

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Komm. Direktor: PD Dr. med. David Wohlrab)

**Untersuchungen des In-vitro-Verhaltens von osteokonduktiven
Implantatbeschichtungen für den Knochenersatz**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Florian Radetzki
geboren am 11.06.1980 in Halle/Saale
Betreuer: PD Dr. Anke Bernstein

Gutachter: Prof. Dr. med. habil. Andreas Nehrlich (München)
PD Dr. Anke Bernstein (Halle)

Öffentliche Verteidigung: 07.10.2009

de nihilo nihil

Gewidmet meiner Familie und Sophie

Referat

Zielsetzung:

Zur Optimierung der Osteointegration werden bioaktive calciumphosphathaltige Keramiken als Beschichtung für die metallischen Komponenten im Bereich der chirurgischen Gelenkendothetik verwendet. Hinsichtlich der chemischen Stabilität und des Langzeitverhaltens der Beschichtungsmaterialien werden zwei Thesen diskutiert. 1. Die Beschichtungen sollten schwer löslich sein, damit die osteokonduktiven Eigenschaften über den gesamten Implantationszeitraum gewährleistet werden können. 2. Die Keramiken sollten schnell resorbierbar sein und den Knochen direkt an die Metalloberfläche heranführen. Bei einem Ungleichgewicht zwischen Bioaktivität und Resorbierbarkeit besteht wiederum die Gefahr eines zu schnellen Substanzverlustes, der eine Schwäche der Implantatverankerung zur Folge hätte. Es muss nach Implantatbeschichtungen gesucht werden, die eine Balance zwischen Substanzverlust und Osteointegration gewährleisten.

Material und Methoden:

Es wurde das In-vitro-Verhalten von drei osteokonduktiven schnell resorbierbaren Keramiken und des Referenzmaterials β -TCP auf zellulärer Ebene untersucht. Die Materialien, die sich in kristalliner Zusammensetzung und Resorbierbarkeit unterscheiden, wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf Zelladhärenz, Zellproliferation und Zellmorphologie getestet. Dies beinhaltete den MTT-Test, Bewuchsversuche, ESEM- und Laserscanning-Untersuchungen.

Ergebnisse:

Es zeigte sich für alle Materialien keine basale Zytotoxizität. Die Bewuchsversuche belegen eine regelmäßige Ausbreitung mit suffizienter Proliferation der Zellen für alle getesteten Materialien in den ersten 19 Tagen. Die Analyse des Besiedlungsverhaltens ergab nach 24 h und 96 h auf allen Materialien eine identische Besiedlungsarchitektur mit kräftigen Zelladhäsionen sowie eng miteinander kommunizierender Zellen.

Schlussfolgerung:

Die Ergebnisse der In-vitro-Untersuchungen bescheinigen unter Einbeziehung der Resultate des Referenzmaterials β -TCP allen Materialien eine sehr gute Biokompatibilität. Die schnell resorbierbaren Keramiken zeigen auf zellulärer Ebene in der Frühphase der Osteointegration eine hohe bioaktive Fähigkeit.

1. Einleitung	1
1.1 Morphologie und Biologie des Knochengewebes	3
1.1.1 Funktion des Knochens	3
1.1.2 Bestandteile des Knochens	3
1.1.3 Formen des Knochengewebes	6
1.1.4 Mineralisation von Knochengewebe	7
1.1.5 Remodeling	8
1.1.6 Knochenheilung	9
1.2 Knochenersatzwerkstoffe	11
1.2.1 Definitionen	11
1.2.2 Einteilung	12
1.2.3 Keramiken als Knochenersatzstoffe	13
1.2.4 Metalle und Metalllegierungen	15
1.2.5 Herstellungsverfahren und Eigenschaften von Hydroxylapatitbeschichtungen	15
1.3 Calciumphosphatbeschichtungen im biologischen Kontext	17
1.3.1 Löslichkeit und Resorption	17
1.3.2 Interaktion zwischen Calciumphosphaten und Osteoblasten	18
1.4 Zellkulturversuche	21
1.4.1 Der MTT-Test	21
1.4.2 Die Konfokale Lasermikroskopie	21
1.4.3 ESEM (Environmental Scanning Electron Microscopy)	23
2. Zielstellung der Arbeit	24
3. Material und Methoden	25
3.1 Materialien	25
3.1.1 Zusammensetzung	25
3.1.2 Herstellung	26
3.1.3 Löslichkeit	26

3.2 Zellkulturversuche	27
3.2.1 Anlegen einer Primärkultur aus humanen Knochenmaterial	27
3.2.2 Nachweis der Kultivierung humaner Osteoblasten	28
3.2.3 MTT Test	29
3.2.4 Bewuchsversuche und Bestimmung der Zellzahl nach 3, 7, 11, 15, 19 Tagen	33
3.2.5 Konfokale Lasermikroskopie	34
3.2.6 ESEM (Environmental Scanning Electron Microscopy)	36
3.2.7 Statistik	38
4. Ergebnisse	39
4.1 MTT-Test	39
4.2 Bewuchsversuche und Bestimmung der Zellzahl nach 3, 7, 11, 15, 19 Tagen	42
4.3 Konfokale Lasermikroskopie	44
4.4 ESEM	48
5. Diskussion	52
6. Zusammenfassung	60
7. Literaturverzeichnis	61
8. Thesen	68

Abkürzungen

Abkürzungen:

A	Fläche
Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
BAM	Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung
Bidest.	bidestillata
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
bzgl.	bezüglich
ca.	circa
Ca/P	Calcium-Phosphat-Verhältnis
°C	Grad Celcius
DMEM-F12	Dulbecco's modified Eagle Medium – F12
DMSO	Dimethylsulfoxid
d.h.	das heißt
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESEM	environmental scanning electron microscopy
et al.	et alii
etc.	et cetera
E-modul	Elastizitätsmodul
FCS	Fötalkälberserum
g	Gramm
µg	Mikrogramm
GPa	Gigapascal
h	Stunde
HA	Hydroxylapatit
HBSS	hanks balanced salt solution
ISO	International Organization for Standardization

Abkürzungen

Jhd.	Jahrhundert
KF	Kulturflasche
l	Liter
µl	Mikroliter
MPa	Megapascal
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mg	Milligramm
min	Minuten
mm	Millimeter
ml	Milliliter
mRNA	messenger ribonucleic acid
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
o.g.	oben genannt
PBS	phosphate-buffered saline
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PS	Petrischale
rpm	rounds per minute
Tab.	Tabelle
TCP	Tricalciumphosphat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Ti6Al4V	Titanlegierung (6% Aluminium, 4% Vanadium)
u.a.	unter anderem
ROI	region of interest
z.B.	zum Beispiel
XRD	Röntgenbeugungsspektren
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

Im Bereich der chirurgischen Gelenkendoprothetik und des Knochenersatzes finden Implantatmaterialien zurzeit ihre häufigste Anwendung. Aufgrund nachweislicher Probleme bzgl. der Einheilung und funktioneller Eigenschaften, die den Ausbau der Implantate oft erforderlich machen, wird neben der Verbesserung von Operationstechniken und Erforschung molekularer Defektheilung ständig nach neuen biokompatiblen Implantatmaterialien gesucht.

Der herkömmlichen Verwendung von Knochenzement auf der Basis von Polymethylmethacrylat zur Fixierung des Implantats im Knochen steht eine zementfreie biologische Verankerung gegenüber. Eine erfolgreiche Implantatverankerung ist Voraussetzung für eine gute Einheilung und optimale Langzeitstabilität, die zu einer Verlängerung der Lebensdauer eines Gelenkersatzes führen. Die zementfreie Fixation von Implantaten, die auf Grund von Problemen wie Alters- und Korrosionserscheinungen mit Knochenzement verstärkt benutzt wird, erfordert eine außerordentlich gute Primärstabilität für eine endgültige bestmögliche Sekundärintegration des Implantates in den Knochen. Voraussetzung für diesen Prozess ist eine biologische Fixation von Implantaten im knöchernen Lager, die als Osteointegration bezeichnet wird. Diese im direkten Kontakt stehende Bindung zwischen Implantatmaterial und Knochen soll eine Knochenneubildung im Sinne einer biologischen Fixierung erreichen.

Für die Prothesen und insbesondere für den lasttragenden Teil des Gelenkersatzes stehen verschiedene Metalle und Metalllegierungen wie z.B. Eisen, Chrom, Nickel und vor allem Titan und seine Legierungen zur Verfügung. Diese Materialien sind nicht ausreichend in der Lage, positiven Einfluss auf die Osteointegration des Implantats zu nehmen. Deshalb werden zur Optimierung der Osteointegration bioaktive calciumphosphathaltige Keramiken, insbesondere Hydroxylapatit, als Beschichtung für die lasttragenden metallischen Komponenten verwendet.

Es konnte nachgewiesen werden, dass diese mit den Knochen biologisch-chemische Verbindungen für eine verbesserte Übertragung von Zugkräften eingehen und gleichzeitig die Differenzierung und Proliferation von Knochenzellen fördern.

Hinsichtlich der chemischen Stabilität und des Langzeitverhaltens der Beschichtungsmaterialien im knöchernen Lager werden zwei Thesen diskutiert. Das bekannte Hydroxylapatit hat die Eigenschaft, unlöslich zu sein und damit langzeitstabil bioaktive Eigenschaften zu garantieren.

Solche langzeitstabilen oder wenig resorbierbaren Verbindungen können über den gesamten Implantationszeitraum eine Osteointegration sicherstellen.

Ein Ablösen oder Abplatzen der Beschichtung von der metallischen Komponente kann jedoch den direkten Verbund zum Knochen gefährden und in der Konsequenz eine Lockerung der Prothese verursachen. Deshalb wird auch über schnell resorbierbare Materialien nachgedacht, die mit der Voraussetzung höherer bioaktiver Fähigkeiten und gleichzeitigem Abbau den Knochen direkt an die dafür notwendig aufgeraute Metalloberfläche heranführen können. Bei einem Ungleichgewicht zwischen Bioaktivität und Resorbierbarkeit besteht wiederum die Gefahr eines zu schnellen Substanzverlustes, der eine Schwäche der Implantatverankerung zur Folge hätte.

Deswegen muss nach Implantatbeschichtungen gesucht werden, die mit ausreichender Bioaktivität und adäquater Degradation die Balance zwischen Substanzverlust und Osteointegration gewährleisten.

1.1 Morphologie und Biologie des Knochengewebes

1.1.1 Funktion des Knochens

Das hoch differenzierte Knochengewebe bildet mit seiner großen Stabilität den Hauptanteil des Skelettsystems der Wirbeltiere und übernimmt damit Stütz-, Bewegungs- und Schutzfunktion des Organismus. Es ist formgebend und enthält das Knochenmark. Darüber hinaus ist das Knochengewebe als Speicher insbesondere für Calcium und Phosphor in entscheidendem Maße am Mineralstoffwechsel beteiligt (Schiebler et al. 1999, Sajonski und Smollich 1990).

Als Binde- und Stützgewebe besteht der Knochen aus spezifischen zellulären Bestandteilen und Interzellulärsubstanzen, mit denen die Funktionen sowie die Fähigkeit, sich optimal den gestellten Anforderungen anzupassen, aufrechterhalten werden. Dabei ist das wesentliche Merkmal des Knochens seine Leichtbauweise. Mit dieser kann das biologische Ökonomieprinzip im Sinne einer Einsparung von Stoffwechselenergie durch Reduktion der Knochenmasse bei gleichzeitiger Gewährleistung, allen mechanischen Beanspruchungen mit genügender Sicherheit gerecht zu werden, verwirklicht werden (Schiebler et al. 1999).

1.1.2 Bestandteile des Knochens

Zelluläre Bestandteile

Osteoblasten gehören zur Gruppe der Interzellulärsubstanzbildner mit einem stark entfalteten Syntheseapparat und entwickeln sich durch differentielle Zellteilung aus pluripotenten Stammzellen des am oder im Knochen vorhandenen Bindegewebes (Schiebler 2005).

Je nach Zellaktivität können Osteoblasten eine rundliche, kubische oder unregelmäßige Gestalt annehmen und besitzen meist einen exzentrisch lokalisierten euchromatinhaltigen Zellkern (Abb.1) (Sajonski und Smollich 1990, Nijweide 1986).

Die basophilen Zellen liegen dem Knochen direkt epithelartig in einer Reihe auf und sezernieren im Rahmen der direkten sowie indirekten Ossifikation pro Tag einen etwa 1 bis 2 μm breiten Saum einer noch nicht mineralisierten Grundsubstanz, die als Osteoid bezeichnet wird (Wintermantel und Ha 1998, Bucher 1997). Dieses vorwiegend aus Kollagen I, Glykosaminoglycanen und Proteoglycanen bestehende Gewebe nimmt mit der Tätigkeit der Osteoblasten stetig an Umfang zu und erhält mit Einlagerung von Calcium- und Phosphationen in Form von Calciumphosphatkristallen die für den Knochen charakteristische Härte (Bucher 1997, Sajonski und Smollich 1990).

Nach Beendigung ihrer Funktion sterben 50-70% der Osteoblasten durch Apoptose ab. Der andere Teil wandelt sich in Osteozyten oder „lining cells“ um.

„Lining cells“ befinden sich auf stabilen Knochenoberflächen und besitzen weniger und minder entwickelte Zellorganellen als aktive Osteoblasten. Sie werden für den Stofffluss zwischen Knochensubstanz und umliegendem Gewebe und damit für die Stabilisation des Knochens verantwortlich gemacht (Wintermantel und Ha 1998, Watanabe et al. 1993).

Inaktive Osteoblasten, die ringsum von Osteoid umgeben sind, transformieren zu abgeplatteten länglichen **Osteozyten** (Abb.1). Die im Knochen am häufigsten vorkommenden Zellen sind arm an Zellorganellen und Enzymaktivitäten und weisen eine Abnahme der paraplasmatischen Einlagerungen auf, sind jedoch prinzipiell zu der gleichen Syntheseleistung für den Erhalt der Knochengrundsubstanz fähig. Deswegen bilden Osteozyten die trophischen Zentren der Knochengrundsubstanz (A. Bob und K. Bob 2007). Osteozyten liegen einzeln in kleinen ca. 30 µm im Längsdurchmesser großen Knochenzellhöhlen, Lacunae osseae, deren Wände von Interzellularsubstanz gebildet werden. Mit ihren allseitig langen dendritischen Fortsätzen, die sich in feinen Knochenkanälchen befinden, stehen die Osteozyten durch Nexus (gap junctions) im wachsenden und aktivierten Knochen untereinander und mit Osteoblasten in Verbindung.

Im ausgereiften adulten Knochen sind die Kanälchen mit nicht mineralisierter Grundsubstanz ausgefüllt und dienen neben den pericellulären Räumen, die durch die unvollständige Ausfüllung der Knochenhöhlen mit Osteozyten entstehen, den wichtigen intraossalen Stofftransport.

Dieses System gewährleistet nicht nur die Ernährung, sondern darüber hinaus auch das Wachstum und die Mechanotransduktion des Knochens (Wintermantel und Ha 1998, Nöbel 2006, Sajonski und Smollich 1990).

Die **Osteoklasten** gehören zum Makrophagensystem und stellen polynukleäre Riesenzellen dar. Sie entstehen durch die Fusion von mononukleären Vorläuferzellen des Phagocytensystem und vermögen auf enzymatischem Wege Knochengewebe abzubauen. Die Zellen haben einen ca. 10 bis 100 µm großen Durchmesser und besitzen bis zu 100 Zellkerne (Abb.1). Sie weisen einen hohen Gehalt an Ribosomen, Mitochondrien, Lysosomen und Vakuolen auf und sind mit vielfältigen Enzymen, wie saure Phosphatase, β-Glukuronidase, Succinodehydrogenase, Cytocromoxydase u.a., ausgestattet (A. Bob und K. Bob 2007, Lees und Heersche 2000, Bucher 1997). Sie liegen häufig in Einbuchtungen des Knochens, die Erosionsbuchten oder Howshipschen Lakunen genannt werden. Diese entstehen durch die Tätigkeit der Osteoklasten, mineralische sowie organische Bestandteile der Knochenmatrix zu resorbieren.

Für die Resorption heften sich Osteoklasten an das Knochengewebe und bilden auf der dem Knochen zugerichteten Zellmembranseite partielle Mikrozottenbesätze, der sogenannten „ruffled border“, aus. Diese bewirken eine Vergrößerung der Abraumfläche gegenüber dem Knochengewebe und schirmen Resorptionskompartimente zur Umgebung ab (Sajonski und Smollich 1990, Kornak 2003). In diese Kompartimente entleeren die Osteoklasten Vesikel mit zahlreichen lysosomalen und nicht lysosomalen Enzymen, u.a. Kathepsin K und Metalloproteinasen, und sezernieren über ATPasen H^+ -Protonen zur Absenkung des pH-Wertes auf ca. 4,5. Das saure Milieu ist für die Auflösung des Knochenapatits sowie für die Aktivität bestimmter Enzyme wie z.B. Proteasen für den Abbau von Matrixproteinen notwendig.

Die Aktivität und Differenzierung der Osteoklasten werden über das RANKL/RANK/Osteoprotegerin System von Osteoblasten gesteuert. Umgekehrt haben Osteoklasten über durch die Knochenresorption freigesetzten Gewebshormone Einfluss auf die Osteoblastenaktivität. Somit sind die Funktionen der Osteoblasten und Osteoklasten, die im Knochen scheinbar gegensätzlich fungieren, vielfach miteinander verknüpft (Teitelbaum 2007, Kornak et al. 2003, Lees und Heersche 2000, Schiebler 2005).

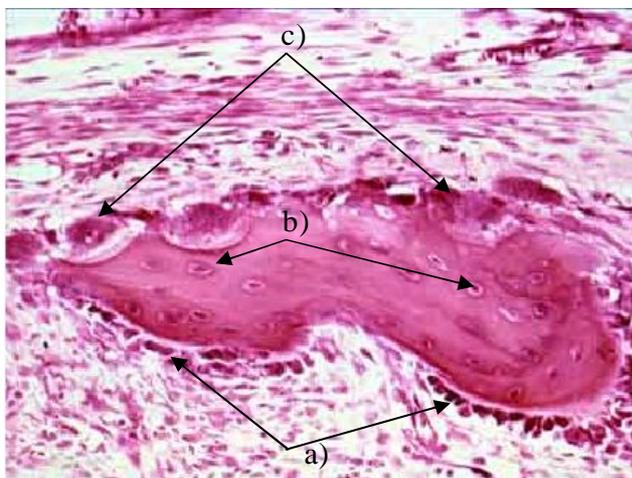


Abb. 1: a) Osteoblasten, b) Osteozyten, c) Osteoklasten (Millette 2000)

Die Interzellulärsubstanz

Die Interzellulärsubstanz oder Knochengrundsubstanz besteht zu etwa 50% aus anorganischen Bestandteilen (Mineralien), zu 25% aus organischen Verbindungen und 25% Wasser.

Die chemische Zusammensetzung des Knochengewebes weist aber eine große Variationsbreite auf und ist neben Umwelt-, Ernährungs-, und Stoffwechseleinflüssen vor allem vom Alter und Geschlecht abhängig (Sajonski und Smollich 1990).

Die anorganische Knochensubstanz macht ca. 70-80% des Knochengewichtes, aber nur 50% des Knochenvolumens aus. Sie ist in die Knochengrundsubstanz eingelagert und für die Druckfestigkeit des Knochens verantwortlich. Sie setzt sich vorwiegend aus Calcium und Phosphat zusammen, das in Form von Hydroxylapatit oder Carbonatapatit vorliegt (Junqueira und Carneiro 1991). Hydroxylapatit, der wichtigste Vertreter, hat die Strukturformel $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ und ein Calcium/Phosphorverhältnis von 1,67. Innerhalb der Kristallstruktur kann die OH-Gruppe auch durch Chlor oder Fluor ersetzt sein und teilweise sind die Elemente Eisen, Magnesium, Strontium oder Barium anstatt des Calciums nachweisbar (Neumüller 1979). Zusätzlich konnten nicht apatitische Carbonat- und Phosphatgruppen nachgewiesen werden, die strukturell und physiologisch löslich und sehr reaktiv auftreten (Barrère et al. 2006).

Die organische Knochensubstanz besteht zu 90% aus Kollagen (vorwiegend Kollagen Typ I), das in Form von kollagenen Fasern vorliegt. Diese Fasern nehmen in Hauptbelastungszonen des Knochens an Menge zu und verleihen diesem die mechanische Festigkeit. Nicht-kollagene Proteine machen zwar nur 10% der organischen Knochensubstanz aus, spielen jedoch beim Stoffwechsel des Knochengewebes und bei der Mineralisation der Knochenmatrix eine wesentliche Rolle. Die Nicht-kollagenen Proteine teilen sich auf in 23% Osteonektin, 15% Osteocalcin, 9% Sialoprotein, 9% Phosphoproteine, 5% α -2-Glykoproteine, 4% Proteoglykane, 3% Albumin und weitere Proteine in geringeren Anteilen (Wintermantel und Ha 1998).

1.1.3 Formen von Knochengewebe

Das Knochengewebe tritt grundsätzlich in zwei Formen auf. Man unterscheidet zwischen Geflecht- oder Faserknochen und Lamellenknochen (Sajonski und Smollich 1990).

Der phylogenetisch ältere Geflecht- oder Faserknochen ist durch eine geflechtartige Anordnung der Kollagenfibrillen gekennzeichnet. Er hat eine beachtliche Druck- und Zugfestigkeit, wobei seine Biegefestigkeit nicht sehr groß ist. Physiologisch und während Heilungsprozessen neu gebildetes Knochengewebe stellt zunächst immer Geflechtknochen dar und wird in der Regel in Lamellenknochen umgebaut. Dadurch kommt Geflechtknochen beim Erwachsenen nur an wenigen Orten vor, z.B. am Felsenbein, in der Umgebung der Schädelnähte oder an der Insertion einzelner Sehnen (Schiebler et al. 1999, Sajonski und Smollich 1990).

Für den Lamellenknochen ist ein lamelläres Ordnungsprinzip der Interzellulärsubstanz typisch. Die Lamellen stellen 5-10 μm dicke Platten dar, die konzentrisch um einen Blutgefäße und Nerven enthaltenden Kanal, der als Havers-Kanal bezeichnet wird, angeordnet sind.

Im Kontaktbereich der Lamellen liegen die Knochenzellhöhlen mit den Osteozyten, die über Fortsätze miteinander in Verbindung stehen. Ein Havers-Kanal mit den dazugehörigen Lamellensystem und Osteozyten bildet etwa einen 3 mm langen Zylinder und wird Osteon genannt. Haverskanäle stellen gemeinsam mit querverlaufenden gefäßführenden Knochenkanälen (Volkmannsche Kanäle) ein weitmaschiges zusammenhängendes Kanalnetz dar, das den Knochen drainiert. Um und zwischen den Osteonen liegen fragmentartige Schalllamellen, die im Rahmen von Ab- und Umbauprozesse entstanden sind.

Generallamellen werden Lamellen bezeichnet, die an der äußeren und inneren Oberfläche den Knochen als Ganzes umfassen (Sajonski und Smollich 1990, Schiebler et al.1999).

1.1.4 Mineralisation von Knochengewebe

Die Mineralisation spielt neben der Anordnung der Kollagenfibrillen und dem lamellären Aufbau für die Festigkeit des Knochens eine bedeutende Rolle. Sie erfolgt außerhalb der Zellen und findet grundsätzlich in vier eng miteinander verbundenen Phasen statt (Boskey 1984).

Das durch Sekretion von Matrix gebildete Osteoid wird im ersten Schritt mit Zunahme von extrazellulärem Calcium und Phosphat sowie mit steigenden Konzentrationen von Phosphoproteinen, Glykoproteinen, Sialoprotein und bestimmter Enzyme modifiziert.

Im zweiten Schritt lagern sich nun an geeignete Keimbildungsplätze, z.B. an einer Kollagenfaser, Calciumionen an und es kommt zur Ausfällung von Calciumphosphat, das sich schließlich in Hydroxylapatit umwandelt. Ein zweiter Weg der Mineralisation erfolgt offenbar über Matrixvesikel, die sich aus den Zellmembranen der Osteoblasten abschnüren und neben Calcium- und Phosphationen auch alkalische Phosphatase und Pyrophosphatase enthalten. In den Vesikeln kommt es zur Bildung von Calciumphosphatkristallen, die sich nach Ruptur der Vesikel an bzw. in den Kollagenfasern ablagern und erneut als Keimbildner dienen (Bucher 1997, Schiebler et al.1999). Auch die Mitochondrien der Zellen speichern Calcium und Phosphat und setzen diese im Verlauf der Mineralisation frei (Jerosch et al. 2002).

Im dritten Schritt entstehen in der Folgezeit weitere Calciumphosphatausfällungen an den Kristallisationskeimen, die überwiegend in Hydroxylapatit oder Carbonatapatit umgewandelt werden. Gewöhnlich vollzieht sich der Mineralisationsprozess sehr schnell, so dass mehr als 60% der Knochenanlage innerhalb von Stunden mineralisiert ist. Danach nimmt die Menge an Hydroxylapatit nur langsam zu und führt unter Abnahme von Wasser und nicht-kollagenen Proteinen zu einer vollständigen Mineralisation und der damit verbundenen charakteristischen

Härte des Knochens (Buckwalter et al. 1996).

