

**Experimentelle Untersuchung zur
Biokompatibilität offenporiger, metallischer
Implantatstrukturen mit biologischer Reaktionsschicht
unter besonderer Berücksichtigung des
Knochenabbaus**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Katharina Lücke
geb. Viehoff
aus Gelnhausen
Troisdorf 2016

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Klinikdirektor: Univ.-Prof. Dr. Christian Heiß

Betreuer: Prof. hc. Dr. Dr. Dr. hc. Reinhard Schnettler

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. Bernd Gallhofer

Gutachter: Prof. Dr. Christian Melzer

Tag der Disputation:

06.10.2016

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung und Fragestellung | 1 |
| 2 | Remodellierung des Knochengewebes | 3 |
| 2.1 | Knochenwachstum und Knochenumbau | 4 |
| 2.2 | Regulierung der Osteogenese | 6 |
| 3 | Frakturheilung | 8 |
| 4 | Anspruch an Knochenersatzmaterialien | 11 |
| 5 | Übersicht verschiedener Knochenersatzmaterialien | 13 |
| 5.1 | Anforderungen an das Implantatmaterial und seine Form | 16 |
| 6 | Material und Methoden | 18 |
| 6.1 | Versuchstiere | 18 |
| 6.2 | Herstellungsverfahren der Implantate und Reaktionsschicht | 20 |
| 6.3 | Narkose, Operationsverfahren und Nachbehandlung | 25 |
| 6.4 | Polychrome Sequenzmarkierung während der Standzeit | 28 |
| 6.5 | Perfusion, Euthanasie und Explantation | 29 |
| 6.6 | Aufbereitung der Proben, Schliffherstellung und -färbung | 32 |
| 6.7 | Standardfärbung, TRAP-Färbung und Histomorphometrie | 34 |
| 6.8 | Histomorphometrische Auswertung der Fluoreszenz-Markierung | 41 |
| 6.9 | Rasterelektronen- und Transmissionselektronenmikroskopie | 44 |
| 6.10 | Qualitative und quantitative PCR | 45 |
| 6.11 | Biomechanik | 55 |
| 6.12 | Statistische Auswertung | 58 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| 7 | Ergebnisse | 59 |
| 7.1 | Makroskopische Befunde | 59 |
| 7.2 | Histologische Befunde | 61 |
| 7.21 | Toluidinblau | 62 |
| 7.3 | Calcein-Grün-Fluoreszenz | 63 |
| 7.4 | Tartrat-resistente Saure Phosphatase | 67 |
| 7.5 | Elektronenmikroskopie (REM) | 69 |
| 7.6 | Molekularbiologie (PCR), relative Expression Cathepsin-K | 70 |
| 7.7 | Biomechanik | 73 |
| 8 | Diskussion | 75 |
| 9 | Zusammenfassung | 87 |
| 10 | Summary | 89 |
| 11 | Verzeichnisse | 90 |
| 11.1 | Abkürzungsverzeichnis | 90 |
| 11.2 | Literaturverzeichnis | 92 |
| 11.3 | Abbildungsverzeichnis | 98 |
| 11.4 | Tabellenverzeichnis | 101 |
| 12 | Poster-Veröffentlichung | 103 |
| 12.1 | Abstract | 103 |
| 12.2 | Poster | 105 |
| 13 | Ehrenwörtliche Erklärung | 106 |
| 14 | Danksagung | 107 |
| 15 | Lebenslauf | 109 |
| 16 | Anhang mit Tierversuchsgenehmigung | 111 |

1 Einleitung und Fragestellung

„Das menschliche Skelett besteht aus mehr als 200 einzelnen Knochen, die jeweils eine spezifische Gestalt und Größe besitzen und in charakteristischer Weise zueinander angeordnet sind.“ [Vortkamp A. 2003, Apr].

In Zahlen ausgedrückt bedeutet das zum Beispiel, dass der Femur eines erwachsenen Menschen eine auf ihn einwirkende Kraft von bis zu 15000N aushalten kann, wobei die Belastungsfähigkeit des Knochengewebes wesentlich von der intraossären Architektur und der belasteten Durchschnittsfläche abhängt [Friedl W, Clausen J. 2001, Nov].

Möchte man also nachvollziehen, weshalb ein Gewebe derartig große Kräfte aushalten kann, obwohl es einem von verschiedenen Faktoren abhängigem Stoffwechselgeschehen unterworfen ist, so muss man sich vor Augen führen, wie sich in diesem Fall das Knochengewebe zusammensetzt, von welchen Einflüssen es verändert wird und wie es bei veränderten Anforderungen oder Frakturen Wege entwickelt hat, sich auf die entsprechenden Anforderungen anzupassen und zu regenerieren.

In der im Folgenden beschriebenen experimentellen Studie wurde der besondere Schwerpunkt auf die Knochenregeneration,- interaktion und –stabilität gelegt und inwiefern diese Aspekte mithilfe offenporiger, metallischer Calcium-Titanat Zylinderimplantate, die mit einer bioaktiven Reaktionsschicht behandelt worden sind, gefördert werden können.

Besonders intensiv wurden dabei die Auswirkungen auf den Knochenabbau hinsichtlich der Makrophagen und Osteoklasten untersucht, um eine möglicherweise überlegene Knochenregeneration und verminderte Implantatlockerung gegenüber unbehandelten Titaniumimplantaten aufzeigen zu können.

Der medizinische und wirtschaftliche Nutzen verbesserter Knochenersatzmaterialien (KEM) als attraktive Alternative zur autologen Knochentransplantation bei Knochendefekten hat initial den Anlass zu weiterführenden Forschungen auf diesem Gebiet der Unfallchirurgie und Orthopädie gegeben.

Darüber hinaus sollen die Knochenersatzmaterialien neben einer guten Biokompatibilität und Stabilität besonders in Defektregionen mit zu erwartender schlechter Knochenneubildung und Vaskularisierung eine gezielte Osteokonduktion und –induktion fördern. Dabei können Knochenersatzmaterialien unter anderem den Vorteil bieten, dass durch die Verwendung künstlichen Materials wie dem Titanium gegenüber Chrom, Nickel oder Kobalt nicht die Gefahr der Antigenität mit einer möglichen Abstoßungsreaktion, Allergie, Entzündungsreaktion oder Krankheitsübertragung besteht [Peters KM, König DP. 2010].

Auch stellt die Interaktion des umliegenden Gewebes mit dem Implantat und die Rekrutierung und Reaktion potenter osteoblastärer Vorläuferzellen mit der Oberfläche des Implantates eine entscheidende Herausforderung an das Material und seine Oberflächenbeschaffenheit [Klein MO et al. 2010].

Nur eine ausreichende Interaktion von KEM und zur Knochenneubildung anzuregendes Umgebungsgewebe mit Ausbildung einer belastungsstabilen Knochenstruktur im Defektbereich gewährleistet ein überlegeneres Ergebnis gegenüber bisherigen KEM. Sowohl das Implantatmaterial als auch die dreidimensionale Beschaffenheit, Oberflächenstruktur und Beschichtung stellen dabei die wichtigsten Faktoren für das Einwachsen von Gefäßen und damit für das Ausmaß der Knochenneubildung und die zu erreichende Defektstabilität dar.

Die Auswahl des Knochenersatzmaterials mit dem besten therapeutischen Benefit wird sich daher auch zukünftig an diesen Faktoren orientieren müssen und damit auch weiterhin die Nachfrage im klinischen Alltag sowie Forschungen auf diesem Gebiet rechtfertigen.

Die nachfolgend durchgeführte experimentelle und wissenschaftliche Untersuchung am Tiermodell beschäftigt sich speziell mit der Frage, ob die mit einer bioaktiven Calcium-Titanat-Reaktionsschicht behandelten metallisch-offenporigen Titanium-Zylinderimplantate einen signifikanten Vorteil gegenüber unbehandelten metallisch-offenporigen Titanium-Zylinderimplantaten beim Defektaufbau in spongiösen knöchernen Arealen besitzen.

Diesbezüglich erhobene Werte und Ergebnisse sind mithilfe histologischer, histomorphometrischer, molekularbiologischer, rasterelektronenmikroskopischer und biomechanischer Untersuchungen zur Osteointegration, Grenzflächenreaktion, Biokompatibilität und Osteokonduktivität untersucht und zwischen den beiden Gruppen verglichen worden. Die so ermittelten Daten erbringen letztendlich ein Resultat, welches sich, bei besonderem Augenmerk auf das Knochenremodeling unter Einsatz beschichteter und unbeschichteter KEM, aus den oben genannten Untersuchungsmethoden zusammensetzt.

2 Remodellierung des Knochengewebes

Der Knochen des Skelettsystems unterliegt verschiedenartigen Anforderungen in Form von Stoffwechselprozessen und äußeren Einflüssen wie zum Beispiel mechanischer Belastung mit der Gefahr der Überlastung und Frakturen als Folge. Auch kleinste Strukturschäden des Knochens, sogenannte *Micro Cracks*, die natürlicherweise belastungs- und bewegungsabhängig im Knochengewebe entstehen, müssen fortlaufend repariert werden und initialisieren die Osteokonduktion [Khosla S et al. 2010]. Ebenso bedarf es nach der primären Knochenheilung eines Umbaus von primär gebildetem Kallusgewebe in belastbares Knochengewebe, welches die Wiederherstellung eines funktionsfähigen Knochens bedeutet und ebenfalls über das Remodeling des Knochens (z.B. Knochenaufbau durch die auf diesem Gewebe einwirkende Belastung) geschieht.

Allein anhand dieses Beispiels wird deutlich, dass Knochen kein starres Konstrukt ist, sondern der Erhalt eines funktionstüchtigen und stabilen Skelettsystems fortlaufend äußeren Einflüssen sowie den Zellen und Mediatoren des Knochenstoffwechsels unterliegt.

Vereinfacht dargestellt bauen dabei die resorptionsfähigen Osteoklasten, während sie in der *sealing zone* durch Integrine mit nur ca. 0,3-0,5nm Abstand adhären an der Knochensubstanz haften, durch Sezernierung proteolytischer Enzyme (Carboanhydrase, ATP-ase, Zytochromoxidasen, Phosphatasen) und Salzsäure die Knochenmatrix über ihre am Knochen anliegende *ruffled border* (resorptionsfähige Zellmembran) extrazellulär ab, wobei sie nach intrazellulär Hydrogencarbonat sezernieren und so das Calcium aus dem Knochen herauslösen und somit so genannte Howship-Lakunen schaffen [DeSelm, CJ et al. 2011].

Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen, die sich laut Boyle et al. aus dem mononukleären Phagozytensystem des Blutes (Makrophagen und Monozyten), mesenchymalen Vorläuferzellen, Osteoblasten, Osteozyten oder auch aus Bindegewebszellen wie den Fibrozyten entwickeln können.

Die Osteozyten sind schließlich mineralisierte, nicht mehr aktiv am Knochenstoffwechsel teilnehmende Osteoblasten, die etwa 90% des Knochens ausmachen, ein dreidimensionales Netzwerk ausbilden und über Canaliculi vor allem Calcium für die Mineralisierung abgeben. Durch z.B. äußere Belastung können sie jedoch die an der Oberfläche adhären Osteoblasten aktivieren [Skerry TM et al. 1989].

Dahingegen synthetisieren und exprimieren z.B. die Osteoblasten Proteine (Proteoglykane, Osteonektin, u.a.) der extrazellulären Matrix und bauen so über

kollagene Osteoidzwischenstufen die Knochenmatrix wieder auf [Helmberg A. et al. 2009]. Das Knochengewebe setzt sich dabei zu 65% aus anorganischen Mineralien wie dem Hydroxylapatit, dem Calciumphosphat und dem Calciumcarbonat zusammen, sowie aus einem geringen Anteil an Calciumfluorid und Magnesiumphosphat und zu 10% aus Wasser. Durch die Auflagerung der Kristalle auf und in die Kollagenfasern entsteht ein dreidimensionales Gittersystem, welches für das stabile Knochengüst verantwortlich ist [Alves RD et al. 2013].

Die gleichermaßen lokale als auch systemische Regulation des Knochenstoffwechsels wird dabei unter anderem von Hormonen wie dem Parathormon, Calcitriol, Schilddrüsenhormonen, *Insulin-like Growth Factor (IGF)* und vielen weiteren Mediatoren beeinflusst und stellt im Idealfall einen ausgewogenen Knochenumbau dar.

Dieses Gleichgewicht verlagert sich zum Beispiel im Wachstum zugunsten des Knochenaufbaus und in der Postmenopause zugunsten der Knochenresorption, um nur zwei Möglichkeiten neben anderen osteoplastischen, osteolytischen oder genetisch bedingten Knochenerkrankungen zu nennen [Hadjidakis DJ, Androulakis II. 2006].

2.1 Knochenwachstum und Knochenumbau

Die Osteogenese von überwiegend kollagenem Geflechtknochen mit anschließender Ossifikation zu kalzifiziertem Lamellenknochen geschieht über unterschiedliche Mechanismen.

Aus embryonalem, undifferenziertem, mesenchyalem Bindegewebe entwickeln sich dabei unter anderem *determined* bzw. *inducible osteogenic precursor cells* (DOPC; IOPC), aus denen sich Prä-Osteoblasten und schließlich Osteoblasten ausdifferenzieren, welche als nicht weiter teilungsfähige Zellen die noch nicht kalzifizierte Knochensubstanz, das sogenannte Osteoid, bilden. In Verbindung mit Calciumphosphat und Fluorid entsteht mit der Zeit eine Hydroxylapatitschicht, die den Knochen stabil und hart werden lässt.

Diejenigen Osteoblasten, die nun vollständig von Knochengewebe umschlossen sind, werden Osteozyten genannt, bleiben jedoch über so genannte *Gap Junctions* (Zell-Zell-Kontakte) miteinander in Verbindung, um Ionen austauschen zu können [Dallas SL et al. 2013]. Unter dem Vorherrschen bestimmter chemischer und physikalischer Reize und unter dem Einfluss bestimmter Wachstumsfaktoren können sich die Osteozyten jedoch wieder in Osteoblasten und Osteoklasten differenzieren.

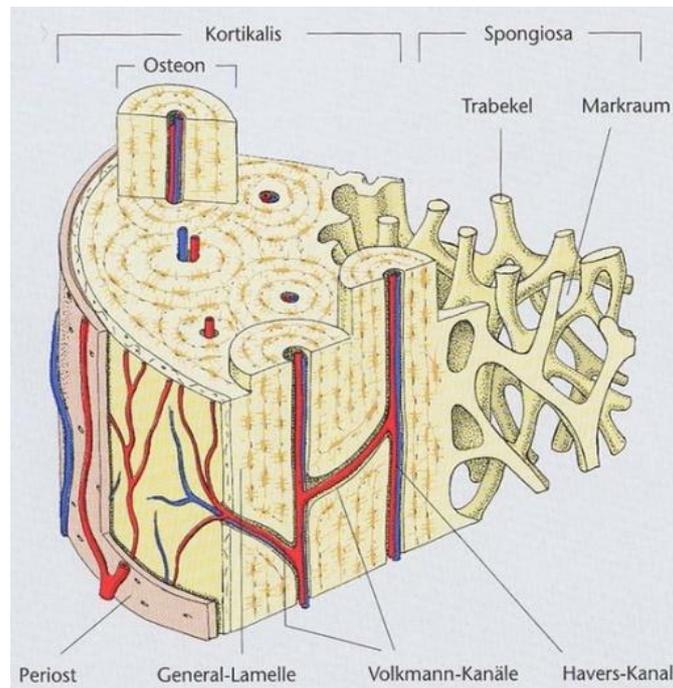


Abb. 2.1: Schematische Darstellung von Lamellenknochen aus Compacta und Knochenmark sowie die Organisation eines einzelnen Osteons mit den versorgenden Gefäßen [aus Trebsdorf M. 2000].

Welche Form der Ossifikation dabei stattfindet, richtet sich nach der zu bildenden Knochenstruktur. Während der überwiegende Anteil des späteren mineralisierten Knochens aus hyalinem Knorpelskelett mittels indirektem, chondralem Knochenwachstums entsteht, entwickeln sich die Kalotte, der Gesichtsknochen und Teile der Clavikula über die bindegewebige Vorstufe der direkten, desmalen Ossifikation.

Durch Anlagerung des Osteoids an diesen Geflechtknochen (hier liegen die Kollagenfibrillen noch als ungeordnete Knochenmatrix vor) entstehen im Laufe der Zeit Knochenspannen, die letztendlich den fertigen Knochen bilden.

Bei der chondralen Ossifikation dagegen entsteht zunächst das knorpelige Primordialskelett, welches erst einmal als Ersatzknochen fungiert.

Die enchondrale, interstitielle Verknöcherung ist dabei für das Längenwachstum zuständig, wobei in den Epiphysenfugen Blutgefäße in den Knochen einwachsen und zugleich den Knorpel abbauende Chondroklasten und neuen Knochen aufbauende Osteoblasten mit einwandern. Durch einen beständigen Auf- und Abbau kommt es so zum Längenwachstum und gleichzeitig zur Entstehung des Markraumes, in dem pluripotente Mesenchymzellen das spätere Knochenmark bilden.

Das appositionelle Dickenwachstum findet dahingegen in den Diaphysen der langen Röhrenknochen statt. Dabei exprimiert das außen am Knorpel gelegene Perichondrium Osteoblasten, welche sich ringförmig zu einer Knochenmanschette ablagern.

In beiden Fällen dient wiederum das von den Osteoblasten synthetisierte und abgegebene Osteoid der Bildung von mineralisiertem Knochen [Celio MR. 2007; Lüllmann-Rauch R. 2006].

Die besondere Struktur des Knochens in eine feste, äußere Substantia Compacta und eine trabekuläre, dreidimensionale innere Substantia Spongiosa bietet dabei den Vorteil, viel an Masse einzusparen und eine große Stabilität zu gewährleisten [Helmberg A. 2009].

2.2 Regulierung der Osteogenese

Die Regulierung des Knochenwachstums unterliegt vielfältigen hormonellen und äußeren Einflüssen, wobei hier beispielhaft einige genannt werden sollen, bei denen besonders die autonome Kontrolle eines gesunden Gleichgewichts im Knochenstoffwechsel im Vordergrund steht.

So zeigt sich unter anderem, dass das aus dem Hypophysenvorderlappen sezernierte Wachstumshormon Somatotropin (STH) die Synthese von Wachstumsfaktoren wie dem IGF induziert und darüber indirekt die Proliferation von Osteoblastenvorläufern und Chondrozyten anregt.

Wiederum der eigens von Osteoblasten sezernierte *Macrophage Colony-stimulating Factor* (M-CSF) induziert die Bildung von Osteoklastenvorläuferzellen [Kohli SS, Kohli VS. 2011].

Besonders das Parathormon (PTH) ist ein entscheidender Regulator in der Osteoblastogenese. So beeinflusst es unter anderem die Transkriptionsfaktoren über eine inhibierende Wirkung der Proteolyse von RUNX-2, welches als transkribierender Faktor für zum Beispiel Osteoblasten an der Knochen- und Knorpeldifferenzierung beteiligt ist. Auch Östrogene können RUNX-2 hingehend einer gesteigerten Osteoblastogenese stimulieren, wie McCarthy et al. (2003) zeigen konnten.

Darüber hinaus haben auch Schilddrüsen-, Nebennierenrinden- und Sexualhormone eine positive Wirkung auf proliferative Zellen des Knochenstoffwechsels, wobei besonders das Sexualhormon Estradiol in der Pubertätsphase eine stimulierende

Wirkung bezüglich des Längenwachstums bei beiden Geschlechtern verursacht [Lüllmann-Rauch R. 2006].

Einen weiteren Effekt übt das Estradiol dabei auf den osteoblasten-ständigen *Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B-Ligand* (RANK-L) aus, der die Fusion mehrkerniger Zellen sowie die Differenzierung und Aktivierung zu Osteoklasten induziert und gleichzeitig die Apoptose hemmt. Das eigens vom Osteoblasten gebildete Osteoprotegerin (OPG) wiederum hemmt durch Bindung an RANK seine Osteoklasten-stimulierende Wirkung und somit den Knochenabbau [Yao Z et al. 2009].

So findet eine Regulierung im Kreislauf des Knochenauf- und abbaus statt und kann an diesen Rezeptoren als Ansatzpunkt bei verschiedenen Knochenerkrankungen dienen. So kann zum Beispiel mithilfe von monoklonalen Antikörpern wie Denosumab eine osteolytische Erkrankung wie die Rheumatoide Arthritis oder Osteoporose dadurch therapiert werden, dass die gesteigerte Aktivität der Osteoklasten, die unter anderem diesen Erkrankungen zugrunde liegt, gehemmt wird [Keck AV et al. 2003].

Auch gäbe es ohne das Vitamin D-Derivat Calcitriol keine über Osteoblasten gesteuerte Mineralisierung des Osteoids und somit keine Umwandlung von Geflecht- zu Lamellenknochen [Holick MF. 1995].

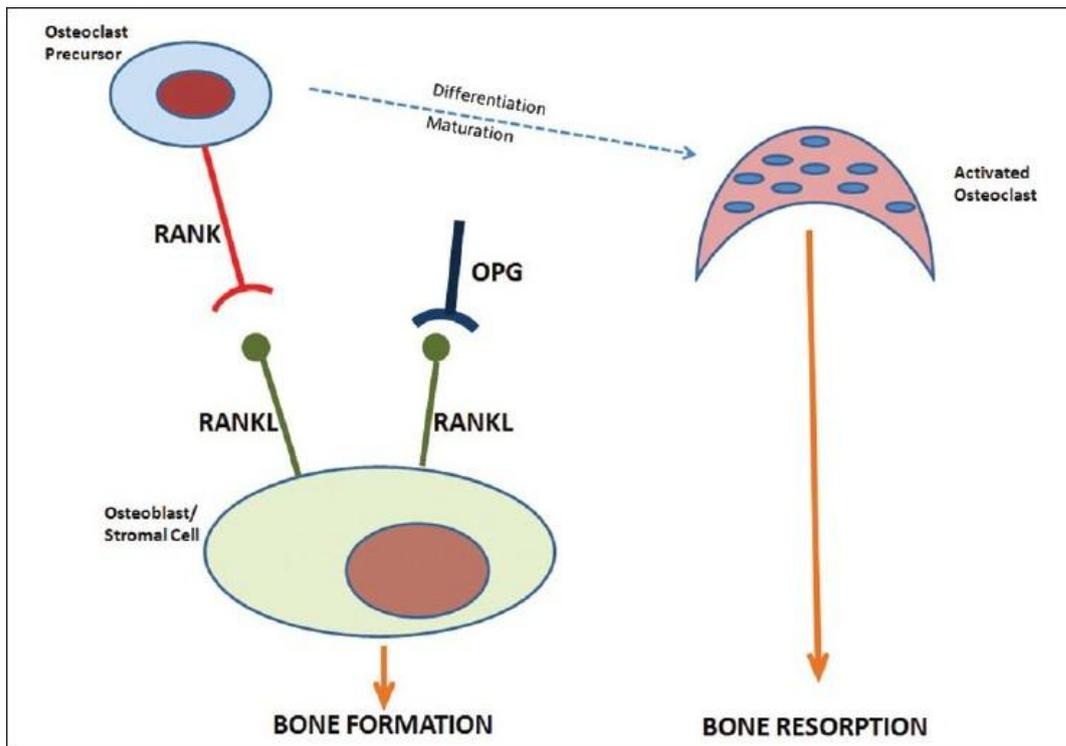


Abb. 2.2: Interaktion von RANKL/OPG im molekularen Komplex. OPG wirkt dabei hemmend auf RANKL und induziert somit die Apoptose reifer Osteoklasten [aus Kohli SS, Kohli VS. 2011].

Auch Zellen des Immunsystems haben einen aktivierenden Einfluss auf die Osteoklasten, welche wiederum durch ihre Fähigkeit Antigene auf ihrer Oberfläche zu präsentieren und damit T-Lymphozyten zu aktivieren, ihrerseits eine Wirkung auf das Immunsystem haben [Dougall WC et al. 1999].

Da die Osteozyten über *gap junctions* mit Osteoblasten in Verbindung stehen und bei sich verändernder Belastung des Knochens untereinander über Botenstoffe das Remodeling beeinflussen können, bietet dieses interzelluläre Kommunikationssystem einen weiteren Ansatzpunkt die Knochenstabilität unterstützende Therapien einschalten zu können. Wird zum Beispiel durch die Verwendung von nanomolekularem Hydroxylapatit das *gap junction*-Protein Connexin 43 gesteigert [Herde K, Wenisch S et al. 2007], oder die durch Scherstress ausgelöste Aktivierung von Osteoblasten und Freisetzung von Alkalischer Phosphatase angeregt, kommt es zu einer aktivierenden Funktion in der Signalkaskade und es wird unter anderem Adenosintriphosphat [ATP] nach extrazellulär sezerniert. ATP als Energieträger sowie Unterstützer des Stoffwechsels, der Wundheilung und schnelleren Regeneration, ist dabei maßgeblich beim Remodeling involviert [Rawadi G et al. 2003].

3. Frakturheilung

Die Knochen-Defekt-Heilung oder auch intramembranöse Osteogenese wird zum einen in die primäre, direkte Frakturheilung (Frakturrenden <200µm), die ohne unter Röntgen-Kontrolle sichtbarer Kallusbildung mithilfe einer optimalen minimalen Instabilität im Frakturspalt bei gleichzeitiger Ruhigstellung in korrekter Frakturreposition eine Wiederherstellung der Knochenstruktur gewährleistet, und zum anderen in die sekundäre Frakturheilung unterteilt, bei der die Knochen-Defekt-Heilung in verschiedenen Phasen abläuft und über eine Organisation des Frakturhämatoms funktioniert [Durst J, Allenberg J-R. 1997].

Bei beiden Formen ist für die Endstabilität des frakturierten Knochenanteils eine schnelle Revaskularisierung und Überbrückung des Frakturspalt mit neuem Knochengewebe von entscheidender Bedeutung, wobei bei der sogenannten Kontaktheilung direkt Osteoblasten und -klasten aus Havers-Kanälen in gegenüberliegende Havers-Kanäle zusammen mit Blutgefäßen einwachsen [Jerosch J. 2002]. Hier soll jedoch lediglich exemplarisch die Knochenheilung anhand der sekundären Frakturheilung aufgezeigt werden.

In der Frakturphase bewirkt die Gewalteinwirkung auf den Knochen, dass das Periost, die Kortikalis, das Knochenmark und je nach Ausmaß der Krafteinwirkung auch das

umliegende Gewebe durchtrennt werden. Dabei bildet sich im Frakturspalt ein Hämatom. Während der nun einsetzenden Blutgerinnung werden aus den α -Granula der an den geschädigten Gefäßwänden sitzenden Thrombozyten Proteine, inflammatorische Zytokine (IL-1 β , IL-6, IL-11 u.a.) und Wachstumsfaktoren wie der Platelet-derived Growth Factor (PDGF) ausgeschüttet und initiieren die intrazelluläre Signalkaskade [Kemkes-Matthes B, Oehler G. 2001].

Unmittelbar nach Entstehung der Fraktur bilden sich in der Entzündungsphase bereits wieder zarte Kapillaren aus und es kommt zu einer vermehrten Ansammlung von Leukozyten, Makrophagen, Mast- und Fresszellen sowie einer Anreicherung von Wachstumsfaktoren und der Induktion von pluripotenten Stammzellen.

Die Phagozytose nekrotischen Gewebes ist dabei maßgeblich von Zellen wie den Makrophagen und Monozyten beeinflusst. Die Stimulierung dieser phagozytierenden Zellen erfolgt dabei über M-CSF-1, TNF- α und PDGF und führt im Verlauf zu einer Autoaktivierung durch die Expression dieser Faktoren [Singer AJ, Clark RA. 1999]. Während die Entzündungsphase in der Regel nach zwei bis drei Tagen abgeschlossen ist und in die Granulationsphase übergeht, kann die gesteigerte Blutversorgung noch sechs Wochen nach Fraktur stark erhöht sein.

In der nächsten Phase organisiert sich im Hämatom des Frakturspalts nach und nach ein Netz aus Kollagen und Fibrin sowie einem fibroblasten-haltigen Granulationsgewebe, welches mit weiteren einsprossenden Kapillaren und eingewanderten Chondrozyten das Hämatom ersetzt. Der somit aus Bindegewebe und Knorpel gebildete weiche Kallus überbrückt damit zunächst bindegewebig die beiden Fraktarenden, während gleichzeitig bereits eine Mineralisierung des Gewebes eingesetzt hat.

Bei der nun folgenden primären Kallusreaktion phagozytieren Osteoklasten die abgestorbenen Zellen beider Fraktarenden, während Chondroblasten einwandern und über die Bildung neuen Osteoids und Anlagerung von Hydroxylapatit eine dem Geflechtknochen entsprechende Bälkchenstruktur bilden. Dies ist die Phase der Kallushärtung, in der sich der neu gebildete Geflechtknochen entlang des ausgesprossenen Kapillarnetzes ausbreitet.

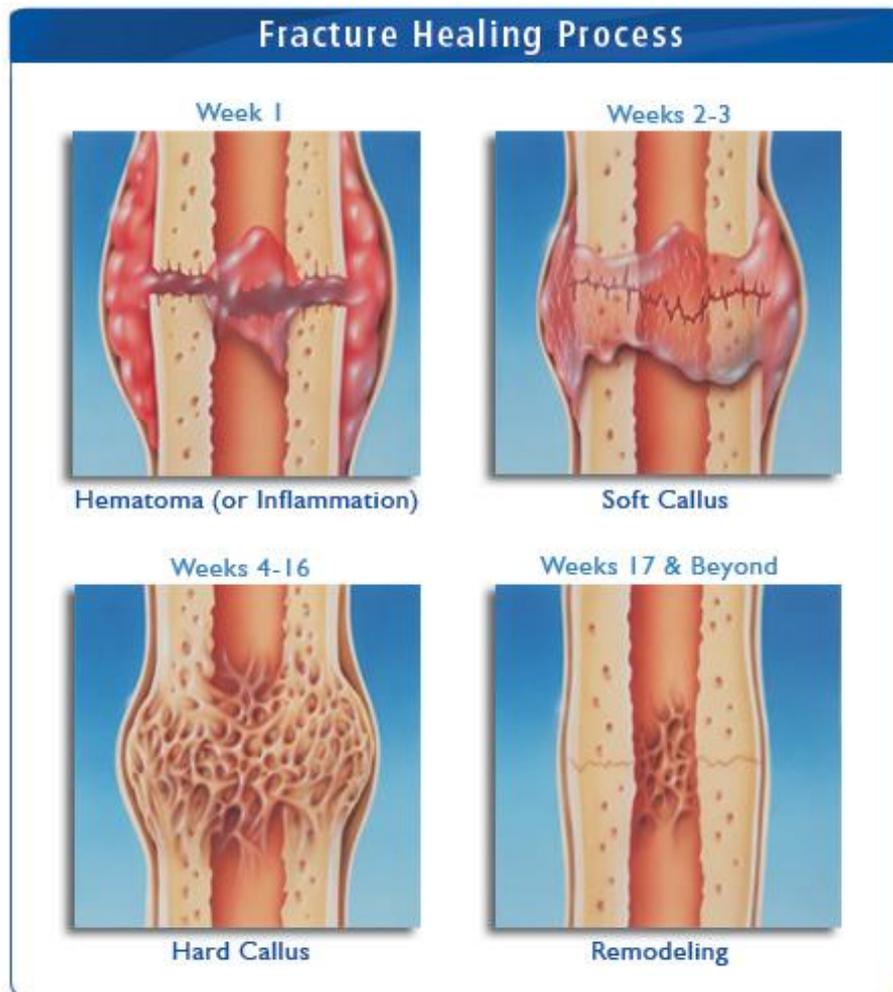


Abb. 3: Sekundäre Frakturheilung [aus Hauter N. 2011].

Entscheidend organisiert wird diese Phase der Faserknochenbildung durch die sogenannte *Basic Multicellular Unit* (BMU), die aus Interzellulärsubstanz, verschiedenen Zellen (z.B. *lining cells*) und Kapillaren unterschiedlichen Aktivitätsgrades, Aufgaben und Fähigkeiten besteht.

Dabei spielen für die Frakturheilung Botenstoffe und Proteine wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren der TGF- β -Superfamilie (zu der auch das BMP gehört), angiogene Faktoren, pro-inflammatorische Zytokine, Metalloproteinasen und viele weitere Stoffe eine wichtige Rolle. Trigger für die Sezernierung dieser osteogenetisch wirksamen Transmitterstoffe ist die Störung der Gewebeintegrität am Frakturspalt. Der somit ausgelöste Regenerationsmechanismus ist letztlich ein komplexes Zusammenspiel aus zellulären Reparaturvorgängen [Alberts B et al. 2011].

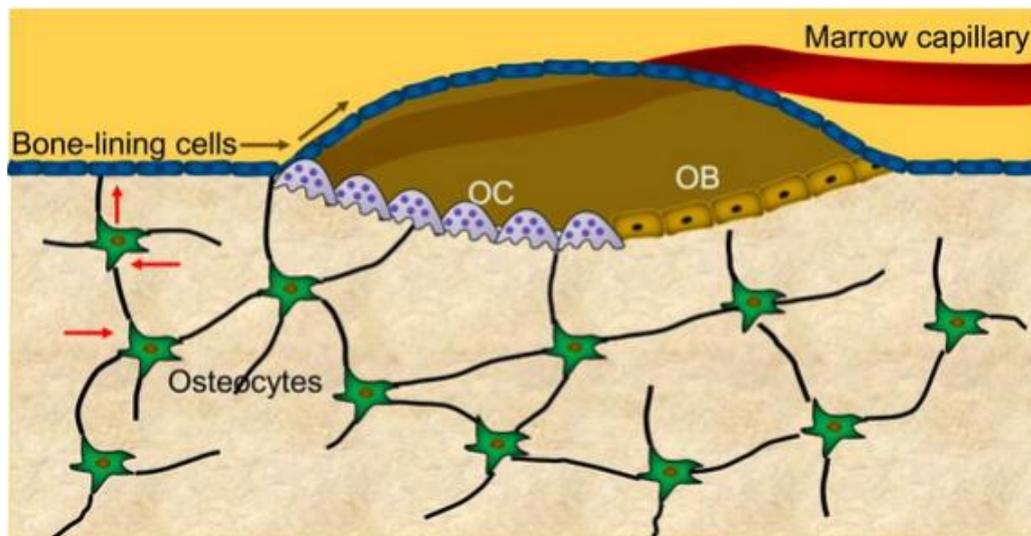


Abb.3.1: Schematische Abbildung der *Basic Multicellular Unit*. OC (Osteoklasten) und OB (Osteoblasten), [aus Dionyssioti Y. 2015].

In der nun nachfolgenden Modeling- und Remodeling-Phase wird unter anderem belastungsabhängig der Geflecht- durch Lamellenknochen ersetzt und eine stabile Knochenstruktur durch einen beständigen Knochenauf- und -abbau wiederhergestellt [Anagnostakos K und Scharf H-P. 2011].

4 Anspruch an Knochenersatzmaterialien

Der Einsatz von KEM gewinnt bedingt durch den demographischen Wandel der heutigen Gesellschaft mit dem vermehrten Wunsch nach einer schnellen Wiederherstellung von Lebensqualität und Mobilität nach Verletzungen des knöchernen Bewegungsapparates zunehmend an Bedeutung. Vorstellbar wäre das im Hinblick auf mögliche Einsatzgebiete bei degenerativ veränderten Gelenken mit ihren knorpeligen und knöchernen Anteilen.

