest.*, 97
 57. Tang, L. (1998) Fibrinogen adsorption and host tissue responses to plasma functionalized surfaces. *J.Biomed.Mater.Res.*, 42, 156-163.
 58. Tang, L. & Eaton, J.W. (1993) Fibrin(ogen) mediates acute inflammatory responses to biomaterials. *J.Exp.Med.*, 178, 2147-2156.
 59. Thomson, L.A., Law, F.C. & Rushton, N. (1991) Biocompatibility of diamond-like carbon coating. *Biomaterials*, Vol.12, January, 37-40.
 60. Uniyal, S. & Brash, J.L. (1982) Patterns of adsorption of proteins from human plasma onto foreign surfaces. *Thromb.Haemost.*, 47, 285-290.
 61. Vogt, W. (1982) Aktivierung und biologische Wirkungen des Komplementsystems. *Funkt Biol Med*, 1, 189-198.
 62. Vroman, L. (1988) The life of an artificial device in contact with blood: initial events and their effect on its final state. *Bull.N.Y.Acad.Med.*, 64, 352-357.

-
63. Wachtvogel, Y.T., DeLaCadena, R. & Colman, R.W. (1993) Structural biology, cellular interactions and pathophysiology of the contact system. *Thromb Res*, 72, 1-21.
 64. Ward, P.A., Till, G.O. & Hauert, R. (1985) Systemic complement activation, lung injury and products of lipid peroxidation. *J Clin. Invest.*, 76, 517-527.
 65. Wälivaara, B., Askendal, A., Lundstrom, I. & Tengvall, P. (1996) Blood protein interactions with titanium surfaces. *J Biomater.Sci.Polym.Ed.*, 8, 41-48.
 66. Wälivaara, B., Aronsson, B.-O., Rodahl, M., Lausmaa, J. & Tengvall, P. (1994) Titanium with different oxides: in vitro studies of protein adsorption and contact activation. *Biomaterials*, Vol.15, 827-834.
 67. Weber, N., Wendel, H.P. & Ziemer, G. (2000) Quality Assessment of Heparin Coatings by Their Binding Capacities of Coagulation and Complement Enzymes. *J Biomater Appl*, 15, 8-22.
 68. Weber, N., Wendel, H.P. & Ziemer, G. (2001) Hemocompatibility of Heparin-coated Surfaces: The Key Role of Selective Plasma Protein Adsorption. *Hasenfuß*, 00, 10033-24007.
 69. Wendel, H.P., Weber N. & Ziemer G. (1999) Increased adsorption of high-molecular weight kininogen to heparin-coated artificial surfaces and correlation to hemocompatibility. *Immunopharmacology*, 43, 149-153.
 70. Williams, D.F. (1981) Implants in dental and maxillofacial surgery. *Biomaterials*, 2 , 133
 71. Williams, D.F. (1987) Definitions in biomaterials. *Elsevier*, Amsterdam.
 72. Williams, D.F., Askill, I.N. & Smith, R. (1985) Protein adsorption and desorption phenomena on clean metal surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol.19, 313-320.
 73. Yamada, K.M. (1978) Immunological Characterization of a Major Transformation-Sensitive Cell Surface Glycoprotein. Location. Redistribution and Role in Cell Shape. *J Cell Biol*, 78, 520-541.
 74. Yamada, K.M. & Olden, K. (1978) Fibronectins--adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature*, 275, 179-184.
 75. Yung, L.Y., Colman, R.W. & Cooper, S.L. (1999) Neutrophil adhesion on polyurethanes preadsorbed with high molecular weight kininogen. *Blood*, 94, 2716-2724.

76. Yung, L.Y., Lim, F., Khan, M.M., Kunapuli, S.P., Rick, L., Colman, R.W. & Cooper, S.L. (1996) Neutrophil adhesion on surfaces preadsorbed with high molecular weight kininogen under well-defined flow conditions. *Immunopharmacology*, 32, 19-23.
77. Yung, L.Y., Lim, F., Khan, M.M., Kunapuli, S.P., Rick, L., Colman, R.W. & Cooper, S.L. (2000) High-molecular-weight kininogen preadsorbed to glass surface markedly reduces neutrophil adhesion. *Biomaterials* 2000.Feb.;21.(4.):405.-14., 21, 405-414.
78. Ziats, N.P., Pankowsky, D.A., Tierney, B.P., Ratnoff, O.D. & Anderson, J.M. (1990) Adsorption of Hageman factor (factor XII) and other human plasma proteins to biomedical polymers. *J Lab.Clin.Med.*, 116, 687-696.

V Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit danke ich sehr herzlich Herrn Professor Dr. Jürgen Geis-Gerstdorfer.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Hans Peter Wendel aus dem Forschungslabor für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Chirurgische Klinik, Universitätsklinikum Tübingen, für die Betreuung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt Frau Doris Armbruster, Frau Michaela Braun, Frau Ingrid Schulz, Herrn Bernd Neumann und Herrn Dr. Norbert Weber aus dem Forschungslabor für Thorax-Herz- und Gefäßchirurgie für die Hilfe und tatkräftige Unterstützung bei Versuchsdurchführungen und der Auswertung vieler Experimente.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. M. Zwirner, Laboratorium der Universitäts-Frauenklinik Tübingen, und seinen Mitarbeitern für die Bereitstellung des *Becton & Dickinson* Durchflusszytometers und für die freundliche und geduldige Einführung in die Handhabung des Gerätes. Ich bedanke mich bei Dr. C. Weinstock, Universitätsklinik für Anaesthesiologie und Transfusionsmedizin, für die Bereitstellung des *Coulter* Durchflusszytometers und für seine Mithilfe.

Mein Dank gilt Frau Monika Hertel aus dem Mineralogischen Instituts der Universität Tübingen für die Bereitstellung der Ultraschallsiebe.

Des Weiteren danke ich Frau Christine Schille (Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik und Propädeutik der Universität Tübingen), Herrn Horst Hüttemann (Labor für Elektronenmikroskopie, Institut für Geowissenschaften der Universität Tübingen) und Herrn Horst Schoppmann (Labor für Elektronenmikroskopie, Zoologisches Institut der Universität Tübingen) für die Betreuung während des Versuchsteils *Taktile und Visuelle Oberflächenanalyse*.

VI Lebenslauf

Name: Steffen Ecker
Geburtsdatum: 06.01.1974
Geburtsort: Schwäbisch Gmünd
Eltern: Friedrich Ecker
Annemarie Ecker, geb. Nagel
Geschwister: Christine Ecker

Schulbildung

1980-1984 Grundschule Schillerschule Eislingen
1984-1993 Erich-Kästner-Gymnasium Eislingen

Zivildienst

1993-1994 Rettungshelfer beim DRK Göppingen

Hochschulbildung

01.11.1994 Studium an der Universität Tübingen im Fach
Physik/Biologie, Gymnasiallehramt
10.03.1995 Studium der Zahnheilkunde an der Universität
Tübingen
31.05.2000 Zahnärztliche Prüfung (Note: gut)
27.06.2000 Erteilung der zahnärztlichen Approbation

Zahnärztliche Tätigkeit

08/2000-10/2000 zahnmedizinische Auslandsfamulatur in Kap-
stadt, Südafrika
seit 11/2000 Ausbildungszahnarzt in Stuttgart und Gingen