Im vierten und letzten Schritt werden die ein Leben lang anhaltenden Prozesse zusammengefasst, die für die Resorption sowie für die Neubildung des Knochens (Remodeling) verantwortlich sind. Der Knochen ist dadurch fähig, sich ständig an die funktionelle Belastung sowie an den Mineralstoffwechsel des Gesamtorganismus anzupassen (Boskey 1984).

1.1.5 Remodeling

Unter dem Begriff Remodeling versteht man den dynamischen lebenslang anhaltenden Prozess des Knochenumbaus. Dieser sorgt für eine adäquate funktionelle Anpassung an wechselnde Belastungen des Knochens und Veränderungen im Mineralstoffwechsel sowie für den Ersatz von alten und defekten Knochen, um Frakturereignisse vorzubeugen.

Schon Galileo bemerkte im 17. Jhd. eine Korrelation zwischen Knochenmasse und Körpergewicht und Aktivität. Wolff konkretisierte 1892 in seinem Transformationsgesetz die Fähigkeit des Knochens, sich adaptiv gegenüber wechselnden Belastungen zu verhalten.

Bei einem Erwachsenen werden durchschnittlich ca. 25% trabekulärer und 3% kortikaler Knochen in einem Jahr abgebaut und durch neuen Knochen ersetzt (Parfitt 1994). Untersuchungen haben gezeigt, dass vor allem Druckkräfte zum Knochenanbau, Entlastung zur Knochenatrophie, Zugkräfte zur Bindegewebsbildung und Scherkräfte zur Knorpelbildung führen (Chao und Inoue 2003).

Das Remodeling beginnt mit der Resorption von bestehenden Knochen durch Osteoklasten. Den Osteoklasten folgen spindelförmige Zellen, Osteoblasten und kleine Blutgefäße in die entstehenden Knochenhöhlräume. Sobald die Osteoklasten ihre resorptive Aktivität beendet haben, machen sie Platz für die Osteoblasten, die mit dem Sezernieren von Osteoid beginnen.

Die Mineralisation der neuen Grundsubstanz vervollständigt den Prozess des Remodelings (Buckwalter et al. 1996).

Insgesamt wird immer gleich viel Knochen aufgebaut, wie vorher resorbiert wurde, so dass die strukturelle Integrität des Knochengewebes erhalten bleibt. Diese im Gleichgewicht stehende osteoklastische Resorption und osteoblastischer Synthese wird als coupling bezeichnet (Ng et al. 1997).

Das Remodeling wird neben lokalen Faktoren wie Zytokinen und Wachstumsfaktoren (z.B. Insulin like Growth Factor-I/II, Transforming Growth Factor- β , Bone Morphogenic Protein), die innerhalb der extrazellulären Matrix vorkommen oder von Knochenzellen synthetisiert werden,

auch zentral hormonell reguliert (Amling et al. 2000, Ng et al. 1997). Neben Hormonen wie den Geschlechtssteroiden oder Parathormon nimmt auch das von Fettzellen produzierte Hormon Leptin als stärkster endokriner Inhibitor der Knochenbildung Einfluss auf den Knochenumbau (Amling et al. 2000).

1.1.6 Knochenheilung

Die Heilung eines Knochendefektes setzt eine Kaskade von Gewebereaktionen, die Geweberückstände entfernt, die Blutversorgung wieder aufbaut und neues Knochengewebe wieder bildet, voraus (Simmons 1985).

Die natürliche oder spontane Knochenheilung tritt bei mechanisch instabilen Bedingungen auf, wobei unter Bildung eines periostalen und endostalen Kallus, das temporäre Gewebe im Verlauf der Defektheilung, die Fragmentenden fixiert und schließlich knöchern zusammen geschweißt werden (Debrunner 2002).

Histologisch kann die Defektheilung in 4 Phasen eingeteilt werden (Bolander 1992):

1. Unmittelbare Verletzungsreaktion

Unmittelbar nach dem Knochenbruch kommt es im Defektbereich zur Ausbildung eines Hämatoms, das sich unter Einwanderung von Entzündungszellen und Vermehrung von angrenzenden undifferenzierten Zellen zu einem körnigen, faserarmen, zell- und gefäßreichen Granulationsgewebe organisiert.

2. Periostale Ossifikation

Unter dem Periost innerhalb des Knochendefektes synthetisieren Osteoblasten, die sich aus Vorläuferzellen im Periost differenziert haben, neues Knochengewebe. Diese Knochenbildung erfolgt direkt ohne knorpelige Zwischenstufe.

3. Knorpelbildung

Im Granulationsgewebe organisieren sich ebenfalls aus den undifferenzierten eingewanderten Zellen Chondrozyten (Knorpelzellen). Diese synthetisieren angrenzend an die fortschreitende periostale Knochenbildung eine knorpelige Matrix bis das gesamte Granulationsgewebe durch diesen Prozess in Knorpelgewebe umgebaut ist.

4. Enchondrale Ossifikation

Bei der enchondralen Ossifikation wird die gesamte Knorpelmasse zu Knochen umgewandelt. Dabei hypertrophieren die an den subperiostalen Knochen angrenzenden Chondrozyten. Die chondroide extrazelluläre Matrix kalzifiziert und Kapillaren sprossen aus dem Knochengewebe

ein. Osteoblasten folgen den Blutgefäßen und synthetisieren osteoide Matrix. Dabei entsteht zunächst Faser- oder Geflechtknochen, der den Defektbereich überbrückt. In der Folgezeit reifen über das Remodeling der neue Knochen und die darunter liegende Kortikalis zur normalen Knochenarchitektur heran. Insgesamt entspricht die natürliche Knochenheilung etwa einer Rekapitulation der embryonalen Knochenentwicklung (Debrunner 2002).

Mit der Einführung von starren Kompressionsosteosynthesen kam es zu tief greifenden Änderungen des natürlichen Frakturheilungsmechanismus. Unter mechanisch absolut stabilen Verhältnissen im Defektbereich tritt eine Kunstform der Knochenheilung auf, die als direkte oder primäre Knochenheilung bezeichnet wird. Sie ist durch fehlende Resorption und fehlende Kallusbildung charakterisiert (Stürmer 1996).

Nach Schenk und Willenegger (1977) kann diese Knochenheilung als Kontaktheilung oder Spalthheilung ablaufen. Dabei spielt die Defektgröße eine wichtige Rolle. Bis zu einem Grenzwert von ca. 200 µm findet die Kontaktheilung als konzentrisches Auffüllen des Defektes mit Lamellenknochen statt. In größeren Defekten erfolgt dagegen die Spalthheilung, bei der innerhalb von 1-2 Wochen zuerst ein aus Faserknochen bestehendes Trabekelwerk errichtet wird, dessen Maschen später konzentrisch durch Lamellenkochen ersetzt werden. Faserknochen ist durch das Fehlen einer Lamellenstruktur gekennzeichnet und reich an Osteozyten. Er kann schneller als Lamellenknochen gebildet werden und seine Osteoblasten sind in der Lage, ihre Matrixbausteine nicht nur entlang der basalen Zelloberfläche, sondern auch entlang der seitlichen Grenzflächen auszuschleusen. Dadurch ist eine rasche und raumgreifende Knochenbildung möglich (Schenk und Willenegger 1977).

Osteosynthesen sind in vielen Fällen vorteilhaft, z.B. wenn eine anatomische Reposition erwünscht ist. Jedoch findet dabei die primäre Knochenheilung unter künstlich erzeugten Bedingungen statt und ihre mechanische Festigkeit ist zumindest in der Anfangsphase geringer als jene des natürlichen Knochenkallus. Sie ist deshalb auf die Stabilität der Osteosynthese angewiesen (Debrunner 2002).

Die verschiedenen Vorgänge der Knochenheilung, die auf zellulärer Ebene die Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Chemotaxis, Angiogenese und Synthese von Extrazellulärmatrix einschließen, werden von verschiedenen Faktoren reguliert. Neben systemischen Bedingungen wie metabolische und genetische Voraussetzungen, Hormone (u.a. Parathormon, Katecholamine) oder Vitamine (Bolander 1992, Simmons 1985) und lokalen Wachstumsfaktoren (u.a. Insulin like Growth Factor-I, Fibroblast Growth Faktor, Transforming Growth Factor-β, Platelet Derived

Growth Factor, Bone Morphogenic Protein) sowie Interleukine und andere Zytokine (Mohan et al. 1991, Bolander 1992) nehmen auch chemisch-physikalische (Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidpartialdruck), elektrische (Simmons 1985) und mechanische Faktoren (Chao und Inoue 2003) Einfluss auf die oben erwähnten zellulären Vorgänge der Knochenheilung.

1.2 Knochenersatzwerkstoffe

1.2.1 Definitionen

Knochenersatzwerkstoffe sind Biomaterialien, die als nicht körpereigene Substanzen nach der Implantation vorhandene strukturelle Elemente, ganze Gewebe und deren Funktionen ersetzen und alleine oder im Zusammenwirken mit anderen Materialien den Knochenheilungsprozess fördern (Rueger 1998, Schnürer et al. 2003). Dabei wird angestrebt, die Knochenheilung in bezug auf Quantität und Qualität des neu gebildeten Knochens sowie Geschwindigkeit der Einheilung des Implantats positiv zu beeinflussen bzw. zu beschleunigen und gleichzeitig ein mechanisch besser belastbares Implantat im Vergleich zu autogenen knöchernen Transplantaten zu entwickeln (Rueger 1998).

Die Biokompatibilität wird als Verträglichkeit zwischen einem technischem und biologischem System verstanden und stellt die Grundvoraussetzung für eine gute Knochenintegration des Implantatmaterials dar (Wintermantel und Ha 1998, Schnürer et al. 2003).

Schenk (1986) unterscheidet folgende Grade der Kompatibilität bei Knochenimplantaten:

Inkompatibel	Freisetzung von Substanzen in toxischen Konzentrationen oder von Antigenen, die Immunreaktionen provozieren Reaktionen: Fremdkörperreaktion, Entzündung, Nekrose, Abstoßung
Biokompatibel	Freisetzung von Substanzen in nicht toxischen Konzentrationen Reaktionen: Einkapselung in Bindegewebe, milde Fremdkörperreaktion, Integration in den Knochen möglich
Bioinert	Keine Freisetzung toxischer Substanzen
Bioaktive	Positive Interaktion mit Gewebedifferenzierung Reaktionen: Bindung oder Adhäsion von Knochen entlang der Grenzfläche zwischen Implantat und Empfängergewebe

Die bioaktive Wirkung von Implantaten kann sich induktiv oder konduktiv verhalten.

Induktiv	Umwandlung undifferenzierter mesenchymaler Vorläuferzellen in Osteoprogenitor-Zellen mit nachfolgender Osteogenese
Konduktiv	Werkstoff dient als Gerüst für Knochenablagerung, aber nur in osteogener Umgebung (Leitschieneneffekt)

Unter Biofunktionalität wird die Substitution einer oder mehrerer Funktionen im biologischen System durch ein technisches System verstanden. Die Hauptfunktion von Knochenersatzwerkstoffen besteht in der Lastübertragung. Eine ausreichende Steifigkeit, Festigkeit und eine genügend hohe Zähigkeit sowie eine gute Implantatstabilisierung im Empfängergewebe sind Voraussetzungen für die Biofunktionalität lasttragender Implantate (Wintermantel und Ha 1998).

1.2.2 Einteilung

Biokompatible synthetische Werkstoffe lassen sich nach Osborn (1989,1991) nach den drei Möglichkeiten der Knochenreaktion mit dem Implantat unterteilen.

Biotolerante Werkstoffe, zu denen Knochenzement, rostfreie Stähle und Chrom-Cobalt-Legierungen gehören, reagieren mit dem umliegenden Knochengewebe über eine Distanzosteogenese, bei der das Implantat mit einer Bindegewebsschicht umkapselt wird.

Bioinerte Werkstoffe wie Aluminiumoxid, Zirkonoxid, Kohlenstoffwerkstoffe, Titan und Titanlegierungen rufen eine Kontaktosteogenese hervor, bei der in unmittelbarer Nähe des Implantats Knochengewebe ohne Bindegewebsbildung entsteht und das Knochenwachstum in Richtung der Implantatoberfläche erfolgt. Bioinerte Stoffe können nur Druck- aber keine Zugbelastungen übertragen (Willmann 1999).

Die **bioaktiven Werkstoffe**, zu denen Calciumphosphathaltige Keramiken (u.a.Hydroxylapatit) und Glaskeramiken gezählt werden, induzieren eine Verbundosteogenese, bei der die Knochenbildung an der Implantatoberfläche beginnt und ihr Wachstum zum Empfängergewebe gerichtet ist.

Rueger (1998) hält aufgrund der Heterogenität und der Vielfalt der heutigen Knochenersatzmaterialien und Materialkombinationen, die eine Einteilung nach chemischer Zusammensetzung, nach ihrem Wirkmechanismus oder dem möglichen Indikationsbereich nicht zulassen, lediglich eine Einteilung nach den Ausgangsverbindungen bzw. dem Herstellungsverfahren derselben für sinnvoll. So werden folgende Materialklassen unterschieden:

1. Biologisch, organische Substanzen
2. Synthetische, anorganische Materialien
3. Synthetische, organische Verbindungen
4. Komposite

Diese Klassifizierung basiert auf der Tatsache, dass die biologischen Materialien (z.B. Knochenmatrixextrakte, -fraktionen, Wachstumsfaktoren) aus der organischen Komponente des Knochens gewonnen wurden, wogegen die synthetischen, anorganischen Substanzen (z.B. Calciumphosphatkeramiken unterschiedlicher Stöchiometrie) aus der anorganischen Phase des Knochens gewonnen werden könnten.

Zu den synthetisch, organischen Verbindungen zählen organische Polymere (z.B. Polyester, Polyaminosäuren) und deren Kombinationen.

Mischungen bzw. Kombinationen von Substanzen der Klassen 1, 2 und 3 und werden in der Klasse 4 als Komposite zusammengefasst.

1.2.3 Keramiken als Knochenersatzstoffe

Zu den Keramiken als Knochenersatzstoffe werden vor allem reine Oxide wie Aluminium- und Zirkonoxid, Calciumphosphate und Glaskeramiken gezählt. Auch anorganische Gläser wie die Biogläser spielen eine Rolle als Implantatmaterial.

Die Oxidkeramiken Aluminiumoxid und Zirkonoxid gehören zu den bioinerten Werkstoffen und finden ihre Anwendung als Gleitpaarung im Bereich der Hüftendoprothetik, vor allem bei jungen Patienten, und als Dentalimplantaten (Willmann 1999, Hench 1991, Piconi und Maccauro 1999). Biogläser sind bioaktive Materialien, die auf Basis der sauren Oxide Phosphoroxid und Siliciumoxid und der basischen Oxide Calciumoxid, Natriumoxid, Kaliumoxid, Magnesiumoxid, Zinkoxid etc. aufgebaut sind. An implantierten Biogläsern treten Ionenaustauschreaktionen mit dem benachbarten organischen Milieu auf, wobei z.B. Calcium- oder Natriumionen aus einem ungeordneten dreidimensionalen Phosphoroxid-Siliciumoxid-Netzwerk des Glases herauswandern und durch Hydroniumionen ersetzt werden. Diese Bioaktivität ermöglicht ein Anwachsen von vitalem Gewebe direkt an der Oberfläche des implantierten Glases (Schnürer et al. 2003, Silver et al. 2000).

Calciumphosphate sind in natürlicher Form als anorganische Komponente der Hartgewebe von Säugetieren aber auch als pathologische Kristallisation, die für bedeutende Erkrankungen wie Arteriosklerose oder Steinbildung verantwortlich ist, vielfältig anzutreffen.

Calciumphosphate sind an vielen Stellen im Körper in gelöster oder fester Form weit verbreitet, sodass ein Großteil der Biomaterialien mit hoher Biokompatibilität auf diese Materialien beruht. Die entscheidenden Parameter für die Einteilung bzw. Benennung der Calciumphosphate sind das molare Ca/P Verhältnis, die Löslichkeit in Wasser sowie die Oberflächenbeschaffenheit.

Je kleiner das Ca/P Verhältnis, desto saurer und besser wasserlöslich ist das Calciumphosphat (Dorozhkin und Epple 2002, Koutsoukos et al. 1980).

Grundsätzlich gilt, dass Keramiken mit einem stöchiometrischen Ca/P-Verhältnis zwischen 1,0 bis 2,0 die beste biologische Verträglichkeit aufweisen (Rueger et al. 1998).

Die als Knochenersatzmaterialien zum Einsatz kommenden anorganischen Keramiken bestehen aus den Basissubstanzen Hydroxylapatit $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ und Tricalciumphosphat $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Schnürer et al. 2003, Wintermantel und Ha 1998).

Hydroxylapatit besitzt ein Ca/P-Verhältnis von 1,67 und wird nur sehr langsam oder gar nicht abgebaut. Biomaterialien auf der Basis von HA sind bis heute die meist verwendeten Knochenersatzstoffe. Sie sind in ihrer elementaren Zusammensetzung dem im menschlichen Knochen vorkommenden biologischen Apatit sehr ähnlich, nicht toxisch, besitzen eine hohe chemische Stabilität und verursachen keine entzündliche oder immunologische Reaktion (Silva et al. 2005, Barrère et al. 2006, Coathup et al. 2001).

Tricalciumphosphatkeramiken haben ein Ca/P-Verhältnis von 1,5. Sie unterliegen chemischen Lösungsprozessen, die zum schnellen Abbau der Keramik führen. Es bestehen 2 Kristallmodifikationen, α -TCP und β -TCP, die unterschiedliches Verhalten aufzeigen. Neben der gleichen chemischen Zusammensetzung hat α -TCP ein größeres Auflösungsvermögen als β -TCP und entsteht nach Erhitzen von β -TCP auf mehr als 1170 °C (Schnürer et al. 2003, Barrère et al. 2006).

Calciumphosphatkeramiken werden klinisch als Pulver, Granulat, Festkörper und Beschichtungen von Metallimplantaten im Bereich der Knochenersatzstoffe verwendet (Hench 1991, Schnürer et al. 2003, Tadic und Epple 2004).

Die Verwendung von Calciumphosphat zur Beschichtung metallischer Komponenten von Endoprothesen spielt eine große Rolle in der Medizin. Für den lasttragenden Teil des Gelenkersatzes stehen verschiedene Metalle und Metalllegierungen wie z.B. Eisen, Chrom, Nickel und vor allem Titan und seine Legierungen zur Verfügung. Diese Materialien sind aber nicht ausreichend in der Lage, positiven Einfluss auf die Osteointegration des Implantats zu nehmen. Deshalb wurden schon früh Wege gesucht, den mechanischen Kontakt an der Grenzfläche

Implantat-Knochen zu verbessern (Dorozhkin und Epple 2002, Wintermantel und Ha 1998). So fördert neben einer Erhöhung der Oberflächenrauigkeit die Beschichtung mit Calciumphosphaten eine erfolgreiche Osteointegration (Dorozhkin und Epple 2002).

1.2.4 Metalle und Metallegierungen

Für Prothesen und insbesondere für den lasttragenden Teil des Gelenkersatzes stehen heute verschiedene Metalle und Metallegierungen wie z.B. Eisen, Chrom, Nickel und vor allem Titan und seine Legierungen zur Verfügung.

Reine Metalle können akute Abstoßungsreaktionen auslösen oder zu Allergien und Entzündungsreaktionen führen. Eine Voraussetzung für die Minimierung derartiger pathologischer Reaktionen ist die chemische Korrosionsbeständigkeit, die bei refraktären Metallen durch die selbst bei geringem Sauerstoffpartialdruck ausbildende, dichte und haftende Oxidschicht gegeben ist. Zu diesen Metallen gehören z.B. Kobalt, Chrom, Titan, Zirkon und Niob. Die meisten Erfahrungen und Erfolge mit hydroxylapatitbeschichtenden Implantaten für den Gelenkersatz hat man mit Titan, seine Legierung (Ti6Al4V) und Cobaltlegierungen gemacht (Willmann 1999, Jaffe und Scott 1996).

Materialien mit einem großen E-Modul, z.B. rostfreier Edelstahl (200 GPa), sind steifer als Knochen (20 GPa). Dieser Unterschied bewirkt relative Mikrobewegungen zwischen Implantat und Knochen, was letztendlich nach dem Wolff'schen Gesetz zu Knochenatrophie mit Bindegewebsbildung und schließlich zur Implantatlockerung führen kann (Willmann 1999).

Titan und seine Legierungen haben vergleichsweise ein niedriges E-Modul (110 GPa), das die Spannungen an der Grenzfläche zum Knochen mindert. Dadurch und auf Grund der Ausbildung einer korrosionsbeständigen Oxidschicht sind Titan und seine Legierungen Mittel der ersten Wahl im Bereich der orthopädischen und dentalen Endoprothetik (Jaffe und Scott 1996, Schmidt et al. 2001).

1.2.5 Herstellungsverfahren und Eigenschaften von Hydroxylapatitbeschichtungen

Techniken zur Erstellung von Hydroxylapatitbeschichtungen sind sehr vielfältig. Sie umfassen Plasmaspritzen, biomimetische, elektrophoretische und elektrochemische Materialabscheidung, gepulstes Lasern, Magnetronspütern, Ionenstrahlspütern sowie Sol-Gel-Prozessierung.

Die am meisten angewandte und gut untersuchte Methode ist das Plasmaspritzen (Knabe et al. 2004). Dieses Standardverfahren wird in Luft oder Vakuum durchgeführt.

Festes Calciumphosphatpulver wird in eine Plasmaflamme eingespritzt und mit ca. 10000 °C gegen die Metallfläche des Implantats geschleudert. Die extrem schnelle Abkühlung der mit hoher Geschwindigkeit auftreffenden Partikel auf das gleichmäßig rotierende Implantat führt zur Bildung einer gleichmäßigen und lagenweisen Beschichtung mit Mikro- und Makroporen, die fest mit der Metallfläche verzahnt ist.

Die hohen Temperaturen und das inkongruente Schmelzverhalten des Ausgangsmaterials führen zur Bildung einer Mischphase, die neben HA auch amorphe Phasen, β -Tricalciumphosphat, Tetracalciumphosphat und CaO enthält. Der Erhalt von einer reinen Hydroxylbeschichtung kann also nicht vollständig erreicht werden. (Dorozhkin und Epple 2002, Khor et al. 2003). Der Einfachheit halber wird aber in der Literatur die Nomenklatur beibehalten (Nöbel 2006).

Für schwierig erreichbare Oberflächen hat eine andere Beschichtungsmethode den Vorzug erhalten, die Kristallisation aus einer übersättigten Calciumphosphatlösung. Nach entsprechender Oberflächenbehandlung des Metalls und Eintauchen metallischer Implantate in übersättigte Calciumphosphatlösungen entsteht eine stabile Verbindung zwischen Calciumphosphat und Metall.

Die Eigenschaften von Hydroxylbeschichtungen sind von verschiedenen Faktoren abhängig. Dazu gehören Oberflächenbeschaffenheit, Mikrostruktur, chemische Zusammensetzung, Schichtdicke und Haftfestigkeit (Wintermantel und HA 1998).

Beschichtungen aus HA sind stets porös mit offener Porosität und interkonnektierenden Poren. Für das Einwachsen von Knochengewebe empfehlen Wintermantel und Ha 1998 eine minimale Porosität von 100-200 μm und eine Rauigkeit von $>75 \mu\text{m}$. Poren größer als 200 μm haben erwartungsgemäß effektiven Einfluss auf die Osteokonduktion (Liu 1997).

Die Haftzugfestigkeit zwischen HA-Beschichtung und metallischen Substrat hängt vor allem von der Schichtstärke ab. Je größer die Schichtstärke, desto geringer die Haftzugfestigkeit. Man setzt deshalb keine Beschichtungen ein, die dicker sind als 250 μm . Nach Wintermantel und HA sollten die Schichtdicken sogar zwischen 50 und 150 μm liegen und zur Verhinderung des Abplatzens eine Haftfestigkeit von $>35 \text{ MPa}$ besitzen.

Für eine gute Haftung muss zusätzlich die HA Schicht über eine hohe Reinheit verfügen. Der HA Gehalt für minimale Reinheit sollte größer als 95% betragen (Wintermantel und Ha 1998, Willmann 1999).

An HA Schichten finden keine Zugbelastung senkrecht der Schicht statt, sondern vielmehr Scher- und Torsionsbelastungen durch das knöcherne Implantatlager, das sich auf Grund seiner

geringen Steifigkeit bei Belastung des Implantates um das steife Implantat bewegt.

Insgesamt hängt die Haftzugs-, Scher- oder Torsionsfestigkeit einer HA-Schicht stark davon ab, wie stark das zu beschichtende Substrat aufgeraut ist. Je höher die Rauigkeit, desto besser die Festigkeit. Ein typischer Wert für die Rauigkeit des Substrates liegt bei etwa 40 µm und kann durch Sandstrahlung erreicht werden (Nöbel 2006, Willmann 1999).