Da bislang noch kein der autologen Knochensubstanz gleichwertiges KEM hergestellt werden konnte, werden besondere Ansprüche an KEM als osteokonduktive Leit- und Füllstrukturen mit dem Vorteil auf dem Gebiet der Osteogenese in Bereichen mit normalerweise nicht zu erwartender Knochenregeneration (Osteoinduktion) gestellt. Es besteht die Erwartungshaltung, dass zum Beispiel durch Verfahren, in denen knochenmorphogenetische Proteine (BMP's) auf das KEM aufgebracht werden sowie generell eine beschleunigte Knochenneubildung und Defekt-Stabilisierung (Osteokonduktion) mithilfe zusätzlicher Stimulierung osteogener Zellen (Osteopromotion) zu

initiieren, die Osteogenese entscheidend unterstützt und verbessert werden kann [Kim TH et al. 2012].

Darüber hinaus sollte eine gute Biokompatibilität des Materials Fremdkörper-, Abstoßungs- und allergischen Reaktionen vorbeugen und eine gute Langzeitverträglichkeit aufweisen [Amorosa LF et al. 2013].

Eine wichtige Komponente für die Resorptionsvorgänge und Vaskularisierung des neu gebildeten Knochengewebes stellt dabei die Porosität des Implantates dar. Je größer dabei der Porendurchmesser wird ($>100\mu\text{m}$), desto stärker kann eine Vaskularisierung neben der Bildung mineralisierten Gewebes am Implantat stattfinden, wobei es von entscheidender Bedeutung ist, das Gleichgewicht zwischen Oberflächenvergrößerung mittels größerer Poren und Defektstabilität zu finden [Murphy CM, O'Brien FJ. 2010].

Weitere Vorteile künstlich synthetisierter KEM bietet zudem die Möglichkeit, medizinisch wirksame Trägersubstanzen auf der Materialoberfläche aufzubringen oder mit ihr reagieren zu lassen. So besteht die Möglichkeit auf dem Gebiet der Infektbehandlung, mittels topischer Antibiotika-Applikation durch die Implantatoberfläche oder das Knochenwachstum stimulierende bioaktive Substanzen mit dem Einbringen des Implantates in den Defektbereich nicht nur eine Defektheilung zu unterstützen, sondern auch möglichen Komplikationen vorzubeugen oder gegebenenfalls gleichzeitig zu behandeln [Peters K und König DP. 2010].

Klein et al. (2010) heben dabei besonders hervor, dass der Vorteil synthetisch hergestellter KEM unter anderem darin liegt, mithilfe der künstlichen Materialherstellung eine unveränderliche Oberflächenbeschaffenheit reproduzieren und annähernd dieselben Ausgangsmaterialien für den klinischen Einsatz bereitstellen zu können.

Schnettler et al. (2009) konnten dabei bereits im Tierversuch unter im künstlich gesetzten Knochendefekt eingebrachten Hydroxylapatit-Implantaten zeigen, dass die Verwendung von Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) als rhBMP-2-Beschichtung, eine gesteigerte osteoinduktive Wirkung zur Folge hat.

Die im Folgenden experimentellen in vivo Versuch gestellte Fragestellung orientiert sich dabei an veränderten Kriterien des Knochenabbaus unter Verwendung von offenporigen, metallischen Calcium-Titanat behandelten Zylinderimplantaten gegenüber unbehandelten Implantaten sowie die spezielle Auswirkung auf die Knochenregeneration, -interaktion und -stabilität.

5 Übersicht verschiedener Knochenersatzmaterialien

Ein knöcherner Substanzdefekt kann erblich, posttraumatisch oder postchirurgisch bedingt sein, wobei jeweils gemäß des Defektausmaßes und weiterer Begleitumstände verschiedene KEM zur Verfügung stehen.

Zu den autogenen Materialien gehören zum Beispiel Spongiosaplastiken. Dabei wird körpereigene Spongiosa (trabekulär aufgebaute Röhrenknochen) aus der Knochenmarkshöhle entnommen und kann danach in den Knochendefekt eingebracht werden [Brinckmann P et al. 2000]. Damit eine Belastungsstabilität erzeugt werden kann, sollte der Defekt dabei möglichst komplett ausgefüllt werden, damit die osteogenen Zellen mit dem stammzellreichen Material reagieren und sich zu trabekulärem Knochengewebe ausbilden können. Je nach Größe des Defektes werden unter zwei Zentimetern Knochendefekt Spongiosaplastiken verwendet, bei ossären Defekten bis fünf Zentimetern eher kortiko-spongiöse Späne. Die Erfolgsaussichten einer Knochendefektheilung sind dabei unmittelbar an die Größe des Defektes gekoppelt und oft vermindert eine ungenügende Weichteildurchblutung den Erfolg einer Knochenregeneration [Anagnostakos K und Scharf H-P. 2011].

Dem gegenüber steht die Möglichkeit einer allogenen, also körperfremden Einbringung von Knochenersatzmaterial der gleichen Spezies. Ein Vorteil ist dabei zum Beispiel die Möglichkeit größere Defekte ausfüllen zu können sowie die konduktive Wirkung, oder dass der allogene Knochen als Leitstruktur bei der Knochenregeneration dienen kann. Das Material kann jedoch auch xenogen von verschiedenen Spezies wie dem Rind verpflanzt werden, sowie von Korallen oder aus künstlicher Herstellung stammen. Der Nachteil von allogenem KEM besteht neben den höheren Kosten unter anderem in der Möglichkeit einer Abstoßungs- oder allergischen Reaktion auf das körperfremde Material und kann zu einer zellulären Sensibilisierung oder Übertragung von Infektionen führen [Wirth CJ et al. 2010].

Eine viel versprechende Alternative bieten dahingegen synthetische (alloplastische) Materialien mit resorbierbaren und nicht resorbierbaren Eigenschaften.

Diese können dem Defekt angepasst hergestellt werden, Defizite gegenüber autologem Material mithilfe verschiedener Trägersubstanzen größtenteils ausgleichen, sich im Idealfall nach stattgefundenener Knochenregeneration resorbieren und provozieren weniger Sensibilisierungs- oder Antigen-Reaktionen.

Darüber hinaus entfällt das Risiko der Entnahmemorbidity und eine synthetische Herstellung ist nicht abhängig von dem Angebot passenden und zur Verfügung stehenden Spendermaterials.

Zudem entfallen Kosten, die bei zweizeitigen Operationen durch eine vorherige Entnahme des KEM entstehen würden [Jähne J et al. 2009].

Jedoch ist die Wirkung des jeweils verwendeten alloplastischen KEM stark von der richtigen Wahl seiner Eigenschaften abhängig. So können die Augmentation verschiedener Beschichtungen, Porosität und die Materialauswahl entscheidend für das Ausmaß der Defektheilung und Knochenregeneration sein.

Ist der Defekt belastungsstabil und hat eine ausreichende Knochenregeneration stattgefunden, kann das Implantat unter sonstiger Beschwerdefreiheit im Körper verbleiben oder es wurde resorbierbares Material verwendet, das mit der Zeit abgebaut wird.

Alloplastische KEM sind unter anderem:

- Metall (z.B. Titan)
- Metallspungiosa (z.B. synthet. Schaumgerüst)
- Keramiken (meist bovine Platzhalter)
- Biogläser (amorph; z.B. Silizium-Alkali-Basis)
- Polymere (z.B. Polyglycolid)
- Zemente (z.B. Calciumphosphat-)

Dabei ist die Verbleibdauer des eingebrachten KEM vorrangig von der Osteoklastenaktivität abhängig. Gerade bei porösem, nicht-resorbierbarem Material mit guter Einwachsung wäre jedoch eine chirurgische Entfernung eher kontraproduktiv zu dem erzielten Ergebnis [Neumann M. 2009].

Ein Nachteil synthetischer Alloplastiken ist auf der anderen Seite die möglicherweise verlängerte Durchbauungszeit oder das Verbleiben des Materials durch fehlende Resorption im Knochen.

Jähne (2009) weist dabei auch darauf hin, dass der Einfluss des Implantates auf die Knochenregeneration stark mit der Beschaffenheit des KEM und der chemischen Zusammensetzung der synthetischen Gerüstsubstanzen, des Weiteren die Porosität mit der zu erzielenden Osteointegration zusammenhängt.

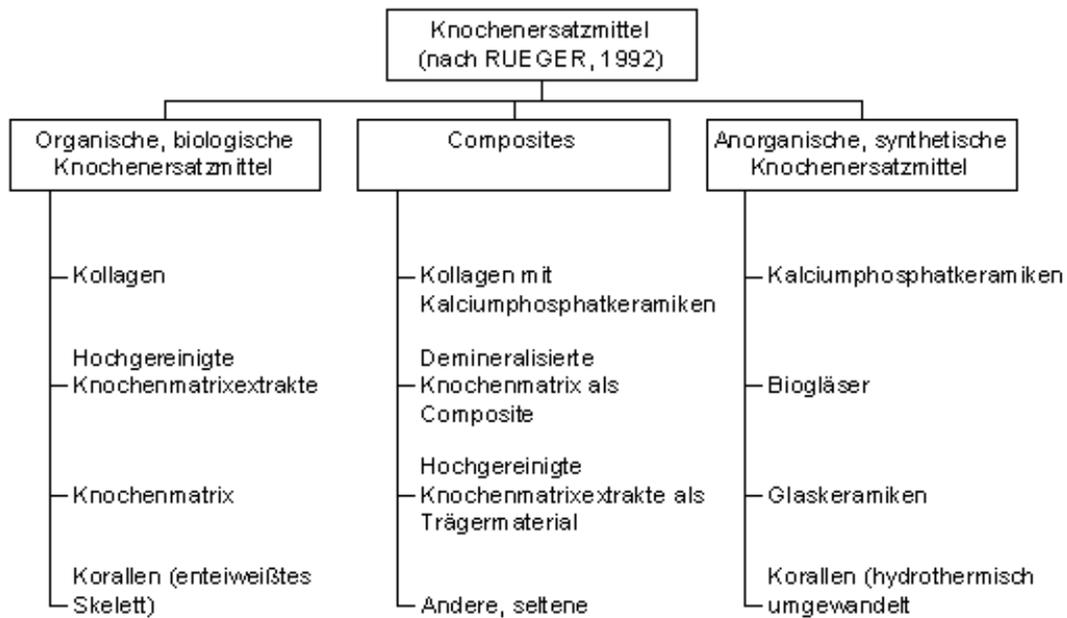


Abb. 5: Klassifikation der Knochenersatzmaterialien [Rüger JM et al. 1992].

Darüber hinaus ist zu beachten, dass das in den Knochen einzubringende KEM ungefähr den biomechanischen Eigenschaften des umliegenden Gewebes entsprechen sollte, da ein mechanisch schwächeres Material für weniger Stabilität im Defektbereich sorgen, ein mechanisch stärkeres Material einen weiteren Umgebungsdefekt provozieren könnte.

Weitere die Herstellung des KEM betreffende Faktoren sind die Anforderungen an die maschinellen Komponenten, die durch die Komplexität der Implantatform, das mechanische Zubehör und die Kosten beeinflusst werden. Gerade der Herstellungsprozess stellt eine große Herausforderung dar und wird bei Material wie dem Titanium durch einen hohen Schmelzpunkt und ausgeprägte Reaktionen der einzelnen Reaktionskomponenten erschwert. Deshalb ist es unter anderem nötig, Titaniumbestandteile unter Vakuum zu verarbeiten [Jovanović M et al. 2009].

Dennoch bleibt Titanium eines der gängigsten Materialien für den Einsatz als KEM in der Knochenregeneration und die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Implantatmaterials können, unter anderem auch im Einsatz von hydrothermalen Techniken, zur Verbesserung der Oberflächenbeschaffenheit durch die Herstellung einer TiO₂-Beschichtung von Vorteil sein.

Studien haben zeigen können, dass derart behandelte Titaniumimplantate Osteoblasten in ihrer Osteogenität anregen können, was sich zum Beispiel an der Erhöhung der Calcium-Ionen und einer verbesserten Mineralisationsstruktur überprüfen lässt [Lorenzetti M et al. 2015].

5.1 Anforderungen an das Implantatmaterial und seine Form

Wie bereits beschrieben möchte man eine ideale Defektstabilität mit ähnlichen biomechanischen Eigenschaften zum Knochengewebe durch die Auswahl des passenden Implantatmaterials und seiner Form erzielen.

Dazu werden die physikalischen Faktoren mithilfe experimenteller Tests und Untersuchungen ermittelt, um schließlich das Implantatmaterial und die jeweiligen Stabilisatoren mit der dem Knochen am meisten ähnelnden Struktur zu verbinden.

Mithilfe des „Youngschen Moduls“ kann der Elastizitätskoeffizient (E; E-Modul) für verschiedene feste Materialien im Bezug auf seine Dehnbarkeit und Spannung unter linearer Verformung ermittelt werden. E wird dabei umso größer, je größer der Materialwiderstand ist und ist zudem abhängig von der Schmelztemperatur des Materials.

Titanium erreicht einen E-Modul-Wert um die 10.500N/mm^2 , während markhaltiger Knochen nur Werte von etwa 211N/mm^2 , markloser Knochen sogar nur Werte von etwa 54N/mm^2 erreicht. Damit hat es zwar im Vergleich zu anderen Implantatmaterialien ein geringeres E-Modul, liegt jedoch noch weit über den Werten von Knochen und bietet daher keine idealen Voraussetzungen für die biomechanische Stabilität [Lohmann S. 2005].

Es gibt verschiedene Methoden, das E-Modul des Implantatmaterials dem von Knochen anzunähern. Ein Ansatz beschäftigt sich mit der Form des Materials. So konnte gezeigt werden, dass eine poröse Struktur das E-Modul weiter absenkt. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Veränderung der Materialstabilisatoren und ihrer β -Phase durch schnelles Herabkühlen, ausgehend von hohen Temperaturen. Dabei hat sich gezeigt, dass Stabilisatoren mit der besten Auswirkung auf die Elastizität des Titans vor allem Niob, Zirconium, Molybdän und Tantal sind [Sakaguchi N et al. 2005].

Durch eine poröse Form Anpassung an die Mikroarchitektur des Knochengewebes und an seine Stabilität zu finden, ist eine Möglichkeit, mittels des KEM-Designs Einfluss auf das Regenerationsergebnis zu nehmen. Gleichzeitig bietet die poröse Form dem umliegenden Knochen und den die Knochenheilung unterstützenden Zellen die Möglichkeit, leichter den im Implantat liegenden Defektbereich und so eine effektivere Knochendurchbauung zu erreichen.

Natürlich spielen die Verfügbarkeit sowie die vom Material abhängigen Herstellungskosten eine ebenso große Rolle wie seine osteogenen Eigenschaften und das Langzeitergebnis des verwendeten KEM.

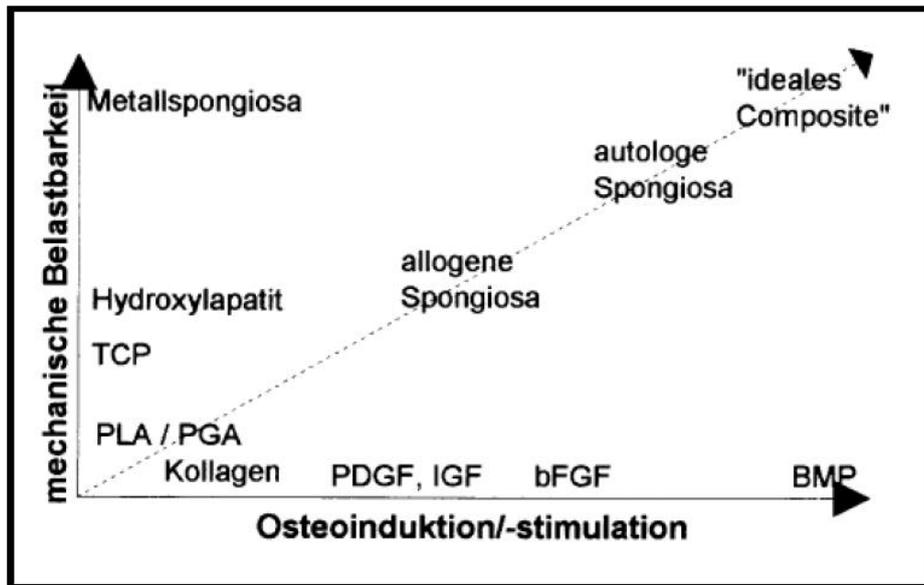


Abb.5.1: bFGF: basic Fibroblast Growth Factor, BMP: Bone Morphogenetic Growth Factor, IGF: Insulin like Growth Factor, PDGF: Platelet Derived Growth Factor, PGA: Polyglycolid [Niedhart C et al. 1998].

Eine im Voraus gründlich erprobte Herstellung und die Verwendung der verschiedenen Implantattypen mit zusätzlichen, die Knochenregeneration unterstützenden Einflüssen unter ähnlichen, den menschlichen Körper belastenden Faktoren, ist daher maßgeblich an der Auswahl des am besten geeigneten bioaktiven Materials beteiligt.

Die nachfolgende experimentelle Untersuchung im Tiermodell ist daher Gegenstand der einleitenden Thematik und hat das Ziel, Antworten auf Fragen zu Materialbeschaffenheit, -form, -beschichtung und möglicher Überlegenheit gegenüber bereits existierenden Knochenersatzmaterialien zu geben.

6 Material und Methoden

6.1 Versuchstiere

Da es bislang erst wenige aussagekräftigen Versuche von mit einer Calcium-Titanat-Reaktionsschicht behandelten offenporigen Titanimplantaten im Schafsmodell gibt, vor allem experimentelle Untersuchungen aus in vitro Systemen oder von Versuchen mit Kleinnagern, erlaubt die Forschung an größeren Säugetieren eine adäquatere Beurteilung und kann einen Trend auf die zu erwartende Umsetzbarkeit im menschlichen Körper aufzeigen.

Zu diesem Zweck fiel die Wahl auf das Merino-Landschaf, welches in Hinsicht auf sein Durchschnittsgewicht von knapp 80kg und einem vergleichbaren Knochen-, Blut- und Lymphsystem eine für den geplanten experimentellen Versuch zum menschlichen Körperbau ähnliche Physiologie mitbringt.

Eine weitere wichtige Voraussetzung war die im Vorhinein natürliche und artgerechte Haltung, in diesem Fall der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung entsprechend und somit im Idealfall ohne die Ausbildung von haltungsbedingten Fehlstellungen oder durch das Futter bedingte Fehlernährung mit folgender Minderung der Knochendichte oder anderer Folgeschäden. Darüber hinaus fiel die Auswahl auf erwachsene Tiere, damit die Ausgangsbedingungen mit denen eines erwachsenen, normalgewichtigen Menschen vergleichbar sein würden. Was hier zunächst nicht berücksichtigt wurde, jedoch für den weiteren Einsatz der KEM in der Klinik zu diskutieren wäre ist die Frage, ob durch den Zweifüßlergang gegenüber dem Vierfüßlergang beim Schaf eine größere Belastung der unteren Extremität beim Menschen zu erwarten wäre.

Die Festlegung der Versuchstieranzahl richtete sich dabei nach den im Vorfeld geplanten Untersuchungsmethoden. So fand sich in der entsprechenden Literatur eine Anzahl von fünf bis sechs Tieren pro Gruppe, wobei schließlich die Zahl von 24 weiblichen Schafen in Anlehnung an vergleichbar randomisierte Versuche festgelegt worden ist [Franchi M et al. 2007]. Das ergab je sechs Tiere für die Implantation der beschichteten und unbeschichteten Titanzylinder für die jeweils biomechanische, histologische und histomorphometrische Auswertung.

Per Zufallsverfahren wurden die Tiere dabei jeweils auf die vier Gruppen (beschichtet/unbeschichtet für die Histologie und Histomorphometrie sowie beschich-

tet/unbeschichtet für die Biomechanik) zwecks einer statistisch verwertbaren Randomisierung aufgeteilt.

| Beschichtung | Anzahl der Tiere | Anzahl der Tiere |
|----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| mit Ca-Titanat-Reaktionsschicht | 6x Histomorphometrie, Histologie | 6x Biomechanik |
| ohne Ca-Titanat-Reaktionsschicht | 6x Histomorphometrie, Histologie | 5x Biomechanik |

Tab. 6.1: Randomisierung der Versuchstiere.

Das jüngste Tier hatte dabei ein Alter von vier Jahren, das älteste Tier war sieben Jahre und 10 Monate alt. Alle Tiere stammen von der Lehr- und Forschungsstation „Oberer Hardthof“ des Institutes für Tierzucht und Haustiergenetik der Justus-Liebig-Universität Gießen und wurden bereits entwurmt von dort übernommen.

Für eine stressfreiere Eingewöhnung wurden die Tiere einige Wochen vor dem geplanten OP-Termin auf das Gelände der zentralen Forschungseinrichtung (ZFE) in Frankfurt verlegt.

Während der Standzeit von sechs Monaten zwischen Implantations-OP und Euthanasie konnten sich die Schafe frei in dem zur Lehr- und Forschungsstation zugehörigen Gehege bewegen oder wurden witterungsabhängig einzeln in den dazugehörigen Stallungen gehalten. Während der gesamten Zeit sind die Tiere bis zwölf Stunden vor der OP mit Kraftfutter versorgt worden, während ihnen Wasser und Heu weiterhin *ad libitum* zur Verfügung gestanden hat.

Qualifizierte Mitarbeiter der ZFE waren während der Eingewöhnungsphase und besonders nach den Operationen der Schafe für das Wohl, den stressfreien Aufenthalt und die Schmerzlinderung der Schafe verantwortlich. Eine über die normale Haltung hinausgehende tierärztliche Versorgung war jederzeit gewährleistet. Die eindeutige Identifizierung der Tiere war dabei durch zwei Ohrmarken im rechten und linken Ohr sichergestellt.

Nach der erfolgten Euthanasie ist für die fachgerechte Entsorgung der Kadaver in einer Tierkörperbeseitigungsanlage gesorgt worden.

Der Antrag auf Genehmigung von Tierversuchen ist an das Regierungspräsidium Darmstadt unter dem Aktenzeichen V54-19c 20/15-F31/31 unter der internen Kurzbezeichnung DFG AZ SCHN 976/1-2 mit einer detaillierten Beschreibung der Versuchsplanung gestellt und erteilt worden.

6.2 Herstellungsverfahren der Implantate und Reaktionsschicht

Aufgrund des großen technischen Aufwandes, offenporige, metallische Zylinderimplantate mit der Legierung Ti-6Al-7Nb herzustellen, haben sich die entsprechenden Einrichtungen der Projektpartner der BAM Berlin (Beschichtung der Implantate), Universität Siegen und Hochschule Osnabrück (Materialcharakterisierung und –prüfung) im *MEDFOAM-Projekt* „Herstellung und Charakterisierung zellulärer metallischer Implantate mit biologischer Randschicht“ mit dem Gießerei-Institut der RWTH zusammengetan. So konnten unter anderem einzelne Gießprozesse analysiert und mithilfe oberflächenanalytischer, mechanischer und metallographischer Untersuchungen in einem frühen Stadium des Herstellungsprozesses optimiert werden.

Aus einer parallel durchgeführten Herstellung von Implantatkörpern für ein mit Ratten durchgeführtes Kleintierexperiment konnten die aus vorangegangenen Versuchen gewonnenen Erkenntnisse auf das am Schaf geplante Großtierexperiment übertragen werden. Dabei war vor allem das bereits aus dem Versuch mit Ratten (Aktenzeichen V 54-19 c 20-15 (1) GI 20/14 Nr. 56/2010) bekannte Problem einer unzureichenden *Press-Fit*-Verbindung im Interfacebereich bekannt, weshalb entschieden wurde, einen Metallschwammkörper mit einem äußeren zylindrischen Mantel zu entwickeln. Damit war gleichzeitig eine für die Implantation ausreichende Stabilität des somit exakt runden Implantatkörpers gegeben.

Bei der Entscheidung, eine Titanlegierung zu verwenden, musste bezüglich der längeren Materialbeständigkeit von Titan gegenüber zum Beispiel Knochenzement berücksichtigt worden, dass zwar auf der einen Seite die Verwendung einer Ti-6Al-7Nb-Legierung die nötige Formfestigkeit und Biokompatibilität für den Einsatz im Knochendefekt bietet, diesem jedoch auf der anderen Seite die Notwendigkeit, höhere Schmelztemperaturen erzeugen zu müssen und damit auch ein höherer Arbeitsaufwand gegenübersteht.

Zusätzlich verstärkt die aufgebrachte Calcium-Titanat-Reaktionsschicht die bereits durch die Legierung hervorgerufene Biokompatibilität, wobei die Verwendung von Ti-6Al-7Nb, einer so genannten α - β -Legierung, bereits gut erforschte mechanische Eigenschaften gewährleistet.

Dabei ist eine verunreinigungsarme Feingießung unter Vakuum bei hohen Gießkräften von entscheidender Bedeutung für die Herstellung der hochwertigen Gussform und der schwammartigen Strukturform.

Die Herstellung unter Vakuum wird deshalb notwendig, da Elemente wie Sauerstoff und Kohlenstoff durch an der Grenzfläche von Formmaterial und Schmelze entstehende Reaktionsprodukte eine α -case-Schicht bilden und infolge dessen die α -Phase stabilisieren. Dies würde die Materialoberfläche derart verunreinigen, dass sich eine

spröde und harte Schicht ausbildet, die möglicherweise eine ausreichende Knochenregeneration im Interface-Bereich gefährdet und die Bildung der Calcium-Reaktionsschicht verhindert [Hagemann K. 2012].

Nachdem der Beizvorgang beendet worden war, verringerte nach dem Gießprozess das Phänomen der sogenannten „Wurmloch-Struktur“ (*worm mark*) den Wert für die Rauheit der Oberfläche von $R_{max} = 45\mu\text{m}$ auf einen Wert von $9\mu\text{m}$. Sie füllten abhängig von der Dauer des Vorgangs die während der Beizung entstandenen Risse auf und führten durch ihre abgerundeten Kanten so zu einer glatteren Oberfläche.

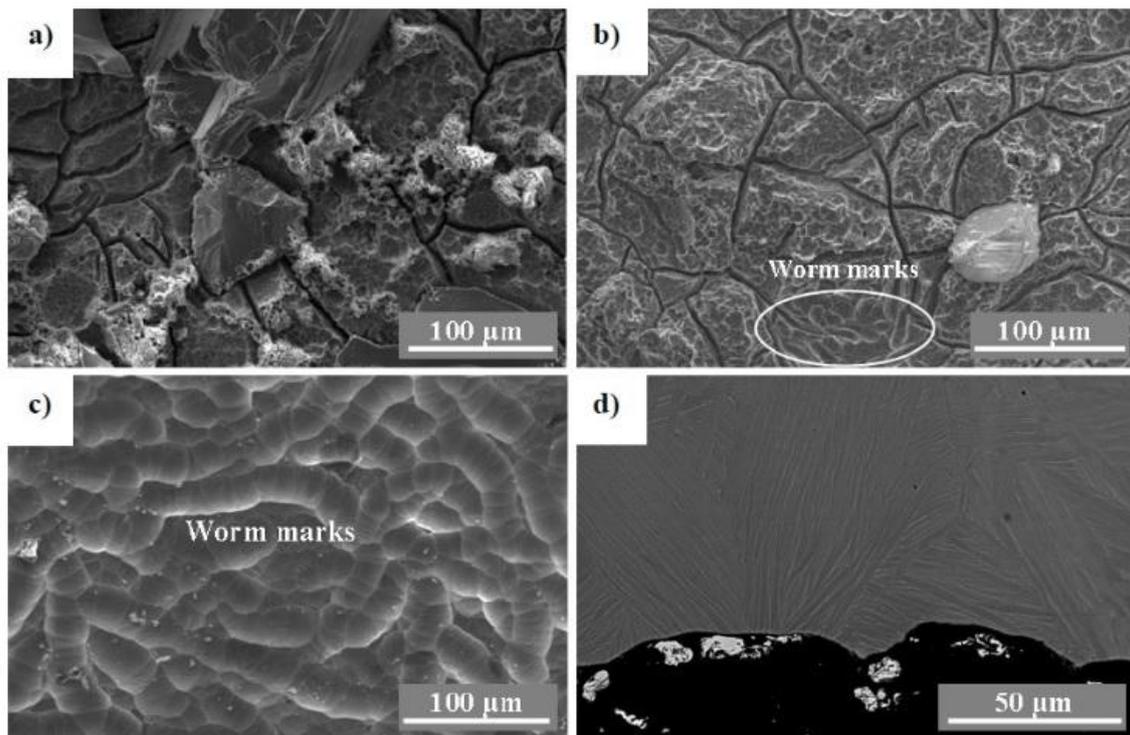


Abb. 6.2: Lochkorrosion nach a) 20, b) 40, c) 60-70 Minuten des Beizens und d) Querschnitt im SEM-Mikroskop nach 60-70 Minuten des Beizens [Guillén GT, Ohrndorf A, Christ H-J. 2013].

In weiterführenden Versuchen konnte die Projektgruppe des Gießerei-Instituts der RWTH Aachen schließlich das Problem der Randschichtversprödung mittels einer speziellen Beizung (70% HNO_3 + 10% HF und 20% H_2O) und einer vorangegangenen Wärmebehandlung bei 600°C über vier Stunden hinweg lösen, durch die sich eine 70-80%ige Verbesserung der Duktilität der Proben zeigte und mithilfe der Entwicklung eines neuen Formschalensystems behoben werden, so dass die Bildung der α -case-Schicht vollständig unterbunden wurde.



Abb. 6.2.1: Steril verpacktes Titaniumimplantat kurz vor Implantation.

Die Herstellung der Implantate an sich ist ein gut reproduzierbarer Prozess, der *Wachsausschmelzverfahren* oder auch *Feinguss* genannt wird und bereits seit etwa 5000 v. Chr. Anwendung findet. Dabei wird ein aus Wachs oder Kunststoff bestehendes Modell gegossen, welches mit einem hitzestabilen Metall umgossen wird. Durch das Schmelzen des inneren Wachskernes bleibt schließlich die metallische Rohform des Implantates übrig, welche nach Belieben mit weiteren Schichten des gewünschten Metalls bzw. der Legierung überzogen werden kann [Kalpakjian S et al. 2011]. Laut Hagemann et al. (2013) nimmt bei steigender Abgusstemperatur die Rauheit zu.

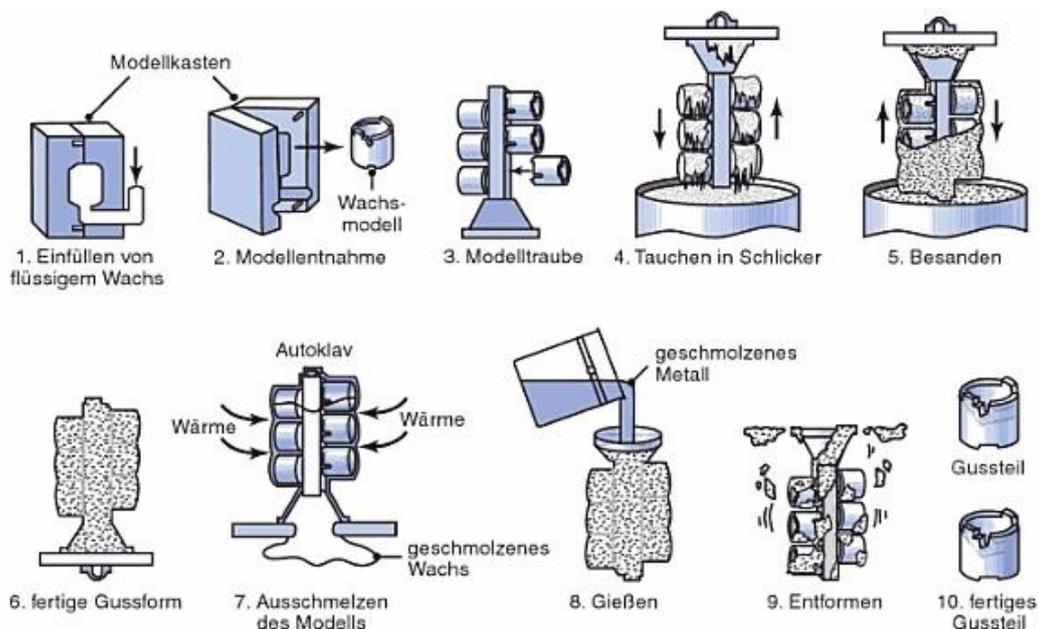


Abb. 6.2.2: Schematische Darstellung des Wachsausschmelzverfahrens [Kalpakjian S et al. 2011].

Die hier verwendeten Implantate entstanden unter anderem dadurch, dass während des Herstellungsprozesses die Kunststoffplatzhalter mit $MgO+Al_2O_3$ und CaO gefüllt wurden, welches bei Erhitzung des Materials eine Härtung des Formmaterials zur Folge hatte. Während des Erhitzens schmolz dabei der Platzhalter und der so freigewordene Platz wurde mittels Schleudergussverfahrens (TiCast Super R, SelecCast) mit geschmolzenem Ti-6Al-7Nb aufgefüllt.

Die Implantatausmaße setzten sich schließlich aus einem äußeren Durchmesser von $10,5 \pm 1mm$, dem inneren Durchmesser von $8,6 \pm 0,4mm$ und einer Länge von $12,5 \pm 1mm$ zusammen. Um einen perfekten Zylinder zu erhalten wurde schließlich der äußere Durchmesser auf $9,7mm$ bestimmt.

Der durch die poröse Struktur verursachte Platz für einwachsende Zellen belief sich letztendlich auf $1674 \pm 704\mu m$, die Strebendicke auf $595 \pm 205\mu m$ [Guillén T. 2012].

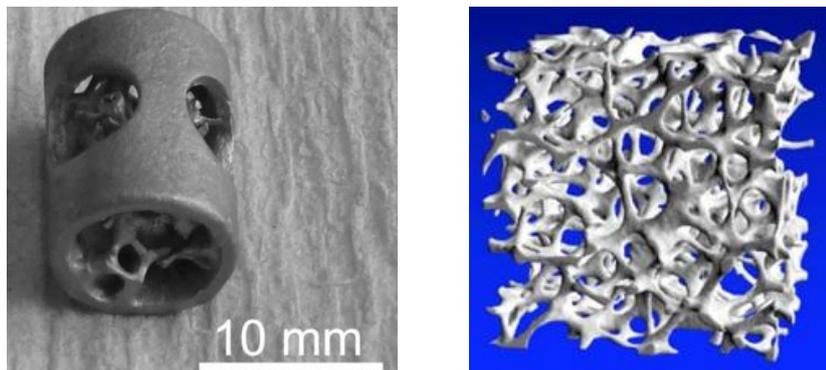


Abb. 6.2.3: Das linke Bild zeigt ein zylindrisches, offenporiges Titaniumimplantat, auf dem rechten Bild ist die Bälkchenarchitektur von Lamellenknochen zu sehen [aus Guillén GT. 2012 und Richly M. Juvent Biomedical GmbH & Co. KG].

Allerdings zeigte sich im Rahmen des Herstellungsprozesses, dass dieser nicht für die Implantatherstellung der hier verwendeten 10 ppi-Schwämmchen mit einer Abmessung von $10*12 mm$ auf die menschliche Spongiosa mit einer erforderlichen Größe von unter 80 ppi angewendet werden kann, da die Schwammstege zu dünn dafür wären [Hagemann K. 2012].

