

Aus der Orthopädischen Klinik  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Rüdiger Krauspe

Zellbiologische Untersuchung zur Biokompatibilität metallischer Werkstoffe aus der  
Hüftendoprothetik an einer humanen Knochenmarkzellkultur

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Falk Florian Urselmann

2010

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. Jäger

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Dr. Handschel



<b>Inhaltsverzeichnis</b>
---------------------------

	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	I- IV
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	V- VII
		<b>Seite</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Allgemeine Grundlagen	1
1.2	Biomaterialien	4
1.2.1	TiAl <sub>6</sub> V <sub>4</sub> (Titanium)	4
1.3	Biokompatibilität und Transplantatabstoßung	5
1.4	Knochen-/ Knochenmark und seine zellulären Bausteine	7
1.4.1	Knochenzellen	7
1.4.2	Knochenvorläuferzellen	7
1.4.3.1	Osteoblastäre Differenzierung aus mesenchymalen Stammzellen	7
1.4.4	Osteoblasten	8
1.4.5	Osteozyten	9
1.4.6	Osteoklasten	10
1.5	Zelluläre Interaktion zwischen Osteoblasten/ Osteoklasten	12
1.6	Extrazelluläre Knochenmatrix	13
1.6.1	Kollagene	13
1.6.1.1	Kollagen Typ I	14
1.6.2	Polyanionische Proteoglykane	14
1.6.3	Nichtkollagene Strukturproteine	16
1.6.3.1	Fibronectin	16
1.6.3.2	Osteopontin	17
1.6.3.3	Osteonectin	18
1.6.3.4	Osteocalcin	18

1.6.3.5	Alkalische Phosphatase (ALP)	19
1.6.3.6	RANKL	21
1.7	Historische Grundlagen zur Hüftendoprothetik	23
1.8	Ziele der Studie	26
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>27</b>
2.1	Beschreibung der Prüfkörper	27
2.1.1	Chirurgenstahl glatt	27
2.1.2	TiAl <sub>6</sub> V <sub>4</sub> glatt	28
2.1.3	TiAl <sub>6</sub> V <sub>4</sub> sandgestrahlt	28
2.1.4	CoCr Porocoat™	29
2.1.5	CoCr glatt	29
2.2	Zellkultur	30
2.2.1	Zellkultursystem	30
2.2.2	Zellgewinnung	30
2.2.3	Zellkultur	31
2.3	RT PCR (Polymerase Ketten Reaktion)	33
2.3.1	Primer	35
2.4	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	36
2.5	Immunhistochemie	38
2.6	Oberflächenanalyse und Benetzbarkeit der Prüfkörper	39

2.7	Alphabetische Aufzählung und Beschreibung der wichtigsten Materialien, Geräte und Chemikalien	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
3.1	Oberflächenanalyse und Morphologie mittels REM	44
3.1.1	Chirurgenstahl	44
3.1.2	TiAl <sub>6</sub> V <sub>4</sub> (Titanium) glatt	45
3.1.3	TiAl <sub>6</sub> V <sub>4</sub> (Titanium) sandgestrahlt	46
3.1.4	CoCr (Orthochrom <sup>TM</sup> ) glatt	47
3.1.5	CoCr (Orthochrom <sup>TM</sup> ) Porocoat <sup>TM</sup>	48
3.2	Zellmorphologie und Zellproliferation mittels REM	50
3.2.1	Chirurgenstahl	50
3.2.2	TiAl <sub>6</sub> V <sub>4</sub> (Titanium) glatt	51
3.2.3	TiAl <sub>6</sub> V <sub>4</sub> (Titanium) sandgestrahlt	52
3.2.4	CoCr (Orthochrom <sup>TM</sup> ) glatt	53
3.2.5	CoCr (Orthochrom <sup>TM</sup> ) Porocoat <sup>TM</sup>	54
3.3	Zellmorphologie und -verteilung und das Wachstumsverhalten der MSC in der Lichtmikroskopie	56
3.3.1	Wachstumskinetik während MSC Expansionsphase	58
3.4	Implantatporosität und Hydrophilie	59
3.5	Molekularbiologische Untersuchung der Genexpression (mRNA) mittels RT-PCR	61
3.5.1	Zelluläre Syntheseleistung (mRNA-Menge)	63
3.6	Immunhistochemische Untersuchung der periimplantären Antigenexpression	65
3.6.1	Chirurgenstahl	66
3.6.2	TiAl <sub>6</sub> V <sub>4</sub> (Titanium) glatt periimplantär	68

3.6.3	TiAl <sub>6</sub> V <sub>4</sub> (Tivanium) sandgestrahlt periimplantär	69
3.6.4	CoCr (Orthochrom™) glatt	71
3.6.5	CoCr (Orthochrom™) Porocoat™	73
3.6.6	Vergleich der RANKL Expression in Abhängigkeit vom Prüfmaterial	74
3.7.	Implantäre Antigenexpression	77
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>79</b>
4.1	Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit auf die Biokompatibilität	81
4.2	Einfluss des Oberflächenmaterials auf die Biokompatibilität	85
4.2.1	Titan	85
4.2.2	Titan Aluminium Vanadium (TiAl <sub>6</sub> V <sub>4</sub> / Tivanium)	86
4.2.3	Kobalt-Chrom-Molybdän-Legierungen	87
4.2.4	Chirurgischer Stahl	89
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>94</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>123</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALP	Alkalische Phosphatase
ATPase	Adenosin Triphosphatase
BMP	Bone morphogenetic protein
BSP	Bone sialoprotein
bzgl.	bezüglich
CA	contact angle, Kontaktwinkel
CAS	Computer assisted surgery
cpTi	commercial pure titan
Col 1	Kollagen 1
CSF	colony stimulating factor
DAG	Dexamethason, Ascorbinsäure, $\beta$ -Glycerolphosphat
DIF	Differenzierungsinduzierende Faktoren
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
EHS Tumor	Engelbreth-Holm-Swarm-Tumor
Fa.	Firma
FCS	Fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Association
g	Gramm
GAG	Glykosaminglykane
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDF's	Growth and differentiation factors
GLA	Gamma carboxyglutamic acid
GM-CSF	Granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor
HCL	Salzsäure
IL-1/ IL-6	Interleukin-1/ Interleukin-6
KD	Kilodalton
KM	Knochenmark
LSM	Lymphozytenseparationsmedium
M-CSF	Macrophage-colony-stimulating-factor

mg	Milligramm
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
MMF	Makrophagen-Monozyten-induzierender Faktor
mRNA	Boten Ribonukleinsäure
MSC	Mesenchymale Stammzelle
Nm	Nanometer
OBDRF	Osteoblast-derived-resorption-factor
OC	Osteocalcin
ON	Osteonektin
OP	Osteopontin
OPG	Osteoprotegerin
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
PGE2	Prostaglandin E2
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathyroid hormone related peptide
RANK	Receptor activator of NF-kappa B
RANKL	Receptor activator of NF-kappa B ligand
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RER	Raues endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
sog.	sogenannt
SPARC	Selected protein acidic and rich in cysteine
STRO-1	Stromal antigen
Tab.	Tabelle
TEA Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TGF-β	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor (Tumor-Nekrosefaktor)
TPA	Tissue plasminogen activator
TRAF 6	Tumor necrosis factor receptor associated factor 6

TRAP	Tartrat resistente saure Phospatase
u.a.	unter anderem
USA	United States of America
z.B.	zum Beispiel
ZK	Zellkern

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeine Grundlagen

Im Verlaufe der letzten Jahrzehnte zeigt sich ein kontinuierlicher Anstieg der Anzahl zementfrei implantierter Totalendoprothesen des Hüftgelenkes (MUNTING 1997). Zur Vermeidung von früh- und vorzeitigen aseptischen Implantat-Lockerung und Verbesserung der ossären Integration des Endoprothesenmaterials wurden bereits in der letzten Vergangenheit große Anstrengungen unternommen, um Materialeigenschaften, das Implantatdesign sowie die entsprechende Oberflächentopographie zu optimieren. Im Bereich der Hüftendoprothetik sind neben der Pfannenkomponente, insbesondere die Verbesserung der Oberflächengeometrie und Rauigkeit zementfreier Endoprothesenschäfte, die einen Direktkontakt mit dem knöchernen Implantatlager eingehen, aktuell Gegenstand intensiver Forschungsansätze und kontroverser Diskussionen. Es ist bekannt, dass Implantat-Oberflächen die Knochenformation *in vivo* und die Differenzierung zu Osteoblasten unterschiedlichen Phänotyps *in vitro* beeinflussen (ZINGER 2005, WILKE 2002). Besonders die gute Biokompatibilität und die Fähigkeit der Zelladhärenz von Titanoberflächen sowie von porösen Oberflächen anderer Metalle wie z.B. Tantal, welche für Endoprothesen verwendet werden, konnten in mehreren experimentellen wie auch klinischen Studien gezeigt werden (WILKE 2002, BACHLE 2004, LAUER 2001, GERMANIER 2006, SVEHLA 2000).

Trotz intensiver Bemühungen und einer großen Anzahl klinischer und experimenteller Publikationen konnte der Mechanismus der Zelldifferenzierung, -migration und -proliferation noch nicht im Detail beschrieben und abschließend verstanden werden. Auch der Einfluss der 3D- Oberflächenskonfiguration der verwendeten Endoprothesenmaterialien bleibt *in vivo* besonders beim Menschen weiterhin nur unvollständig erklärt (ABSOLOM 1987, WILKE/ JÄGER/ ENDRES 2002).

Zur Überprüfung der Biokompatibilität von Endoprothesenmaterial werden als Screeningverfahren neben tierexperimentellen Studien häufig *in-vitro*-Modelle verwendet. Eine herausragende Bedeutung kommt hierbei der Zytokompatibilitätsuntersuchung von Implantaten durch Zellkulturen zu (WILKE 1998, JÄGER 2004, JÄGER 2005). PITTENGER konnte 1999 zeigen, dass mesenchymale Stammzellen (MSC) in der Lage sind, sich sowohl im Sinne einer osteogenen,

chondrogenen wie adipogenen Zellreihe zu differenzieren. Diese pluripotenten mesenchymalen Stammzellen finden sich neben anderen adulten Geweben insbesondere im menschlichen Knochenmark. Genau in diesen Markraum wird orthopädisches Endoprothesenmaterial in der Regel implantiert. Auf Grund der daraus resultierenden engen Interaktionen zwischen dem Biowerkstoff und den mesenchymalen Stammzellen eignen sich insbesondere Mischzellkulturen aus humanen Knochenmarkzellen zur Beurteilung der *in-vitro*-Zytokompatibilität.

Eine wichtige Voraussetzung für zufriedenstellende klinische Ergebnisse, langfristige Stabilität und Zuverlässigkeit implantierter zementfreier Implantate ist eine solide osteoblastäre Integration ohne die Ausbildung von bindegewebigen Formationen zwischen Knochen und Endoprothesenoberfläche.

Abhängig von physiko-chemischen Eigenschaften wurde für viele Biomaterialien gezeigt, dass eine poröse Oberflächengeometrie das Einwachsen von Osteoblasten begünstigt (ESKELINEN, REMES 2005, BARRIAS 2005, MARCHISIO, REA 2004, ZINGER 2005). Ein Biomaterial mit dazugehöriger spezieller Oberflächenstruktur zu definieren, welches das optimale Einwachsen von Osteoblasten fördert und zugleich die Differenzierung zu und Proliferation von Fibroblasten unterdrückt, ist daher ein unverändertes erklärtes Ziel in der Endoprothetik. Im Gegensatz zu diesen permanenten Implantaten müssen solche Implantate abgegrenzt werden, die nur temporär am Stützapparat eingesetzt werden (z.B. Osteosynthesematerial). Bei diesen ist eine vollständige ossäre Integration sogar für eine spätere Metallentfernung hinderlich.

Verschiedene Hersteller haben daher, basierend auf eigenen Studien, verschiedenste Verfahren und Techniken zur Oberflächenmodifizierung ihrer Implantate entwickelt. Einige dieser Techniken basieren auf Oberflächenveränderungen mit dem Ziel einen vergrößerten Oberflächenkontakt herzustellen (z.B. Sandstrahlung). Eine zusätzliche verwendete Fibrinbeschichtung soll der Stabilisierung und Verstärkung der zellulären Adhärenz sowie einer osteoblastären Zelldifferenzierung und Produktion von extrazellulärer Matrix dienen, um ein Einwachsen des Implantates in die knöcherne Umgebung zu erleichtern (HUANG 2004).

Verschiedene Methoden zu Veränderungen der Implantatoberflächen führen zu einer großen dreidimensionalen Variationsbreite mit unterschiedlicher biologischer Wirkung.

Neben der physiko-chemischen Zusammensetzung eines Biomaterials beeinflussen insbesondere die Energie und Rauheit einer Oberfläche das *in-vitro*- und *in-vivo*-Verhalten. Parameter zur Bestimmung der Porosität sind Höhenunterschiede (*R*-Parameter) und der Variabilität der Zwischenräume (*Z*-Parameter) (WENNEBERG 1996/1998). Ein indirektes Maß zur Erfassung der Oberflächenenergie von Biomaterialien ist die sog. Benetzbarkeit ('wettability'), gemessen durch den Kontaktwinkel (contact angle, CA). Diese beeinflusst neben dem lokalen Mikromilieu, der Porosität und der Materiallegierung, die Adsorption von Proteinen und die Adhärenz von Knochenzellen (REDEY 2000).

Im Gegensatz zu Osteoblasten und ihren Progenitoren stammen Osteoklasten von der hämatopoetische Stammzellreihe ab und sind für die Knochenresorption verantwortlich. So ist die periimplantäre Knochenresorption, welche von Osteoklasten getriggert wird, eine Ursache aseptische Lockerung von Endoprothesenmaterial. Interaktionen zwischen Osteoblasten und den mehrkernigen Osteoklasten während der Knochenumbauprozesse (sog. Remodelling) sind sehr komplex und im Detail noch nicht abschließend verstanden. Neben anderen Faktoren ist der Osteoblasten-Marker RANKL ein potenter Osteoklasten-Aktivator *in vitro* und *in vivo* (BOYCE 2007, HOFBAUER 2004, TEITELBAUM 2003).

Ziel dieser Studie ist, die osteogene Potenz von fünf verschiedenen metallischen Biomaterialien, welche typischerweise in der Hüftgelenkendoprothetik Verwendung finden, zu beleuchten.

## **1.2 Biomaterialien**

Die Lebenserwartung unserer Bevölkerung hat in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich zugenommen (LUY 2006). Dies führt zwangsläufig auch zu einer wachsenden Anzahl an Patienten mit degenerativen Erkrankungen, besonders auch im Bewegungsapparat (z.B. Coxarthrosen und Gonarthrosen), wodurch häufig der Ersatz einzelner Gelenke oder Gelenkabschnitte durch sogenannte Biomaterialien notwendig wird. Langfristig steht hier besonders der endoprothetische Ersatz von Gelenken im Vordergrund. Darüber hinaus finden permanente Implantate auch in der Zahn-/ Kieferchirurgie Anwendung.

Ebenso werden nach akuten Traumen häufig exogene Werkstoffe zur temporären Stabilisierung oder Gewebeersatz verwendet.

Neben metallischen Werkstoffen findet heutzutage ein breites Spektrum an neueren Biomaterialien Verwendung. Hierzu gehören zunehmend auch Kunststoffe, Keramiken, Biogläser sowie andere resorbierbare Biomaterialien.

Ein Biomaterial von besonderer Bedeutung im Bereich der Endoprothetik ist das  $\text{TiAl}_6\text{V}_4$  (Titanium).

### **1.2.1 $\text{TiAl}_6\text{V}_4$ (Titanium)**

Titanlegierungen finden heute sowohl in Osteosynthesematerial, wie auch in zementfreien und zementierten Hüft- und Knieendoprothesen breite Anwendung. Auf Grund der guten Biokompatibilität kommt es bei zementfreier Anwendung zu einem meist bindegewebsfreien Mikroverbund zwischen dem neugebildeten Knochen und dem Endoprothesenmaterial mit daraus resultierender hoher Langzeitstabilität. Die häufig verwendete Titanlegierung Titanium zeichnet sich durch ein relativ geringes Gewicht (60% des rostfreien Stahls), seine mechanischen Eigenschaften (hohe Biegebelastbarkeit) und gute Korrosionsbeständigkeit aus (WILLIAMS 1981, KIENAPFEL 1991). Verschiedene Arbeiten konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Biokompatibilität an einer humanen KM-Zellkultur verschiedener Titanlegierungen zeigen. Titanium wurde als gut biokompatibel beschrieben (WILKE 1995). Es enthält das als Reinelement toxische Vanadium.

### 1.3 Biokompatibilität und Transplantatabstoßung

Die Biokompatibilität von Werkstoffen hängt von ihren physiko-chemischen Eigenschaften sowie von der Oberflächenbeschaffenheit ab und definiert das biologische Verhalten *in vitro* und *in vivo*. In der Bundesrepublik Deutschland fallen die Implantate unter die Bestimmung § 2 Absatz 2 des Arzneimittelgesetzes und obliegen daher bestimmten Anforderungen in Bezug auf Anmeldung, Kennzeichnung und Einwilligung des Patienten bei der klinischen Erprobung sowie einer dem Risiko angemessenen Versicherung. Ähnliche Regelungen gelten auch in anderen Ländern. In den USA wurden beispielsweise bereits 1938 die Zulassungsbestimmungen durch den FDA (Food and Drug Administration) eingeführt.

An alle Materialien, die im Menschen Verwendung finden oder auch in unmittelbarem Kontakt mit ihm stehen, müssen aus Gründen der biologischen Sicherheit strenge Kriterien gestellt werden.

Diese beinhalten zum einen mechanische Eigenschaften, die je nach Art der Anwendung unterschiedliche Anforderungen erfüllen müssen. So kann zum Beispiel bei Prothesen eine hohe Festigkeit und Stabilität gefordert werden, während jedoch gerade bei einem Katheter die Flexibilität des Materials von Bedeutung ist. Diese funktionellen Qualitäten allein werden dem Empfänger allerdings wenig von Nutzen sein, wenn nicht auch die Gewebeverträglichkeit des Materials berücksichtigt wird. Insbesondere bei Biomaterialien wie Endoprothesen, welche über einen langen Zeitraum im Körper verbleiben sollen, ist die sogenannte Biokompatibilität von großer Bedeutung, um den Langzeiterfolg der Operation zu sichern.

WILLIAMS definierte die Biokompatibilität als:

„Fähigkeit des Materials eine angemessene Gewebereaktion des Empfängers bei spezifischer Applikation zu erzeugen (WILLIAMS 1988)“. Dieser etwas abstrakte Begriff umfasst mehrere Anforderungen an das Material. Das Biomaterial darf:

- nicht toxisch sein
- weder kanzerogen, noch mutagen sein
- und nicht zu einer Sensibilisierung führen.

Zudem muss es im Falle von Gewebsimplantaten adhäsiv für Zellen sein (KAWAHARA 1985).

Erfüllt ein Material die o.g. Kriterien in idealer Weise, so wird es als „inert“ bezeichnet. Eine Sonderform stellen in jüngerer Zeit durchgeführte Modifikationen von Werkstoffen dar, die so genannten „bioaktiven“ Materialien. Diese Substanzen sind in der Lage, bei gleichzeitig ausgezeichneter Biokompatibilität eine gewünschte Gewebeneubildung und ggf. Umbildung zu induzieren. Typisches Beispiel für eine Neubildung von Knochen ist die sog. Osteoinduktion (OHGUSHI 1990 a und b), bei welcher es zu einer Knochenneubildung in nichtknöchernem Gewebe kommt.

## **1.4 Knochen-/ Knochenmark und seine zellulären Bausteine**

### **1.4.1 Knochenzellen**

Folgende Zellen sind maßgeblich mit der Bildung, dem Erhalt und dem Umbau von extrazellulärer Knochenmatrix/ Osteoid befasst:

Knochenvorläuferzellen, Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten.

Darüber hinaus beeinflussen auch weitere Zelltypen durch lokale Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren die Knochenbildung (z.B. Megakaryozyten/ Thrombozyten, Endothelzellen, Makrophagen).

### **1.4.2 Knochenvorläuferzellen**

Osteoblastäre Vorläuferzellen sind primitiv mesenchymaler Herkunft und während des gesamten Lebens in Knochen und Knochenmark nachweisbar. Sie bilden eine Stammzellpopulation, welche sich zu stärker spezialisierten knochenbildenden Zellen (Osteoblasten und Osteozyten) differenzieren kann. JUNGQUEIRA beschrieb 1991 Knochenvorläuferzellen als undifferenziert, proliferationsfreudig mit spindelförmigem, Fibroblasten ähnelndem Aussehen. Sie besitzen nur einen spärlichen Golgi-Apparat und weisen wenig Raues Endoplasmatisches Reticulum (RER) auf.

### **1.4.3 Osteoblastäre Differenzierung aus mesenchymalen Stammzellen**

Die osteoblastäre Differenzierung aus mesenchymalen Stammzellen (MSCs) ist ein komplexer Vorgang, der verschiedene Faktoren einschließt und noch nicht vollständig verstanden ist. Von entscheidender Bedeutung ist hierbei die Superfamilie der transforming growth factors (TGF- $\beta$ ) inklusive bone morphogenic protein (BMPs) und growth and differentiation factors (GDFs) (MARTINOVIC 2004). Das Runx2 Gen spielt bei der osteoblastären Differenzierung eine Art multifunktionelles „Master-Gen“ (LIAN 2004). Auf eine detaillierte Darstellung wird an dieser Stelle verzichtet, da dies den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde und nicht maßgebend dem Studienziel entspricht.

Eine osteoblastäre *in-vitro*-Differenzierung kann nach PITTENGER durch den Zusatz von Dexamethason, Ascorbinsäure und  $\beta$ -Glycerolphosphat (DAG) induziert werden. Ein charakteristisches morphologisches Zeichen für eine osteoblastäre *in-vitro*-Differenzierung sind kuboidale Zellen in clusterartiger Formation, welche nachfolgend kalzifizieren.

#### 1.4.4 Osteoblasten

Der Name Osteoblast geht auf GEGENBAUER zurück. Er beschrieb bereits 1864 granuläre Korpuskel und bezeichnete sie als aktive Agentien des Knochenwachstums.

Osteoblasten leiten sich von den Knochenvorläuferzellen ab und synthetisieren den organischen Bestandteil der Knochenmatrix (Osteoid), welche aus Typ-1-Kollagen sowie aus Glycosaminglykanen und Proteoglykanen besteht. Zudem produzieren sie verschiedene Peptidfaktoren, Osteonektin, Osteocalcin und knochenspezifische alkalische Phosphatase (Ostase). Der Präosteoblast besitzt eine flache Morphologie und exprimiert TGF- $\beta$  (NODA 1989). In der aktiven Synthesephase hingegen zeigen Osteoblasten ein kubisch oder polygonales Aussehen mit deutlich basophilem Zytoplasma. Diese spiegelt den hohen Anteil an RER wider, ein Hinweis auf ihre Rolle als aktiv proteinsynthetisierende und –sezernierende Zellen (STEVENS/LOWE 1992).

50-70% aller Osteoblasten unterliegen während ihrer Differenzierung der Apoptose. Die übrigen Osteoblasten differenzieren sich zu Osteozyten aus und werden in die extrazelluläre Knochenmatrix eingebettet.

Der Präosteoblast bildet sich aus Osteoprogenitoren, welche wiederum von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) abstammen. Er entwickelt sich über den transitorischen Osteoblasten Typ I und II zum sekretorischen und weiterhin osteozytischen Osteoblasten. *In vitro* entsteht durch DAG-Stimulation schließlich der Osteozyt (STEIN 1996).

Eine der morphologisch und funktionell wichtigsten Charakteristika ist die Polarität dieser Zellen. Syntheseprodukte werden dort abgegeben, wo eine direkte Verbindung zur Knochengrundsubstanz besteht, an der Knochenoberflächenseite.

Während der Zellkern an dem der Syntheseseite gegenüberliegendem Pol zu liegen kommt. Die Aktivierung der Osteoblasten erfolgt im Wesentlichen über eine Interaktion mit Osteoklasten (sog. cross-talk). Des Weiteren werden ebenso Kollagenase und sog. „tissue plasminogen activator“ (TPA) beschrieben. Diese Enzyme bauen die organische Matrix des Knochens ab und schaffen damit die Voraussetzung der Knochenresorption durch Osteoklasten. VAES beschreibt 1988 die Aktivierung der Osteoblasten-Kollagenasen durch eine Kaskade von proteolytischen Plasminfaktoren und TPA.

In der Regel ist ab der 4. Lebensdekade ein deutlicher Rückgang der Syntheseleistung der Osteoblasten zu verzeichnen. Dies führt zu einem Überwiegen der Knochenabbaurate gegenüber dem Knochenaufbau. Begründet wird dies durch eine Veränderung des endokrinen Milieus und einer zunehmenden Verkürzung der Umbauzyklen (RAUE 1996).

#### **1.4.5 Osteozyten**

Wenn Osteoblasten ihre Osteoidbildung vollendet haben, verfallen die meisten von ihnen in einen inaktiven Zustand, erscheinen morphologisch abgeflacht und spindelförmig und legen sich der nun inaktiven Knochenoberfläche an. Einige Osteoblasten werden jedoch von mineralisierter Knochenmatrix umgeben, liegen in kleinen Höhlen und werden als Osteozyten bezeichnet. Benachbarte Osteozyten kommunizieren über lange Zytoplasmafortsätze und Gap-junctions, welche auch dem Transport von niedermolekularen Stoffen sowie Ionen u.a. dienen. Die Osteozytenfunktion ist noch nicht abschließend geklärt, da dieser Zelltyp nur schwer zu isolieren und *in vitro* zu untersuchen ist. Es wird jedoch diskutiert, dass Osteozyten bei der Verarbeitung mechanischer Reize auf den Knochen beteiligt sind, wobei dies noch nicht durch *in-vivo*-Experimente belegt werden konnte (KNOTHE 2004). Jeder Osteozyt hält eine schmale Osteoidsaum aufrecht und weist einen gut einwickelten Golgi-Apparat sowie einen Teil des RER seiner Osteoblastenvorgänger auf.

JUNGQUEIRA unterscheidet bezüglich ihrer Funktion zwei Gruppen:

- 1) osteoblastische Osteozyten:
  - dienen der Erhaltung der Grundsubstanz
  - enthalten protein- und glykoprotein-gebundenes Kalziumphosphat
  
- 2) osteolytische Osteozyten:
  - enthalten viele Lysosomen
  - liegen besonders in den tiefen Lagen der Grundsubstanz
  - können  $\text{Ca}^{2+}$  aus abgebauter Hartschubstanz freisetzen

#### **1.4.6 Osteoklasten**

Osteoklasten sind große, multinukleäre Zellen und leiten sich nach heutigem Kenntnisstand von Blutmonozyten/ Makrophagen ab, die sich unter Einfluss von Lymphokinen (insbesondere IL-1 sowie IL-6) bis zur Endzelle differenzieren.

Die Differenzierung der Osteoklasten wurde in den letzten Jahren sehr ausführlich an Mausmodellen untersucht. Es zeigte sich, dass eine Kaskade von Signalmolekülen in verschiedenen Stadien der Osteoklastogenese wirkt (CHAMBERS 2000). In der frühen Phase der Differenzierung spielt neben dem Proto-Onkogen c-fos und dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B vor allem macrophage-colony stimulating factors (M-CSFs) eine wichtige Rolle, wohingegen die terminale Differenzierung der Regulation vom TNF-ähnlichen Zytokin RANKL (RANK-Ligand) und dessen Antagonisten Osteoprotegerin OPG (BOYCE 2007) unterliegt. RANKL wird von Osteoblasten und Lymphozyten synthetisiert und bindet an seinen Osteoklasten-Rezeptor RANK (BOYLE 2003, BOYCE 2007; HSU 1999). Dadurch wird intrazellulär eine TRAF6 (TNF receptor associated factor) -abhängige Signalkaskade aktiviert (DARNAY 1998). OPG hemmt kompetitiv die Bindung von RANKL an RANK. Das Gleichgewicht von RANKL und OPG ist somit entscheidend für die Regulation der Knochenresorption, was durch Befunde der Mausgenetik eindrucksvoll unterstützt wird. So weisen RANKL-defiziente Mäuse eine Osteopetrose auf (KONG 1999), während OPG-defiziente Mäuse osteoporotisch sind (BUCAY 1998).

Auch kolonie-stimulierende Faktoren (CSF), der differenzierungs-induzierende Faktor (DIF), der Makrophagen-Monozyten-induzierende-Faktor (MMF) und andere Lymphokine spielen eine wichtige Rolle im Differenzierungsweg der Präosteoklasten (ATHANASOU 1996).

Man findet Osteoklasten an Stellen aktiver Knochenresorption an der Knochenoberfläche, oft in Resorptionsbuchten, den sogenannten Howship-Lakunen, an die mineralische Grundsubstanz angeheftet. Ultrastrukturell finden sich viele Golgi-Felder, Lysosomen, Sekretvesikel und reichlich Mitochondrien. Zudem besitzen Osteoklasten eine sogenannte „ruffled border“, die sich am resorptiven Pol befindet. Ab einer Lakunentiefe von 70µm stellen sie ihre Resorptionstätigkeit ein und verschwinden wahrscheinlich durch Auflösungsprozesse. Zuvor jedoch sezernieren Osteoklasten TGF-β, um benachbarte Osteoklasten zu aktivieren (STEVENS 1992). Die Membran der „ruffled border“ enthält eine vakuoläre H<sup>+</sup>-ATPase und zeigt Gemeinsamkeiten mit der Membran später Endosomenkompartimente (TEITELBAUM 2000). Es wird ein saures Milieu, das die Aktivität der lysosomalen Enzyme begünstigt, geschaffen. Hier bewirken die Osteoklasten durch eine Erhöhung der Protonenkonzentration über verschiedene Moleküle wie den Chloridkanal CLC7 oder die Protonenpumpe ATP6i, sowie die Freisetzung spezifischer Proteasen, wie Cathepsin K und Phosphatasen, den Abbau mineralisierter Knochensubstanz (KORNAK 2001). Die Knochenresorptionsfläche mit der „ruffled border“ ist durch ringförmig angeordnete, spezielle Zytoplasmadomänen, die mit zahlreichen Aktinfilamenten ausgestattet, doch im wesentlichen frei von Zellorganellen sind, begrenzt. Dieser Zytoplasmaring bildet eine Versiegelungszone, die den Raum der Knochenresorption mit dem sauren Milieu von der Umgebung abgrenzt. (TEITELBAUM 2000).

## 1.5 Zelluläre Interaktion zwischen Osteoblasten/ Osteoklasten

Systemisch ist für den Knochenabbau das unter anderem Parathormon (PTH) entscheidend. Die PTH-Wirkung wird nicht direkt am Osteoklasten, sondern an den Osteoblasten und Osteoklastenvorläuferzellen (Monozyten/ Makrophagen) vermittelt. Durch PTH wird die Produktion von Kollagenase in Osteoblasten induziert, welche die oberflächliche Knochenschicht andauen und damit die Voraussetzung für die Entfaltung der resorptiven Aktivität des Osteoklastenbürstensaumes schaffen. Zudem erfolgt die Aktivierung des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI) sowie eines osteoblastenabgeleiteten Resorptionsfaktors (sog. „osteoblast-derived-resorption-factor“, OBDRF) (ZIEGLER 1995). Neben PTH spielen vor allem physikalische Reize, wie Druck- und Zugkräfte, die Mechanorezeptoren in Osteozyten stimulieren, eine wichtige Rolle.

Nach KUMMER 1985 kommt es hierbei zu Umbauprozessen im Sinne von ossären An- und Abbauvorgängen. Diese Hypothese wird ebenfalls von SCHNEIDER 1992 getragen, welcher von Knochenschwund in der Schwerelosigkeit berichtete.

Eine besondere Rolle bei der Proliferationsanregung von Osteoklasten-Vorläuferzellen kommt dem Makrophagen-Kolonie-Stimulierenden-Faktor (MCSF) zu. MCSF wird unter anderem von Osteoblasten produziert und wirkt über den MCSF-Rezeptor, das c-fms-Gen und zuletzt durch eine Tyrosinkinase. MCSF wirkt zudem lebensverlängernd auf bereits differenzierte Osteoklasten (FAN 2001). Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor (GMCSF) und Interleukin-3 (IL-3) fördern die Proliferation von Osteoklasten weniger stark als MCSF. Synergistisch zum IL-3 wirkt auch das IL-6 und stimuliert die Bildung von sogenannten „colony forming units“ durch bestimmte Makrophagen und Granulozyten, welche wahrscheinlich, wie bereits oben beschrieben, die hämatopoetischen Stammzellen der Osteoklasten darstellen (ATHANASOU 1996).

Die Freisetzung der genannten Lymphokine wiederum unterliegt einer hormonellen Steuerung, wie zum Beispiel durch PTH.



(10%). Es sind auffällig wenig schwefelhaltige Aminosäuren und Tyrosin enthalten (JUNQUEIRA 1991).

### **1.6.1.1 Kollagentyp I**

Kollagentyp I ist der häufigste Kollagentyp und wird vor allem im lockeren und dichten Bindegewebe, der Haut, Sehnen, in Knochen und Faszien nachgewiesen. Die Fibrillen besitzen einen Durchmesser von 20-100nm. Kollagen I wird zunächst intrazellulär synthetisiert und in Folge am Golgi-Apparat modifiziert. Die exakte spätere Konformation des Kollagens wird durch die Hydroxilierung von Prolin durch die Prolinhydroxylase bestimmt. Nach der Sekretion der beiden Pro- $\alpha$ -Ketten und Abspaltung der endständigen Polypeptidgruppen, wird die Tropokollagen-Triplehelix extrazellulär durch Wasserstoffbrückenbindungen quervernetzt. Zusätzlich sind die einzelnen Fasern noch mit Vernetzungspeptiden, vor allem Pyridinolin-Derivate verbunden. Kollagen I macht 90% der organischen Matrix des Knochens aus. Dessen carboxyterminales Prokollagen I Propeptid dient neben der alkalischen Phosphatase (ALP) und Osteocalcin als Parameter des Knochenabbaus (RAUE 1996).

### **1.6.2 Polyanionische Proteoglykane**

Sie stellen neben den fibrillären Proteinen die zweite wichtige Hauptgruppe der Extrazellulärschubstanz dar.