1.3 Calciumphosphatbeschichtungen im biologischen Kontext

1.3.1 Löslichkeit und Resorption

Die Degradation von Calciumphosphatbeschichtungen in-vivo hängt zum einen von dem biologischen Milieu zum anderen von der chemischen Zusammensetzung und Porosität des Materials ab.

Der Abbau erfolgt neben der chemischen Löslichkeit der Keramik auch über eine zellvermittelte Resorption unter dem Einfluss von osteoklastischer Aktivität (Schenk 1986, Schilling 2004, Langstaff et al. 1999).

Grundsätzlich nehmen im biologischen Milieu die Temperatur, die Präsenz von Wasser und der pH-Wert wesentlich Einfluss auf die o.g. Abbauvorgänge (Hench 1991). Nach Beobachtungen von Tonino et al. (1999), die klinisch erfolgreiche Elemente beschichteter Hüftendoprothesen untersuchten, scheint ein zellvermittelter Abbau ausschlaggebend für die Degradation der HA Beschichtung zu sein.

Im Rahmen der Reaktion des Materials mit der biologischen Umgebung treten Ionenübertragungen zwischen beiden Medien auf, nicht nur von der festen Phase zur wässrigen, sondern auch umgekehrt. Dadurch resultiert aus diesem Prozess nicht nur allein eine chemische Lösung, sondern auch eine Phasenumwandlung der Beschichtung (Barrère et al. 2006).

Des Weiteren kann eine mikroporöse Oberfläche der Beschichtung die Löslichkeit erhöhen (Hench 1991). Je höher die Porosität und der damit verbundenen Oberflächenvergrößerung, desto schneller geht ein Material in Lösung (Barrère et al. 2006).

Es konnte beobachtet werden, dass der zellvermittelte Abbau der Calciumphosphatbeschichtungen der Resorption von Knochen durch Osteoklasten ähnelt (Schenk 1986, Barrère et al. 2006). Calciumphosphatkeramiken interagieren dabei nicht alle auf demselben Weg mit den Osteoklasten. Zusammen mit der Oberflächenstruktur und der Kristallinität beeinflusst die chemische Löslichkeit der Calciumphosphatkeramiken die Osteoklastenaktivität (Barrère et al. 2006).

Allen Calciumphosphaten gemeinsam ist, dass ihre Löslichkeit im sauren Bereich um Größenordnung höher ist. HA zeigt dabei die geringste Löslichkeit (Willmann 1999). Dagegen weisen im Vergleich dazu Tricalciumphosphate (TCP) eine höhere Löslichkeit und Resorbierbarkeit auf (Schenk 1986, Lind et al. 1999). Im sauren Milieu löst sich TCP 12,3mal und im Basischen 22,3mal schneller als HA (Jaffe und Scott 1996). Manche Autoren berichten sogar, dass Hydroxylapatitkeramiken im biologischen Milieu praktisch unlöslich sind (Schenk 1986).

Jedoch wurde beobachtet, dass bei Explantation von beschichteten Implantaten auch HA Schichten teilweise oder ganz aufgelöst sind. Hier ist meist eine Entzündung der Grund. Bei Entzündungen liegt lokal der pH-Wert im sauren Bereich, also im Bereich hoher Löslichkeit. Außerdem dürfen die prozessbedingt beim Plasmaspritzen von Hydroxylapatit entstandenen Anteile von amorphen Phasen wie TCP und CaO sowie die durch den Ionenaustausch im biologischen Milieu erwiesene Phasenumwandlung für die Veränderung des Löslichkeitscharakters mit verringerter Resorptionsresistenz der Beschichtung im Vergleich zum ursprünglichen Hydroxylapatit nicht vernachlässigt werden.

Inwieweit die Langzeitstabilität lasttragender Implantate durch ein vollständiges Verschwinden der Beschichtung gefährdet wird, ist noch nicht vollständig geklärt (Nöbel 2006). Bei entsprechender Oberflächengestaltung und Materialwahl kann eine feste Verbindung zwischen Knochen und Metallkomponente erreicht und eine Implantatlockerung durchaus vermieden werden (Søballe 1993, Tonino et al. 1999, Lintner et al. 2001).

1.3.2 Interaktion zwischen Calciumphosphaten und Osteoblasten

Als bioaktive Biomaterialien nehmen Calciumphosphate positiv Einfluss auf die osteogene Gewebedifferenzierung. Diese lässt sich in 3 wesentliche biologische Phasen unterteilen.

Man unterscheidet zwischen der Zellproliferation, Zellreifung und Mineralisationsphase (Barrère et al. 2006). In diesen Phasen produzieren und sezernieren Osteoblasten spezifisch Typ I Kollagen, alkalische Phosphatase und andere nicht-kollagene extrazelluläre Knochenmatrixproteine wie Osteocalcin, Osteopontin, Osteonectin und Sialoprotein.

Diese Proteine übernehmen im Knochenstoffwechsel verschiedene Aufgaben und treten im Verlauf der o.g. Phasen in unterschiedlich starker Konzentration auf. Kollagen Typ I wird als grundlegendstes Knochenmatrixprotein bezeichnet. Es trägt hauptsächlich über die Bindung an Hydroxylapatitkristallen im extrazellulären Raum zum Erhalt der biomechanischen Festigkeit des

Knochens bei. Ein früher Marker der osteoblastären Aktivität und osteogenen Differenzierung ist die alkalische Phosphatase, die für die Bereitstellung von freiem Calcium und Phosphat zum Aufbau von Hydroxylapatitkristallen verantwortlich ist.

Osteocalcin und Sialoprotein lassen sich später während der Mineralisationsphase nachweisen. Osteocalcin spielt für die Aufnahme und Bindung von Calcium eine wesentliche Rolle und stellt einen wichtigen Marker für die Knochenmineralisation dar.

Das Sialoprotein ist mitverantwortlich für die Ausfällung von HA Kristallen und ebenfalls wichtig für die Mineralisation des Knochens.

Osteonectin kommt als multifunktionales Protein in vielen Geweben vor. Im Knochen bindet es an Kollagen und reguliert die Osteoblastenproliferation (Barrère et al. 2006, Wang et al. 2004, Behrens et al. 2000).

Calciumphosphate treten mit Oberflächenrezeptoren der Membranen der Osteoblasten in Kontakt und lösen intrazellulär Reaktionen aus, die Veränderungen in Gen- und Proteinexpression verursachen und in der Konsequenz eine Alternation der zellulären Proliferation und Differenzierung bewirken (Wang et al. 2004).

Verschiedene Parameter der Calciumphosphate haben Einfluss auf die Veränderungen dieser zellulären Aktivität. Zum einen hängen Proliferation, Reifung und Differenzierung von der chemischen Reaktivität, das heißt Löslichkeits- und Präzipitationsverhalten der Calciumphosphate, ab (Barrère et al. 2006, Wang et al. 2004, Knabe et al. 2004).

De Bruijn et al. (1992, 1994) macht dafür die Konzentration von freien Calciumionen und anorganischen Phosphat verantwortlich. Eine Änderung dieser nimmt direkt Einfluss auf zelluläre Aktivität der Osteoblasten.

Ein weiterer mit der chemischen Reaktivität eng verbundener Faktor ist die Zusammensetzung bzw. das Ca/P- Verhältnis der Calciumphosphate. Eine Veränderung dieses Verhältnisses ändert direkt die chemische Reaktivität und damit auch den Einfluss auf die Osteoblasten. Der Einbau von Elementen wie Zink oder Silizium in Calciumphosphatkeramiken haben eine nachgewiesene Erhöhung der Anheftung am Material und Proliferation der Osteoblasten bewirkt (Ishikawa et al. 2002, Thian et al. 2005). Dagegen zeigt die Präsenz von Carbonationen in der Kristallstruktur des Apatits einen gegensätzlichen Effekt auf Proliferation und AP Produktion (Anselme et al. 1997, Redey et al. 2000).

Auf die Proliferation und Ausbreitung der Osteoblasten auf den Calciumphosphatkeramiken haben vor allem deren Oberflächengestaltung und Mikrostruktur besonderen Einfluss.

Osteoblasten sind in der Lage die Oberflächenporosität zu deuten und sich den entsprechenden Verhältnissen anzupassen. So können Osteoblasten, die auf porösen Oberflächen kultiviert werden, weitaus größere Distanzen überbrücken als solche, die auf planen Materialien wachsen (Barrère et al. 2006, Annaz et al. 2004).

Chou et al. (2005) konnte einen direkten Zusammenhang zwischen Kristallinität und Zelldifferenzierung nachweisen. Nach 3 Wochen Zellkultivierung auf Materialien unterschiedlicher Kristallinität haben Zellen auf großen Apatitkristallen eine stärkere Bildung von Sialoprotein und Osteocalcin aufgewiesen als auf Materialien mit kleineren Kristallen.

Insgesamt ist von einem engen Zusammenspiel zwischen Calciumphosphaten und deren Eigenschaften mit der zellulären Aktivität und Gewebedifferenzierung auszugehen. Dabei ist das Beeinflussen gegeneinander sehr komplex, so dass nicht immer von einer erfolgreichen Interaktion zwischen den Calciumphosphatkeramiken und dem biologischen Milieu ausgegangen werden kann.

Grundsätzlich kann die initiale Interaktion zwischen Osteoblasten und Biomaterial in 4 Stufen eingeteilt werden. Zu Beginn findet eine Adsorption der Zellproteine an der Oberfläche des Materials über fadenförmige Fortsätze statt (1). Daraufhin kommt es zum Kontakt der noch morphologisch runden Zellen (2) und Adhäsion dieser am Material (3). Schließlich breiten sich die nun polygonalen Zellen auf dem Biomaterial aus (4) (Rizzi et al. 2001).

Das Ausbreiten der Zellen vollzieht sich etwa nach den ersten 4 h, wobei dieser Zeitraum nicht fix ist, sondern von Zelltyp und Art des Biomaterials abhängt (Wintermantel und Ha 1998).

Daneben ist die Oberflächenbeschaffenheit der einzelnen Materialien ein weiterer einflussnehmender Faktor für die initiale Interaktion zwischen Zellen und Material. Es werden vor allem poröse Oberflächen mit Poren von 10 µm im Durchmesser und 50 µm in der Tiefe von den darauf wachsenden Zellen bevorzugt (Rizzi et al. 2001). Liu berichtet 1997, dass sogar Poren mit einem Durchmesser größer als 200 µm effektiven Einfluss auf die Osteokonduktion haben können (Liu 1997).

1.4 Zellkulturversuche

1.4.1 Der MTT – Test

Der MTT-Test ist eine bekannte Methode zur Bestimmung und Einschätzung der Zellaktivität sowie der Zellproliferation. Dabei wird die Dehydrogenaseaktivität vor allem der Mitochondrien, die voraussetzend für Stoffwechselaktivität und Lebensfähigkeit der Zellen sind, gemessen.

Die Aufgabe von Mitochondrien in der Zelle ist neben der Beteiligung an bestimmten Stoffwechselprozessen vor allem die Gewinnung und Bereitstellung von Energie in Form von ATP durch biologische Oxidation (Schiebler et al. 1999). Je größer der Energieverbrauch der Zelle bei höherer Stoffwechselaktivität, desto größer ist die Anzahl der Mitochondrien sowie deren enzymatische Stoffwechselleistung (Schiebler et al. 1999).

Das MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) ist ein gelbes wasserlösliches Tetrazoliumsalz und besteht aus einem Tetrazoliumring. Es dringt in Zellen ein und wird neben Mitochondrien auch von anderen Zellorganellen wie Peroxisomen aufgenommen. Ein kleiner Teil verbleibt im Cytosol. In den Mitochondrien, Peroxisomen und im Cytosol wird der Tetrazoliumring des MTT von Succinat-Dehydrogenasen aufgebrochen. Dadurch entsteht das blaue wasserunlösliche kristalline Formazan. Die Konzentration des gebildeten Formazans ist proportional zur zellulären Stoffwechselaktivität und der Anzahl vitaler Zellen (Bank et al. 1991). Die zelluläre Aktivität ist wiederum von verschiedenen Faktoren abhängig, wie z.B. metabolischer Aktivitätsstatus, Zelltyp und ob die Zelle sich teilt oder in welcher Phase des Zellteilungszyklus sie sich befindet (Wintermantel und Ha 1998).

Nach abgelaufener MTT Reaktion wird durch Lyse der Zellen mit Hilfe von Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma) das Formazan freigesetzt. Die Intensität der blauen Formazanlösung wird im Anschluss photometrisch mit einer Wellenlänge von 550-570 nm gemessen.

1.4.2 Die Konfokale Lasermikroskopie

Mit der konfokalen Lasermikroskopie lassen sich die Morphologie, die Art der Besiedlung und Verteilung sowie die bezüglich des mittels Fluoreszenzmarkierung sichtbar gemachten Aktin des Zytoskeletts der auf den Probematerialien kultivierten Osteoblasten analysieren (Baschong 2004). Die Methode ermöglicht das Sichtbarmachen und die Beurteilung von fokalen Kontakten zwischen den Zellen und den Probekörpern sowie zwischen den Zellen selber (Puleo und Bizios 1992). Dabei kann Aktin mit Hilfe eines mit einem Fluoreszenz Farbstoff markierten Phalloidin, ein aus dem Aminata phalloides Pilz gewonnen Gift mit hoher Affinität zu F-Aktin, gebunden,

gefärbt und letztlich mit einem Lasermikroskop von einer entsprechenden Wellenlänge angeregt und bildlich dargestellt werden (Invitrogen 2006, Baschong 2004).

Die Auswertung der mikroskopischen Bilder kann Aussagen über Interaktion und Integration zwischen Osteoblasten und Biomaterialien und die damit verbundene Biokompatibilität der einzelnen Testmaterialien liefern.

Aktin ist ein aus 375 Aminosäuren bestehendes globuläres Molekül (G-Aktin) und bildet durch Aneinanderlegen fibrilläre Polymere (F-Aktin), die als Mikrofilamente neben den Mikrotubuli und den intermediären Filamenten das Zytoskelett der Zellen aufbauen. Die Mikrofilamente dienen sowohl der Zellbewegung als auch der Stabilisierung von Zellstrukturen. Aktin, assoziiert mit dem Protein Myosin, findet man vor allem in Muskelzellen. Beide Proteine sorgen dort durch ihr Zusammenwirken für Zellkontraktionen. In Zellen wie Osteoblasten, die nicht vorrangig kontraktile reagieren, sind die Aktinfilamente nicht oder nur kaum mit Myosin verbunden und je nach Erfordernissen unterschiedlich angeordnet. Sie übernehmen hier vor allem versteifende und stabilisierende Aufgaben im Cytoplasma und sind mittels Befestigungen an der Zellmembran auch an der Ausbildung von Protrusionen und Membraneinziehungen der Zelloberfläche beteiligt und können durch schnelle Änderung der Anordnung auf die Formveränderung der Zelle einwirken (Schiebler et al. 1999, Bucher 1997).

Die Zellmembranen vieler Zellformen gehen mit benachbarten Zellen Kontakte ein. Zu solchen Zellverbindungen gehören die Zonula adhaerens, die der mechanischen Verknüpfung von Zellen dienen und aus den Proteinen Cadherin und Catenin aufgebaut sind. Andere Proteine wie Integrin sind am Aufbau bestimmter Bereiche der Zellmembran beteiligt, die als focal contacts die Zellen mit ihrem umgebendem Substrat oder in diesem Fall die Osteoblasten auf dem Biomaterialien verankern. In beide Strukturen strahlen Zytoskelettproteine insbesondere Aktin hinein und beteiligen sich an ihrem Aufbau (Anselme et al. 2004, Puleo und Bizios 1992).

Aktinfilamente können sich aber auch zu dicken parallel zur Zellachse verlaufenden Mikrofilamentbündel zusammensetzen. Diese Bündel werden als "stress fibers" bezeichnet und bestehen neben Aktin aus Myosin und alpha-Aktinin. Diese Strukturen wurden erstmals 1924 von Lewis und Lewis in verschiedenen nichtmuskulären Zellen beschrieben und treten vor allem in Zellen auf, die auf nicht natürlichen Substraten kultiviert werden (Byers et al. 1984).

1.4.3 ESEM (Environmental Scanning Electron Microscopy)

Mit Hilfe der Environmental Scanning Electron Mikroskopie (ESEM) lassen sich weitere Aussagen bezüglich der Morphologie, der Art der Besiedlung und Verteilung der Osteoblasten auf den Probematerialien machen. Es liefert außerdem detaillierte Informationen über die Oberflächenbeschaffenheit der einzelnen Materialien, die Einfluss auf die Interaktion zwischen Zellen und Material nimmt (Rizzi et al. 2001).

Die ESEM ist eine spezialisierte Form der Elektronenmikroskopie, die es erlaubt schwierige Proben im feuchten aber auch trockenen Zustand zu mikroskopieren. Dabei wird nicht wie bisher ein Hochvakuum aufgebaut, sondern die Proben befinden sich während des Mikroskopiervorganges in einem gasförmigen Milieu, so dass auch feuchte Proben gerade mit biologischem Ursprung in ihrem natürlichen Zustand ohne vorausgegangene aufwendige Präparation dargestellt werden können (Donald 2003). Untersuchungen von chemisch fixierten und nicht fixierten Proben zeigten, dass die Morphologie der Zellen in beiden Fällen keine Unterschiede aufweisen (MuscarIELlo et al. 2005).

Des Weiteren ist für die ESEM eine Benetzung der Proben mit z.B. Gold-Palladium nicht erforderlich, so dass charakteristische Merkmale des zu mikroskopierenden Materials für weitere Untersuchungen bewahrt werden und mit Abnahme der Präparationsschritte die Entstehung einzelner Artefakte reduziert werden können (MuscarIELlo et al. 2005).

2. Zielstellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll das In-vitro-Verhalten von vier resorbierbaren calciumphosphathaltigen Biokeramiken mittels der Zellkulturlinie MG63 und primären humanen Osteoblasten untersucht werden. Die Materialien, die sich in kristalliner Zusammensetzung und Resorbierbarkeit unterscheiden, werden hinsichtlich ihres Einflusses auf Zelladhärenz, Zellproliferation und Zellmorphologie getestet. Dies beinhaltet Bewuchsversuche mit anschließender Zellauszählung, ESEM- sowie Laserscanning-Untersuchungen. Zur Bestimmung der basalen Zelltoxizität wird außerdem der MTT-Test herangezogen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sollen grundsätzlich Aussagen über die getesteten Materialien hinsichtlich ihrer biologischen Eignung als Implantatmaterialbeschichtungen machen und dabei folgende Fragen beantworten:

1. Sind die verwendeten Materialien für die Beschichtung orthopädischer Implantate biokompatibel?
2. Welche der gewählten Materialien induziert eine gegenüber von β -TCP gesteigerte Zellproliferation?
3. Welchen Einfluss haben die Löslichkeit der Keramiken und die in Lösung gehenden Ionen auf das Bewuchsverhalten der Osteoblasten?
4. Welchen Einfluss nimmt die Oberflächengestaltung der Materialien auf die primäre Adhäsion und Besiedlungsarchitektur der Osteoblasten?
5. Sind die gewonnenen Ergebnisse mit in der Literatur veröffentlichten Daten zu schnell resorbierbaren calciumphosphathaltigen Keramiken vergleichbar?

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Zusammensetzung

Es wurden die drei schnell resorbierbaren Materialien **602020**, **305020**, **GB14** und als Referenzmaterial **β -TCP** hinsichtlich ihres Einflusses auf Zellproliferation und Zellmorphologie untersucht.

Die Synthese der Materialien 602020, GB14 und 305020 erfolgte durch die Arbeitsgruppe „Biowerkstoffe und Implantate“ der Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung (BAM). Das Material β -TCP wurde als das Produkt Cerasorb[®] von der Firma Curasan AG (Frankfurt Main) bezogen. Es gilt aufgrund seiner Phasenreinheit von $\geq 99\%$ als weltweite Referenz für β -Tricalciumphosphat und ist in die Kartei der ICDD (International Center of Diffraction Data, Pennsylvania, USA) aufgenommen wurden.

In der Zusammensetzung unterschieden sich die Materialien in ihren Phasenbestandteilen. Das einphasige GB14 enthält $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$, die zweiphasigen Materialien 602020 und 305020 dagegen alkalihaltige Calciumphosphate von der Struktur des Whitelockits.

Zur Bestimmung der Zellzytoxizität mittels MTT-Test wurden die Materialien in granulierter Form verwendet. Die Korngrößen sowie die Bestandteile der einzelnen Materialien sind in der Abb. 2 aufgeführt. Für die Bewuchsversuche dienten die Materialien als Tabletten mit ca. 14 mm im Durchmesser und einer Höhe von 2 mm.

Abb. 2: Zusammensetzung der Materialien

Material	Bestandteile in Massenprozent					kristalline Hauptphasen	Korngrößen in μm
	CaO	P ₂ O ₅	Na ₂ O	K ₂ O	MgO		
602020	38,0	46,2	5,7	8,6	1,5	Ca ₁₀ Na(PO ₄) ₇ Ca ₁₀ K(PO ₄) ₇	200-315
305020	45,2	46,88	2,86	4,45	0,75	Ca ₁₀ Na(PO ₄) ₇ Ca ₅ Na ₂ (PO ₄) ₄	315-400
GB14	30,7	43,1	9,4	14,3	2,5	Ca ₂ KNa(PO ₄) ₂	200-315
β-TCP	54,3	45,8	-	-	-	Ca ₃ (PO ₄) ₂	150-500

3.1.2 Herstellung

GB14, 602020 und 305020 (BAM) wurden mittels einer Festkörperreaktion hergestellt. Zunächst wurden die Komponenten CaCO_3 , MgO , Na_2CO_3 , K_2CO_3 bezogen auf das Gesamtgewicht des Werkstoffes eingewogen und in einem Taumelmischer gemischt. Danach wurde das Gemenge mit 85% H_3PO_4 versetzt, bei 100°C getrocknet und anschließend gemörsert. Die Produkte wurden nun in einem mehrstufigen Temperaturbehandlungsprogramm mit Haltepunkten im Bereich von 200 bis 1500°C in einem Platintiegel bei 1550°C zum Schmelzen gebracht. Die Schmelzen ließen sich gießen und kristallisierten spontan. Nach der Abkühlung wurde der Werkstoff granuliert.

Der Nachweis der Kristallphasen erfolgte röntgendiffraktometrisch. Röntgenbeugungs(XRD)-Spektren von den Ausgangspulvern ($\ll 50 \mu\text{m}$, in Vibrations-Mikromühle / Fa. FRITSCH) wurden mit einer Anlage Philips PW 1710 aufgenommen.

3.1.3 Löslichkeit

Die Löslichkeitsuntersuchungen wurden zur Eluatgewinnung nach dem MTT-Test nach DIN ISO EN 10993-5 durchgeführt. Nach ISO erfolgte die Eluation von 0,4 g Substanz in 1ml Wasser über einen Zeitraum von 10 Tagen. Das Material wurde in granulierter Form verwendet.

Die Werte für die Löslichkeit sind in Abb.3 aufgeführt.

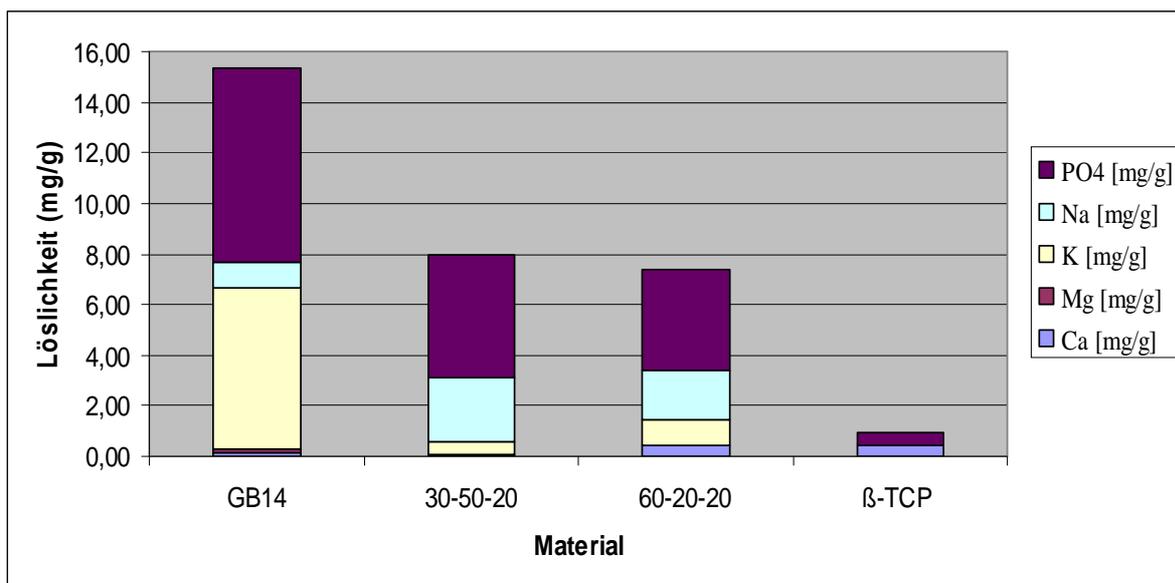


Abb. 3: Löslichkeit der Materialien

3.2 Zellkulturversuche

3.2.1 Anlegen einer Primärkultur aus humanen Knochenmaterial

Für die Primärkultur der humanen Osteoblasten wurde subkortikale Spongiosa von anfallenden Tibiaplateaus bei Einbau von Kniegelenksendoprothesen (MLU Halle, Genehmigung der Zentralen Ethikkommission; 17.11.2006) gewonnen. Das Knochenmaterial wurde bis zur Weiterverarbeitung, die sich direkt nach Knochenentnahme anschließen musste, in steriler physiologischer Kochsalzlösung gelagert.