Ein anderes in der Medizin weit verbreitetes Herstellungsverfahren von als KEM einsetzbaren Implantaten ist das *Rapid Prototyping* (RP), welches eine randomisierte Struktur und gute Reproduzierbarkeit bietet. Jedoch hat sich gezeigt, dass beim

Titanguss Ascherückstände des Formmaterials im Material verbleiben und darüber hinaus eine dreidimensionale Struktur mit der gewünschten Stegdicke von etwa 1mm nicht realisierbar ist. Weitere Versuche der Forschungsgruppe ergaben schließlich den Nachweis, dass eine tetradodekaidrische Innenarchitektur des Implantates am geeignetsten bezüglich der Nachbildung einer dem Knochen ähnlichen Schaumstruktur ist.

6.3 Narkose, Operationsverfahren und Nachbehandlung

Um einen möglichst stressfreien Operationsablauf für die Versuchstiere herzustellen, ist den Schafen präoperativ eine analgetisch und sedativ wirkende intramuskuläre Ketamindosis (10mg/kg KG) und Xylazin (0,1mg/kg KG) injiziert worden. Außerdem erfolgte eine präoperative Antibiose mit Veracin comp. 3ml/50kg.

Die so beruhigten Tiere sind dann aus dem an die ZFE angrenzenden Stall in den Operationsraum gefahren worden, wo sie nach dem Wiegen in Rechtsseitenlage und fixierten Extremitäten für den Eingriff vorbereitet worden sind. Gegen das Austrocknen der Cornea wurde den Schafen eine Augensalbe verabreicht, des Weiteren ist eine prophylaktische Antibiose appliziert worden.

Ein arterieller und venöser Zugang wurden gelegt und parallel erfolgte die Monitor-gestützte Überwachung der Vitalfunktionen.

Die Einleitung der Narkose erfolgte mit dem Narkotikum Propofol (4mg/kg KG) und Fentanyl (0,5mg/kg KG), wonach eine maschinelle Beatmung möglich war.

Der Operationsort über der jeweils rechten hinteren distalen, medialen Femurkondyle wurde großflächig von Haaren befreit und unter sterilen Bedingungen mit Braunol® desinfiziert und mit sterilen Lochtüchern abgedeckt.

Zu jedem Schaf ist ein Protokoll mit Fotos und Dokumentation der beiden Ohrnummern, des Gewichts, Alters, der Medikation und kurzer Beschreibung des Operationsablaufes angelegt worden, damit eine spätere Zuordnung und gegebenenfalls Rückführung abweichender Versuchsergebnisse mit der Einbringung der Implantate verglichen werden konnte.

Anschließend hat ein für diese Operation ausgewiesener Chirurg der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des UKGM alle Eingriffe und Implantationen mithilfe einer Veterinärmedizinerin an zwei Tagen unter sterilen OP-Bedingungen vorgenommen.

Zunächst sind nach Setzung der etwa 4cm langen Hautinzision medial des Femurkopfes die einzelnen Gewebeschichten unter Kauterisierung kleiner Blutungen mit anschließender Spaltung des über der Femurkondyle gelegenen Muskelgewebes und der Faszia genus durchtrennt worden.

Nach Durchtrennung des Periosts wurde die Femurmetaphyse freipräpariert und mithilfe einer Bohrmaschine (Firma Synthes), die die durch NaCl-Lösung gekühlte innenliegende Diamanthohlschleife antreibt (*Diamond Bone Cutting Systems „DBCS“*), etwa 1cm unterhalb des Gelenkes einen Defekt mit dem inneren Durchmesser von 9,55mm, dem äußeren Durchmesser von 10,45mm und einer Tiefe von 14mm geschliffen.

Die im DBCS-System integrierte Wasserkühlung hat dabei der Entstehung von Hitzeekrosen vorgebeugt und das Schleifen eines möglichst zylinderförmigen Knochendefektes ermöglicht.

Der durch das Schleifen des Defektes entstandene Spongiosakern wurde entweder entnommen und verworfen, oder für eventuell nachfolgende Versuche verpackt und aufgehoben.

Nach diesem Schritt sind die bereitgelegten zwölf beschichteten und elf unbeschichteten Titaniumimplantate nach zuvor erfolgter Zuordnung zu den jeweiligen Schafen in den Defekt weitgehend pressfit eingesetzt und nach Möglichkeit mit einem Spongiosadeckel aus dem Material des Bohrkerns bedeckt worden. Ein sogenanntes „Press-Fit“, die exakte Einpassung von Implantat in den Knochendefekt, konnte dabei jedoch nicht ganz erreicht werden, da der Knochendefekt etwas größer als der äußere Implantatdurchmesser war. Bei einem Versuchstier diente der geschliffene Knochendefekt als Lehrdefekt.

Im Anschluss wurden über dem Knochendefekt das Periost und die darauffolgenden Etagengewebe wieder sachgerecht durch resorbierbares Nahtmaterial miteinander vernäht und die Wunde mit einem antiseptischen Nobecutan® -Sprühverband versorgt.

Am Ende der Operation sind die Schafe aus der Narkose ausgeleitet, extubiert und nach Entfernung der Zugänge in die wärmeregulierten Aufwachboxen verbracht worden, wo sie sich unter Überwachung ihres Allgemeinzustandes und bei bedarfsabhängiger postoperativer Wundschmerz-Analgesie durch das Personal der ZFE von dem Eingriff erholen konnten.



Abb. 6.3: Links: Monitore zur Überwachung der Vitalparameter und Aufrechterhaltung der Narkose und Atmung.
Rechts: Steriles Operationsbesteck und DBCS-System mit Bohrmaschine.



Abb. 6.3.1: Links: DBCS-Schleife mit Spongiosakern sowie knöcherner Defekt in der rechten medialen Femurkondyle.
Rechts: Im Knochendefekt eingebrachter Titanzylinder vor Wundverschluss.

Dazu wurde unter anderem die Applikation einer subkutanen Dosis des Opioid-Analgetikums Buprenorphin (0,001- 0,01mg/kg KG) für jeweils alle sechs bis zwölf Stunden in Kombination mit dem Benzylpenicillin-Procaïn Veracin-Compositum (3ml/50kg KG) verwendet.

Da ein nicht-steroidales, anti-inflammatorisches Analgetikum möglicherweise durch eine entzündungshemmende Wirkung die Osteoblasten-vermittelte Knochenneubildung mindern könnte, ist die Wahl auf ein Schmerzmittel aus der Gruppe der Opiode gefallen. Während der sechsmonatigen Standzeit konnten die Schafe nach gründlicher postoperativer Wundkontrolle und dem ungestörten Heilungsverlauf witterungsabhängig die Weide oder die Stallungen benutzen und wurden artgerecht mit Futter, Wasser und gegebenenfalls mit Medikamenten versorgt. Ebenso wurden die Schafe auf ein mögliches Lahmen hin untersucht, damit gegebenenfalls eine Untersuchung durch den verantwortlichen Tierarzt und ein Abbruch des Versuchs erfolgen könnte.

6.4 Polychrome Sequenzmarkierung während der Standzeit

Der Nachweis einer stattgefundenen Knochenneubildung in und um das Implantat herum sollte mithilfe einer intravitalem polychromen Sequenzmarkierung erfolgen.

Um die Vergrößerung der Versuchstiergruppe zu vermeiden und für eine eindeutige Zuordnung der räumlich-zeitlich stattgefundenen Aktivität der Knochenneubildung sind den für die Histologie zugeordneten Schafen zu festgelegten Zeitpunkten subkutan die drei Fluorochrome Oxytetracyclin (OTC, Terramycin/LA von Pfizer; gelbe Fluoreszenz), Alizarin (rote Fluoreszenz) und Calcein-Grün (grüne Fluoreszenz) appliziert worden.

Das 3%-ige Alizarin Complexone ist mit 2%iger NaHCO₃- Lösung und das 3%-ige Calcein-Grün mit 4%iger NaHCO₃- Lösung in *aqua ad injectionem* verdünnt und intramuskulär über Sterifiltern appliziert worden.

| Fluorochrome | Dosierung [ml] | Applikationszeitpunkt [d] (postoperationem ø) |
|--------------|----------------|--|
| OTC | 25mg/kg KG | 29 und 36 |
| Alizarin | 20mg/kg KG | 106 |
| Calcein-Grün | 7,5mg /kg KG | 177 und 184 |

Tab. 6.4: Übersicht über die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und Zeitpunkt der intravitalem Verabreichung mit entsprechender Dosierung.

Die Wahl einen Fluorochromfarbstoff für die Sichtbarmachung des neu gebildeten Knochens (Calcifizierung) wie von Rahn (1976) beschrieben zu verwenden, erklärt sich zum einen in der guten Verträglichkeit und fehlenden Toxizität durch den Einsatz einer verdünnten Lösung im lebenden Organismus und zum anderen in der guten Abgrenzbarkeit der Farbstoffe im späteren Knochenschliff durch die mithilfe von UV-Licht unterschiedlich erzeugten Wellenlängen und daraus resultierenden Färbungen der Fluorochrome. Durch unterschiedliche Zeitpunkte der Applikation der jeweiligen Fluorochrome lässt sich später eine zeitliche Zuordnung des neu entstandenen Knochengewebes vornehmen. Im Knochengewebe reagiert dabei der Farbstoff entlang der Mineralisierungszone mit Calcium und bildet einen Chelatkomplex [Módos L et al. 1969]. Um ein starkes farblisches Signal für die spätere Zuordnung unter dem Fluoreszenzmikroskop und eine leichtere Markierung der den Fluorochromen zugeordneten Knochenanteilen in der Histomorphometrie zu erhalten, wurden das OTC und Calcein-Grün zweimal hintereinander appliziert.

Somit lässt sich nach Vorbereitung und Einbettung der Knochenschliffe in Technovit 9100® und Darstellung der zeitlich getrennt applizierten Farbstoffe mit nachfolgender Entstehung von Calcium-Fluorochrom-Chelaten mit Einlagerung an die Knochenmatrix während der Knochenneubildung unter dem Fluoreszenzmikroskop eine klare Zuweisung hinsichtlich der Menge und des Zeitpunkts des neu gebildeten Knochens treffen [Rahn BA. 1976].

Anhand dieser Versuchsplanung ist es möglich gewesen, bei einer Gruppenstärke von insgesamt 24 Versuchstieren, davon 23 Tiere mit jeweils beschichteten oder unbeschichteten Implantaten und einer Injektion der Fluorochrome bei insgesamt 12 Tieren, Aussagen über unterschiedliche Ossifikationsverläufe während der Standzeit zu treffen und darzustellen, wo und wann welche Art von Knochen während der Defektheilung gebildet worden ist.

| Schafe | beschichtet | unbeschichtet | Leerdekt | Histologie | Biomechanik |
|--------|-------------|---------------|----------|------------|-------------|
| 24 | 12 | 11 | 1* | 12+1* | 11 |

Tab. 6.4.1: Aufteilung der insgesamt 24 Versuchstiere auf die unterschiedlichen Versuchsvorhaben und Zuteilung zu der Experimental- bzw. Kontrollgruppe.
* Der belassene Leerdefekt wurde der Histologie-Gruppe zugeteilt.

6.5 Perfusion, Euthanasie und Explantation

Nach sechs Monaten Standzeit sind die Versuchstiere in der ZFE auf die Euthanasie mit Perfusion der rechten hinteren Gliedmaße und anschließende post-mortale Amputation für die Probenaufarbeitung vorbereitet worden.

Dazu wurden die Tiere mit Ketamin und Xylazin in eine tiefe Narkose versetzt, dann perfundiert und danach durch eine letale Dosis des Barbiturats Pentobarbital schmerzfrei euthanisiert.

Auf Grund der Tatsache, dass in den Gefäßen verbleibende Erythrozyten durch ihren hohen endogenen Peroxidasegehalt angefärbt und eine immunhistochemische Untersuchung stören würden, ist es notwendig gewesen, die das Implantat enthaltende Extremität zu perfundieren [Mulisch M, Welsch U. 2010]. Dazu ist in weiterhin tiefer Narkose die im Canalis femoralis verlaufende Arteria und Vena femoralis freipräpariert worden, wobei erst die Haut und anschließend die mediale Schenkelfaszie durchtrennt

werden mussten. Die beiden Gefäße sind legiert und distal davon für die anschließende Einleitung 0,9%iger NaCl-Lösung und 10000IE Heparin/500ml über einen in die Arterie gelegten Katheter abgetrennt worden. So konnte die Spülflüssigkeit über einen ebenfalls in der Vene gelegten Katheter wieder ablaufen.

Postmortem wurde dann schließlich 1L des 4%igen Fixiermittels Paraformaldehyd in den arteriellen Katheter einlaufen gelassen, womit eine möglichst optimale Konservierung des Nativzustandes der späteren Präparate gewährleistet werden sollte.



Abb. 6.5: Linkes Bild: Perfusionsbesteck und Katheter.
Rechtes Bild: Die für Perfusion und Euthanasie verwendeten Medikamente.

Die so präparierte Gliedmaße wurde im Anschluss an die Tötung der Schafe und Perfundierung der zu untersuchenden Gewebe, makroskopisch freipräpariert und die proximale Tibia-Epiphyse mittels eines Elektro-Fuchsschwanzes (Firma Ferm) abgetrennt. Nachdem das den Knochen umgebende Gewebe grob entfernt worden ist, sind die für die histologischen Versuche bestimmten Präparate noch vor Ort fotografiert und mit einer Bandsägevorrichtung (Exakt-Trennschleifsystem 310 CL, große Säge) unter ständiger Wasserkühlung in Scheiben zersägt worden.

Anschließend sind die Knochenscheiben für die weiterführende Verarbeitung im Labor für experimentelle Unfallchirurgie der Universität Gießen in ausreichend NaCl-Lösung eingelegt und verpackt worden.

Auch die für die Biomechanik bestimmten Präparate wurden auf die der Implantatlänge entsprechende Länge zurechtgesägt und als Knochenblöcke in NaCl-Lösung aufbewahrt an das Institut für Werkstofftechnik der Universität Siegen weitergeleitet worden.

Zu jeder Zeit prä-, peri- und postoperativ, haben folgende Abbruchkriterien für die Weiterbehandlung der Schafe gegolten:

1. stark gestörter Allgemeinzustand
2. deutlich herabgesetzte Futteraufnahme
3. Gewichtsverlust von 15-20% innerhalb von Tagen oder über einen längeren Zeitpunkt bis hin zur Abmagerung
4. eingeschränkte Beweglichkeit der Hinterläufe
5. schwerere Infektionen des das Implantat enthaltenden Gelenks
6. nicht kontrollierbare Blutungen
7. Verlagerung des Implantates aus der Implantationsstelle in das umliegende Weichteil- oder Muskelgewebe



Abb. 6.5.1: Oberes Bild: Gelenkaufsicht Femurkondyle vor Euthanasie.
Links unten: Knochenscheibe mit Implantat.
Rechts unten: Das Implantat enthaltender, zurechtgesägter Gelenkanteil.

6.6 Aufbereitung der Proben, Schliffherstellung und -färbung

Nachdem die Knochenpräparate bereits unmittelbar nach der Explantation zurechtgesägt und etikettiert worden waren, fand nun im Experimental-Labor in Gießen die Einbettung mit dem schnellhärtenden Kunststoff Technovit®- bzw. die wasserentziehende Epon®-Einbettung für die Rasterelektronenmikroskopie statt. Das hierbei verwendete Technovit9100® härtet bei sehr niedrigen Temperaturen aus und ist besonders für die Einbettung von mineralisiertem Gewebe und anschließende Lichtmikroskopie und Standardmethoden wie Immun- und Enzymhistochemie sowie für verschiedene Färbungen geeignet [Lang G. 2013]. Die so fixierten Knochenschnitte konnten anschließend dazu verwendet werden, Dünnschliffe (20 – 30µm) bzw. Semi- (0,5 - 2µm) und gegebenenfalls Ultradünnschnitte (ca. 50nm) mithilfe der Bandsäge unter Wasserkühlung herzustellen.

Dazu sind die Probenblöcke mithilfe eines angerührten Sirups (T4000) und der EXAKT-Vakuum-Klebevorrichtung planparallel auf einem Objektträger (OT) aufgebracht worden, damit eine spätere Aufblockung durch die Vakuumpumpe möglich sein würde. Nach Aushärtung und Polymerisation der Masse (etwa nach 2 Minuten) konnte dann der überschüssige Kleber mit einem Skalpell entfernt werden. Danach mussten die Proben noch für 30 Minuten auf die Heizplatte einer Glas-Exikatorglocke, angeschlossen an eine Vakuumpumpe (<-35mbar), für die vollständige Blocktrocknung gelegt werden.

Die so präparierte Knochenprobe ist nach dem ersten Planparallel-Schleifen (320er- bzw. 500er-Schleifpapier) an vier Stellen mittels einer Mikrometerschraube mit Digitalanzeige ausgemessen und die Dicke des OT abgezogen worden, um eine gleichmäßige Dicke der Probe nachprüfen und gegebenenfalls nachschleifen zu können. Alle gemessenen Daten während des Säge- und Schleifvorgangs wurden dabei in ein entsprechendes Messprotokoll eingetragen.

Nachdem die nur noch einige Millimeter dicke Knochenprobe planparallel geschliffen und ausgemessen worden war, wurde sie mithilfe eines Präzisionsklebers (T7210) auf einen mit Diamantschreiber beschrifteten zweiten OT geklebt und nach Beendigung der Polymerisation erneut ausgemessen.

Nun konnte die Anfertigung des Schliffes durch das EXAKT-Trennschleifsystem beginnen. Dazu ist der OT mit Vakuum an der Vakuumplatte angesaugt und die Halterung so vor dem Sägeblatt arretiert worden, dass der OT möglichst nah am Band befestigt war. Für weitere Schliffe mussten dann anschließend das Planparallel-Schleifen, Ausmessen, Kleben und erneute Sägen wiederholt werden.

Nachdem die Erstellung des ersten Schliffes abgeschlossen war, sind die Proben mit dem Ziel, die Implantat-Knochenoberfläche sichtbar zu machen, mittels Vakuumsaugung in das EXAKT-Mikroschleifsystem (400 CS) und Steuerungselement (EXAKT AW 10) eingebracht worden.



Abb. 6.6: EXAKT-Mikroschleifsystem (400 CS) und Steuerungselement (EXAKT AW 10).

Unter ständiger Wasserspülung wurden dann die Proben über einen rotierenden Teller mit 320er-Schleifpapier so lange bewegt, bis das Implantat vollständig sichtbar gemacht worden war. Anschließend ist dann die Probe nachpoliert und der Schliff wieder an vier Stellen gemessen sowie der höchste Wert in das Protokoll eingetragen worden, wobei jeweils die Kleberdicke zu subtrahieren war. Die so entstandenen Schliffe konnten dann im Anschluss für die Färbung verwendet werden. Die für die Fluoreszenzmikroskopie bestimmten Objekte wurde aussortiert.

So ergaben sich folgende Schritte für die Berechnung des Messprotokolls:

| | |
|-------------------------|--|
| Eingangs-Nummer | |
| Sandwich | Plexiglas-OT + Block + Kleber + ausgemessene Glas-OT-Dicke |
| - absolute Dicke | Plexiglas-OT + Block + Kleber |
| - OT | ausgemessene Glas-OT-Dicke |
| = Kleber | Sandwich - absolute Dicke - Glas-OT-Dicke |

Tab. 6.6: Schema des Messprotokolls bei der Schliffherstellung.

| | |
|-------------------------|-----------------|
| Eingangs-Nummer | 145/12 I |
| Sandwich | 11371µm |
| - absolute Dicke | 9471µm |
| - OT | 1866µm |
| = Kleber | 34,0µm |
| Messung Säge | 244µm |
| 1. Messung | 260µm |
| 2. Messung | 200µm |
| 3. Messung | 152µm |
| 4. Messung | 129µm |
| End-Dicke | 128µm |

Tab. 6.6.1: Beispiel der Vorbereitung für den Schliff 145/12 I.

6.7 Standardfärbung, TRAP-Färbung und Histomorphometrie

Da als Schwerpunkt dieser wissenschaftlichen Arbeit die histomorphometrische Auswertung der Fluoreszenz gefärbten Proben gewählt worden war, sind die Toluidinblau gefärbten Schnitte lediglich zur makroskopischen Übersicht als Standardfärbung (Toloniumchlorid, Reagenz mit den Inhaltsstoffen Methanol, Wasser, Glycerin und Toluidinblau) für die spätere Ermittlung des neu gebildeten Knochens angefärbt worden.

Für die Standardfärbung sind die Proben jeweils für eine Minute mit dem Toluidinblau-Reagenz (1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt und filtriert) bedeckt und anschließend gemäß der aufsteigenden Alkoholreihe entfettet worden. Danach wurden die Schnitte eingedeckt.

Toluidinblau eignet sich deshalb für die lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Voruntersuchung, da es gut durch das stärker aushärtende Einbettungsmedium Epoxidharz in die einzelnen Schichten des Präparats einzieht sowie mit seiner intensiven Blaufärbung gleichzeitig der relativen Elektronendichte des Materials entspricht. Ebenso lassen sich durch diese Routinefärbung biologische Gewebebestandteile wie zum Beispiel Osteoblasten (hellblau) und Knorpel (violett) differenzierter voneinander darstellen [Rehmet R. 1997].

Um die in beschichteten und unbeschichteten Knochenschliff-Präparaten enthaltenden TRAP-positiven Zellen (z.B. Osteoklasten) und ihre flächenmäßige Anzahl darzustellen, sind zwölf Schliffe mit Tartrat-resistenter Saurer Phosphatase (TRAP), einer Enzymfärbung für knochenresorbierende Zellen, angefärbt worden.

Die TRAP ist ein Isoenzym der Sauren Phosphatase und fällt bei knochenresorptiven Vorgängen vermehrt an.

Die gefärbten Präparate sind nach einer Austrocknungszeit von mindestens 24 Stunden und maximal einer Woche bei histomorphometrischen Untersuchungen weiterverwendet worden.

Osteoklasten-Enzymfärbung:

1. Entplasten

- a. 3x je 5 Minuten mit MEA I-III auf dem Rüttler (adR)
- b. 2x je 5 Minuten mit technischem Aceton (adR)

2. Rehydrieren

- a. 2x je 5 Minuten Aceton (technisch) + Aqua Dest (1:1) (adR)
- b. 2x je 5 Minuten Aqua Dest (adR)

3. Schnitte einkreisen

Mit einem *Pap Pen*-Fettstift, um das Verlaufen der Farbe auf dem OT zu verhindern

4. Spülen

1x 10 Minuten mit 0,1M (pH 5,2) Natriumacetat-Puffer (adR)

5. Färben (Auftropfung der Färbelösung innerhalb des *Pap Pen*-Kreises)

Färbelösung 1 (35mg Naphtol-AS-TR-Phosphat in 125µl N-N-Dimethylformamid (DMF)

+ Färbelösung 2 (57,5mg Na-Tartrat in 1ml Na-Acetatpuffer mit 35mg Echtrotsalz („*Fast Red*“) in 1ml Na-Acetat-Puffer

6. Proben für ca. ½ Stunde in den Wärmeschrank

Rotfärbung der Osteoklasten unter dem Mikroskop überprüfen und ggf. die Proben für ein paar weitere Minuten zurück in den Wärmeschrank

7. Abspülen der Färbelösung

Die Proben in Aqua Dest tauchen und abspülen (3x 5 Minuten adR)

8. Gegenfärbung mit Hämatoxylin

Jede Probe für 40 Sekunden mit *Shandon Instant-Hämatoxylin* versehen und danach erneut mit Aqua Dest abspülen

9. Bläuen

10 Minuten die Proben unter fließendem Leitungswasser eintauchen und danach mit Aqua Dest abspülen

10. Eindeckeln mit Glyceringelatine

Kaisers Glyceringelatine im 70°C-heißen Wasserbad verflüssigen und dann unter gleichmäßiger Absenkung der Deckplatte alle Luftblasen aus der Gelatine verdrängen und anschließend mit Eisengewichten beschwert aushärten lassen

11. Trocknung und Aufbewahrung der Präparate

- a. Für mindestens 24 Stunden sind die Gewichte auf den Deckplatten belassen worden
- b. Einsortierung der beschrifteten Präparate in OT-Kasten

Nachdem die Enzymfärbung der zwölf ausgewählten Knochenschliffe beendet worden war, mussten die Proben, um eine möglichst intensive Färbung dokumentieren zu können, zeitnah unter dem Photomikroskop (Carl Zeiss Axioplan-Mikroskop, Leica DC 500) fotografiert und über ein Software-Programm (IM 100) an einen Computer gesendet werden. Die Schwierigkeit beim Fotografieren bestand dabei in der Größe der Knochenschliffe. So konnten unter dem Photomikroskop jeweils nur Teilausschnitte erfasst und aufgenommen werden, was ein genaues und überlappendes Fotografieren nötig machte.

Zur Kontrolle der Vollständigkeit eines Präparates wurden deshalb die Einzelbilder nach dem Fotografieren überlappend in einem *Photoshop* (PS)-Dokument angeordnet und überprüft, bevor sie dann mit *Photomerge* (PS) zusammengesetzt und ausgewertet worden sind.

Vorbereitung und Durchführung der histomorphometrischen Untersuchungen (jeweils für die TRAP- und Fluoreszenz-Bilder)

Bereits im 19. Jahrhundert machte sich der französische Geologe und Mineraloge Achille Delesse Gedanken darüber, wie man von zweidimensionalen, flachen

Schnittpräparaten oder Bildern einen Rückschluss auf die dreidimensionale Struktur schließen könnte. Schließlich entwickelte er die so genannte „Geometiko-statistische Methode“ [Delesse AE. 1848], die, angewendet auf morphologische Eigenschaften, zunächst das Prinzip der Morphometrie und später bei der quantitativen Auswertung histologischer Präparate, die Histomorphometrie begründete [Hollinger JO, Buck D, Schmitz JP. 1994].

Mithilfe dieser histomorphometrischen Methode sollten die zuvor fotografierten Präparate in PS durch Festlegung eines genau definierten *Area of Interest* (AOI) und Ausmessung der AOI-, Implantat- und Fluoreszenzfläche, auf das Verhältnis von neu gebildetem Knochen zu übrigem Gewebe im AOI des Defektbereichs untersucht werden. Diese quantitative Messung an einem histologischen Präparat mittels Lichtmikroskopie ist das Standardverfahren, um morphologisch bedeutsame Aussagen über das Vorkommen, Volumen und die Dichte von neugebildetem Knochen in einem ausgewähltem Bereich machen zu können [Hollinger J, Kleinschmidt J. 1990].

Da mehrere Knochenschnitte eines Implantates vorlagen und auf neu gebildeten Knochen hin untersucht werden konnten, konnte eine nach der histomorphometrischen Ausmessung stattfindende rechnerisch ermittelte dreidimensionale Vorstellung des um und in das Implantat gewachsenen Knochengewebes gewonnen werden.

Das von Feifel (1994) beschriebene mathematische Prinzip, das hinter der histomorphometrischen Auswertung steht, zeigt eine Proportionalität von dem Volumenanteil der Präparatprobe zu dem im Gewebeabschnitt befindlichen Flächenanteil eines Ausschnittes dieser Komponente auf [Feifel H et al. 1994].

Die heutige Anwendung dieser Methode soll in den folgenden Schritten kurz beschrieben werden.

Voreinstellungen Lichtmikroskop:

Lichtweg auf Okular und Kamera 50:50

Kondensor zentriert, hochgedreht mit offener Blende; Einstellung „H“

Filterräder auf „12“ und „6“; Dimmer auf „2“

Voreinstellungen Computer-Software:

„Multifokus“ einstellen

Shadingkorrektur, Weissabgleich, Farbkorrektur durchführen

Farbtiefe: 8 Bit/V.; Farbtyp: Farbe; Bildgröße: 1300x1030

Einstellungen Photomerge und Bildbearbeitung:

„interaktives Layout“ einstellen

„Füllbilder ergänzen“ und „Stapelverarbeitung“ auswählen

Einfügen eines μ -Striches für die Bestimmung des Maßstabs nach dem Zusammensetzen der Einzelbilder

- Schritt 1:** mäanderförmiges Erstellen von Teilaufnahmen eines Präparates bei 2,5-facher Vergrößerung sowie Detailaufnahmen mit 5-facher und 10-facher Vergrößerung mit dem Photomikroskop und mit an den PC angeschlossener Leica-Kamera DC 500
- Schritt 2:** Überprüfung der Vollständigkeit des fotografierten AOI mithilfe von PS (CS-Version)
- Schritt 4:** automatisches Zusammensetzen der Einzelbilder durch *Photomerge* in PS zu einer Übersichtsaufnahme, wobei das interaktive Layout für ein verzerrungsfreies Zusammensetzen sorgt
- Schritt 5:** erneute Überprüfung der Vollständigkeit der erstellten Übersichtsaufnahme
- Schritt 6:** Einfügen eines μ -Striches (1mm) als Maßstab im Bild und Kalibrierung (Festlegung der Messskala und Berechnung der Logischen Länge und Einheit von 1mm; hier: 245 Pixel $\hat{=}$ 1mm)
- Schritt 7:** Bestimmen des AOI mit einem Durchmesser von 43cm x 43cm und exakter Anpassung an die Außenkrümmung des Implantats mit anschließender Erweiterung des AOI um 100 Pixel
- Schritt 8:** Messen des AOI und Abspeicherung der AOI-Ebene sowie der Messprotokoll-Werte
- Schritt 9:** Erstellen einer eigenen Implantat-Ebene durch Markierung des Implantatbereichs mit dem „Zauberstab-Werkzeug“ in PS und Berechnung der Implantatfläche

Schritt 10: Auswählen des „Zauberstab-Werkzeuges“ und Einstellung der Toleranz für den zu markierenden Bereich im AOI; nun musste die jeweils zu messende Färbung im AOI markiert und nach Korrektur der automatisch erfassten Farbbereiche ausgemessen werden

(Cave: Die Toleranz hängt von der Intensität der Farbe ab, wobei ein höherer Toleranzwert zwar automatisch mehr Fläche mit der entsprechenden Färbung markiert, jedoch ungenauer in der Auswahl der exakt zu der zu bestimmenden Färbung angehörenden Fläche wird)

Schritt 11: Eintragen der Messergebnisse in eine Excel-Tabelle und Berechnung des neugebildeten Knochengewebes aus den Werten von AOI-, Implantat- und der angefärbten Fläche für die beschichteten (b) und unbeschichteten (ub) Präparate

| Präparat | TRAP-pos.-Zellen [%] | Beschichtung |
|----------|----------------------|--------------|
| Schaf 6 | 1,304 | ub |
| Schaf 10 | 0,491 | ub |
| Schaf 12 | 0,447 | ub |
| Schaf 14 | 0,059 | ub |
| Schaf 16 | 0,233 | ub |
| Schaf 24 | 0,219 | ub |
| Schaf 11 | 0,663 | b |
| Schaf 15 | 0,475 | b |
| Schaf 19 | 0,465 | b |
| Schaf 21 | 0,412 | b |
| Schaf 23 | 0,412 | b |
| Schaf 25 | 0,241 | b |

Tab. 6.7: In PS histomorphometrisch gemessene und auf die prozentuale Fläche im AOI berechneten Werte der TRAP- pos.-Zellen.

Rechnung: $TRAP\text{-pos.-Zellen} * x 100 / (AOI * - (Gewebe + Implantat) *)$

* mit PS histomorphometrisch ermittelter Wert

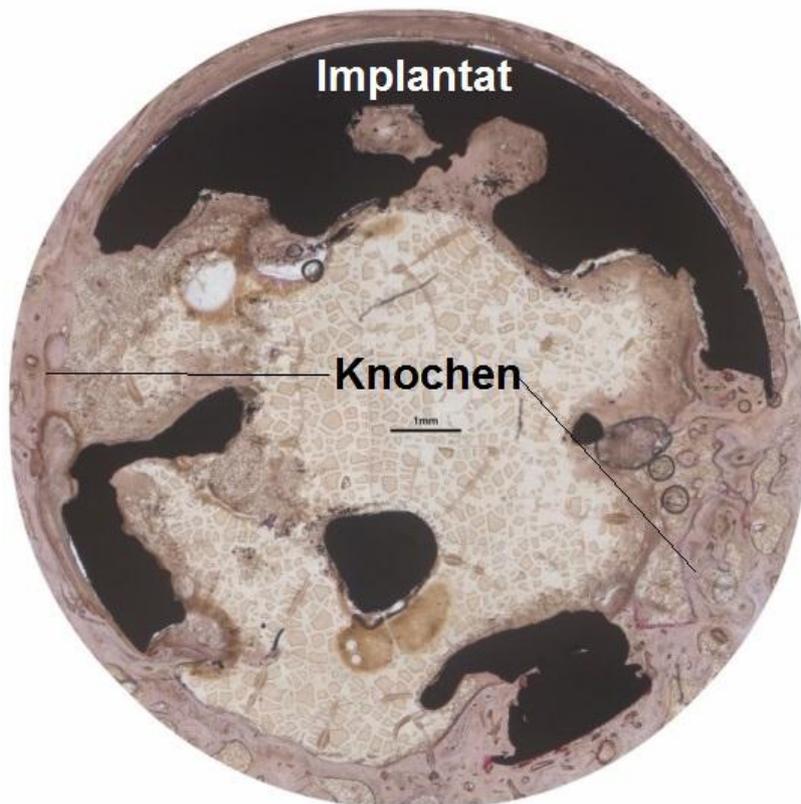


Abb.6.7:
Lichtmikroskopbild einer TRAP-Färbung für die histomorphometrische Ausmessung in PS.

Die statistische Auswertung der Werte für die beschichteten und unbeschichteten Ergebnisse ergab schließlich folgende Werte im „U Test“ (U Test Result TRAP 2013):

| Anzahl [b] | Anzahl [ub] | U | P (two-tailed) | P (one-tailed) |
|-------------------------------|-------------|------|----------------|----------------|
| 6 | 6 | 22,0 | 0,588744 | 0,294372 |
| normal approx z = 0,640513 | | | 0,52184* | 0,26092* |

* Diese Werte sind Näherungswerte

Tab. 6.7.1: Ergebnis der Signifikanzberechnung für die TRAP-pos.-Zellen in beschichteten und unbeschichteten Präparaten im U-Test:
 $P \geq 0,05$, two-tailed test.

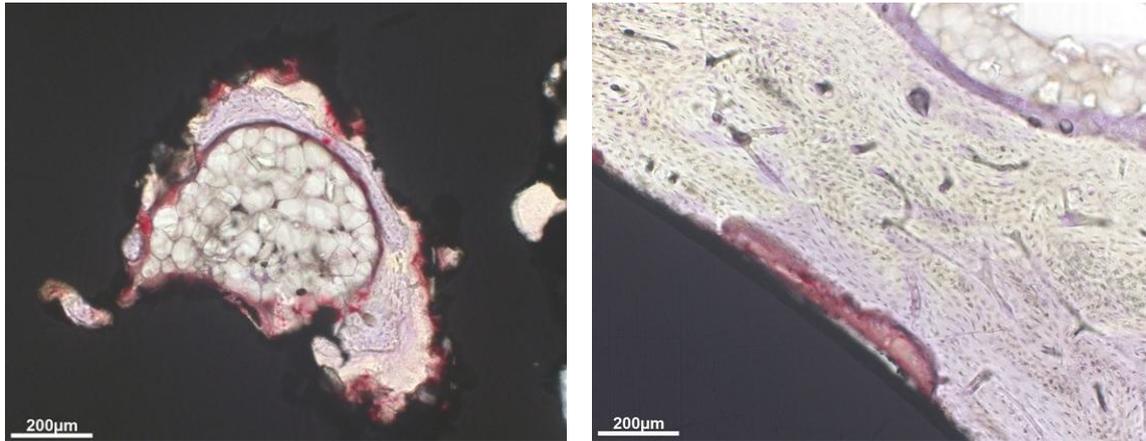


Abb. 6.7.1: Detailaufnahmen von unbeschichteten TRAP-Präparaten. Rot angefärbt sind unter anderem die in Nestern vorkommenden Osteoklasten.