Glykosaminoglycane (GAG) sind große, unverzweigte Polypeptidketten aus Disaccharid-Einheiten (70-200 Reste), welche die folgenden Eigenschaften aufweisen:

- GAG sind stark negativ geladen, da in allen GAG die repetetive Einheit, ein Aminozucker (N-Acetylglukosamin oder N-Acetylgalactosamin), sulfatiert ( $\text{SO}_3$ ) vorkommt. Die zweite Zuckereinheit wird in der Regel aus Uronsäure und einer Carboxylgruppe gebildet.
- GAG haben ein stark hydrophiles Verhalten und können sich nicht zu kompakten Strukturen zusammenfallen. Somit besitzen sie eine große ständig offene Spiralanordnung.

-GAG bewirken eine Retention von Kationen (z.B. Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>) und Wasser. Der hieraus resultierende Turgor dient der Aufrechterhaltung der Gewebsarchitektur und wirkt der Verformung durch Druckkräfte entgegen (STEVENS 1992).

GAG spielen im Gewebe eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Kalzifizierung, der Wundheilung, dem Wassergehalt sowie der Kontrolle des Ionen- und Metabolitenhaushaltes. Als einziges GAG ist Hyaluronsäure nicht an ein Proteinzentralfilament gebunden.

GAG sind Bestandteile vieler biologischer Makromoleküle, etwa der kovalent an Proteine gebundenen Proteoglykane. Proteoglykane, welche aus 40-60 kovalent gebundenen GAG aufgebaut sind, sind in der Lage, die großen Hydratationsräume in der extrazellulären Matrix aufrechtzuerhalten.

Proteoglykane sind negativ geladen und stark hydratisiert; sie werden auch häufig als saure Mucopolysaccharide bezeichnet.

Auf Grund Ihrer Zusammensetzung werden die Glykosaminglykane (GAG) in 4 Gruppen eingeteilt: Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat und Dermatansulfat, Heparansulfat und Heparin sowie Keratansulfat (STEVENS 1992)

Glykosaminoglykan	Sulfatierung	Proteinverknüpfung	Vorkommen (Beispiele)
Hyaluronsäure	Nein	Nein	<i>Knorpel</i> , Haut Bindegewebe, Synovial- flüssigkeit
Chondroitinsulfat	Ja	Ja	<i>Knorpel</i> , <i>Knochen</i> , Kornea, Arterien
Dermatansulfat	Ja	Ja	Haut, Blutgefäße, Herz
Heparansulfat	Ja	Ja	Basalmembran, Lunge, Arterien
Heparin	Ja	Ja	Lunge, Leber, Haut, Mastzellgranula
Keratansulfat	Ja	Ja	<i>Knorpel</i> , Kornea, Bandscheiben

Tab.1: Glycosaminoglykane

### 1.6.3 Nichtkollagene Strukturproteine

#### 1.6.3.1 Fibronektin

Fibronektin ist ein hochmolekulares Protein, welches von Fibroblasten, Myoblasten und Chondrozyten gebildet wird. Das multifunktionale Glykoprotein kommt in drei Hauptformen vor:

- als zirkulierendes Plasmaprotein
- als Protein, welches sich zeitweise an die Oberfläche vieler Zellen anhaftet
- als unlösliche Fibrillen und Teile der extrazellulären Matrix, die durch Quervernetzung von Fibronektindimeren durch Disulfidbrücken entstehen (VAHERI 1980).

Fibronektin besitzt eine hohe Affinität zu Zelloberflächen und Matrixproteinen und vernetzt diese über Fibronektinrezeptoren miteinander. Fibronektinrezeptoren gehören zu einer Klasse von Zelloberflächenrezeptoren, welche als Integrine bezeichnet werden.

Integrine stellen eine große Familie von Zelloberflächenrezeptoren dar, die für vielfältige Zell-Matrix- und Zell-Zell-Wechselwirkungen verantwortlich sind (ALBELDA 1990). Sie sind  $\alpha,\beta$ -heterodimere Transmembran-Glykoproteine. Extrazellulär weisen die Integrine eine globuläre Domäne auf, mit der auch zweiwertige Kationen gebunden werden können, was für die Bindung der Liganden wichtig ist. Die Bindungsstellen liegen dabei auf beiden Untereinheiten (HYNES 2002, SPRINGER 2004). Intrazellulär binden die Integrine an Cytoskelettbestandteile (v.a. Aktin) und verbinden somit das Zellinnere mit der Umgebung. Die Verteilung der Integrine ist gewebe- und entwicklungsspezifisch (ADAMS 1993). Während des Zellwachstums bindet Fibronektin über Integrine an Zelloberflächen und spielt auf Grund seiner Kollagenanhaftungsstellen eine bedeutende Rolle bei der Anhaftung und Ausrichtung neusynthetisierter Kollagenfibrillen. Durch ihre Verbindung mit intrazellulärem Aktin beeinflusst die Ausrichtung des inneren Zytoskeletts auch die Orientierung der extrazellulären Matrix (STEVENS 1992).

### 1.6.3.2 Osteopontin (OP)

Dieses knochentypische Protein wird von Osteoblasten (insbesondere Präosteoblasten) synthetisiert. Osteopontin ist ein saures, multifunktionelles phosphoryliertes Glykoprotein. Es ist an der Reorganisation von Geweben, Gewebeintegration nach inflammatorischen Prozessen und immunologischen Reaktionen beteiligt. Neben stressinduzierten Knochenumbauprozessen führt die Bildung von Osteopontin auch zu dystropher Kalzifizierung von Gefäßwänden im Rahmen der Arteriosklerose und Mineralisierung in metastatischen Geweben (DENHARDT 2001). Mechanischer Stress beeinflusst die OP-Expression in Osteoblasten. So konnte gezeigt werden, dass die Applikation von intermittierendem hydrostatischem Druck *in vitro* zu einer Steigerung der OP-Syntheserate führt (KLEIN-NULEND 1997, MORINOBU 2003).

Durch seine Bindung an Hydroxylapatit und zellulären Strukturen hat es eine wichtige Funktion in der Osteoblastenbindung an die mineralischen Phase des Knochens (HEINEGARD 1993).

FLOREZ und Mitarbeiter konnten bereits 1992 mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen an isolierten Rattenosteoklasten eine verstärkte OP-Konzentration in topographischer Nähe zu Osteoklasten nachweisen. Die Anhaftung des OP an der Knochenoberfläche erfolgt über Integrine (avb3 Integrin).

REINHOLT beschreibt 1990 OP als wichtigen Mediator für die Bindung von Osteoklasten an den zu resorbierenden Knochen. OP spielt daher in der Knochenresorption eine wichtige Rolle. Der Vitronectin-Rezeptor dient den Osteoklasten als osteopontinspezifischer Rezeptor (CHABAS 2005).

### **1.6.3.3 Osteonectin (ON)**

Das extrazelluläre, calciumbindende Protein Osteonectin (ON, BM-40, Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteines (SPARC) wurde erstmals von TERMINE und Mitarbeitern 1981 als eines der wichtigsten, nicht-kollagenen Proteine in bovinem und humanem Knochen beschrieben und mit Osteonectin (ON) bezeichnet. Im weiteren Verlauf stellte sich heraus, dass dieses Protein mit SPARC, einem Protein, das von Endothelzellen und Fibroblasten sekretiert wird (SAGE 1984), und BM-40, einem aus dem Basalmembran-produzierenden Engelbreth-Holm-Swarm-Tumor (EHS-Tumor) isolierten Protein (DZIADEK 1986), identisch ist (MANN 1987).

Osteonectin wird von vielen verschiedenen Zelltypen wie Endothelzellen, Fibroblasten, Osteoblasten, Chondrozyten und glatten Muskelzellen sezerniert (REED 1996). Das Protein wird zusätzlich in vielen Geweben, insbesondere während der Embryonalentwicklung, Morphogenese und Wundheilung exprimiert (REED 1996).

Im Knochen bindet ON selektiv an Hydroxylapatit und an Kollagen-Fibrillen (Kollagen I, III, IV, V, VIII) und steuert hiermit die Mineralisation von Knochengewebe (TERMINE 1981)

Es wird vermutet, dass ON Zell-Zell und Zell-Matrix-Interaktionen moduliert (LANE 1994). Die Expression von ON während der Entwicklung ist zeitlich und örtlich reguliert. Während der frühen Embryonalentwicklung von Mäusen wird das Protein in der Herzanlage sowie in extraembryonalen Membranen detektiert. In adulten Mäusen findet man hingegen keine Expression in Herz, Lunge und Thymus. Die stärkste Expression wird dann in Knochen beobachtet (LANE 1994; BREKKEN 2000).

### **1.6.3.4 Osteocalcin (OC)**

Osteocalcin, auch bone-GLA-Protein genannt, ist ein Hydroxylapatit-bindendes Protein mit einem Molekulargewicht von 5,8 kD, welches aus einem Precursor-Molekül (9kD) durch proteolytische Abspaltung entsteht. Es enthält bis zu drei Gamma-Carboxy-Glutaminsäure-Reste (bone-GLA-Protein), die im Verlauf der Knochenmatrixsynthese durch die Osteoblasten in die Knochenmatrix eingebaut werden (RESCH 2004).

Osteocalcin ist das häufigste nicht kollagene Strukturprotein der mineralisierten Knochenmatrix. Das Vitamin-K-abhängige Protein wird in reifen Osteoblasten synthetisiert, ist knochentypisch und an der Mineralisation des Knochens beteiligt. Der OC-Spiegel im Blut steht in enger Beziehung zur Knochendichte und charakterisiert den reifen Osteoblasten (SHERMAN 1992). Eine routinemäßige Bestimmung ist auf Grund seiner geringen Stabilität nicht unproblematisch. Das intakte OC verliert bereits nach 6 bis 24 Stunden bei Lagerung in Raumtemperatur zwischen 50-70% seiner Immunreaktivität (BLUMSOHN 1995, GARNERO 1994). OC existiert sowohl als integrales Membranprotein, als auch in löslicher Form im Blut.

Osteocalcin besitzt auf Grund seiner GLA-Reste eine hohe Affinität zu Hydroxylapatit. BOSKEY konnte 1998 an Knockout-Mäusen zeigen, dass ein Verlust des OC-Gens zu einer erhöhten Knochendichte führt und OC an der Ausreifung von Apatit-Kristallen funktionell beteiligt ist. Hingegen werden ebenso chemotaktische Effekte auf Osteoklasten sowie ein hemmender Effekt auf die Knochenmineralisation beschrieben (MALONE 1982, LIAN 1998).

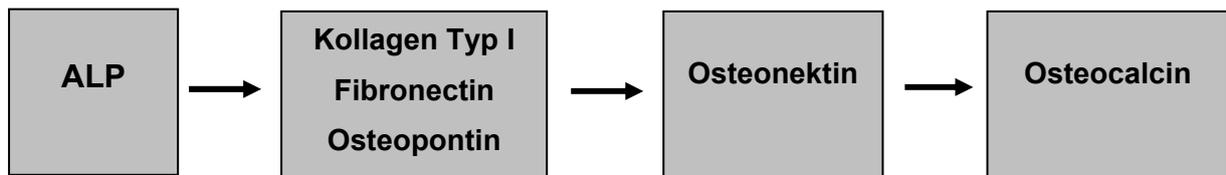
#### **1.6.3.5 Alkalische Phosphatase (ALP)**

Die alkalische Serumphosphatase ist kein einheitliches Enzym, sondern besteht aus verschiedensten Isoenzymen. Obwohl diese sogenannten Isoenzyme einem gemeinsamen Ursprungs-Gen abstammen, zeigen sie große Unterschiede bezüglich ihrer Hitze- und Harnstoffstabilität, sowie ihrer elektrophoretischen Eigenschaften.

Die ALP gehören zur Gruppe der Ortho-Phosphorsäure-Monoester-Phospho-Hydrolasen. Phosphorsäure- Monoester werden unter der Freisetzung von Phosphat und dem jeweiligen Alkohol hydrolytisch gespalten.

Die knochenspezifische alkalische Phosphatase (Ostase), ein tetramerisches Glykoprotein, ist in der Plasmamembran der Osteoblasten lokalisiert. Sie wird als Dimer durch Phospholipase aus einem membranassoziierten Phosphatidyl-Inositol-Glykan, das am carboxyterminalen Ende des Proteins anhaftet, in die Zirkulation freigesetzt (RESCH 2004). Untersuchungen mit Knochenmark-Zellkulturen haben gezeigt, dass Osteoblastenvorläuferzellen Kollagen I, Osteopontin, Fibronectin und andere Matrixproteine zeitlich vor Osteonektin und Alkalischer Phosphatase (ALP) bilden.

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wird die ALP als Marker für eine Osteoblastenaktivität reifer Zellen herangezogen. Als Zeichen einer guten Biokompatibilität/ Osteokonduktivität wird daher ein frühes Auftreten und ein hoher Spiegel im Überstand des Kulturmediums interpretiert.



*Abb. 1: zeitliche Abfolge der Proteinexpression in Osteoblasten*

JOHNSON beschreibt eine steigende Wirkung der ALP auf die Knochenmineralisation. So fand er heraus, dass ALP Pyrophosphat (PPi) hydrolysiert und somit dessen inhibierenden Wirkung auf die ATP-abhängige Calciumpräzipitation antagonisiert.

### 1.6.3.6 RANKL

RANKL (Receptor activator of NF- $\kappa$ B-Ligand) ist ein osteoklastenaktivierender Faktor, welcher PTHrP (parathyroid hormone related peptide) zur Differenzierung von Osteoklasten aus hämatopoetischen Vorstufen anregt (THOMAS 1999).

RANKL gehört zur Superfamilie der Tumornekrose-Faktoren (TNF's) und ist membrangebunden. RANKL bindet spezifisch an zwei Molekülen, dem eigentlichen RANKL-Rezeptor RANK und Osteoprotegerin (OPG), welche beide von Osteoblasten sezerniert werden. OPG wiederum kann durch eine Inaktivierung von RANKL die Osteoklastenaktivierung inhibieren. Somit bestimmt u.a. das Verhältnis zwischen OPG und RANKL das Ausmaß der osteoklastären Aktivität (HOFBAUER 2001).

HOFFMANN beschrieb 2003 bei osteolytischen Knochenmetastasen eine Erhöhung des RANKL/ OPG-Verhältnisse und folglich eine Differenzierung von Osteoklasten aus ihren Vorläuferzellen, wohingegen sich besonders osteosklerotische Metastasen durch ein erniedrigtes RANKL/ OPG-Verhältnis auszeichnen.

BOYCE und Mitarbeiter befassten sich 2007 ebenfalls intensiv mit der Rolle des RANK/ RANKL/ OPG-Systems im Rahmen des Knochenmineralisation und Knochen-Remodelling und kam zu vergleichbaren Ergebnissen.

GRANCHI und SABOKBAR zeigten 2006 resp. 2005 eine RANKL-Expression von periprothetischen Fibroblasten sowie während der osteoblastären Differenzierung aus mesenchymale Stammzellen. HOLDING (2006) und CLOHISY (2003) fanden einen engen Zusammenhang zwischen der RANKL-Expression im periprothetischem Gewebe und dem Ausmaß der Osteolyse und Polyethylenabriebpartikeln bei Patienten mit aseptischer Hüft-TEP-Lockerung. Die Arbeitsgruppe von HAYNES konnte 2001 bereits zeigen, dass es über eine partikelinduzierte Makrophagenaktivierung zu einer gesteigerten RANKL-Expression kommt und in Folge vermehrt periimplantäre Osteolysen entstehen können.

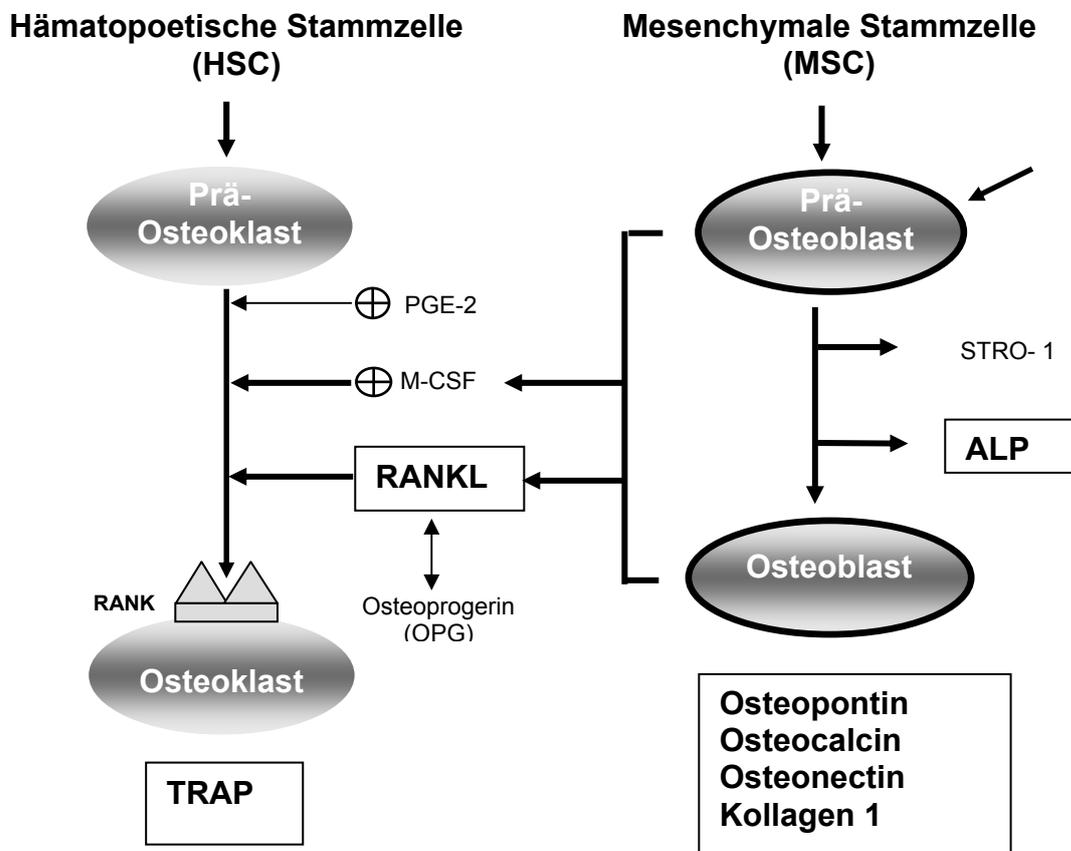


Abb. 2 Schematische Darstellung der komplexen Osteoblasten-Osteoklasten Interaktion während der osteoblastären Differenzierung. Zu den osteoklastenstimulierenden Faktoren gehören PGE-2, M-CSF, RANKL. Demgegenüber wird die Osteoklastendifferenzierung und –aktivierung von Osteoprotegerin (OPG) und RANK, beides von Osteoblasten exprimierte Proteine, gehemmt. (aus Jäger M. Präklinische Untersuchungen von Möglichkeiten und Grenzen einer Stammzelltherapie zur Behandlung ossärer Defekte. Shaker Verlag, Aachen 2008, ISBN 0978-3-8322-6931-9)

## 1.7 Historische Grundlagen der Hüftendoprothetik

Bereits 1890 wurde durch den Berliner Chirurgen Themistocles Gluck der erste Versuch unternommen, eine Kniegelenksendoprothese zu implantieren. Zur Sicherung der festen intramedullären Implantation verwendete er ein Art Zement aus Colophonium, Bimsstein und Gips. Infolge auftretender Infektionen und der wenig geeigneten Materialien scheiterte dieses Vorhaben frühzeitig.

Der Versuch einer Hüftgelenksendoprothesenimplantation aus Elfenbein wurde 1922 von Hey-Groves unternommen.

Die erste Totalendoprothese der Hüfte wurde 1938 von Philipp Wiles in London eingesetzt. Die Fixierung der Hüftpfanne erfolgte über zwei Schrauben, die Fixierung des Hüftkopfes wurde mittels eines durch den Schenkelhals geführten Schraubenbolzen erreicht (SCALES 1966-67).

Das Zeitalter der Hemiarthroplastiken begann 1940 mit einer erstmalig intramedullär verankerten Vitalliumprothese nach Moore und Bohlmann, wobei auf einen Pfannenersatz verzichtet wurde (MOORE 1952).

Nachdem sowohl die Brüder Judet mit der von ihnen entwickelten Schenkelhalsprothese aus Plexiglas (BLAUTH, DONER 1979), wie auch Moore 1952 mit seiner Schaft-Kopfprothese und Charnley mit seiner teflonbeschichteten Gleitpaarungen auf Grund frühzeitiger Endoprothesenlockerungen wenig erfolgreich waren, gelang Charnley dann Anfang der 1960er Jahre mit der Einführung des Polyethylens und des sogenannten Knochenzementes (Polymethylmetacrylat, PMMA) ein entscheidender Durchbruch im Bereich der Hüftendoprothetik (UNGETHÜM, BLÖMER 1987). Durch Verwendung der Polyethylenpfanne als Gleitpartner zum Endoprothesenkopf konnte das Gleitverhalten verbessert und eine deutliche Reduktion von Abriebpartikeln erzielt werden. So ergaben sich für einige zementierte Polyethylenpfannen und zementierte Schafttypen Überlebensraten von 90-98% nach 10 Jahren (KÄRRHOLM 2007, MALCHAU 2002). Es zeigte sich jedoch, dass mit der zementierten Technik unter Verwendung von Polymethylmetacrylat keine sichere dauerhafte Fixierung erreichbar war. Das

Problem der aseptischen Prothesenlockerung war weiterhin existent. Da u.a. zunächst insbesondere der verwendete Knochenzement als Ursache für eine Implantatlockerung angesehen wurde (sog. „cement disease“), wurden bereits zu Anfang der 1970er Jahre erste zementfreie Endoprothesen implantiert.

Judet verwendeten 1978 in einer der ersten Studien über die Implantatlockerung bei zementfreien Prothesen sog. Porometallprothesen. An Autopsiepräparaten konnte er ein gutes Knocheneinwachsen in das Endoprothesenoberflächenmaterial der Porometallprothesen zeigen (JUDET 1978).

Zur Verbesserung der elastischen Prothesenverklebung in der Markhöhle wurde 1974 von Mittelmeier die Tragrippenprothese entwickelt. Bis zum Jahre 1985 wurde das Endoprothesendesign kontinuierlich optimiert. Der Schafttyp III besaß zusätzlich zu einer makroporigen Kobalt-Chrom-Molybdän Legierung (Endocast®), Längsrippen und Stabilisierungsflügel zur Verbesserung der Rotationsstabilität (MITTELMEIER 1984).

1974 führte Lord seine „madreporische Prothese“ ein, bei der eine bessere Prothesenintegration durch Oberflächenvergrößerung erreicht werden sollte (LORD 1983). Auch diese Grundidee wurde in den folgenden Jahren und Jahrzehnten optimiert. Verschiedene Prothesentypen wurden entwickelt. Mit der ESKA-Schenkelhalsprothese wurde ein metaphysäres Verankerungsprinzip für Hüftgelenktotalendoprothesen realisiert. Es handelt sich hierbei um ein makroporös strukturiertes, zementfreies methaphysär zu verankerndes Implantat.

Eine Sonderform der Hemiarthroplastik wurde 1970 von Wagner in Form der sog. Wagnerkappe eingeführt. Hierbei handelte es sich um eine vollständige metallische Überkronung des Femurkopfes. Auf Grund der sehr hohen Reibungskräfte waren jedoch im Verlauf bei bis zu 50% der Fälle eine Revisionsoperation innerhalb von 7-10 Jahren notwendig (SPRANGER 1980).

Die Renaissance der Metall-Metall-Gleitpaarungen und deutlich verbesserte Fertigungstechniken führten 1980 zu der Entwicklung neuer Oberflächenersatzprothesen. Neben Wagner führte McMinin eine Teststudie mit einer CoCrMb-Monoblockpfanne durch. Die sicherster Fixation erreichte er mit hydroxylapatitbeschichteten zementfreien `press fit`-Pfannen und zementierten Kopfschalen (DANIEL 2004, MCMINN 1996).

Im weiteren Verlauf wurde eine Vielzahl verschiedener Endoprothesen konstruiert, welche sich primär in ihrem Schaftdesign zur methaphysären bzw. diaphysären Verankerung sowie in ihrer Oberflächenbeschaffenheit unterschieden. Zur weiteren Reduktion des Knochenverlustes während der Prothesenimplantation, insbesondere bei jungen Patienten mit guter Knochenstruktur wurden zunehmend Kurzschaftprothesen konstruiert. Die Verankerung des Schaftes erfolgt methaphysär-intertrochantär.(GULOW 2007)

Parallel zur Entwicklung verschiedenster Endoprothesensysteme wurde ebenso die Operationstechnik optimiert. Nach Vorbereitungen durch die Initiatoren W. Bargar und H. Paul wurden 1992 erstmalig computergestützte/ computerassistierte Endoprothesenimplantationen durchgeführt (Robodoc). Insgesamt ist jedoch die Wertigkeit solcher Verfahren noch nicht abschließend zu beurteilen, da sich in der Literatur kontroverse Positionen finden (BIRKE 2000, BÖRNER 1997, WETZEL 2000).

BIRKE beschrieb 2000 auf Grund der dreidimensionalen Planungsmöglichkeiten eine hohe Genauigkeit beim Auffräsen des Prothesenlagers und somit eine optimale Einpassung der Prothese in das proximale Femur sowie verbesserte Kontaktfläche zwischen Prothese und Knochen. Ebenso seien Qualitätskontrollen und Standards sowohl präoperativ sowie postoperativ evaluierbar.

Demgegenüber stehen neben der deutlich höheren Anschaffungs- und Unterhaltskosten, eine Verlängerung der Operationszeit und folglich ein höherer Blutverlust mit größerer Infektionsgefahr (BÖRNER 1997).

Das sog. CAS System (Computer Assisted Surgery) erlaubt dem Chirurgen hingegen in den meisten Fällen eine präoperative Planung und Simulation. Anhand präoperativer mehrdimensionaler Bildansätze der anatomischen Verhältnisse ist es dem Operateur jederzeit möglich, die zuvor geplante optimale Endoprothesenposition zu kontrollieren und optimal zu implantieren.

Zunächst waren zur intraoperativen Navigation präoperative CT-Datensätze erforderlich. Die Navigation erfolgte über verkabelte Instrumente. Stete Weiterentwicklungen machen aktuell eine röntgenfreie und kabellose Navigation möglich. Ob die hohe Präzision zu klinisch längeren Standzeiten der Endoprothesen führt, ist noch nicht abschließend geklärt und Gegenstand aktueller Studien.

## 1.8. Ziel der Studie

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine Aussage über die Biokompatibilität und Osteokonduktivität verschiedener Endoprothesenmaterialien zu machen. Es handelt sich um die klinisch eingesetzten Materialien Chirurgienstahl, eine Kobald-Chrom-Legierung sowie Titanium ( $TiAl_6V_4$ ). Die Kobald-Chrom-Legierung und Titaniumprüfkörper wurden in glatter, wie auch aufgerauter Version untersucht. Alle verwendeten Materialien werden typischerweise im Rahmen der Gelenkendoprothetik besonders in der orthopädischen und traumatologischen Chirurgie zahlreich verwendet. Aus diesem Grund wurde in dieser Studie eine humane Knochenmarkzellkultur aus dem Beckenkamm zur Biokompatibilitätstestung herangezogen.

Es existiert eine Vielzahl experimenteller Studien, welche sich mit der Frage der Biokompatibilität von Endoprothesenmaterialien auseinandersetzen. Im Gegensatz zu dieser Studie, in welcher humane Knochenmarkzellkulturen untersucht wurden, wurden üblicherweise tierische Osteoblasten und Fibroblasten verwendet.

Folgende Fragen wurden gestellt:

Bestehen im Rahmen der elektronenmikroskopischen Analyse der Zellmorphologie, Zelldichte und Verteilung Unterschiede zwischen Chirurgienstahl, Kobald-Chrom-Legierungen und Titanium?

Lassen sich auf molekularbiologischer Ebenen signifikanten Unterschiede in der Genexpression der unterschiedlichen Prüfkörper registrieren?

Existieren immunhistochemisch nachweisbare Unterschiede der osteoblastären Differenzierung auf den genannten Prüfkörpern unter Verwendung verschiedener osteoblasten-spezifischer Marker?

Welchen Einfluss hat die Implantatporosität und Hydrophilie auf das Auf-/Einwachsverhalten humaner Osteoblasten?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Beschreibung der Prüfkörper

Es handelt sich bei allen verwendeten Prüfkörpern um industriell gelieferte, scheibenförmige metallische Prüfkörper (DePuy Orthopädie GmbH, Johnson & Johnson, Kinkel, Germany) mit einem Durchmesser von 12 mm, einer Höhe von 3 mm und einem zentralen kreisförmigen Loch von 2 mm Durchmesser. Die Oberflächengeometrie entspricht derjenigen von Endoprothesenschäften- und Pfannenkomponenten, welche derzeit in der Orthopädie und Unfallchirurgie Verwendung finden.

Vor Beginn der zellulären Besiedelung auf den Prüfkörpern erfolgte zunächst die Reinigung mit Alkohol, sowie im Ultraschallbad mit einer anschließenden Spülung durch aqua destilata. Abschließend folgte die Hitze-Dampfsterilisation unter gesättigtem Wasserdampf bei 121°C.

Die folgenden Angaben der Werkstoffeigenschaften der verwendeten Prüfkörper erfolgten nach Angaben des Herstellers DePuy Orthopädie GmbH, Johnson & Johnson, Kinkel, Germany.

#### 2.1.1 Chirurgenstahl (stainless steel)/ glatt:

- Rauigkeit: 1,4 µm
- Gewicht: 2,18 g
- Chemische Zusammensetzung: C: 0,02%, Cr: 18,0%, Mo: 3%, Ni: 14%, Fe: Rest

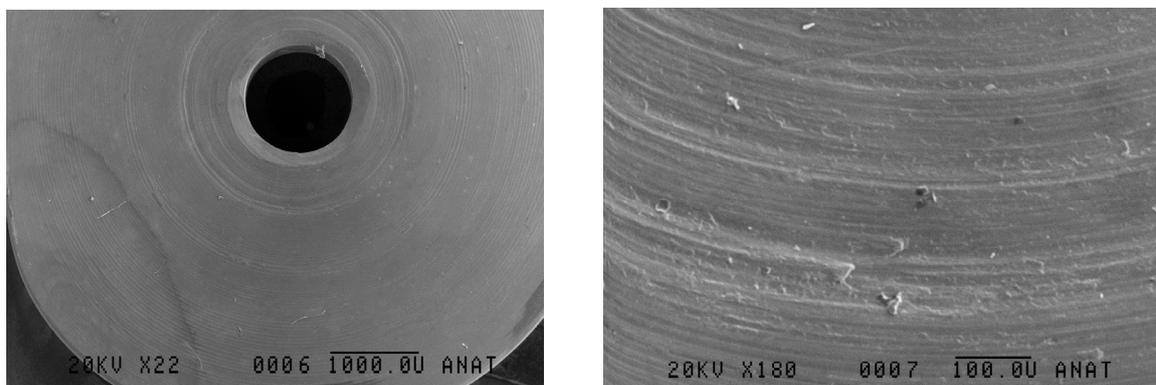


Abb. 3: REM Bild Chirurgenstahl bei 22-facher resp. 180-facher Vergrößerung ohne Zellen

### 2.1.2 $\text{TiAl}_6\text{V}_4$ (Titan, Schmiedelegierung, Tivanium)/ **glatt**:

- Rauigkeit: 1,4  $\mu\text{m}$
- Gewicht: 1,51 g
- Chemische Zusammensetzung: Al: 5,5-6,5%, C: 0,1%, Fe: 0,25%,  
H: 0,0125%, N: 0,03%, O: 0,13%, V: 3,5-4,5%, Ti: Rest

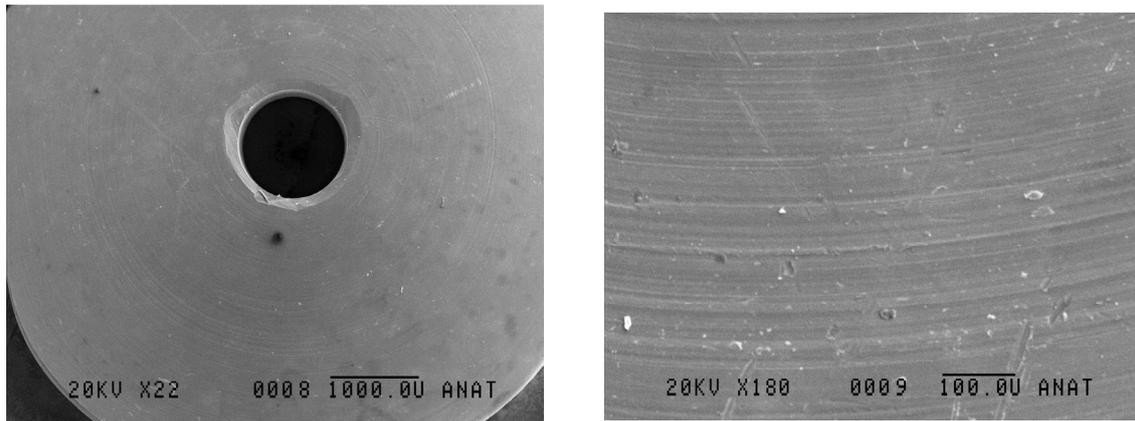


Abb. 4: REM Bild Tivanium ( $\text{TiAl}_6\text{V}_4$ ) glatt bei 22-facher resp. 180-facher Vergrößerung ohne Zellen

### 2.1.3 $\text{TiAl}_6\text{V}_4$ (Titan, Schmiedelegierung, Tivanium)/ **sandgestrahlt**:

- Rauigkeit: 4-6  $\mu\text{m}$
- Gewicht: 1,49 g
- Chemische Zusammensetzung: Al: 5,5-6,5%, C: 0,1%, Fe: 0,25%,  
H: 0,0125%, N: 0,03%, O: 0,13%, V: 3,5-4,5%, Ti: Rest

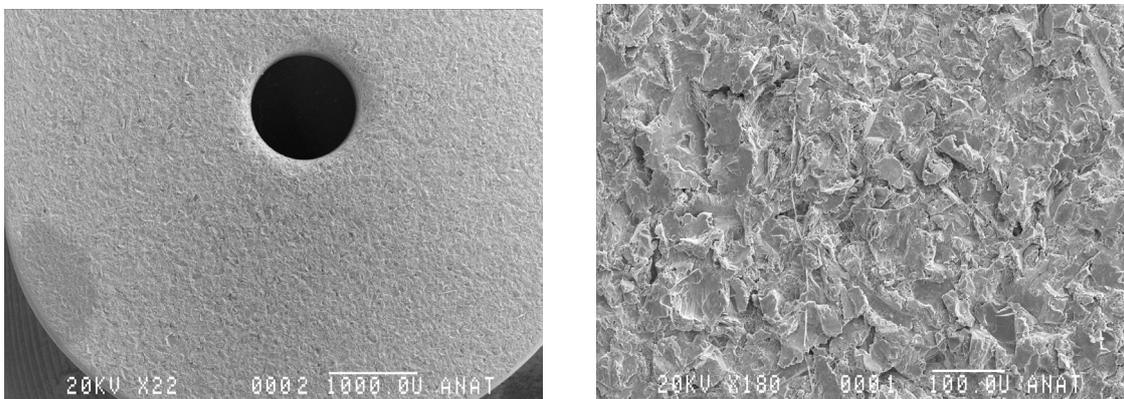


Abb. 5: REM Bild Tivanium ( $\text{TiAl}_6\text{V}_4$ ) sandgestrahlt 22-facher resp. 180-facher Vergrößerung ohne Zellen

#### 2.1.4 CoCr ( Orthochrom™) (Porocoat™):

- mittlere Porengröße: 250 µm
- Gewicht: 2,62 g
- Chemische Zusammensetzung: C: 0,21-0,25%, Co: Rest, Cr: 27-30%,  
Fe: 0,75% (max.), Mn 1,0% (max.), Ni: 1,0% (max.), Si: 1,0% (max.)