Die Verarbeitung des Knochenmaterials fand unter einer Laminarbox bei sterilen Bedingungen statt. Folgende Schritte umfassten das Anlegen einer Primärkultur von humanen Osteoblasten:

1. Knochenmaterial in die erste mit 10 ml PBS (Biochrom AG) gefüllte PS überführen und den trabekulären Knochen mit dem Skalpell von anhängendem Bindegewebe lösen
2. Knochenfragmente mit der Pinzette in die zweite mit 10 ml PBS (Biochrom AG) gefüllte PS überführen und mit dem Skalpell bis auf etwa 1 mm³ große Stücke zerkleinern
3. vier weitere Waschschrte mit jeweils 10 ml PBS (Biochrom AG) und abschließend einmal mit 10 ml Osteoblastenmedium (Promocell) zum Abwaschen des Fettes und des Blutes durchführen, dabei mit der Pinzette die Knochenstücke im Puffer leicht bewegen
4. das zerkleinerte Knochenmaterial in die vorher beschrifteten 75 cm³ KF überführen, die Böden der KF sollten gleichmäßig nicht zu dicht aber auch nicht zu sparsam von den Knochenstücken bedeckt sein
5. die KF vorsichtig mit jeweils 10 ml 37°C warmen Osteoblastenmedium (Promocell) füllen
6. KF für die nächsten Wochen im Brutschrank (MCO-18 AIC CVV, Sanyo) bei 37°C und 5% CO₂ lagern
7. nach 7 bis 10 Tagen die KF vor dem jetzt nötigen Mediumwechsel unter dem Mikroskop auf Wachstum und Kontaminationen untersuchen
8. danach das Osteoblastenmedium (Promocell) vorsichtig absaugen und mit jeweils 10 ml neuen Medium ersetzen, dabei dürfen sich so wenig Knochenstückchen wie möglich vom Boden der KF lösen
9. nach diesem ersten Mediumwechsel wird nun zweimal wöchentlich das Medium ausgetauscht und Zellwachstum unter dem Mikroskop kontrolliert

Wenn nach ca. 3 bis 4 Wochen ein konfluentes Zellwachstum erreicht war, folgten das Trypsinieren und die Weiterverwendung der Osteoblasten für die anschließenden

Untersuchungen. Das Trypsinieren der Zellen umfasste folgende Arbeitsschritte:

1. Herstellung von Kulturmedium mit 10% FCS, 1% Antibiotikum und 1% Antimykotikum (normales Medium)
 - DMEM F12 (Gibco Laboratories) und 1,125 g NaHCO_3 (Biochrom AG) in 1 l bidest. H_2O lösen
 - pH Wert mit 2% HCl oder 2% NaOH auf 7,2 einstellen
 - Lösung steril filtrieren
 - 100 ml steriles FCS (Biochrom AG) und jeweils 10 ml Penicillin/Streptomycin (100x, PAA Laboratories GmbH) und Amphotericin B (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Biochrom AG) zugeben
2. Osteolastenmedium und Knochenstücken abgießen und so lange mit jeweils 10 ml 37°C warmen PBS (Biochrom AG) spülen bis sämtliches Knochenmaterial aus den KF entfernt ist
3. je 10 ml 37°C warmes EDTA/Trypsin (Biochrom AG) für Zellablösung in die KF geben und für 6 min in den Brutschrank (MCO-18 AIC CVV, Sanyo) bei 37°C und 5% CO_2 stellen
4. unter Mikroskop Zellablösung beobachten
5. mit jeweils 10 ml 37°C warmen normalen Medium Reaktion stoppen und die Lösung in ein Zentrifugalröhrchen überführen und mit 1200 rpm 10 min zentrifugieren
6. danach Überstand abgießen und Zellpellet mit 5 ml 37°C warmen normalen Medium resuspendieren
7. Zellzahl der Lösung in einer Newtonschen Zählkammer bestimmen und benötigte Zellsuspension mit normalem Medium für anschließende Untersuchungen herstellen

3.2.2 Nachweis der Kultivierung humaner Osteoblasten

Bei jeder Primärkultur wurde der Nachweis der Expression der alkalischen Phosphatase, als Beleg für die Kultivierung von Osteoblasten, durchgeführt. Dazu waren folgende Arbeitsschritte notwendig:

1. auf Thermanox[®]-Membranen jeweils 1 ml einer Zellsuspension (1×10^5 Zellen/ml) mit primären humanen Osteoblasten geben
2. Membranen im Brutschrank (MCO-18 AIC CVV, Sanyo) bei 37°C und 5% CO_2 aufbewahren bis konfluentes Zellwachstum erreicht ist

3. Herstellung einer Pufferlösung und Inkubationsmedium:
 - Pufferlösung: - 2,4 g 0,2 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Servu) in 100 ml Aqua dest. lösen, pH Wert auf 8,9 einstellen
 - Inkubationsmedium: - 5 mg Naphthol AS:MX-Phosphat (Sigma) in 0,25 ml N,N-Dimethylformid (Merck) lösen
 - Zugabe von 25 ml Aqua dest., 25 ml Pufferlösung, 2 Tropfen Mg SO₄ x 7 H₂O 10% (Merck), 30 mg Fast Blue BB (Sigma)
 - vor Gebrauch filtrieren
4. Membranen vom Medium befreien
5. Fixierung der Zellen mit PBS (Biochrom AG) (1,5 min), Aceton/PBS (1,5 min) und Aceton (Merck) (1,5 min)
6. Färbung der Zellen:
 - Membranen für 1-3 h mit Inkubationsmedium bei Raumtemperatur inkubieren
 - Spülen mit Aqua dest.
 - 5-10 min mit 0,1 % Kernechtrot (Merck) färben
 - Spülen mit Aqua dest.
 - Eindecken (DAKO-Eindeckmedium)
7. positives Färbergebnis: Zellkerne rot, Enzymaktivitätsstellen blau

3.2.3 MTT Test

MG 63 Tumorzelllinie

Für den MTT Test wurden Zellen der Osteosarkomzelllinie MG 63 der American Type Culture Collection (ATCC) verwendet, die vorher mit normalem Medium bis zu mindestens 4 Passagen kultiviert wurden. Obwohl diese Tumorzellen keine normalen osteoblastischen Verhältnisse widerspiegeln, ähneln sie humanen Osteoblasten am meisten und lassen eine höhere Reproduzierbarkeit von Messdaten zu (Carinci et al. 2004).

Die Kultivierung der Tumorzellen begann schon einige Wochen vor dem eigentlichen MTT-Test und beinhaltete folgende Schritte, die unter einer Laminarbox bei sterilen Bedingungen durchgeführt wurden:

1. Herstellung des Kulturmediums mit 10% Fötalkälberserum (FCS), 1% Antibiotikum und 1% Antimykotikum (normales Medium)
 - DMEM F12 (Dulbecco's modified Eagle's Medium, Gibco Laboratories) und 1,125 g NaHCO_3 (BiochromAg) in 1 l bidest. H_2O lösen
 - pH Wert mit 2% HCl oder 2% NaOH auf 7,2 einstellen
 - Lösung steril filtrieren
 - 100 ml steriles FCS (Biochrom AG) und jeweils 10 ml Penicillin/Streptomycin (100x, PAA Laboratories GmbH) und Amphotericin B (250 $\mu\text{g/ml}$, Biochrom AG) zugeben
2. die bei -20°C tief gefrorenen Zellen mit warmen Kulturmedium schnell auftauen und 5×10^5 Zellen in eine 75 cm^3 KF aussäen
3. KF mit jeweils 40 ml 37°C warmen Kulturmedium füllen und alle 2 Tage wechseln
4. die KF in einen Brutschrank (MCO-18 AIC CVV, Sanyo) mit 37°C und 5% CO_2 für die kommenden Wochen lagern und Zellwachstum sowie auf Kontamination regelmäßig unter dem Mikroskop kontrollieren

Wenn ein konfluentes Zellwachstum erreicht war, mussten die Zellen vom Boden der KF abtrypsiniert und gesplittet werden. Folgende Arbeitsschritte waren dafür notwendig:

1. Herstellung von HBSS (Hanks Balanced Salt Solution)
 - 50 ml konzentriertes HBSS (Hanks Balanced Salt Solution, Gibco Laboratories) mit 450 ml bidest. H_2O verdünnen
 - 1 g NaHCO_3 (Biochrom Ag) hinzufügen
 - pH Wert mit 2% HCl oder 2% NaOH auf 7,2 einstellen
 - Lösung steril filtrieren
2. Medium aus den Kulturflaschen entfernen und die Zellen dreimal mit 10 ml 37°C warmen HBSS (Gibco Laboratories) spülen
3. je 10 ml 37°C warmes EDTA/Trypsin (0,05% Gibco Laboratories) für Zellablösung in die KF geben und für 6 min in den Brutschrank (MCO-18 AIC CVV, Sanyo) bei 37°C und 5% CO_2 stellen
4. unter Mikroskop Zellablösung beobachten
5. Reaktion mit je 10 ml 37°C warmen normalen Medium stoppen und die Lösung in ein Zentrifugalröhrchen überführen und mit 1200 rpm 10 min zentrifugieren

6. danach Überstand abgießen und Zellpellet mit 5 ml 37°C warmen normalen Medium resuspendieren
7. Zellzahl der Lösung in einer Newtonschen Zählkammer bestimmen und 1×10^5 Zellen für die Subkultivierung in jeweils eine 75 cm³ KF aussäen

Die Kultivierung mit den dazu gehörigen Splittungen der konfluenten Zellen wurde mindestens viermal wiederholt. Erst dann hatten die durch das Tieffrieren auf -20°C beeinflussten Tumorzellen ihre physiologischen Eigenschaften und Zellaktivitäten wieder erreicht und konnten für den MTT-Test verwendet werden.

Extraktionsmedien

Um den Einfluss der Testmaterialien auf die Zellaktivität und Proliferation messen zu können, wurden die Zellen mit Extraktionsmedien in verschiedenen Verdünnungen kultiviert.

Dafür mussten mindestens 10 Tage vorher Extrakte aus den Testmaterialien hergestellt werden.

Die Herstellung dieser sowie deren Verdünnungsreihen erfolgte nach DIN EN ISO

109993-5 und bestand aus folgenden Arbeitsschritten:

1. pro MTT-Test jeweils 0,4 g Pulver der Probematerialien in 1 ml destilliertem Wasser geben und zur Unterstützung der Lösung für 10 Tage bei 37°C und 5% CO₂ unter täglichem Schütteln der Probengefäße in den Brutschrank (MCO-18 AIC CVV, Sanyo) stellen
2. nach abgelaufener Zeit Proben 4 Minuten bei 5000 rpm zentrifugieren und Überstand vorsichtig abpipettieren
3. pH-Wert der gewonnenen Extrakte auf 7,2 einstellen und steril filtrieren
4. Herstellung von doppelt konzentrierten Medium ohne FCS und Antibiotikum
5. zur Herstellung einer Ausgangslösung 1:1 jedes Extrakt mit dem gleichen Volumen doppelt konzentrierten Medium verdünnen
6. für die Versuchsreihen zusätzlich 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16 Verdünnungen mit normalen Medium herstellen

Ablauf MTT Test

Der MTT Test wurde für jedes Testmaterial nach 24, 48 und 72 Stunden Zellkultivierung durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde normales Medium und als Negativkontrolle zelltoxisches Phenol verwendet.

Folgende Arbeitsschritte unter der Laminarbox waren für eine erfolgreiche Durchführung des MTT Tests notwendig:

1. Herstellung von Leermedium
 - DMEM F12 (Gibco Laboratories) und 1,125 g NaHCO_3 (Biochrom AG) in 1 l bidest. H_2O lösen
 - pH Wert auf 7,2 einstellen
 - Lösung steril filtrieren
2. Bereitstellen von normalem Medium
3. nach der letzten Splittung der Tumorzellen eine Zellsuspension mit $2,5 \times 10^4$ Zellen/ml mit normalem 37°C warmen Medium herstellen.
4. in jedes zu messende Well 200 μl Zellsuspension geben, pro Well-Platte jeweils 10 Wells für jede Verdünnung, für die Positivkontrolle sowie für die Negativkontrolle füllen, Platten beschriften (Material, Untersuchungszeitpunkt)
5. Well Platten für 24 h bei 37°C und 5% CO_2 in den Brutschrank (MCO-18 AIC CVV, Sanyo) stellen
6. am nächsten Tag Medium absaugen und alle Wells mit 200 μl Leermedium füllen, nach Protokoll zusätzlich 10 Wells jeweils mit 20 μl einer Verdünnung eines Extraktionsmediums inkubieren, für die Positivkontrolle verbleiben 10 Wells ohne Extraktionsmedium und für die Negativkontrolle werden 10 Wells jeweils mit 20 μl Phenol inkubiert
7. zur weiteren Zellkultivierung Wellplatten zurück in den Brutschrank (MCO-18 AIC CVV, Sanyo) stellen
8. in den nächsten 3 Tagen Well-Platten täglich vom verbrauchtem Medium befreien und wie beschrieben mit dem Leermedium, mit den verschiedenen Verdünnungen der Extraktionsmedien und mit dem Phenol erneuern
9. PBS (Biochrom AG) herstellen
10. nach 24 h, 48 h und 72 h die jeweiligen für den Untersuchungszeitpunkt bestimmten Well Platten nicht vom Medium trennen, sondern pro Well mit 20 μl MTT Lösung inkubieren, vorher MTT Lösung mit einer Konzentration von 5 mg MTT (Sigma) pro 1 ml PBS (Biochrom AG) herstellen
11. 4 Stunden Inkubation im Brutschrank (MCO-18 AIC CVV, Sanyo) bei 37°C und 5% CO_2

12. Medium absaugen und für die Lyse der Zellen in jedes Well 100 µl DMSO (Sigma) pipettieren
13. mittels Elisa-Reader (Fluostar Optima, BMG Labtechnologies GmbH) die Extinktion der blauen Formazanlösung mit einer Wellenlänge von 570 nm messen.

3.2.4 Bewuchsversuche und Bestimmung der Zellzahl nach 3, 7, 11, 15 und 19 Tagen

Zur Untersuchung des Einflusses der Materialien auf die Zellproliferation wurden Bewuchsversuche mit anschließender Zellzahlbestimmung durchgeführt. Dies beinhaltete die Kultivierung von humanen Osteoblasten auf Probekörpern der Materialien für insgesamt 19 Tage mit regelmäßigem Wechsel des Nährmediums. Als Positivkontrolle wurden Thermanox[®] - Membranen verwendet. Am 3., 7., 11., 15. und 19. Tag nach Kultivierungsbeginn wurden die Zellen vom Nährmedium getrennt, mit Giemsa-Lösung (Romeis 1989) gefärbt und abschließend zur Auszählung der auf den Materialien gewachsenen Zellen unter dem Olympus-Auflichtmikroskop (Typ BX51) photographisch festgehalten.

Für die Ermittlung der Zellzahl kamen ein Objektiv mit 5-facher Vergrößerung und ein Okular mit 10-facher Vergrößerung zur Anwendung. Das Gesichtsfeld des Okulars war durch ein Gittermuster in 10x10 quadratische Felder aufgeteilt. Jeweils 5 verschiedene ROI's (region of interests) wurden ausgezählt und die Zellzahl auf 1 cm² normiert.

Folgende Arbeitsschritte waren bis zur Auszählung der auf den Probematerialien kultivierten Osteoblasten notwendig:

1. Anlegen einer Primärkultur aus humanen Knochenmaterial 3-4 Wochen zuvor
2. pro Material 5 Probekörper bei 200°C für 4 h im Trockenschrank sterilisieren, danach für die 5 Untersuchungszeitpunkte jeweils eine 24 Well Platte mit einem Probekörper je Material und eine Thermanox[®]-Membran als Positivkontrolle füllen, jeweils mit 1 ml vorher frisch hergestellten normalem Medium bedecken und für 24 h in den Brutschrank (MCO-18 AIC CVV, Sanyo) bei 37°C und 5% CO₂ stellen
3. am nächsten Tag Medium absaugen und alle Materialien mit jeweils 1 ml einer aus der angelegten Osteoblastenkultur hergestellten Zellsuspension mit $2,5 \times 10^4$ Zellen/ml inkubieren und im Brutschrank (MCO-18 AIC CVV, Sanyo) bei 37°C und 5% CO₂ aufbewahren
4. jeden 2. Tag Mediumwechsel mit normalem Medium

5. Am jeweiligen Untersuchungszeitpunkt müssen für die Färbung der Materialien folgende Arbeitsschritte durchgeführt werden:

- Herstellung einer Giemsa-Lösung 1:10
- Bereitstellen von Methanol
- Kulturmedium von den Materialien vorsichtig absaugen
- Materialien zweimal mit PBS (Biochrom AG) spülen
- Zur Fixierung der Zellen Materialien für 10 min mit Methanol inkubieren
- Materialien zweimal mit PBS (Biochrom AG) spülen
- für 10 min Zellen mit angefertigter Giemsa-Lösung färben
- ausgiebig mit Aqua dest. spülen

Nach erfolgreicher Färbung der Zellen auf den Materialien wurden diese unter dem Auflichtmikroskop photographisch dokumentiert und ausgezählt.

Die Auswertung und statistische Verarbeitung der gewonnenen Daten erfolgte über das Statistik Programm SPSS Version 12.0 für Windows (SPSS Inc. Chicago, USA).

3.2.5. Konfokale Lasermikroskopie

Die lasermikroskopischen Untersuchungen wurden 24 und 96 Stunden nach Kultivierungsbeginn der Osteoblasten auf den Probematerialien durchgeführt. Voruntersuchungen ergaben, dass lange Kultivierungszeiten und die damit verbundene erhöhte Zelldichte auf den Materialien die Auswertung der Aktinfilamente einzelner Zellen erschwerten oder gar unmöglich machten. Aus diesem Grund wurde auf Untersuchungen zu späteren Zeitpunkten verzichtet.

Als Positivkontrolle wurden Thermanox[®]-Membranen und als Negativkontrolle Probekörper aus zelltoxischem PVC verwendet.

Für die Aufarbeitung und Färbung der Proben diente die Vorschrift sowie der Farbstoff Alexa Flour 488 Phalloidin von der Firma Invitrogen. Die behandelten Proben wurden in einem Leica confocal laser scanning microscope Leica DM IRE2 mit einer Wellenlänge von 495 nm angeregt und inspiziert.

Folgende Arbeitsschritte waren bis zur Darstellung von auf den Probematerialien kultivierten Osteoblasten mittels konfokaler Lasermikroskopie notwendig:

1. Anlegen einer Primärkultur aus humanen Knochenmaterial 3-4 Wochen zuvor
2. pro Material 2 Probekörper bei 200°C für 4 h im Trockenschrank sterilisieren, danach für die zwei Untersuchungszeitpunkte jeweils eine 24 Well Platte mit einem

Probekörper je Material, mit einer Thermanox[®]-Membran sowie einem Probekörper PVC füllen und mit 1ml vorher frisch hergestellten normalem Medium bedecken und für 24 h in den Brutschrank (MCO-18 AIC CVV, Sanyo) bei 37°C und 5% CO₂ stellen

3. am nächsten Tag Medium absaugen und auf alle Materialien jeweils 1 ml einer aus der angelegten Osteoblastenkultur hergestellten Zellsuspension mit 5×10^4 Zellen/ml geben und für die nächsten Tage im Brutschrank (MCO-18 AIC CVV, Sanyo) bei 37°C und 5% CO₂ lagern
4. Medium jeden 2.Tag wechseln

Am jeweiligen Untersuchungszeitpunkt mussten für die Färbung der Materialien folgende Vorbereitungen getroffen werden:

1. Herstellung einer 3,7% Formaldehydlösung und einer 0,1% Triton X-100 (Roth) Lösung jeweils mit PBS (Biochrom AG)
2. für die Färbung der Materialien müssen je Probekörper 5 µl Alexa Fluor Phalloidin mit 200 µl PBS (Biochrom AG) verdünnt werden

Voruntersuchungen haben gezeigt, dass das für die Reduzierung von störenden Hintergrundfärbungen im Protokoll empfohlene Bovine Serumalbumin (BSA) keine signifikante Verbesserung der Bildqualität erbracht hat. Aus diesem Grund wurde auf das aufwendige Verwenden von BSA in den folgenden Fixierungs- und Färbeschritten verzichtet:

1. Probekörper vom Medium befreien und jeweils mit 1 ml 37°C warmen PBS (Biochrom AG) zweimal waschen
2. Zellen mit 1 ml 3,7% Formaldehydlösung je Probekörper für 10 min bei Raumtemperatur fixieren
3. 2-3mal mit PBS (Biochrom AG) waschen
4. für 3-5 Minuten die Materialien mit jeweils 1 ml 0,1% Triton X-100 (Roth) Lösung inkubieren
5. 2-3mal mit PBS (Biochrom AG) waschen
6. die Probekörper für 20 min bei Raumtemperatur mit dem vorher verdünnten Alexa Flour 488 Phalloidin (Invitrogen) färben, zur Vermeidung von Evaporation Materialien vor Licht schützen
7. 2-3 mal mit PBS (Biochrom AG) waschen
8. Proben mikroskopieren und Bilder mittels PC dokumentieren

3.2.6. ESEM (Environmental Scanning Electron Microscopy)

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden 4 Tage nach Kultivierungsbeginn der Osteoblasten auf den Probematerialien durchgeführt. Für die Aufarbeitung und Fixierung der Proben dienten die Vorschriften von Rizzi et al. (2001) und Wiedmann et al. (2005).

Die Darstellung der behandelten Proben erfolgte durch das Elektronenmikroskop XL 30 ESEM-FEG. Dabei wurde das Gerät im low-vaccum-Bereich des ESEM-Modus betrieben. Der Druck in der Kammer wurde zur Optimierung der Abbildungsbedingungen (Verhinderung von Aufladungen bei gleichzeitig hoher Auflösung) im Bereich von 0,1 bis 2,5 Torr variiert (Wasserdampf-Atmosphäre).

Folgende Arbeitsschritte waren bis zur Darstellung von auf den Probematerialien kultivierten Osteoblasten mittels ESEM notwendig:

1. Anlegen einer Primärkultur aus humanen Knochenmaterial 3-4 Wochen zuvor
2. pro Material 1 Probekörper bei 200°C für 4 h im Trockenschrank sterilisieren, danach eine 24 Well Platte mit den Probekörpern und einer Thermanox[®]-Membran füllen und mit je 1ml normalem Medium bedecken und für 24 h in den Brutschrank (MCO-18 AIC CVV, Sanyo) bei 37°C und 5% CO₂ stellen
3. am nächsten Tag Medium absaugen und auf alle Materialien jeweils 1 ml einer aus der angelegten Osteoblastenkultur hergestellten Zellsuspension mit 5×10^4 Zellen/ml geben und für die nächsten Tage im Brutschrank (MCO-18 AIC CVV, Sanyo) bei 37°C und 5% CO₂ lagern
4. Medium jeden 2.Tag wechseln

Nach Ende der Kultivierung mussten für die Aufarbeitung und Fixierung der Osteoblasten folgende Arbeitsschritte durchgeführt werden:

1. Proben auf 4°C für 30 min abkühlen
2. in dieser Zeit Fixationspuffer herstellen: 1,5 % Glutaraldehyd (Sigma) in 0,1M Cacodylat (Sigma), d.h. z.B. 2,14 g Na-Cacodylat in 50 ml Aqua bidest lösen, pH Wert auf 7,4 einstellen, Lösung auf 100 ml auffüllen, 1,5 g Glutaraldehyd in 98,5 g Puffer lösen
3. Proben vom Medium befreien und für 12 h mit Fixationspuffer je 1 ml pro Probe bei 4°C aufbewahren
4. nach 12 h Fixationspuffer entfernen und mit PBS (Biochrom AG) spülen

5. für eine spätere ESEM Untersuchung Probematerialien mit jeweils 0,7 ml Einfriermedium (42,8 g Saccharose (Merck), 0,33 g $MgCl_2$ (Merck) in 250 ml PBS (Biochrom AG) lösen und 250 ml Glycerol (Merck) zugeben) sammeln und wegfrieren
6. 12 h vor ESEM Untersuchung Einfriermedium entfernen, 2 mal mit PBS (Biochrom AG) Proben gründlich spülen
7. Proben für 1 h bei Raumtemperatur und zur Kontrastverstärkung mit 1 ml 1% OsO_4 (Roth)-Lösung behandeln (Abzug)
8. danach 3 mal mit 1 ml Aqua bidest. jede Probe spülen
9. Proben mit 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100% Alkohol je 3 min entwässern
10. Trocknung mit Kieselgel für 12 h
11. Proben Mikroskopieren und Bilder mittels PC dokumentieren

3.2.7 Statistik

Die graphische Darstellung und statistische Auswertung der gewonnenen Daten des MTT-Tests und der Bewuchsversuche mit Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit dem Statistik Programm SPSS Version 12.0 für Windows (SPSS Inc. Chicago, USA).