6.8 Histomorphometrische Auswertung der Fluoreszenz-Markierung

Wie bereits für die TRAP-Proben beschrieben, ist mit den Fluoreszenz-Präparaten nach dem gleichen Schema beim Fotografieren, zusammensetzen der Einzelbilder und bei der Bearbeitung in PS verfahren worden.

Diesmal wurde nach Berechnung der AOI- und Implantatfläche nur die durch den Fluoreszenzfarbstoff grün gefärbte Fläche im Präparat markiert. Die rote und gelbe Fluoreszenz wurde in dieser wissenschaftlichen Arbeit nicht weiter berücksichtigt.

Aus insgesamt 82 Einzelschnitten aller für die Histomorphometrie vorgesehenen Schafe wurden jeweils 4-9 zu einem Schaf gehörenden Schnitte histomorphometrisch ausgemessen und zugeordnet. So konnten schließlich aus vielen Einzelpräparaten Mittelwerte für jeweils ein Schaf errechnet werden. Zum Schluss ergaben sich für jeweils sechs beschichtete und unbeschichtete Implantate die prozentualen Werte des im AOI neu gebildeten Knochens.

Da es zu jedem Implantat jeweils mehrere Knochenschnitte gab, deren Werte für den neu gebildeten Knochen nach Ausmessung gemittelt wurden, ist auf dreidimensionaler Ebene der Knochen im Interface-Bereich innerhalb der AOI erfasst worden.

Die Anzahl der angefertigten Knochenschnitte richtete sich dabei jeweils nach der Dicke der vorhandenen Femurkondyle und konnte daher nicht einheitlich gewählt werden.

| Präparat | Einzelchnitte | grüne Fluoreszenz [%] | Beschichtung |
|-----------------|----------------------|------------------------------|---------------------|
| Schaf 6 | 7 | 2,088 | ub |
| Schaf 10 | 6 | 2,295 | ub |
| Schaf 12 | 7 | 3,152 | ub |
| Schaf 14 | 8 | 5,644 | ub |
| Schaf 16 | 9 | 2,658 | ub |
| Schaf 24 | 6 | 2,354 | ub |
| Schaf 11 | 8 | 7,916 | b |
| Schaf 15 | 4 | 2,860 | b |
| Schaf 19 | 7 | 2,029 | b |
| Schaf 21 | 5 | 3,741 | b |
| Schaf 23 | 9 | 4,257 | b |
| Schaf 25 | 5 | 1,705 | b |

Tab. 6.8: In PS histomorphometrisch gemessene und auf die prozentuale Fläche im AOI berechnete Werte der Calcein-Grün-Fluoreszenz.

Rechnung: $\text{Calcein-Grün-markierte Fläche} \times 100 / (\text{AOI} - (\text{Gewebe} + \text{Implantat}))$

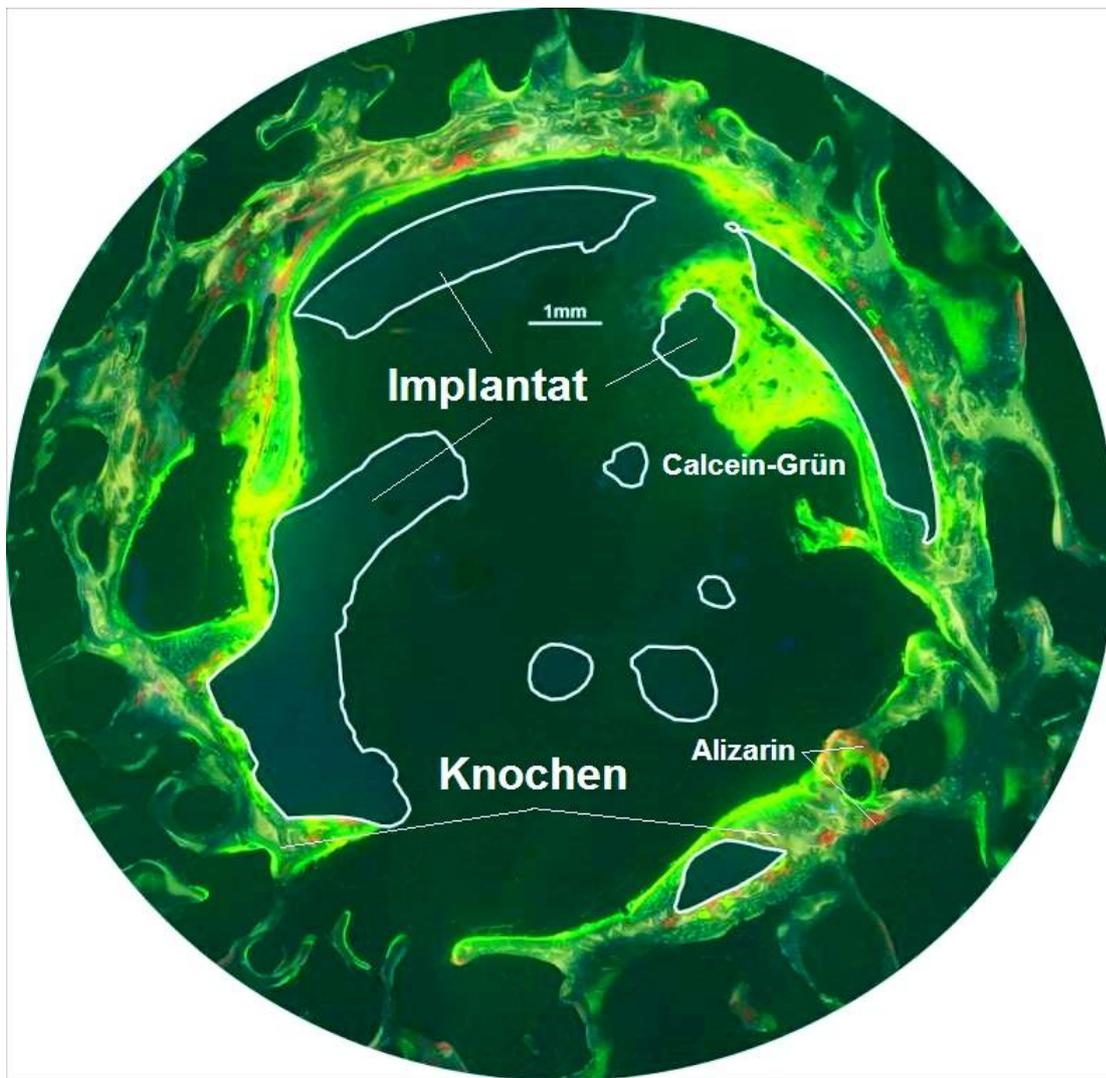


Abb. 6.8: Das Bild zeigt die in PS festgelegten AOI. Das Bild soll als Beispiel für ein mit den drei Fluorochromen angefärbtes Präparat dienen. Am wenigsten gut lässt sich aufgrund seiner braun-gelben Färbung das OTC im Knochengewebe abgrenzen.

Die ebenfalls im „U-Test“ ermittelten Werte für die beschichteten und unbeschichteten Präparate ergaben folgendes Resultat:

| Anzahl [b] | Anzahl [ub] | U | P (two-tailed) | P (one-tailed) |
|-------------------------------|-------------|----|----------------|----------------|
| 6 | 6 | 20 | 0,818182 | 0,409091 |
| normal approx z = 0,320256 | | | 0,748774* | 0,374387* |

Tab. 6.8.1: Ergebnis der Signifikanzberechnung im U-Test:
 $P \geq 0,05$, two-tailed test.
 * Diese Werte sind Näherungswerte

6.9 Rasterelektronen- und Transmissionselektronenmikroskopie

Beispielhaft wurden je ein beschichteter und unbeschichteter Knochenschnitt (Schaf 12; 25) mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) fotografiert. Da das REM Gegenstände statt mit Licht mit Elektronen „rastert“ und diese Wechselwirkungen mit dem Objekt auf einem Computer dargestellt werden können, ist die Auflösung um ein Vielfaches höher und neben der dreidimensionalen Darstellung des Objekts lassen sich kleinste Details mit einem Verhältnis von 1.000.000:1 scharf wiedergeben.

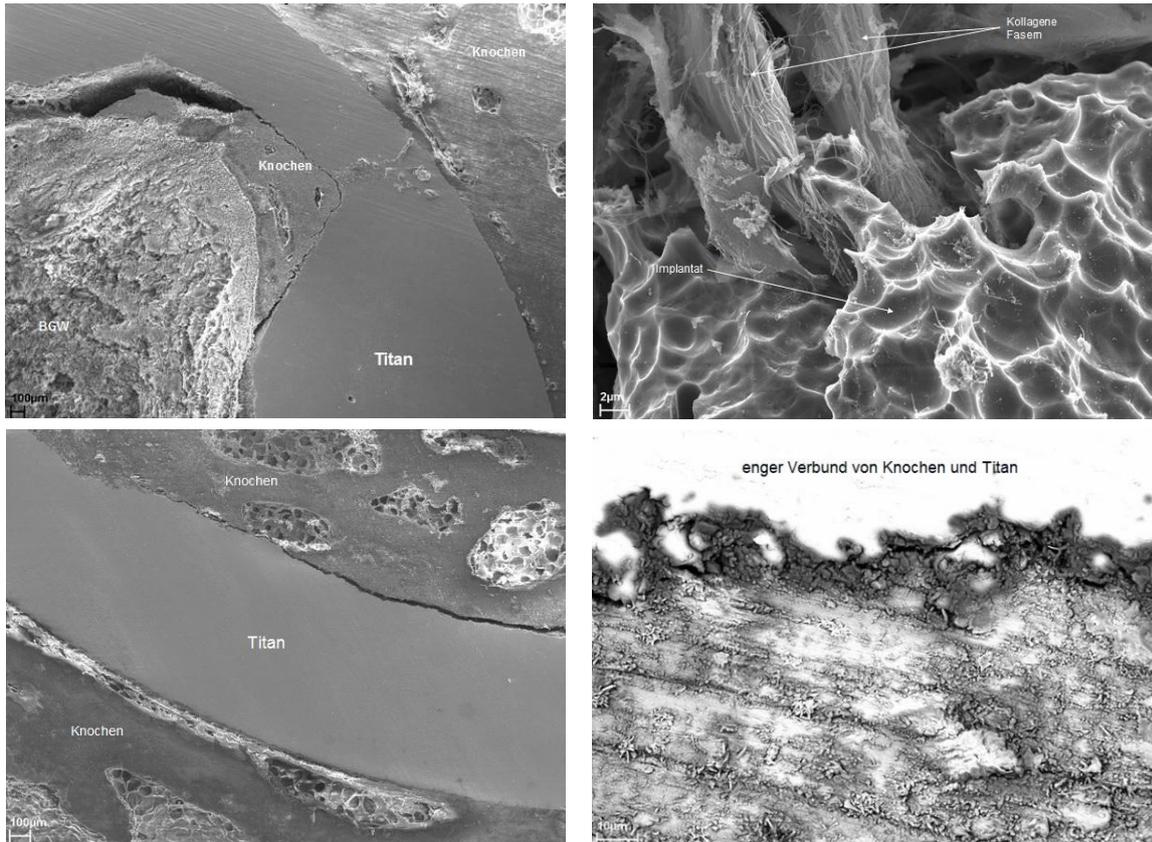


Abb. 6.9: Die obere Bildreihe zeigt REM-Aufnahmen beschichteter Implantate, die untere Bildreihe zeigt REM-Aufnahmen unbeschichteter Implantate und jeweils ihre Beziehung zu neu gebildetem Knochen- und Bindegewebe im Interface-Bereich.

Die direkte Abbildung über einen Zwischenprojektor von durch einen Elektronenstrahl durchleuchteten Proben erfolgt über die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Da die Probe von dem Elektronenstrahl durchdrungen werden muss, ist die Auflösung des Bildes umso höher, je dünner die Probe ist [Michler GH, Lebek W. 2004].

Im Fall der beschichteten und unbeschichteten Proben konnten mithilfe einer höheren Auflösung und detaillierten Projektion unter anderem einzelne Zellen und das Verhältnis von Knochen- und Bindegewebe im Interface-Bereich dargestellt werden. So konnte besonders die Beziehung von Implantat zu umliegendem Gewebe beurteilt und beispielhaft beschrieben werden.

6.10 Qualitative und quantitative PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine Methode, Erbmaterial in Form von Desoxyribonukleinsäure (DNA) für die Vervielfältigung eines kurzen (3-30 kbp), definierten Teils eines DNA-Strangs in vitro zu nutzen.

Dabei bezeichnet der Begriff „Kettenreaktion“ die Tatsache, dass Produkte aus vorausgegangenen Vervielfältigungszyklen erneut als Ausgangsstoffe für den jeweils nachfolgenden Zyklus verwendet werden, wobei ein PCR-Prozess aus 20-50 Zyklen bestehen kann. So kann aus relativ wenig Probenmaterial eine ausreichend große Menge an DNA erzeugt und für biologische oder medizinische Nachweise auf dem Gebiet der Erbkrankheiten, Virusinfektionen, dem Klonen von Genen und Erstellen genetischer Fingerabdrücke genutzt werden [Weissensteiner T. 2004].

Die für eine erfolgreiche PCR benötigten Zutaten und Voraussetzungen setzen sich aus folgenden Komponenten zusammen:

1. Original-DNA mit Template (der zu vervielfältigende Abschnitt)
2. 2x Primer (Festlegung der Startpunkte auf der DNA und beidseitige Begrenzung)
3. DNA-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase für die Replizierung)
4. Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP) als DNA-Bausteine
5. Mg²⁺-Ionen (essentiell für Polymerase-Funktion)
6. Pufferlösung (chemische Umgebung für DNA-Polymerase)
7. Thermocycler (Maschine zur exakten Einstellung der Reaktionstemperatur)
8. ggf. Pyrophosphatase (Effektivitätssteigerung der PCR)

Die klassische PCR-Technik ist im Laufe der Zeit durch einige Varianten erweitert worden. So ist zum Beispiel die Methode der *Real-Time-PCR* oder auch der quantitativen PCR (qPCR) etabliert worden, die für jeden durchgeführten Zyklus mithilfe eines beigefügten Fluoreszenzfarbstoffes in Echtzeit einen Rückschluss auf die Menge

der amplifizierten DNA zulässt. Dabei aktiviert die DNA-Produktion den in inaktivem Zustand beigefügten Fluoreszenzfarbstoff (entweder durch Interkalierung in die DNA mit z.B. *SYBR® Green* bzw. Ethidiumbromid, oder durch Elimination eines die Fluoreszenz entfernenden *Quenchers*). Die quantitative Bestimmung in der exponentiellen Phase wird durch die zusätzliche Ermittlung eines Schwellenwertes für das Fluoreszenzsignal möglich, da die Fluoreszenz proportional zur Target-DNA-Menge ansteigt. Anhand von Standardkurven lässt sich dann die absolute Quantifizierung (Kopienzahl pro Reaktion) ermitteln.

Vor allem die verbesserte Spezifität durch Ermittlung der Fragmentlänge(n) am Ende der PCR und die sehr gute Sensitivität der qPCR bieten neben der Zeiteinsparung eine enorme Verbesserung gegenüber der klassischen PCR. Zudem ist es nicht mehr nötig, die Amplifikate gelelektrophoretisch nach ihrer Länge aufzutrennen und sichtbar zu machen [Marusina K. 2013].

Eine allgemein übliche Rezeptur für die Durchführung einer PCR stellt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

1. 1,0µl DNA-Lösung (100ng/µl)
2. 2,0µl/ Primer (2x zu 10µmol)
3. 1,0µl 10mmol dNTPs
4. 5,0µl 10-fach konzentrierte Polymerase-Pufferlösung
5. 38,0µl H₂O
6. 1,0µl Pfu-, Taq- u.a. thermostabile Polymerasen (1-5U/µl)

→ insgesamt 50,0µl Gesamtvolumen

Nachdem das 50µl-Gemisch in ein oder mehrere zusammenhängende Reaktionsgefäße mit einem Einfüllvolumen von 200µl in den Thermocycler gegeben wurde, beginnt der in der Regel aus drei Schritten bestehende PCR-Zyklus:

1. **Denaturierung** (Schmelzen) der doppelsträngigen DNA bei 94-96°C zur Auftrennung der Wasserstoffbrückenbindungen und somit der Stränge. Die Initialisierung im ersten Zyklus soll dabei die vollständige Trennung von Ausgangs-DNA und der Primer gewährleisten. Um eine Rückbildung der Doppelhelix zu verhindern, erfolgt im Anschluss eine schnelle Abkühlung auf 65°C.
2. **Primerhybridisierung** (*primer annealing*) der Primer an die DNA für 30 Sekunden bei 55-65°C.
3. **Elongation** (Amplifikation) durch Auffüllung der fehlenden Stränge mit den Nukleotiden durch die DNA-Polymerase. Start ist am 3'-Ende des angelagerten Primers mit Richtung in 5'-Ende des DNA-Strangs, wobei der Primer ohne vorherige Ablösung direkt mit der Bildung eines neuen Einzelstrangs beginnt.

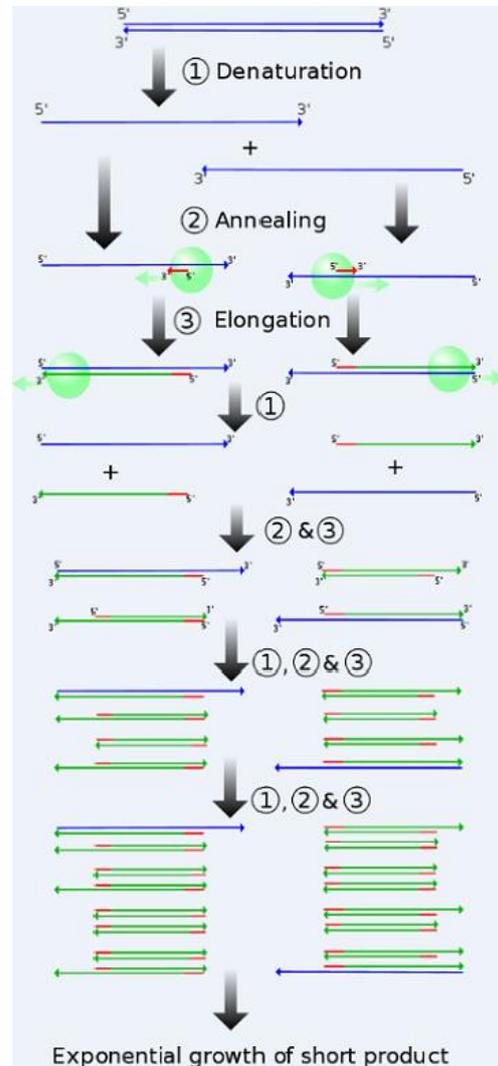


Abb. 6.10: PCR-Schema [www.hortipendium.de/Polymerase-Kettenreaktion].

In diesem Versuch sollte die quantitative und qualitative PCR-Analyse von Cathepsin-K als Marker der Knochenresorption einen eventuell vorliegenden Unterschied einer verminderten Knochenresorption in Proben mit Reaktionsschicht gegenüber unbeschichteten Proben aufzeigen. Die qPCR eignet sich dabei besonders für die Aufzeigung kleinster Unterschiede in der Genexpression.

Dazu wurden 11 nicht perfundierte Präparate ausgewählt, die durch *Real-Time-PCR* und eine herkömmliche molekularbiologische PCR-Analyse auf ihre Cathepsin-K-Expression untersucht worden sind.

| | beschichtet | unbeschichtet | Leerdeфекt |
|-----------------|--------------------|----------------------|-------------------|
| qPCR/PCR | 5x | 5x | 1x |

Tab. 6.10: Anzahl der nicht perfundierten Proben für die qualitative und quantitative PCR-Analyse.

Um an die gewünschte RNA-Probe aus dem Knochenpräparat zu gelangen, wurde als erster Schritt eine RNA-Isolation und anschließende –Extraktion durchgeführt. Dazu wurde ungefähr 100mg Material aus dem Innern des Implantats entnommen. Die Isolation wurde mithilfe des *RNeasy® Lipid Tissue Kit (Qiagen)* vorgenommen. Die Vor- und Aufbereitung der Proben wurden nach Herstellervorgaben mit dem Einweg-Homogenisierungssystem *Ultraturrax® Tube Drive* durchgeführt. Das Zerkleinern und Homogenisieren der Proben fand unter einer hermetisch abgedichteten Atmosphäre statt, wobei das Einwegsystem die *Cross-Kontamination* durch vorherige Probenaufbereitungen verhinderte. Damit keine Ergebnisse durch DNA-Verschleppung verfälscht werden konnten, wurde der Homogenisierungsstab mit je 1ml Diethylpyrocarbonat (DEPC) auf einen Liter destillierten Wassers gereinigt, um so die sich eventuell auf dem Stab befindende RNA zu deaktivieren. Das nach der Extraktion erhaltene „Ziel-RNA-Gemisch“ (Eluat) wurde sofort in eine Schraubdeckeltube überführt und auf Eis gestellt.

Um festzustellen, wie viel von dem gewonnenen Eluat weiter verwendet werden kann, wurde der RNA-Gehalt von je 1µl Eluat mithilfe des „*Nano-Drop-Spektralphotometers*“ gemessen und anschließend bei -80°C eingefroren. Als „*Housekeeping*“-Gen wurde β 2-Microglobulin (β 2M) gewählt, welches die kleinere Untereinheit des *Major Histocompatibility Complex (MHC)* darstellt und auf fast allen Zellen wirbelhaltiger Tiere vorkommt. Da es in jeder Probe vorhanden sein sollte, definiert es den Nullpunkt in den Kontrollläufen und der nachfolgenden Auswertung.

Qualitative PCR mit AmpliTaq Gold; Applied Biosystems

Housekeeping-Gen: HK 02 β 2M/ sh/ 159 (Ann. Temp. 58°C; 159 bp erwartet)

| <u>Primer:</u> β -2-Microglobulin | |
|--|----------------------------------|
| Forward | 5' CCA GAA GAT GGA AAG CCA AA 3' |
| Reverse | 5' AGC GTG GGA CAG AAG GTA GA 3' |

Tab. 6.10.1: Primer für β 2-Microglobulin.

Rezept:

1. 1,0 μ l cDNA
2. 2,5 μ l PCR Puffer II (10x)
3. 2,0 μ l $MgCl_2$ (25mM)
4. 0,625 μ l dNTPs (10mM)
5. 0,125 μ l AmpliTaq Gold Polymerase (5 U/ μ l)
6. 0,625 μ l Primer f+r (20 μ M)
7. 25 μ l Aq. Inj.

PCR-Programm:

- 95°C 12'
- 95°C 25 ''
- Ann. Temp. 25 ''
- 72°C 25 ''
- 72°C 7 '
- 4°C >

qPCR mit iQ SYBR Green Supermix

Housekeeping-Gen: HK 02 β 2M/ sh/ 159

Probenauswahl (beschichtet/ unbeschichtet):

1. Schaf 6/ 11
2. Schaf 10/ 15
3. Schaf 14/ 19
4. Schaf 16/ 21
5. Schaf 24/ 23

Zusammensetzung der Komponenten:

- cDNA: 1,0 μ l
- Primer (20 μ M St. Lsg.): 0,5 μ l
- iQ SYBR Green Supermix: 12,5 μ l
- H₂O: 11,0 μ l

Zielgen: Ctsk/sh/133

| <u>Primer:</u> Cathepsin-K (ctsk), 133bp | |
|--|----------------------------------|
| Forward | 5' GGG TCA ATG TGG TTC CTG TT 3' |
| Reverse | 5' GCA GCC ATC ATT CTC AGA CA 3' |

Tab. 6.10.2: Primer für Cathepsin-K.

Zusammensetzung der Komponenten:

- cDNA: 1,0µl
- Primer (20µM St. Lsg.): 0,5µl
- iQ SYBR Green Supermix: 12,5µl
- H₂O: 11,0µl

PCR-Programm:

- 95°C 3'
- 95°C 25''
- 58°C 25'' } 40x
- 72°C 25''
- 95°C 1'
- 65°C 1' → 0,5°C/10s → 95°C

Die Ergebnisse der qPCR können mithilfe einer PC-Software anhand von Standardkurven verglichen werden.

Dabei beschreibt der sogenannte Ct-Wert (*Cycle Threshold*) denjenigen Zyklus, in dem erstmals die Fluoreszenz signifikant über den Wert der Hintergrund-Fluoreszenz hinaus ansteigt [Schild TA].

So wurden in die PCR-Maschine jeweils Doppelproben mit cDNA unterschiedlicher Konzentration zur Kontrolle eingegeben. Stellte sich heraus, dass zu große Abweichungen auftraten, wurde die Probe verworfen. Als Ergebnis war eine lineare Gerade zu erwarten.

Die den Zyklen der PCR entsprechenden Werte wurden mit einer Verdünnung einer 10er-/ 100er-/ und 1000er-Konzentration erreicht.

Dabei ging man von der Vermutung aus, dass je früher das Fluoreszenzsignal erschien, umso mehr Material in der Probe zu erwarten war.

So wurden zum Beispiel im Testlauf folgende Ergebnisse mit einem deutlichen Fluoreszenzsignal ermittelt:

- 10er-Verdünnung: nach 19,15 Zyklen
- 100er-Verdünnung: nach 22,11 Zyklen
- 1000er-Verdünnung: nach 25,72 Zyklen

Zu erkennen war, dass je mehr Zyklen benötigt wurden, um ein Signal zu erhalten, die Verdünnung umso größer sein musste.

Die Schmelzkurve zeigt bei einer kontinuierlichen Erhöhung der Schmelztemperatur von 0,5°C alle 10 Sekunden von 65°C auf 95°C dabei die Größe der Fragmentlängen an, da die Denaturierung der DNA bei einer spezifischen Temperatur zu erwarten ist und dabei SYBR Green freigesetzt wird. Verunreinigungen in der Probe werden dabei durch „Peaks“ in der Kurve sichtbar.

Idealerweise verläuft die Null-Probe „Rt-“, parallel zur X-Achse auf „0“ oder ist mindestens 10x später zu sehen und dient als Nachweis für die Brauchbarkeit des Primers.

Das „*Housekeeping-Gen*“ β 2-Mikroglobulin wird dabei für die Definition des Null-Punktes immer mitlaufen gelassen.

Mithilfe der „REST“-Software ermittelten Werte für die hier fünf verwendeten Proben kamen wie folgt zustande:

ΔCt $\hat{=}$ Rt^+ minus den Durchschnittswert der Duplikate
 \rightarrow Zielgen minus *Housekeeping-Gen*

Bsp.: Schaf 6 (-17, 115 minus *Housekeeping-Gen*)

$\Delta\Delta Ct$ $\hat{=}$ Test minus Kontrolle
 \rightarrow beschichtet („treated“)
 $\hat{=}$ Kontrolle
 \rightarrow unbeschichtet („untreated“)

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ $\hat{=}$ relative Expression

Die durch das PC-Programm ermittelten Werte für die Ziel- und Referenzgruppe wurden dann einerseits tabellarisch mit den Ergebnissen für u.a. die Reaktions-Effizienz und Relative Expression, andererseits graphisch mit Darstellung u.a. des Maximums und Minimums für die Relative Expression des Cathepsin-K-Gens sowie des vom Programm ermittelten Medians dargestellt und ließen eine Interpretation bezüglich der Relativen Expression von Cathepsin-K als Marker für den Knochenabbau zwischen beschichteten und unbeschichteten Proben zu.

Gelelektrophorese (qualitative PCR)

Nachdem der PCR-Ansatz vorbereitet worden war, konnte mit der Gelelektrophorese unter der nachfolgend aufgeführten Komponentenzusammenstellung gemäß allgemein standardisierter Vorgaben begonnen werden.

Tris-Acetat-EDTA (TAE) 10x:

- 48,46g Tris Base (Sigma T1503)
- 11,44ml Essigsäure (Merck 1.00063.1011)
- 20ml 0,5M EDTA (Sigma E7889)
- auf 1000ml mit Bidest auffüllen
- pH auf 8,0 einstellen

Bandenmarker:

- 4µl 100Bp-Marker (-20°C)
- 12µl Gel loading buffer (4°C)
- 104µl Bidest

Gel färben:

- 6µl SYBR Green (-20°C) auf 60ml TAE

| [%] Agarose | Dauer (Elektrophorese) | Spannung | Färbung (1x SYBR Green) |
|-------------|---------------------------|----------|----------------------------|
| 2 | 80' | 110V | 20' |

Tab. 6.10.3: Durchführung der Gelelektrophorese.

Fotografieren des Gels:

- Belichtungszeit auf 0, 800''
- Anpassung von Fokus, Zoom und Blende
- UV-Licht zuschalten

In der Gelelektrophorese sieht man die 11 aufgetragenen Proben (je 6µl) mit einer zu erwartenden Länge von 159bp. Zuerst kommt die Positiv-Probe, gefolgt von ihrer Negativ-Probe. Die große Bande an Stelle Nr. 13 ist die 100bp-Positiv-Kontrolle (8µl), die hier 24. Bande (nicht zu sehen) ist die Negativ-Kontrolle.

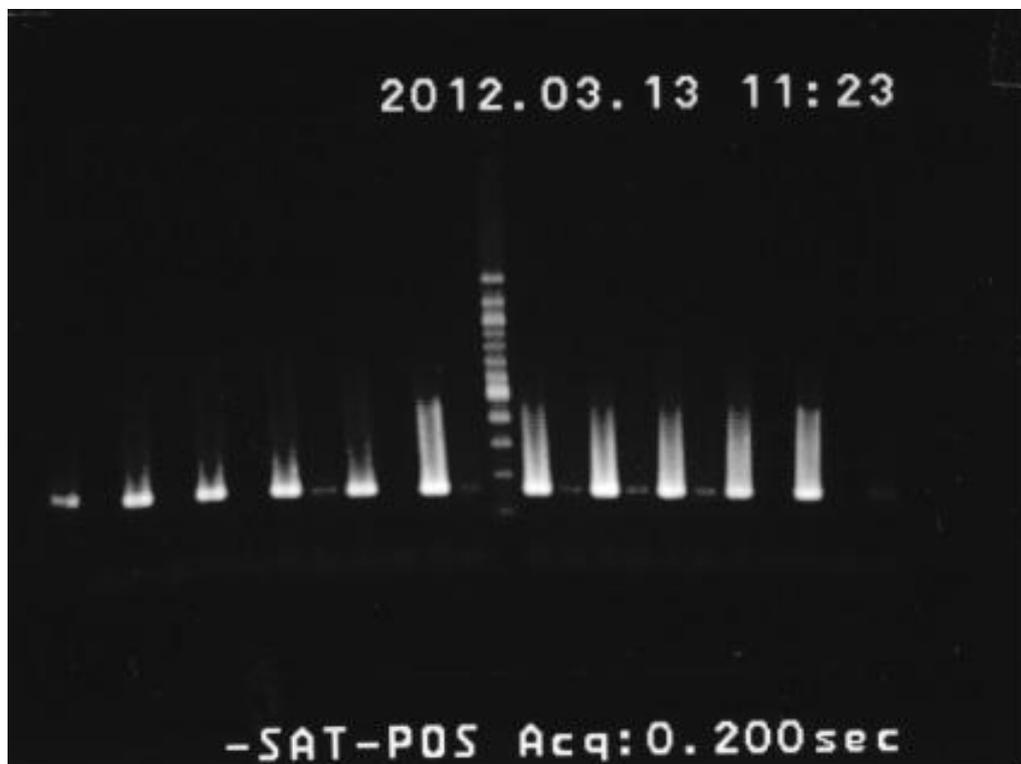


Abb. 6.10.1: Ergebnis der Gelelektrophorese [Labor für experimentelle Unfallchirurgie, Justus-Liebig-Universität Gießen].

6.11 Biomechanik

Die biomechanischen Untersuchungen zur Stressanalyse der Interface-Grenzfläche sind im Institut für Werkstofftechnik in Siegen mit Hinblick auf die Strukturkompatibilität der Implantate und des Umgebungsgewebes von Guillén Giron T et al. (2012) durchgeführt worden.

Als Vorbereitung auf die folgenden morphologischen und analytischen Studien musste das organische Material im Interface-Bereich zunächst gegen Schäden präpariert werden, welche gegebenenfalls durch den Push-Out-Test entstehen könnten.

Dazu wurden im Labor für experimentelle Unfallchirurgie in Gießen die für die Biomechanik vorgesehenen Präparate folgendermaßen vorbehandelt:

1. Säuberung mit 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer
2. Fixierung für 24 Stunden in 2,5% Glutraldehyd und 1%iger Saccharose
3. Wiederholung von Schritt Nr. 1
4. Dehydrierung in Ethanol mit CPD7501 (Thermo VG Scientific)
5. Säuberung metallischer Teile zunächst für 15 Minuten in Ethanol und anschließend für 5 Minuten in destilliertem Wasser
6. Trocknung der Präparate

Guillén et al. erhielten für die weiteren biomechanischen Untersuchungen die 11 präparierten und ausreichend gekühlten Gelenkanteile mit den beschichteten und unbeschichteten Implantaten, welche hinsichtlich der Interface-Stabilität an der Knochen-Implantat-Grenze untersucht werden sollten. Dafür standen speziell dafür konstruierte und kalibrierte Geräte und Messmethoden zur Verfügung.

Eine eigens entwickelte Haltevorrichtung diente dabei der Fixierung der Knochen für die Durchführung des „Push-Out-Tests“ und konnte Knochen einer Länge von $73\pm 5\text{mm}$ und einer Breite von $63\pm 5\text{mm}$ aufnehmen.

Im Vorfeld war mithilfe eines Röntgenbildes der Neigungs- bzw. Ausdrückwinkel errechnet worden, damit das Implantat möglichst gemäß seiner Lage im Gewebe gerade nach unten durchgedrückt werden kann.

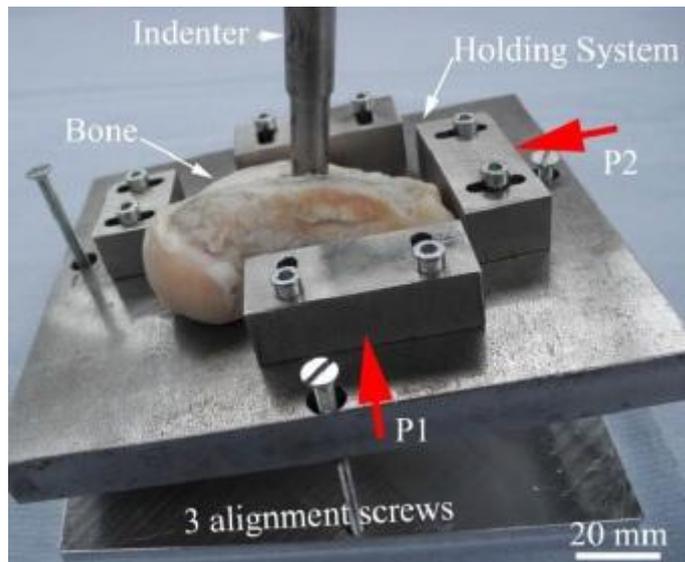


Abb. 6.11.1: Haltevorrichtung mit eingespanntem Knochen und Implantat für die Push-Out-Testung; P1 und P2 zeigen dabei die für die Röntgen-Analyse genutzten Strahlengänge an. Der *Indenter* bezeichnet hier den Eindringkörper [Guillén GT et al. 2012].