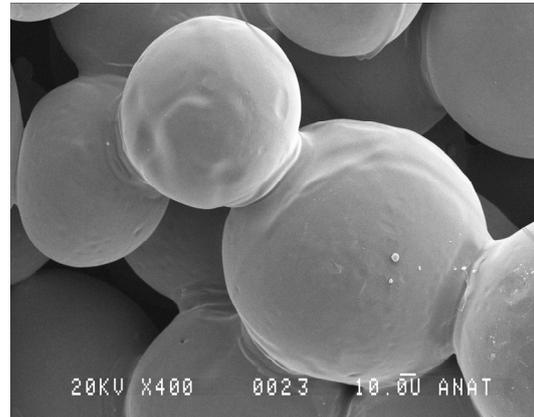
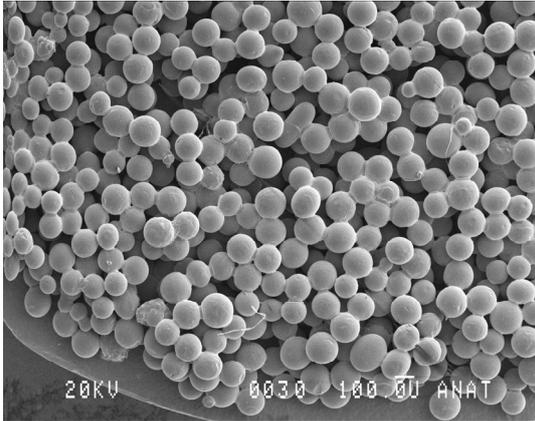


Abb. 6: REM Bild CoCr Porocoat mit 40-facher resp. 400-facher Vergrößerung ohne Zellen

#### 2.1.5 CoCr (Orthochrom™) glatt (Schmiedelegierung):

- Rauigkeit: 1,4 µm
- Gewicht: 2,18 g
- Chemische Zusammensetzung: C: 0,21-0,25%, Co: Rest, Cr: 27-30%,  
Fe: 0,75% (max.), Mn: 1,0% (max.), Ni: 1,0% (max.), Si: 1,0% (max.)

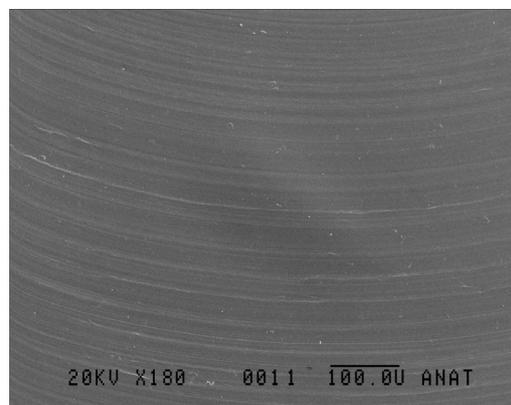
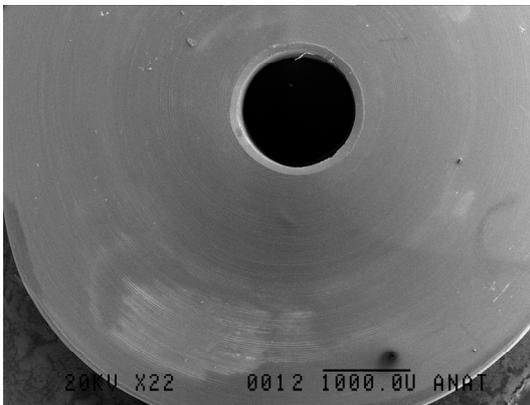


Abb. 7: REM Bild CoCr glatt mit 22-facher resp. 180-facher Vergrößerung ohne Zellen

## **2.2 Zellkultur**

### **2.2.1 Zellkultursystem**

Das verwendete Zellkultursystem aus mononuklären Knochenmarkzellen wurde bereits in den 1970er Jahren von KALLA erstmalig beschrieben und in den 1990er sowie 2000er Jahren von WILKE und anderen Arbeitsgruppen (WILKE & JÄGER 2001) zur *in vitro*-Untersuchung von orthopädischen Implantaten herangezogen. Hierdurch konnten relative Aussagen zur Spezifität und Sensibilität des beschriebenen Zellkultursystems in Bezug auf die Eignung als Screeningsystem von Biokompatibilitätstests gemacht werden. Modifikationen der Kulturbedingungen (PITTINGER et al. 1999) führten zu einer deutlichen Erhöhung des Anteils an mesenchymalen Stammzellen innerhalb der Mischkultur. Somit konnte in Folge das Knochenmarkzellkultursystem auch auf Progenitorzellen aus dem humanen Nabelschnurblut übertragen werden, da im Ausgangsmaterial des zuletzt genannten Systems deutlich weniger mesenchymale Progenitorzellen vorkommen (KÖGLER 2004, JÄGER 2003/ 2003).

### **2.2.2 Zellgewinnung**

Ausgangsmaterial zur Testung der oben genannten Biomaterialien waren unter standardisierten Bedingungen gewonnene Knochenmarkzellen. Hierzu wurden 20ml Knochenmark via Jamshidi-Vakuum-Aspiration aus dem dorsalen Beckenkamm einer 47 jährigen freiwilligen gesunden Knochenmarkspenderin entnommen.

Ausschlusskriterien:

- akute, chronische septisch-entzündliche Erkrankungen
- Erkrankungen des Immunsystems
- Neoplasien
- Einnahme von immunmodulierenden Medikamenten

Die Spenderin erfüllten die Kriterien zur primären Knochenmarktransplantation nach den Richtlinien der Bundesärztekammer. Es lag eine rechtskräftige schriftliche Aufklärung im Sinne der Deklaration von Helsinki vor. Die Beckenkammpunktion erfolgte nicht studienbedingt, sondern sie wurde im Rahmen einer Knochenmarkspende durchgeführt.

Die anschließende Isolierung mononukleärer Zellen aus der Zellsuspension erfolgte durch Gradienten-Zentrifugation, welche im Folgenden beschrieben wird.

### 2.2.3 Zellkultur

Zur weiteren Aufbereitung wurden 20 ml Knochenmark auf 1:2 bis 1:3 mit PBS (PAA, Pasching, Österreich) verdünnt, Lymphozyten-Separationsmedium (LSM) (PAA, Pasching, Österreich) im Falcon-Röhrchen (BD Bioscience, Erembodegem, Belgien) vorgelegt (1:2 bis 1:3 LSM : KM) und vorsichtig im Dichtegradienten aufgeschichtet. Es folgte eine Zentrifugation über 20 Minuten bei 1800 UpM/RT.

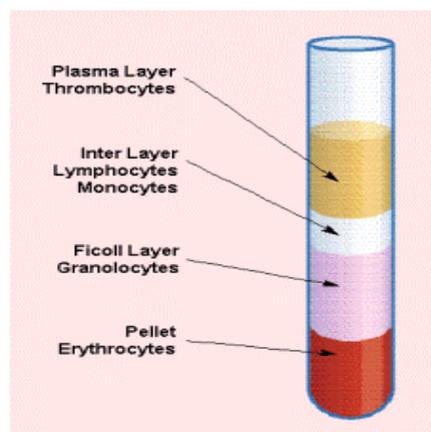


Abb. 8: Schichtung nach Dichtegradient im Falcon- Röhrchen

Während die leichten Thrombozyten in der Plasmaphase verblieben, reicherten sich die Lymphozyten und Monozyten in der weißlich erscheinenden Phase zwischen Plasma und Ficoll (Interphase) an. Die Granulozyten und Erythrozyten diffundierten durch die Ficollschicht und bildeten ein bodenständiges Pellet (Klumpchen am Gefäßboden). Die Gradientenschicht wurde abpipettiert und mit PBS erneut aufgefüllt. Nach wiederholter Zentrifugation über 5 Minuten bei 1800 UpM/RT wurde der Überstand dekantiert und das Pellet mit 7 ml Medium resuspendiert. Die Kultivierung in einer T25 Kulturflasche (Fa. Greiner, Flacht, Deutschland) erfolgt im Anschluß in DMEM-Kulturnährlösung (PAA Laboratories, Pasching Österreich) unter Zusatz von 20% FCS-Gold (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) und 1% Penicillin/Streptomycin/L-glutamin bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Am 7. Tag wurden die adherenten Zellen in 0.1% Trypsin / EDTA-Lösung (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) passagiert. Die zweite und dritte Passage folgte am 14. und 28. Tag. Vor

jeder Passage wurde die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer (VWR, Darmstadt, Deutschland) ermittelt. Im Anschluss an die 4. Passage (42. Tag) wurden jeweils 25.000 Zellen (100 µl Suspensionslösung) pro Kulturgefäß (Well)/ Oberflächen der verschiedenen Biomaterialien aufpipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C zur Förderung der zellulären Adhärenz durch zelluläre Sedation und Proteinbildung wurde je 1 ml DMEM-Lösung hinzugegeben.

Die osteoblastäre Stimulation mit Dexamethason/ Ascorbinsäure/ Glycerolphosphat (DAG) (Sigma, Steinheim, Deutschland) der aufgebrauchten Knochenmarkzellen erfolgt über einen Zeitraum von 4 Wochen. Das Kulturmedium wurde alle drei Tage gewechselt. Das Zellwachstum wird wöchentlich fotodokumentiert (AxioCam MRc, Zeiss, Göttingen, Deutschland).

**Beginn der Kultur Tag 0 →**

**P1 (7.Tag) →**

**P2 (14.Tag) →**

**P3 (28. Tag) →**

**P4 (42.Tag) →**

**Kultivierung auf den  
Biomaterialoberflächen (28 Tage)**

Herstellung der DAG Lösung:

Dexamethason Lösung  $10^{-2}$  M: Zur Herstellung der erforderlichen Lösung wurden 100 mg Dexamethason abgewogen, unter der Sterilbank zu 25,4 ml Ethanol hinzugefügt und das Dexamethason durch vorsichtiges Schütteln gelöst. Es folgte die Sterilfiltration durch einen 0,2 µm Filter (Nunc, Langenselbold, Deutschland). Die Lösung wird anschließend zu jeweils 500 µl/ 1000 µL in sterile Einfriergefäße aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Eine Zwischenverdünnung wurde täglich frisch ansetzen:

10 µl  $10^{-2}$  M + 10 ml PBS:  $10^{-5}$  M, von  $10^{-5}$  M 100 µl auf 10 ml Medium

Ascorbinsäure 2-Phosphat 50 mM: Es wurden 0,64 g abgewogen, in 50 ml PBS gelöst und sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Glycerolphosphat 1 M: Es wurden 10,8 g abgewogen, in 50 ml PBS gelöst und sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C.

## 2.3 RT-PCR (Polymerase chain reaction)

Mittels der Reversen Transkription (RT) wurde von der RNA ein reverses Transkript (cDNA) erstellt. In der PCR- Reaktion wurde diese cDNA mit spezifischen kurzen einzelsträngigen DNA-Fragmenten vermehrt. Die Vermehrung erfolgte durch die Taq-Polymerase. Im Anschluss erfolgte die weitere Analyse der amplifizierten DNA-Fragmente durch eine Gelelektrophorese.

In der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese wurde die DNA der Größe nach im elektrischen Feld aufgetrennt. Zur Dokumentation und semiquantitativer Evaluation wurde in der vorliegenden Arbeit ein Gel-Dokumentations-System samt Software (einschließlich einer Real time Kamera mit Ethidiumbromid Filter in Kombination mit Alpha-DigiDoc™ RT Software, Alpha Innotec, USA) verwendet.

Die One-step RT-PCR wurde mit dem Eppendorf Mastercycler Gradient durchgeführt.

Die Reaktionmischung (25 µl) enthielt:

- 3 µl humane RNA
- 1 µl 10 mM dNTP-Mix (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- 1 µl recombinant Rnasin™ / ribonuclease Inhibitor 1:4 (Promega, Madison, USA)
- 20 pM von jedem Primer
- 1 µl Enzym-Mix: Omnicript™ Reverse transcriptase, Sensicript™ Reversis Transcriptase und HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen OneStep RT-PCR Kit (100) Cat. No. 210212, Fa Qiagen, Hilden, Deutschland)
- 5 µl RT-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- 5 µl Q-solution und 7 µl RNase (Qiagen, Hilden, Deutschland)

Der verwendete Enzym-Mix diente der Transkription und Verstärkung.

Durchführung der thermischen Zyklen: 30 min bei 50 °C (Reverse Transkription), 15 min bei 95 °C (Denaturierung), gefolgt von einem PCR-Zyklus von 30 Sekunden bei 95 °C (Denaturierung), 55 °C für 30 Sekunden (annealing), 72 °C für 60 Sekunden (Extension) und einer abschließenden Extension für 60 Sekunden bei 72 °C. Es

wurden insgesamt 35 Zyklen durchgeführt. GAPDH (Thermo Elektron) diente als Negativ-Kontrolle.

Anfertigung der Ladepuffer für Gelelektrophorese:

Es wurde 25 g Saccharose in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen und 25 ml 1xTAE-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) hinzugefügt.

Die Saccharose wurde durch kräftiges Schütteln des Zentrifugenröhrchens gelöst, eine Spatelspitze Orange G (Sigma, Steinheim, Deutschland) hinzugefügt und ebenfalls durch kräftiges Schütteln gelöst bis die Lösung eine kräftig gelbe Farbe aufwies.

Für den aktuellen Bedarf wurde nun jeweils 1 ml in ein Reaktionsgefäß abgefüllt.

Anfertigung der Ethidiumbromid-Stammlösung:

Eine Tablette (1 g) wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt, 10 ml 1xTAE-Puffer hinzugefügt und die Tablette durch Schwenken des Röhrchens gelöst. Zur Verdünnung wurde 200 µl der Stammlösung zu 200 ml 1xTAE-Puffer in einer Laborflasche hinzugefügt.

RLT-Puffer:

Dem RLT-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurden 100:1 β-Mercaptoethanol (14,3 M) (VWR, Darmstadt, Deutschland) zugesetzt.

Hierzu wurden 10 ml RLT-Puffer in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 100 µl β-Mercaptoethanol (14,3 M) hinzugefügt.

TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer:

Der 50xTAE Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurde mit demineralisiertem H<sub>2</sub>O 1:50 verdünnt.

Hierzu wurden 200 ml 50xTAE-Puffer in einen 200 ml Messzylinder abgefüllt, im Anschluss dann 200 ml 50xTAE-Puffer in ein 10 l-Gefäß gegeben und mit demineralisiertem H<sub>2</sub>O auf 10 l aufgefüllt.

### 2.3.1 Primer (Thermo Elektron):

Gen Produkt	5'-3' Sequenz	3'-5' Sequenz
Osteopontin (OP)	5'- GAACGACTCTGATGATGTAG- 3'	3'- GCTCATTGCCTCCATCATTG-5'
Osteocalcin (OC)	5'- AGTCCAGCAAAGGTGCAGC-3'	3'- GGC CGT AGA AGC GCC GAT-5'
Receptor-activator of NFκB-ligand (RANKL)	5'- GCTTGAAGCTCAGCCTTTTG-3'	3'-GGGGTTGGAGACCTCGATG- 5'
Tatrat-resistente-saure- Phosphatase (TRAP)	5'- CTGTCCTGGCTCAAGAAACAG- 3'	3'- CATAGTGGAAGCGCAGATAGC- 5'
Kollagen I (Col I)	5'- GGACACAATGGATTGCAAGG- 3'	3'-AACCACTGCTCCACTCTGG- 5'
Kollagen II (Col II)	5'- TTTCCCAGGTCAAGATGGTC- 3'	3'- CTTCAGCACCTGTCTCACCA-5'
Bone sialoprotein (BSP)	5'- TGGGGTCTTTAAGTACAGGC- 3'	3'- TTTGTTATATCCCCAGCCTTC- 5'
Alkalische Phosphatase (ALP)	5'- GCTTCAGAAGCTCAACACCA- 3'	3'- CGTTGTCTGAGTACCAGTCC-5'
Glyceraldehyd-3- Phosphatdehydrogenase (GAPDH)	5'- CTCAAGATCATCAGCAATGCC- 3'	3'- GATGGTACATGACAAGGTGC- 5'

Tab. 2: Verwendete Primer

Lösen der Primer:

Die lyophilisierten Primer wurden vor dem Öffnen 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend mit H<sub>2</sub>O (Volumen nach Angabe des Herstellers auf dem Analysenzertifikat) versetzt, um eine Lösung von 100 µM (100 pmol/µl) zu erhalten.

Zum Lösen wurden die Primer geschüttelt und ca. 1 min auf dem Vortex (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) gemischt sowie nach ca. 5 min erneut für ca. 1 min gemischt. Die Primer waren gelöst.

Die Arbeitslösung enthielt somit 20 µl Stocklösung sowie 80 µl RNase-freies Wasser.

Zur nachstehenden mRNA Analyse wurden die Knochenmarkzellen mit Unterstützung von 0,05% Trypsin mechanisch von den zu testenden Biomaterialien gelöst und jeweils in 350 µl RLT-Puffer (Quiagen, Hilden, Deutschland) und 1:100 14,3 M β-mercaptoethanol überführt.

## **2.4 Rasterelektronenmikroskopie (REM)**

Die Rasterelektronenmikroskopie diente zur Erfassung der Oberflächenbeschaffenheit der Prüfkörper vor der zellulären Kultivierung sowie zur Analyse der Zellmorphologie. Die REM fand in enger Kooperation mit und am Institut für Anatomie (Herrn Dr. rer. nat. K. Zanger) statt. Verwendet wurde das REM Typ Jeol JSM 35 CF (Fa. Jeol., Tokyo, Japan).

Die Proben wurden in 2,5% Glutaraldehyd (Plano, Marburg, Deutschland) in 0,1 M/l Phosphat-Puffer für 2 h fixiert, in gleichem Puffer gewaschen, in Osmiumtetroxid (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) nachfixiert und in steigenden Acetonstufen entwässert (jeweils 30 min in 30%, 50%, 70%, 90%, 95% und 2x100% Aceton).

Critical Point Trocknung in der Druckkammer (Fa. Technics, USA/ CA) bei 42 °C und 1300 psi für 15 min.

Die Druckkammer wurde mit 100% Aceton gefüllt und die Proben hineinlegt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Proben nicht trockenfallen, Aceton wird durch CO<sub>2</sub> substituiert.

Kühlung erfolgte durch mehrmaliges Ein- und Ablassen des Druckgases bei geschlossener Kammer. Hierbei wurde die Kammer durch Zudrehen der Muttern per Hand verschlossen, das Druckgasflaschenventil geöffnet und das Auslassventil am Gerät geschlossen.

Das Einlassventil wurde langsam geöffnet. Sobald der Druck nicht mehr weiter anstieg, wurde das Einlassventil geschlossen und der Druck durch Öffnen des Auslassventils wieder abgelassen.

Nach Erreichen der Temperatur von 42 °C und eines Drucks von 1300psi wurde bis zum Ablassen des Gases circa 20 Minuten unter eingeschalteter Heizung gewartet.

Nach der Wartezeit von 20 Minuten wurde das Auslassventil bei eingeschalteter Heizung leicht geöffnet. Die gesamte Auslasszeit betrug etwa 15-20 Minuten.

Das Auslassventil wurde erst nach Unterschreiten von 1100psi-marke weiter geöffnet. Hatte der Druck den Wert von 500psi unterschritten, wurde der verbliebene Überdruck schneller ausgeglichen.

Erst nach Entnahme des Präparates wurde die Heizung ausgeschaltet.

Wurden mehrere Trocknungen hintereinander durchgeführt, wurde bei jedem Vorgang der O-Ring unter dem Kammerdeckel gewechselt.

Nun folgt das Aufkleben der Probenträger auf Messingplättchen, Umranden mit Leitsilber (Plano, Marburg, Deutschland) und Trocknung über 12h. Die Proben werden mit einer Polaron SEM Coating Unit (E5150 + Digimat 1200k) mit Goldstaub bedampft (30nm), wobei ein steter Argondurchfluss erfolgt (bei 0,1 Torr/ 30mA/ 2,5kV).

Schließlich wurden die dauerhaften Proben im REM betrachtet und die Ergebnisse mit Polaroidfilm `55´ dokumentiert.

## 2.5 Immunhistochemie

Zum Nachweis einer osteoblastären Differenzierung wurden folgende osteoblastenspezifische Marker verwendet:

- Alkalische Phosphatase (ALP)**, PA-kit, Vector, Burlingame, USA)
- Osteopontin (OP)**, Chemicom Int. Hamshare, UK / conc 1:50 in PBS-(T)ritonX-(A)lbumine bovine fraction V)
- Kollagen I** (Chemicom Int. Hamshare, UK / conc 1:100 in PBS-TA)
- Receptor-activator of NFκB-ligand (RANKL)** (anti-RANKL, Sana Cruz, USA / conc 1:200 in PBS-TA).

Ablagerungen von Calcium-Phosphat-Präzipitaten als Zeichen der Biomineralisation wurde semiquantitativ durch eine *von Kossa*-Färbung analysiert.

Es konnte bereits in einigen Studien gezeigt werden, dass eine Bindung von RANKL an seinen spezifischen RANK-Rezeptoren auf der Oberfläche der Osteoklasten zu deren Stimulierung und Differenzierung und folglich zu Knochenresorption führt (BOYCE 2007). Somit kann auch RANKL als indirekter Marker für osteoblastäre Stimulation dienen (WRIGHT 2005, SMITH 2004, TAKAHASHI 1999).

Die Biomaterialproben wurden in 4% Formalin für 15 Minuten fixiert, mit *aqua destilata* gespült und anschließend in PBS gespült. Endogene Peroxidasen werden mit 3% Perhydrol-Isopropanol Lösung geblockt.

Nach dem Aufbringen von Tris-Puffer (Ambion Darmstadt, Deutschland) wurden die Zellkulturgefäße mit primären Antikörpern gegen die verschiedenen zu testenden Antigene (Kollagen I, Osteopontin, und RANKL) für 12 Stunden bei 4 °C inkubiert.

Da die metallischen Prüfkörper zur Analyse der adherenten Zellen eine durch lichtmikroskopische Untersuchung nicht erlaubten, wurden zur deren Darstellung zusätzlich ein Fluoreszenz- Antikörper-System verwendet, wohingegen zur Analyse der Zellen in den periimplantären Regionen konventionelle Zweit-Antikörper-Färbeysteme (Avidin-biotin-complex und 3,3-Diaminobenzidine, Sigma Steinheim, Deutschland) zur Anwendung kamen.

Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) wurde nach Fixierung in 4%iger Formaldehyd und 30 minütiger direkter Substrat-Inkubation (SK-5.200, Vector, Burlingame CA, USA) gemessen. Die Zellkulturen wurden durch einen unabhängigen Untersucher verblindet lichtmikroskopisch (Axiovert 200, Zeiss, Deutschland) ausgewertet, unterstützt durch ein computergestütztes Bildbearbeitungsprogramm (Axiovision, Zeiss, Deutschland).

## **2.6 Oberflächenanalyse und Benetzbarkeit der Prüfkörper**

Die Rauigkeitsmessung findet in enger Kooperation mit Herrn Dr. F. Witte aus der Orthopädischen Universitätsklinik Annastift der Medizinischen Hochschule Hannover statt. Um den Einfluss der Zellkultivierung auf die Oberflächenbeschaffenheit der einzelnen Prüfkörper zu untersuchen, verwendeten wir das Tastschnittverfahren (Perthometer PRK, Mahr GmbH, Deutschland). Es wurde die Oberflächenrauheit jedes Implantatmaterials vor und nach der Zellkultivierung an Hand der Parameter Ra und Rz (DIN EN ISO 4287) analysiert. Es wurde jeweils über eine Länge von 5,6mm gemessen und ausgewertet.

Ra ist definiert als das arithmetische Mittel der Oberflächenrauheit. Sie entspricht der Fläche zwischen dem Rauheitsprofil und der Mittellinie bzw. dem Integral des absoluten Wertes der Rauheit über gemessener Flächenlänge.

Rz entspricht der Amplitude der durchschnittlichen Rauheit, gemessen an den fünf größten Höhen und Senken über der untersuchten Flächenlänge.

Zur Bestimmung der Benetzbarkeit wird der CA (contact angle) mittels des Messgerätes OCA (DataPhysics Instruments GmbH, Deutschland) in drei unabhängige Messungen der Prüfkörperoberflächen bestimmt. (näherer Infos)

Je kleiner der gemessene CA ist, desto größer ist die Benetzbarkeit und Oberflächenenergie des Prüfkörpers. Bei einem CA von  $0^\circ$  besteht somit eine vollständige Benetzbarkeit und hohe Hydrophilie.

Je größer der gemessenen CA ist, desto kleiner ist die Benetzbarkeit und Oberflächenenergie des Prüfkörpers. Der Prüfkörper ist hydrophob.

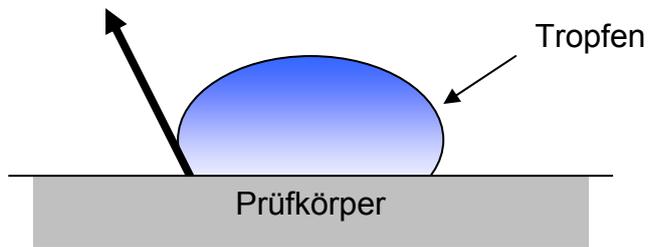


Abb. 9: Schematische Darstellung des CA (Contact angle) auf einem hydrophoben Prüfkörper (niedrige Benetzbarkeit)

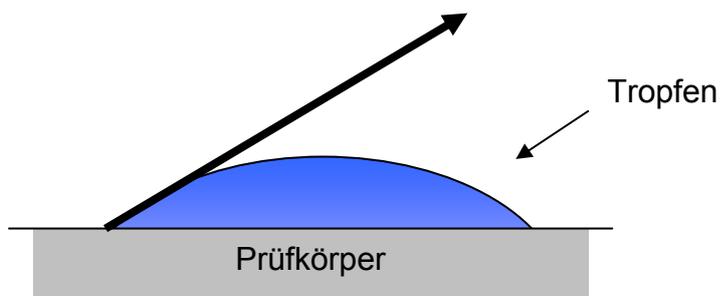


Abb. 10: Schematische Darstellung des CA (Contact angle) auf einem hydrophilen Prüfkörper (hohe Benetzbarkeit)

## 2.7 Alphabetische Aufzählung und Beschreibung der wichtigsten Materialien, Geräte und Chemikalien

### Verwendete Geräte/ Material:

Name	Firma/ Stadt/ Land
PCR-Gerät Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Photometer (Biophotometer)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spannungsgeber Consort E132	Biozym, hess. Oldendorf, Deutschland
Gelkammer MaxiL	Biozym, hess. Oldendorf, Deutschland
Zellkulturwerkbank HERAsafe	Kendro, Haunau, Deutschland
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Research, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe AccuJet	Brand, Wertheim, Deutschland
Vortex	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad W12	Medingen, Desden, Deutschland
Falcon-Röhrchen	BD Bioscience, Erembodegem, Belgien
T25 Kulturflasche	Greiner, Flacht, Deutschland
Druckkammer	Technics, CA, USA
REM Jeol JSM 35 CF	Jeol, Tokyo, Japan
Lichtmikroskop Axiovert 200/ Axiovision	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Kamera Axioacam MRc	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Substrat-Inkubation SK-5.200	Vector, Burlingame CA, USA
Autoklav	Tuttnauer 2540 EL System, Wetzlar, Deutschland

## Verwendete Chemikalien:

<b>Name</b>	<b>Firma/ Stadt/ Land</b>
DMEM	PAA, Pasching, Österreich
Lymphozyten-Separationsmedium	PAA, Pasching, Österreich
PBS für Histologie	PAA, Pasching, Österreich
Foetal Calf Serum Gold (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1x)	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin-Streptomycin-L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
Trypsin 2,5% 10x	Biochrom, Berlin, Deutschland
Viralex Trypsin-EDTA (10x)	PAA, Pasching, Österreich
Dexamethason	Sigma, Steinheim, Deutschland
L-Ascorbic-acid-2-phosphate	Sigma, Steinheim, Deutschland
Glycerol 2 phosphate	Sigma, Steinheim, Deutschland
Antibiotika-Antimykotika-Lösung (Penicillin-Streptomycin-Amphotericin)	PAA, Pasching, Österreich
Primer	Thermo Elektron
RNeasy Mini Kit (50)	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAshredder (50)	Qiagen, Hilden, Deutschland
DNase-free RNase-Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
RT- Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Tris-Puffer	Ambion, Darmstadt, Deutschland
RNasin 2500 units	Promega Corporation, Madison, USA
Seakem LE Standardagarose	Biozym, hess. Oldendorf, Deutschland
OneStep RT-PCR-Kit (100)	Qiagen, Hilden, Deutschland
GAPDH	Thermo Elektron
TAE-Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
RLT-Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl, Roth, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Qiagen, Hilden, Deutschland
100bp Ladder	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Osmiumtetroxid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

dNTP-Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
Albumin bovine Fraction V	Serva, Heidelberg, Deutschland
CaCo-Puffer	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Merck, Darmstadt, Deutschland
HCl 2M	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glutaraldehyd (2,5%)	Plano, Marburg, Deutschland
Leitsilber	Plano, Marburg, Deutschland
Orange G	Sigma, Steinheim, Deutschland
TAG Polymerase	Qiagen, Hilden, Deutschland
Perhydrol-Isopropanol	VWR, Darmstadt, Deutschland
Avidin-biotin-complex	Vector, Burlingame CA, USA
3,3-Diaminobenzidine	Sigma, Steinheim, Deutschland

**Antikörper Immunhistochemie:**

Osteopontin (Rabbit)	Chemicon, Hamshare, GB
Alkalische Phosphatase	Vector, Burlingame, USA
Collagen I (Maus)	Chemicon, Hamshare, GB
RANKL (Rabbit)	Santa Cruz, Santa Cruz, USA

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Oberflächenanalyse und Morphologie mittels REM

Zur Dokumentation der Oberflächenbeschaffenheit der einzelnen Prüfkörper sowie Analyse der Zellmorphologie wird die Rasterelektronenmikroskopie herangezogen. Zur Überprüfung der angegebenen Rauigkeit und Oberflächenstruktur sowie zur späteren Evaluation des zellulären Wachstums werden zunächst die geprüften Oberflächen ohne Zellen (nativ) untersucht.

#### 3.1.1 Chirurgenstahl

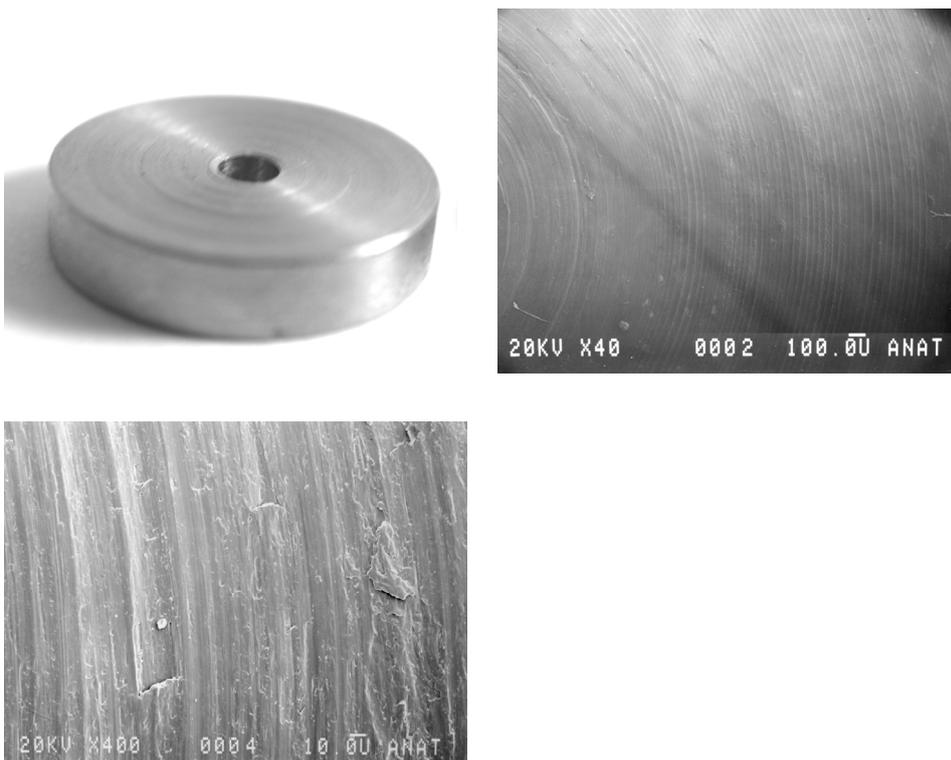


Abb. 11: Chirurgenstahl in der Aufsichtsfotographie und REM

Die Abbildungen Nr. 11 zeigen zunächst eine Fotoaufnahme des Prüfkörpers Chirurgenstahl, sowie die korrespondierenden rasterelektronenmikroskopischen Darstellungen der Oberflächen sowohl bei 40-facher, wie auch 400-facher Vergrößerung. Es zeigt sich eine glatte, in der 400-fachen Vergrößerung diskrete

Rauhigkeit, welche auf Grund der Schmiedung entstanden ist und einer Rauhigkeit von 1,4  $\mu\text{m}$  entspricht.