Hierzu wurden die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt und mit dem t-Test verglichen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant bezeichnet (von Janssen und Laatz 2005).

4. Ergebnisse

4.1 MTT-Test

In jedem MTT Test wurden 10 Extinktionen für jeweils eine Verdünnung eines Extraktionsmediums gemessen. Die Auswertung erfolgte über eine Mittelwertbildung der gemessenen Daten.

Alle gemessenen Extinktionen der Verdünnungsreihen der jeweiligen Testmaterialien erreichen zu jedem Untersuchungszeitpunkt höhere Werte als die der Negativkontrolle mit dem zelltoxischen Phenol. Nach 24 h befinden sich die Extinktionen aller Verdünnungen jedes Materials im Bereich der Positivkontrolle. Erst nach 48 und 72 Stunden sind Unterschiede im Verlauf der Extinktionen der einzelnen Materialien und deren Verdünnungen zu beobachten. Jedoch erreichen abgesehen von den Negativkontrollen alle gemessenen Extinktionen nach 72 h ihren Maximalwert. Dabei lässt sich eine Verdünnungsabhängigkeit aller Materialien, vor allem bei 602020 und 305020, feststellen. Je stärker die Konzentration des gelösten Materials, desto höher ist die Extinktion.

Für 602020 nehmen insgesamt die Extinktionen aller Verdünnungen mit der Dauer der Kultivierung zu (Abb.4). Nach 48 Stunden Zellkultivierung wird bei diesen Material eine Verdünnungsabhängigkeit sichtbar. Deutlich steigen nach 72 Stunden Zellkultivierung die Extinktionen der 1:1 und 1:2 Verdünnungen an, während die der anderen Verdünnungen mit fallender Konzentration geringere Maximalwerte erreichen. Die Formazankonzentration der 1:1 Ausgangslösung ist zu diesem Zeitpunkt am größten.

Die gemessenen Extinktionen der Verdünnungsreihen des Materials 305020 verhalten sich ähnlich wie die von 602020. Nach 48 h kommt es aber hier zu einer geringen Abnahme der Extinktionen bei allen Extrakten. Nach 72 Stunden Zellkultivierung steigen die Extinktionen verdünnungsabhängig wieder an. Die Formazankonzentrationen der 1:2 und 1:1 Verdünnungen erreichen dabei die höchsten Werte (Abb. 5).

Bei dem Material GB14 ist ebenfalls eine deutliche Verdünnungsabhängigkeit der Extinktionen zu erkennen. Je stärker die Konzentration des gelösten Materials, desto höher ist die Extinktion. Dies wird aber erst nach 72 Stunden Zellkultivierung deutlich.

Alle bis dahin gemessenen Extinktionen liegen nach 24 h und 48 h unwesentlich verändert eng beieinander (Abb. 6).

Der MTT-Test für das Referenzmaterial β -TCP ergibt ähnliche Ergebnisse. Vor allem die Extinktion der 1:1 Konzentration verändert sich im Vergleich zu denen der restlichen

Verdünnungen, die im Verlauf des MTT Tests kaum an Größe zunehmen und dicht beieinander liegen, am stärksten. Nach 48 Stunden Zellkultivierung ist die Extinktion der 1:1 Ausgangslösung am kleinsten, um nach 72 Stunden deutlich den größten Wert der Verdünnungsreihe zu erreichen. Dabei zeigen die Zellen nach Zugabe des unverdünnten Extraktes und des Extraktes in der Verdünnung 1:2 im Vergleich zu den anderen Materialien eine geringere Steigerung in Zellzahl bzw. Zellaktivität (Abb. 7).

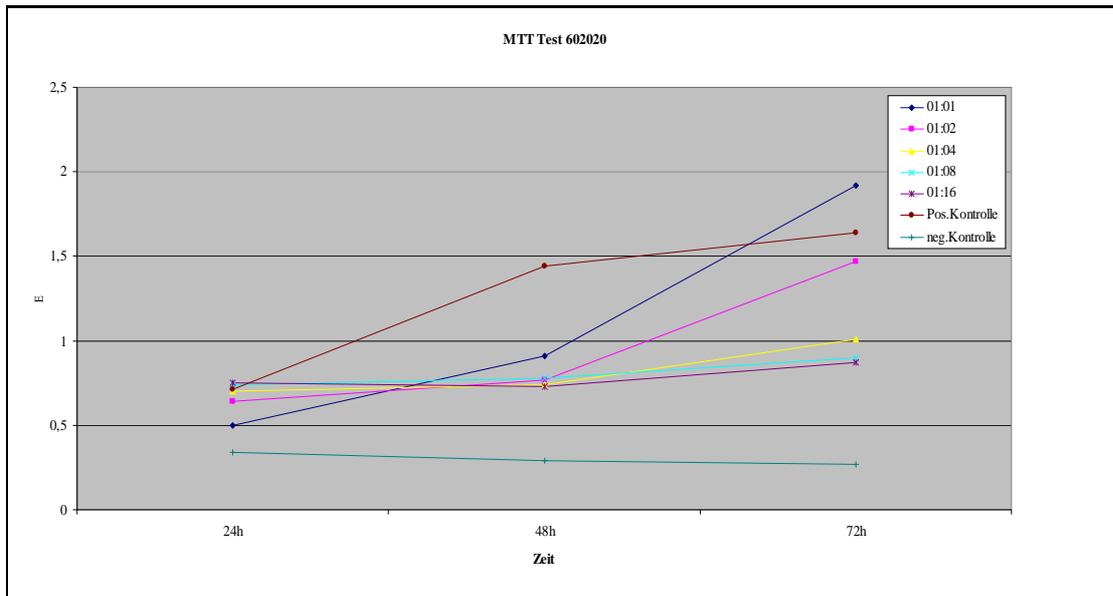


Abb. 4: MTT Test für **602020** nach 24 h, 48 h und 72 h

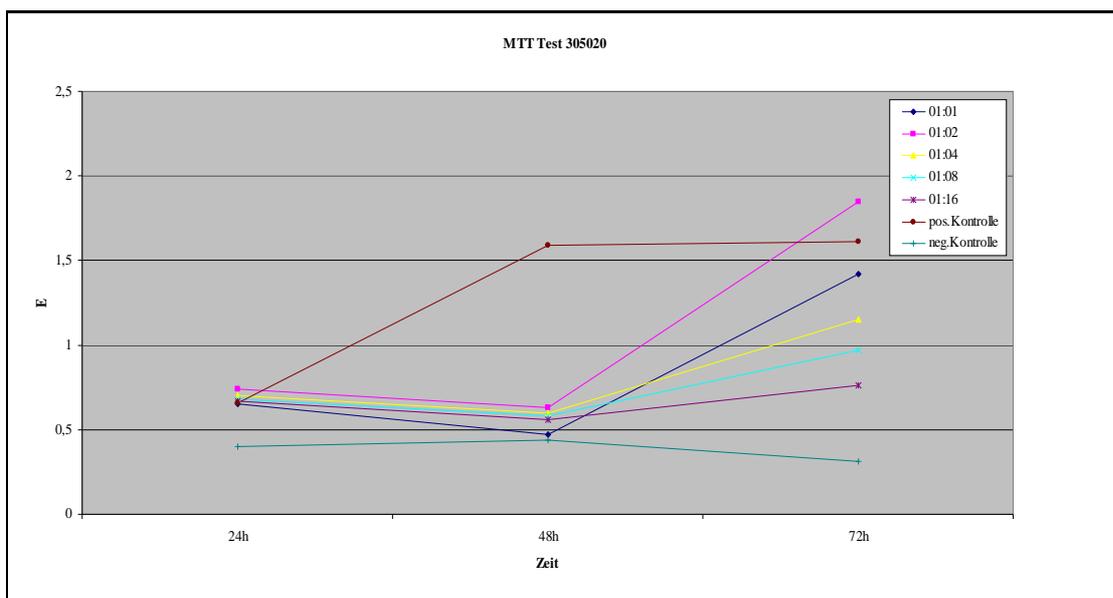


Abb. 5: MTT Test für **305020** nach 24 h, 48 h und 72 h

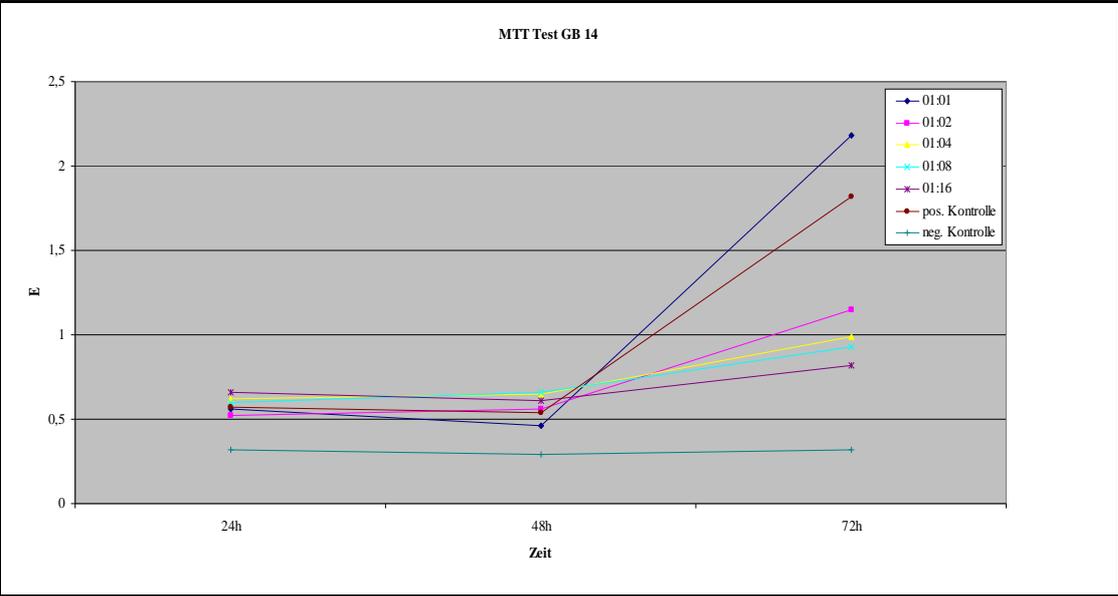


Abb. 6: MTT Test für **GB14** nach 24 h, 48 h und 72 h

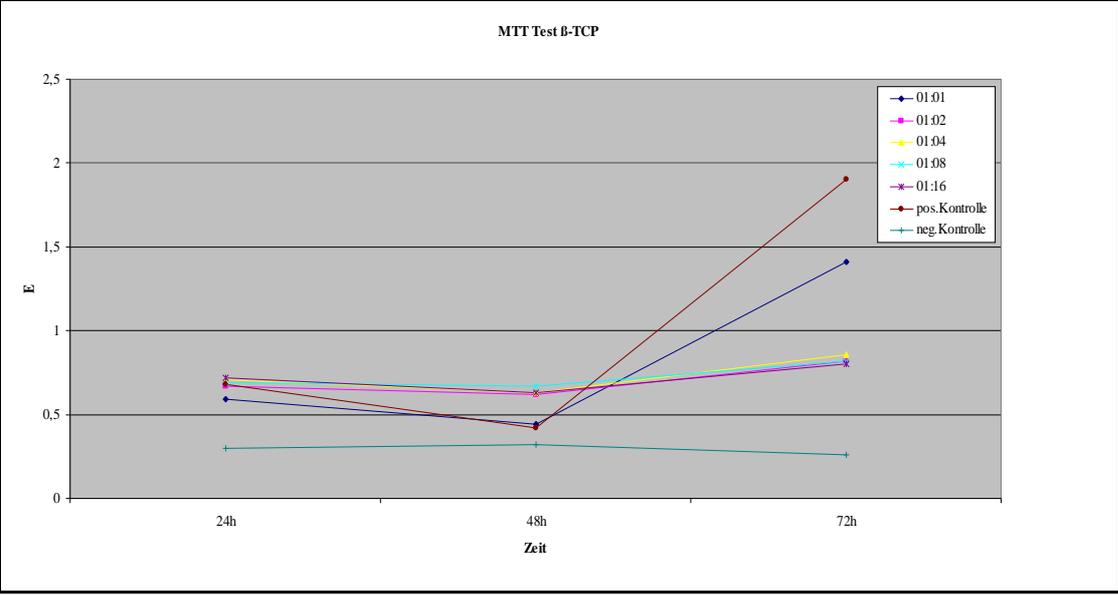


Abb. 7: MTT Test für **beta-TCP** nach 24 h, 48 h und 72 h

4.2 Bewuchsversuche und Bestimmung der Zellzahl nach 3, 7, 11, 15 und 19 Tagen

An allen Untersuchungszeitpunkten konnten auf allen Testmaterialien mit Hilfe der Giemsa-Färbung Osteoblasten angefärbt und dargestellt werden.

Nach Auszählen der Zellen und Auswertung der Ergebnisse ist grundsätzlich eine Zunahme der Zellzahl im zeitlichen Verlauf mit Ausnahme von 305020 auf allen Materialien zu verzeichnen.

Allerdings fällt mit Ausnahme der Thermanox[®]-Membran und 305020 die Zahl der Zellen auf allen Testmaterialien am letzten Untersuchungszeitpunkt deutlich ab.

Bei 602020 ist die Abnahme der Zellmenge sogar schon früher zu beobachten. Ab den 15. Tag nimmt die bis dahin stetig wachsende Zellmenge wieder kontinuierlich ab.

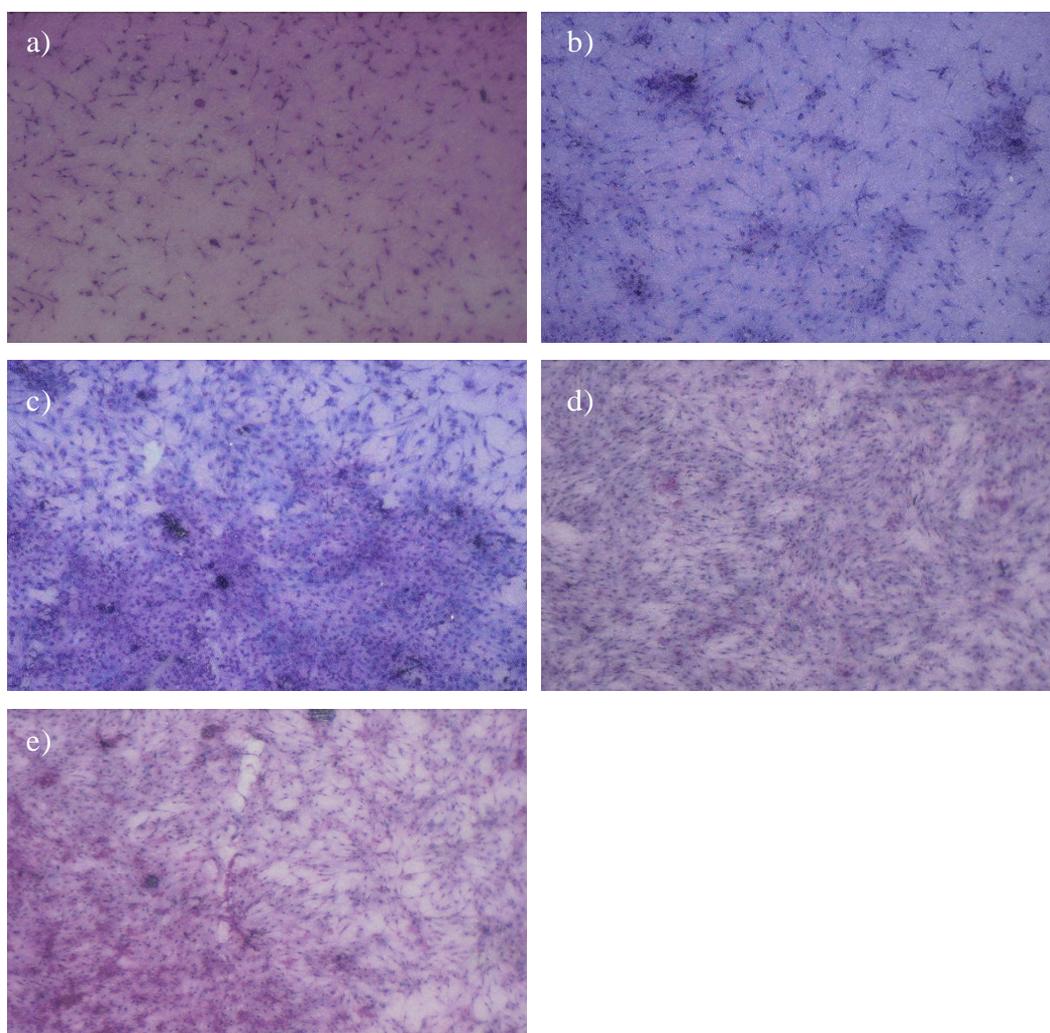


Abb. 8: Giemsa Färbung, humane Osteoblasten auf **602020** nach a) 3 Tagen, b) 7 Tagen, c) 11 Tagen, d) 15 Tagen und e) 19 Tagen ($A = 0,073 \text{ cm}^2$, Vergrößerung: 50x)

Wie die Abb. 9 zeigt, kommt es auf den verschiedenen Oberflächen der Testmaterialien zu unterschiedlichen Proliferationsverhalten der humanen Osteoblasten.

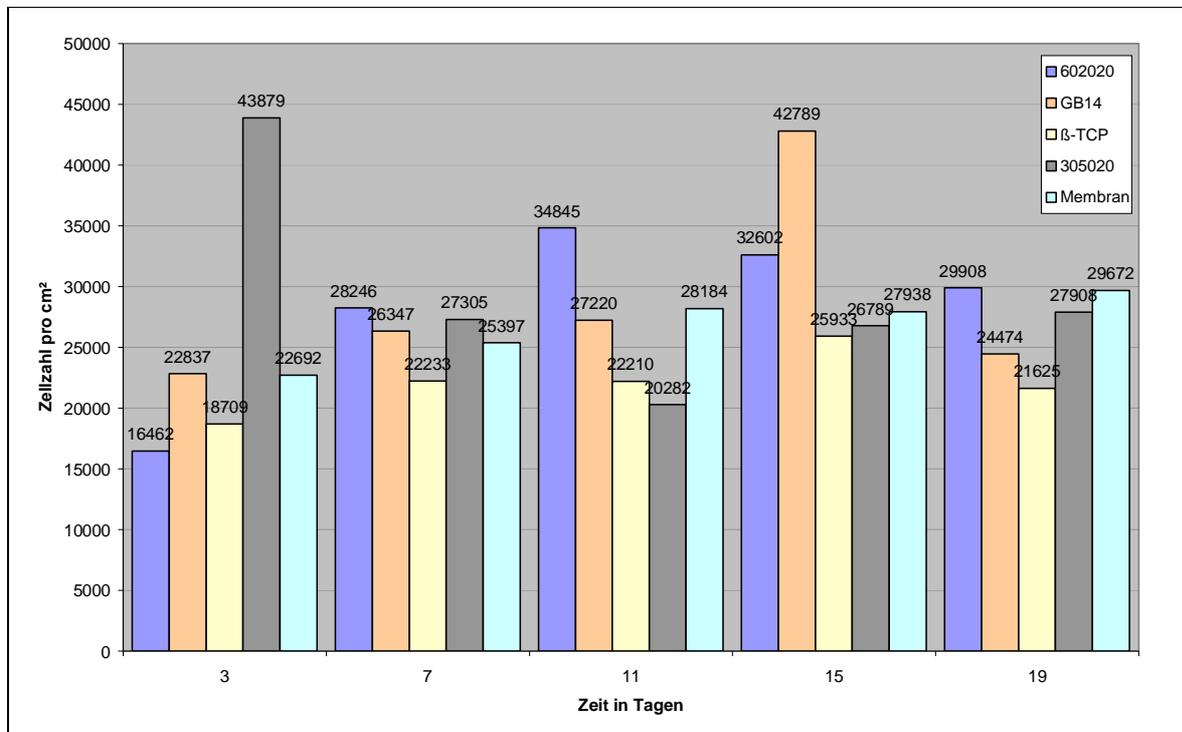


Abb. 9: Zellzahl pro cm² nach 3, 7, 11, 15 und 19 Tagen auf **602020, GB14, β-TCP, 305020** und **Thermanox[®]-Membran**

Die größte Zellmenge mit 43879 Zellen pro cm² wird nach 3 Tagen auf Material 305020 gezählt. Im weiteren Verlauf der Zellkultivierung nimmt die Zellzahl jedoch deutlich ab und fällt nach 11 Tagen auf 20282 Zellen pro cm². Das ist eine Abnahme von fast 50% und ausschließlich auf Material 305020 zu beobachten. Die Zellzahlbestimmung an den letzten beiden Untersuchungszeitpunkten zeigt dann wiederum einen leichten Anstieg und Erholung der Zellmenge. Mit letztendlich 27908 Zellen nach 19 Tagen wird die drittgrößte Zellzahl am letzten Untersuchungszeitpunkt erreicht jedoch die initiale Zellzahl zu Beginn der Kultivierung deutlich verfehlt.

Ein weiterer hoher Wert für die Zellzahl ist nach 15 Tagen auf dem Material GB14 mit 42789 Zellen pro cm² zu verzeichnen. Dies bedeuten im Gegensatz zu 305020 ein stetiger Zuwachs und eine beinahe Verdopplung der Zellmenge zwischen Tag 3 und Tag 15.

Auf den anderen Materialien nehmen die Zellzahlen in diesem Zeitraum ebenfalls deutlich zu,

auf Material β -TCP um 39% und auf der Thermanox[®]-Membran um 23%.

Der größte Zuwachs der Zellmenge findet sich mit 111% auf Material 602020 zwischen Tag 3 und Tag 11, allerdings ist schon am 15. Tag die schon erwähnte Abnahme der Zellzahl zu beobachten. Eine stetige Zunahme der Zellmenge bis zum letzten Untersuchungstag findet sich nur bei der Positivkontrolle. Über den gesamten Untersuchungszeitraum nimmt die Zellzahl auf der Thermanox[®]-Membran um insgesamt 31% zu.

4.3 Konfokale Lasermikroskopie

Nach 24 und 96 Stunden Zellkultivierung konnten auf allen Testmaterialien, ausgenommen die Negativkontrolle, Zellen angefärbt und dargestellt werden. Dabei nehmen im Vergleich der beiden Untersuchungszeitpunkte die Zellzahl, die interzellulären Kontakte über Zellausläufer sowie die Menge der Aktinfilamente der einzelnen Zellen auf allen Materialien zu. Das Aktin ist in punktueller Form, die so genannten fokalen Adhäsionspunkte, sowie in filamentärer Anordnung zu finden.

Nach 96 Stunden präsentieren die konfluenten Zellen auf allen Testmaterialien vorwiegend ca. 5-6 nm dicke und parallel zur Zellachse verlaufende Mikrofilamentbündel. Diese auffälligen Strukturen, die zum Teil auch netzwerkartige Geflechte innerhalb der Zellen ausbilden, können als "stress fibers" gedeutet werden.

Die auf 602020 gewachsenen Zellen (Abb.10) sind zu beiden Untersuchungszeitpunkten typisch polygonal und können voneinander abgegrenzt werden. Nach 24 Stunden bauen die noch zum Teil vereinzelt Zellen Ausläufer in Richtung benachbarter Zellen auf oder stehen in 2 bis 3er Gruppen im direkten Kontakt zueinander. Die filamentäre Anordnung des Aktins überwiegt und in fast allen Zellen ist ein netzwerkartiges filamentäres Geflecht zu erkennen. Dabei kommt es vereinzelt in den Zellen zur Ausbildung der schon beschriebenen "stress fibers". Nach 96 Stunden stehen die nicht vollständig konfluenten Zellen, die sich teilweise einschichtig aber auch doppelschichtig bis mehrschichtig übereinander liegend präsentieren, über kabelartige Fortsätze oder im direkten Zellkontakt zueinander. In allen Bereichen der Zellen dominieren "stress fibers", die sich in ihrem Verlauf innerhalb der Zellen parallel angeordnet an den Zellachsen orientieren aber auch netzwerkartig organisieren. Sie kreuzen einander als Zellausläufer und überbrücken Zellen, um mit weiter distanzierten Kontakt aufzunehmen.