Das dabei durch das Ingenieurbüro F. Braun (Zerstörungsfreie Werkstofftechnik; Freudenberg, Deutschland) zur Verfügung gestellte Röntgengerät (Comet MRX 320/26) wurde während der einzelnen Röntgendurchgänge mit 50kV, 5mA und einer Belichtungszeit von 3 Minuten betrieben.

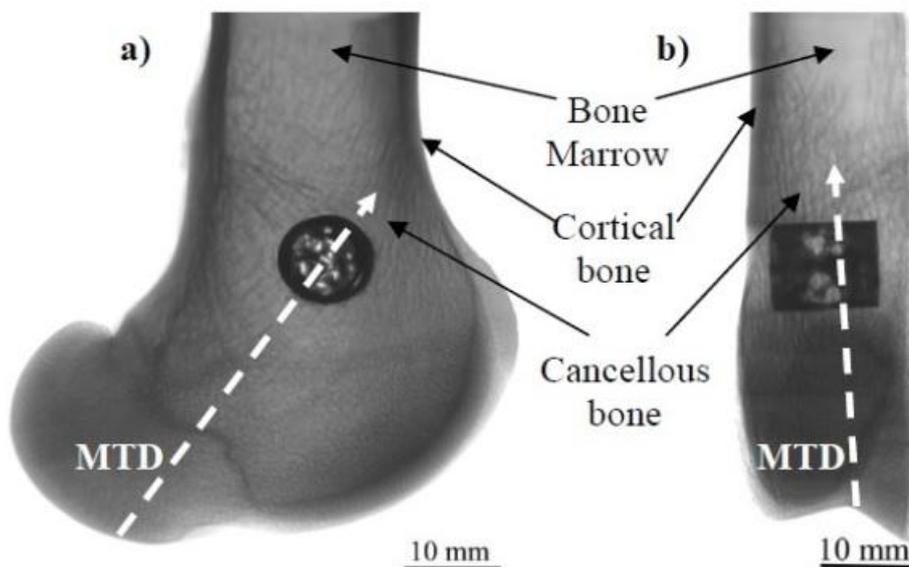


Abb. 6.11.2: Darstellung einer Femurcondyle mit Implantat aus a) frontaler Sicht, b) lateraler Sicht im μ -CT. Pfeile von oben nach unten: Knochenmark, Kortikalis, Spongiosa [Guillén GT et al. 2012].

Im Push-Out-Versuch mit dem MTS 810-System wurde dann der sogenannte Eindringkörper (mit einem Durchmesser von 9,3mm, hier bezeichnet als *Indenter*) auf das Implantat gesetzt und dazu genutzt, unter konstanter Krafteinwirkung von 50kN in einachsiger Richtung zum Implantat und einer Verschiebungsrate von 1mm/min die Ausdruckkraft und aufgenommene Energie zu ermitteln. Das Versagen der Knochen-Implantat-Verbindung wurde dann mit der maximal benötigten Ausdruckkraft gleichgesetzt.

In der Literatur beschrieben ist dabei das sich langsame Lösen dieser Interface-Verbindung mit einem allmählichen Nachgeben der verbundenen Strukturen, bis es dann zu einer auch makroskopisch sichtbaren Implantatlockerung kommt.

Die mit dem Sensor gemessenen Werte werden währenddessen mit einem Programm aufgezeichnet und graphisch sichtbar gemacht. So lassen sich die benötigte Ausdruckkraft und auftretende Spannungsspitzen zu den jeweiligen Zeiten während der Testung nachvollziehen [Brandt J et al. 2005].

| Schaf-Nr. | Beschichtung | Neigungswinkel P1 | Neigungswinkel P2 |
|-----------|--------------|----------------------|----------------------|
| 2 | b | 12° | 4° |
| 5 | b | 1° | 0° |
| 7 | b | 15° | 0° |
| 9 | b | 7° | 12° |
| 13 | b | 0° | 1° |
| 17 | b | 9° | 9° |
| 4 | ub | 7° | 6° |
| 18 | ub | 0° | 5° |
| 20 | ub | 6° | 14° |
| 22 | ub | 5° | 0° |
| 1* | ub | 0° | 0° |

Tab. 6.11.1: Präparate mit ihrem errechneten Neigungswinkel für die Einspannung in die Haltevorrichtung zur Push-Out-Testung.

* Präparat Nr. 1 wurde bei der Vorbereitung beschädigt

6.12 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der histomorphometrisch ermittelten Werte der Fluoreszenz- und TRAP-positiv gefärbten Proben wurden zwei verschiedene Tests angewendet.

Die erste Berechnung fand mit dem „U-Test“ („Wilcoxon-Rangsummentest“) statt, da mit ihm, als Prüfung der Signifikanz, die Kongruenz zweier Verteilungen ermittelt werden kann [Büning H et al. 1994]. Somit kann ohne Parameter ein Test auf Homogenität durchgeführt werden.

Die Eingabe der entsprechenden Daten erfolgte unter anderem über ein Online-Angebot [<http://elegans.som.vcu.edu/~leon/stats/utest.html>. 2007] in das vorgegebene Bedienfeld zur Errechnung einer möglichen Signifikanz.

Ein zweiter Test wurde mit dem Statistikprogramm „R“ Version 3.1.1 [<http://www.R-project.org/>] durchgeführt. Mit „R“ wurde zum einen der „*welch two sample t-test*“ (Zwei-Stichproben t-Test) durchgeführt, welcher davon ausgeht, dass die Menge an neu gebildetem Knochen eine normalverteilte Variable ist (Nullhypothese: $H_0: \mu_x - \mu_y = \omega_0$; Alternativhypothese: $H_1: \mu_x - \mu_y \neq \omega_0$), zum anderen wurden erneut die Daten mit dem Wilcoxon-Rangsummentest überprüft, welcher zwar weniger statistische Power hat, dafür jedoch nicht unter der Annahme durchgeführt wird, dass normalverteilte Variablen vorliegen. Um jeweils die Einzelwerte berücksichtigen zu können, wurden zwei lineare Modelle gegeneinander gerechnet. Beide enthielten eine Konstante für den globalen Mittelwert sowie die Zuordnung zum Schaf als Zufallsfaktor. In das zweite Modell wurde zusätzlich die Gruppenzugehörigkeit (beschichtet vs unbeschichtet) als fester Faktor mit aufgenommen.

Das jeweilige Ergebnis wurde nach Berechnung des entsprechenden Programms interpretiert und nach seiner Überprüfung für diese Arbeit übernommen.

7 Ergebnisse

7.1 Makroskopische Befunde

Nachdem die Implantate mitsamt Gelenk explantiert und unmittelbar vor Ort zurechtgesägt worden waren, konnte man bereits einen Eindruck vom Zustand der Implantate in der Femurkondyle erhalten.

Die Knochenschnitte wurden so gesägt, dass man jeweils die obere und untere Implantatöffnung sehen und eventuelle Unterschiede der Interface-Grenze oder Knochendurchbauung im Inneren der beschichteten und unbeschichteten Implantate makroskopisch beurteilen konnte.

Dabei war zunächst auf etwaige Lücken zwischen dem das Implantat umgebende Knochengewebe und der äußeren Oberfläche sowie auf die Kompaktheit des in das Implantat gewachsenen Knochens zu achten.

Würde sich zum Beispiel bei einem überwiegenden Teil der unbeschichteten Implantate ein makroskopisch sichtbares Areal ohne Knochen-Implantat-Verbund zeigen, könnte das ein Anhalt einer unvollständigen Knochenregeneration und eines fehlenden An- und Einwachsverhaltens sein.

Die folgenden Abbildungen zeigen die unmittelbar nach Explantation vorläufig zurechtgesägten Knochenschnitte:



Abb. 7.1: Linke Spalte: Beschichtete Implantate in den zurechtgesägten Knochenschnitten nach Explantation.
Rechte Spalte: Unbeschichtete Implantate.

Beim Vergleichen der beschichteten gegen die unbeschichteten Implantate war zunächst kein Unterschied des peri-implantären Knochengewebes zu erkennen. Sowohl von medialer als auch von lateraler Ansicht der Implantatanschnitte ließ sich weder bei den

beschichteten, noch bei den unbeschichteten Interface-Grenzen ein Unterschied im Anwachsverhalten des Knochengewebes feststellen. Makroskopisch entsteht der Eindruck eines vollständigen Interagierens von Knochengewebe mit Implantatoberfläche. Auch in den Implantaten selber hat makroskopisch eine sichtbare Knochendurchbauung stattgefunden. Jedoch könnte man das innerhalb beider Implantattypen vorkommende weißliche Gewebe als Fettgewebe deuten, welches anstelle von Knochen gewachsen ist. Sollte sich die Relation von in das Implantat eingewachsenem Knochen- zu Fettgewebe in weiteren Untersuchungen zwischen beschichteten und unbeschichteten Implantaten als gleichermaßen geringer herausstellen, muss von einer ungenügend vonstattengegangenen Knochendurchbauung und damit auch verminderten Defektstabilität ausgegangen werden.

Makroskopisch ließ sich allerdings lediglich das Ein- und Anwachsen von Gewebe und eine durch das Zurechtsägen manipulativ festgestellte Defektstabilität erkennen, wobei zunächst keine weiteren Differenzierungen zwischen den Gewebetypen, noch das Erkennen eventueller Unterschiede zwischen beschichteten und unbeschichteten Implantaten möglich war.

7.2 Histologische Befunde

In der histologischen Übersicht konnte zunächst eine allgemeine Beurteilung bezüglich des entstandenen Gewebes im und um das Implantat herum sowie seine Beziehung zu den Implantatflächen getroffen werden.

Zu erkennen war zum einen, dass vor allem an der Außenfläche vitales Knochengewebe zu finden und auch im Inneren der Implantate neues Knochengewebe eingewachsen war. Allerdings war zum anderen in allen Präparaten auch ein deutlicher Anteil von Fettgewebe zu sehen, wobei oftmals, wahrscheinlich durch den Vorbereitungsprozess und die Einbettung, Gewebe verloren gegangen war.

Da die für die Fluoreszenzphotografie vorgesehen Bilder an anderer Stelle unter speziellen Kriterien betrachtet worden sind, soll an dieser Stelle zunächst eine Beschreibung der anderen histologisch ausgewerteten Bilder erfolgen.

7.21 Toluidinblau-Färbung

Die zur groben Differenzierung durchgeführte Toluidinblau-Färbung bietet den Vorteil, dass das durch Epoxidharz mineralisierte Gewebe kaum, dafür jedoch besonders Knochen- und Bindegewebe blau und Knorpelmatrix violett angefärbt wird. So gelingt es, einen ersten Eindruck des vorliegenden Gewebes zu bekommen.

In diesem Fall hat die Toluidinblau-Färbung lediglich der groben makroskopischen Ermittlung des im Präparat vorkommenden Gewebes gedient. Wie in den beispielhaft angeführten Bildern zu sehen ist, hat sich bereits bei den ersten Untersuchungen zeigen können, dass neuer Knochen in die Implantate eingewachsen ist und mit der Implantatoberfläche interagiert hat. Nachdem dieser erste Hinweis auf eine nach Implantation erfolgte Knochenregeneration erbracht worden war, konnte mit der genaueren Untersuchung der Präparate hinsichtlich der Flächenberechnung der in einem Schnitt vorkommenden Gewebe begonnen werden.

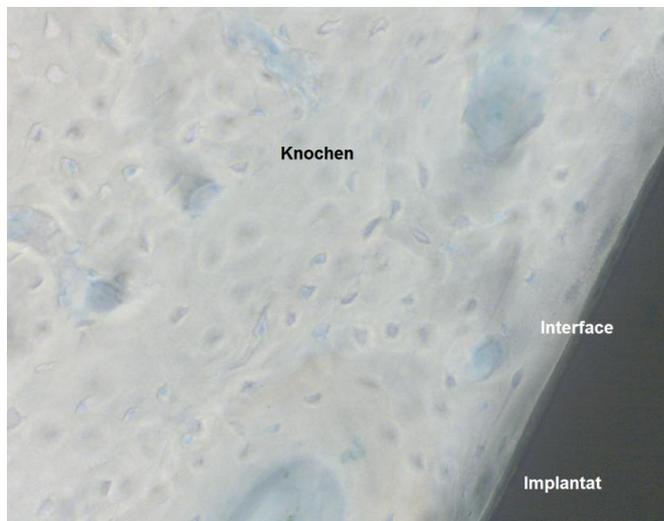
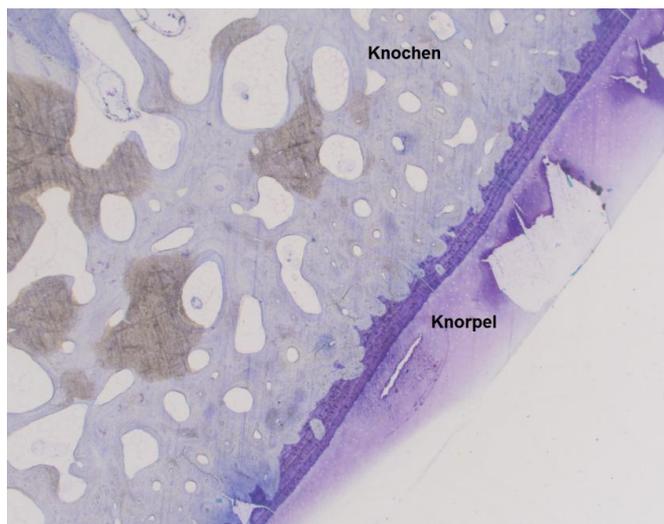


Abb. 7.2:

Zu erkennen sind die unterschiedlichen Gewebe im Implantat.

Während im oberen Bild besonders deutlich der violette Knorpelsaum hervorsticht, lässt sich im unteren Bild der blau gefärbte Knochen am Implantat erkennen.

7.3 Calcein-Grün-Fluoreszenz

In dieser Arbeit ist Calcein-Grün als ein Marker von insgesamt drei applizierten Fluorochromen zur Quantifizierung des neu gebildeten Knochens nach Implantation der Titaniumzylinder herangezogen worden.

Nach Sichtbarmachung des Fluoreszenzfarbstoffes durch die Photomikroskopie konnten bereits grobe Aussagen bezüglich der Farbstoffverteilung getroffen werden. So zeigte sich sehr deutlich, dass das Calcein-Grün gefärbte Knochengewebe deutlich im Bereich der inneren und äußeren Implantatoberfläche lokalisiert war und großflächigen Kontakt bis dicht an die Oberfläche hergestellt hatte. Außerdem fiel auf, dass die Farbe im Interface-Bereich am intensivsten darstellbar war sowie eine allgemeine Verteilung im gesamten AOI mit Lokalisation zwischen den zwei Fluoreszenzfarbstoffen, die zu jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten appliziert worden waren und dementsprechend das Knochengewebe angefärbt hatten.

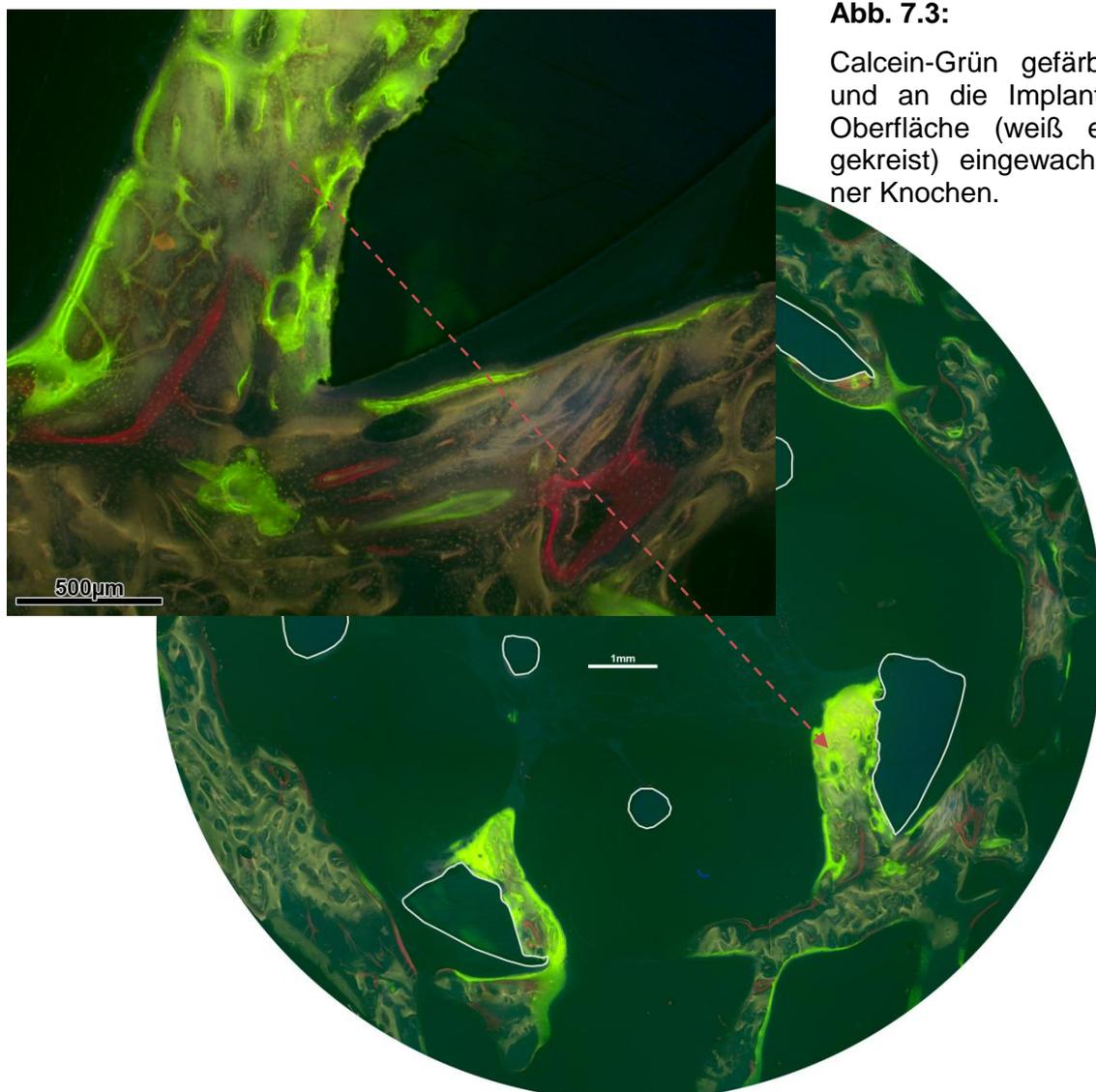


Abb. 7.3:

Calcein-Grün gefärbter und an die Implantat-Oberfläche (weiß eingekreist) eingewachsener Knochen.

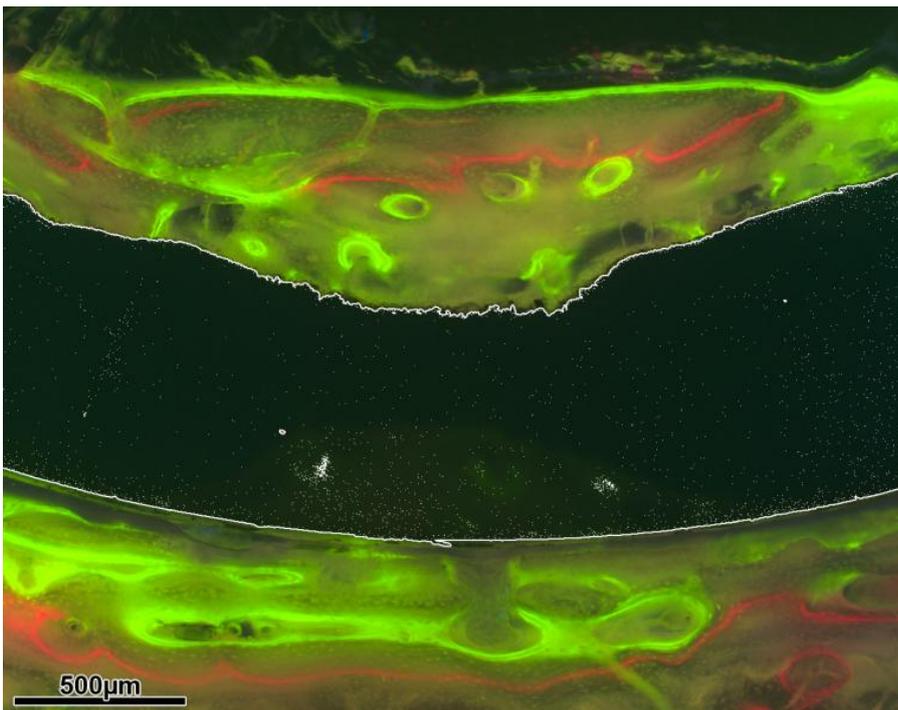
Ein Vergleich der mikroskopischen Bilder und dem Regenerationsverhalten des Knochens zwischen beschichteten und unbeschichteten Implantaten fiel insofern schwer, als dass die im Schliff unterschiedlich angeschnittenen Implantatflächen keinen sicheren Rückschluss auf das Verhältnis von neu gebildetem Knochen zu übrigem Gewebe und Implantat zuließen. Erst die histomorphologische Bestimmung der Teilflächen und das anschließend rechnerisch ermittelte Verhältnis der Ergebnisse zueinander konnte das tatsächliche Verhalten des Knochengewebes zwischen den beiden Gruppen darstellen.



Abb. 7.3.1:

Detailaufnahmen der Interface-Region eines unbeschichteten (oberes Bild) und eines beschichteten Implantats (unteres Bild).

In der mikroskopischen Vergrößerung lassen sich keine makroskopischen Unterschiede der Knochenregeneration erkennen.



Die schwarze Fläche entspricht dem Implantat, rot/gelb/grün hat sich das Knochengewebe angefärbt.

| Tier | Beschichtung | AOI [mm ²] | grüne Fluoreszens [mm ²] | Knochen (ges.) | neuer Knochen [%] |
|------|--------------|------------------------|--------------------------------------|----------------|-------------------|
| 12 | ub | 98,323 | 2,481 | 79,104 | 3,152 |
| 6 | ub | 103,250 | 1,503 | 72,444 | 2,088 |
| 16 | ub | 100,023 | 2,053 | 76,395 | 2,658 |
| 10 | ub | 102,288 | 1,762 | 74,920 | 2,295 |
| 14 | ub | 99,342 | 4,604 | 83,098 | 5,644 |
| 24 | ub | 96,475 | 1,804 | 78,434 | 2,354 |
| 19 | b | 100,386 | 1,530 | 78,686 | 2,029 |
| 11 | b | 100,125 | 5,980 | 76,550 | 7,916 |
| 25 | b | 96,694 | 1,340 | 78,950 | 1,705 |
| 23 | b | 98,485 | 3,364 | 80,465 | 4,257 |
| 15 | b | 99,145 | 2,290 | 80,566 | 2,860 |
| 21 | b | 97,766 | 2,913 | 77,612 | 3,741 |

Tab. 7.3: Die mit PS histomorphometrisch ermittelten Flächen der AOIs und des Knochengewebes in Beziehung zu ihrem Gesamtverhältnis im AOI.

Nachdem die grüne Fluoreszenz mithilfe von PS ausgemessen und zu den Flächen von dem jeweils dazugehörigen AOI und Implantatanschnitt ins Verhältnis gesetzt worden war, konnte im Vergleich der beschichteten zu den unbeschichteten Implantaten kein Unterschied in der Menge des neu gebildeten Knochens gesehen werden.

Zur Berechnung der Signifikanz wurden erneut die gemittelten Werte für die unbeschichteten und beschichteten Proben mithilfe des „U-Tests“ ermittelt, wobei sich erneut kein signifikanter Unterschied zeigen konnte. Die beschichteten Implantate haben demnach keine verstärkte Knochenregeneration im Bereich des AOI induzieren können.

| Anzahl [b] | Anzahl [ub] | U | P (two-tailed) | P (one-tailed) |
|-------------------------------|-------------|------|----------------|----------------|
| 6 | 6 | 20,0 | 0,818182 | 0,409091 |
| normal approx z = 0,320256 | | | 0,748774* | 0,374387* |

* Diese Werte sind Näherungswerte

Tab. 7.3.1: Ergebnis der Signifikanz-Ermittlung im Rangsummen- (U-) Test. Zwischen den beiden Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden.

$P \geq 0,05$, two-tailed test

Test bei Annahme normalverteilter Werte: Welch Two Sample t-test

(t= 0,6676, df= 8,141), p= 0,5229

Alternative Hypothese: 95%-Konfidenz-Intervall: -1,736463 - 3,157493

Stichprobe: Mittelwerte von x (beschichtet) und y (unbeschichtet)

3,742488 und 3,031974

Berücksichtigung sämtlicher Einzelwerte: (model df AIC BIC logLik Test L.Ratio p-value)

ob1 1 3 343,2256 350,4089 – 168,6128

ob2 2 4 344,6674 354,2452 – 168,3337 1 vs. 2 0,5581167 p=0,455

Modell 2 zeigte im Vergleich zu Modell 1 keine statistisch signifikant bessere Beschreibung der Daten (p=0,455).

7.4 Tartrat-resistente Saure Phosphatase

Anhand der TRAP-positiven Färbung konnten sehr gut das Knochengewebe und Zellen wie Osteoklasten und Makrophagen beurteilt werden. Bereits mikroskopisch war zu erkennen, dass die rot angefärbten Zellen besonders im Interface-Bereich zu finden waren und sich häufig konzentriert an bestimmten Stellen im Gewebe finden ließen.

Es zeigte sich zum Beispiel, dass das Knochengewebe nicht willkürlich in das Implantat eingewachsen war, sondern sich besonders entlang der Implantatoberfläche entwickelt hatte.

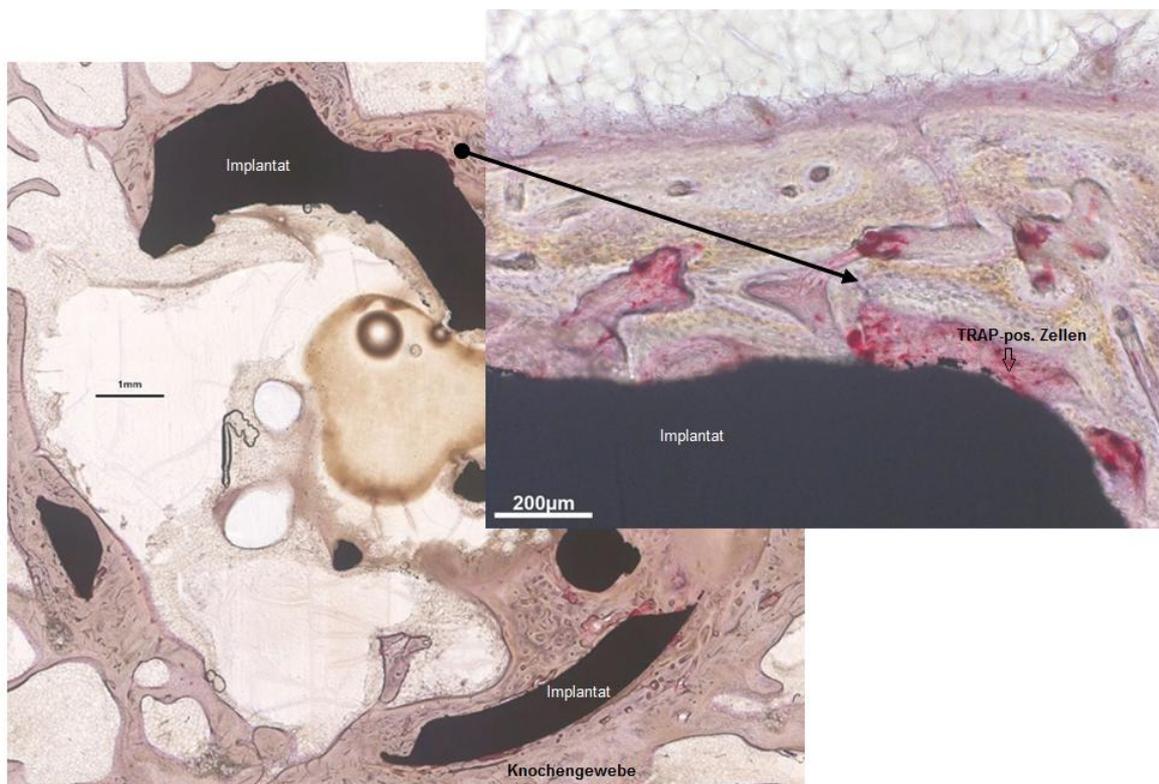


Abb. 7.4: Beispiel für die Anfärbung TRAP-positiver Zellen auf einem beschichteten Implantat und die Beziehung des neugebildeten Knochens zur Materialoberfläche.

Die vermehrte Ansammlung TRAP-positiver Zellen in unmittelbarer Implantatnähe lässt daher auf einen erhöhten Knochenstoffwechsel in der Interface-Region schließen und ist ein Beleg für die anhaltend stattfindende Knochenregeneration.

Mithilfe der weiter oben beschriebenen Histomorphometrie-Technik die Fläche des AOI, des Implantats und der TRAP-positiven Zellen auszumessen und zueinander ins Verhältnis zu setzen, ergaben sich die folgenden Werte für die jeweils angegebenen Schiffe in mm^2 :

| Tier, Schliff | Beschichtung | AOI [mm ²] | Implantat [mm ²] | Knochen (ges.) | Osteoklasten [mm ²] |
|---------------|--------------|------------------------|------------------------------|----------------|---------------------------------|
| 6, 1* | ub | 105,240 | 28,639 | 14,582 | 0,156 |
| 6, 2* | ub | 105,533 | 40,425 | 9,689 | 0,149 |
| 10, 1 | ub | 103,047 | 24,336 | 15,869 | 0,078 |
| 11, 1 | b | 102,020 | 17,644 | 28,576 | 0,189 |
| 12, 1 | ub | 98,237 | 14,571 | 15,911 | 0,071 |
| 14, 3 | ub | 102,537 | 29,658 | 29,662 | 0,017 |
| 15, 2 | b | 101,676 | 12,643 | 14,321 | 0,068 |
| 16, 1 | ub | 101,797 | 30,024 | 39,910 | 0,093 |
| 21, 2 | b | 99,616 | 21,905 | 8,211 | 0,034 |
| 23, 1 | b | 100,723 | 24,799 | 15,005 | 0,062 |
| 24, 1 | ub | 97,071 | 22,256 | 20,362 | 0,045 |
| 25, 1 | b | 97,180 | 14,958 | 27,327 | 0,066 |
| 19, 1 | b | 100,743 | 21,789 | 25,941 | 0,121 |
| | | | | | |
| 6 ø* | ub | 105,386 | 34,532 | 12,136 | 0,153 |

Tab. 7.4: Aufgeführt sind die histomorphometrisch errechneten Flächen der einzelnen AOIs, Implantate, TRAP-positiven Zellen und des Knochengewebes (ohne Bindegewebe und Defektflächen), inklusive der Osteoklasten.

* Aufgrund von nachträglichen Änderungen in der Schliffauswahl sind zwei Präparate von Schaf Nr. 6 (Schliff Nr. 1 und 2) ausgemessen worden und gehen hier mit ihrem Durchschnittswert in weitere Berechnungen mit ein.

| Tier, Schliff | Beschichtung | TRAP-pos.-Zellen [%] |
|---------------|--------------|----------------------|
| 6, 1* | ub | 1,069 |
| 6, 2* | ub | 1,539 |
| 10, 1 | ub | 0,491 |
| 11, 1 | b | 0,663 |
| 12, 1 | ub | 0,447 |
| 14, 3 | ub | 0,059 |
| 15, 2 | b | 0,475 |
| 16, 1 | ub | 0,233 |
| 21, 2 | b | 0,412 |
| 23, 1 | b | 0,412 |
| 24, 1 | ub | 0,219 |
| 25, 1 | b | 0,241 |
| 19, 1 | b | 0,465 |
| | | |
| 6 ø* | ub | 1,304 |

Tab. 7.4.1: Prozentuale Fläche der TRAP-positiv gefärbten Zellen von der Fläche des reinen Knochengewebes.

Welch Two Sample t-test:

(t= -0,0748, df= 5,933), p= 0,9428

Alternative Hypothese: 95%-Konfidenz-Intervall

-0,4789497 - 0,4506164

Stichprobe: Mittelwert von x (beschichtet) und y (unbeschichtet):

0,4446667 und 0,4588333

Vergleicht man die erzielten Werte für angefärbte TRAP-positive Zellen in dem Wilcoxon-Rangsummentest [Büning H et al. 1994], so zeigt sich zwischen beschichteten und unbeschichteten Implantaten kein signifikanter Unterschied bezüglich der prozentualen Anzahl dieser Zellen. Auch die im *Welch Two Sample t-test* ermittelten Werte konnten keine Signifikanz aufzeigen. Statistisch gesehen konnte demnach kein Anhalt für eine gesteigerte oder herabgesetzte Aktivität der mit der TRAP-Färbung erfassten Zellen gefunden werden.

7.5 Elektronenmikroskopie

Wie bereits beispielhaft in Kapitel 6.9 dargestellt, lassen sich mithilfe des REM hochauflösende Bilder der Interface-Region erstellen. Deutlich zeigte sich sowohl bei beschichteten als auch bei unbeschichteten Präparaten ein enger Verbund des neu gebildeten Knochens mit der Implantatoberschicht. TEM-Bilder konnten nicht angefertigt werden, da es nicht möglich war den das Implantat enthaltenden Knochen ausreichend dünn zu schneiden.

Vergleicht man rein makroskopisch die REM-Aufnahmen, so fällt kein Unterschied in dem Einwachsen des neu gebildeten Gewebes an oder in das Implantat auf.

In beiden Fällen gibt es Beispiele für einen engen Kontakt zwischen Knochen und Implantat sowie das Einziehen kollagener Fasern in die Implantatoberfläche hinein. Außerdem gibt es keine eindeutigen Unterschiede für eine veränderte Reaktion auf die Calcium-Titanatschicht, wie zum Beispiel ein größerer gewebefreier Raum um das unbeschichtete Implantat herum.

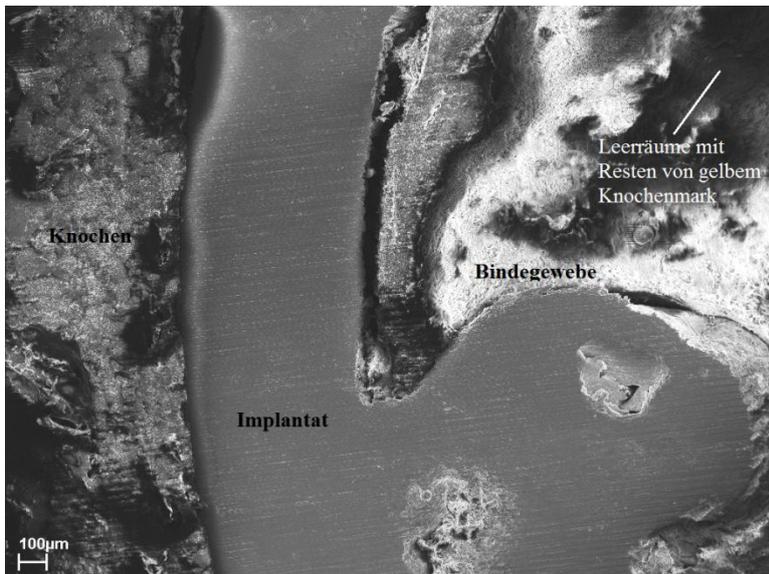
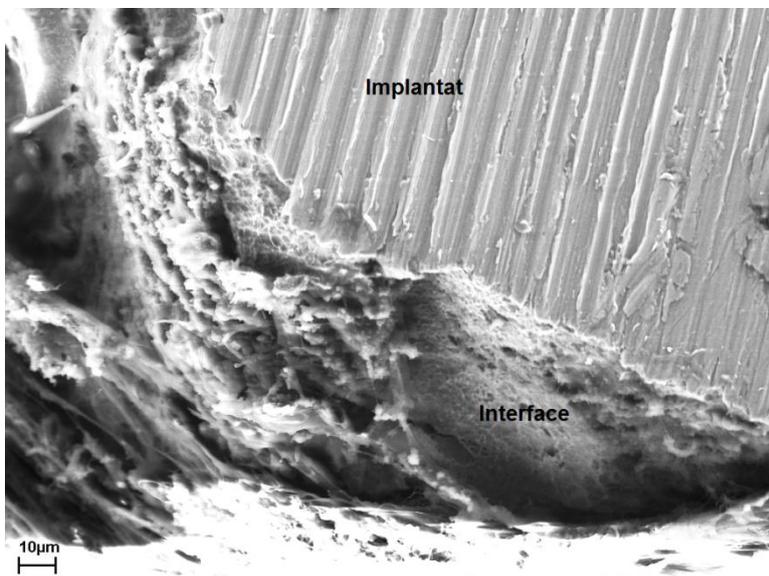


Abb. 7.5:

Oben:
Ansicht eines beschichteten Implantatabschnittes zwischen neu gebildetem Knochengewebe.