### 3.1.2 $\text{TiAl}_6\text{V}_4$ (Titanium) glatt

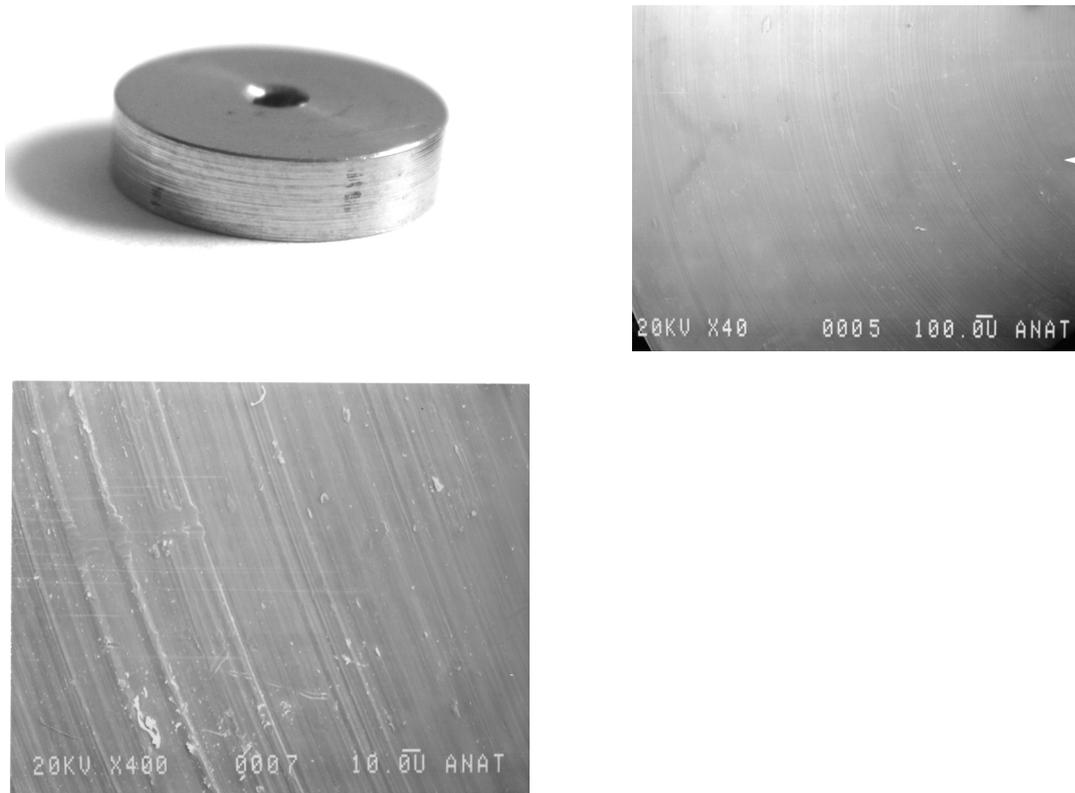
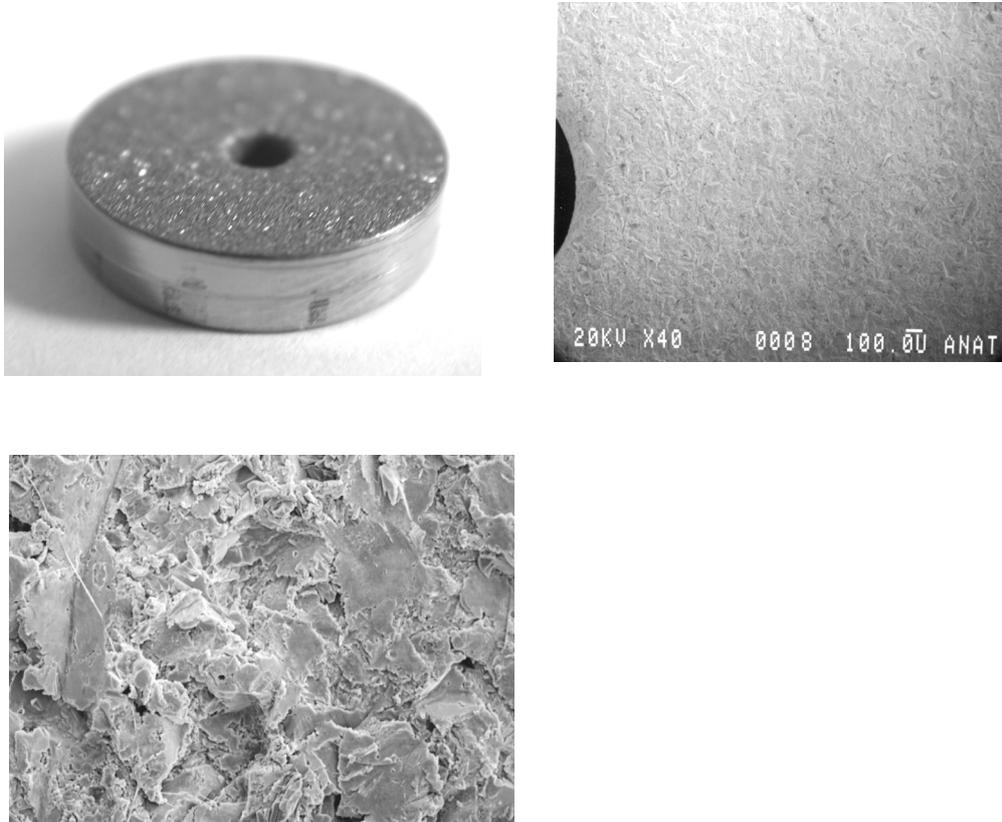


Abb. 12: Titanium in der Aufsichtsfotografie und REM

Die Abbildungen Nr. 12 zeigen eine Fotoaufnahme des Prüfkörpers Titanium glatt, sowie die korrespondierenden rasterelektronenmikroskopischen Darstellungen der Oberflächen sowohl bei 40-facher, wie auch 400-facher Vergrößerung. Es zeigt sich eine glatte, in der 400-fachen Vergrößerung diskrete Rauhigkeit, welche auf Grund der Schmiedung entstanden ist, und mit einer Rauhigkeit von 1,4  $\mu\text{m}$ , der des Chirurgenstahls entspricht.

### 3.1.3 $\text{TiAl}_6\text{V}_4$ (Titanium) sandgestrahlt



*Abb. 13: Titanium sandgestrahlt in der Aufsichtsfotographie und REM*

Die Abbildungen Nr. 13 zeigen eine Fotoaufsicht des Prüfkörpers Titanium sandgestrahlt, sowie die korrespondierenden rasterelektronenmikroskopischen Darstellungen der Oberflächen sowohl bei 40-facher, wie auch 400-facher Vergrößerung. Es zeigt sich bereits makroskopisch eine deutliche Oberflächenrauigkeit, welche einer Rauigkeit von 4-6  $\mu\text{m}$ , entspricht.

### 3.1.4 CoCr (Orthochrom™) glatt

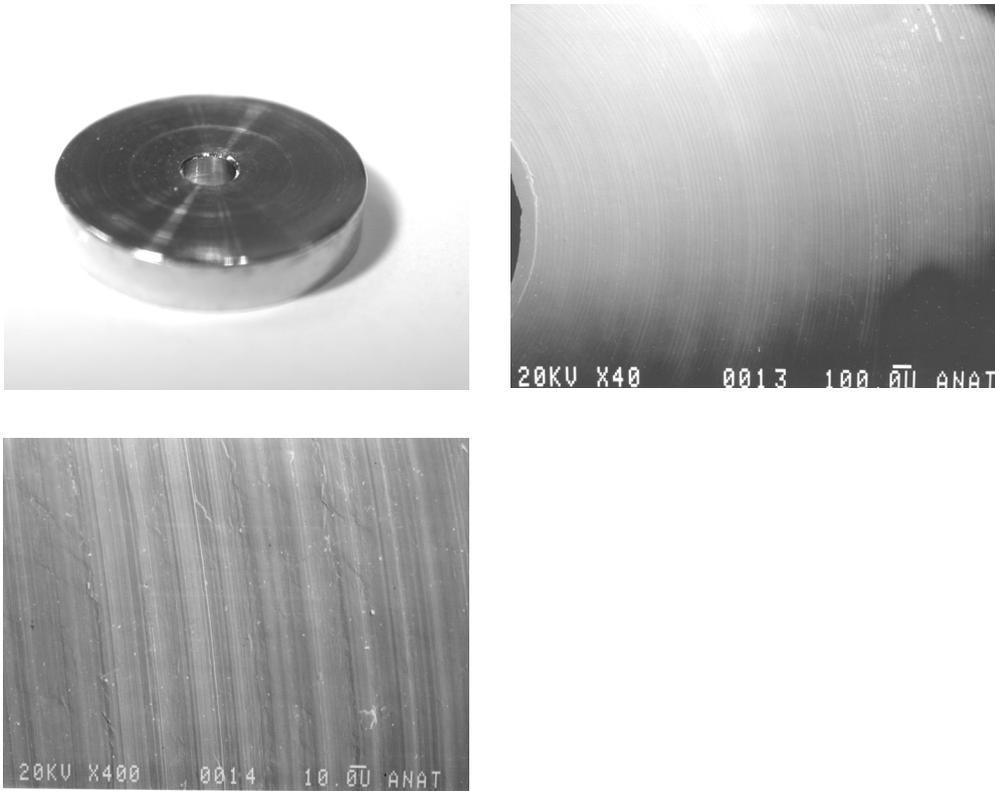


Abb. 14: CoCr (Orthochrom™) glatt in der Aufsichtsfotographie und REM

Die Abbildungen Nr. 14 zeigen eine Fotoaufnahme des Prüfkörpers CoCr (Orthochrom™) glatt, sowie die korrespondierenden rasterelektronenmikroskopischen Darstellungen der Oberflächen sowohl bei 40-facher, wie auch 400-facher Vergrößerung. Es zeigt sich eine glatte, in der 400-fachen Vergrößerung diskrete Rauigkeit, welche auf Grund der Schmiedung entstanden ist, und mit einer Rauigkeit von 1,4 μm der des Chirurgenstahls und des glatten Tivaniums entspricht.

### 3.1.5 CoCr (Orthochrom™) Porocoat™

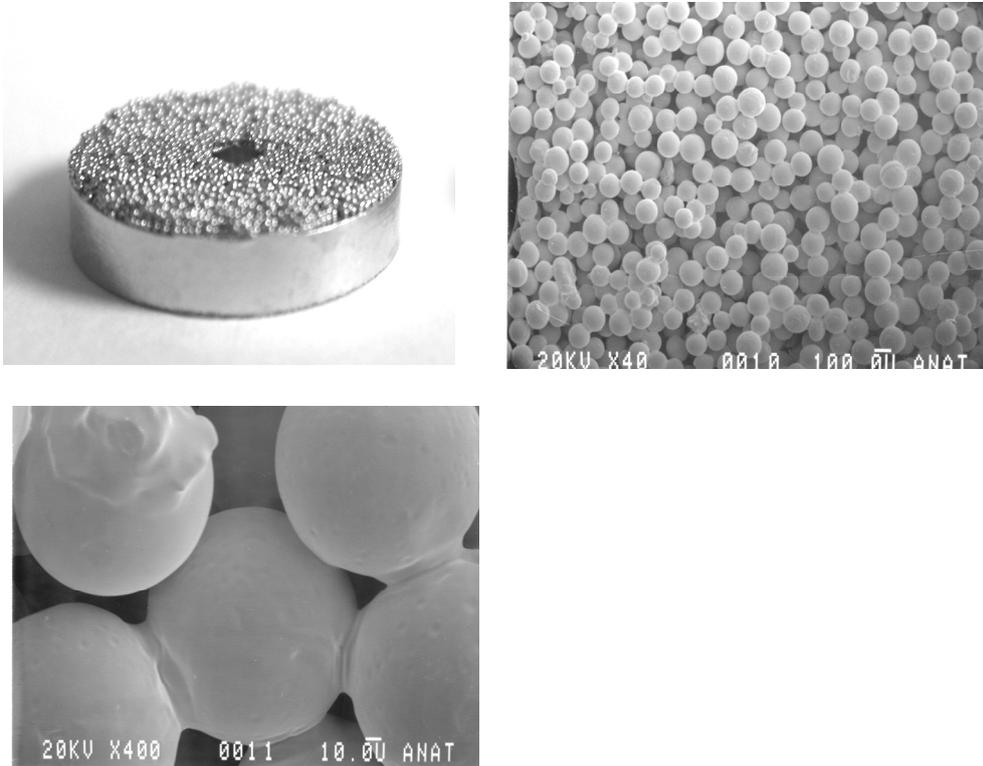
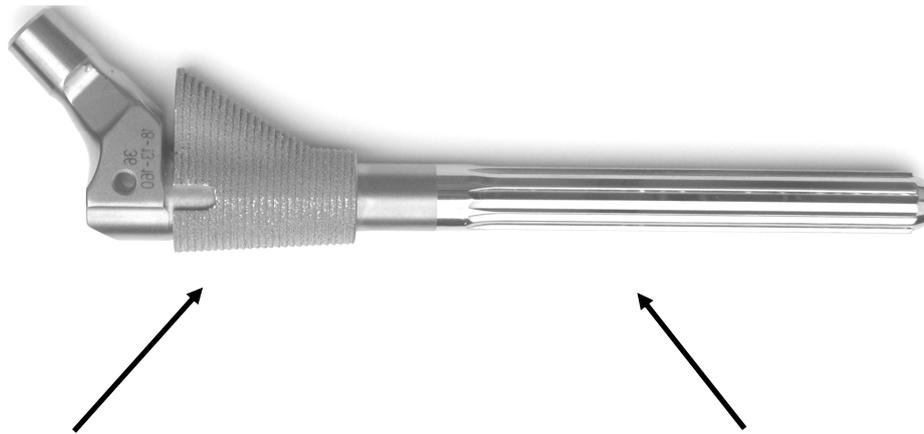


Abb. 15: CoCr (Orthochrom™) Porocoat™ in der Aufsichtsfotografie und REM

Die Abbildungen Nr. 15 zeigen eine Fotoaufnahme des Prüfkörpers CoCr (Orthochrom™) Porocoat™, sowie die korrespondierenden rasterelektronenmikroskopischen Darstellungen der Oberflächen, sowohl bei 40-facher, wie auch 400-facher Vergrößerung. Es zeigt sich die als Porocoat™ bezeichnete Oberflächenstruktur in Form eines dreidimensionalen Gerüsts aus 250µm großen Kugeln, welche bereits makroskopisch in der Fotoaufnahme zuerkennen sind.



CoCr (Orthochrom™) Porocoat

CoCr (Orthochrom™) glatt

*Abb. 16: SROM™ Endoprothesenschaft der Firma DePuy Orthopädie GmbH (Johnson & Johnson), Kirkel, Deutschland*

Exemplarisch ist das verwendete Material CoCr (Orthochrom™) Porocoat™ und CoCr (Orthochrom™) glatt an Hand der in der orthopädischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität verwendeten SROM™ Hüftgelenk-Endoprothese demonstriert. Im Bereich des Prothesenkragens, welcher dem Bereich der metaphysären Verankerung entspricht, wird das besonders poröse Oberflächenmaterial CoCr (Orthochrom™) Porocoat™ verwendet, wohingegen der Prothesenschaft aus glatten CoCr (Orthochrom™) besteht.

Im weiteren Verlauf werden die Prüfkörper aus CoCr (Orthochrom™) zur Vereinfachung lediglich mit CoCr bezeichnet.

## 3.2 Zellmorphologie und Zellproliferation mittels REM

Um Aussagen zum Anwachsverhalten und zur Zellmorphologie zu erhalten, werden nun nach 70 Tagen Untersuchungszeitraum die bewachsenen Prüfkörper mittels der Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM) untersucht.

### 3.2.1 Chirurgenstahl



Abb.17: Chirurgischer Stahl bei 200-facher Vergrößerung in der REM

Auf der Oberfläche des chirurgischen Stahls zeigen sich bei 200-facher Vergrößerung lediglich vereinzelte rundlich geformte Zellen ohne sichtbare Bildung von Zellverbänden.

Es findet sich kein Zellrasen, die Zellen erscheinen deutlich verplumpt und haben keine osteoblastentypischen Ausläufer.

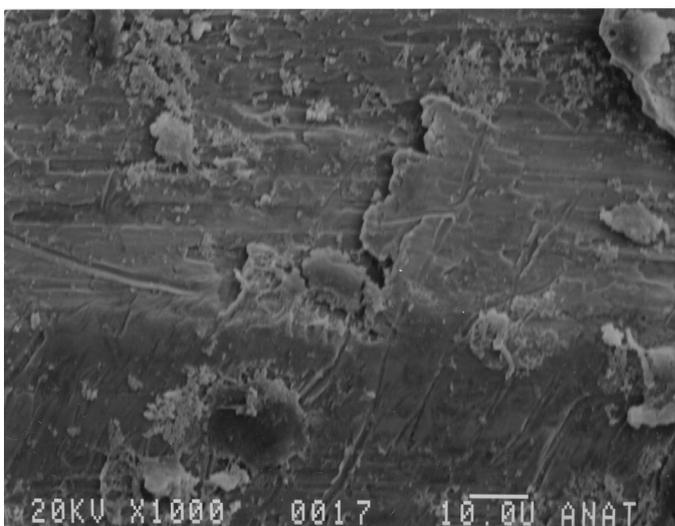


Abb.18: Chirurgischer Stahl bei 1000-facher Vergrößerung in der REM

Auch bei 1000-facher Vergrößerung zeigen sich auf dem chirurgischen Stahl lediglich vereinzelte Zellformationen ohne direkten Zellverbund.

### 3.2.2 $\text{TiAl}_6\text{V}_4$ (Titanium) glatt

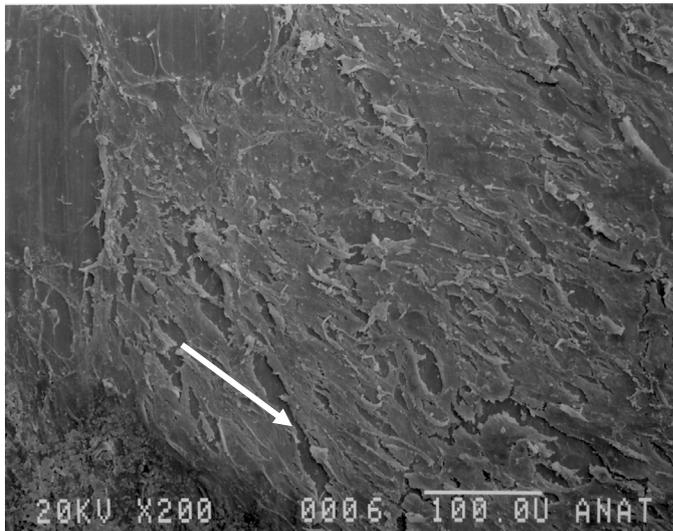


Abb. 19: Titanium glatt bei 200-facher Vergrößerung in der REM

Bereits bei 200-facher Vergrößerung zeigen sich flächenhafte Zellbesiedlungen im Sinne eines dichten Zellrasens. Die einzelnen Zellen liegen zum Teil übereinander geschichtet und weisen einen engen Kontakt zueinander auf. Zum Teil erscheinen sie auseinander gerissen, welches am ehesten als Artefakt durch die Präparation zu werten ist.

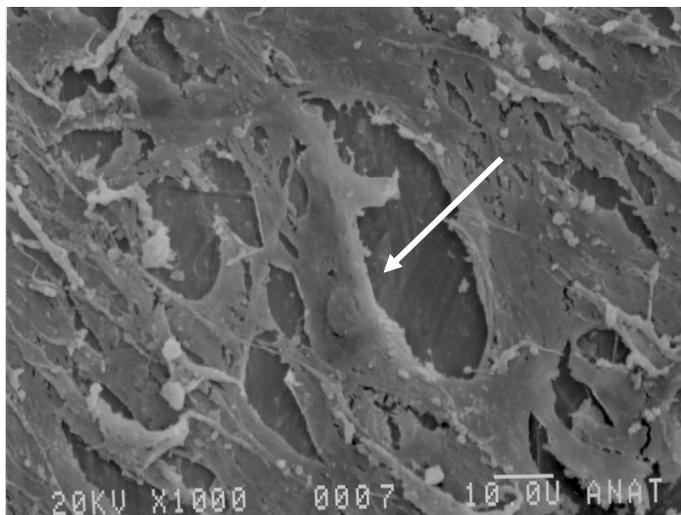


Abb. 20: Titanium glatt bei 1000-facher Vergrößerung in der REM

Besonders in der 1000-fachen Vergrößerung finden sich großflächige und flache Zellen. Vereinzelt sind große Zellkerne als deutliche Ausbuckelung zu erkennen (Pfeil).

Die Zellen zeigen zudem einen flächigen Verbund mit Verbindung über lange Zellausläufer und erscheinen ebenfalls zum Teil in mehreren Schichten übereinander liegend.

Die ursprüngliche Oberflächenstruktur ist nur noch an wenigen Stellen des Prüfkörpers zu sehen.

### 3.2.3 $\text{TiAl}_6\text{V}_4$ (Titanium) sandgestrahlt

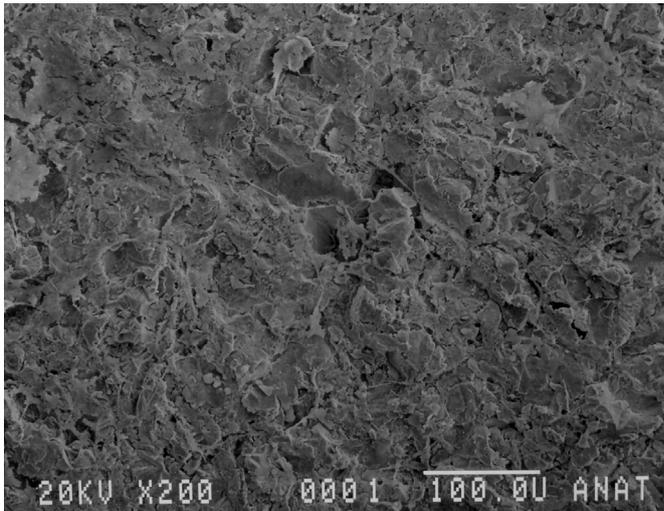


Abb. 21: Titanium sandgestrahlt bei 200-facher Vergrößerung in der REM

Schon in der 200-fachen Vergrößerung fällt die dichte Zellbesiedelung, besonders im Vergleich zum glatten Titanium mit insgesamt weniger harmonischem Zellverteilungsmuster auf. Zelllücken sind erkennbar, ebenso lange Zellausläufer und Verbindungen.

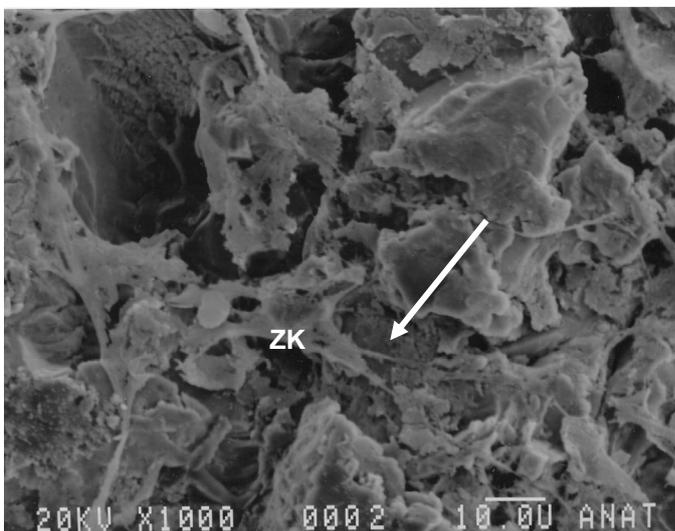


Abb. 22: Titanium sandgestrahlt bei 1000-facher Vergrößerung in der REM

Die Zellen sind morphologisch sehr ähnlich, zu denen der glatten Titanium Oberfläche. Auf Grund der aufgerauten Oberfläche des Prüfkörpers erscheinen die Zellen insgesamt weniger harmonisch, jedoch vergleichbar dicht verteilt.

Das Zellwachstum ist ebenfalls mehrschichtig und zum Teil in deutlichem Zellverbund. Vereinzelt lässt sich noch die sandgestrahlte Oberfläche des Prüfkörpers zwischen den Zellverbänden erkennen.

Die Zellen sind besonders im Vergleich zur glatten Titanium Oberfläche etwas kleiner, bilden jedoch ebenfalls typische Zellausziehungen (Pfeil) und dichten Zellkontakt, vereinzelt Zellkerne (ZK) lassen sich ebenfalls darstellen.

### 3.2.4 CoCr (Orthochrom™) glatt

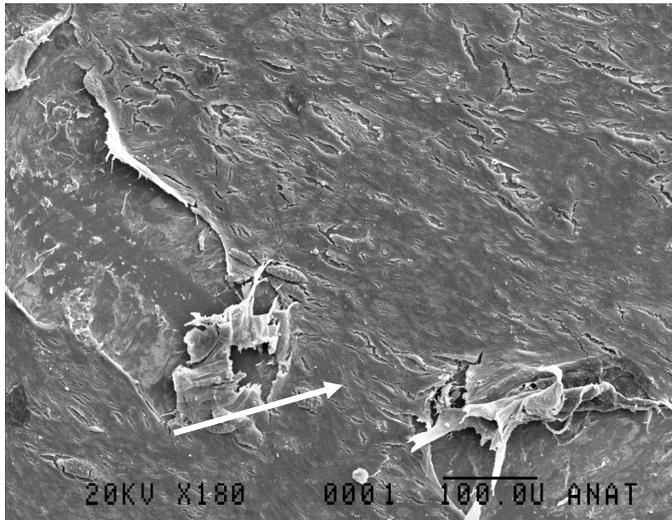


Abb. 23: CoCr glatt bei 180-facher Vergrößerung in der REM

Bereits bei 180-facher Vergrößerung in der REM lässt sich eine nahezu lückenlose Zellbesiedlung auf der Oberfläche des Biowerkstoffs erkennen. Nur kleine Areale sind unbedeckt und ermöglichen die Sicht auf die Implantatoberfläche.

Die zu sehenden Zellaufwerfungen sind Defekte der obersten Zellschichten und bei der Präparation entstanden. Hier ist der Prüfkörper gut erkennbar, ebenso die dichte nahezu lückenlose Zellbesiedlung am Rand des Artefaktes.

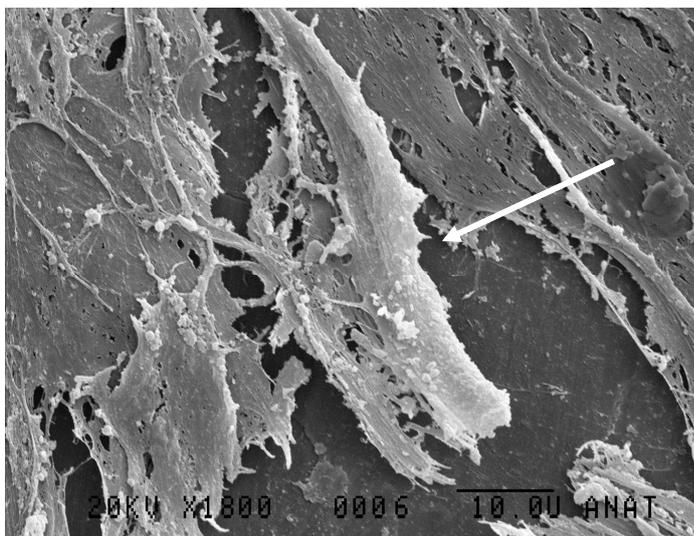


Abb.24: CoCr glatt bei 1800-facher Vergrößerung in der REM

In der 1800-facher Vergrößerung lassen sich in der REM flache, polygonale Zellen in sehr dichtem Zellverband erkennen. Oben dargestellte Unterbrechungen mit Aufsicht auf das Prüfmaterial beruht auf Defekten durch die Präparation.

Es lassen sich zahlreiche Zellausläufer finden. In anderen Bereichen ist der Zellverband so dicht, dass keine klaren Zellgrenzen zu unterscheiden sind und sich ein teppichähnlicher, vollständiger Zellrasen gebildet hat.

### 3.2.5 CoCr (Orthochrom™) Porocoat™

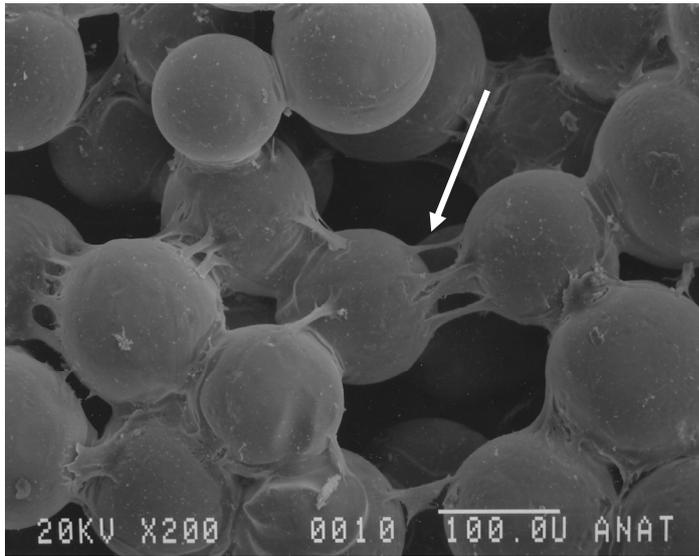


Abb. 25: CoCr Porocoat™ bei 200-facher Vergrößerung in der REM

Bereits in der 200-fachen Vergrößerung zeigen sich die 250 µm großen CoCr-Kügelchen in einem dreidimensionalen Konstrukt. Die Kügelchen sind nahezu vollständig von Zellen überzogen und über lange Zellausläufer mit einander verbunden.

Zellgrenzen lassen sich nicht bestimmen. Zum Teil kommt es zu vollständiger Überbrückung und Verbindung der einzelnen Kugeln durch die aufliegende Zellverbände.



Abb.26: CoCr Porocoat™ in 1000-facher Vergrößerung in der REM

In der links gezeigten Detailansicht bei 1000-facher Vergrößerung ist der Übergang zweier CoCr-Kügelchen dargestellt. Das vollständige Überwachsen und Überbrückung des Raumes zwischen den CoCr-Kügelchen ist gut sichtbar. Es zeigen sich Zellausläufer, welche die einzelnen Zellen mit einander verbinden und sich im dreidimensionalen Raum aufspannen. Vereinzelt sind die Zellen abgelöst und eingerissen. Auf Grund der dichten Besiedlung ist die genaue Morphologiebeschreibung nur eingeschränkt möglich. Es zeigen sich erneut flache, polygonale ausgezogene Zellen.

Zusammenfassend zeigen sich sowohl bei den Prüfkörpern aus Tivanium wie auch der porösen CoCr-Legierung dichte Zellbesiedlungen und zahlreichen Zellverknüpfungen durch zytoplasmatische Ausläufer.

Morphologisch finden sich vornehmlich flache, polygonale Zellen mit multiplen Zellausläufern zur interzellulären Kommunikation. Diese morphologischen Zeichen erfüllen die Kriterien vitaler und proliferierender Zellen.

Im Gegensatz hierzu, zeigen sich beim chirurgischen Stahl sehr wenige verplumpte, runde Zellen ohne erkennbare Zellausläufer. Dies sind typische Charakteristika für avitale Zellen ohne Proliferationstendenz. Somit kann man von einer reduzierten und vergleichsweise schlechten Cyto- bzw. Biokompatibilität von Chirurgenstahl ausgehen. Dies entspricht auch den Ergebnissen von Pittenger (PITTENGER 1999).

Nach 4 wöchiger Kultivierung sind die Oberflächen des sandgestrahlten Tivanium nahezu vollständig mit flachen Zellen mit zarter Morphologie bedeckt. Die Porocoat™ beschichteten Prüfkörper zeigen sich zur selben Zeit makroskopisch unverändert, zwischen den großen Granula breiten sich fibroblastenartige Zellen aus, welche mit ihren langen spindelartige Fortsätzen die intergranulären Zwischenräume brückenartig verbinden.

### 3.4 Zellmorphologie und -verteilung und das Wachstumsverhalten der MSC in der Lichtmikroskopie

Nach Aufbringen der Zellen auf die Oberflächen der einzelnen Prüfkörper erfolgt in wöchentlichen Abständen die lichtmikroskopische Analyse und Dokumentation des periimplantären Bereiches der Biometalle (Randbereich sowie Bereich im zentralen Loch der Prüfkörper). Evaluiert werden die Zellmorphologie, Zellverteilung sowie das Wachstumsverhalten der Mischzellkultur.

Nach 1-wöchiger Kultivierungsdauer finden sich periimplantär bei allen Prüfkörpern zunächst morphologisch überwiegend ubiquitär runde Zellen. Zudem zeigt sich, dass lediglich die Titan-Implantate einen direkten Metall-Zell-Kontakt erlauben, wohingegen CoCr und die Chirurgenstahlimplantate einen zellfreien Saum in der Kulturschale von durchschnittlich 200- 400  $\mu\text{m}$  Abstand zum Prüfkörper bilden.

Nach 14 Tagen *in vitro* hingegen finden sich bei allen Biomaterialien, mit Ausnahme des Chirurgenstahls direkte Zelladhärenzen zum Implantat. Im weiteren Verlauf der Kultivierung erweitert sich der zellfreie Saum um die Prüfkörper aus Chirurgenstahl bis auf 740  $\mu\text{m}$ .