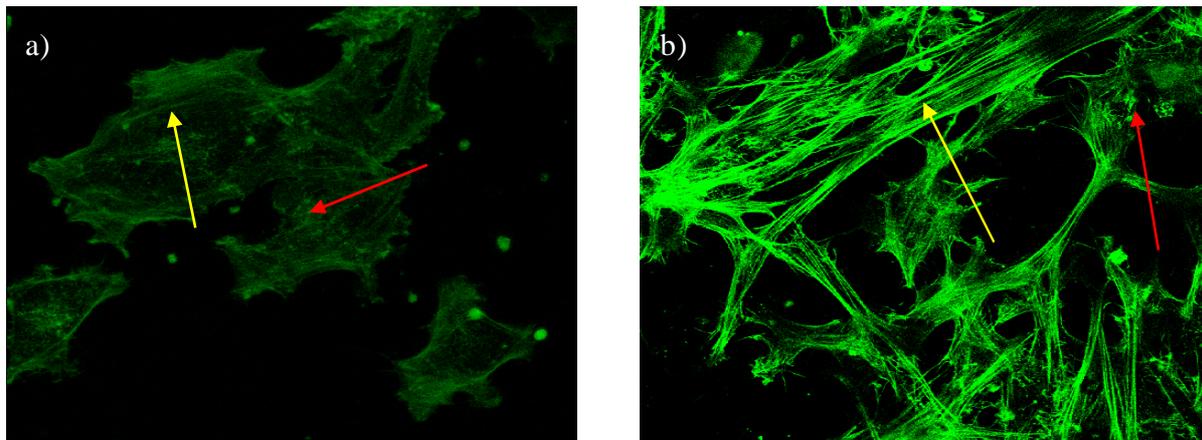


Abb. 10: Konfokale Lasermikroskopie, Aktin markierte humane Osteoblasten auf **602020** nach a) 24 h und b) 96 h , rote Pfeile: fokale Adhäsionspunkte, gelbe Pfeile: „stress fibers“

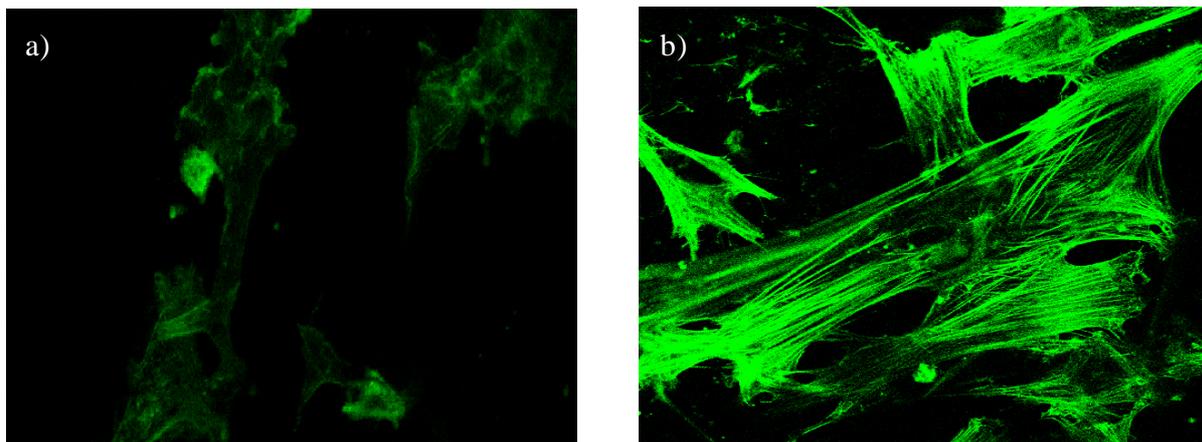


Abb. 11: Konfokale Lasermikroskopie, Aktin markierte humane Osteoblasten auf **305020** nach a) 24 h und b) 96 h

Die Zellen auf 305020 (Abb.11) präsentieren sich ebenfalls polygonal und lassen sich voneinander abgrenzen. Die Ausbildung von Zellausläufern für die Kontaktaufnahme mit benachbarten Zellen ist nach 24 h sichtbar und nach 96 h stehen alle Zellen über Zellfortsätze oder im direkten Kontakt zueinander in Verbindung. Nicht vollständig konfluent liegen die Zellen mit dreidimensionalen Auswerfungen nach 96 h vorwiegend mehrschichtig übereinander und gehen vereinzelt filamentär ineinander über. Die Aktinverteilung ist nach 24 h punktuell angeordnet ohne stress fibers. Diese beherrschen nach 96 h sehr dick und kabelartig parallel verlaufend das Bild. In den Zellen sind sie den Zellachsen orientierend mehr streifenförmig als netzwerkartig angeordnet und die Enden einzelner Filamente treffen an bestimmten Punkten der Zellmembran

scharf zusammen. Auch auf GB14 (Abb.12) lassen sich polygonale Zellen an beiden Untersuchungszeitpunkten darstellen. Streng voneinander abgrenzbar sind sie vorwiegend noch nach 24 h. Nach 96 h liegt ein konfluentes Zellwachstum vor, so dass die Zellen mehrschichtig und im direkten Kontakt zueinander liegend kaum voneinander zu unterscheiden sind. Erste Zellkontakte über sich in Richtung benachbarter Zellen aufbauende Zellfortsätze sind nach 24 h gut zu sehen. Vereinzelt liegen zu diesem Zeitpunkt stress fibers vor, jedoch bauen vorwiegend zarte Mikrofilamentbündel ein feines netzwerkartiges intrazelluläres Zytoplasmageflecht auf. Neben der filamentären Anordnung liegt ebenso ein punktuelltes Muster der Aktinverteilung vor. Nach 96 h überwiegt die filamentäre Aktinanordnung und stress fibers durchspannen die Zellen.

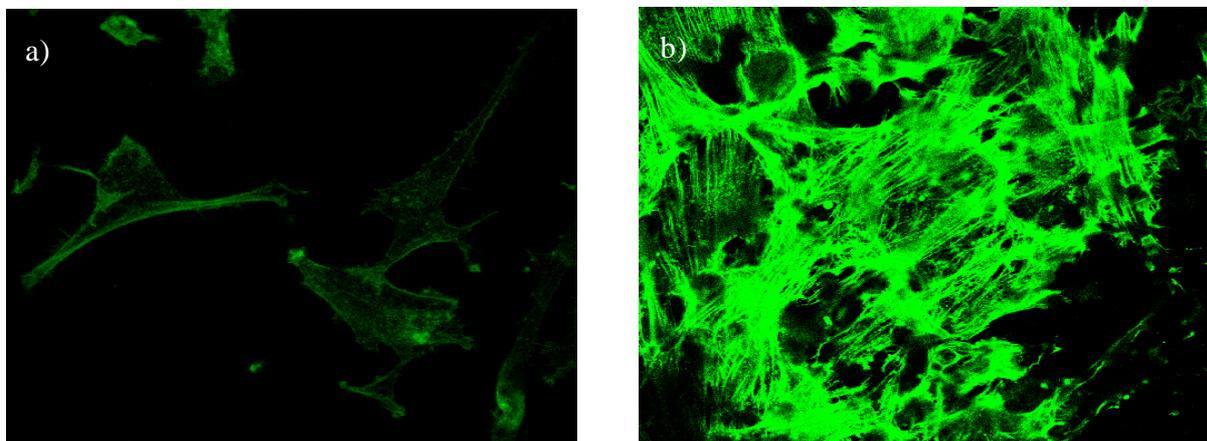


Abb. 12: Konfokale Lasermikroskopie, Aktin markierte humane Osteoblasten auf **GB14** nach
a) 24 h und b) 96 h

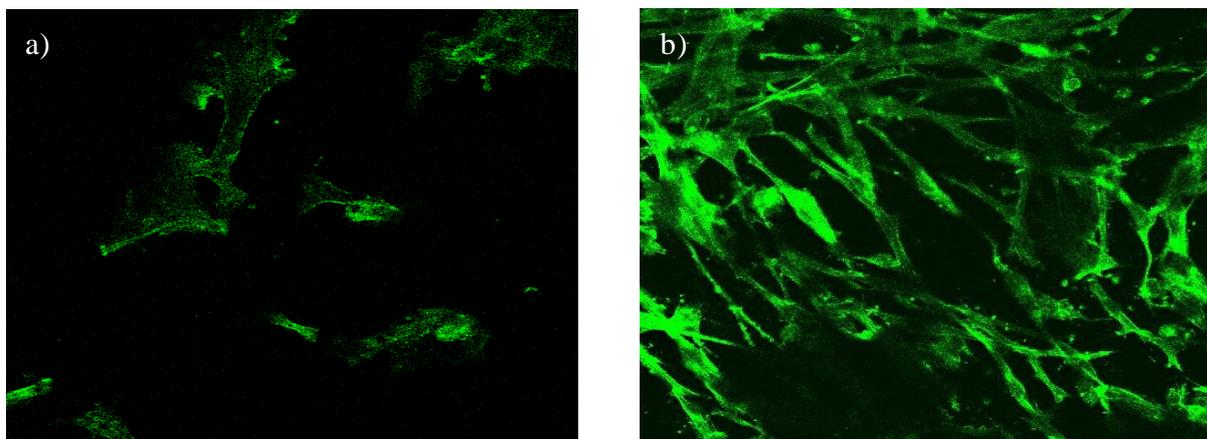


Abb. 13: Konfokale Lasermikroskopie, Aktin markierte humane Osteoblasten auf **β -TCP** nach
a) 24 h und b) 96 h

Auf Material β -TCP lassen nach 24 h und 96 h polygonale Zellen nachweisen (Abb.13). Nach 24 h sind die Zellen noch streng voneinander abgrenzbar. Auch hier sind neben isolierten Zellen schon Kontaktaufnahmen untereinander über Zellausläufer nachweisbar. Nach 96 h hat sich ein enger Zellrasen mit stark vernetzten Zellen ausgebildet. Alle Zellen stehen über Zellfortsätze oder im direkten Kontakt zueinander in Verbindung. Die Aktinverteilung ist nach 24 h vorwiegend punktuell angeordnet. Vereinzelt sind feine Aktinfilamente ausgebildet. Erst nach 96 h zeigen sich zahlreiche lange parallel angeordnete Aktinbündel, die die Zelleiber durchspannen.

Auf den Thermanox[®]-Membranen sind die Zellen (Abb.14a)) nach 24 h fast vollständig konfluent gewachsen, einschichtig und mehrschichtig angeordnet und polygonal nur teilweise voneinander abgrenzbar. Die Zellen suchen den direkten Kontakt zueinander, so dass zarte Zellausläufer nur vereinzelt mit entfernter liegenden Zellen Kontakt aufnehmen. Die filamentäre Aktinanordnung überwiegt nach 24 h und die Ausbildung von radial und längsgerichteten stress fibers, die netzwerkartige Geflechte in allen dargestellten Zellen aufbauen, lassen sich gut erkennen. Nach 96 h sind die Zellen nicht mehr voneinander abgrenzbar und haben ein vollständig konfluentes Wachstum erreicht (Abb.14b)). Die mikroskopische Aufnahme wird durch die parallel angeordneten stress fibers, die eine gleichmäßig mehrschichtige und tapetenartige Zellverteilung erahnen lassen, dominiert. Die Länge der Fasern, die vereinzelt senkrecht in die Zellen einstrahlen, ist sehr groß und umfasst zum Teil den gesamten Bildausschnitt.

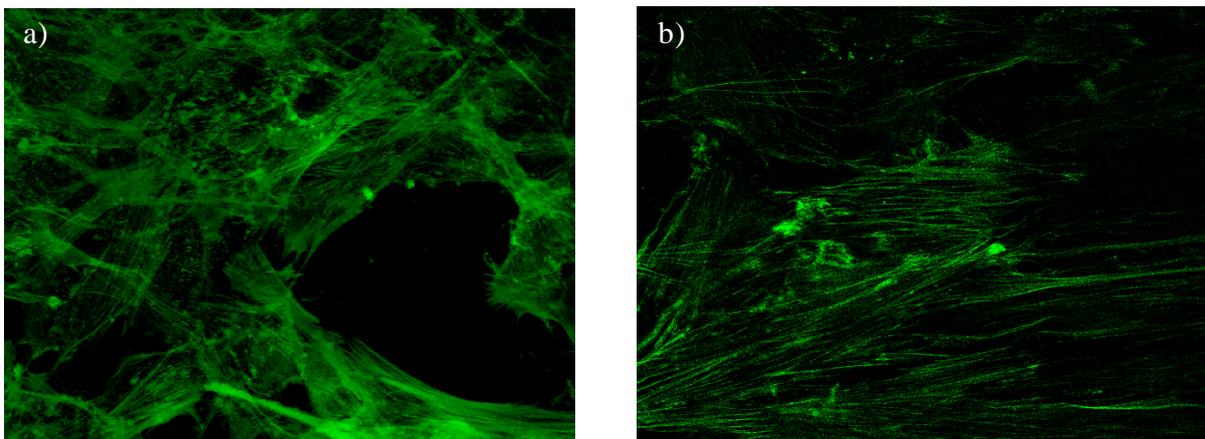


Abb. 14: Konfokale Lasermikroskopie, Aktin markierte humane Osteoblasten auf Membran nach a) 24 h und b) 96 h

4.4 ESEM

Nach 4 Tagen konnten auf allen Probematerialien vitale polygonale Zellen in der Zellbindungphase 4 nachgewiesen werden.

Die Abbildung 15 zeigt die Oberflächenbeschaffenheit und Zellverteilung auf Probematerial 602020. Die unregelmäßige strukturierte poröse Oberfläche ist charakterisiert durch glatte kugelhähnliche ca. 10 bis 50 μm große Körner, die ineinander übergehen aber auch lückenhaft angeordnet sind, so dass schwammartig ca. 10-20 μm weite Poren hervorgerufen werden. Dazwischen verteilt sich eine feine im Durchmesser ca. 3 μm große Körnung.

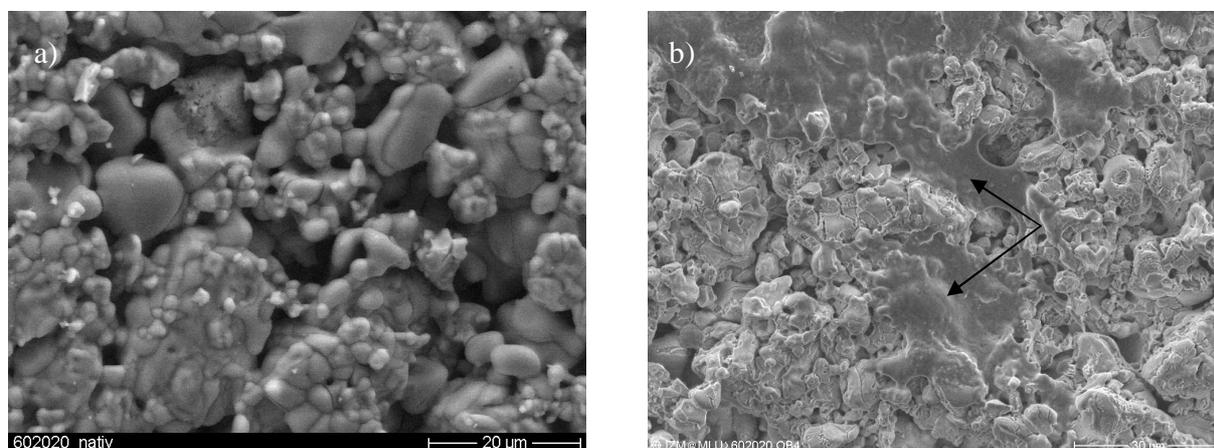


Abb.15:ESEM,602020 a)Oberfläche nativ, b)fixierte humane Osteoblasten nach 4 Tagen (Pfeile)

Alle nachgewiesenen Zellen haben Kontakt zum Material aufgenommen und verteilen sich regelmäßig. Dabei legen sich die Zellleiber der polygonalen Zellen direkt auf die Oberfläche oder in die unregelmäßig großen Poren und halten sich über ausgebildete Zellausläufer an der unterschiedlich großen Körnung des Materials fest. Der jeweilige Kontakt zu benachbarten Zellen wird über Zellausläufer oder durch direkten Zellkontakt aufgebaut. Dabei erscheint die unregelmäßig poröse Oberfläche des Testmaterials nicht als Hindernis, sondern dient als Leitstruktur für die Anhaftung und Ausbreitung der Zellen.

Die Oberflächenstruktur des Testmaterials 305020 ähnelt 602020. Sie wirkt etwas rauer und unregelmäßiger, vor allem durch eine z.T. eckige und scharfe Körnung mit der Größe von ca.1 bis 10 μm (Abb.16). Zwischen den rauen Arealen befinden sich auch glatte unporöse Bereiche. Im Vergleich zu 602020 sind weniger aber dafür größere ca. 20 μm große Poren vorhanden. Die Zellleiber der regelmäßig verteilten polygonalen Zellen liegen vor allem

zwischen den aufgerauten Bereichen oder überspannen die großen Poren, in dem sie über z.T. lang gestreckte Zellausläufer mit den gegenüberliegenden Porenrändern Kontakt aufnehmen und über diesen Weg sich auf der Oberfläche des Materials verankern. Aufgrund der rauen Oberfläche ist der direkte Zell-Zellkontakt nach 4 Tagen noch rar. Die Kommunikation der Zellen verläuft vorwiegend über z.T. sehr lange und filigrane Zellausläufer.

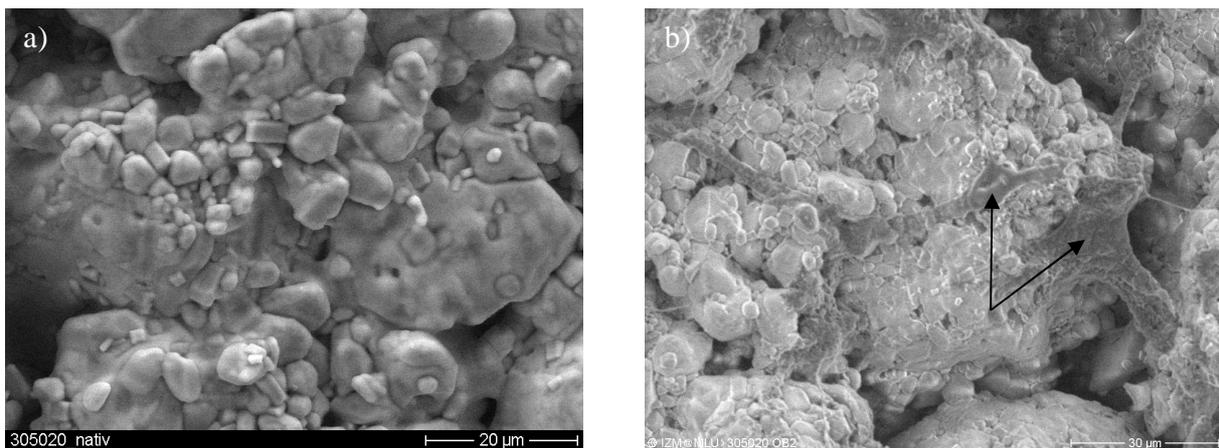


Abb.16:ESEM,305020 a)Oberfläche nativ, b)fixierte humane Osteoblasten nach 4 Tagen (Pfeile)

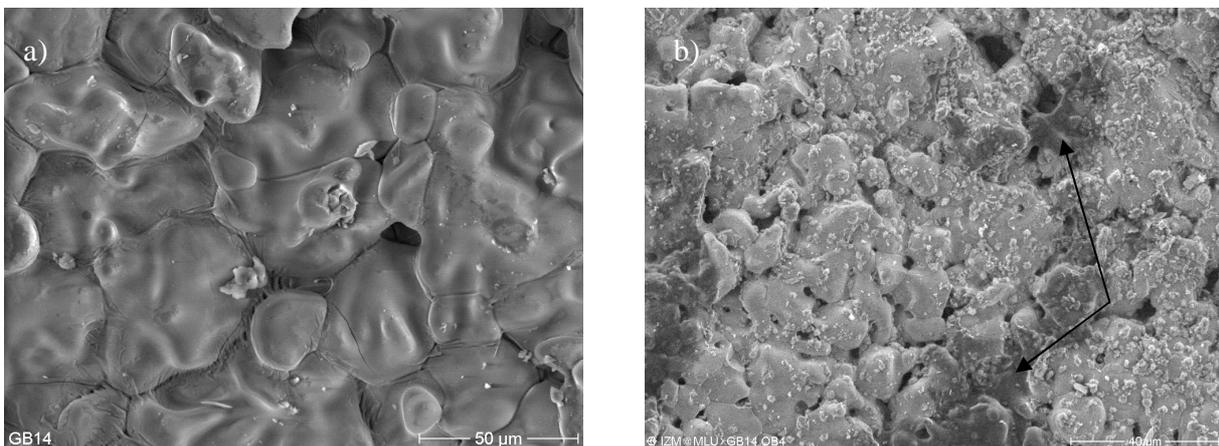


Abb.17: ESEM,GB 14 a) Oberfläche nativ, b) fixierte humane Osteoblasten nach 4 Tagen(Pfeile)

Das Testmaterial GB14 weist eine im Vergleich zu den o.g. Materialien 602020 und 305020 glatte und regelmäßige Oberfläche auf. Sie wird aus eng aneinander liegenden, flachen und glatten ca. 20 bis 50 µm große Körnungen aufgebaut. Dazwischen befinden sich nur selten Poren, die im Durchmesser ca. 20 µm groß sind (Abb.17). Auch hier können mittels ESEM nach 4

Tagen Zellkultivierung vitale polygonale Zellen auf dem Material dargestellt werden. Diese liegen flach auf der Oberfläche oder vereinzelt in den wenigen Poren. Die typischen Zellausläufer zwischen den Zellen und dem Material sowie zwischen den Zellen selber sind wenig ausgeprägt. Auch die schon im Laserscanning nachgewiesenen interzellulären Kontakte können in dieser Untersuchung nur teilweise sichtbar gemacht werden.

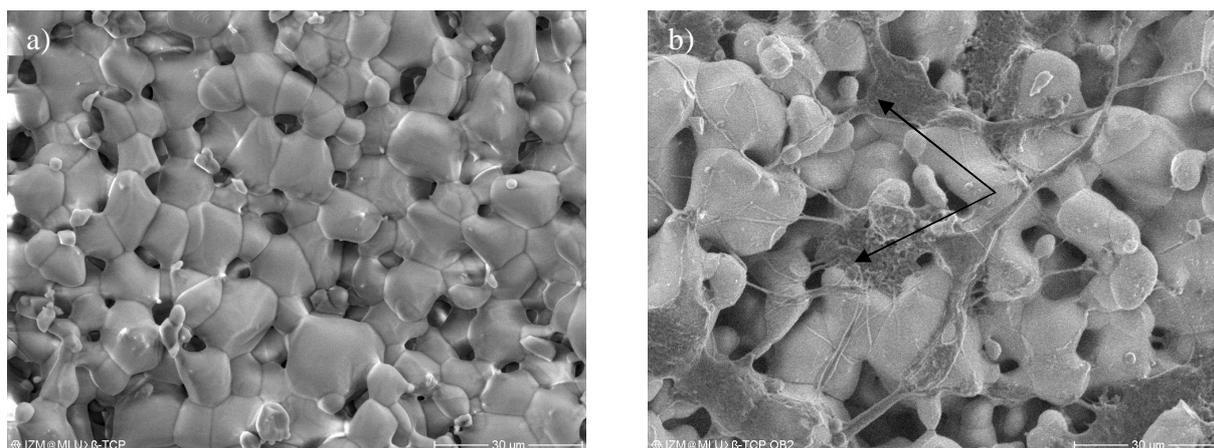


Abb.18:ESEM, β -TCP a)Oberfläche nativ, b)fixierte humane Osteoblasten nach 4 Tagen (Pfeile)

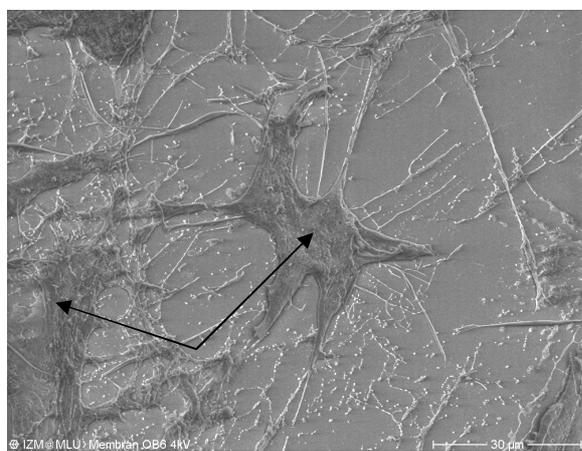


Abb. 19: ESEM Thermanox[®]-Membran, fixierte Osteoblasten nach 4 Tagen (Pfeile)

Das native Bild (Abb. 18a)) des Materials β -TCP zeigt eine unregelmäßige, schwammartig poröse Oberfläche. Die Körnung wirkt glatt und ist in unterschiedlicher Größe von ca. 5 bis 30 μm im Durchmesser anzutreffen. Viele große und kleine Poren zwischen 5 und 30 μm weit lockern die Oberflächenstruktur sehr auf. Die regelmäßige Zellverteilung der polygonalen,

vitalen Zellen ähnelt dem Material 305020. Alle Zelleiber liegen in kleineren Poren oder überspannen Größere, in dem sie über z.T. langgestreckte Zellausläufer mit den gegenüberliegenden Porenrändern Kontakt aufnehmen und sich auf der Oberfläche des Materials anheften. Auch die Kommunikation zwischen den Zellen wird über direkten Kontakt oder über sehr lange und filigrane Zellausläufer gewährleistet (Abb. 18b)).