Unten:
Anschnitt der Interface-Region eines unbeschichteten Implantats.

Bei makroskopischer Betrachtung der REM-Aufnahmen lassen sich keine Unterschiede der Knochen-Implantat-Beziehung zwischen den beiden Proben erkennen.

7.6 Molekularbiologie (PCR), relative Expression Cathepsin-K

Die molekularbiologische Untersuchung der relativen Expression von Cathepsin-K als Marker für den in den jeweiligen Proben stattgefundenen Knochenabbau ließ sich nach aufwändiger Aufarbeitung der Proben (5x „b“, 5x „ub“, 1x „le“ (Leerdefekt)) getrennt für die zwei zu untersuchenden Gruppen (beschichtet/unbeschichtet) ermitteln.

Für den ΔCt - (Ctsk/sh/133) Wert ergaben sich in der qPCR folgende Werte:

| Beschichtung | Tier | Ctsk/sh/133 |
|--------------|------|-------------|
| le | 8 | 3,235 |
| b | 11 | 2,29 |
| b | 15 | 3,623 |
| b | 19 | 3,01 |
| b | 21 | 2,78 |
| b | 23 | 2,703 |
| ub | 6 | 2,835 |
| ub | 10 | 2,158 |
| ub | 14 | 3,598 |
| ub | 16 | 3,605 |
| ub | 24 | 3,19 |

Tab. 7.6: Einzelwerte für die in den Proben gefundene Relative Expression von Cathepsin-K.

Mithilfe der in Kapitel 6.10 erläuterten Formeln konnten folgende Mittelwerte errechnet werden:

| | CTSK ub | CTSK b | $\Delta\Delta\text{Ct}$ sK/sh/133 | CTSK |
|------|------------|-----------|--------------------------------------|--------|
| qPCR | 3,077 | 2,88 | -0,197 | 114,63 |

Tab. 7.6.1: Ergebnisse der in der qPCR ermittelten Werte für Cathepsin-K im Vergleich zu $\beta 2\text{M}$.

Um schließlich die relative Expression der unbeschichteten und beschichteten Proben mit $\beta 2\text{M}$ als Kontrolle zu erhalten, wurde folgende Zuordnung vorgenommen:

Tab. 7.6.2: Im Versuch wurde jeweils einer unbeschichteten Probe eine beschichtete Probe zugeteilt.

| Nummerierung | Tier ub/b |
|--------------|--------------|
| 1 | 6/11 |
| 2 | 10/15 |
| 3 | 14/19 |
| 4 | 16/21 |
| 5 | 24/23 |

Unter Aufstellung der Hypothese (H_0), dass es einen Unterschied in der relativen Expression von beschichteten Proben gegenüber unbeschichteten Proben gibt, wurde anhand der Gegenhypothese (H_1) die Wahrscheinlichkeit ($P(H_1)$) ermittelt, einen Unterschied zu finden. Die nachfolgende Tabelle gibt die Ergebnisse für diese Berechnung wieder.

| Gen | Typ | Reaktion Effizienz | Expres-sion | Std. Error | 95%-Intervall | P(H_1) |
|-------------|-----|--------------------|-------------|---------------|---------------|------------|
| Cathepsin-K | TRG | 0,9587 | 1,126 | 0,705 – 1,821 | 0,471 – 2,475 | 0,635 |
| β 2M | REF | 1,0178 | 1,000 | | | |

Tab. 7.6.3: Resultat der Berechnung der relativen Expression von Cathepsin-K gegenüber β 2M als Kontrollgruppe.

Die Interpretation der Ergebnisse führt zu dem Schluss, dass es bei einem Wert von $P(H_1) = 0,635$ keinen Unterschied der relativen Expression von Cathepsin-K zwischen der Stichprobe und der Kontrollgruppe gibt.

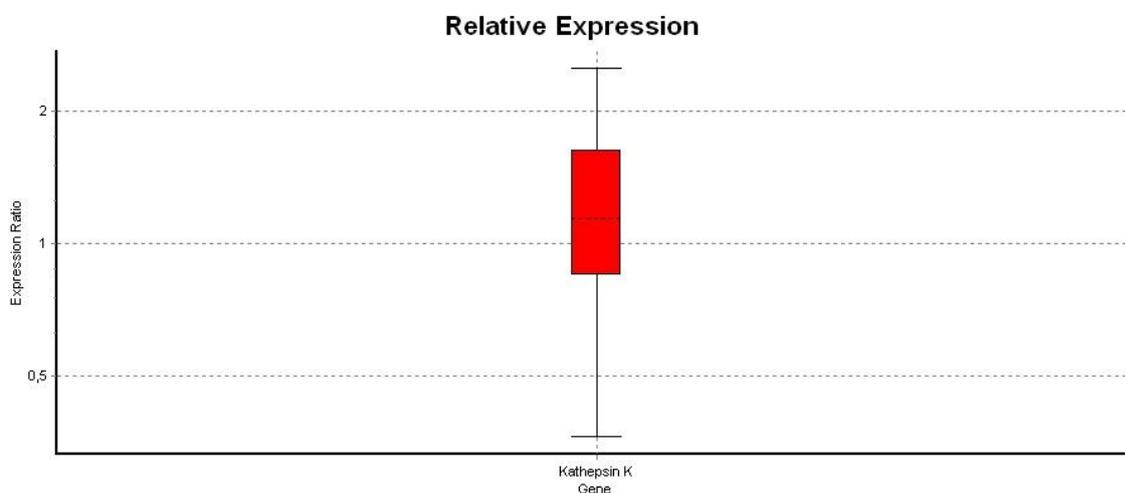


Abb. 7.6: Darstellung der Differenz zwischen dem oberen und dem unteren Quartil (dem so genannten Quartilsabstand), der die "inneren 50%" der nach zunehmender Größe geordneten Daten definiert. Die oberste und unterste horizontale Linie markiert die Ausreißer. Die gestrichelte Linie in der roten Box repräsentiert den Median der Gen-Expression.

7.7 Biomechanik

Die hier präsentierten Ergebnisse der Push-Out-Testung stammen allesamt aus der Arbeit von Guillén et al. (2012) und werden zur Vervollständigung dieser wissenschaftlichen Arbeit lediglich mit aufgeführt und in Anlehnung an Guilléns Dissertation interpretiert.

Die in Kapitel 6.12 erläuterte Versuchsdurchführung erbrachte folgende Ergebnisse im Push-Out-Test:

| Tier | Beschichtung | Ausdruckkraft [N] | Aufgenommene Energie [mJ] |
|------|--------------|-------------------|---------------------------|
| 2 | b | 1548 | 1865 |
| 5 | b | 1430 | 6393 |
| 7 | b | 473,6 | 1387 |
| 9 | b | 1774 | 3269 |
| 13 | b | 1845 | 6858 |
| 17 | b | 1445 | 4186 |
| 4 | ub | 1784 | 2970 |
| 18 | ub | 657,5 | 4012 |
| 20 | ub | 1255 | 1913 |
| 22 | ub | 1752 | 5562 |
| 1* | ub | ca. 1800 | keine Daten |

* Diese Probe war bei der Vorbereitung beschädigt worden. Während des Ausdrückversuches brach der Knochen bei ca. 1800N, so dass keine weiteren Daten gewonnen werden konnten.

Tab. 7.7: Ergebnisse des Push-Out-Tests. Der *Indenter* registrierte, während er das Implantat im rechten Winkel nach unten ausdrückte, sowohl die dafür benötigte Ausdruckkraft als auch die dabei aufgenommene Energie.

Als Resultat ergaben sich für beschichtete Implantate Werte für die Ausdruckkraft von $1419 \pm 494\text{N}$ und $3993 \pm 2274\text{mJ}$ für die aufgenommene Energie. Bei den unbeschichteten Implantaten ergaben sich Werte von $1362 \pm 529\text{N}$ für die Ausdruckkraft und für die aufgenommene Energie Werte von $3614 \pm 1556\text{mJ}$.

Zwischen den beiden Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied im Push-Out-Test gefunden werden [Guillén TG. 2012].

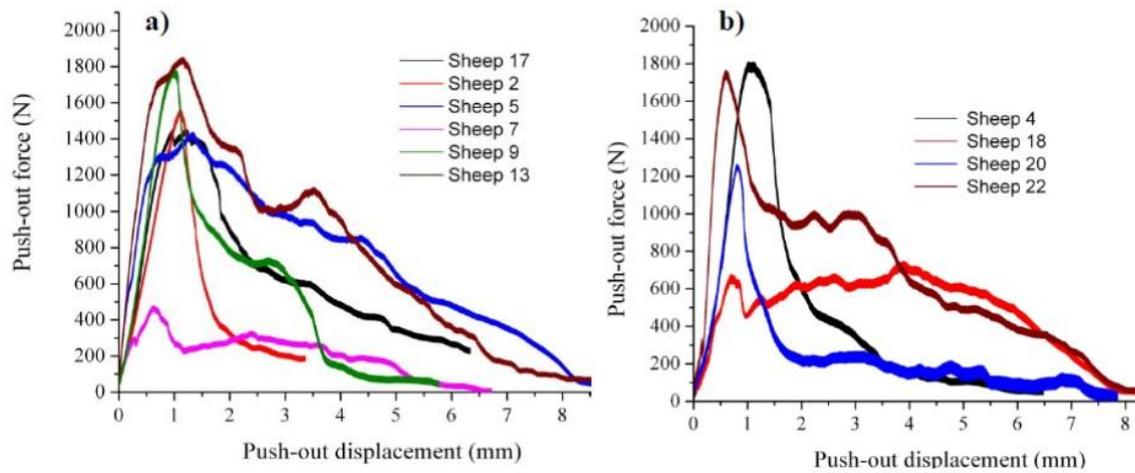


Abb. 7.7: Ergebnisse des Push-Out-Tests als graphische Darstellung
a) beschichtete Proben, b) unbeschichtete Proben.

8 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der Knochenregeneration bei neuartigen Beschichtungen von Knochenersatzmaterialien zu erlangen.

Bei Beginn der Untersuchungen lagen keine Erkenntnisse zu offenporigen Zylinderimplantaten mit Calcium-Titanat-Reaktionsschicht im Schaf durch vergleichende Studien vor.

Obwohl in dieser wissenschaftlichen Arbeit vorrangig die Menge an neu gebildetem Knochen als Anhalt für einen verminderten Knochenabbau durch eine eventuell stattfindende gezielte Osteokonduktion und -promotion sowie das Auftreten von Zellen als Marker der Knochenresorption betrachtet worden ist, sollte gerade im Hinblick auf die Herstellung und Verarbeitung der Reaktionsschicht auch die Frage untersucht werden, ob der Beschichtungsprozess an sich bereits Auswirkungen auf die Knochenregeneration hat.

Bereits die Schwierigkeiten bei der Vorbereitung der Implantatoberfläche und die Herstellung der Calcium-Titanat-Reaktionsschicht haben Anlass dazu gegeben, neben den eigentlichen Zielparametern dieser Untersuchung (Menge des neu gebildeten Knochens im Defektbereich, maximale Kraft, die für ein Grenzflächenversagen notwendig ist, Anzahl der TRAP-positiven Zellen als Marker für die Knochenresorption und weitere histologische und makroskopische Unterschiede) auch Parameter wie eine eventuell ungenügend stattgefundene Verbindung der Beschichtung mit dem Implantat durch Materialfehler oder andere chemische und physikalische Eigenschaften der Reaktionsschicht zu untersuchen.

Am Ende dieser Arbeit soll dann noch kurz erörtert werden, warum aus Sicht der statistischen Berechnung, bedingt durch die Anzahl der zu untersuchenden Objekte, kleinere Unterschiede der zu vergleichenden Gruppen kaum aufgezeigt werden können.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde der Herstellungs- und Verarbeitungsprozess der porösen Implantate und der Ti-6Al-7Nb-Legierung erläutert. Die in mehreren Versuchen durchgeführte aufwendige Fertigung und die zu berücksichtigenden physikalischen und chemischen Eigenschaften haben ein interdisziplinäres Arbeiten und Forschen während des Fertigungsprozesses erfordert.

So zeigte sich bereits in den Vorversuchen, dass die Entstehung einer α -case-Schicht im Rahmen der Beizung der Implantate und der somit entstandenen Verunreinigungen die Aufbringung einer Calcium-Titanat-Reaktionsschicht erschweren und somit eine verbesserte Knochenregeneration verhindern könnte.

Somit stellt der Beschichtungsprozess einen entscheidenden Faktor für die Bewertung des Endergebnisses dar. Erst weiterführende Versuche der Projekt-Gruppe im Gießerei-

Institut der RWTH Aachen konnten durch eine vorab erfolgte Wärmebehandlung das zuvor aufgetretene Problem der Randschichtversprödung lösen und die Bildung einer α -case-Schicht durch die Verwendung eines neuen Formschalensystems verringern.

Einen weiteren Faktor für den Erfolg der Knochenregeneration im Interface-Bereich und das Einwachsen des neuen Knochengewebes stellt ein anderer Herstellungsprozess dar. Die Implantate wurden nach dem Guss zum Entfernen herstellungsbedingter Schmutzpartikel für das Polieren der Implantataußenseite in eine Drehbank eingespannt. Somit wurde die Oberflächenbeschaffenheit der Außenseite durch dieses Polieren und Glätten zusätzlich verändert, wodurch man vermuten könnte, dass die Beschichtung eher an der Außenseite eine bessere Verbindung mit dem Material eingehen konnte, da weniger Herstellungsrückstände anhafteten. Um diese Hypothese objektiv beurteilen zu können, hätte man zusätzlich eine entsprechende Fläche im inneren und äußeren Interface-Bereich histomorphometrisch ausmessen und vergleichen, sowie im Push-Out-Test polierte und nicht nachbehandelte Implantate in ihrer Interface-Stabilität gegeneinander vergleichen müssen. In diesem Fall sollte jedoch lediglich eine makroskopische und histologische Einschätzung erfolgen, welche eine grobe Einschätzung zu dieser Thematik zulässt.

Dabei fällt auf, dass zunächst bei dem Vergleich fluoreszenzgefärbter Präparate kein eindeutiger Unterschied zur Anwachsung des Knochengewebes an die äußere oder innere Implantatoberfläche ausgemacht werden kann. Bei manchen Bildern war jedoch auf den ersten Blick ersichtlich, dass, wenn ein Randsaum an der Außenfläche des Implantats zu sehen war, dieser häufig großflächig ausfiel. Zum einen kann dieses Phänomen wieder durch Unterschiede bei der Beizung und einer damit verbundenen schlechteren Reaktionsschicht erklärt werden, zum anderen ist die Osteokonduktion an rauen Flächen besser. Dazu geht aus der Studienlage hervor, dass der BIC (*bone implant contact*), also die prozentuale Implantatoberfläche mit mikroskopischen Kontakt zum Knochen, mit der Material-Rauigkeit steigt und bei mittlerer Größe von etwa $Sa=1-2\mu\text{m}$ am höchsten ist [Meirelles L et al. 2007]. Die gezielte Oberflächenveränderung von KEM kann also entscheidend zur Knochenheilung beitragen. Unterstützt wird diese Eigenschaft durch die hydroxylierende Wirkung von Titandioxidoberflächen, welche, beschichtet mit einer Calciumphosphat-Schicht, zudem die Osteokonduktion steigern [Junker R et al. 2009].

Die weitere Verbesserung der Knochenregeneration, besonders in der Anfangsphase, könnte auf dieser Grundlage durch die Aufbringung bioaktiver Stoffe oder Wachstumsfaktoren möglich sein und ließe sich für weitere Versuche dieser Art modifizieren. In diesem Versuch kann lediglich die Vermutung aufgrund anderer Studien zum BIC geäußert

werden, dass die mikroskopisch sichtbare Lücke bei einigen Proben durch das vorherige Polieren und damit der Glättung der Außenfläche entstanden sein könnte.

Außerdem zu bedenken ist für die Betrachtung der inneren Fläche, dass das Knochengewebe zunächst durch die Poren in das Implantat hinein wachsen musste, somit also erschwerten Zugang zum AOI hatte. Das offenporige Konstrukt solcher KEM stellt jedoch, gegenüber geschlossener KEM, eine deutliche Verbesserung für den Zugang des Knochens in das Implantat hinein dar.

Sowohl bei beschichteten als auch unbeschichteten Implantaten ist der Abstand von Knochengewebe zur Interface-Oberfläche einmal breiter und dann wieder schmaler und es lässt sich keine, bei Betrachtung aller für den Versuch histomorphometrisch fotografierten Präparate, eindeutige Tendenz für ein besseres An- und Einwachsverhalten an der Außen- oder Innenseite erkennen. Die subjektiv größer erscheinende schwarze Fläche im Implantat kommt durch das während der Fixierung herausgelöste Fettgewebe zustande.

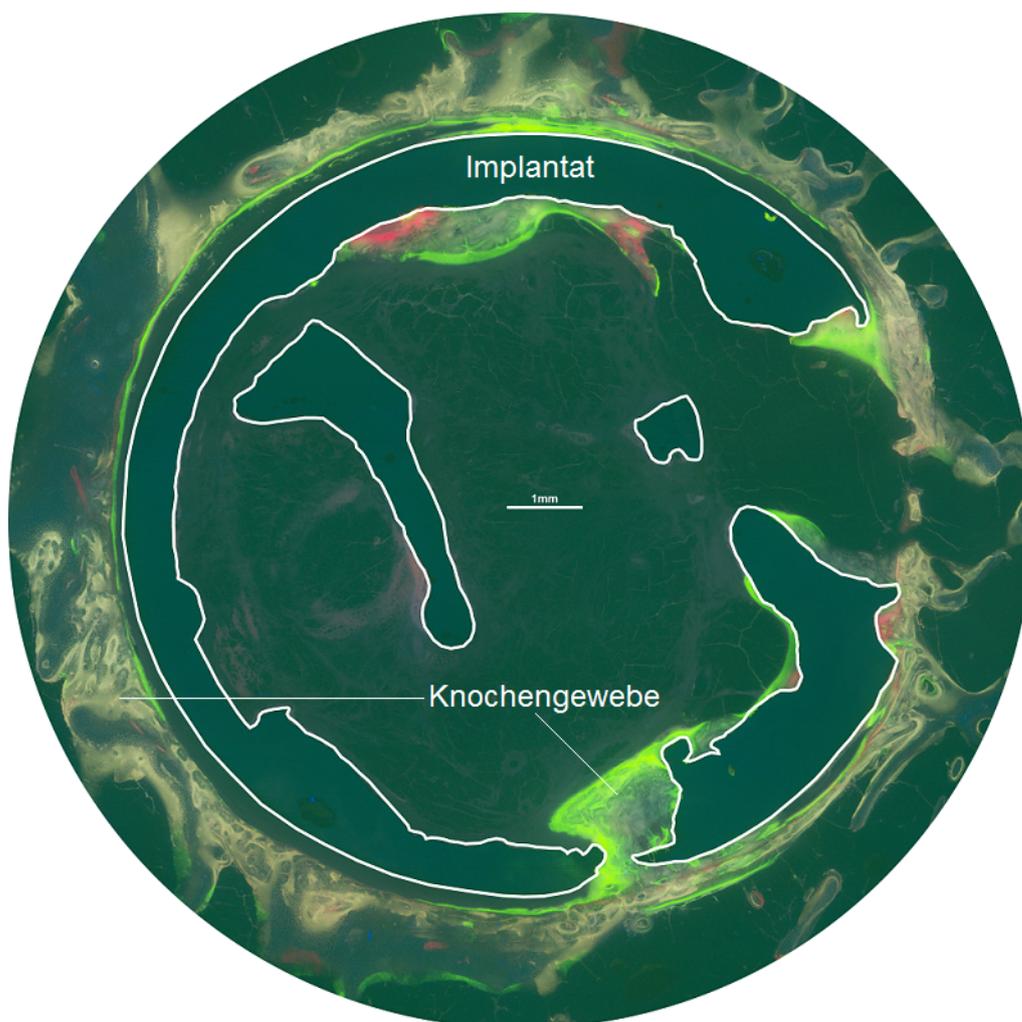


Abb. 8.1: Unbeschichtetes Implantat.

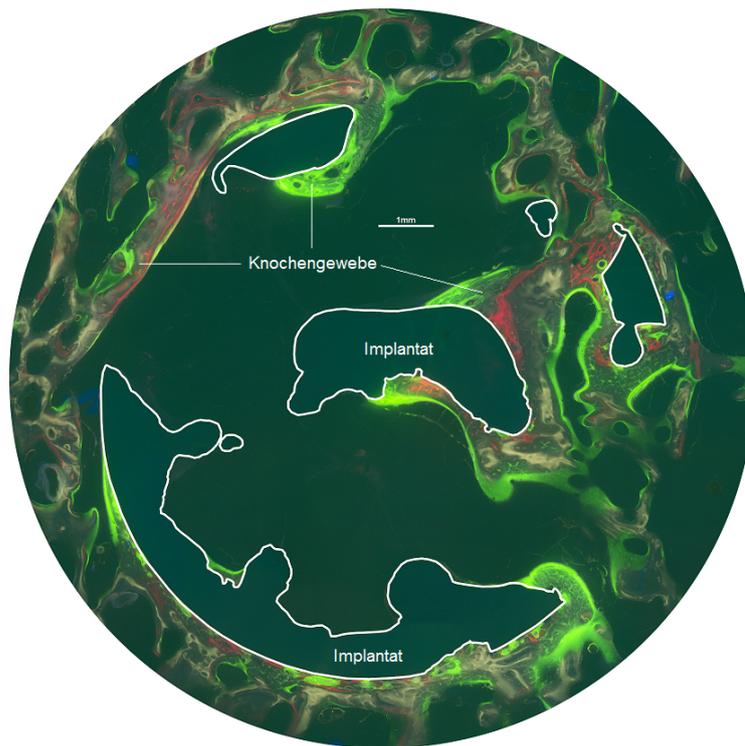
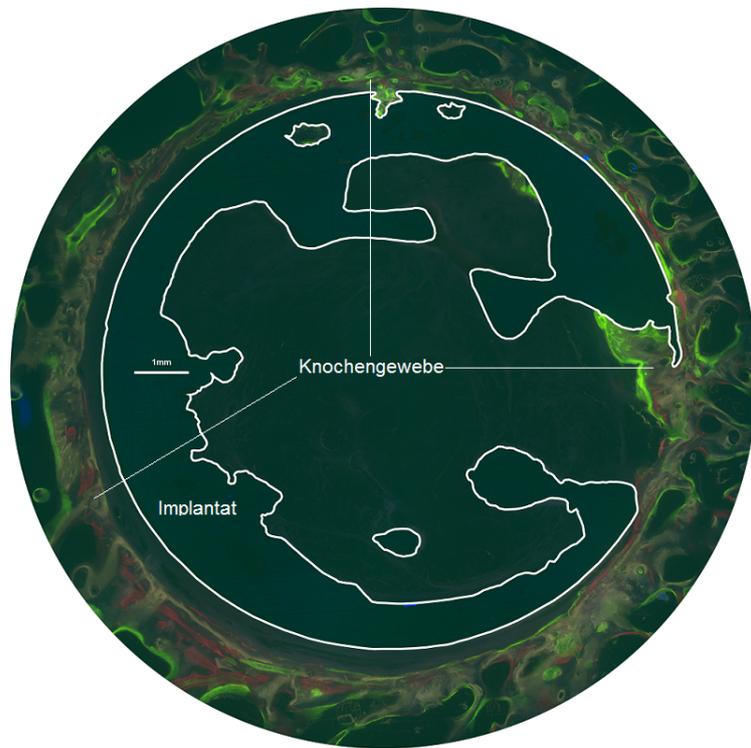


Abb. 8.1: S. 77: unbeschichtetes Implantat, S.78: beschichtete Implantate; beispielhaft soll hier gezeigt werden, dass einmal Knochengewebe besser an die äußere und dann wieder einmal besser an die innere Implantatoberfläche gewachsen ist.

Zudem muss noch der Aspekt einer nicht exakt übereinstimmenden Relation von Bohrlochdefekt und Implantat berücksichtigt werden. Durch das Fehlen einer Press-Fit-Situation kann sowohl die Frakturstabilität als auch die Interface-Reaktion beeinträchtigt worden sein. Führt bei der Behandlung von Frakturen vor allem eine achsengerechte Reposition mit möglichst wenig Bewegung im Frakturspalt zu guten Ergebnissen in der Frakturheilung und Knochenregeneration, ist bei der Verwendung von KEM mit oder ohne Beschichtung der gleiche Aspekt zu berücksichtigen. Da jeder Knochendefekt unterschiedliche Charakteristika aufweist, gilt es trotzdem, eine bestmögliche Press-Fit-Situation zu erreichen. Aufgrund der bioaktiven Reaktionsschicht hätten sich auch hierbei Vorteile bei der Knochenregeneration zeigen können, wurden jedoch durch die biomechanischen Untersuchungen nicht bestätigt. Beide Implantattypen wiesen ähnliche Ergebnisse im Push-Out-Versuch auf und geben somit keinen Hinweis auf eine stabilere Interface-Verbindung bei den beschichteten Implantaten.

Das Langzeitergebnis orthopädisch verwendeter KEM hängt in großem Maße von ihrer Oberflächenbeschaffenheit in Bezug auf die Interface-Reaktion, Defektstabilität und Biokompatibilität ab.

Wie bereits beschrieben, können synthetisch hergestellte Knochenimplantate das Risiko einer Abstoßungs- oder Sensibilisierungsreaktion annähernd eliminieren, werden jedoch in der Dauer ihrer Implantationszeit in entscheidendem Maße von ihrer Oberflächenbeschaffenheit limitiert.

Mit dem Ziel einer guten Osteointegration und -konduktion sollten die chemischen und physikalischen Eigenschaften einer bioaktiven Implantatbeschichtung daher mit einer idealen Kohäsionskraft, einer starken Adhäsion der Beschichtung mit dem Charakter einer kristallinen chemischen Verbindung und einer optimalen Porosität in Bezug auf die künstlich physikalisch hergestellte Verbindung des Implantates mit seiner Beschichtung einhergehen [Alzubaydi TL et al. 2009].

| | Remodelling | Self-Repair | Immunogenität/ Inflammation | Reproduzierbarkeit | Lagerungsfähigkeit | Produktionsaufwand | Logistischer Aufwand |
|---------------------------------|-------------|-------------|--------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| Biologische Implantate | + | + | + | (-) | (-) | ↑↑ | ↑↑ |
| Biohybrid Systeme | - | - | (+) | (+) | (-) | ↑ | ↑ |
| Bewehrte Implantate | (+) | + | (+) | (+) | (+) | ↑↑ | ↑ |
| Vitale Einbettung | (+) | + | (+) | (+) | (+) | ↑↑ | ↑ |
| <i>in vitro</i> Cell Coating | - | - | (+) | (+) | (+) | ↑ | ↑ |
| <i>in vivo</i> Cell Coating | - | - | (+) | + | + | ↓ | ↓ |
| Biofunktionalisierte Implantate | - | - | (-) | + | ++ | ↓ | ↓ |

Tab. 1: Abwägungskriterien für ein Patienten-optimiertes Implantat (+ = positive, - = negative Eigenschaften, ↓ = niedriger, bzw. ↑ = hoher Aufwand)

Abb. 8.2: Eigenschaften und Auswirkungen unterschiedlicher funktionalisierter Biomaterialien bei der Herstellung und dem Gebrauch *in vivo* [aus Schmitz-Rode T. 2011].

Diese Form der Herstellung beschichteter *in vivo* Implantate wurde unter anderem von Kumar et al. (2010) mit dem Begriff der Biofunktionalisierung beschrieben. Es geht darum, ohne den Verlust der guten bioaktiven, mechanischen, physikalischen und chemischen Eigenschaft der Grundmaterialien (Implantate, Stents, u.a.) eine optimale Werkstoffoberfläche herzustellen, die neben einer hervorragenden Biokompatibilität und –stabilität auch einen möglichst großen Schutz vor Korrosion des Implantatmaterials bietet.

Daher beschäftigt sich das *Biological Interface Engineering* mit der Herstellung, Analyse und Standardisierung solcher synthetischen Implantate und überprüft die Patienten-relevanten Kriterien in Bezug auf die Anforderungen und die Resultate von funktionalisierten Biomaterialien [Schmitz-Rode T. 2011].

In seiner wissenschaftlichen Untersuchung zu biomechanischen Eigenschaften beschichteter und unbeschichteter poröser Titaniumimplantate in tierischem Spongiosaknochen weist Guillén (2012) darauf hin, dass das Ziel einer biochemisch behandelbaren Implantatoberfläche besonders dazu geeignet sein sollte, Enzyme,

Proteine und Peptide zu fixieren und somit eine zielgerichtete Zell-/ Interfacereaktion und –ansprechbarkeit auszulösen.

Dabei ist es bei der Auswahl des jeweiligen Implantatmaterials bereits von entscheidender Bedeutung, dessen biogene Eigenschaften, besonders im Hinblick auf die Biokompatibilität, zu kennen.

So bietet zum Beispiel das Titanium mit seiner Titaniumdioxid-Legierung eine gegenüber anderen metallischen Materialien verbesserte Biokompatibilität, welche darüber hinaus sogar bei Schäden an ihrer Oberfläche die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzt.

Je nach Auswahl der die Legierung stabilisierenden Zusätze (Aluminium, Molybdän, Niob, Eisen, Chrom, u.a.) wird eine α - und β -Phase unterschieden, deren polykristalliner Volumenanteil abhängig von der Herstellungstemperatur und Abkühlungsgeschwindigkeit variieren kann und für die Ausbildung der kristallinen Struktur verantwortlich ist. Des Weiteren unterscheiden sich die Elemente untereinander in ihrer stabilisierenden Wirkung auf den Oxidfilm der auf Titanium basierenden KEM und ihrer Auswirkung auf die Anionen-Konzentration. So hat sich herausgestellt, dass zum Beispiel das Niob gegenüber dem Vanadium einen stärkeren Korrosionsschutz bietet, was durch seinen höheren Oxidgehalt und seinen sehr stabilen Zustand im menschlichen Körper zu erklären ist [Moeller E. 2008].

Neben chemischen und physikalischen Eigenschaften wie der Oxidschicht, die für den Korrosionsschutz des Implantates zuständig ist, sind die Abtrennung von Verunreinigungen durch das Implantat - bedingt durch den Herstellungsprozess - die kristalline Zusammensetzung der Beschichtung und viele weitere die Interface-Reaktion beeinflussende Faktoren bei der Auswahl des Implantatmaterials zu berücksichtigen [Geetha M, Singh AK, Asokamani R, Gogia AK. 2009].

Vor allem die physisch-chemischen Methoden und morphologischen Veränderungen bei der Oberflächenbearbeitung wie das Polieren, Anrauen oder Beizen des Materials sind gängige Methoden, um eine bessere Einpassung in den Defektbereich oder eine gesteigerte bioaktive Wirkung zu erzielen.

Auf der anderen Seite können unterschiedliche Bearbeitungsmethoden des Implantates als Vorbereitung für die Beschichtung auch unterschiedlich gute Ergebnisse bei der Anhaftung dieser an die Materialoberfläche mit sich bringen. So führt ein Polieren oder Abschleif von zum Beispiel nur der Außenfläche des Implantates zur Entfernung herstellungsbedingter Materialfehler zwar zu einer glatteren Oberfläche, bietet der Beschichtung jedoch auch weniger Ansatzmöglichkeiten, sich mit der Oberfläche zu verbinden, woraus sich Differenzen in der An- und Einwachsung des KEM im Knochengewebe ergeben könnten. Darüber hinaus spielen die Konsistenz und

Zusammensetzung der Beschichtung eine weitere entscheidende Rolle bei der erwünschten Interface-Reaktion.

Experimentell kann man die Adhäsion verschiedener Beschichtungen an metallische Oberflächen mit dem *Tensile Adhesion Test* (TAT) darstellen. Dazu wird die Zeit und Kraft aufgezeichnet, die es braucht, ein beschichtetes und unbeschichtetes metallisches Objekt, welches jeweils in der Mitte von einem Verbindungsstück getrennt und gleichermaßen zusammengehalten wird, zu lösen. War die Verbindung mit der beschichteten Seite stärker, so löst sich zuerst das Stück ohne Beschichtung und umgekehrt. Anhand dieses semiquantitativen Versuches kann man zwar keine Aussagen zu der genauen Korrelation der Interface-Integrität treffen, es reicht jedoch dazu aus, ein Ranking bezüglich der qualitativen Eigenschaften verschiedener Beschichtungen zu erstellen, wobei jedoch diese Art von Test mit weiteren Mikroanalysen (SEM; XRD; FTIR) zum Beschichtungsverhalten unter verschiedenen experimentell herbeigeführten Belastungen kombiniert werden sollte [Berndt CC. 1990].

Häufig verwendete Beschichtungen bioaktiver Implantate sind unter anderem Nano-Keramik-Partikel, Hydroxylapatite (HA), poröse Calciumphosphate sowie elektrophysiologisch konzipierte Beschichtungen [Samuel RE et al. 2011].

Das zu 40% im menschlichen Knochen vorkommende HA wird durch den Prozess der Biomineralisierung natürlicherweise gebildet und bietet durch seine in Wirbeltieren vorkommende Hartschubstanz eine vergleichbare Mikroarchitektur. Nach der Implantation eines mit HA beschichteten Implantates kann sogleich nach Einbringung des Materials eine osteogene Reaktion mit dem umliegenden Gewebe des Defektbereiches beginnen und mithilfe der ähnlichen mineralischen Zusammensetzung kann die Füllung und Defektstabilisierung initiiert werden [Chen X-B et al. 2009].

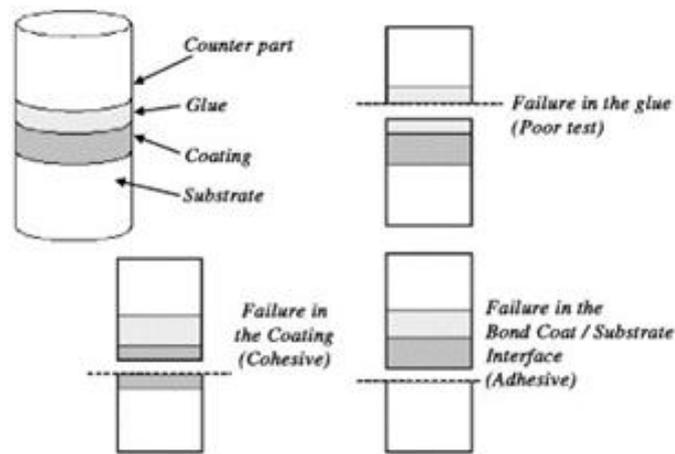


Abb. 8.3: Schema des TAT-Versuchsaufbaus und mögliche Resultate nach Belastung der Grenzflächenverbindung bei beschichteten und unbeschichteten Materialien [aus Lima CRC, Guilemany JM. 2007].