Bei allen Proben aus Titan- und CoCr-Legierungen zeigen die Zellen überwiegend eine fibroblastenartige Morphologie mit langen polygonalen Zellkörpern. Im Falle von Chirurgenstahlnähe haben sie jedoch ein kugeliges rundes Aussehen. Diese Ergebnisse entsprechen den bei der REM beobachteten Resultate.

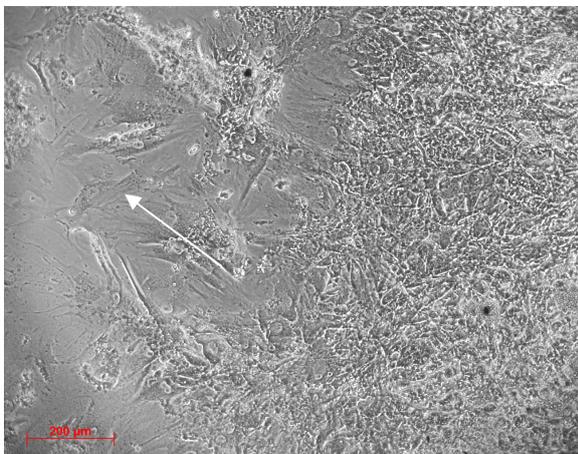


Abb. 27: Chirurgicaler Stahl: Periimplantärer Bereich

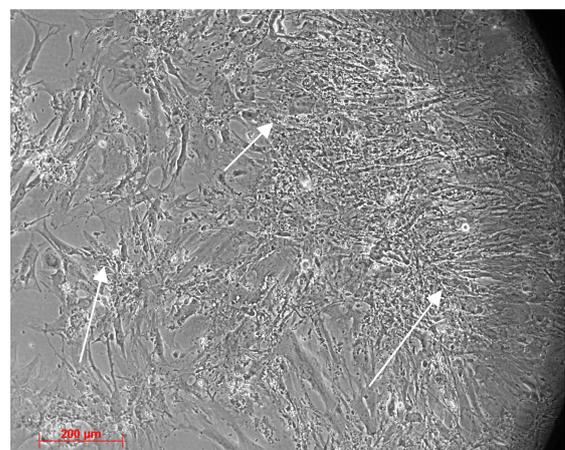


Abb. 28: CoCr glatt: Periimplantärer Bereich

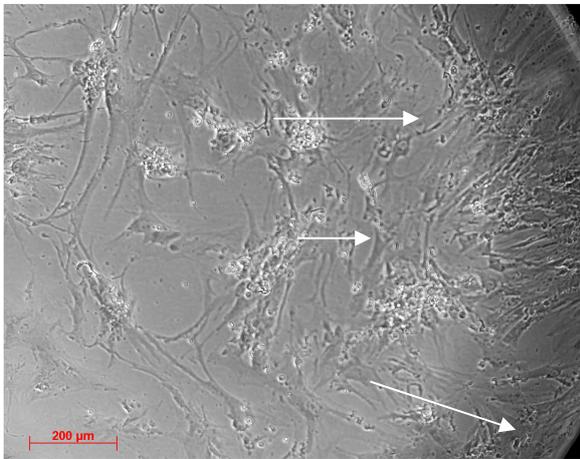


Abb. 29: CoCr Porocoat™: Periimplantärer Bereich

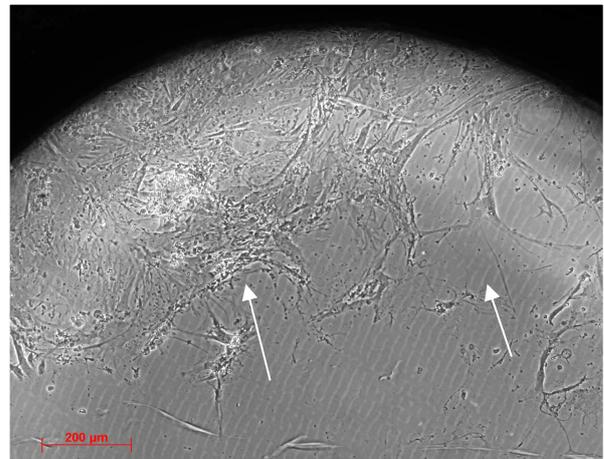


Abb. 30: Titanium sandgestrahlt: Periimplantärer Bereich

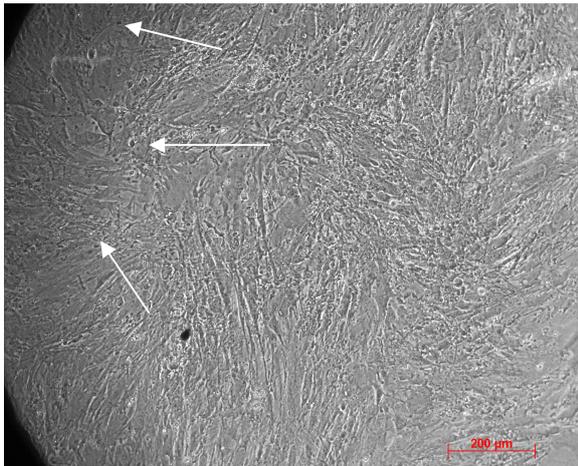


Abb. 31: Titanium glatt: Periimplantärer Bereich

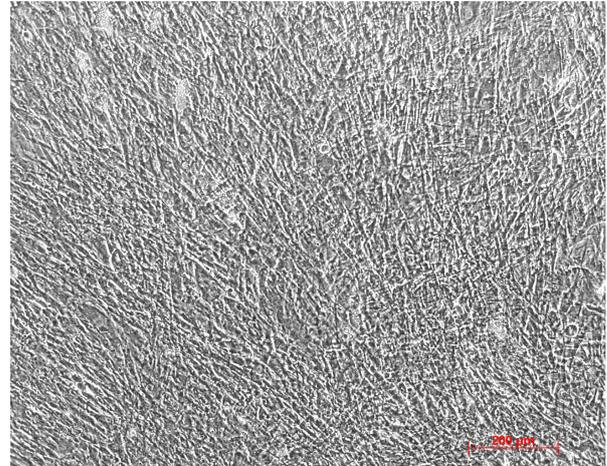


Abb. 32: Kontrolle ohne Prüfkörper

Die oben aufgeführten Abbildungen (Photoaufnahmen) dokumentieren die lichtmikroskopische Analyse der Zellmorphologie und Adhärenz zu den unterschiedlichen Biomaterialien nach 3 wöchiger Kultivierung. Die Photos werden im zentralen Loch der Biomaterialien zur Beurteilung der periimplantären Zellmigration und Adhäsion gemacht. Alle Biomaterialien, mit Ausnahme des Chirurgenstahls zeigen einen direkten Zellkontakt und Adhärenz der umgebenden mononukleären Zellen. Typisch für MSCs haben sie eine spindelförmige Morphologie.

In der periimplantären Region des Chirurgenstahls finden sich wie zuvor beschrieben runde apoptotische/ nekrotische Zellen und reichlich Zelldetritus.

Die Zellverbände orientieren sich mit Ausnahme des Chirurgenstahl bei allen Biomaterialien perpendikulär in Richtung des Implantates. Die Zellausrichtung beim Stahlimplantat erscheint zufällig ohne besondere Orientierung.

### 3.3.1 Wachstumskinetik während MSC Expansionsphase

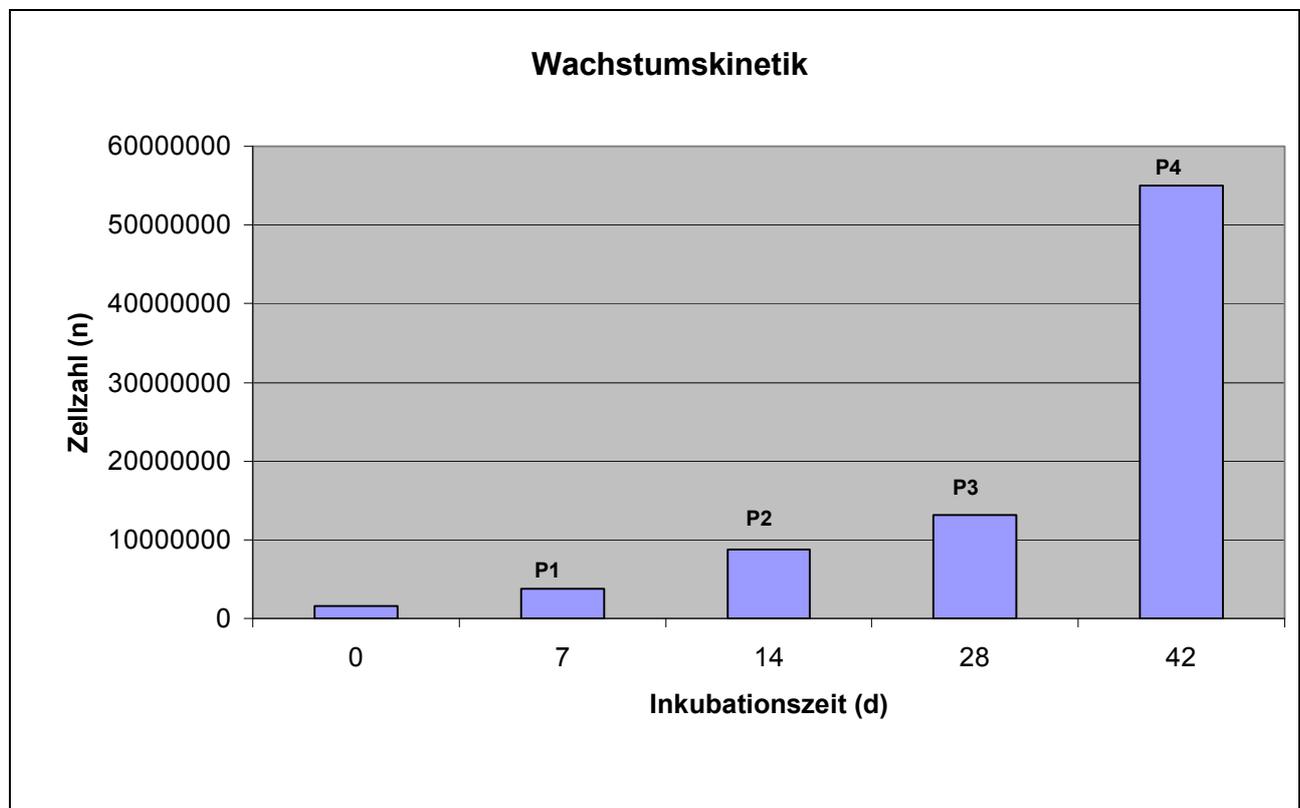


Abb. 32: Darstellung der Wachstumskinetik der mesenchymalen Stammzellen

Es zeigt sich eine stete Zellvermehrung unter den genannten Kulturbedingungen innerhalb der ersten 42 Tage. Nach 7 Tagen wurden bei einer Ausgangszahl von  $1,6 \times 10^6$  Zellen bereits  $3,75 \times 10^6$  Zellen nachgewiesen, nach 14 Tagen proliferierten die Zellen auf  $8,75 \times 10^6$  Zellen, am 28. Tag auf  $13,1 \times 10^6$  Zellen und am 42. Tag der Zellkultur ließen sich in der Lichtmikroskopie  $55 \times 10^6$  Zellen nachweisen.

Dies entspricht einer Zellvermehrung von 230% innerhalb der ersten 28 Tage im Vergleich zum Ausgangswert, gefolgt von einer Wachstumsbeschleunigung bis zur 6. Woche auf 628% der ursprünglich kultivierten Zellen.

### 3.4 Implantatporosität und Hydrophilie

Die Oberflächenmorphologie der einzelnen Prüfkörper haben wir vor Inkubation mittels REM (Elektronenmikroskopie) untersucht und zuvor bereits beschrieben. Wie in Abb. 33 zeigt, wurde der bereits vom Hersteller genannte Grad der Oberflächenrauigkeit bestätigt.

Mit zunehmender Kultivierungsdauer änderten sich die Oberflächeneigenschaften aller Biomaterialien durch die Zellbesiedlung. So zeigten die zunächst glatten maschinell gefertigten Oberflächen von CoCr, TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub> und Chirurgenstahl einen Anstieg der Oberflächenrauigkeit nach Zellkultivierung, an Hand von Ra und Rz Messungen. Die stochastisch aufgeraute Oberfläche des sandgestrahlten Titanimplantates verliert durch die Zellkultivierung an Rauigkeit. So vermindert sich Ra von 4,05µm vor der Zellkultivierung auf 2,66µm nach der Zellkultivierung, ebenso verhält sich des Rz. Die Oberfläche des sandgestrahlten Tivaniums zeigt bei initialem Rz von 24,04 µm nach der Zellkultivierung lediglich einen Rz von 18,16µm.

Die Untersuchung des Kontaktwinkels (CA) erbringt beim sandgestrahlten und glatten TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub> nahezu gleiche Hydrophilie (gemittelter CA: 66° zu 67°). Bei den glatten Oberflächen des CoCr und TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub> führt die Zellkultivierung zu einem verminderten CA und damit verbunden zu einem Anstieg der Hydrophilie.

Im Gegensatz dazu finden wir nach Beimpfung des sandgestrahlten TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub> Implantates einen diskreten Anstieg des CA von 67° auf 68° und folglich Abfall der Hydrophilie.

Da der zur Messung des CA erforderliche Wassertropfen unmittelbar und vollständig von der Porocoat<sup>TM</sup>- Oberfläche absorbiert wird, ist eine Bestimmung des CA bei den Porocoat<sup>TM</sup>-Prüfkörper nicht möglich.

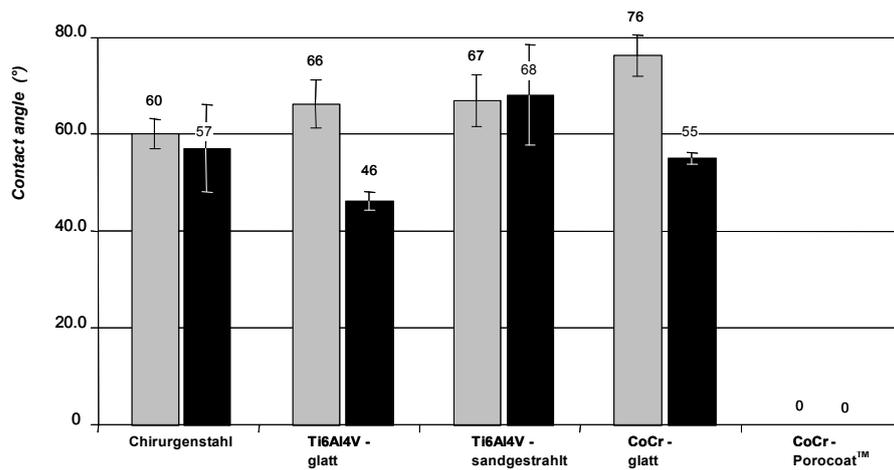
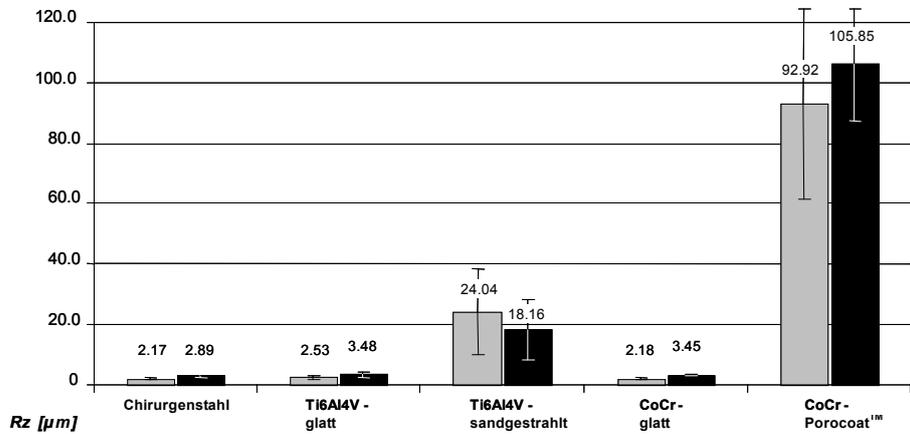
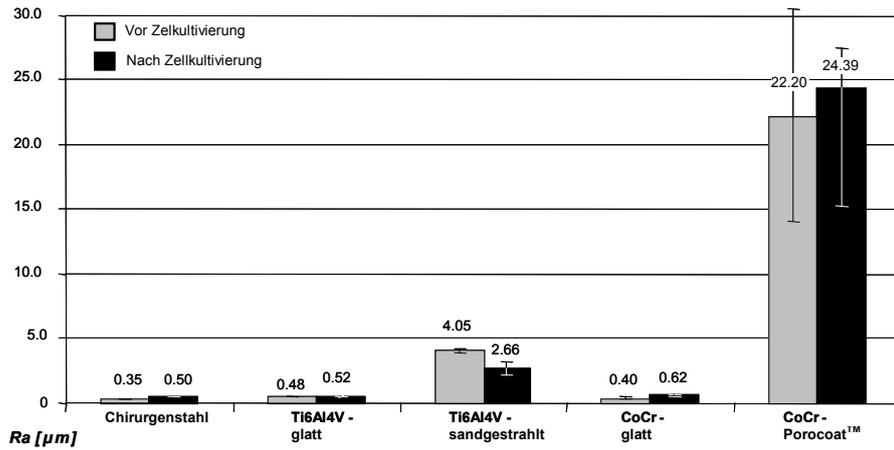


Abb. 34: Graphische Darstellung der Oberflächeneigenschaften der einzelnen Prüfkörper vor und nach Zellkultivierung an Hand der Parameter Ra, Rz und CA (JÄGER, URSELMANN 2007)

### 3.5 Molekularbiologische Untersuchung der Genexpression (mRNA) mittels RT-PCR (qRT-PCR)

Zur molekularbiologischen Untersuchung der zellulären Genexpression (mRNA) in Abhängigkeit von den einzelnen Prüfkörpern wird, in Ergänzung zur immunhistochemischen Analyse der Antigenexpression die RT-PCR (reverse Transkriptase-PCR) herangezogen.

Es werden Osteopontin, Osteocalcin, Kollagen 1 und alkalische Phosphatase (ALP) als osteoblasten-spezifische Marker, sowie TRAP und RANKL als indirekte Indikatoren für eine Osteoklastenaktivierung verwendet.

In der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese wird DNA der Größe nach im elektrischen Feld aufgetrennt. Es dient zur Analyse der PCR-Reaktion. Die quantitative mRNA Bestimmung erfolgt mittels Real Time PCR (qRT-PCR).

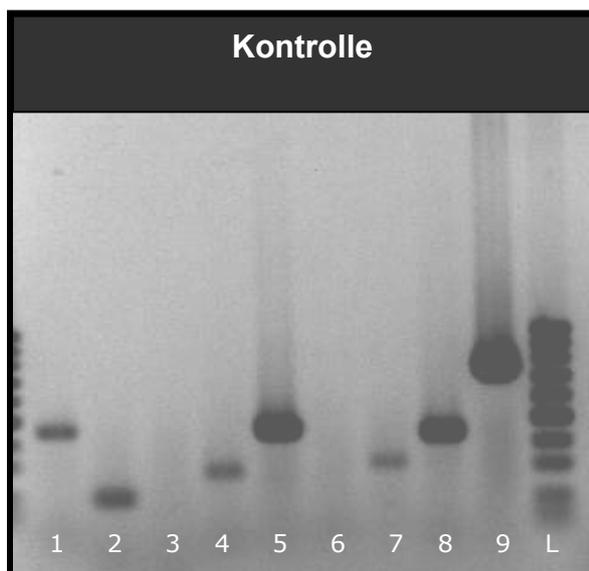


Abb. 35: Genexpression: Kontrolle

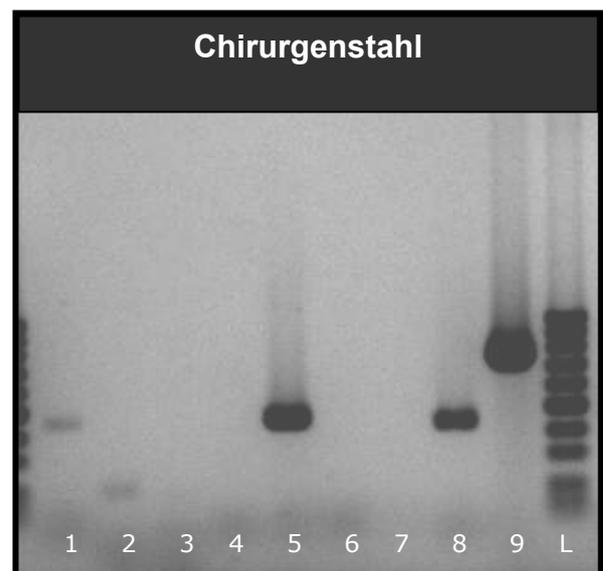


Abb. 36: Genexpression: Chirurgienstahl

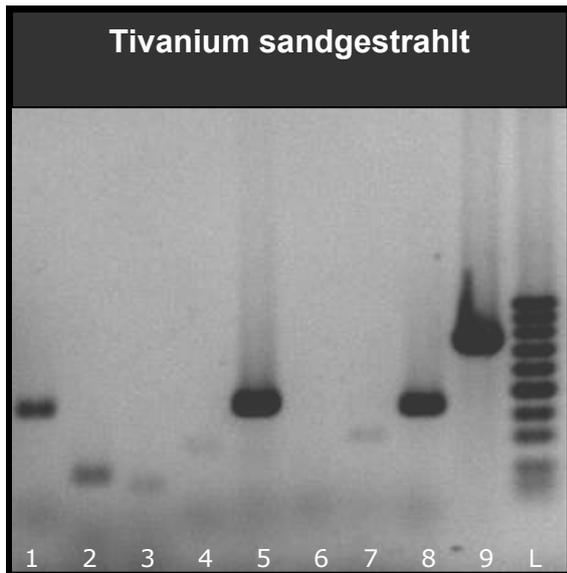


Abb. 37: Genexpression: Tivanium sandgestrahlt

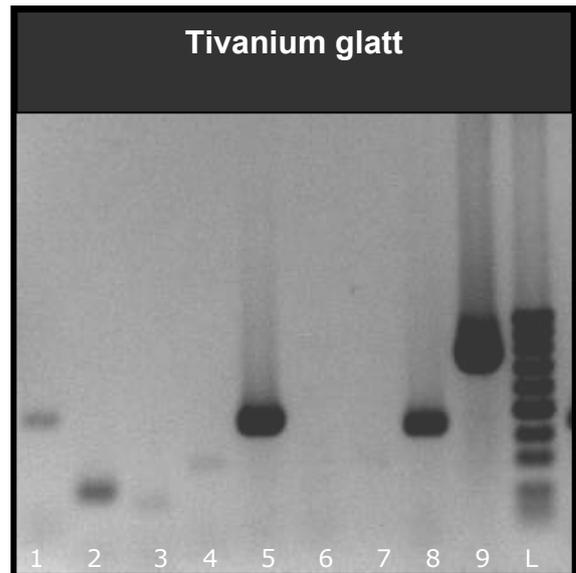


Abb. 38: Genexpression: Tivanium glatt

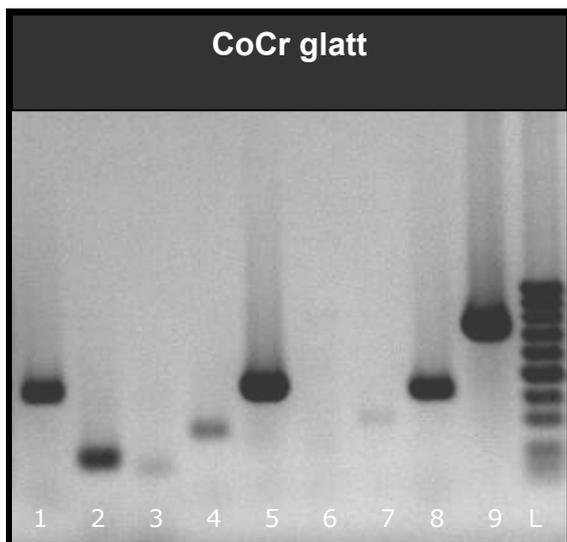


Abb. 39: Genexpression CoCr glatt

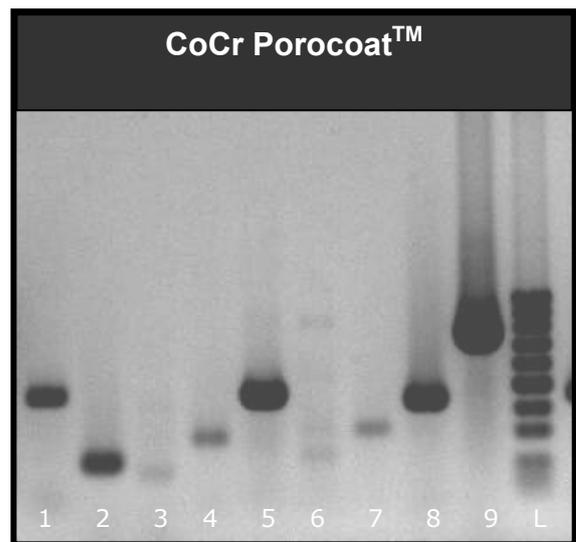


Abb. 40: Genexpression CoCr Porocoat™

**Legende:**

Osteopontin (1), Osteocalcin (2), RANKL (3), TRAP (4), Kollagen I (5),  
Kollagen 2 (6), BSP (7), ALP (8), Glyceraldehy-3-phosphat-dehydrogenase  
(GAPDH) (9)

Auf molekularbiologischer Ebene lassen sich qualitativ keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression der unterschiedlichen Prüfkörper registrieren. Dies schließt neben den osteoblasten-typischen Markern auch die Genexpression für den Osteoklastenaktivator RANKL mit ein, dessen mRNA auf keinem der geprüften Oberflächenmaterialien in erhöhter Menge gemessen wurde.

### 3.5.1 Zelluläre Syntheseleistung (mRNA-Menge)

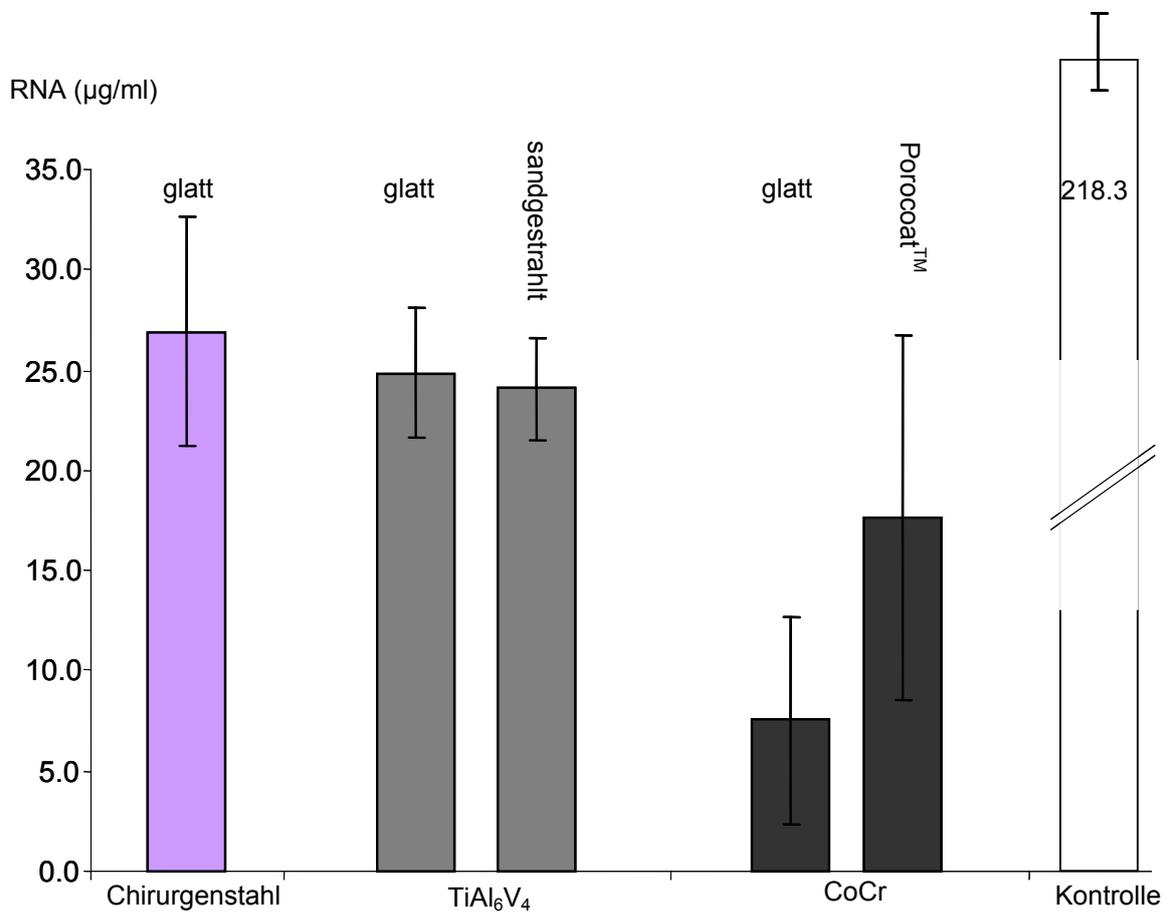


Abb. 41: RNA Expression der adhärennten Zellen in Abhängigkeit vom Implantatmaterial

Abbildung 41 stellt die quantitative RNA Expression der auf den einzelnen Implantatmaterialien adhärenen Zellen in ml Zellsuspension dar.

Chirurgenstahl und TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub> weisen die höchste RNA Expression auf. Es zeigt sich jedoch beim Tivanium kein signifikanter Unterschied zwischen den glatten und den sandgestrahlten Prüfkörpern. Vergleicht man hingegen die CoCr-Implantate untereinander so führt die Porocoat™ Beschichtung im Vergleich zur glatten Oberfläche zur einer deutlich verstärkten RNA -Expression ( $p < 0,05$ ).

Zur statistischen Auswertung und Bestimmung der Signifikanz wurde jeweils der Student-T-Test angewendet.

### **3.6 Immunhistochemische Untersuchung der periimplantären Antigenexpression**

Zur weiteren ergänzenden Beurteilung der Zytokompatibilität, osteogene Potenz und spezifische Syntheseleistung der kultivierten Zellen auf den unterschiedlichen Untersuchungsoberflächen werden immunzytochemische Techniken angewandt.

Hierbei wird sowohl die Antigenexpression der periimplantären Region innerhalb der Kulturschale (Well) nach dem Entfernen der Prüfkörper evaluiert, als auch die auf den Biowerkstoffen adhärenen Zellen untersucht. Zur Darstellung der periimplantären Population wird mittels Durchlichttechnik mikroskopiert, die Beurteilung des implantären Zellwachstums benötigt hingegen die Auflichtmikroskopie mit zusätzlichen Färbung durch Immunfluoreszenzantikörper.

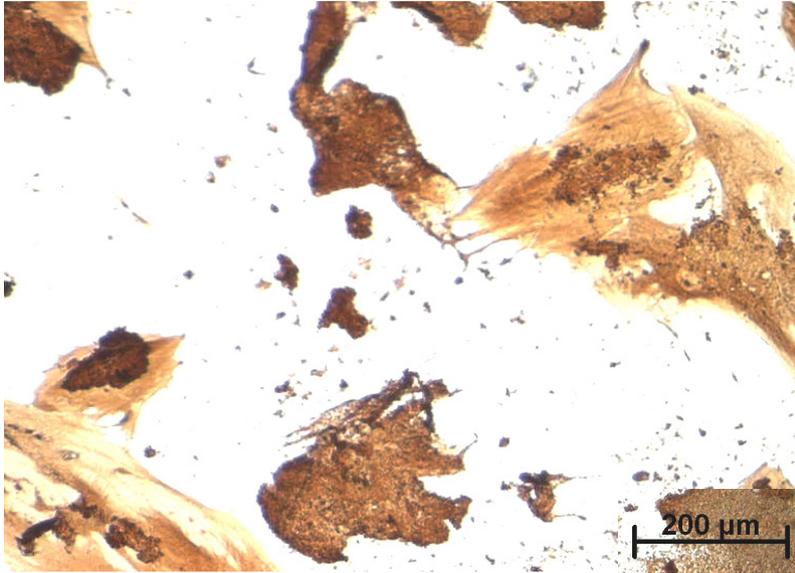
Es werden spezifische Antikörper gegen Alkalische Phosphatase (ALP), Osteopontin (OP), Kollagen 1 (Col-1) und RANKL verwendet, da diese Markerproteine von besonderem Interesse zur Erfassung einer osteoblastären Differenzierung sind.

Eine erhöhte Expression von ALP, Osteopontin und Kollagen 1 wird folglich als Osteoblastenaktivierung/ und -differenzierung und daher als guter Kompatibilitätsfaktor interpretiert.

Im Gegensatz zu ALP, Kollagen 1 und Osteopontin ist zellulär gebundenes RANKL hingegen ein potenter Osteoklasten-Aktivator und wird folglich mit aseptischen Implantatlockerung in Zusammenhang gebracht, wie zahlreiche Studien bereits belegen konnten (BOYCE 2007, BOYLE 2003, CROTTI 2004, HAYNES 2001, HOLDING 2006, CLOHISY 2003).

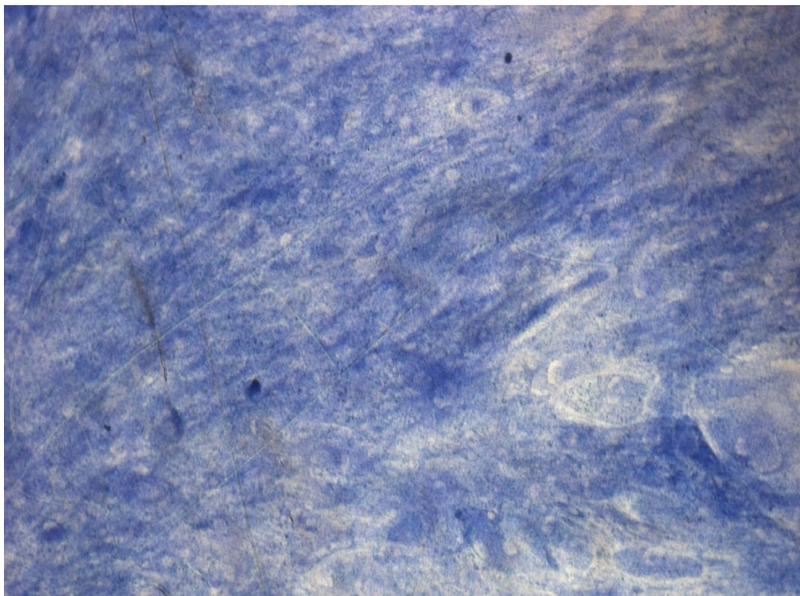
Im Folgenden werden beispielhaft und quantitativ die Expression definierter Antigenen durch immunzytochemischen Färbungen für die verschiedenen Biomaterialien dargestellt.