Nach 4 Tagen Zellkultivierung sind auf allen Materialien sowie auf der Positivkontrolle (Abb.19) polygonale vitale Zellen nachweisbar. Die Zellverteilung ist überall regelmäßig, die Zelldichte in etwa gleich. Die Interaktion zwischen den Zellen wird durch einen direkten unmittelbaren Zellkontakt sowie über Zellausläufer, die vor allem zwischen den Osteoblasten auf der Thermanox[®]-Membran, 602020, 305020 und β -TCP aufgebaut werden, vollzogen.

5. Diskussion

Die Untersuchung an isolierten Zellen unter Kulturbedingungen stellt eine wichtige Alternative zum In-vivo-Verhalten von bestimmten Werkstoffen im Bereich der Biomaterialtestung dar. Dabei existieren eine Reihe an Verfahren und Methoden sowie eine in der Literatur schier unüberschaubare Datenmenge, die den Einfluss von Materialien auf Zelladhärenz, Zellproliferation und Differenzierung analysieren und benennen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das In-vitro-Verhalten der osteokonduktiven schnell resorbierbaren Keramiken 602020, GB14, 305020 und des Referenzmaterials β -TCP auf zellulärer Ebene untersucht. Dazu wurden zum einen eine permanente Zellkulturlinie MG63 für die Bestimmung der basalen Zelltoxizität mittels MTT-Test zum anderen humane Osteoblasten zur Untersuchung des Zellwachstums auf den Probematerialien verwendet.

Es ist kritisch anzumerken, dass sich auf Grund der Verwendung von humanen Osteoblasten von verschiedenen Patienten, die bei primärer oder sekundärer Gonarthrose eine Knieendoprothese implantiert bekamen, die Proliferationsverhalten der Zellen patientenabhängig unterscheiden und dabei die Ergebnisse der Bewuchsversuche beeinflussen. Der Grad dieser Einflussnahme abhängig vom Gesundheitszustandes und Alter der Patienten sowie Wachstumspotential der gewonnenen Osteoblasten konnte nur eingeschränkt berücksichtigt werden. Mit der Intention, potente Knochenzellen zu gewinnen, wurde vorwiegend Knochenmaterial von jüngeren Patienten verwendet. Im Falle eines schlechten Proliferationsverhaltens im Verlauf der Kultivierung wurden Primärkulturen ausgeschlossen. Zudem konnte mit Hilfe des Nachweises der Expression der alkalischen Phosphatase, die einen früher Marker der osteoblastären Aktivität und osteogenen Differenzierung darstellt, die Existenz von Osteoblasten beurteilt werden.

In der Literaturübersichtsarbeit von Wilke et al. 2002 sind wichtige Daten über das In-vitro-Verhalten von keramischen Werkstoffen für orthopädische Anwendungen in der Zellkultur der letzten vier Jahrzehnte zusammengefasst. Darin werden die große Anzahl der verschiedenen angewendeten Testsysteme und vielfältigen Zellkulturlinien, die nur eingeschränkte Vergleiche der Testergebnisse zulassen, kritisch hervorgehoben. Außerdem eignen sich laut Autoren die überwiegend zu kurz gewählten Untersuchungszeiträume, die zwischen 48 h und 15 Tagen in den verschiedenen Studien betragen, nur zur Einordnung der Toxizität des untersuchten Werkstoffes. Langzeiteffekte können daraus aber nicht abgeleitet werden. Des Weiteren werden auf die zum Teil konträren veröffentlichten Ergebnisse zu den Materialien Tricalciumphosphat und Hydroxyl-

apatit hingewiesen. Grundsätzlich attestierten jedoch die meisten Arbeiten für diese beiden Materialien einstimmig eine gute Biokompatibilität (Wilke et al. 2002).

Zur Bestimmung und Einschätzung eines zytotoxischen Effektes wurde der MTT-Test als bekannte Methode genutzt. Dabei steht das Ausmaß der Inhibition auf Stoffwechselaktivität sowie Proliferation der Zellen im Mittelpunkt der Untersuchung. Allerdings kann der Test nicht zwischen Anzahl vitaler Zellen und Höhe der Zellaktivität unterscheiden. Eine Erhöhung der gemessenen Extinktion kann aus einer gesteigerten Zellaktivität, einer Zunahme der Zellzahl oder aus beiden kombiniert resultieren.

Die Extinktion E_λ wird als Absorbanz eines Materials für Licht einer bestimmten Wellenlänge λ definiert und ist nach dem Lambert-Beerchen Gesetz gegeben als:

$$E_\lambda = -\lg(I / I_0) = c \cdot \epsilon_\lambda \cdot l$$

mit: I: Intensität des transmittierten Lichtes

I_0 : Intensität des einfallenden Lichtes

c: Konzentration der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit

ϵ_λ : molarer Extinktionskoeffizient der Substanz bei der Wellenlänge λ

l: Weglänge des Lichtes im Material

Die Extinktion ist also direkt proportional zur Konzentration der absorbierenden Substanz, zum molaren Extinktionskoeffizient und zur Weglänge des Lichtes im Material. Bei Beibehaltung der Wellenlänge und der Weglänge des Lichtes, nimmt nur die im MTT Test vorkommende Formazankonzentration einen Einfluss auf die Extinktion. Je größer die Konzentration des gebildeten Formazans, desto größer ist die gemessene Extinktion. Dabei ist die Menge des Formazans abhängig von der Zellaktivität und von der Anzahl vitaler Zellen. Aus der Extinktion lassen sich somit Aussagen zur Proliferationsrate bzw. zur Anzahl vitaler Zellen ableiten.

Für alle getesteten Materialien konnte im MTT-Test nach 72 h kein basaler zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden. Alle Materialien zeigten nach Ende der Zellkultivierung für die hochkonzentrierten Verdünnungen einen positiven Einfluss auf die Zellproliferation und Zellaktivität. Je größer die Konzentration der gelösten Materialien, desto höher die gemessenen Extinktionen. Dabei ließen die Zellen nach Zugabe der unverdünnten Extrakte und der Extrakte in der Verdünnung 1:2 der Materialien 602020, 305020 und GB14 im Vergleich zum Referenzmaterial β -TCP eine höhere Zellzahl bzw. Zellaktivität erkennen.

Eine gesteigerte Abgabe von Calcium und Phosphat ins Medium führt zu einer zunehmenden Proliferation von Osteoblasten (Gregoire et al. 1987 und 1990; Behrens et al. 2000). Dieses

Ergebnis lässt sich auf alle Materialien übertragen und begründet deren positiven Einfluss auf die osteoblastenähnliche Zellkulturlinie MG63 im MTT-Test.

Die Biokompatibilitätstestungen resorbierbarer Glaskeramiken von Ignatius et al. 2001 zeigten im Gegensatz hierzu eine konzentrationsabhängige Minderung der Stoffwechselaktivität im MTT-Test für das Material GB14. Durch β -TCP, welches als Referenzmaterial diente, wurde die Zellproliferation bzw. Zellaktivität nicht beeinflusst (Ignatius et al. 2001). Es gab im Vergleich zur vorliegenden Untersuchung keine wesentlichen Unterschiede in der Herstellung der Extrakte, der Anwendung der Methode und Auswertung der Ergebnisse. Jedoch verwendete die Arbeitsgruppe eine andere Zelllinie, BALB/3T3 (Mäusefibroblasten). Die Daten der Arbeitsgruppe Picker et al. 1993 fanden wiederum keinen zytotoxischen Effekt von GB14 Extrakten im MTT-Test. Die Zytotoxizitätsprüfungen erfolgten hier an Tumorzelllinien, einem Fibrosarkom (EPS 86-079) und einem Adenokarzinom des Magens (EPG 85-257) (Picker et al. 1993). Studien haben ergeben, dass die Anwendung von verschiedenen Zellarten die Testsensitivität unter gleichen Bedingungen beeinflusst (Browne et al. 1979, Naji et al. 1990, Puleo et al. 1991, Jansen et al. 1991, Berstein et al. 1992, Niederauer et al. 1994, Harmand et al. 1990, Caughman et al. 1990). Diese Erfahrungen mit unterschiedlichen Zellkulturen führten zu der Forderung, Zellen zu benutzen, die auch tatsächlich im klinischen Alltag Kontakt zu entsprechenden Biomaterialien haben (Harmand et al. 1990, Pizzoferrato et al. 1985).

Die MTT Messungen nach 48 h ergaben für alle Materialien keine wesentlichen Veränderungen der Zellproliferation und Zellaktivität im Vergleich zu denen nach 24 h. Jedoch differieren die für jedes Material mitgeführten Positivkontrollen nach 48 h. Ein Anstieg der Extinktion der Positivkontrollen ist nach 48 h bei Material 602020 und 305020 zu beobachten. Dagegen fallen sie zu diesem Zeitpunkt bei GB14 und β -TCP ab. Es besteht jedoch eine gute Übereinstimmung zwischen den Kurven der unterschiedlichen Konzentrationen mit denen der Positivkontrollen. Der Abfall der entsprechenden Werte ist nach 48 h minimal. Danach steigen die Extinktionen wieder an.

Ursachen für diese in der Frühphase bei allen Materialien aufgetretene Stagnation der zellulären Aktivität sowie für die unterschiedlichen Verläufe der Positivkontrollen konnten nicht eindeutig gefunden werden. Für jedes Material wurde der MTT Test einzeln durchgeführt, sodass an unterschiedlichen Zeitpunkten eine andere Passage der Zellkulturlinie verwendet wurde. Dementsprechend variiert je nach Einfrierzeitpunkt auch das Alter der Zellen. Die Zellproliferation im MTT Test wird nicht nur von der vorher notwendigen Kultivierung

beeinflusst, sondern ist auch vom Einfrierzeitpunkt und vom Alter der jeweiligen Zellpassage abhängig. Zudem ist das Proliferationsverhalten am Zellzyklus gebunden. Entsprechend des gewählten Zeitpunktes für die Durchführung des MTT Tests ändert sich zyklusabhängig auch das Proliferationsverhalten der Zellen. Eine phenoltoxische Kontamination ist unwahrscheinlich, kann aber nicht vollständig ausgeschlossen werden. Wiederholungen des MTT-Tests reproduzierten die Ergebnisse.

Die Auswertung des Proliferationsverhaltens der humanen Osteoblasten auf den Oberflächen der Testmaterialien ergab nur geringfügige Unterschiede zwischen den verschiedenen Substanzen.

Die höchste Zellzahl wurde auf Material 305020 nach 3 Tagen sowie auf Material GB14 am 15. Tag erreicht. Der Abfall der Zellzahl an den letzten Untersuchungszeitpunkten auf den Materialien 602020, GB14 und β -TCP ist durch das Erreichen eines konfluenten Zellrasens und des damit verbundenen Ablösens der Zellen von den Probekörpern und Absterben dieser zu erklären. Die beiden Materialien 602020 und GB14 setzten in den ersten Tagen der Interaktion zwischen Osteoblasten und Biomaterial von allen Materialien den größten Proliferationsreiz.

Auf Material 305020 fand ein rapider Abfall der Zellzahl bis zum 11. Tag nach Kultivierungsbeginn statt. In der letzten Phase der Kultivierung kam es zur Erholung und zu einem leichten Anstieg der Zellzahl. Da das Proliferationsverhalten der Osteoblasten in der Frühphase innerhalb der ersten 3 Tage nicht untersucht ist, kann ein initiales Zellwachstum zu Beginn der Kultivierung nicht ausgeschlossen werden. Eine negative Beeinflussung des Proliferationsverhaltens durch die in Lösung gegangenen Ionen des Materials 305020 kann außer Acht gelassen werden. Es bestanden keine deutlichen Unterschiede zwischen den Konzentrationen der in Lösung gegangenen Ionen im Vergleich zu den anderen Substanzen. Zudem erreichten die ermittelten Ionenkonzentrationen nicht annähernd die Höhe derjenigen, die von der Arbeitsgruppe Picker et al. 1993 für eine wachstumshemmende Wirkung auf zwei Tumorzelllinien verantwortlich gemacht wurden (Picker et al. 1993). Aufgrund der verwendeten Zellkulturen erlauben die Ergebnisse nur eine eingeschränkte Ableitung auf humane Osteoblasten. Jedoch bewirkte in dieser Arbeit die selektive Ionenerhöhung eine Wachstumshemmung für K^+ -Ionen ab ca. 5facher Normionen-konzentration (30mmol/l) und für Ca^{2+} -Ionen ab ca. 3,5facher Konzentration (5 mmol/l). Mg^{2+} -Ionen hatten auch bei 10-facher Konzentration (18mmol/l) und Phosphat-Ionen bei 15facher Konzentration (30mmol/l) keine wachstumshemmende Wirkung.

Da es sich bei 305020 um ein zweiphasiges Material handelt, ist davon auszugehen, dass in den

ersten 10 Tagen eine der Hauptphasen acceleriert in Lösung geht und eine Veränderung der Oberflächenstruktur verursacht. Die Zellen verlieren dadurch eine stabile Oberfläche und parallel zu den in Lösung gehenden Bestandteilen lösen sich auch Zellen vom Material. Dieser Prozess hält solange an bis die Degradation einer der Hauptphasen an der Oberfläche abgeschlossen ist und eine Vermehrung der Zellen zulässt.

Bei dem Referenzmaterial β -TCP war die Proliferationsrate im Vergleich zu den anderen Materialien niedriger, aber höher als auf der Positivkontrolle. Auf allen neuen schnell resorbierbaren Keramiken fanden sich am letzten Untersuchungstag der Kultivierung mehr Zellen als auf β -TCP. Diesem traditionell als Knochensubstitut verwendetem Biomaterial wird in vielen In-vitro-Untersuchungen überwiegend eine gute Biokompatibilität bescheinigt (Wilke et al. 2002). Es finden sich jedoch auch deutlich schlechtere Ergebnisse. Koutoura et al. 1985 und Hyakuna et al. 1989 beobachteten neben einer deutlichen Wachstumseinschränkung auch Zellschäden auf β -TCP Keramikoberflächen kultivierten Zellen (Hyakuna et al.1989, Koutoura et al.1985.). Eine mögliche Erklärung für die im deutlichen Gegensatz zu den Resultaten der meisten Untersucher stehenden Ergebnisse ist, dass beide Arbeitsgruppen exakt dieselben Zellen (Hamsterfibroblasten V79) verwendet haben. Sun et al. 1997 führten Versuche mit Osteoblasten aus embryonaler Rattenkalvaria durch und zeigten, dass TCP eine PGE₂-Ausschüttung induziert, die für eine Hemmung des osteoblastären Wachstums verantwortlich gemacht wird (Sun et al.1997). Arbeiten der Arbeitsgruppen Knabe et al. 2004 und Wang et al. 2004 zeigten in Wachstumsversuchen mit osteoblast like cells auf neu entwickelte calciumphosphathaltige Keramiken ein schnelleres Proliferationsverhalten im Vergleich zum Referenzmaterial TCP.

In Folge dessen und mit Ergebnissen weiterer immunhistochemischer Untersuchungen wurden die neuen Materialien als potentielle Kochenersatzmaterialien empfohlen (Knabe et al. 2004, Wang et al. 2004).

Die vorliegenden Ergebnisse des MTT-Tests und der Bewuchsversuche bescheinigen unter Einbeziehung der Resultate des Referenzmaterials β -TCP allen Materialien eine sehr gute Biokompatibilität. Grundsätzlich lassen sich jedoch die Ergebnisse nur eingeschränkt mit anderen Untersuchungen vergleichen. Die bisher genannten Arbeiten verschiedenster Autoren zeigen deutlich die Vielfalt der Testsysteme und Zellkulturlinien im Bereich der In-vitro-Testung von Biomaterialien. Zur Verbesserung der Vergleichbarkeit von Daten fordert es im Bereich der Testung von Biomaterialien auf zellulärer Ebene die Anwendung von Zellkulturen, welche Zellen entsprechen oder ähneln, die auch später in-vivo definitiv in Kontakt mit den getesteten

Materialien treten.

Mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie ist es möglich, schon in der Frühphase der Knochenbildung Aussagen über die Besiedlungsarchitektur der Osteoblasten auf den Probematerialien zu machen. Das über Fluoreszenzmarkierung sichtbar gemachte Aktin stellt nicht nur Morphologie und Verteilung der einzelnen Zelle im Zellrasen dar, sondern repräsentiert auch die Struktur und die damit verbundenen Aufgaben des Zytoskeletts. Besonders die Ausbildung und Struktur fokaler Kontakte zwischen den Zellen und den Probekörpern sowie zwischen den Zellen selber, die essentiell für das Überleben der Zellen sind und Einfluss auf die Osteoidbildung und damit auf die Eigenschaft der im direkten Kontakt stehenden Bindung zwischen Implantatmaterial und Knochen nehmen, standen im Mittelpunkt der Untersuchungen.

Die Ergebnisse der konfokalen Lasermikroskopie nach 24 h und 96 h ergaben den Nachweis eines gut ausgeprägten Netzwerkes humaner Osteoblasten auf allen Materialien. Die Besiedlungsarchitektur der fixierten Osteoblasten war weitaus identisch.

Nach 96 h ließ sich auf allen Materialien eine hohe Anzahl von „stress fibers“ darstellen. „Stress fibers“ erscheinen und verschwinden als Antwort auf mechanische Stimuli und man geht davon aus, dass „stress fibers“ eine der Hauptkomponenten für die Absorption mechanischen Stresses in Zellen darstellen (Sato 2007). Sie sind vor allem in gut verteilten und festsitzenden Zellen zu finden (Byers et al. 1984). In den mikroskopischen Aufnahmen erinnert die Anordnung dieser Fasern zum Teil an Sarkomere der Muskelzellen. Eine aktive Kontraktion *in vivo* ist jedoch bisher nirgends beschrieben. „Stress fibers“ sind aber in der Lage mit wechselnden Anteilen der kontraktilen Proteine isometrische Spannungen innerhalb der Zelle aufzubauen (Byers et al. 1984). Sie spielen deshalb eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Zellmorphologie und sind am Aufbau von Zelladhäsionen beteiligt (Watanabe et al. 1993).

Die Arbeitsgruppe Zhu et al. untersuchte mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie das Wachstumsverhalten von Osteoblasten kultiviert auf verschiedenen Titanoberflächen. In der Untersuchung bewies die Darstellung eines organisierten Zytoskelett mit „stress fibers“ die Präsenz festsitzender Zellen mit kräftigen Zelladhäsionen und wenig Motilität (Zhu et al. 2003).

Aktinfilamente sind nicht nur formgebend und rein stabilisierend, sondern spielen auch eine wichtige Rolle für die zelluläre Organisation und Kommunikation. Die Zellmembranen nehmen über die sogenannten Zonula adhaerens mit benachbarten Zellen Kontakte auf und verankern mit den focal contacts die Zelle mit dem umliegenden Substrat. In diese speziellen Bereiche der Membran strahlen Zytoskelettproteine, insbesondere Aktin, hinein und beteiligen sich an ihrem

Aufbau. Solche Interaktionen spielen eine wichtige Rolle für die Signalübertragung der Zellen, welche die Zellmorphologie, Zellbewegung, Genexpression, Proliferation und Differenzierung regulieren (Anselme et al. 2004, Puleo und Bizios 1992).

Zusammengefasst und mit Berücksichtigung der zur konfokalen Lasermikroskopie veröffentlichten Literatur erbringen die vorliegenden Ergebnisse mit Darstellung fokaler Adhäsionspunkte sowie in hoher Anzahl gefundener „stress fibers“ den sicheren Nachweis für kräftige Zelladhäsionen festsitzender und eng miteinander kommunizierender Zellen auf allen Materialien nach 96 h.

Die Ergebnisse der ESEM Untersuchung bestätigen die genannten Beobachtungen der konfokalen Lasermikroskopie. Nach 4 Tagen Zellkultivierung waren auf allen Materialien polygonale, regelmäßig verteilte Zellen nachweisbar. Die Interaktion zwischen den Zellen wurde durch einen direkten unmittelbaren Zellkontakt sowie über Zellausläufer aufgebaut.

Die Oberflächengestaltung und Mikrostruktur von Calciumphosphatkeramiken haben großen Einfluss auf die Proliferation und Ausbreitung der Osteoblasten auf den Materialien (Barrère et al. 2006, Rizzi et al. 2001). Wiedmann-Al-Ahmad et al. analysierten mit Hilfe der ESEM das Proliferationsverhalten von osteoblast-like cells auf 16 resorbierbaren Biomaterialien mit unterschiedlicher Oberflächengestaltung und chemischer Zusammensetzung. Auf porös gestalteten Biomaterialien präsentierten sich die Zellen überwiegend vollständig intakt, flach aufliegend und mit hoher Kolonisationsdichte. Zellen, die auf Materialien mit glatten Oberflächen und wenig sowie kleinen Poren kultiviert wurden, wiesen hingegen ein schlechtes Proliferationsverhalten auf. Die Autoren machten dafür die Oberflächengestaltung verantwortlich, die eine primäre Anheftung der Zellen nur eingeschränkt zuließ (Wiedmann-Al-Ahmad et al. 2005). ESEM Untersuchungen der Arbeitsgruppe Rizzi et al. konnten 2001 ebenfalls zeigen, dass Osteoblasten vor allem poröse Materialoberflächen mit Poren von 10 µm bevorzugt bewachsen (Rizzi et al. 2001).

Auch diese Arbeit kann bestätigen, dass die Anheftung und Ausbreitung der Zellen auf den Materialien durch die Oberflächengestaltung beeinflusst wird. Die Zelleiber der Osteoblasten legten sich auf glatte Flächen flach auf. Stark unregelmäßige und zerklüftete Bereiche wurden dagegen vermieden. Es kann bekräftigt werden, dass die Osteoblasten überwiegend die porösen Bereiche der Materialoberflächen favorisiert besiedeln. Die Ausbildung der dafür notwendigen Zellausläufer spielte für das Anheften der Zellen an der porösen Oberfläche der Materialien eine bedeutende Rolle. Dabei wurde die in der Übersichtsarbeit von Barrère et al. 2006 und in der

Laserscanninguntersuchung von Annaz et al. 2004 beschriebene Fähigkeit der Osteoblasten, die Oberflächenporosität zu deuten und sich den entsprechenden Verhältnissen anzupassen, deutlich (Barrère et al. 2006, Annaz et al. 2004).

Es muss jedoch die primäre Zelladhäsion von der späteren Ausbreitung der Zellen auf den Biomaterialien klar abgegrenzt werden. Untersuchungen zeigen, dass Materialien mit guter Zelladhäsion nicht unbedingt die Ausbreitung und spätere Proliferation und Differenzierung der Zellen fördern (Mayer et al. 1993). Gerade resorbierbare Materialien, deren Oberflächenstrukturen sich ständig im Wandel befinden, sind im Verlauf der Zellproliferation und Differenzierung hinsichtlich einer stabilen Oberfläche kritisch zu betrachten (Rizzi et al. 2001).

Für alle getesteten Materialien können die konfokale Lasermikroskopie und die ESEM Untersuchung eine sehr gute primäre Zelladhäsion attestieren. Die Bewuchsversuche mit anschließender Zellauszählung belegen eine regelmäßige Ausbreitung mit suffizienter Proliferation der Zellen auf den getesteten Materialien für die ersten 19 Tage. Insgesamt lässt sich für die Biokompatibilität aller Materialien keine Zytotoxizität mittels Zellkultur nachweisen.

Als bioaktive Biomaterialien nehmen Calciumphosphate positiv Einfluss auf die osteogene Gewebedifferenzierung, die in die Phasen Zellproliferation, Zellreifung und Mineralisationsphase unterteilt wird (Barrère et al. 2006). In diesen Phasen produzieren und sezernieren Osteoblasten in unterschiedlich starker Konzentration spezifisch Typ I Kollagen, alkalische Phosphatase und andere Knochenmatrixproteine wie Osteocalcin, Osteopontin, Osteonectin und Sialoprotein. Ein früher Marker der osteoblastären Aktivität und osteogenen Differenzierung ist die alkalische Phosphatase. Osteocalcin und Sialoprotein lassen sich später während der Mineralisationsphase nachweisen. Osteonectin ist an der Regulierung der Osteoblastenproliferation beteiligt (Barrère et al. 2006, Wang et al. 2004, Behrens et al. 2000).

Eine quantitative Bestimmung charakteristischer Knochenmatrixproteine und entsprechender mRNA Moleküle der auf den verschiedenen Biomaterialien kultivierten Osteoblasten ermöglicht die Gewinnung von Informationen über die Effekte der Biomaterialien auf die osteoblastische Zelldifferenzierung (Zreiqat et al. 1999). Zur weiterführenden Untersuchung und Ermittlung des Potentials, Knochenneubildung zu induzieren, ist eine Analyse der 4 calciumphosphathaltigen Keramiken mit Hilfe solcher In-vitro-Untersuchungen unumgänglich.