- Unten links: Bruch des Anteils mit Beschichtung.
- Oben rechts: Bruch des unbeschichteten Anteils; Materialfehler.
- Unten rechts: Bruch des Interface-Bereichs zwischen Beschichtung und metallischem Verbindungsobjekt.

Ein weiteres Beispiel einer initiierbaren osteokonduktiven Implantatreaktion durch bioaktive Beschichtungen beschreiben Hamada et al. (2002) unter anderem in ihrer Untersuchung einer mit Calcium-Ionen angereicherten Lösung, die mittels eines speziellen hydrothermischen Verfahrens auf Titanium aufgebracht wird. Durch ein chemisches Verfahren ist es möglich, Calcium-Ionen und Titaniumdioxid in Calcium-Titanat umzuwandeln und durch diese Transformation eine hervorragende Grundlage eines die Knochenregeneration stimulierenden Materials herzustellen.

In Anlehnung an biomechanische, chemische und osteo-regenerative Eigenschaften des menschlichen Knochens wird daher an der idealen Zusammensetzung und Herstellung bioaktiver Beschichtungen für KEM geforscht, wobei unter anderem laut Chen et al. (2002) eine besondere Herausforderung darin besteht, neben der Aufbringung einer am besten geeigneten Ionen-Konzentration, eine dem bindegewebigen Wachstum von im Defektbereich liegenden Gewebezellen überlegenere Osteokonduktion durch die Implantatbeschichtung entgegen zu setzen.

Bei der Betrachtung der histomorphometrisch ausgewerteten Bilder bestätigt sich der zu Anfang beobachtete rein makroskopische Eindruck, dass es bei den beschichteten gegenüber den unbeschichteten Implantaten in diesem Versuchsaufbau keine verbesserte Knochenregeneration im Interface-Bereich gibt. Aus über 80 Calcein-Grün

gefärbten und 13 TRAP-positiv gefärbten Schnitten wurde, zunächst einzeln und dann gemittelt, die Fläche an neu gebildetem Knochen und den knochenresorbierenden Zellen ermittelt, um einen eventuell verminderten Knochenabbau durch die bioaktive Beschichtung aufzeigen zu können. Die Ergebnisse für beide Färbungen konnten dabei jedoch keinen signifikanten Unterschied aufweisen und deuten an, dass die hier verwendete Calcium-Titanat-Schicht zumindest gegenüber des bereits erprobten Implantatmaterials keinen eindeutigen Vorteil bietet.

Was jedoch besonders gut auf den TRAP-positiv gefärbten Bildern zu erkennen ist, ist die Aktivität der Zellen des Knochengewebes im Interface-Bereich. Als Mitglied in der Gruppe der sauren Phosphatasen, ist die TRAP in hoher Konzentration in den Knochen resorbierenden Zellen wie zum Beispiel den Osteoklasten und Makrophagen vorhanden. Ansammlungen knochenresorptiver Zellen finden sich in unmittelbarer Implantatnähe. Und da gerade beim Knochenwachstum ein Gleichgewicht zwischen den Knochen aufbauenden und resorbierenden Zellen besteht, kann, trotz fehlender Anfärbung zum Beispiel von Osteoblasten als Zellen des Knochenaufbaus, von ihrem Vorhandensein ausgegangen werden. Der Vergleich beider Versuchsgruppen erbringt zwar bei dieser Stichprobenmenge keinen signifikanten Unterschied, zeigt aber durch die Wahl der Implantat-Legierung und des Materials, dass die Anregung der Knochenregeneration in einem gewissen Ausmaß erfolgt ist und das Einwachsen des Implantats gefördert hat. Diesen Effekt sieht man besonders deutlich anhand der Elektronenmikroskop-Bilder, welche den Verbund von Knochen mit Implantatoberfläche abbilden.

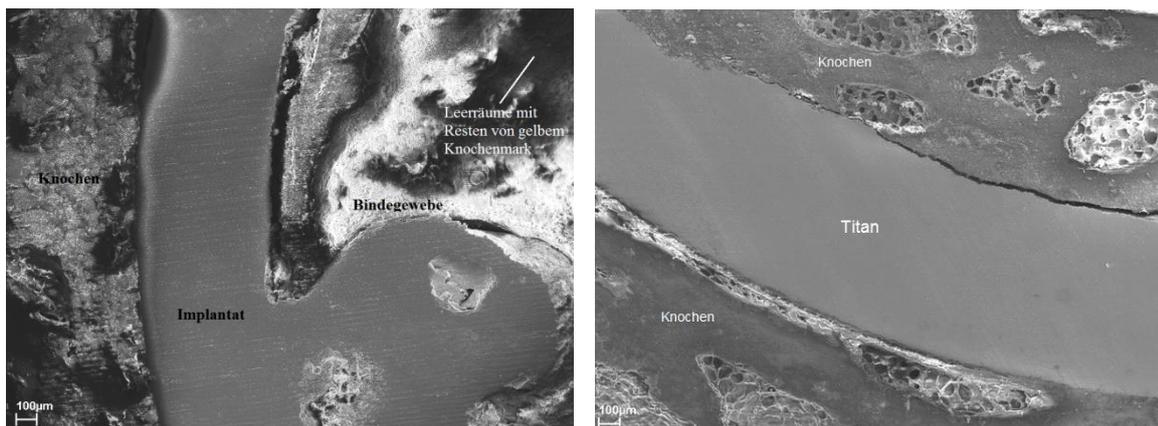


Abb. 8.4: Knochen-Implantatverbund bei einem beschichteten (links) und unbeschichteten (rechts) Elektronenmikroskop-Bild (REM).

Zu erkennen ist, dass Knochengewebe in die Materialstruktur eingewachsen ist, wobei insbesondere die unmittelbare Kontaktfläche von Knochen und Implantat (BIC) großflächig und regelmäßig zu interagieren scheint (siehe Abbildung 8.4).

Als Ergänzung der histologischen und makroskopischen Ergebnisse wurde für je fünf beschichtete und unbeschichtete Implantate sowie den Leerdefekt eine molekularbiologische Untersuchung von Cathepsin-K als Marker der Knochenresorption vorgenommen.

Bei den Proben von beschichteten Implantaten wurde zuvor die Hypothese aufgestellt, dass sie eine verminderte Expression von Cathepsin-K aufweisen müssten, damit von einer gehemmten Resorption durch den Knochen abbauenden Zellen und somit von einer gesteigerten Knochenregeneration gesprochen werden könnte.

Im Vergleich zum Leerdefekt und der β 2M-Kontrolle konnte jedoch kein signifikanter Unterschied ermittelt werden, sodass auch hier davon ausgegangen werden muss, dass es unter diesem Versuchsaufbau keinen erkennbaren Einfluss der Beschichtung auf die Hemmung oder Verstärkung von den Knochen resorbierender oder aufbauender Zellen gibt.

Es sollen noch die Beurteilung von Guillén et al. bezüglich der biomechanischen Ergebnisse diskutiert werden. Ziel dieser Untersuchung war die mechanische Objektivierung der im Interface-Bereich existierenden Stabilität. Dazu wurde untersucht, ob im Push-Out-Versuch mehr Kraft für die beschichteten Implantate infolge einer besseren Interaktion von Knochengewebe mit Beschichtung stattgefunden hatte und somit ein verbessertes Einwachsen des Knochens an und in die Implantatstruktur erfolgt sei. Dabei sollte die offenporige Struktur unterstützend agieren und somit eine stärkere Frakturstabilität erzielen. Die von Guillén et al. ermittelten Werte sowie deren Aufarbeitung in der entsprechenden Dissertation [Guillén GT et al. 2012] kommen jedoch ebenso zu dem Schluss, dass unter den gegebenen Versuchsparametern kein signifikanter Unterschied in der biomechanischen Belastbarkeit der beschichteten und unbeschichteten Interface-Regionen gesehen werden konnte und somit die zuvor in dieser wissenschaftlichen Arbeit erhobenen Ergebnisse bestätigt werden konnten.

Abschließend erfolgt somit die Einschätzung, dass unter Berücksichtigung aller mit in diese Arbeit einbezogenen Methoden und Untersuchungen die Biokompatibilität der biologischen Calcium-Titanat-Reaktionsschicht auf offenporigen und mit einer Ti-6Al-7Nb-Legierung versehenen Titaniumimplantaten keine signifikante Verbesserung gegenüber der unbeschichteten Proben aufweist. Insbesondere konnte nicht die Reduktion der Knochenresorption mit Folge des verminderten Knochenabbaus erwiesen werden.

Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass eine kleine Stichprobe kaum in der Lage ist, signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen aufzuweisen. Die notwendige Erhöhung der Versuchstieranzahl jedoch schnell zu experimentell nicht mehr durchführbaren Verhältnissen führen kann.

Zudem könnte die hier angewendete Methodik in einer weiterführenden Untersuchung um den immunhistochemischen Nachweis von zum Beispiel ASMA (Autoantikörper gegen glatte Muskulatur), welche sich bei der vaskulären Proliferation finden, oder CD-44 (Adhäsionsmolekül mit starker Bindung u.a. an Hyaluron auf Seite der osteoblastischen Aktivität), in Betracht gezogen werden. Die Gewinnung für Material aus fixierten Schliffrücken ist dazu jedoch nicht geeignet und sollte daher an unfixiertem Material erfolgen.

Das eingeflossene Fachwissen in die einzelnen Versuchsabschnitte sowie die stetigen Bemühungen der einzelnen Arbeitsgruppen zeigen einmal mehr die Aktualität und Nachfrage nach optimierbaren Knochenersatzmaterialien und erfordern auch weiterhin Studien zu die Biokompatibilität und Knochenregeneration verbessernden Mitteln. Die hier erfolgten Versuche am Großtier Schaf als Annäherung an beim Menschen vorherrschenden biologischen und mechanischen Verhältnissen waren dabei ein wichtiger Schritt zum Verständnis der Knochenregeneration unter natürlichen Verhältnissen und vergleichbaren Voraussetzungen.

Zusammen mit weiteren experimentellen Arbeiten auf diesem Gebiet sollte eine angenäherte Übertragbarkeit auf die Reaktionen und Interaktionen im menschlichen Knochengewebe unter Verwendung von mit einer biologischen Reaktionsschicht versehenen Knochenersatzmaterialien möglich sein und die entsprechende Anwendbarkeit im klinischen Alltag erlauben.

Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse tragen insoweit dazu bei, als dass die Funktionalität der bereits bekannten offenporigen Knochenersatzmaterialien aus Titan ihre Biokompatibilität unter Beweis gestellt haben und nach wie vor als Grundlage für weitere Verbesserungen in dem Bemühen um eine bessere Knochenregeneration im knöchernen Defekt dienen können.

9 Zusammenfassung

Die Aufgabe, gezielt eine verbesserte Knochenregeneration durch biokompatible und osteogene Materialien zu erreichen, rückt aufgrund der Nachfrage einer leistungsorientierten Gesellschaft, jedoch auch durch den demografischen Wandel und der somit erhöhten Anforderungen an Knochen und Knorpel, immer mehr in den Mittelpunkt der Erforschung modifizierbarer Knochenersatzmaterialien. Von der Wahl des Implantates über seine mechanische Beschaffenheit und Struktur bis hin zu speziellen, die Knochenregeneration unterstützenden Beschichtungen oder der Infiltration von Wachstumsfaktoren und ähnlichen Stoffen, bietet die Herstellung biokompatibler Knochenersatzmaterialien eine Reihe von Ansatzpunkten für die gezielte Osteokonduktion und ggf. Induktion und Unterstützung des knöchernen Skeletts.

Bisher gab es zu ähnlichen Fragestellungen bereits Studien an Kleintieren wie Ratten oder Kaninchen. Die Übertragung von Ergebnissen solcher wissenschaftlichen Untersuchungen aus einem Großtierversuch, welches ein für das menschliche Skelettsystem und seiner Beanspruchung ähnliches Regenerationsverhalten aufzeigt, gab es unter Verwendung offenporiger Titanium-Zylinderimplantate mit biologischer Reaktionsschicht bei Beginn dieser Studie jedoch noch nicht.

Die Wahl fiel daher auf eine Auswahl von 24 Merino-Schafen, von denen nach einem halben Jahr Proben aus der Femurkondyle entnommen wurden, die nach gesetztem Knochendefekt und anschließender Implantation des Knochenersatzmaterials mit biologischer Calcium-Titanat-Reaktionsschicht unter natürlicher Beanspruchung unter Vollbelastung der Tiere in vivo reagieren konnten.

Die Proben beschichteter und unbeschichteter Implantate wurden unter der Fragestellung verglichen, ob die Verwendung der biologischen Reaktionsschicht eine verbesserte Knochenheilung und -stabilität, einen verminderten Knochenabbau und darüber hinaus die Induktion osteogener Zellen bewirken konnte. Dazu wurden, neben der Miteinbeziehung herstellungsbedingter Faktoren mit möglicher Auswirkung auf das Gesamtergebnis, histologische, histomorphometrische, molekularbiologische und biomechanische Versuche durchgeführt.

Das Ergebnis für alle angewandten Methodiken bestätigte dabei den bereits nach Explantation gewonnenen makroskopischen Eindruck: Zwischen beschichteten und unbeschichteten Implantaten gibt es keinen signifikanten Unterschied im Einwachsverhalten des neu gebildeten Knochens hinsichtlich der Stabilität im Interface-Bereich sowie der Reduktion knochenresorptiver Zellen im Zielbereich. Insbesondere der histomorphometrische Vergleich der zeitgleich mit Calcein-Grün-Fluorochrom gefärbten

Knochenbereiche an Tag 177 und 184 konnte keine signifikanten Abweichungen bei der Knochenregeneration aufzeigen. Die daraufhin gestellte Arbeitshypothese, dass die verwendete Beschichtung keinen Vorteil gegenüber der reinen Titaniumimplantate aufweist, wurde durch den Vergleich der TRAP-positiv gefärbten Zellen, REM-Bilder, relativen Expression von Cathepsin-K und Ausdrückversuche im Rahmen der biomechanischen Versuche bestätigt.

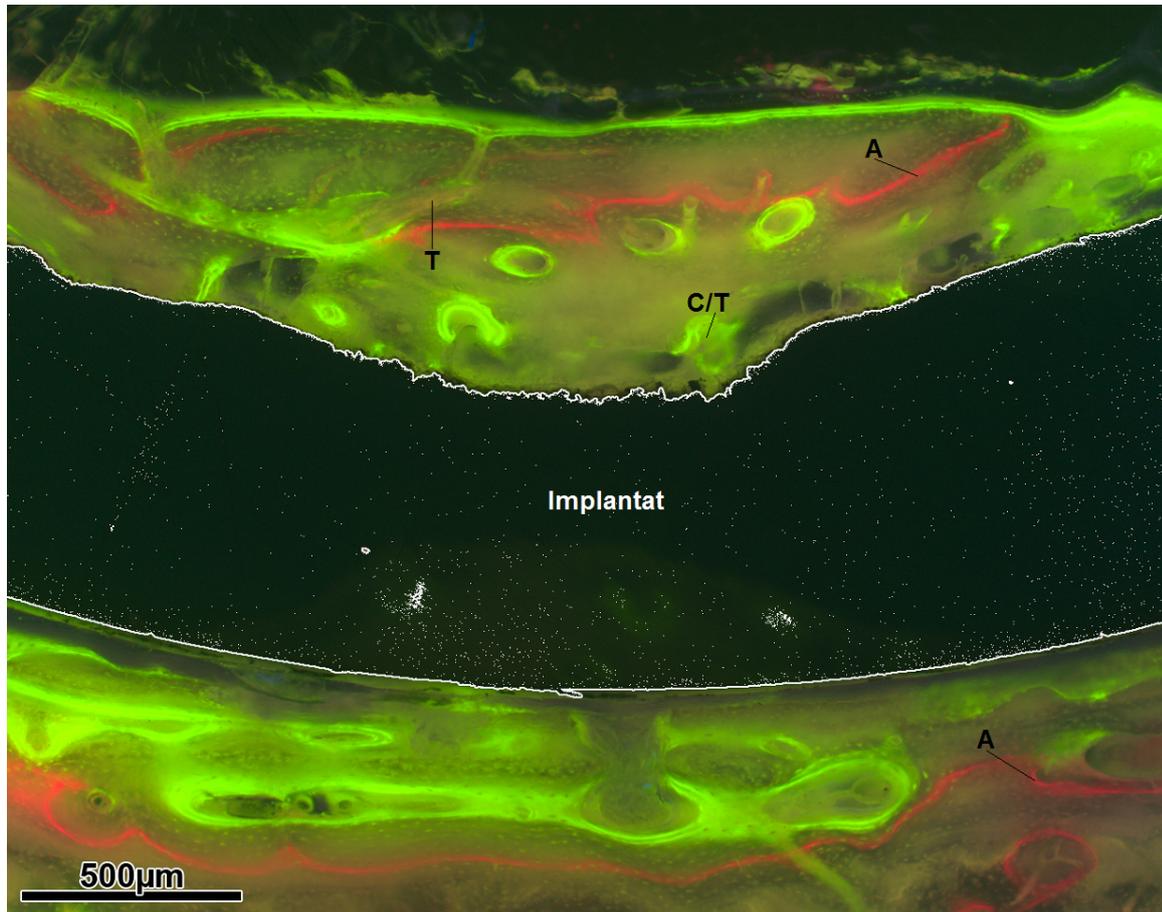


Abb. 9.1: Detailansicht eines beschichteten Fluoreszenzbildes:

C: Calcein Grün (Tag 177 und 184)
T: Oxytetracyclin (Tag 29 und 36)
A: Alizarin (Tag 106)

Entsprechend des Regenerationszeitpunktes und der Dichte des neu gebildeten Knochens, variieren die Intensität und das Farbspektrum der Fluoreszenz.

10 Summary

The task to achieve improved bone regeneration by biocompatible and osteogenic materials has increasingly become the focus of research on modifiable bone substitute materials due to the demands of a competitive society and the demographic change leading to increased strain on bone and cartilage. The choice of the implant, its mechanical properties and structure as well as a coating to support bone regeneration or the infiltration of growth factors etc, offers a range of opportunities to support cells inducing bone regeneration and the bone skeleton.

So far there have been similar academic studies on small animals such as rats or rabbits. At the beginning of this study these scientific results had not been transferred to an experiment with large animals with a skeletal system similar to that of humans and its recovery behaviour, using open-pore Titanium cylinder implants with biological reaction layer.

Therefore a group of 24 Merino sheep was selected and after half a year samples were taken from the femoral condyle, which had been allowed to react naturally in vivo after causing an artificial bone defect with subsequent implantation of bone substitute material with biological Calcium Titanate reaction layer.

After explantation, samples of coated and uncoated implants were compared concerning the question whether use of biological reaction layers could improve bone healing, stability, decrease bone resorption or even cause osteogenic induction. Therefore, in addition to consideration of processing variations with possible influence on the overall result, histological, histomorphometric, molecular biological and biomechanical tests were performed.

The result of all methodologies confirmed the macroscopic impression gained immediately after explantation: namely that there is no significant difference between coated and uncoated implants related to ingrowth of newly formed bone, stability in the interface area as well as the reduction of osteoclasts in the target area. Particularly the histomorphometric comparison of the osseous areas, all simultaneously marked with Calcein-Green-Fluorochrome, did not indicate any significant divergences of osseous regeneration. Finally, the hypothesis of there being no significant difference between coated and uncoated implants was confirmed by the additional analysis of TRAP-positive-coloured cells, REM pictures, relative expression of Cathepsin K and biomechanical push-out-tests.

11 Verzeichnisse

11.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| adR | auf dem Rüttler |
| Ann. Temp. | Annealing Temperature |
| AOI | Area Of Interest |
| Aqua Dest | destilliertes Wasser |
| Aq. Inj. | Aqua Injectionem |
| ASMA | Anti-Smooth Muscle Antibodies |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| b | beschichtet |
| β2M | Beta-2-Microglobulin |
| BIC | Bone Implant Contact |
| BMP | Bone Morphogenetic Proteins |
| BMU | Basic Multicellular Unit |
| bp | Basenpaare |
| CTSK | Cathepsin-K |
| Ct-Wert | Cycle Threshold-Wert (für Schwellenwert-Zyklus) |
| DBCS | Diamond Bone Cutting Systems |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMF | Dimethylformamid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DOPC | Determined Osteogenic Precursor Cells |
| dNTP | Desoxyribonukleotidtriphosphate |
| E | Young´s modulus |
| FTIR | Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer |
| H ₀ | Hypothese |
| H ₁ | Gegenhypothese |
| HA | Hydroxylapatit |
| IGF | Insulin-like Growth Factor |
| IL | Interleukin |
| IOPC | Inducible Osteogenic Precursor Cells |
| kbp | Kilobasenpaare |
| KEM | Knochenersatzmaterialien |
| KG | Körpergewicht |
| kg | Kilogramm |

| | |
|---------------|---|
| L | Liter |
| le | Leerdefekt |
| M-CSF | Macrophage Colony-Stimulating Factor |
| MEA | 2-Methoxyethyl-Acetat |
| mg | Milligramm |
| MHC | Major Histocompatibility Complex |
| µg | Mikrogramm |
| mJ | Millijoule |
| MTS | Material Test System |
| NaCl | Natrium-Chlorid (physiologische Kochsalzlösung) |
| N | Newton |
| nm | Nanometer |
| OPG | Osteoprotegerin |
| OT | Objektträger |
| OTC | Oxytetracyclin |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PDGF | Platelet-Derived Growth Factor |
| PS | Photoshop |
| PTH | Parathormon |
| qPCR | quantitative PCR |
| RANK-L | Receptor Activator of Nuclear factor-κB-Ligand |
| REF | Reference |
| REM | Rasterelektronenmikroskop |
| RUNX-2 | Runt-related Transcription Factor 2 |
| R (Core Team) | A language and environment for statistical computing (2014) |
| RP | Rapid Prototyping |
| SEM | Scanning Electron Microscope |
| STH | Somatotropes Hormon |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TAT | Tensile Adhesion Test |
| TEM | Transmissionselektronenmikroskopie |
| TRAP | Tartrat-Resistent Acid Phosphatase |
| TRG | Target |
| TNF-α | Tumornekrosefaktor-α |
| ub | unbeschichtet |
| ZFE | Zentrale Forschungseinrichtung |
| XRD | X-Ray Diffraction |

11.2 Literaturverzeichnis

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2011): Molekularbiologie der Zelle. John Wiley & Sons. S.1060-1062. ISBN: 3527323848.

Alves RD, Eijken M, Bezstarosti K, Demmers JA, van Leeuwen JP. (2013): Activin A suppresses osteoblast mineralization capacity by altering extracellular matrix composition and impairing matrix vesicle production. In: Mol. Cell Proteomics.

Alzubaydi TL.; Alameer SS.; Ismaeel T; Alhijazi AY.; Geetha, M. (2009): In vivo studies of the ceramic coated titanium alloy for enhanced osseointegration in dental applications. In: J Mater Sci Mater Med 20 Suppl 1, S. S35-42.

Amorosa, LF, Lee, CH, Aydemir, AB, Nizami, S, HSU, A, Patel, NR et al. (2013): Physiologic load-bearing characteristics of autografts, allografts, and polymer-based scaffolds in a critical sized segmental defect of long bone: an experimental study. In: Int J Nanomedicine 8, S. 1637–1643.

Anagnostakos K, Scharf H-P. (2011): Orthopädie und Unfallchirurgie. Facharztwissen nach der neuen Weiterbildungsordnung. 2., korrigierte Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer. 40ff.

Berndt CC. (1990): Tensile adhesion testing methodology for thermally sprayed coatings. In: J. Materials Engineering 12 (2), S. 151–158.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. (2003 May): Review article Osteoclast differentiation and activation. In: Nature 423, 337-342 (15 May 2003) | doi:10.1038/nature01658

Brandt J, Bierögel C, Holweg K, Hein W, Grellmann W. (2005): Erweiterter push out-Test zur Schädigungscharakterisierung der Implantat-Knochen-Grenzfläche / Extended push-out test to characterize the failure of bone-implant interface. In: Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering 50 (6), S. 201–206.

Brinckmann P, Frobin W, Leivseth G. (2000): Orthopädische Biomechanik. Georg Thieme Verlag, ISBN: 3131266317. S. 162.

Büning H, Trenkler G. (1994): Nichtparametrische statistische Methoden. Walter de Gruyter-Verlag. S. 131ff.

Chen X-B, Li Y-C, Du Plessis J, Hodgson PD, Wen C. (2009): Influence of calcium ion deposition on apatite-inducing ability of porous titanium for biomedical applications. In: Acta Biomater 5 (5), S. 1808–1820.

Dallas SL, Prideaux, M, Bonewald, LF. (2013): The Osteocyte: An Endocrine Cell and More. In: Endocr. Rev.

DeSelm CJ, Miller BC, Zou W, Beatty WL, van Meel E, Takahata Y et al. (2011): Autophagy proteins regulate the secretory component of osteoclastic bone resorption. In: Dev. Cell 21 (5), S. 966–974.

Dongowski N. (2010): Expression von BDNF und TrkB in der humanen Frakturheilung. Dissertation. Justus-Liebig-Universität Gießen. Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie UKGM, Gießen.

- Dougall WC et al. (1999): RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev.* 13(18):2412-24
- Durst J, Allenberg J-R (Hg.). (1997): *Traumatologische Praxis: in einem Band. Standards in Diagnostik und Therapie für alle Fachgebiete ; mit 91 Tabellen: Schattauer Verlag.* 35ff.
- Feifel H, Schmitz HJ, Albert-Deumlich J, Wimmer F, Schmidt KH. 1994: Knöcherne Integration porösen korallinen Hydroxylapatits nach Beschichtung mit einem osteoinduktiven Proteinkomplex. Histologische und histomorphometrische Untersuchungen am Kaninchen. In: *Zeitschrift für Zahnärztliche Implantologie*, Bd. 10, S. 89–98.
- Franchi M, Bacchelli B, Giavaresi G, Pasquale V de, Martini D, Fini M et al. (2007): Influence of different implant surfaces on peri-implant osteogenesis: histomorphometric analysis in sheep. In: *J. Periodontol.* 78 (5), S. 879–888.
- Friedl W, Clausen J. (2001): Experimentelle Untersuchungen zur Optimierung der Belastungsstabilität von Implantaten für proximale Femurfrakturen Intra- versus extramedulläre Lage des Kraftträgers und Untersuchung zur Minimierung des Ausbruchsrisikos des Schenkelhalskraftträgers. November; 72, Issue 11: 1344–1352.
- Geetha M, Singh AK, Asokamani R, Gogia AK. (2009): Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants (54). In: *A review. Progress in Materials Science*, S. 397-425.
- Guillén Girón T. (2012): Properties and application spectrum of cast porous implants made of Ti-6Al-7Nb in coated and uncoated conditions. Dissertation. Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Universität Siegen.
- Guillén GT, Ohrndorf A, Christ H-J. (2013): Biomechanical Evaluation of the Osseointegration of Biologically Coated Open-Cell Titanium Implants. Institut für Werkstofftechnik der Universität Siegen, Deutschland. Erschienen 16.-21. Juni 2013, Beijing, China.
- Hadjidakis DJ, Androulakis II. (2006 December): Bone remodelling. In: *Ann N Y Acad Sci.*, S. 385–396.
- Hagemann K. (2012): Gießtechnische Herstellung offenporiger Implantate aus Ti6Al7Nb. Dissertation. Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, Aachen. Fakultät für Georessourcen und Materialtechnik.
- Hamada K, Kon M, Hanawa T, Yokoyama K, Miyamoto Y, Asaoka K. (2002): Hydrothermal modification of titanium surface in calcium solutions. In: *Biomaterials* 23 (10), S. 2265–2272.
- Hauter N. (2011): Evaluierung automatisierter versus visueller Auswertung von BrdU Schnitten an der Epiphysenfuge der wachsenden Ratte. Diplomarbeit.
- Helmberg A. (2009): Knochen-Stoffwechsel. Vorlesungs-Skript "Gentechnisch hergestellte Medikamente".
- Holick MF. (1995): Noncalcemic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and clinical applications. In: *Bone*, S. 107-111.
- Hollinger J, Kleinschmidt J. (1990): The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1:60-68.

- Hollinger JO, Buck D, Schmitz JP. (1994): Quantitative light microscopy. A powerful tool to assess bone. In: Clin Plast Surg 21 (3), S. 463–475.
- Hortipendium-Autoren: Schematische Darstellung des PCR-Zyklus. (2010) In: Hortipendium, das grüne Lexikon. Online verfügbar unter <http://www.hortipendium.de/index.php?title=Polymerase-Kettenreaktion&oldid=13561>.
- Jähne J et al. (2009): Was gibt es Neues in der Chirurgie?: Hüthig Jehle Rehm.
- Jerosch J. (2002): Knochen. Curasan Taschenatlas spezial. Stuttgart: Thieme.
- Jovanović M, Bobić I, Mišković Z, Zec S. (2009): Precision cast of Ti-based alloys - microstructure and mechanical properties. (15). In: Metalurgija - Journal of Metallurgy, 2009, S. 53-69.
- Junker R, Dimakis A, Thoneick M, Jansen JA. (2009): Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. In: Clin Oral Implants Res 20 Suppl 4, S. 185–206. DOI: 10.1111/j.1600-0501.2009.01777.x.
- Kalpakjian S, Schmid SR, Werner EA. (2011): Werkstofftechnik. 5. aktual. Aufl. München: Pearson Studium / Pearson Education (Always learning).
- Keck A-V, Pecherstorfer M. 2003. Knochenstoffwechsel bei malignen Erkrankungen. Journal für Mineralstoffwechsel 2003; 10 (2), 6-11.
- Kemkes-Matthes B, Oehler G. (2001): Blutgerinnung und Thrombose. Georg Thieme Verlag. S. 10-12. ISBN: 3131048220
- Khosla S, et al. (2010, Dec): Stem Cells. Concise Review: Insights from Normal Bone Remodeling and Stem Cell-Based Therapies for Bone Repair. 28(12): 2124–2128.
- Kim TH, Oh SH, Na SY, Chun SY, Lee JH. (2012): Effect of biological/physical stimulation on guided bone regeneration through asymmetrically porous membrane. J Biomed Mater Res Part A. 100A: 1512–1520.
- Klein MO, Götz H, Duschner H, Wagner W. (2010): Anforderungen an moderne Knochenersatzmaterialien. In: MKG-Chirurg 2010. DOI 10.1007/s12285-010-0186-y; Springer-Verlag 2010, Redaktion: E. Esser, Osnabrück.
- Kohli SS, Kohli VS. (2011). Role of RANKL-RANK/ osteoprotegerin molecular complex in bone remodeling and its immunopathologic implications. Indian J Endocr Metab. 15:175-81.
- Köster K, Karbe E, Kramer H, Heide H, König R. (1976): Experimental bone replacement with resorbable calcium phosphate ceramic (author's transl) Langenbecks Arch Chir. 1976 Jul 23;341(2):77-86.
- Kumar CSSR. (Hg.). (2010): Nanostructured thin filmings and surfaces. 1. Aufl. 10 Bände. In: Nanomaterials for the Life Sciences, 5. Weinheim: WILEY-VCH.
- Lang G. (2013): Histotechnik. Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. 2., überarbeitete und aktualisierte Auflage. Vienna: Springer (SpringerLink : Bücher).
- Lima CRC, Guilemany JM. (2007): Adhesion improvements of Thermal Barrier Coatings with HVOF thermally sprayed bond coats. In: Surface and Coatings Technology 201 (8), S. 4694–4701.

Lohmann S. (2005): Eigenschaften biologischer Materialien zur Simulation menschlicher Bewegung. Funktionell-anatomische Grundlagen und Materialeigenschaften zur Erstellung dreidimensionaler Körpermodelle im Computer. Dissertation. Universität Konstanz, Konstanz. Fachbereich Geschichte und Soziologie, S. 25-27.

Lorenzetti M, Dakischew O, Trinkaus K, Lips KS, Schnettler R, Kobe S, Novak S. (2015): Enhanced osteogenesis on titanium implants by UVB photofunctionalization of hydrothermally grown TiO₂ coatings. *J Biomater Appl.* 2015 Jul;30(1):71-84. doi: 10.1177/0885328215569091. Epub 2015 Jan 28.

Lüllmann-Rauch R. (2006): Taschenlehrbuch Histologie, 2. Auflage, 637 Seiten. 156-161.

Meirelles L, Arvidsson A, Albrektsson T, Wennerberg, A. (2007): Increased bone formation to unstable nano rough titanium implants. In: *Clin Oral Implants Res* 18 (3), S. 326–332. DOI: 10.1111/j.1600-0501.2006.01308.x.

Marusina K. (2013): RT-PCR: Ready for Prime Time? In: *Genetic Engineering and Biotechnology News* 33 (14). (01.08.2013). Online verfügbar unter <http://www.genengnews.com/gen-articles/rt-pcr-ready-for-prime-time/4944/>.

McCarthy TL, Chang WZ, Liu Y Centrella M. (2003): Runx2 integrates estrogen activity in osteoblasts. In: *J. Biol. Chem.* 278 (44), S. 43121–43129.

Michler GH, Lebek W. (2004): Ultramikrotomie in der Materialforschung. 1. Aufl. München: Hanser.

Moeller E (Hg.). (2008): Handbuch Konstruktionswerkstoffe. Auswahl, Eigenschaften, Anwendung. München: Hanser.

Módis L, Petkó M, Földes I. (1969): Histochemical examination of supporting tissues by means of fluorescence. II. Fluorochromes as an indicator of lamellar bone mineralization. *Acta Morphol Acad Sci Hung.* ;17(2):157-66.

Mulisch M, Welsch U. (Hg. 2010): Romeis Mikroskopische Technik. 18. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Murphy, CM, O'Brien, FJ. (2010): Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds. In: *Cell Adh Migr* 4 (3), S. 377–381.

Neumann M. (2009): Synthese und Charakterisierung von Calciumcarbonat-Phasen und Calciumphosphat-basierter Knochenersatzmaterialien. Doktorarbeit / Dissertation. 1. Aufl. München: GRIN-Verlag.

Niedhart C, Niethard FU et al. (1998): Klinische Anforderungen an Knochenersatzstoffe. In: *Bioceramics in Orthopaedics - New applications, Proceedings of the 3rd International Symposium on Ceramic Wear Couple, February 14 Stuttgart Germany*: 46-50.

Peters KM, König DP. (2008): Fortbildung Osteologie 2. [Heidelberg]. Steinkopff. 64f.

Peters KM, König DP. (2010): Fortbildung Osteologie. Berlin: Springer (Fortbildung Osteologie, 3). 102ff.

Rahn BA. (1976): Die polychrome Sequenzmarkierung des Knochenanbaus. [Freiburg i. Br.], Habilitationsschrift.

Rammelt S, Heck C, Bernhardt R, Bierbaum S, Scharnweber D, Goebbels J et al. (2007): In vivo effects of coating loaded and unloaded Ti implants with collagen, chondroitin sulfate, and hydroxyapatite in the sheep tibia. In: J. Orthop. Res. 25 (8), S. 1052–1061.