### 3.6.1 Chirurgischer Stahl periimplantär



Vereinzelte OP-  
exprimierende Zellen  
(braun)

*Abb. 42: Immunhistochemische Doppelfärbung für OP (braun) und ALP (blau) auf chirurgischem Stahl*



Keine Col-1-  
positive Zellen (rot)

Starke Expression  
von RANKL-positiven  
Zellen (blau)

*Abb. 43: Immunhistochemische Doppelfärbung für Col-1 (rot) und RANKL (blau) auf chirurgischem Stahl*

Zur Quantifizierung der Antigenexpression wurden die eingefärbten antigensynthetisierenden Zellen unter dem Mikroskop optisch ausgezählt. Hierfür erfolgte die Auszählungen jeweils dreier Kulturschalen für jeden Antikörper. Die arithmetischen Mittel der Zellanzahl für die jeweiligen Antikörper sind in Abb. 44 dargestellt.

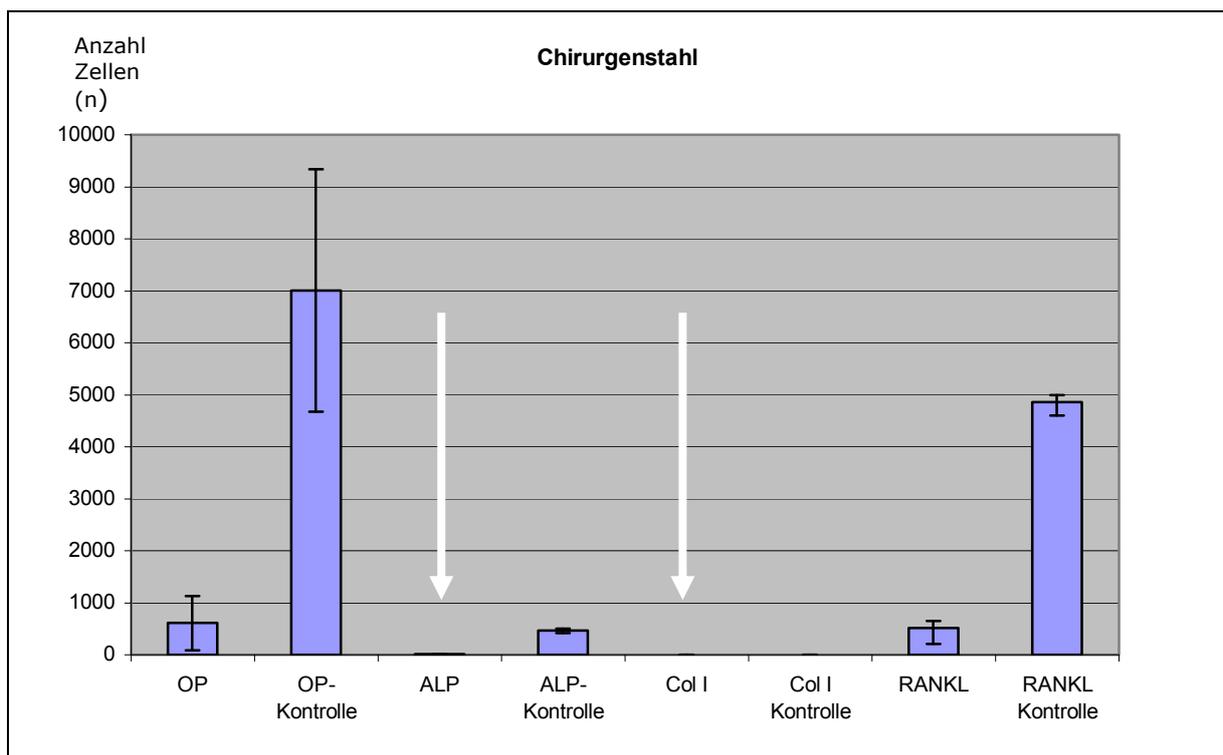
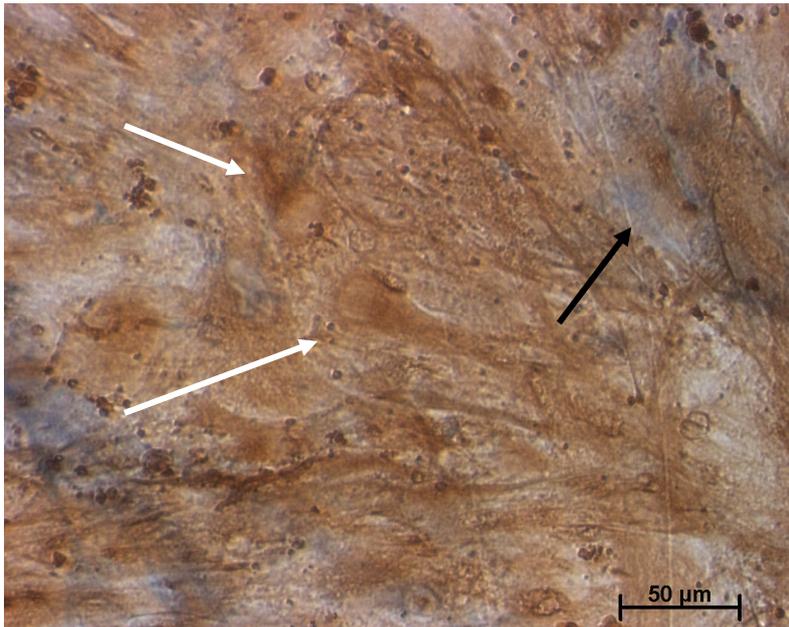


Abb. 44: Anzahl der antigenexprimierenden Zellen auf chirurgischem Stahl periimplantär

Betrachtet man die unterschiedliche Antigenexpressionen auf dem Prüfkörper Chirurgenstahl, so fällt eine fehlende Kollagen-1-Expression auf. Demgegenüber bleibt die RANKL-Expression mit einem Mittelwert von 463 positiven Zellen vergleichsweise niedrig. Zudem findet sich eine sehr niedrige ALP-Expression (8 ALP-positive Zellen im Durchschnitt).

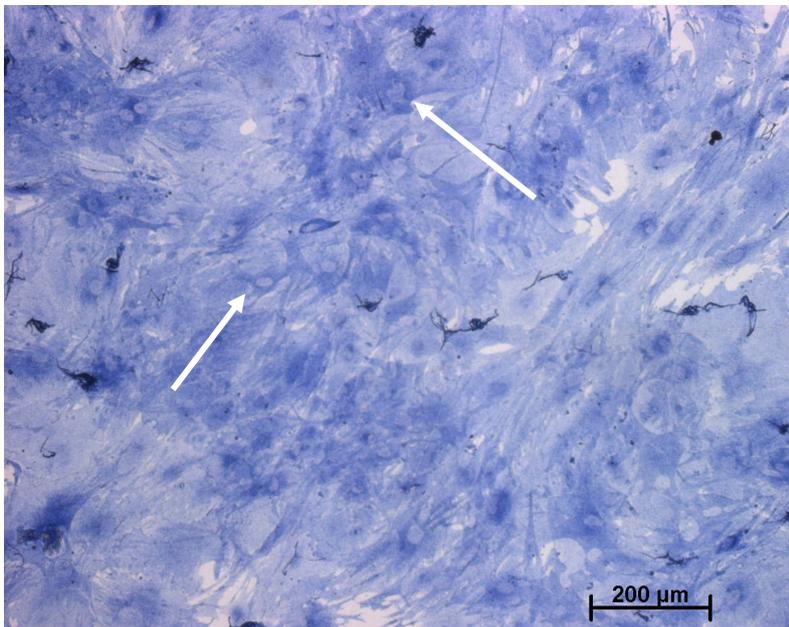
### 3.6.2 TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub> (Titanium) glatt periimplantär



Vielzahl an braunen Zellen (OP+) (weiße Pfeile)

vereinzelt blaue Zellen mit diffuser Zytoplasmadarstellung (ALP+) (schwarzer Pfeil)

Abb. 45: Immunhistochemische Doppelfärbung für OP (braun) und ALP (blau) auf Titanium glatt



ausschließlich blau eingefärbte Zellen mit RANKL-Expression, diese sind deutlich von einander abzugrenzen und kommunizieren über lange Zellausläufer

keine roten Zellen (Col-1+)

Abb. 46: Immunhistochemische Doppelfärbung für Col-1 (rot) und RANKL (blau) auf Titanium glatt

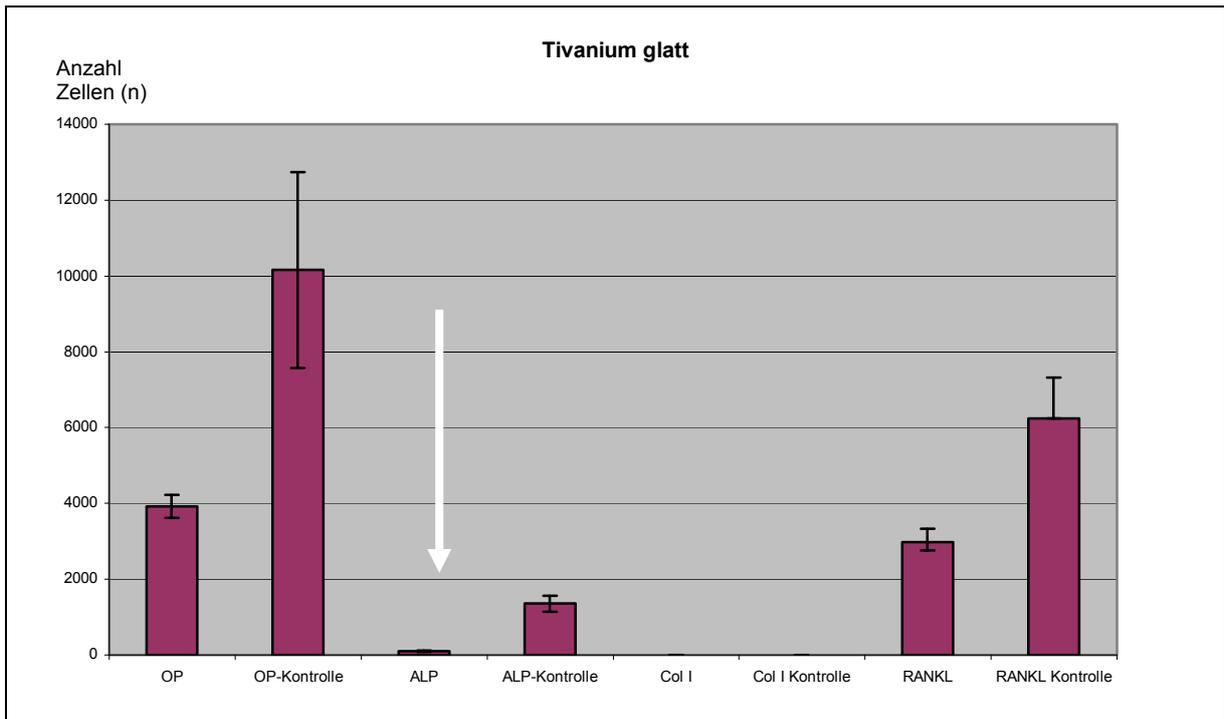
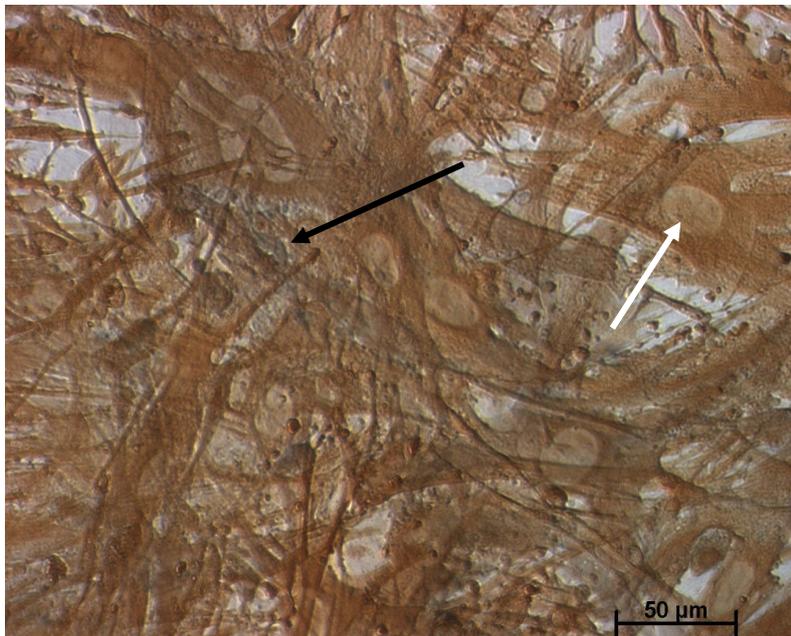


Abb. 47: Anzahl der antigenexprimierenden Zellen auf Titanium glatt periimplantär

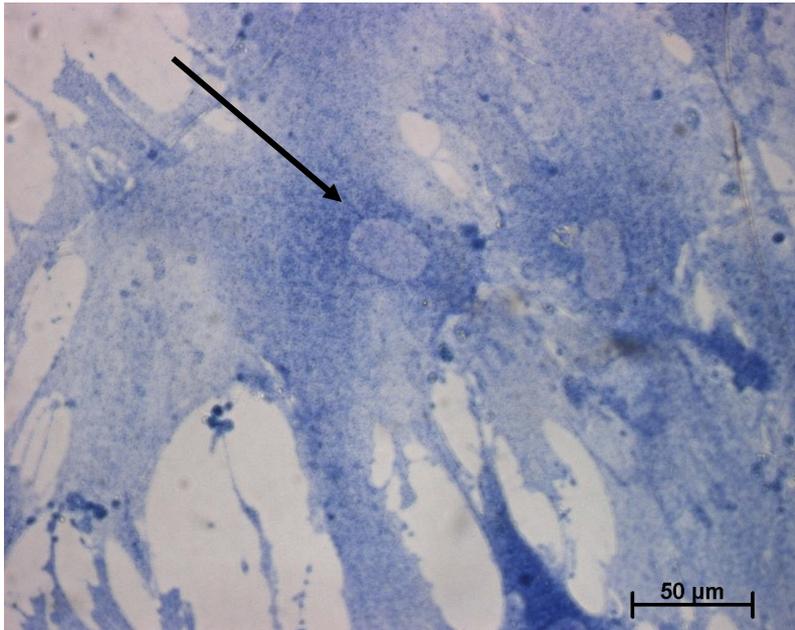
### 3.6.3 TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub> (Titanium) sandgestrahlt periimplantär



Hohe Zelldichte  
brauner Zellen mit  
großen Zellkernen  
(OP+) (weißer Pfeil)

Blaue Zellen  
erscheinen vereinzelt  
ubiquitär verteilt  
(ALP+) (schwarzer  
Pfeil)

Abb. 48: Immunhistochemische Doppelfärbung für OP (braun) und ALP (blau) auf Titanium sandgestrahlt



Klar erkennbare  
blaue Zellen mit  
großen Zellkernen  
(RANKL+)

Keine roten Zellen  
(Col-1+)

Abb. 49: Immunhistochemische Doppelfärbung für Col-1(rot) und RANKL (blau) auf Tivanium sandgestrahlt

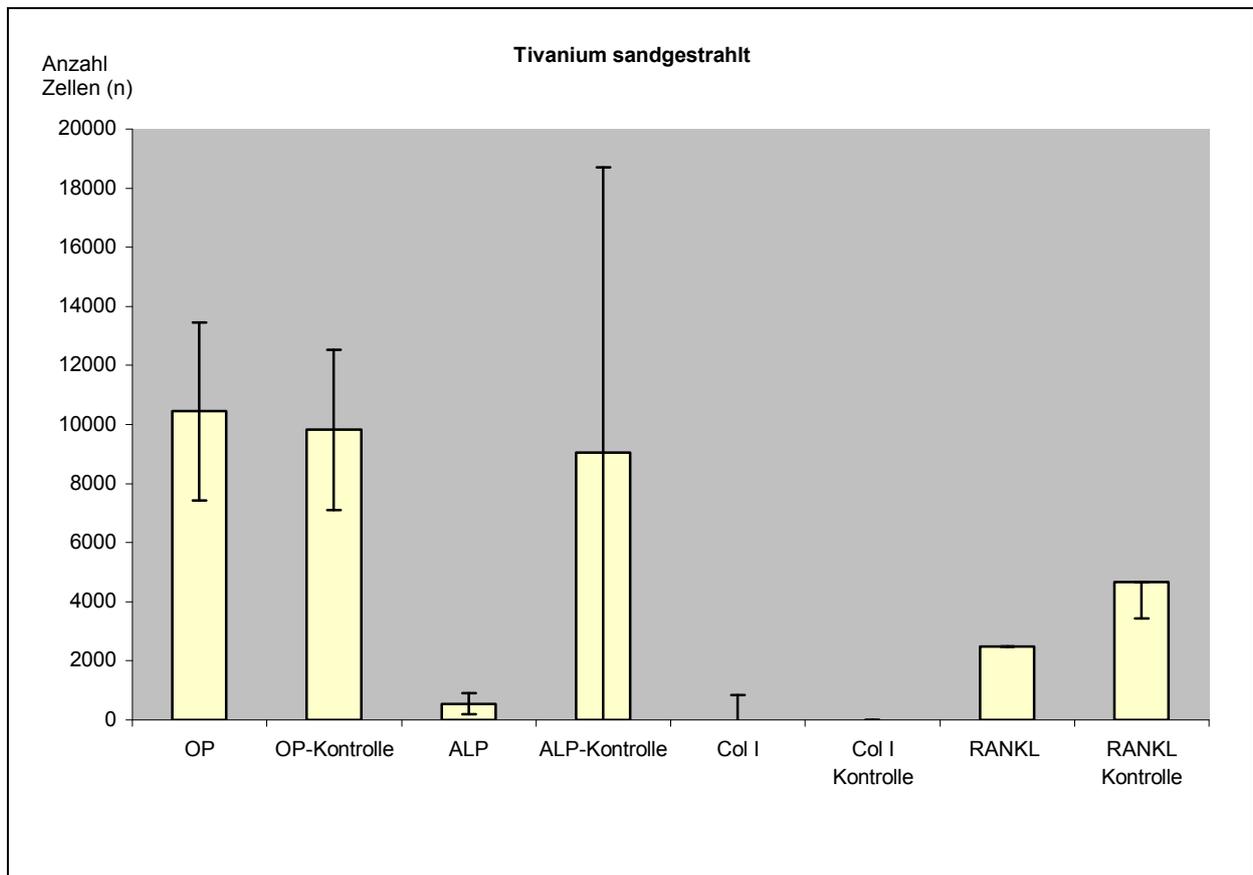
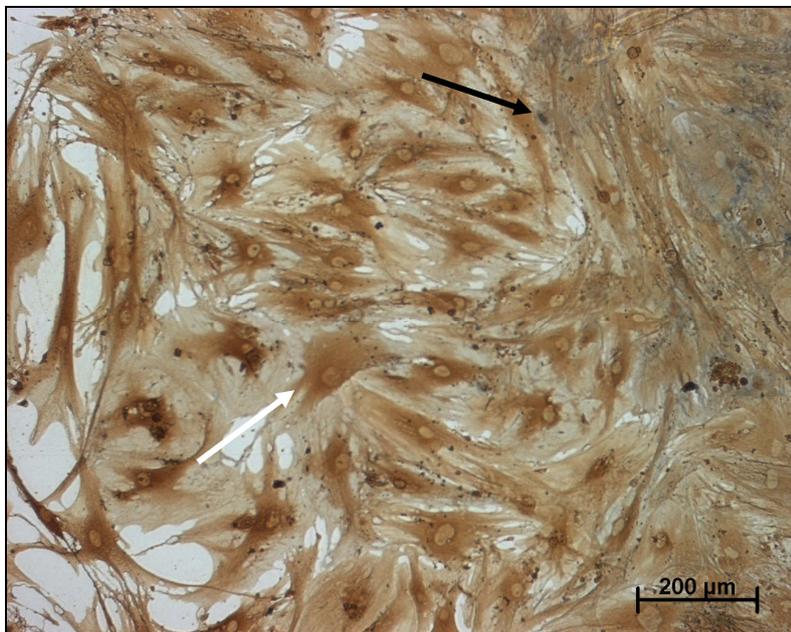


Abb. 50: Anzahl der antigenexprimierenden Zellen auf Tivanium sandgestrahlt periimplantär

Im Vergleich zum glatten Titanium findet sich periimplantär beim sandgestrahlten Titanium eine mehr als doppelt so hohe Osteopontin-Expression. Zudem sehen wir, dass die Osteopontinsekretion auf dem Prüfmaterial die Sekretion ohne Prüfkörper (Negativkontrolle) übersteigt.

Wie bei Chirurgenstahl und glattem Titanium kann auch beim sandgestrahlten Titanium keine stärkere Kollagen-1-Expression dokumentiert werden.

### 3.6.4 CoCr (Orthochrom™) glatt periimplantär



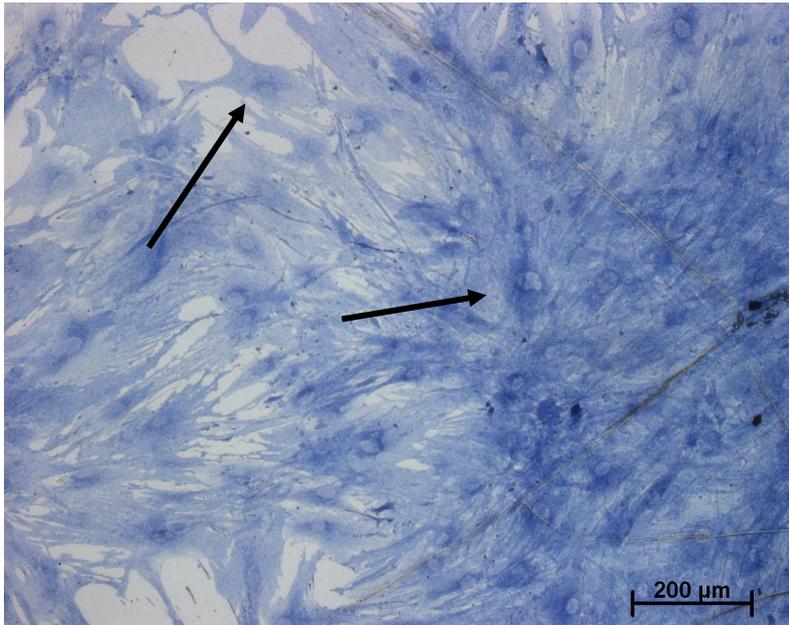
Viele deutlich erkennbare braune Zellen (OP+) mit großen Zellkernen (weißer Pfeil)

Ebenfalls ALP-positive Zellen (blau)

Abb. 51: Immunhistochemische Doppelfärbung für OP (braun) und ALP (blau) auf CoCr glatt

Polierte CoCr-Prüfkörper zeigen mit durchschnittlich 5059 Zellen pro Kulturschale eine starke Expression von Osteopontin. Diese liegt damit aber nur etwas halb so hoch wie bei sandgestrahltem Titanmaterial (10452 Zellen/ Kulturschale).

Die RANKL-Expression übersteigt mit 4450 Zellen pro Kulturschale beim CoCr alle anderen Prüfkörper.



Hohe Zelldichte  
RANKL-positiver  
Zellen mit großen  
Zellkernen

Keine Col-1-  
Expression

Abb. 52: Immunhistochemische Doppelfärbung für Col-1 (rot) und RANKL (blau) auf CoCr glatt

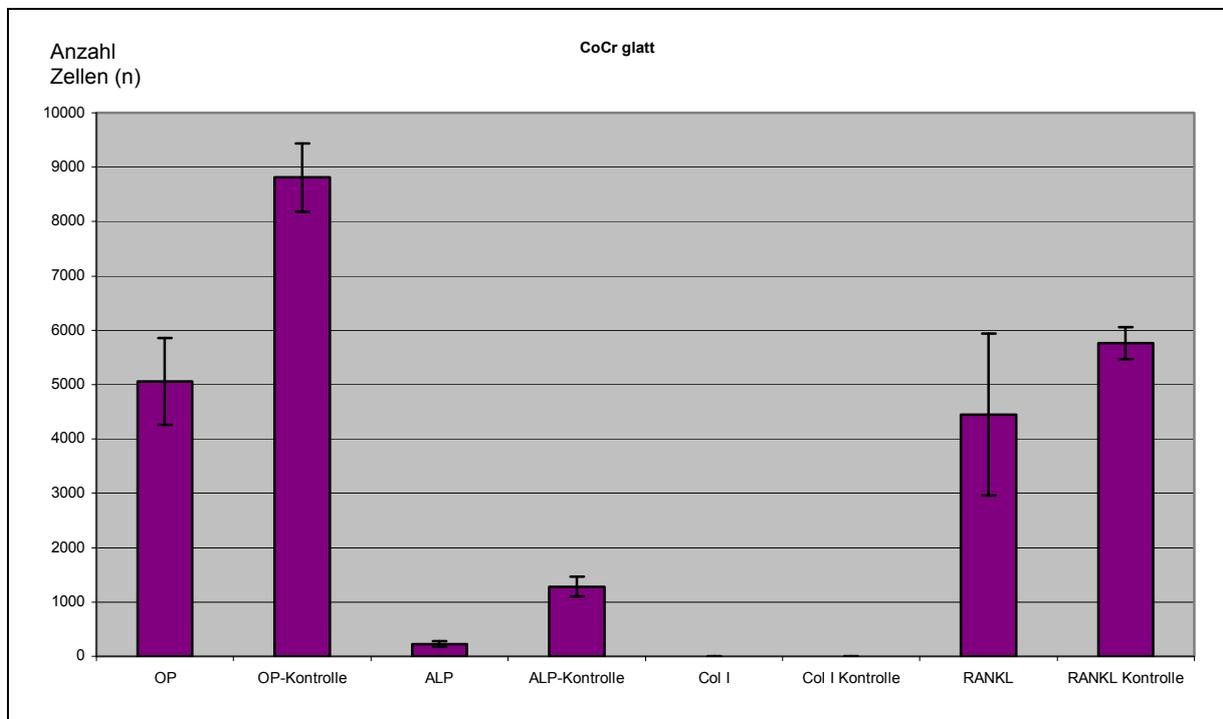
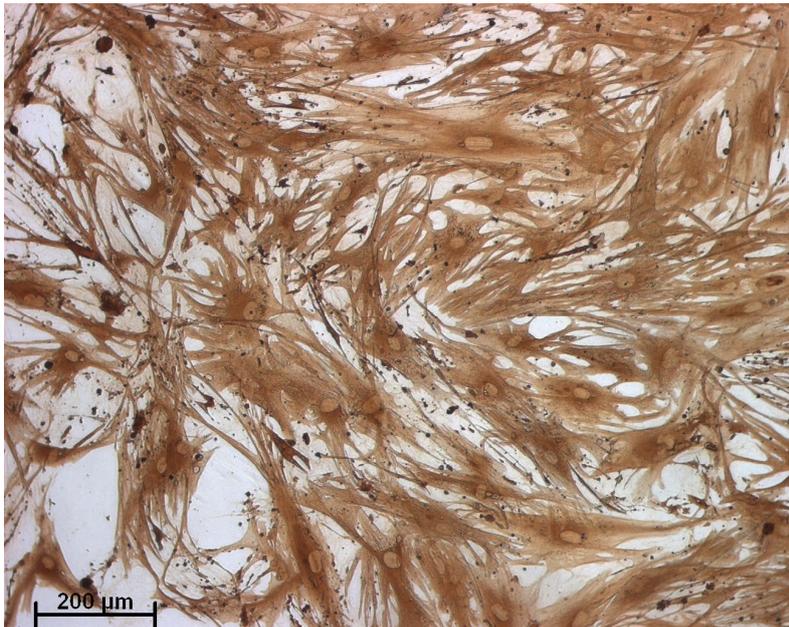


Abb. 53: Anzahl der antigenexprimierenden Zellen auf CoCr glatt periimplantär

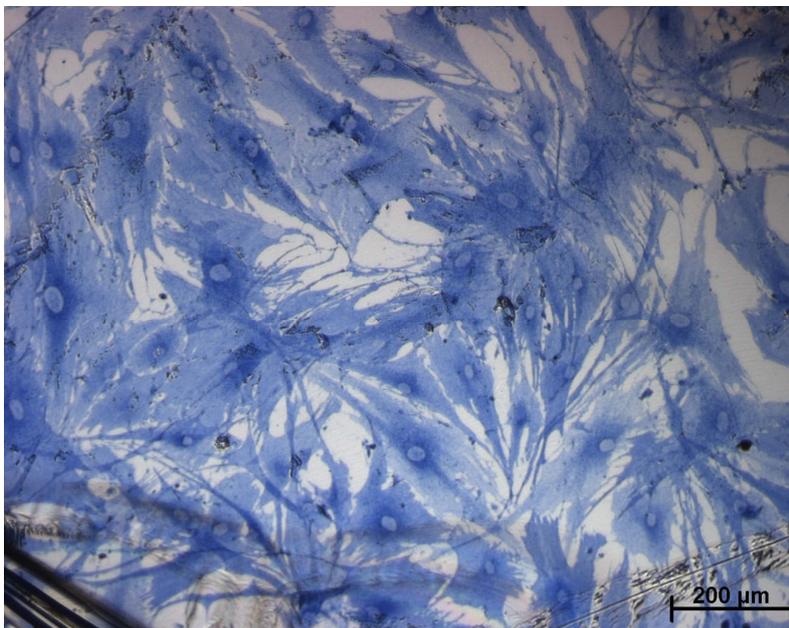
### 3.6.5 CoCr mit Porocoat™ Beschichtung periimplantär



Zahlreiche braune Zellen (OP+), über langen Zytoplasmaausläufer in Kontakt stehend, große Zellkerne

Kein Nachweis von ALP-positiven Zellen (blau)

Abb. 54: Immunhistochemische Doppelfärbung für OP (braun) und ALP (blau) auf CoCr mit Porocoat™



Nachweis von zahlreichen RANKL-positiven Zellen mit großen Zellkernen

Kein Nachweis von Col-1-positiven Zellen (rot)

Abb. 55: Immunhistochemische Doppelfärbung für Col-1 (rot) und RANKL (blau) auf CoCr mit Porocoat™

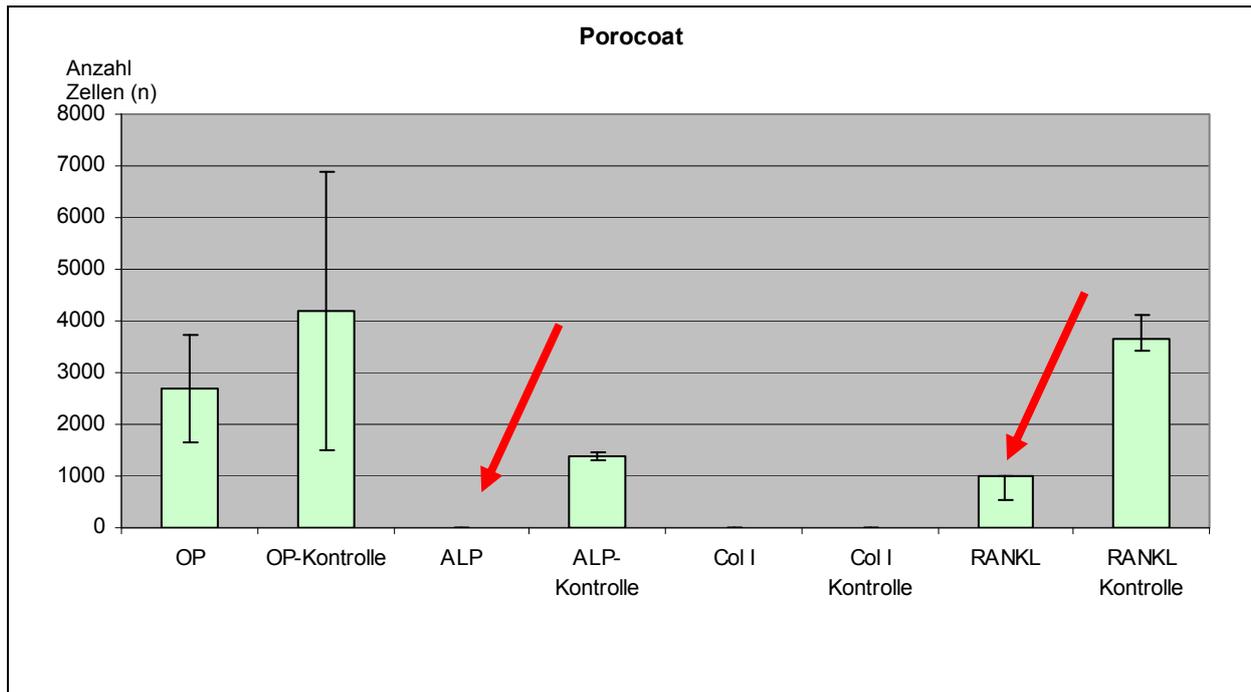


Abb. 56: Anzahl der antigenexprimierenden Zellen auf CoCr mit Porocoat™ periimplantär

Aus der Abb. 56 erkennt man, dass auch beim CoCr mit Porocoat™ Beschichtung sich im Gegensatz zu dem glatten CoCr, vergleichbar zum chirurgischen Stahl nahezu keine Sekretion von zellständiger ALP nachweisen lässt. Die RANKL-Expression ist, verglichen mit dem polierten CoCr deutlich reduziert.