6. Zusammenfassung

Zur Optimierung der Osteointegration werden bioaktive calciumphosphathaltige Keramiken, insbesondere Hydroxylapatit, als Beschichtung für metallische Implantate verwendet.

Das bekannte langzeitstabile Hydroxylapatit kann über den gesamten Implantationszeitraum eine Osteointegration sicherstellen. Einen direkten Verbund zwischen Metallfläche und Knochen zur verbesserten Anpassung an mechanischen Belastungen ist damit aber nicht gewährleistet.

Neue schnell resorbierbare Materialien sollen mit der Voraussetzung höherer bioaktiver Fähigkeiten und gleichzeitiger Degradation den Knochen direkt an die Metallfläche heranführen. Die Untersuchung der Biokompatibilität von drei schnell resorbierbaren calciumphosphathaltigen Biokeramiken und vom Referenzmaterial β -TCP wurde in der Zellkultur mittels der Zellkulturlinie MG63 und primären humanen Osteoblasten durchgeführt. Die Materialien, die sich in kristalliner Zusammensetzung und Resorbierbarkeit unterschieden, wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf Zellproliferation und Zellmorphologie getestet. Dies beinhaltete Bewuchsversuche mit anschließender Zellauszählung, konfokale Lasermikroskopie und ESEM-Untersuchungen. Zur Bestimmung der basalen Zelltoxizität wurde der MTT Test genutzt.

Es zeigte sich für alle Materialien keine basale Zytotoxizität im MTT-Test. Die Auswertung des Proliferationsverhaltens der humanen Osteoblasten ergab keine deutlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Substanzen. Die Materialien 602020 und GB14 setzten in den ersten Tagen den größten Proliferationsreiz. Das unterschiedliche Lösungsverhalten der beiden Phasen des Materials 305020 lässt erst in der zweiten Hälfte der Kultivierung eine zunehmende Proliferation der Zellen zu.

Die Analyse des Besiedlungsverhaltens mit Hilfe der ESEM und konfokalen Lasermikroskopie ergab nach 24 h und 96 h eine weitaus identische Besiedlungsarchitektur mit kräftigen Zelladhäsionen sowie eng miteinander kommunizierender Zellen auf allen Materialien.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der In-vitro-Tests auf Zellkulturebene, dass alle Materialien mit hoher bioaktiver Fähigkeit als Beschichtungsmaterial geeignet sind.

Die Frage nach einer guten Knochenintegration in Abhängigkeit eines Gleichgewichts zwischen Knochenneubildung und Degradation muss in weiteren In-vivo-Untersuchungen geklärt werden.

7. Literaturverzeichnis:

1. Amling M, Takeda S, Karsenty G: A neuro (endo)crine regulation of bone remodeling. *Bioessays* 22 (2000) 970-975
2. Annaz B, Hing KA, Kayser M, et al.: Porosity variation in hydroxyapatite and osteoblast morphology: a scanning electron microscopy study. *J Microsc* 215 (2004) 100–10
3. Anselme K, Sharrock P, Hardouin P, et al.: In vitro growth of human adult bone-derived cells on hydroxyapatite plasma-sprayed coatings. *J Biomed Mater Res* 34 (1997) 247–59
4. Anselme K, Bigerelle M, Loison I, et al.: Kinetic study of the expression of beta-catenin, actin and vinculin during osteoblastic adhesion on grooved titanium substrates. *Biomed Mater Eng* 14 (2004) 545-556
5. Bank U, Reinhold D, Ansorge S: [Measurement of cellular activity with the MTT test. Optimization of the method]. *Allerg Immunol (Leipz)* 37 (1991) 119-123
6. Barrère F, van Blitterswijk CA, de GK: Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int J Nanomedicine* 1 (2006) 317-332
7. Baschong W, Lambrecht J Th: Einfluss der Implantatoberfläche auf die osteogene Frühphase in vitro. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 114 (2004) 792-799
8. Behrens P, Wolf E, Bruns J: [In vitro culture of human autologous osteoblast cells on natural bone mineral]. *Orthopade* 29 (2000) 129-134
9. Berstein A, Bernauer I, Marx R, et al.: Human cell culture studies with dental metallic materials. *Biomaterials* 13(2) (1992) 98-100
10. Bob A, Bob K: *Duale Reihe Anatomie*. 1. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2007
11. Bolander ME: Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med* 200 (1992) 165-170
12. Boskey AL, Posner AS: Bone structure, composition, and mineralization. *Orthop Clin North Am* 15 (1984) 597-612
13. Browne RM, Tyas MJ: Biological testing of dental restorative materials in vitro-a review. *J Oral Rehabil* 6(4) (1979) 365-374
14. Bucher O, Wartenberg H: *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. 12. Auflage. Hans Huber Verlag, Bern, 1997
15. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, et al.: Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect* 45 (1996) 371-386

16. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, et al.: Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *Instr Course Lect* 45 (1996) 387-399
17. Byers HR, White GE, Fujiwara K: Organization and function of stress fibers in cells in vitro and in situ. A review. *Cell Muscle Motil* 5 (1984) 83-137
18. Carinci F, Pezzetti F, Volinia S, et al.: Zirconium oxide: analysis of MG63 osteoblast-like cell response by means of a microarray technology. *Biomaterials* 25 (2004) 215-228
19. Caughman WF, Caughman GB, Dominy WT, et al.: Glass ionomer and composite resin cements: effects on oral cells. *J Prosthet Dent* 63(5) (1990) 513-521
20. Chao EY, Inoue N: Biophysical stimulation of bone fracture repair, regeneration and remodelling. *Eur Cell Mater* 6 (2003) 72-84
21. Chou YF, Huang WB, Dunn JCY, et al.: The effect of biomimetic apatite structure on osteoblast viability, proliferation, and gene expression. *Biomaterials* 26 (2005) 285-295
22. Coathup MJ, Blunn GW, Flynn N, et al.: A comparison of bone remodelling around hydroxyapatite-coated, porous-coated and grit-blasted hip replacements retrieved at post-mortem. *J Bone Joint Surg Br* 83 (2001) 118-123
23. Debrunner AM: *Orthopädische Chirurgie*. 4. Auflage. Hans Huber Verlag, Bern, 2002
24. de Bruijn JD, Bovell YP, van Blitterswijk CA: Structural arrangements at the interface between plasma sprayed calcium phosphates and bone. *Biomaterials* 15 (1994) 543-550
25. de Bruijn JD, Davies JE, Klein CPAT, et al.: Biological responses to calcium phosphate ceramics. *Bone bonding biomaterials*. Ducheyne P, Kokubo T, van Blitterswijk CA (eds). Leiden: Reed Healthcare Communications (1992) 57-72
26. Donald AM: The use of environmental scanning electron microscopy for imaging wet and insulating materials. *Nat Mater* 2 (2003) 511-516
27. Dorozhkin SV, Epple M: Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten. *Angew Chem* 114 (2002) 3260-3277
28. Gregoire M, Orly I, Kerebel LM, et al.: In vitro effects of calcium phosphate biomaterials on fibroblastic cell behavior. *Biol Cell* 59(3) (1987) 255-260
29. Grégoire M, Orly I, Menanteau J: The influence of calcium phosphate biomaterials on human bone cell activities. An in vitro approach. *J Biomed Mater Res* 24(2) (1990) 165-177
30. Harmand MF, Naji R, Jeandot R, et al.: Cytocompatibility study of cobaltchromium alloys using human cell cultures. *Advances in Biomaterials* 9 (1990) 19-24
31. Hench LL: Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceram Soc* 74(7) (1991) 1487-1510

32. Hyakuna K, Yamamuro T, Kotoura Y, et al.: The influence of calcium phosphate ceramics and glass-ceramics on cultured cells and their surrounding media. *J Biomed Mater Res.* 23 (1989) 1049-1066
33. Ignatius A, Schmidt C, Kaspar D, et al.: In vitro biocompatibility of resorbable experimental glass ceramics for bone substitutes. *J Biomed Mater Res* 55(3) (2001) 285-294
34. Invitrogen: Molecular Probes: Phallotoxins. Product information and Usage instructions (2006) 1-6
35. Ishikaw K, Miyamoto Y, Yuasa T, et al.: Fabrication of Zn containing apatite cement and its initial evaluation using human osteoblastic cells. *Biomaterials* 23 (2002) 423–508
36. Jaffe WL, Scott DF: Total hip arthroplasty with hydroxyapatite-coated prostheses. *J Bone Joint Surg Am* 78 (1996) 1918-1934
37. Jansen JA, van der Waerden JP, de Groot K: Fibroblast and epithelial cell interactions with surface-treated implant materials. *Biomaterials* 12(1) (1991) 25-31
38. Janssen J, Laatz W: Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows. 4. Auflage. Springer Berlin-Heidelberg, 2003
39. Jerosch J, Bader A, Uhr G: Knochen Curasan Taschenatlas spezial. 1.Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2002
40. Junqueira LC, Carneiro J: Histologie. 3. Auflage. Springer, Berlin-Heidelberg, 1991, S.190-217
41. Khor KA, Li H, Cheang P: Processing-microstructure-property relations in HVOF sprayed calcium phosphate based bioceramic coatings. *Biomaterials* 24 (2003) 2233-2243
42. Knabe C, Berger G, Gildenhaar R, et al.: The functional expression of human bone-derived cells grown on rapidly resorbable calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 25 (2004) 335-344
43. Knabe C, Berger G, Gildenhaar R, et al.: The modulation of osteogenesis in vitro by calcium titanium phosphate coatings. *Biomaterials* 25 (2004) 4911-4919
44. Kornak U, Delling G, Mundlos S: Molekulare Mechanismen der Regulation der Knochendichte durch Osteoklasten. *Deutsches Ärzteblatt* 100(19) (2003) 1258-1268
45. Kotoura Y, Yamamuro T, Shikata J, et al.: A method for toxicological evaluation of biomaterials based on colony formation of V79 cells. *Arch Orthop Trauma Surg.* 104 (1985) 15-19
46. Koutsoukos P, Amjad Z, Tomson MB, et al.: Crystallization of calcium phosphates. A constant composition study. *J. Am. Chem. Soc* 102 (1980) 1553-1557

47. Langstaff S, Sayer M, Smith TJ, et al.: Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates. Part I: rational design, sample preparation and material characterization. *Biomaterials* 20 (1999) 1727-1741
48. Lees RL, Heersche JN: Differences in regulation of pH(i) in large (≥ 10 nuclei) and small (≤ 5 nuclei) osteoclasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 279 (2000) C751-C761
49. Lind M, Overgaard S, Bunger C, et al.: Improved bone anchorage of hydroxyapatite coated implants compared with tricalcium-phosphate coated implants in trabecular bone in dogs. *Biomaterials* 20 (1999) 803-808
50. Lintner F, Böhm G, Huber M, et al.: Ist nach Verlust der Hydroxylapatitbeschichtung bei totalen Hüftendoprothesen nach mehrjähriger Liegezeit eine Knochenneubesiedlung der Titanlegierungsoberfläche möglich? *Osteologie* 10(1) (2001) 40-53
51. Liu DM: Fabrication of hydroxyapatite ceramic with controlled porosity. *Journal of materials science in medicine* 8 (1997) 227-232
52. Martin RB, Barr DB: Structure, function, and adaptation of compact bone. New York Raven Press (1989) 124-125
53. Mayer U, Szulczewski DH, Moeller K, et al.: Attachment kinetics and differentiation of osteoblasts on different biomaterial surfaces. *Cells and Mat* 3 (1993) 129-140
54. Millette CF: Medical microscopic anatomy: CBNS 602. 2000 (zitiert vom 23.05.2009). http://millette.med.sc.edu/Lab%20%20pages/bone_and_bone_forma.htm
55. Mohan S, Baylink DJ: Bone growth factors. *Clin Orthop Relat Res* (1991) 30-48
56. Muscariello L, Rosso F, Marino G, et al.: A critical overview of ESEM applications in the biological field. *J Cell Physiol* 205 (2005) 328-334
57. Naji A, Harmand MF: Study of the effect of the surface state on the cytocompatibility of a Co-Cr alloy using human osteoblasts and fibroblasts. *J Biomed Mater Res* 24(7) (1990) 861-871
58. Neumüller OA: Römpps Chemielexikon. 8. Auflage. Franckh, Stuttgart, 1979
59. Ng KW, Romas E, Donnan L, et al.: Bone biology. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 11 (1997) 1-22
60. Niederauer GG, McGee TD, Keller JC, Zaharias RS: Attachment of epithelial cells and fibroblasts to ceramic materials. *Biomaterials* 15(5) (1994) 342-352
61. Nijweide PJ, Burger EH, Feyen JHM: Cells of bone: proliferation, differentiation, and hormonal regulation. *Physiol Rev* 66(4) (1986 Oct) 855-872

-
62. Nöbel D: Untersuchungen zur Osteointegration und Resorbierbarkeit von Implantatbeschichtungen für den Knochenersatz [Dissertation]. Leipzig: Universität Leipzig (2006)
 63. Osborn JF: Biowerkstoffe und ihre Anwendung bei Implantaten. Schweiz Monatsschr Zahnheilk 89 (1979) 1138-1139
 64. Osborn JF: The biological profile of hydroxyapatite ceramic with respect to the cellular dynamics of animal and human soft tissue and mineralized tissue under unloaded and loaded conditions, In: Barbosa MA Ed: Biomaterials degradation. Elsevier Science Publishers B.V., 1991, S.185-225.
 65. Osborn JF: Physiologische Verankerung von belasteten Endoprothesen durch Verbundsosteogenese – Ergebnisse humanhistologischer Auswertung hydroxalapatitbeschichteter Titanschäfte, In: Willert HG and Heuck FHW Eds: Neuere Ergebnisse in der Osteologie. Springer, Heidelberg, 1989, S. 358-364
 66. Parfitt AM: Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. J Cell Biochem 55 (1994) 273-286
 67. Picker HU, Arps H, Köhler St, Berger G: Zytotoxizitätsprüfungen von resorbierbaren glaskeramischen Knochenersatzmaterialien. Z Zahnärztl Implantol IX. (1993) 111-116
 68. Piconi C, Maccauro G: Zirconia as a ceramic biomaterial. Biomaterials 20 (1999) 1-25
 69. Pizzoferrato A, Vespucci A, Ciapetti G, et al.: Biocompatibility testing of prosthetic implant materials by cell cultures. Biomaterials 6(5) (1985) 346-51
 70. Puleo DA, Holleran LA, Doremus RH, et al.: Osteoblast responses to orthopaedic implant materials in vitro. J Biomed Mater Res 25(6) (1991) 711-723
 71. Puleo DA, Bizios R: Formation of focal contacts by osteoblasts cultured on orthopedic biomaterials. J Biomed Mater Res 26 (1992) 291-301
 72. Redey SA, Nardin M, Bernache-Assolant D, et al.: Behavior of human osteoblastic cells on stoichiometric hydroxyapatite and type A carbonate apatite: role of surface energy. J Biomed Mater Res 50 (2000) 353-364
 73. Rizzi SC, Heath DJ, Coombes AG, et al.: J Biodegradable polymer/hydroxyapatite composites: surface analysis and initial attachment of human osteoblasts. Biomed Mater Res 55(4) (2001 Jun 15) 475-486
 74. Rueger JM: [Bone substitution materials. Current status and prospects]. Orthopade 27 (1998) 72-79
 75. Sajonski H, Smollich A: Zelle und Gewebe. 7. Auflage. Hirzel Verlag, Leipzig, 1990

-
76. Sato M: Cellular and Molecular Biomechanics. 2007 (zitiert vom 08.02.2007) S.1-8.
<http://www.fmbe.coe.tohoku.ac.jp/studies/cfmo/msato-en.html>
77. Schenk RK: Die Histologie der primären Knochenheilung im Lichte neuer Konzeptionen über den Knochenumbau. *Unfallheilkunde* 81 (1978) 219-227
78. Schenk RK: Bone response to grafts and implants. In: Lin OCC, Chao EYS, editors. *Perspectives on biomaterials, materials science monographs 33*. Taipei(Taiwan): Elsevier; 1986.p.121-36.
79. Schenk RK, Willenegger HR: Zur Histologie der primären Knochenheilung. Modifikationen und Grenzen der Spaltheilung in Abhängigkeit von der Defektgröße. *Unfallheilkunde* 80 (1977) 155-160
80. Schiebler TH: *Anatomie*. 9. Auflage. Springer, Berlin-Heidelberg, 2005
81. Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K: *Anatomie*. 8.Auflage. Springer, Berlin-Heidelberg, 1999
82. Schilling AF, Linhart W, Filke S, Gebauer M, Schinke T, Rueger JM, Amling M: Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts. *Biomaterials* 25(18) (2004) 3963-3972
83. Schmidt C, Ignatius AA, Claes LE: Proliferation and differentiation parameters of human osteoblasts on titanium and steel surfaces. *J Biomed Mater Res* 54 (2001) 209-215
84. Schnürer SM, Gopp U, Kuhn KD, et al.: Knochenersatzwerkstoffe. *Orthopäde* 32 (2003) 2-10
85. Silva RV, Camilli JA, Bertran CA, et al.: The use of hydroxyapatite and autogenous cancellous bone grafts to repair bone defects in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 34 (2005) 178-184
86. Silver IA, Deas J, Erecinska M: Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: effects of 45S5 Bioglass, and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability. *Biomaterials* 22 (2001) 175-185
87. Simmons DJ: Fracture healing perspectives. *Clin Orthop Relat Res* (1985) 100-113
88. Søballe K: Hydroxyapatite ceramic coating for bone implant fixation. Mechanical and histological studies in dogs. *Acta Orthop Scand* 64(Suppl 255) (1993) 1-58
89. Stürmer KM: Pathophysiologie der gestörten Knochenheilung. *Orthopäde* 25 (1996) 386-393
90. Sun JS, Tsuang YH, Liao CJ, et al.: The effects of calcium phosphate particles on the growth of osteoblasts. *J Biomed Mater Res*. 37 (1997) 324-334

91. Tadic D, Epple M: A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials* 25 (2004) 987-994
92. Teitelbaum SL: Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol* 170 (2007) 427-435
93. Thian ES, Huang J, Best SM, et al.: Magnetron co-sputtered silicon-containing hydroxyapatite thin films—an in vitro study. *Biomaterials* 26 (2005) 2947–2956
94. Tonino AJ, Thérin M, Doyle C: Hydroxyapatite-coated femoral stems. *Journal of Bone and Joint Surgery* 81-B (1999) 148-154
95. Wang C, Duan Y, Markovic B, et al.: Phenotypic expression of bone-related genes in osteoblasts grown on calcium phosphate ceramics with different phase compositions. *Biomaterials* 25 (2004) 2507-2514.
96. Wang C, Duan Y, Markovic B, et al.: Proliferation and bone-related gene expression of osteoblasts grown on hydroxyapatite ceramics sintered at different temperature. *Biomaterials* 25 (2004) 2949-2956
97. Watanabe H, Miake K, Sasaki J: Immunohistochemical study of the cytoskeleton of osteoblasts in the rat calvaria. Intermediate filaments and microfilaments as demonstrated by detergent perfusion. *Acta Anat (Basel)* 147 (1993) 14-23
98. Wiedmann-Al-Ahmad M, Gutwald R, Gellrich NC, et al.: Search for ideal biomaterials to cultivate human osteoblast-like cells for reconstructive surgery. *J Mater Sci Mater Med* 16 (2005) 57-66
99. Wilke A, Wanner F, Traub F, et al.: Biokompatibilitätstestung orthopädischer Werkstoffe in vitro. Eine kritische Literaturübersicht. Teil III: Keramiken. *Osteologie* 3 (2002) 178-203
100. Willmann G: Beschichtung von Implantaten mit Hydroxylapatit: Die Option auf eine stoffschlüssige Verbindung zwischen Knochen und Metall. *Mat.-wiss.u.Werkstofftechn* 30 (1999) 317-325
101. Wintermantel E, Ha SW: Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen, Implantate für Medizin und Umwelt. 2.Auflage. Springer, Berlin-Heidelberg, 1998
102. Wolff J: Das Gesetz der Transformation des Knochens. Hirschwald, Berlin, 1892
103. Zhu X, Chen J, Scheideler L, et al.: Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses. *Biomaterials* 25 (2004) 4087-4103
104. Zreiqat H, Howlett CR: Titanium substrata composition influences osteoblastic phenotype: In vitro study. *J Biomed Mater Res.* 47 (1999) 360-366

8. Thesen:

1. Calciumphosphathaltige Keramiken sollen schnell resorbierbar sein und den Knochen direkt an die Metalloberfläche heranführen, um ein späteres Ablösen oder Abplatzen der Beschichtung von der metallischen Komponente und eine Lockerung der Prothese vorzubeugen.
2. Bei einem Ungleichgewicht zwischen Bioaktivität und Resorbierbarkeit des Materials besteht die Gefahr eines zu schnellen Substanzverlustes, der eine Schwäche der Implantatverankerung zur Folge hat.
3. Es muss nach schnell resorbierbaren Implantatbeschichtungen gesucht werden, die eine Balance zwischen Substanzverlust und Osteointegration gewährleisten.
4. Alle getesteten schnell resorbierbaren Materialien zeigen keine zytotoxische Reaktion im MTT-Test.
5. Die Abgabe von Calcium und Phosphat aus den Keramiken in das Medium führt zu einer gesteigerten Proliferation von Osteoblasten.
6. Unter Einbeziehung der Resultate des Referenzmaterials β -TCP besitzen alle getesteten Materialien in der Frühphase der Osteointegration eine sehr gute Biokompatibilität.
7. Die resorbierbaren Keramiken zeigen auf zellulärer Ebene eine hohe bioaktive Fähigkeit.
8. Poröse Materialoberflächen fördern die Adhäsion und Ausbreitung der Osteoblasten.
9. Ergebnisse von In-vitro-Untersuchungen im Bereich der Biomaterialtestung lassen sich nur eingeschränkt miteinander vergleichen.

10. Im Bereich der Testung von Biomaterialien auf zellulärer Ebene fordert es die Anwendung von Zellkulturen, die später in-vivo definitiv in Kontakt mit den getesteten Materialien treten.

11. Zur weiterführenden Ermittlung des Potentials der vier calciumphosphathaltigen Keramiken, Knochenneubildung zu induzieren, ist eine quantitative Bestimmung charakteristischer Knochenmatrixproteine und entsprechender mRNA Moleküle unumgänglich.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 11.06.1980

Geburtsort: Halle

Familienstand: ledig

Schulbildung

1987 – 1991	Grundschule „Frohe Zukunft“, Halle
1991 – 1997	Thomas-Müntzer-Gymnasium, Halle
1997 – 1998	Colorado Springs School in Colorado Springs, Colorado (USA)
1998 – 2000	Abitur am Thomas-Müntzer-Gymnasium, Halle

Zivildienst

2000 – 2001	Universitätsklinik und Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
-------------	--

Studium

2001	Aufnahme des Medizinstudiums an der Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg
2003	erfolgreich bestandene Ärztliche Vorprüfung
2007	erfolgreich bestandene Ärztliche Prüfung

Berufliche Tätigkeit

seit Jan.2008	Assistenzarzt an der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Sept. 2008 – Feb.2009	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am AO Development Institute, Davos (Schweiz)

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig angefertigt habe und versichere, dass ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Halle, 25.05.2009

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'F. Radetzki', with a small horizontal line at the end.

Florian Radetzki

ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE PROMOTIONSVERSUCHE

Hiermit erkläre ich, dass es keine früheren Promotionsversuche gab, weder mit dieser Arbeit noch mit einer anderen, weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch an einer anderen Universität.

Halle, 25.05.2009

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'F. Radetzki', with a horizontal line extending to the right.

Florian Radetzki

Danksagung

Ich möchte mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. med. habil W. Hein für das Ermöglichen einer erfolgreichen Umsetzung dieser Arbeit.

Frau PD Dr. Anke Bernstein für die Überlassung des Themas und die hervorragende Unterstützung sowie geduldige Betreuung der Arbeit.

Dem Laborteam Frau Angela Rosemeier und Frau Cornelia Vetter. Vielen Dank für Ihre Hilfe und die guten Ratschläge bei den Laborarbeiten.

Der Projektgruppe „Biowerkstoffe und Implantate“ der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung für die Bereitstellung der Materialien.

Herrn Dr. rer. nat. D. Glanz für die hervorragende Zusammenarbeit sowie großzügige Hilfestellung bei den Laserscanning Versuchen.

Herrn Dr. rer. nat. S. Henning und Herrn F. Syrowatka für die zeitaufwendigen ESEM Aufnahmen und die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Auswertung.

Herrn Dr. med. T. Mendel für die zahlreichen und wertvollen Hinweise vor allem am Ende der Arbeit.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, Geschwistern und Sophie, für den Beistand in allen Lebenslagen während des Studiums und der Doktorarbeit. Vielen Dank für Euer Verständnis, Eure Geduld und Euer in mich gesetztes Vertrauen. Ohne Eure Unterstützung wäre die Anfertigung dieser Arbeit nie möglich gewesen.