Rawadi G et al. (2003): BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. J Bone Miner Res. 18(10):1842-53

Rehmet, R. (1997): Das Adsorptionsverhalten von Poly(diallyl-dimethylammoniumchlorid), Poly(N-methyl-N-vinylacetamid), Poly(diallyl-dimethylammoniumchlorid-co-N-methyl-N-vinylacetamid) und Poly-L-lysin auf Polystyrolatex. München: Utz, Wiss (Chemie). S. 47ff.

Richly M. Juvent Biomedical GmbH & Co. KG. Online verfügbar unter: <http://www.juvent.de/therapie/knochen.und.osteoporose/osteoporose>.

Rueger JM et al. (1992): Knochenersatzmittel. Hefte Unfallheilkunde 1992; S.213.

Samuel RE, Shukla A et al. (2011): Osteoconductive protamine-based polyelectrolyte multilayer functionalized surfaces. In: Biomaterials 32 (30), S. 7491–7502.

Schild TA: 7700 SDS Workshop. Einführung in die Real-Time TaqMan™ PCR-Technologie. Vers. 2.1. Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt.

Schmitz-Rode T, et al. (2011): Bioimplantate. Biologische, biologisierte und biofunktionalisierte Implantate; [Bioengineering]. Frankfurt am Main: VDE (Acatech-Positionspapier).

Schnettler R, Knöss PD, Heiss C, Stahl JP, Meyer C, Kilian O, Wenisch S, Alt V. (2009): Enhancement of bone formation in hydroxyapatite implants by rhBMP-2 coating. In: J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2009 Jul;90(1):75-81. doi: 10.1002/jbm.b.31255.

Singer AJ, Clark RA. (1999): Cutaneous wound healing: (341). In: N Engl J Med 1999, S. 738–746.

Skerry TM, Bitensky L, Chayen J, Lanyon LE. (1989): Early strain-related changes in enzyme activity in osteocytes following bone loading in vivo. In: J Bone Miner Res 1989; 4: 783-788

Soost F. (2001): Validierung des Knochenumbaus von Knochenersatzmaterialien in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Habilitationsschrift. Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität, Berlin.

Trebsdorf M (Hg.). (2000): Biologie, Anatomie, Physiologie. Aufbau eines Röhrenknochens. Reinbek: Lau-Verlag.

U Test Result. (19.08.2013): <http://elegans.som.vcu.edu/~leon/stats/utest.cgi>.

Vorkamp A. (2003, Apr): Molekulare Analyse der Skelettentwicklung. Habilitationsschrift.

Weissensteiner T. (2004): PCR technology. Current innovations. 2nd ed. Boca Raton, Fla: CRC Press.

Welch two sample t-test (2014): R Core Team (Version 3.1.1): A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>

Herde K, Hartmann S, Brehm R, Kilian O, Heiss C, Hild A, Alt V, Bergmann M, Schnettler R, Wenisch S. (2007): Connexin 43 expression of foreign body giant cells after implanatation of nanoparticulate hydroxyapatite Biomaterials 2007;28:4912-4921

Wirth CJ et al. (2010): Komplikationen in Orthopädie und Unfallchirurgie. 1. Auflage. [s.l.]: Thieme.

Yao Z, Xing L, Boyce BF. (2009): NF-kappaB p100 limits TNF-induced bone resorption in mice by a TRAF3-dependent mechanism. In: J. Clin. Invest. 119 (10), S. 3024–3034.

11.3 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 2.1: Darstellung des Aufbaus von Lamellenknochen [aus Trebsdorf M. 2000].
- Abb. 2.2: Interaktion von RANKL/OPG im molekularen Komplex: Induktion und Hemmung des Osteoklasten-vermittelten Knochenabbaus [aus Kohli SS, Kohli VS. 2011].
- Abb. 3: Sekundäre Frakturheilung: Entzündungsphase, Granulationsphase mit weichem Kallus, Phase der Kallushärtung mit hartem Kallus, Remodeling [aus Hauter N. 2011].
- Abb. 3.1: Schematische Darstellung der BMU [aus Dionyssiotis Y. 2015: Medicine » Immunology, Allergology and Rheumatology » "Advances in Osteoporosis", book edited by, ISBN 978-953-51-2027-8].
- Abb. 5: Klassifizierung und Häufigkeit öfter verwendeter Knochenersatzmaterialien [aus Soost F. 2001].
- Abb. 5.1 Zusammenhang zwischen der Osteokonduktion und der Stabilität verschiedener KEM [Niedhart et al. 1998].
- Abb. 6.2: Lochkorrosion nach a) 20, b) 40, c) 60-70 Minuten des Beizens und d) Querschnitt im SEM-Mikroskop nach 60-70 Minuten des Beizens [Guillén T, Ohrndorf A, Christ H-J. 2013].
- Abb. 6.2.1: Titanium-Zylinderimplantate in steriler Verpackung präimplantationem.
- Abb. 6.2.2: Dargestellt ist das Verfahren eines Feinguss-/Wachsausschmelzverfahrens [Kalpakjian S et al. 2011].
- Abb. 6.2.3: Auf dem linken Bild ist ein offenporiges Titanium-Zylinderimplantat, auf dem rechten Bild eine schematische Darstellung der Bälkchenstruktur von Lamellenknochen zu sehen [aus Guillén GT. 2012 und Richly M. Juvent Biomedical GmbH & Co. KG].
- Abb. 6.3: Die zwei Bilder zeigen das sterile Operationsbesteck und das zur Verfügung stehende Monitoringequipment und Narkosegerät [aus eigenen Bildern].
- Abb. 6.3.1: Die Bilder zeigen das intra-operativ eingesetzte DBCS und den mit einem Titaniumimplantat aufgefüllten Knochendefekt.
- Abb. 6.5: Auf dem rechten Bild sind die für die Perfundierung verwendeten Katheter mit Perfusionssystem zu sehen. Das rechte Bild zeigt eine Auswahl der verwendeten Medikamente.
- Abb. 6.5.1: Auf dem oberen Bild ist die freipräparierte Femurkondyle von Schaf Nr. 15 vor Euthanasie zu sehen. Auf dem linken Bild ist ein für die Histologie zugesägter Knochenschnitt mitsamt unbeschichtetem Implantat abgebildet. Das rechte Bild zeigt ein für die Biomechanik explantiertes Gelenk mit unbeschichtetem Implantat.

- Abb. 6.6: Das Bild zeigt das für die Schliffherstellung verwendete EXAKT-Mikroschleifsystem (400 CS) und Steuerungselement (EXAKT AW 10).
- Abb. 6.7: TRAP-Färbung in einem mit dem Lichtmikroskop aufgenommenen Präparat. Schwarz dargestellt ist das Implantat, die vereinzelt im Bild vorkommenden rot-gefärbten Zellen sind TRAP-pos.-Zellen wie zum Beispiel Osteoklasten.
- Abb. 6.7.1: Auf den Detailaufnahmen der TRAP-Bilder sieht man deutlich die rot gefärbten Osteoklastennester. Das Implantat stellt sich schwarz dar. Das hellere, umliegende Gewebe ist neu gebildeter Knochen.
- Abb. 6.8: Dargestellt ist ein Fluorochrom-gefärbtes und mit dem Lichtmikroskop fotografiertes Bild, in dem histomorphometrisch die grüne Fluoreszenz ausgemessen worden ist. Gut nachvollziehbar ist wie der neu gebildete Knochen in das Implantat eingewachsen ist.
- Abb. 6.9: Die oberen Bilder zeigen REM-Aufnahmen beschichteter Implantate:
Linkes Bild: zwischen dem Knochengewebe ist das Implantat abgebildet
Rechtes Bild: kollagene Fasern ziehen in das Implantat.
Die unteren Bilder zeigen REM-Aufnahmen unbeschichteter Implantate:
Linkes Bild: das neu gebildete Knochengewebe reicht sowohl von der Außen- als auch von der Innenseite im Interface-Bereich an das Implantat heran.
Rechtes Bild: dargestellt ist der enge Verbund von Knochengewebe und Implantatoberfläche.
- Abb. 6.10: Schematische Darstellung des PCR-Zyklus.
- Abb. 6.10.1: Ergebnis der Gelelektrophorese der qualitativen PCR. Insgesamt 24 Banden (1x Positiv-Kontrolle an Stelle Nr. 13, 1x Negativ-Kontrolle an Stelle 24 und 11x je eine Positiv- und Negativ-Probe der Eluate).
- Abb. 6.11.1: Fixierung für *Push-Out-Testung*. Zu sehen ist der in die Vorrichtung eingespannte Knochen mit Implantat sowie die Angabe über Richtung der Röntgenstrahlung für weitere Tests [aus Guillén GT. 2012].
- Abb. 6.11.2: Darstellung der ein Implantat enthaltenden Femurkondyle von
a) frontaler Ansicht, b) lateraler Sicht im μ -CT.
Pfeile von oben nach unten: Knochenmark, Kortikalis, Spongiosa [aus Guillén GT et al. 2013].
- Abb. 7.1: Zur makroskopischen Beurteilung aufgeführt sind in der linken Spalte beschichtete und in der rechten Spalte unbeschichtete Implantate. Diese wurden unmittelbar nach der Explantation der Femurkondylen zurecht gesägt und beschriftet fotografiert.
- Abb. 7.2: Detailaufnahmen von zwei mit Toluidinblau angefärbter Präparate. Deutlich lässt sich Knochen- (hellblau) von Knorpelgewebe (violett) unterscheiden.
- Abb. 7.3: Ausschnitt eines mit Calcein-Grün gefärbten Knochenabschnittes der unmittelbar in der Innenseite des Implantats im Interface-Bereich eingewachsen ist. Man erkennt im Vergleich zur Übersichtsaufnahme eine deutliche Intensivitätszunahme der Fluoreszenz im Bereich der Implantatoberfläche im Gegensatz zur Peripherie.

- Abb. 7.3.1: Im direkten Vergleich lassen sich zwischen mikroskopisch vergrößerten Detailaufnahmen eines im linken Bild unbeschichteten und im rechten Bild beschichteten Implantats keine Unterschiede erkennen.
- Abb. 7.4: Zu sehen ist ein Ausschnitt mit TRAP-positiv gefärbten Zellen (dunkelrot) in einem beschichtetem Präparat (Schaf 11). Deutlich lässt sich auch der neu gebildete Knochen (hellrot) darstellen, wie er zum Teil bis an das Implantat herangewachsen ist.
- Abb. 7.5: Im makro- und mikroskopischen Vergleich der beiden Präparate lässt sich ein enger Knochen-Implantat-Verbund erkennen. In beiden Bildern ziehen die Knochenfasern ohne erkennbaren Vorteil des beschichteten Implantats (rechtes Bild) hinsichtlich einer stärker erfolgten Knochenregeneration und Interaktion mit der Calcium-Titanat-Beschichtung bis an bzw. in die Titaniumoberfläche hinein.
- Abb. 7.6: Darstellung der Differenz zwischen dem oberen und dem unteren Quartil - der so genannte Quartilsabstand, der die "inneren 50%" der nach zunehmender Größe geordneten Daten definiert. Die oberste und unterste horizontale Linie markiert die Ausreißer. Die gestrichelte Linie in der roten Box repräsentiert den Median der Gen-Expression.
- Abb. 7.7: Ergebnisse des Push-Out-Tests als graphische Darstellung
a) beschichtete Proben, b) unbeschichtete Proben [aus Guillén GT et al. 2013].
- Abb. 8.1: S. 77: unbeschichtetes Implantat, S.78: beschichtete Implantate: im beispielhaften Vergleich soll gezeigt werden, dass makroskopisch kein besserer Knochen-Implantatverbund an der Innen- gegenüber der Außenseite gesehen werden konnte.
- Abb. 8.2: Aufgeführt sind wünschenswerte biologische Eigenschaften und ihre in vivo-Realisierung (Fähigkeit zur Implantatanpassung /Remodelling, Autoreparationsmechanismen, vollständige immunologische Integrität) im Verhältnis zur Beschaffenheit des Implantatmaterials und -beschichtung [aus Schmitz-Rode T. 2011].
- Abb. 8.3: Schematischer Versuchsaufbau des *Tensile Adhesion* Tests mit Darstellung eines Bruchs im Interface-Bereich (der Verbindungsstelle zwischen Beschichtung und Material) und eines Bruchs im Material selbst [aus Lima CRC, Guilemany JM. 2007].
- Abb. 8.4: In der Vergrößerung der Elektronenmikroskopie ist die Beziehung von Knochengewebe zur Materialstruktur zu erkennen. Besonders gut lassen sich Ansammlungen von Zellnestern im Knochengewebe erkennen.
- Abb. 9.1: Anhand des vergrößerten Bildausschnittes eines beschichteten Fluoreszenzbildes lässt sich gut darstellen, wie stark und wann einzelne Phasen der Knochenregeneration stattgefunden haben.

11.4 Tabellenverzeichnis

- Tab. 6.1: Übersicht über die Aufteilung der Versuchstiere auf die unterschiedlichen Gruppen.
- Tab. 6.4: Übersicht der applizierten Fluorochrome mit Dosierung und Zeitpunkt der Injektion postoperationem, wobei als OP-Zeitpunkt ein durchschnittlicher (aus fünf OP-Terminen ermittelter) Zeitpunkt gewählt wurde.
- Tab. 6.4.1: Auflistung der versuchsbezogenen Aufteilung der Schafe.
* Der belassene Leerdefekt wurde der Histologie-Gruppe zugeteilt.
- Tab. 6.6: Überblick über das bei der Schliffherstellung verwendete Messprotokoll mit für die Berechnung der verschiedenen Dicken eingesetzten Formeln.
- Tab. 6.6.1: Beispiel für die Listung der einzelnen Schichtdicken eines Präparates während der Vorbereitung zur Färbung und fluoreszenzmikroskopischen Auswertung.
- Tab. 6.7: Ergebnisse der mittels PS ausgemessenen Werte für die prozentual im jeweiligen Präparat vorhandenen TRAP-pos.-Zellen.
- Tab. 6.7.1: Dargestellt sind die im U-Test berechneten Werte für die Signifikanz der beschichteten und unbeschichteten Proben bei den TRAP-pos.-gefärbten Präparaten [online U Test Result. 2013].
- Tab. 6.8: Übersicht der mittels Histomorphometrie ermittelten Werte für die prozentuale Fläche der Calcein-Grün-Färbung im Verhältnis zum AOI.
- Tab. 6.8.1: Dargestellt sind die im U-Test berechneten Werte für die Signifikanz der beschichteten und unbeschichteten Proben bei den Calcein-Grün-gefärbten Präparaten [online U Test Result. 2013].
- Tab. 6.10: Für die qualitative und quantitative PCR-Untersuchung wurden je fünf beschichtete und unbeschichtete und der Leerdefekt ausgewählt. Alle Proben sind vorher nicht perfundiert worden.
- Tab. 6.10.1: Aufgeführt ist der für die PCR verwendete Primer für β 2-Microglobulin.
- Tab. 6.10.2: Aufgeführt ist der für die PCR verwendete Primer für Cathepsin-K als Startpunkt für die DNA-Polymerase.
- Tab. 6.10.3: Material und Durchführung der Gelelektrophorese.
- Tab. 6.11.1: Auflistung der für die Push-Out-Testung ermittelten Neigungswinkel [aus Guillén GT. 2012].
- Tab. 7.3: Mithilfe der histomorphometrisch ermittelten Fläche von den jeweiligen AOIs und des dazugehörigen neu gebildeten Knochens, konnte der prozentuale Wert des mit Calcein-Grün angefärbten Knochens errechnet werden.

- Tab. 7.3.1: Ergebnis der im Rangsummen- (U-) Test errechneten Werte hinsichtlich eines möglichen Unterschiedes zwischen den beiden Gruppen für die Flächen des mit Calcein-Grün angefärbten Knochens. Demnach besteht kein signifikanter Unterschied der Knochenregeneration zwischen beschichteten und unbeschichteten Präparaten.
- Tab. 7.4: Ergebnisse der mithilfe von PS errechneten Flächen aller TRAP-positiv gefärbten Präparate für jeweils den einem Schliff zugeordneten AOI, dem Implantat, dem reinen Knochengewebe und den TRAP-positiv angefärbten Zellen.
- Tab. 7.4.1: Ergebnisse für die anteilig am reinen Knochengewebe errechnete Fläche der TRAP-positiven Zellen in Prozent.
- Tab. 7.6: Prozentualer Anteil der jeweils in den Proben (le/ b/ ub) ermittelten Werte für die relative Expression von Cathepsin-K in der qPCR.
- Tab. 7.6.1: Mittelwerte der durch die qPCR erhaltenen prozentualen Werte für Cathepsin-K anhand der in Kapitel 6.10 erläuterten Formeln.
- Tab. 7.6.2: Zuordnung jeweils einer beschichteten zu einer unbeschichteten Probe im Versuchsaufbau zur Ermittlung der realiven Expression von Cathepsin-K.
- Tab. 7.6.3: Resultat der Berechnung der relativen Expression durch die qPCR von Cathepsin-K (CtsK/sh/133) gegenüber β 2M (B2M/sh/159) als Kontrollgruppe.
- Tab. 7.7: Ergebnisse des Push-Out-Tests, gewonnen durch Guillén et al. (2012). Der *Indenter* registrierte während er das Implantat im rechten Winkel nach unten ausdrückte sowohl die dafür benötigte Ausdruckkraft [N] als auch die dabei aufgenommene Energie [mJ]. Das Präparat von Tier Nr. 1 (ub) war bei der Vorbereitung beschädigt worden und vorzeitig während des Ausdrückversuches gebrochen. Es konnten keine brauchbaren Daten von diesem Implantat zur Biomechanik gewonnen werden.

12 Poster-Veröffentlichung

Veröffentlichung in „Bionano-Materials“, Journal of Functional Materials, Biomechanics and Tissue Engineering, Vol. 14, Nr.1, de Gruyter

Tagungsort: Universitätsklinikum Erlangen, Ulmenweg 18 • 91054 Erlangen

Termin: 26.–28. September 2013

Veranstalter: Deutsche Gesellschaft für Biomaterialien e.V.

Tagungsleitung: Prof. Dr.-Ing. habil. Aldo R. Boccaccini (Lehrstuhlleiter)
Universität Erlangen-Nürnberg, Lehrstuhl Biomaterialien, Cauerstraße
6, 91058 Erlangen

12.1 Abstract

„Prüfung der Knochenregeneration, -interaktion und –stabilität bei Verwendung offenporiger, metallischer Kalzium-Titanat behandelte Zylinderimplantate unter dem besonderen Aspekt des Knochenabbaus in vivo“

K. Lücke¹, U. Sommer¹, U. Thormann², K. Hagemann³, A. Bührig-Polaczek³, T. Guillén⁴, A. Ohrndorf⁴, H.-J. Christ⁴,
U. Ploska⁵, A. Becker⁵, G. Berger⁵, M. Altindis⁶, U. Krupp⁶, S. Wenisch⁷, R. Schnettler²

1 Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Justus-Liebig-Universität Gießen

2 Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH

3 Gießerei-Institut, RWTH Aachen

4 Institut für Werkstofftechnik, Universität Siegen

5 Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung, Berlin

6 Fakultät für Ingenieurwissenschaften und Informatik, Fachhochschule Osnabrück

7 Klinische Anatomie und experimentelle Chirurgie, Justus-Liebig-Universität Gießen

Fragestellung: Kann Knochenheilung durch die Verwendung einer mit Kalziumreaktionsschicht behandelten Titanstruktur gegenüber bereits vorhandenen unbehandelten Titan-Knochenersatzmaterialien verbessert werden?

Einleitung: Die Unterstützung der postfrakturären Knochenheilung sowie die Vaskularisierung und Knochenstabilität nach stattgefundenen Osteointegration stellt die Medizin vor eine große Herausforderung bei dem zu wählenden Therapieansatz und der wirtschaftlich machbaren Umsetzung.

Vor diesem Hintergrund sind offenporige Titaniumzylinderimplantate jeweils mit und ohne bioaktiver Kalzium-Titanat-Reaktionsschicht auf ihre Biokompatibilität bezüglich der dreidimensionalen Struktur, mechanischen Stabilität und der Auswirkung der Oberflächenfunktionalisierung im spongiösen Knochen verglichen und besonders der Knochenabbau durch Makrophagen und Osteoklasten näher untersucht worden.

Methodik: Dazu ist unter operativen und sterilen Bedingungen in der medialen Femurkondyle älterer Schafe ein definierter Knochenzylinder entnommen und mit jeweils beschichteten oder unbeschichteten Implantaten aufgefüllt worden.

Innerhalb eines sechsmonatigen Zeitraums konnte anschließend das Knochengewebe mit dem offenporigen Implantat bei natürlicher Belastung durch die Schafe interagieren.

Zusätzlich sind zu verschiedenen Zeitpunkten Fluorochrome appliziert worden, mit Hilfe derer nach Euthanasie der Schafe, neben weiteren histologischen, histomorphometrischen, molekularbiologischen und rasterelektronenmikroskopischen sowie biomechanischen Untersuchungen die Osteointegration dargestellt und ein möglicherweise auftretender Knochenabbau in Gegenwart der beschichteten Implantate aufgezeigt werden konnte.

Ergebnis: Daraus haben sich in vivo Resultate zu Fragen der Grenzflächenreaktion, Biomechanik, Biokompatibilität und Osteokonduktivität in einem zum menschlichen Knochen vergleichbaren und ähnlich belastetem Knochengewebe bei der Verwendung von Titanimplantaten mit und ohne Reaktionsschicht ergeben.

Die vorläufigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass es keine signifikanten Unterschiede bei den jeweils untersuchten Kriterien zwischen bisher verwendeten Titanimplantaten oder denen mit einer bioaktiven Kalzium-Titanat-Reaktionsschicht gibt.



K. Lücke², U. Sommer¹, U. Thormann², K. Hagemann³, A. Bührig-Polaczek³, T. Guillén⁴, A. Ohrndorf⁴, H.-J. Christ⁴, U. Ploska⁵, A. Becker⁵, G. Berger⁵, M. Altindis⁶, U. Krupp⁶, S. Wenisch⁷, R. Schnettler²

Prüfung der Knochenregeneration, -interaktion und -stabilität bei Verwendung offenerporiger, metallischer Calcium-Titanat behandelte Zylinderimplantate unter dem besonderen Aspekt des Knochenabbaus in vivo



¹ Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Justus-Liebig-Universität Gießen 2 Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH 3 Gießerei-Institut, RWTH Aachen 4 Institut für Werkstofftechnik, Universität Siegen 5 Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, Berlin 6 Fakultät für Ingenieurwissenschaften und Informatik, Fachhochschule Osnabrück 7 Klinische Anatomie und experimentelle Chirurgie, Justus-Liebig-Universität Gießen

➤ **Fragestellung:** Kann Knochenheilung durch die Verwendung einer mit Calcium-Reaktionsschicht behandelten Titanstruktur gegenüber bereits vorhandenen unbehandelten Titan-Knochenersatzmaterialien verbessert werden?

➤ **Einleitung:**

Mit dem Ziel, die Knochenregeneration mit Hilfe offenerporiger Titanium-Zylinderimplantate zu verbessern, sind jeweils mit und ohne bioaktiver Calcium-Titanat-Reaktionsschicht behandelte Implantate auf ihre Biokompatibilität bezüglich der dreidimensionalen Struktur, mechanischen Stabilität und der Auswirkung der Oberflächen-funktionalisierung im spongiosen Knochen verglichen und besonders der Knochenabbau durch Makrophagen und Osteoklasten näher untersucht worden.

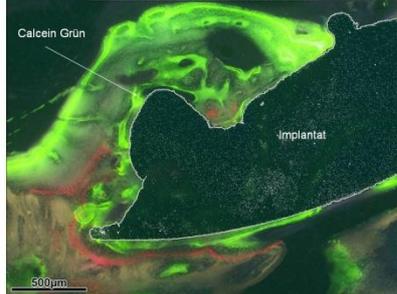
➤ **Histomorphometrie:**
neu gebildeter Knochen: Median [%]

- beschichtet: 3,741%
- unbeschichtet: 2,658%

• **U-Test-Result:**

→ kein signifikanter Unterschied

In vivo-Fluorochrom-Markierung:



➤ **PCR:** relative Expression von Kathepsin K
Marker für den hydrolytischen Abbau von EZM (Endoproteasen der Osteoklasten)

- Control group: 1,0
- Sample group: 1,126

➤ Auswertung: kein signifikanter Unterschied

➤ **Biomechanik:**

• beschichtete und unbeschichtete Implantate zeigten keinen signifikanten Unterschied in den „Push-Out“-Ergebnissen¹

Biomechanik: „Push-Out-Test“



➤ **Fazit:**

Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den offenerporigen metallischen Implantaten mit und ohne biologischer Reaktionsschicht.

➤ **Literatur:**

[1] M.Sc. Teodolito Guillén Girón: Properties and application spectrum of cast porous implants made of Ti-6Al-7Nb in coated and uncoated conditions

➤ **Methodik:**

Implantation: med. Femurkondyle

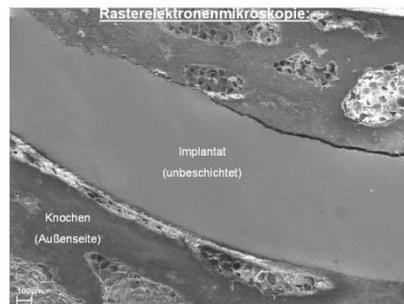
- 24 Schafe
- 1 Leerddefekt
- 12 beschichtete Impl.
- 11 unbeschichtete Impl.

Post implantationem:

- sechs monatige Standzeit
- Calcein-Grün-Applikation in vivo

1. Fluorochrome in vivo
- 2a. Knochenscheibe für RNA-Isolation
→ Genexpression von Kathepsin K
- 2b. Knochenscheibe für REM
- 2c. Knochenscheibe für Technoviteinbettung
→ Schlißherstellung
→ Fluoreszenz
→ TRAP
3. Histomorphometrie
4. Histologie (13x)
5. Biomechanik (11x)
→ „Push-Out“ mit Winkelkorrektur nach Röntgenkontrolle

Rasterelektronenmikroskopie:

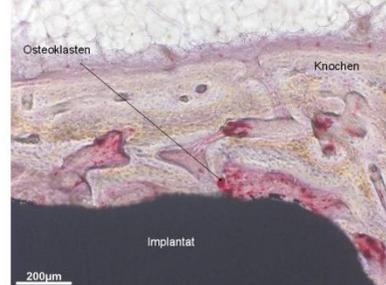


➤ **Tartrat-resistente-saure Phosphatase („TRAP“):**

Marker zum Nachweis einer erhöhten Knochenresorption: Enzymnachweis im Knochen-schliff

• prozentuale Osteoklastendichte: kein signifikanter Unterschied

TRAP-Färbung:



Mit einem herzlichem Dank an die **DFG** Deutsche Forschungsgemeinschaft

13 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung der guten wissenschaftlichen Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt.

Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert.

Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

14 Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich zunächst bei meinem Doktorvater, dem Prodekan für den Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, Herrn Prof. hc. Dr. Dr. Dr. hc. Reinhard Schnettler. Nicht nur für die Überlassung des hochaktuellen und interessanten Forschungsthemas, sondern auch für die Bereitstellung des Labors für experimentelle Unfallchirurgie und seiner überaus kompetenten Labormitarbeiter.

In diesem Sinne möchte ich der Leiterin des Labors, Frau Prof. Dr. rer. nat. Katrin Lips für ihre stets offene Tür und zahlreichen Hilfestellungen danken. Mein Dank gilt in besonderem Maße Frau Dr. med. vet. Ursula Sommer für ihre jahrelange Betreuung dieser Forschung und die unzähligen Stunden, die sie mir mit enormen fachlichen Kenntnissen und gutem Rat zur Seite stand. Ich bin fest davon überzeugt, dass allein durch ihre ständige Ansprechbarkeit und großes Fachwissen die Arbeit im Labor und das Schreiben dieser Dissertation so reibungslos erfolgen konnte.

Natürlich möchte ich mich darüber hinaus auch herzlichst beim gesamten Laborpersonal für seine fachkompetente Hilfe und gute Betreuung bedanken.

Für die Erprobung und Herstellung der offenporigen Titanat-Implantate möchte ich den jeweiligen Teams und Projektpartnern der BAM Berlin der Universität Siegen und der Hochschule Osnabrück sowie dem Gießerei-Institut der RWTH Aachen für die Ermöglichung dieser Studie durch ihre im Vorfeld geleistete Arbeit danken.

Da für die Implantation der Implantate ein entsprechend ausgebildeter Operateur gefordert war, möchte ich Dr. med. Ulrich Thormann von der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Gießen für die Durchführung der Operationen und seine in das Projekt investierte Zeit danken.

Danken möchte ich zudem den Mitarbeitern der zentralen Forschungseinrichtung (ZFE) in Frankfurt für ihre Pflege und Überwachung der Versuchstiere sowie ihre tatkräftige Unterstützung während den Operationen.

Des weiteren gilt mein besonderer Dank Dipl.-Ing. Teodolito Guillen Giron aus dem Institut für Werkstofftechnik in Siegen, da durch seine biomechanischen Untersuchungen und die freundliche Bereitstellung seiner Ergebnisse diese Arbeit komplettiert und meine eigenen gewonnen Resultate gestützt wurden.

Zuletzt möchte ich meiner Familie von ganzem Herzen danken, die mir auf dem langen Weg des Medizinstudiums und der Zeit während der Fertigstellung meiner Doktorarbeit tatkräftig zur Seite stand und immer Verständnis für meine Abwesenheit während unzähliger Lernphasen und im Labor verbrachter Nächte und Wochenenden hatte. Insbesondere danken möchte ich in diesem Sinne denjenigen Freunden, die mir während dieser Zeit nicht nur großes Verständnis und Kraft, sondern auch unbeschreibliche Unterstützung und Ermutigung gegeben haben. Ohne sie hätte ich sicherlich Vieles nicht erreicht.

15 Lebenslauf

Der in der gedruckten Fassung vorhandene Lebenslauf wurde an dieser Stelle aus datenschutzrechtlichen Gründen aus der elektronisch publizierten Version entfernt.

16 Anhang mit Tierversuchsgenehmigung

Der Verlängerungsantrag „Entwicklung und Charakterisierung offener metallischer Implantatstrukturen mit biologischer Reaktionsschicht“ wurde unter dem Aktenzeichen KR1999/12; BE1339/32; BU 1072/13; SCHN 976/1-1 eingereicht.

29/03/2011 09:16

Zentrale Forschungseinrichtung (FAX)+4969 6301 4106

P.001/003

Regierungspräsidium Darmstadt



Regierungspräsidium Darmstadt, 64278 Darmstadt

Fachbereich Medizin
der Goethe-Universität Frankfurt
Frau Dr. C. Tandi
Theodor-Stern-Kai 7
60590 Frankfurt am Main

Unser Zeichen: V 54 - 19 c 20/15 - F 31/31
Ihr Zeichen:
Ihre Nachricht vom:
Ihre Ansprechpartner: Frau Dr. Simon/Frau Schader
Zimmernummer: 2.123/2.104
Telefon: 06151-12 53 16/12-55 33
Fax: 06151-12-64 98
E-Mail: veterinaerdezernat@rpda.hessen.de
Datum: 23. März 2011

Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren;
Genehmigung gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206)

Ihr Antrag auf Genehmigung vom 10.01.2011, hier eingegangen am 24.01.2011
Ihr Schreiben vom 10.03.2011

Sehr geehrte Damen und Herren,

auf Ihren Antrag vom 10.01.2011, geändert bzw. ergänzt mit Schreiben vom 10.03.2011 erteile ich Ihnen gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes die

GENEHMIGUNG

zur Durchführung von wissenschaftlichen Versuchen an 24 Schafen

für folgendes Versuchsvorhaben:

„Metallische Implantatstrukturen mit biologischer Reaktionsschicht“

(Gen. Nr. F 31/31).

Regierungspräsidium Darmstadt
Wilhelmstraße 1-3, Wilhelmshaus
64283 Darmstadt
Internet:
www.rp-darmstadt.hessen.de

Servicezeiten:
Mo. - Do. 8:00 bis 16:30 Uhr
Freitag 8:00 bis 15:00 Uhr
Telefon: 06151 12 0 (Zentrale)
Telefax: 06151 12 6347 (allgemein)

Eristenbriefkasten:
Luisenplatz 2
64283 Darmstadt
Öffentliche Verkehrsmittel:
Haltestelle Luisenplatz

- 2 -

Verantwortlich für die antragsgemäße Durchführung des Versuchsvorhabens und die Einhaltung der rechtlichen Vorschriften ist der

Leiter des Versuchsvorhabens: Prof. Dr. Dr. Reinhard Schnettler

Stellvertreter des Leiters: PD Dr. Dr. Volker Alt

Im Rahmen des Versuchsvorhabens dürfen außer den Obengenannten folgende Personen entsprechend ihrer Qualifikation bzw. aufgrund von Ausnahmegenehmigungen gem. § 9 Abs. 1 Satz 4 TierSchG Eingriffe und Behandlungen vornehmen.

Dr. Ulrich Thormann
Dr. Ursula Sommer

Die Betäubung der Tiere ist durchzuführen bzw. zu beaufsichtigen von:
Dr. Alf Theisen, Dr. Christa Tandi.

Für die medizinische Versorgung der Tiere ist verantwortlich:
Dr. Alf Theisen.

Der Bescheid ergeht unter folgenden Nebenbestimmungen:

Diese Genehmigung ist befristet bis zum 22.03.2014.

Den Widerruf der Genehmigung behalte ich mir vor.

Änderungen bezüglich der versuchsdurchführenden Personen sind der Genehmigungsbehörde unverzüglich anzuzeigen.

Hinweise:

Gemäß § 8 Abs. 4 TierSchG ist der Genehmigungsbehörde jeder Wechsel des Leiters des Versuchsvorhabens oder seines Stellvertreters unverzüglich anzuzeigen. In diesem Fall gilt die Genehmigung weiter, wenn sie nicht innerhalb eines Monats nach Eingang der Anzeige bei der Genehmigungsbehörde widerrufen wird.

Jede Änderung des genehmigten Versuchsvorhabens bedarf der Erlaubnis durch die Genehmigungsbehörde oder ist bei Vorliegen der Voraussetzungen des § 8 Abs. 7 Satz 2 TierSchG anzuzeigen.

Für Betäubungen gelten die Vorschriften des § 9 Abs. 2 Ziffer 4 TierSchG (siehe auch Ziffer 9.2.2.1 und 9.2.2.2 der Allg. Verwaltungsvorschrift zur Durchführung des Tierschutzgesetzes).

Kostenentscheidung:

Die Erteilung dieser Genehmigung ist kostenfrei.

- Gemäß § 8 des Hessischen Verwaltungskostengesetzes besteht Gebührenfreiheit.
- Auslagen i.S.d. § 9 Hessisches Verwaltungskostengesetz sind nicht entstanden.

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen den Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Klage beim

Verwaltungsgericht Frankfurt am Main
Adalbertstraße 18
60486 Frankfurt am Main

erhoben werden.

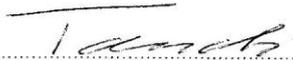
Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag



(Dr. Simon)

Frankfurt/Main 10.01.11

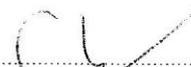
Ort und Datum



Unterschrift des Antragstellers

Greifen, 20.12.2010

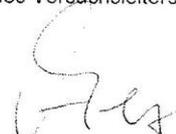
Ort und Datum



Unterschrift des Versuchsleiters

Greifen, 20.12.2010

Ort und Datum



Unterschrift des stellv. Versuchsleiters