### 3.6.6 Vergleich der RANKL-Expression in Abhängigkeit vom Prüfmaterial

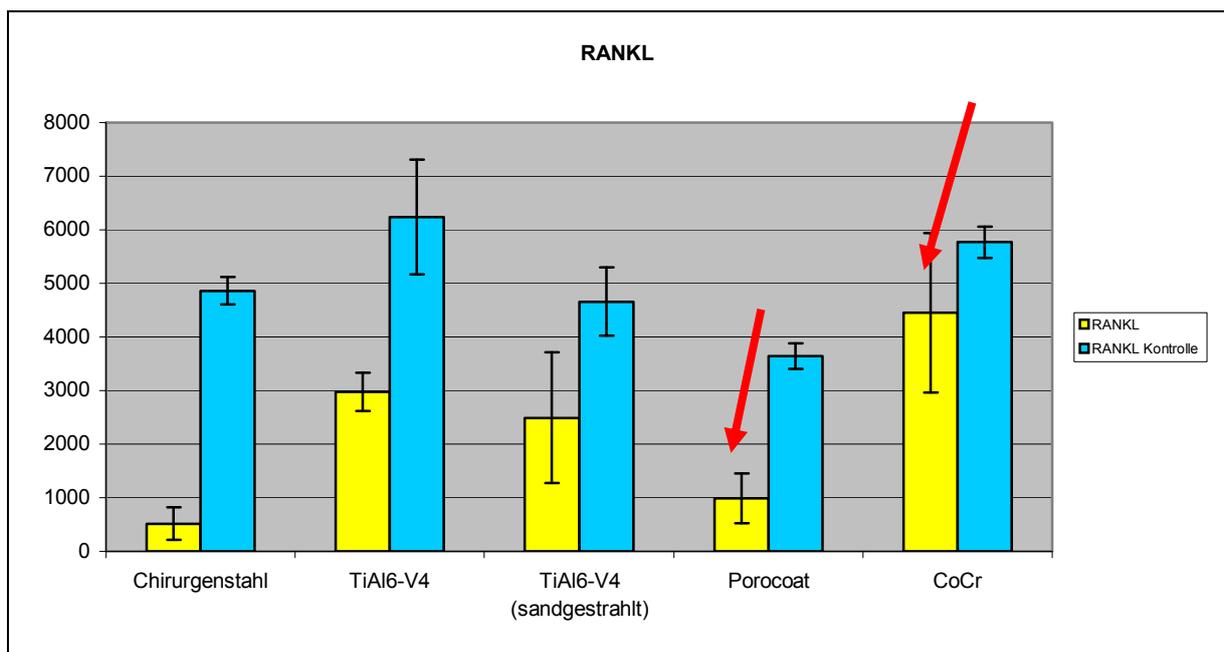


Abb. 57: RANKL-Expression in Abhängigkeit vom Prüfkörper periimplantär

Die Zusammenfassung der quantitativen Antigenexpression der Zellen, welche sich im periimplantären Bereich befinden, demnach keinen direkten Kontakt zum Prüfkörper aufweisen, zeigt deutliche Unterschiede für RANKL, OP, ALP in Abhängigkeit vom Implantatmaterial und dessen Oberflächenstruktur.

Mit durchschnittlich 4450 positiven Zellen pro Kulturschale induziert poliertes CoCr die höchste RANKL-Expression von allen untersuchten Prüfmaterialien. Chirurgischer Stahl und CoCr mit Porocoat™-Beschichtung weisen mit 515 RANKL-positiven Zellen pro Kulturschale resp. 985 Zellen pro Kulturschale den niedrigsten RANKL-Gehalt auf.

Die Porocoat™-Beschichtung führt zu einem deutlichen Abfall der RANKL-Expression der periimplantär gelegenen Zellen im Vergleich zum polierten CoCr-Prüfkörper. Eine ähnliche Tendenz findet sich ebenfalls beim Vergleich vom sandgestrahlten und polierten TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub>. Der RANKL-Abfall ist hier jedoch nicht derart deutlich.

Stellt man die unterschiedlichen Prüfkörper nach der Anzahl der sie umgebenden positiven Zellen in Reihe auf, so findet sich folgende Abfolge:

**-OP:** TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub> sandgestrahlt > CoCr glatt > TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub> glatt > CoCr Porocoat™ > Chirurgienstahl

**-ALP:** TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub> sandgestrahlt > CoCr glatt > TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub> glatt > Chirurgienstahl > CoCr Porocoat™

**-RANKL:** CoCr glatt > TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub> glatt > TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub>sandgestrahlt > CoCr Porocoat™ > Chirurgienstahl

Die größte Differenz zwischen der Antigenproduktion auf dem Untersuchungsmaterial und der Kontrolle weist hingegen der chirurgische Stahl auf. Die Antigenexpression auf diesem Metall ist um den Faktor 9,5 niedriger als in der Kontrolle. Bei den Titanpräparaten beträgt das Verhältnis Anzahl der Zellen in den Kontrollen zur Anzahl Zellen auf dem Prüfkörper Metall ca. 2:1 (poliertes TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub>: 6240 zu 2974 RANKL-positive Zellen, sandgestrahltes TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub>: 4660 zu 2493 RANKL-positive Zellen).

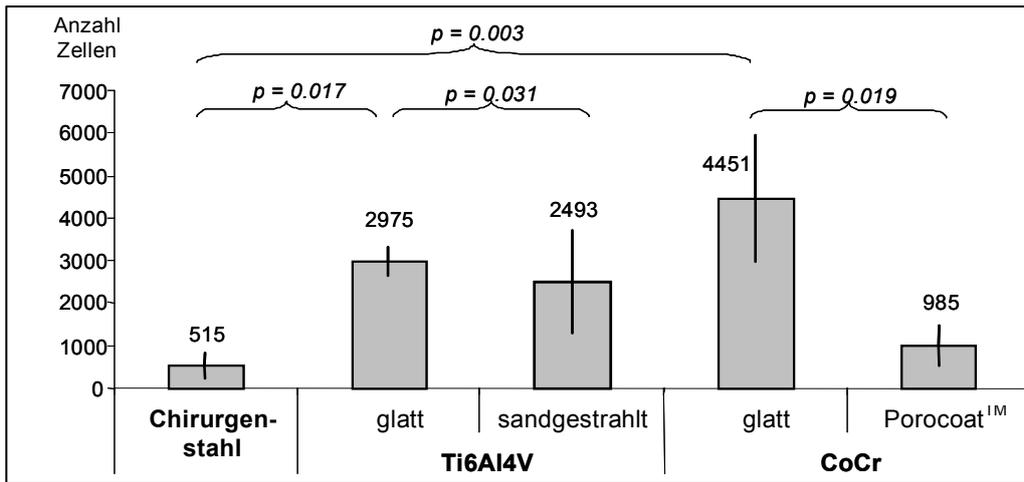


Abb. 58: Anzahl der RANKL-pos. Zellen periimplantär in Abhängigkeit der verschiedenen Prüfkörper

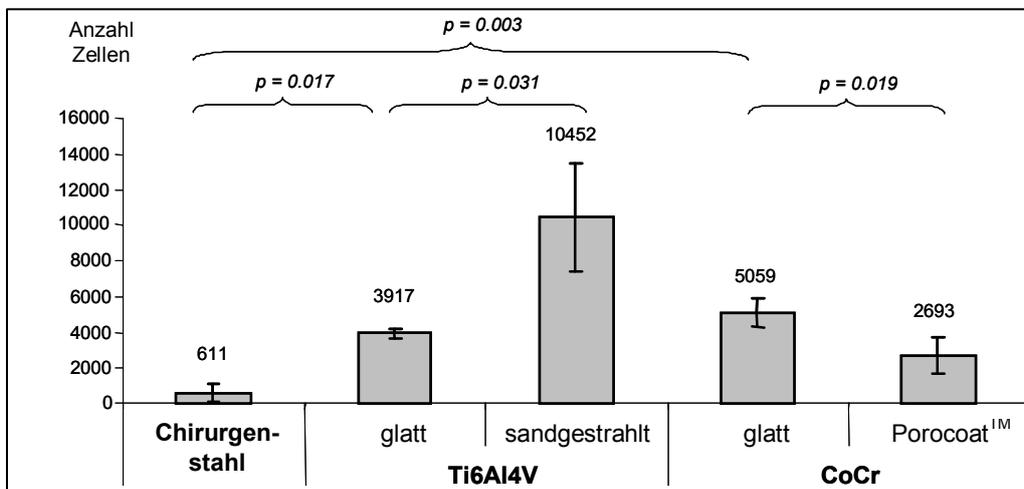


Abb. 59: Anzahl der OP-pos. Zellen periimplantär in Abhängigkeit der verschiedenen Prüfkörper

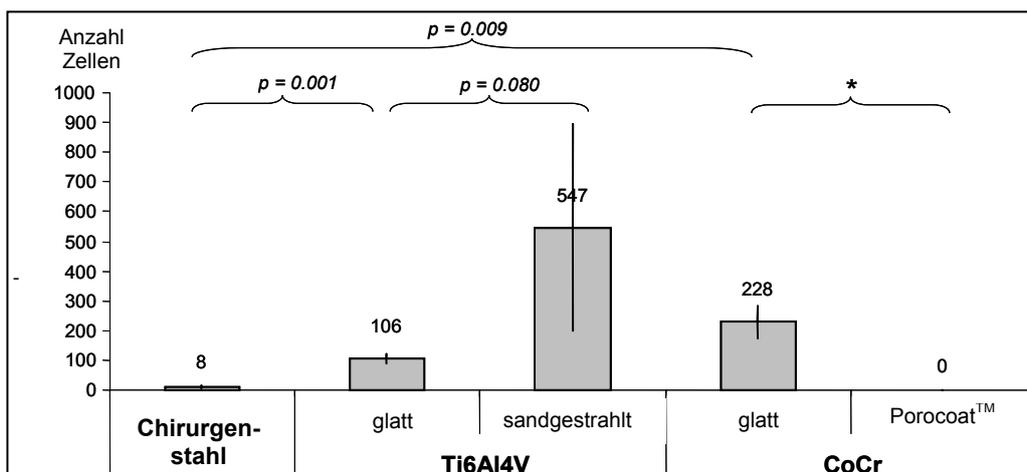


Abb. 60: Anzahl der ALP-pos. Zellen periimplantär in Abhängigkeit der verschiedenen Prüfkörper

Zusammenfassende Darstellung der quantitativen Antigenexpression an Hand der Anzahl der antigenexprimierenden Zellen auf Chirurgenstahl, TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub> und CoCr.

### 3.7 Implantäre Antigenexpression

Auf Grund des sehr dichten Zellrasens mit zum Teil in mehreren Ebenen sich überlagernde Zellenverbänden ist eine detaillierte quantitative Auswertung der für die jeweiligen Antigene positiven Zellen auf den Prüfkörpern nicht möglich.

Dennoch waren Unterschiede in der Menge der OP-, ALP-, Col-1- und RANKL-positiven Zellen in Abhängigkeit vom untersuchten Implantatmaterial semiquantitativ zu erkennen.

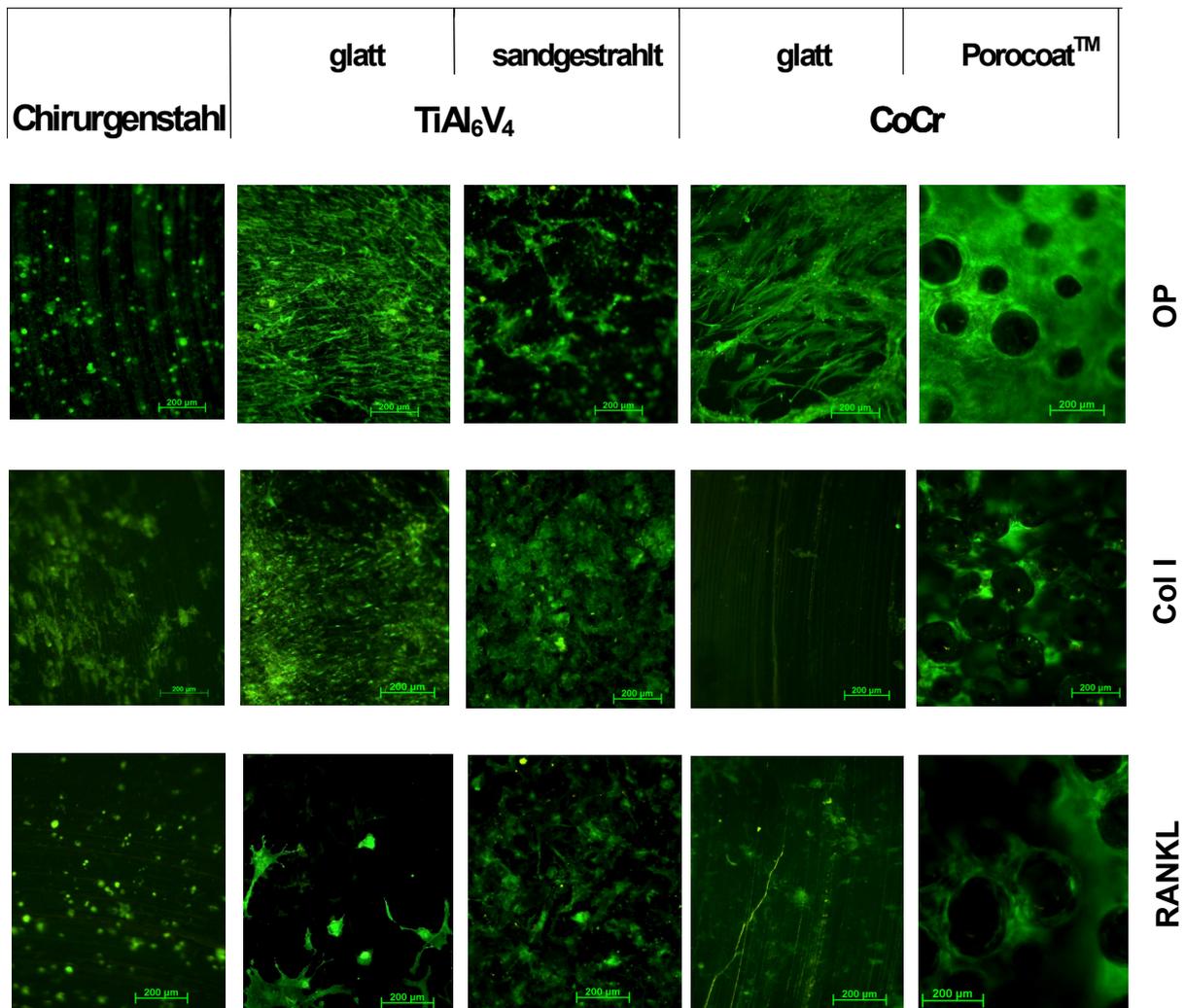


Abb. 61: Die immunhistochemische Färbung zeigt die Expression von OP, Col-1, RANKL der Zellen nach Inkubation auf den Implantatmaterialien.

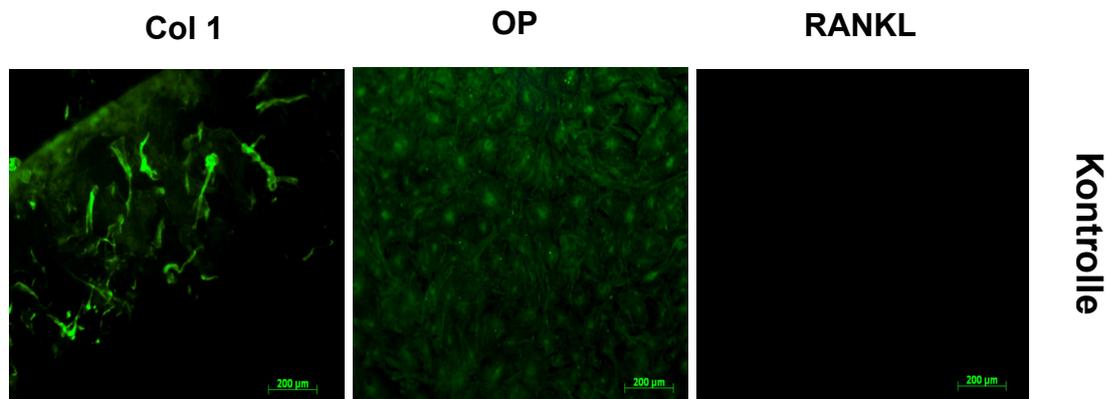


Abb. 62: Immunhistochemische Färbung der Kontrolle für Col-1, OP, RANKL

Wie immunhistochemische Färbungen zeigen, wird OP besonders kräftig auf den Titan- und CoCr-Oberflächen exprimiert, deutlich weniger von denen auf Chirurgenstahl anhaftenden Zellen. Die Porocoat<sup>TM</sup>-beschichtete Oberfläche ist vollständig mit OP-positiven Zellen bedeckt, dahingegen finden sich bei dem glatten CoCr-Material auch vereinzelt OP-freie Areale.

Die Antigenfärbung gegen Col-1 demonstriert, dass Zellen, die auf Chirurgenstahl wachsen deutlich mehr Col-1 produzieren. Zudem ist auffällig, dass die Porocoat<sup>TM</sup>-Oberfläche eine große Menge an Col-1-exprimierender Zellen induziert, das glatte CoCr jedoch nahezu vollständig frei von Col-1 erscheint.

Sowohl das glatte wie auch das sandgestrahlte TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub>-Biometall induzieren eine starke Col-1-Expression in den auf ihnen adhärenen Zellen.

RANKL positive Zellen wurden auf allen Prüfkörpern gefunden, jedoch nicht in den Kontrollen (mononukleäre Zellen ohne Prüfkörper). Im Gegensatz zur Col-1 und OP-Expression ist es jedoch nicht sicher möglich, Unterschiede in der RANKL Expression nachzuweisen.

Zum Nachweis von Mineralisationsprozessen führten wir eine *von-Kossa*-Einfärbung durch. Auf keinem Prüfkörper oder der Kontrolle konnte eine fortgeschrittene Biomineralisation gefunden werden.

## 4 Diskussion

Wir können in dieser Studie deutliche Unterschiede bzgl. des Zellwachstums, der Zellmorphologie, der Proteinexpression sowie der Oberflächeneigenschaften auf den geprüften Endoprothesenmaterialien finden. Alle verwendeten Biowerkstoffe einschließlich ihrer verschiedenen Oberflächenstrukturen entsprechen regelmäßig verwendeten Endoprothesenmaterialien.

Mit Ausnahme des Chirurgenstahls, welcher einen zellfreien Saum um das Implantatmaterial bildet, sowie morphologische Zeichen von Apoptose und Zellnekrose zeigt, zeigen alle übrigen Biomaterialien eine gute Zytokompatibilität bei einer humanen Knochenmarkzellkultur.

Die Porocoat<sup>TM</sup>-Beschichtung des CoCr zeigt im Vergleich zum polierten CoCr eine verbesserte Zelladherenz und induzierte eine verminderte RANKL-Expression in den periimplantären Zellen. Im Gegensatz hierzu findet sich in den periimplantären Zellen des polierten CoCr eine um das 4,5fach erhöhte RANKL-Expression (985 zu 4451 RANKL-positive Zellen). Auch bei den Tivaniumprüfkörpern zeigt die sandgestrahlte Oberfläche im Vergleich zur polierten Tivaniumoberfläche eine signifikant niedrigere Anzahl RANKL-positiver Zellen (2493 zu 2975 RANKL-positive periimplantäre Zellen). RANKL ist ein starker Osteoklastenaktivator, welcher sowohl in *in-vivo*- wie auch in *in-vitro*-Studien Osteolysen hervorruft und daher direkt verantwortlich für aseptische Hüft-TEP-Lockerung gemacht wird. RANKL wird von periprothetischen Fibroblasten und ebenso, jedoch signifikant niedriger auch während der osteoblastären Differenzierung aus mesenchymale Stammzellen exprimiert (GRANCHI 2006, SABOKBAR 2005). In der vorliegenden Studie findet sich entsprechend keine RANKL-Expression in der Negativkontrolle (Abb. 62). HOLDING (2006) und CLOHISY (2003/2004) fanden einen engen Zusammenhang zwischen der RANKL-Expression im periprothetische Gewebe und dem Ausmaß der Osteolyse und Polyethylenabriebpartikeln bei Patienten mit aseptischer Hüft-TEP-Lockerung. Auch CROTTI fand 2004 deutlich erhöhte RANKL-Konzentrationen im periimplantären Gewebe von Osteolysen und interpretierte RANKL als Auslöser der aseptischen Lockerung. Er beschrieb jedoch Abriebpartikel-resorbierende-Makrophagen als die Zellen mit der höchsten RANKL-Sekretion.

Zu vergleichbaren Ergebnissen gelangte bereits HAYNES drei Jahre zuvor. Die partikelinduzierte Aktivierung von Makrophagen induzieren wiederum die Aktivierung von RANK. Es kommt somit zu einer gesteigerten Bildung unreifer Osteoklasten. Durch die Bindung an RANKL wird die Differenzierung zu reifen Osteoklasten mit osteolytischer Aktivität induziert.

Die niedrige Anzahl RANKL-positiver Zellen im periimplantären Bereich des Porocoat<sup>TM</sup>-beschichteten CoCr-Prüfkörpers wird daher als Zeichen einer verminderten periimplantären Inflammation gewertet. Auch in den periimplantären Bereichen des polierten Chirurgenstahls findet sich eine niedrige Anzahl RANKL-positiver Zellen. Bei einer deutlich verminderten Gesamtzellzahl in der Aufsichtsmikroskopie und Elektronenmikroskopie wird dies jedoch als zytotoxischer Effekt des Chirurgenstahls interpretiert (WILKE 1994).

Entgegen der Ergebnisse dieser Studie fanden BRUNI und MARTINENSI (2005), GIUDICEANDREA (1998) sowie ERIKSSON (1991) heraus, dass besonders macrophage-inflammatory-protein-1, TNF- $\alpha$  und monocyte-chemoattractant-protein-1 sowie weitere Mitglieder der Interleukin- und Leukotrin-Familie und weniger RANKL eine entscheidende Rolle an der zellgebundenen Entzündungsreaktion bei Kontakt mit festen Biometallen spielen.

#### 4.1 Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit auf die Biokompatibilität

Mit den gewonnenen Daten der vorliegenden Studie sollen, neben dem Einfluss der unterschiedlichen Biomaterialien als solche, auch Aussagen über den Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit gemacht werden. Wir verwenden daher Materialien, welche sich sowohl in der physiko-chemischen Zusammensetzung (verschiedene Legierungen) als auch in der Oberflächentopographie unterscheiden. Insbesondere differiert die Oberflächenrauheit der verschiedenen Biowerkstoffe (chirurgischer Stahl mit einer Rauheit von 1,4µm bis hin zur CoCr-Legierung mit der speziellen Porocoat<sup>TM</sup>-Beschichtung und einer Porengröße von 250µm).

Die vorliegenden *in-vitro*-Ergebnisse bestätigen die bereits bekannte gute *in-vivo*-Biokompatibilität und Osteokonduktivität von Titanmaterialien, besonders mit porösen Oberflächen. MÜLLER (2006) demonstrierte die Fähigkeit der Osteoblasten in einen grob poröse Titankörper (Schwamm) einzuwachsen, LI (2006) dokumentierte ein gutes Anhaften und Ausbreiten von MC3T3-E1-Zellen auf der Oberfläche eines hoch porösen trabekelartigen Tivanium-Implantates. Die vorliegenden Daten bestätigen dieses bezogen auf die untersuchte Porocoat<sup>TM</sup>-Oberfläche des CoCr, dokumentiert mittels REM.

HATTARI zeigte bereits 1988 an Hand seiner *in vitro*-Ergebnissen an Endothelzellen, Fibroblasten und anderen Zellreihen, dass die Porosität von unterschiedlichen Biomaterialien wie z.B. Titan oder PMMA die Zelladhäsion, -migration und –differenzierung deutlich beeinflusst und die freie Oberflächenenergie das Verhalten gegenüber Flüssigkeiten im Sinne von Hydrophilie und Hydrophobie verändert. So ist zum Beispiel die Oberflächeneigenschaft von Titan-Implantaten in der orthopädischen Chirurgie entscheidend für den Grad der Osteoblastendifferenzierung, die Produktion von extrazellulärer Matrix und dem Ausmaß der Osteoblastenproliferation (KOKONEN 1992). Auch in der vorgelegten Studie finden sich deutliche Unterschiede in der Antigenexpression der sandgestrahlten (Tivanium) und Porocoat<sup>TM</sup>-beschichteten Oberflächen im Vergleich mit glatten Oberflächen. Jeweils führt die Oberflächenaufrauung zu signifikant erniedrigten RANKL-Expressionen.

LOWENBERG konnte 1992 an Hand von Gingivafibroblasten eine gute Biokompatibilität mit hoher Zelladhäsion zur untersuchten Titan-Aluminium-Vanadium-Legierung präsentieren. Er zeigte zudem, dass auch die

Oberflächenbeschaffenheit des Prüfkörpers Einfluss auf die Adhäsionsraten der Zellen hat. So adhärten auf glattpolierten Oberflächen deutlich mehr Zellen als auf dem gleichen Material mit aufgerauter Oberfläche (4- 6µm). Ergänzend hierzu konnte REFAI auf aufgerauten Titanoberflächen eine deutlich erhöhte proinflammatorische Zytokin-Expression nachweisen (2004).

Eine starke Abhängigkeit der Zellproliferation von der Art der Oberflächenbeschaffenheit eines Biowerkstoffes postulierten GOLDRING und HARMAND bereits in ihren Studien 1990. Während auf glatt polierten Oberflächen einer Kobalt-Chrom-Molybdän-Legierung ein gutes Zellwachstum, sowie eine Produktion von Kollagen und extrazellulärer Matrix beobachtet wurde, zeigte sich auf demselben Material bei aufgerauter Oberfläche kein Wachstum der verwendeten humanen Fibroblasten und humanen Osteoblasten. Als Begründung führte HARMAND die geringere Korrosionsbeständigkeit und daher größere Toxizität der oberflächenbehandelten und aufgerauten Prüfkörper an.

Zu nahezu den gleichen Ergebnissen kamen die Arbeitsgruppen um NOVAK 1991 und NAJI 1990. Sie testeten humane Osteoblasten aus dem Kieferbereich und Gingivafibroblasten. Die verwendeten rauen Oberflächen zeigten ebenso ein reduziertes Zellwachstum, verminderte Aktivität der ALP und morphologische Zeichen der Zellschädigung, wohingegen die glatten Oberflächen des selben Prüfmaterials eine gute Biokompatibilität aufwiesen.

Betrachtet man in der vorliegenden Studie die Anzahl ALP-sezernierender Zellen in der periimplantären Region, so zeigen sich auch hier deutliche Unterschiede zwischen den Biomaterialien. Auf sandgestrahltem Tivanium findet sich die größte Anzahl ALP-positiver Zellen, wohingegen sich beim Chirurgenstahl nur wenige und in unmittelbarer Nähe des Porocoat<sup>TM</sup>-beschichteten CoCr keine ALP-positiven Zellen entdecken lassen.

Im Gegensatz dazu fand KURODA 2002 keine signifikanten Unterschiede in der ALP-Sekretion auf sechs verschiedenen Oberflächen.

HENRICH beschreibt im gleichen Jahr eine vom Entwicklungszustand der Osteoblasten abhängige Antigenexpression. So wird ALP typischerweise von Osteoblasten in einem frühen Entwicklungsstadium exprimiert, wohingegen andere Proteine wie OP, OC und ON von reifen Osteoblasten synthetisiert und exprimiert werden.

BOYAN fand 1996 heraus, dass die Reaktionen von Zellen auf veränderte Oberflächenstrukturen und Beschaffenheiten vor allen Dingen von der Zellreife abhängt.

Ebenso sind die Kulturbedingungen (Kulturmedium, Kultivierungszeit, Anzahl der Passagen und die Verwendung von Zusätzen wie Dexamethason, Ascorbinsäure und  $\beta$ -Glycerolphosphat) während des Experimentes für das Verhalten von Osteoblasten auf unterschiedlichen Oberflächen wichtig (COEHLO 2000).

BIGERELLE betonte 2005, dass die Materialzusammensetzung und das Ausmaß der Oberflächenrauigkeit keinen signifikanten Einfluss auf die Zellproliferation hat, die Oberflächenmorphologie allerdings den größten einflussnehmenden Faktor darstellt. Nach KIM hingegen ist die Oberflächenrauigkeit und Porösität des Titanmaterial die entscheidende Größe zur Beeinflussung der Zellproliferation. Die Zellmorphologie wird nicht verändert (2004).

Die weitaus meisten Studien, welche sich mit der Oberflächenbeschaffenheit und deren Einfluss auf das Ein-/ Anwachsverhalten von Zellen beschäftigen, beschreiben mikrostrukturelle Oberflächenvariationen (CURTIS 1990, CURTIS 1997), wohingegen besonders die Nanostruktur laut DALBY 2000, WANG 2000, JÄGER 2008 und JÄGER, ZILKENS et al. 2007 von ausschlaggebender Bedeutung sei. WEBSTER fand 2000 heraus, dass im wesentlichen nanostrukturelle Bestandteile wie Zell- und Basalmembranen für die Zelladhäsion entscheidend sind und stellte somit indirekt die Ergebnis älterer Studien, welche sich primär mit der Makrostruktur von Oberflächen beschäftigten in Frage.

Die Oberflächenanalyse der unterschiedlichen Biomaterialien vor und nach Zellkultivierung zeigen, dass eine Zellbesiedlung und Proteinpräzipitation die Rauigkeit aller glatter Materialien (Chirurgenstahl, CoCr, Tivanium) verstärken. Auf der Porocoat<sup>TM</sup>-Oberfläche des CoCr wird kein nennenswerter Unterschied, auf der sandgestrahlten Oberfläche des Tivaniums sogar eine Abnahme der Rauigkeit nachgewiesen. Sowohl die Zunahme auf den glatten wie auch die Abnahme der Rauigkeit auf dem sandgestrahlten Tivanium-Körper kann durch die dichte Zellbesiedlung, in REM dargestellt, und Proteinablagerungen begründet werden (VON RECUM 1995).

Auf Grund der sehr groben Oberfläche des Porocoat™-beschichteten CoCr haben Zellrasen und Proteinablagerungen hier keinen Einfluss auf die Rauigkeit.

In seinen Zellexperimenten konnte IWASAKI 1996 zeigen, dass hydrophile Oberflächen im allgemeinen affiner für Zellen sind, jedoch eine geringere Affinität zu Proteinen als hydrophobe Materialien besitzen.

Der Kontaktwinkel (CA) wird zur Untersuchung der Hydrophilie von Biomaterialien verwendet. ZHAO (2005) konnte zeigen, dass Osteoblasten auf hydrophilen Oberflächen besser anwachsen als auf hydrophoben Oberflächen. Auch wenn in der vorliegenden Studie sowohl Tivanium, wie auch CoCr sehr gute Fähigkeiten zeigen Osteoblasten zu binden, ist es weiterhin unklar wie stark die Präzipitation und Absorption der beschriebenen Proteine auf die Osteokonduktivität der Metalle Einfluss nimmt.

Es gibt wenige wissenschaftliche Daten über die Proteinabsorption von CoCr. STOCK und Mitarbeiter verglichen 2005 Titan und CoCr Prüfkörper bezüglich ihrer Proteinabsorption und Zelladhäsion an Hand einer Osteoblastenzellreihe. Sie fanden keinen signifikanten Unterschied zwischen den genannten Materialien, wohl aber eine deutlich stärkere Zelladhäsionsrate für Titanimplantate und interpretierten dies als Ergebnis der höheren Hydrophilie des Titans.

Auch die vorliegende Studie zeigt einen kleineren Kontaktwinkel für Tivanium im Vergleich zu CoCr, korrespondierend mit der höheren Hydrophilie des Titanmaterials. Auf Grund der grobporösen Oberflächenarchitektur des Porocoat™-beschichteten CoCr war die Messung des CA nicht möglich, die verwendeten Wassertröpfchen versanken direkt in der Oberflächenstruktur des Porocoat™.

Es bedarf weiterer *in vitro*- und *in vivo*-Studien, um sicher zu zeigen, dass auch zukünftig zusätzliche Oberflächenmodifizierungen von Endoprothesenmaterialien wie RGD, HA oder Kollagenbeschichtungen das Einwachsen in den Knochen fördern, die Implantatstabilität vergrößern und die Anzahl aseptischer Lockerungen reduzieren können, um so ein optimiertes klinisches Resultat zu erzielen.

## 4.2 Einfluss des Oberflächenmaterials auf die Biokompatibilität

Metalle werden schon seit Jahrzehnten als Biomaterial in der orthopädischen Chirurgie und Traumatologie verwendet und die Tendenz und Anzahl der eingesetzten Implantate ist weiterhin steigend. Kommerziell nutzbare Produkte existieren mittlerweile in nahezu unübersehbarem Ausmaß. Trotz alledem existieren bis heute keine standardisierten Biokompatibilitätskriterien. Unter anderem auch aus diesem Grund existiert eine große Anzahl von Forschungsgruppen, welche sich mit der Biokompatibilität verschiedener Oberflächenmaterialien, besonders derer von Metallen und Kunststoffen, sowie unterschiedlicher Knochenzemente beschäftigen.

### 4.2.1 Titan

WILKE und Mitarbeiter konnten 1995 in einer Vergleichsstudie zwischen verschiedenen Titanwerkstoffen keine wesentlichen Unterschiede nachweisen. Daher wird in folge der zellbiologische Einfluss der verwendeten Titanlegierung Tivanium ( $TiAl_6V_4$ ) dem des Reintitan gleichgestellt.

Unter Verwendung tierischer Fibroblasten (Hamster, Maus und Hühnerembryonen) konnte ebenfalls eine gute Biokompatibilität von Titanwerkstoffen gezeigte werden. So beobachtete KAWAHARA (1985), sowie CRAIG 1990 an verwendeten Mausfibroblasten, KNÖFLER (1985) an Fibroblasten vom Hühnerembryo und KOTOURA (1985) sowie CANNAS (1988) an Hamsterfibroblasten durchweg ein gutes Wachstum der Fibroblasten auf den getesteten Titanoberflächen. Es wurden jeweils die Morphologie, die Proliferation und Adhäsion der Fibroblasten überprüft.

Mit humanen Osteoblasten wiederum arbeitete 1990 die Arbeitsgruppe von HARMAND. Neben Osteoblasten wurden die Reaktionen von Gingivafibroblasten auf dem Biomaterial Reintitan untersucht. Während bei den Osteoblasten eine reduzierte Proteinbiosynthese und verminderte Aktivität der ALP festgestellt werden konnte, fanden sich bei den Fibroblasten keine derartigen Veränderungen.

#### 4.2.2 Titan-Aluminium-Vanadium (TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub>/ Tivanium)

LOWENBERG konnte in seiner Studie 1991 an Hand von Gingivafibroblasten eine gute Biokompatibilität der Titanlegierung TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub> nachweisen. Auch unter direktem Kontakt mit dem Prüfkörper zeigte sich eine hohe Adhäsionsrate. Zudem fand er eine deutliche Zellaffinität zu polierten Prüfkörpern. Aufgeraute Oberflächen zeigten hingegen eine vergleichsweise schlechtere Zelladhäsion.

Ebenso keine Anzeichen für Zellschädigung fand HEHNER bei seiner Beurteilung der Zellmorphologie und des Wachstumsverhaltens von humanen Gingivaepithel- und Fibroblasten bei direktem Kontakt mit Tivanium (1989).

DORAN und Mitarbeitern untersuchten 1998 Tivanium auf seine Potenz Neoplasmen hervorzurufen. Sie konnten keine erhöhte Kanzerogenität oder Toxizität nachweisen, woraufhin sie Titanlegierungen als sehr gut verträglich, ohne erhöhtes kanzerogenes Risiko einstufen.

PULEO konnte 1993 im Rahmen seiner molekularbiologischen Untersuchung mit Hilfe der RNA-Blot-Analyse eine erhöhte Genexpression für OC, ON und OP von neonatalen Osteoblasten der Ratte nachweisen. WILKE zeigte mit seiner Studie 1992, dass auch humane Knochenmarkzellen bei direktem Kontakt mit Titan-Aluminium-Vanadium-Legierungen mit einem raschen Zellwachstum und der Produktion extrazellulärer Matrix, als Zeichen einer guten Biokompatibilität, reagieren.

Starke osteogene Eigenschaften von sandgestrahlten Titanoberflächen, wie in unserer Studie beschrieben konnten auch MUSTAFA und Mitarbeiter nachweisen. Sie fanden deutliche Vorteile für sandgestrahlte TiO<sub>2</sub> im Bezug auf die osteogene Differenzierung.

### 4.2.3 Kobalt-Chrom-Molybdän Legierungen

PULEO und Mitarbeiter untersuchten in Ihrer Studie 1991 die Adhäsion und das Zellwachstum wie auch die Kollagenbiosynthese von Osteoblasten neonataler Ratten bei direktem Kontakt mit einer Kobalt-Chrom-Molybdän-Legierung. In direktem Vergleich zu Prüfkörpern aus chirurgischem Stahl, welche in gleicher Weise untersucht wurden, fanden sie nahezu identische Eigenschaften bzgl. der Biokompatibilität.

Mäusefibroblasten, deren Zellzahl und Morphologie bei direktem Kontakt mit Kobalt-Chrom-Molybdän untersucht wurden, präsentierten keine signifikante Schädigung (NAKAMURA 1984).

Im Gegensatz hierzu fand BERNSTEIN in seinen Untersuchungen an metallischem Zahnersatzpräparaten 1992 eine starke Reduktion des Zellwachstums von humanen Fibroblasten bei unmittelbarem Kontakt zu Kobalt-Chrom-Molybdän Legierungen.

Eine erhöhte Toxizität im Sinne einer Reduktion der Zellzahl und Veränderungen der Zellmorphologie konnte bereits EVANS 1986 nachweisen. Die verwendete Kobalt-Chrom-Molybdän Legierung wurde hier im Unterschied zu den zuvor genannten Studien in pulverisierter Form der Fibroblastenzellkultur zugeführt. Vergleicht man allerdings die toxische Wirkung der Legierung mit der von Nickel und Cobalt in Einzelprüfung, so fand EVANS eine geringere Toxizität der Legierung, welches er mit der geringeren Löslichkeit und gleichzeitig deutlich höheren Korrosionsbeständigkeit der Legierung erklärte.

Verglichen mit Titan existieren bzgl. der Osteokonduktivität und Biokompatibilität von CoCr Materialien sehr viel weniger wissenschaftliche Daten.

Auch in dieser Studie zeigen die CoCr-Prüfkörper eine gute Zytokompatibilität. Es finden sich elektronenmikroskopisch große Mengen von kuboidförmigen Zellen mit langen Zellausläufern, sowie eine starke OP-Expression der auf CoCr anhaftenden Zellen.

Das Verhalten einer humanen Knochenmarkszellreihe bei Kontakt zu einer polierten CoCrMo Legierung wurde 1994 von WILKE untersucht. Zur Beurteilung der Biokompatibilität wurde die Anzahl der Zellen, das Zellwachstum, die Zellmorphologie, sowie die Menge der sezernierten extrazellulären Matrix als Marker für die metabolischen Zelleistung ausgewertet. WILKE fand eine geringere

Zelladhäsion und Zellwachstum als bei Titanlegierungen. Zur weiteren Evaluation der Biokompatibilität untersuchten LIN die biokorrosiven Effekte von CoCrMo an Hand einer Makrophagenzell-Kultur. Sie konnten eine Freisetzung von Metallionen dokumentieren, jedoch ohne erkennbaren Einfluss auf das Zellüberleben oder Proliferation.

In der bereits zuvor beschriebenen Studie von DORAN wurde auch eine verwendete Kobalt-Chrom-Molybdän-Legierung bzgl. ihrer Zytotoxizität und ihrer Fähigkeit Neoplasmen hervorzurufen überprüft. DORAN stufte sie als moderat verträglich ein und konnte keinen Zusammenhang zwischen der Toxizität und Kanzerogenität nachweisen.

Zusammenfassend sprechen nahezu alle beschriebenen Arbeiten für eine recht gute Biokompatibilität von Kobalt-Chrom-Molybdän-Legierungen. Allerdings nimmt die Art der Oberfläche erheblichen Einfluss auf die Verträglichkeit, wobei humane Osteoblasten im Vergleich zu Fibroblasten eine höhere Empfindlichkeit aufweisen (WILKE 1994).

#### 4.2.4 Chirurgischer Stahl

Auch wenn einige Studien ein vergleichbare Zytokompatibilität von Titan und Chirurgenstahl in Bezug auf die Osteoblastendifferenzierung zeigen (SCHMIDT 2001, 2003), werden eine zytotoxische Wirkung und proinflammatorische Effekte von Chirurgenstahloberflächen im Vergleich zu Titanmaterialien in anderen Arbeiten beschrieben (SHAAMA 2005, RODIL 2005, FERNANDES 1999).

MORAIS fand in seiner Arbeit 1999 entsprechend den Ergebnissen dieser Studie ebenfalls eine verminderte Zytokompatibilität des Chirurgenstahls. Als Ursache für eine erhöhte zytotoxische Wirkung des Chirurgenstahls auf humane Knochenmarkzellen nennt er die entstehenden Korrosionsprodukte und die erhöhten Metallionenkonzentration. Er konnte nachweisen, dass bereits nach einer Kulturdauer von 21 Tagen Korrosionsprodukte des Chirurgenstahls und Nickelsalze signifikant das Wachstumsverhalten und die ALP-Expression stören. Zu vergleichbaren Ergebnissen kam auch 1995 die Arbeitsgruppe um PULEO. Er berichtete über irreversible zytotoxische Effekte des Chirurgenstahls bereits nach 48h.

Diese Ergebnisse decken sich mit unseren Daten, welche einen zellfreien Saum um den Chirurgenstahl bei insgesamt reduzierter Zellzahl nach Kultur auf diesem Biomaterial dokumentieren.

Sowohl HOWLETT wie auch WILKE fanden 1994 eine etwas schlechtere Materialverträglichkeit des Chirurgenstahls gegenüber Titanprüfkörpern. HOWLETT verwendete hierzu humane Knochenzellen wohingegen WILKE eine Mischkultur aus humanen Knochenmarkzellen zur Untersuchung einsetzte. Es zeigte sich in beiden Untersuchungen nach Bestimmung der Proliferationsrate, Adhäsion und Zellzahl eine verminderte Biokompatibilität gegenüber Titan.

Demgegenüber stehen die Ergebnisse von GARVEY (1995) und VROUWENVELDER (1993). GARVEY zeigten an Hand von Osteoblasten neonataler Ratten eine gesteigerte Produktion von mineralisierter extrazellulärer Matrix und ein gutes Wachstum der Osteoblasten bei direktem Kontakt zur untersuchten Stahloberfläche. VROUWENVELDER verglich 1993 das Verhalten von fetalen Rattenosteoblasten bei Kontakt mit Titan- und Stahloberflächen. Da er weder

morphologische noch metabolische Unterschiede der Osteoblasten fand, beschrieb er die Biokompatibilität von chirurgischem Stahl und Titan als vergleichbar.

DORAN und Mitarbeiter prüften auch chirurgischen Stahl auf ihre Zytotoxizität und die Fähigkeit Neoplasmen zu bilden. An den verwendeten Mausfibroblasten konnte keine erhöhte Zytotoxizität oder Kanzerogenität nachgewiesen werden, so dass auch der chirurgische Stahl als gut verträglich eingestuft wurde.

Auch CIAPETTI untersuchte die Toxizität von rostfreiem Stahl (1993). Er überprüfte die Reaktionen von humanen Monozytenzellkulturen mit Hilfe der Extraktionsmethode mittels MTT-Assay. Die Zellvitalität zeigte sich durch den rostfreien Stahl unbeeinträchtigt.

SCHMIDT untersuchte 2003 unter anderem Titan- und Chirurgenstahlimplantate bzgl. aseptischer Materiallockerung. Es wurde die Menge von sezerniertem IL-6 und PGE-2, welche wiederum eine Osteoklastenstimulation bewirken und somit für periimplantäre Osteolysen verantwortlich gemacht wird, gemessen. Er konnte keine signifikanten Unterschiede bzgl. der einzelnen Prüfkörper feststellen.

KUNDELSKA-MAZUR (2005) fand eine höhere Zellzahl in Zellkulturen auf Titanmaterialien im Vergleich zu chirurgischem Stahl innerhalb der ersten 7 Tagen nach Stimulation mit DAG.

Dexamethason stimuliert die Expression von ALP während der Osteoblastendifferenzierung in humanen Knochenmarkzellen aus Progenitorzellen (BELOTI 2005).

In der vorliegenden Studie finden wir signifikante Unterschiede in der Anzahl ALP-positiver Zellen in der periimplantären Region der einzelnen Biomaterialien. Sandgestrahltes  $TiAl_6V_4$  zeigt die höchste Anzahl ALP-positiver Zellen, gefolgt vom glatten  $TiAl_6V_4$  und dem glatten CoCr-Prüfkörper. Um CoCr mit Porocoat<sup>TM</sup>-Oberfläche lassen sich keine und um den glatten Chirurgenstahl nur wenige ALP-positiven Zellen nachweisen.

Daraus lässt sich ableiten, dass CoCr mit Porocoat<sup>TM</sup>-Oberfläche eine geringe osteogene Eigenschaft besitzt und die Osteoblastenmigration und/ oder deren Vorläuferzellen in Richtung des Biomaterials während der Kultivierung unterstützt.

Die hohe Anzahl Osteopontin-positiver Zellen auf CoCr mit Porocoat<sup>TM</sup>-Oberfläche unterstützt die zuletzt genannte Hypothese.

Zur Überprüfung der *in-vitro*-Adhärenz und des Zellwachstum auf verschiedenen orthopädischen Biomaterialien (Ti, CoCrMb, UHWPE) verwendete HUNTER Fibroblasten und Osteoblasten (1995). Er fand jedoch keinen signifikanten Unterschied bzgl. der Zelladhäsion. Im Gegensatz dazu beschreiben eine Vielzahl zuvor genannter Studien einen signifikanten Einfluss des Prüfmateri als und deren Oberflächenstruktur auf die Zellanhaftung, Osteoblastendifferenzierung und Genexpression.

Basierend auf der Osteopontin-Expression und Zellmorphologieanalyse mittels REM findet sich eine hohe Anzahl von flachen cuboidförmigen Osteoblasten auf der Oberfläche von Tivanium und CoCr. Elektronenmikroskopische Analysen der Stahloberflächen zeigen hingegen eine kleinere Anzahl kleiner runder Zellen.

Zu differierenden Ergebnissen kam SCHMIDT 2002, welche sowohl auf Chirurgenstahl, CoCr, commercial pure Titan (cpTi), Tivanium und  $TiAl_6Nb_7$  flache Zellen mit fibroblastenähnlicher Morphologie fanden.

In der vorliegenden Studie wiederum zeigen sich parallel orientierte Zellen auf allen glatten Biomaterialien, mit Ausnahme des Chirurgenstahls, welche eher eine zufällige Zellorientierung zeigt. ANSELME untersuchten 2000 die Zellmigration und Proteinexpression auf Oberflächen mit unterschiedlicher Rauigkeit. Auf Tivanium fand er ebenfalls parallel orientierte Zellverbände. Die in der vorliegenden Studie beschriebene Zellmorphologie entspricht den Daten von KONONEN, welcher 2002 flache Zellen mit langen Ausläufern nach Kultivierung von humanen Gingivafibroblasten auf Titanoberflächen fand.

Große Mengen von OP-positiven Zellen können in unserer Studie auf allen Oberflächen gefunden werden. Nur Chirurgenstahl zeigt keinen dichten Zellrasen von OP-positiven Zellen.

Eine mögliche Erklärung für die hohe OP-Expression der auf CoCr anhaftenden Zellen oder aber fehlenden ALP-Expression der periimplantären Zellen ist ein möglicherweise unterschiedliches Entwicklungsstadium des Osteoblasten.

So wird ALP typischerweise von Osteoblasten in einem frühen Entwicklungsstadium exprimiert, wohingegen andere Proteine wie OP, OC und ON von reifen Osteoblasten synthetisiert und exprimiert werden. Zudem ist auch von anderen Biomaterialien wie Calcium-Ti-Phosphat, cpTi und CoCrMb bekannt, dass nach einem anfänglichen Peak innerhalb der ersten 10 Tage die ALP-Aktivität rückläufig ist (HENDRICH 2002).

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit konnte eine exzellente Zellanlagerung/ Adhäsion, Zellausbreitung und osteogene Differenzierung auf den glatten und sandgestrahlten TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub> sowie den glatten und Porocoat™-beschichteten CoCr-Implantaten der humanen Knochenvorläuferzellen nachweisen.

Es wurden Unterschiede in der Oberflächenrauigkeit und dem Kontaktwinkel (CA) vor und nach Zellkultivierung gefunden. Auf den Porocoat™-beschichteten CoCr-Implantate lassen sich die meisten OP-positiven Zellen nachweisen. Dahingegen zeigt Chirurgienstahl zytotoxische Effekte auf humane Osteoblasten, nachgewiesen durch die verminderte periimplantäre Zellzahl.

## 6 Literaturverzeichnis

1. **Absalom DR, Zing W, Neumann AW**  
Proteinadsorption to polymer particles: Role of surface properties. *J Biomed Mater Res* 1987; 21: 161–71
2. **Adams JC, Watt FM**  
Regulation of development and differentiation by extracellular matrix. *Development* 1993; 117: 1183-1198
3. **Aldinger G, Beyer A, Schmid U, et al.**  
Grundsätzliche Aspekte der osteoinduktiven Aktivität von Knochengewebe und Möglichkeit ihrer klinischen Anwendung. *Z. Orthop.* 1996, 134: 2005-209
4. **Aldinger G, Kusswetter W, Reis HJ, et al.**  
Bone morphogenetic protein: a review. *Int. Orthop (SICOT)* 1991, 15: 169-177
5. **Albelda SM, Buck CA**  
Integrins and other cell adhesion molecules. *Faseb J* 1990; 4: 2868- 2880
6. **Anselme K, Bigerelle M, Noel B, et al.**  
Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughness. *J Biomed Mater Res* 2000; 49: 155-166
7. **Athanasou NA**  
Current concepts review. Cellular biology of bone-resorbing cells. *J of bone and joint surgery* 1996; 78 (7)-A: 1096-1112

- 8. Bachle M, Kohal RJ,**  
A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. *Clin Oral Implant Res* 2004; 15: 683-692
- 9. Barrias CC, Ribeiro CC, Lamghari M, et al.**  
Proliferation, activity, and osteogenic differentiation of bone marrow stroma cells cultured on calcium titanium phosphate microspheres. *J Biomed Mater Res A* 2005; 72: 57-66
- 10. Bell, B**  
A system of surgery. Penniman, Troy N.Y. (1804)
- 11. Beloti MM, Rosa AL**  
Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone. *Braz Dent J* 2005; 16: 156-161
- 12. Berstein A, Bernauer I, Marx R, et al.**  
Human cell culture studies with dental metallic materials. *Biomaterials* 1992  
13: 98-100
- 13. Bigerelle M, Anselme K**  
Statistical correlation between cell adhesion and proliferation on biocompatible metallic materials. *J Biomed Mater Res A* 2005; 72: 36-46
- 14. Birke A, Reichel H, Hein W, et al.**  
ROBODOC- a path into future of hip endoprothetics or an investment error? *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2000; 138: 395-401

- 15. Blauth W, Donner K**  
Notes on the history of arthroplasty. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1979; 117: 997-1006
- 16. Blumsohn A, Hannon RA, Eastell R,**  
Apparent instability of osteocalcin in serum as measured with different commercially available immunoassays. *Clinical chemistry* 1995 Vol. 41: 318-319
- 17. Börner M**  
Computer assisted robotics in hip endoprosthesis implantation. *Unfallchirurg* 1997; 100: 640-5
- 18. Boskey AL, Gadaleta S, Gundberg C, et al.**  
Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bone osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone* 1998; 23: 187-96
- 19. Boyce BF, Xing L**  
Biology of RANK, RANKL, and Osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther* 2007; 9 Suppl 1: S1
- 20. Boyce BF, Xing L**  
The RANKL/RANK/OPG pathway. *Curr Osteoporos Rep* 2007 Sep; 5: 98-104
- 21. Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, et al.**  
Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* 1996; 17: 137-146

- 22. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL**  
Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423: 337-342
- 23. Brekken RA, Sage EH**  
SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cellmatrix, *Matrix Biology* 2000; 19: 569-580
- 24. Bruni S, Martinesi M, Stio M, et al.**  
Effects of surface treatment of Ti-6Al-4V titanium alloy on biocompatibility in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Acta Biomater* 2005; 1: 223-34
- 25. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al.**  
Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998; 12:1260-1268
- 26. Cannas M, Denicolai F, Webb L, et al.**  
Bioimplant surfaces: Binding of fibronectin and fibroblast adhesion. *J. Orthop Res* 1988, 6:58-62
- 27. Chabas D**  
Osteopontin, a multi-faceted molecule. *Med Sci (Paris)* 2005 Oct; 21: 832-8
- 28. Chambers TJ**  
Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *J Pathol* 2000; 192: 4-13

- 29. Ciapetti G, Cenni E, Pratelli L, et al.**  
In vitro evaluation of cell/ biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials* 1993; 14: 359-364
- 30. Clohisy JC, Frazier E, Hirayama T, et al.**  
RANKL is an essential cytokine mediator of polymethylmethacrylate particle-induced osteoclastogenesis. *J Orthop Res* ; 2003; 21: 202-212
- 31. Clohisy JC, Hirayama T, Frazier E, et al.**  
NF- $\kappa$ B signaling blockade abolishes implant particle-induced osteoclastogenesis. *J Orthop Res* 2004; 22: 13-20
- 32. Coelho MJ, Fernandes MH**  
Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerolphosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials* 2000; 21: 1095-1102
- 33. Craig R, Hanks C**  
Cytotoxicity of experimental casting alloys evaluated by cell culture tests. *J dent Res* 1990, 69: 1539-1542
- 34. Crotti TN, Smith MD, Findlay DM, et al.**  
Factors regulating osteoclast formation in human tissues adjacent to peri-implant bone loss: expression of receptor activator NF- $\kappa$ B, RANK ligand and osteoprotegerin. *Biomaterials*. 2004;25: 565-73.

- 35. Cutis ASG, Clark P**  
The effect of topographic and mechanical properties of materials on cell behaviour. *Crit Rev Biocompatibility* 1990; 5: 343-362
- 36. Curtis ASG, Wilkinson C**  
Topographical control of cells, *Materials* 1997; 18: 1573-1583
- 37. Dalby MJ, Di Silvio L, Davis GW, et al.**  
Surface topography and HA filler volume effect on primary human osteoblasts *in vitro*. *J Mat Sci: Mater Med* 2000; 11:805-810
- 38. Daniel J, Pynsent PB, McMinn D**  
Metal-on-metal resurfacing of the hip in patients under the age of 55 years with osteoarthritis. *J Bone Joint Surg Br* 2004; 86: 177-184
- 39. Darnay BG, Haridas V, Ni J, et al.**  
Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 1998; 273:20551-20555
- 40. Denhardt DT, Noda M, O`Regan AW, et al**  
Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodelling, and cell survival. *J Clin Invest* 2001; 107: 1055-61

- 41. Doran A, Law FC, Allen MJ, et al.**  
Neoplastic transformation of cells by soluble but not particulate form of metals used in orthopaedic implants. *Biomaterials* 1998;19: 751-759
- 42. Duff-Barclay I, Scales JT, Wilson JN**  
Biomechanics. The development of the Stanmore total hip replacement. *Proc R Soc Med* 1966 Oct; 59: 948-51
- 43. Dziade M, Paulsson M, Aumailley M, et al.**  
Purification and tissue distribution of a small protein (BM-40) extracted from basement membrane tumor. *Eur J Biochem.* 1986; 161: 455-464
- 44. Eriksson AS, Thomsen P**  
Leukotriene B4, interleukin 1 and leucocyte accumulation in titanium and PTFE chambers after implantation in the rat abdominal wall. *Biomaterials* 1991; 12: 827-30
- 45. Eskelinen A, Remes V, Helenius I, et al.**  
Total hip arthroplasty for primary osteoarthritis in younger patients in the Finnish arthroplasty register. 4, 661 primary replacement followed for 0-22 years. *Acta Orthop* 2005; 76: 28-41
- 46. Evans EJ, Thomas IT,**  
The in vitro toxicity of cobalt-chromium-molybdenum alloy in its constituent Metals. *Biomaterials* 1986, 7: 25-29

- 47. Fan X, Fan D, Gewant H, et al.**  
Increasing membrane-bound MCSF does not enhance OPGL-driven osteoclastogenesis from marrow cells. *Am J physiol endocrinol metab* 2001; 280: 103-111
- 48. Fernandes MH**  
Effect of stainless steel corrosion products on in vitro biomineralization. *J Biomater Appl* 1999; 14 :113-68
- 49. Florez ME, Norgard M, Heinegard D, et al.**  
RGD-directed attachment of isolated rat osteoclasts to osteopontin, bone sialoprotein, and fibronectin. *Exp Cell Res* 1992; 201: 526-530
- 50. Garnero P, Grimaux M, Seguin P, et al.**  
Characterization of immunoreactive forms of human osteocalcin generated in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 833-834
- 51. Garvey BT, Bizios R**  
A transmission electron microscopy examination of the interface between osteoblasts and metal biomaterials. *J Biomed Mater Res* 1995; 29: 987-92
- 52. Germanier Y, Tosatti S, Brogini N, et al.**  
Enhanced bone apposition around biofunctionalized sandblasted and acid-etched titanium implant surfaces. A histomorphometric study in miniature pigs. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17: 251-257

- 53. Giudiceandrea F, Iacona A, Cervelli G, et al.**  
Mechanisms of bone resorption: analysis of proinflammatory cytokines in peritoneal macrophages from titanium implant- An experimental design.  
*J Craniofac Surg* 1998; 9: 254-259
- 54. Goldring S, Flannery M, Petrison K, et al.**  
Evaluation of connecting tissue cell response to orthopaedic implant Materials. *Connect Tiss Res* 1990; 24: 77-81
- 55. Gulow J, Scholz R, Salis-Solgio G**  
Kurzschäfte in der Hüftendoprothetik. *Der Orthopäde* 2007; 36: 353-359
- 56. Granchi D, Pellacani A, Spina M, et al.**  
Serum level of osteoprotegerin und receptor activator of nuclear factor-KappaB ligand as markers of periprosthetic osteolysis. *J Bone Joint Surg Am* 2006; 88: 1501-1509
- 57. Harmand MF, Naji R, Jeandot R, et al.**  
Cytocompatibility study of cobalt- chromium alloys using human cell cultures.  
*Advances in Biomaterials* 1990, 9: 19-24
- 58. Hattari S,**  
Fibroblast cell proliferation on charged hydroxyethyl-methacrylate-copolymers. *J Colloid Interface Sci* 1988, 104: 72-78
- 59. Haynes DR, Crotti TN, Potter AE, et al.**  
The osteoclastogenic molecules RANKL and RANK are associated with periprosthetic osteolysis. *J Bone Joint Surg Br* 2001; 83: 902-11. Review

- 60. Heinegard D, Oldberg A,**  
Glycosylated matrix proteins. In: Connective Tissue and its Heritable Disorders (Eds Royce PM, Steinman B). Wiley Liss. Inc. New York 1993: 189-209
- 61. Hehner B, Heidemann D,**  
Vergleich der biologischen Verträglichkeit von Titan und Titanlegierungen in der Zellkultur der menschlichen Gingiva. *Dtsch Z Mund Kiefer GesichtsChir* 1989; 13: 394-400
- 62. Hendrich C, Noth U, Stahl U, et al.**  
Testing of skeletal implant surfaces with human fetal osteoblasts. *Clin Orthop Relat Res* 2002; 394: 278-289
- 63. Hofbauer LC, Neubauer A, Heufelder AE**  
Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and osteoprotegerin: Potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone disease. *Cancer* 2001; 92, 460-70
- 64. Hofbauer LC, Schoppet M**  
Clinical implication of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA* 2004; 292: 490-495
- 65. Hoffmann O**  
Zelluläre und molekulare Mechanismen der Tumormetastasierung in den Knochen. *J Miner Stoffwechs* 2003; 10, 12-15

- 66. Holding CA, Findlay DM, Stamenkov R, et al.**  
The correlation of RANK, RANKL and TNF alpha expression with bone loss volume and polyethylene wear debris around hip implant. *Biomaterials* 2006; 27: 5212-5219
- 67. Howlett C, Evans M, Walsh W, et al.**  
Mechanism of initial attachment of cells derived from human bone to commonly used prosthetic materials during cell culture. *Biomaterials* 1994; 15: 213-222
- 68. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, et al.**  
Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:3540-3545
- 69. Huang HH, Ho CT, Lee TH, et al.**  
Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion. *Biomol Eng* 2004; 21: 93-97
- 70. Hunter A, Archer CW, Walker PS, et al.**  
Attachment and proliferation of osteoblasts and fibroblasts on biomaterials for orthopaedic use. *Biomaterials* 1995; 16: 287-95
- 71. Hynes R**  
Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; 110: 673-87

- 72. Ivanoff CF, Hallgren C, Widmark G, et al.**  
Histologic evaluation of the bone integration of TiO<sub>2</sub> blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clin Oral Implants Res* 2001; 12: 128-134
- 73. Iwasaki Y, Mikami A, Kurita K, et al.**  
Reduction of surface- induced platelet activation on pospholopid polymers. *J Biomed Mater Res* 1996, 36: 508-515
- 74. Jäger M, Feser T, Denck H, et al.**  
Proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured onto three different polymers in vitro. *Annals of Biomedical Engineering* 2005; 33: 1319-1332
- 75. Jäger M**  
Präklinische Untersuchungen von Möglichkeiten und Grenzen einer Stammzelltherapie zur Behandlung ossärer Defekte. Shaker Verlag, Aachen 2008, ISBN 0978-3-8322-6931-9
- 76. Jäger M, Urselmann F, Witte F, et al.**  
Osteoblast differentiation onto different biometals with a endoprosthetic surface topography *in vitro*. *J Biomed Mater Res A*. 2008; 86: 61-75
- 77. Jäger M, Wild A, Lensing-Höhn S, et al.**  
Influence of different culture solutions on osteoblastic differentiation in cord blood and bone marrow derived progenitor cells. *Biomed Tech (Berl)*. 2003; 48 :241-4

- 78. Jäger M, Wild A, Werner A, et al.**  
Osteogenetisches Potential unrestringierter somatischer Stammzellen (USSC) aus dem Nabelschnurblut Neugeborener. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2002; 140: S11
- 79. Jäger M, Wilke A.**  
Comprehensive biocompatibility testing of a new PMMA-hA bone cement versus conventional PMMA cement in vitro. *J Biomater Sci Polym Ed* 2003;14: 1283-98
- 80. Jäger M, Zilkens C, Zanger K, et al.**  
Significance of nano- and microtopography for cell-surface interactions in orthopaedic implants. *J Biomed Biotechnol* 2007; 2007(8): 69036
- 81. Johnson KA, Hessle L, Vaingankar S, et al.**  
Osteoblastic tissue nonspecific alkaline phosphatase antagonizes and regulates PC-1. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2000; 279: 1365–1377
- 82. Judet R, Siquier M, Brumpt B, et al.**  
A noncemented total hip prosthesis. *Clin orthop Relat Res* 1978; Nov-Dez 137: 76-84
- 83. Junqueira LC, Carneiro J**  
Lehrbuch der Histologie, Übersetzt von T.H. Schiebler, 4. Auflage, Springer Verlag: 151-163/ 190-217/ 306-325 (1991)

- 84. Kärrholm J, Garellick G, Herberts P**  
Swedish Hip Arthroplasty Register. Annual report 2006. Department of Orthopaedics, Sahlgrenska University Hospital
- 85. Kawahara H**  
Biological requirements for biomaterials, *Implantologist* 1985; 3: 41-49
- 86. Kawahara Y, Nakamura M**  
Biological testing of dental materials by means of tissue culture, *Int Dent J* 1968; 18: 443-466
- 87. Keyserlingk DG**  
Bindegewebe. Aus: Benninghoff Anatomie I, Hrsg Staubesand J 1985, Urban & Schwarzenberg: 110-131
- 88. Kienapfel H, Griss P, Orth J, et al.**  
Zwei- bis Fünfjahresergebnisse mit zementfrei einsetzbaren Knieendoprothesen vom Typ MG. *Orthopädie* 1991; 20: 189-196
- 89. Kim Hk, Jang JW, Lee CH**  
Surface modification of implant materials and its effect on attachment and proliferation of bone cells. *J Mater Sci Mater* 2004; 15: 825-830
- 90. Klein-Nulend J, Roelofsen J, Semeins CM, et al**  
Mechanical stimulation of osteopontin mRNA expression and synthesis in bone cell cultures. *J Cell Physiol* 1997; 170: 174-181

- 91. Knöfler W**  
Untersuchung zur Zytotoxizität verschiedener Metalle mit Oxidbeschichtung in vitro. 1. Mitteilung: Einfluss auf das Proliferationsverhalten von Monolayerzellen. *Stomatol DDR* 1985, 35: 633-637
- 92. Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, et al.**  
The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 1-8
- 93. Kögler G, Sensken S, Airey JA, et al.**  
A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 2004; 200: 123-135
- 94. Kokonen M, Hormia M, Kivilakti J, et al.**  
Effect of surface processing on the attachment, orientation und proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. *J Biomed Mater Res* 1992; 26: 1325-1341
- 95. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, et al.**  
OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999; 397: 315-323
- 96. Kornak U, Kasper D, Bösl MR, et al.**  
Loss of the CLC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* 2001; 104: 205-215
- 97. Kotoura Y, Yamamuro T, Shikata J**  
A method of toxicological evaluation of biomaterials based on formation of V79 cells. *Archi Orthopa Trauma Surg* 1985; 104: 15-19

- 98. Kummer B**  
Mechanische Beanspruchungen und biologisches Verhalten des Knochens.  
Aus: Benninghaff Anatomie I. Hrsg. J Staubesand 1985, Urban &  
Schwarzenberg Verlag: 185-221
- 99. Kundelska-Mazur D, Lewandowska-Szumiel M, Mazur M, et al.**  
Osteogenic cell contact with biomaterials influences phenotype expression.  
*Cell Tissue Bank* 2005; 6: 55-64
- 100. Kuroda S, Takeda S, Nakamura M**  
Effects of six particulate metals on osteoblast-like MG-63 and HOS cells in  
vitro. *Dent Mater J* 2003; 22: 507-20
- 101. Lane TF, Sage EH**  
The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions.  
*FASEB J* 1994, 8: 163-173
- 102. Lauer G, Wiedmann-Al-Ahmad M, Otten JE, et al.**  
The titanium surface texture effects adherence and growth of human gingival  
keratinocytes and human maxilar osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials*  
2001; 22: 2799-2809
- 103. Li JP, Li SH, Van Blitterswijk CA, et al.**  
A novel porous Ti6Al4V: characterization and cell attachment. *J Biomed  
Mater Res A* 2005; 73: 223-33

- 104. Lian JB, Javed A, Zaidi SK, et al.**  
Regulatory controls of osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2004; 14: 1-41
- 105. Lian JB, Stein GS, Stein JL, et al.**  
Osteocalcin gene promoter: unlocking the secrets for regulation of osteoblast growth and differentiation. *J Cell Biochem Suppl* 1998; 30-31: 62-72
- 106. Lin HY, Bumgardner JD**  
In vitro biocorrosion of Co-Cr-Mo implant alloy by macrophage cells. *J Orthop Res* 2004; 22: 1231-1236
- 107. Lord G, Bancel P**  
The madreporic cementless total hip arthroplasty. New experimental data and a seven-year clinical follow-up study. *Clin Orthop Relat Res* 1983; 176: 67-76
- 108. Lowenberg B, Chernecky R, Shiga A, et al.**  
Mineralized matrix production by osteoblasts on solid titanium in vitro. *Cells & Materials* 1991, 1: 177-187
- 109. Luy, M**  
Perspektiven für die zukünftige Entwicklung der Lebenserwartung, *Rostocker Zentrum- Diskussionspapier Nr 4*, Dezember 2006
- 110. Malchau H, Herberts P, Eisler T, et al.**  
The Swedish total hip replacement register. *J Bone Joint Surg Am* 2002; 84(Suppl 2): 2-20

- 111. Malone JD, Teitelbaum SL, Griffin GL, et al.**  
Recruitment of osteoclast precursors by purified bone matrix constituents. *J Cell Biol* 1982; 92: 227-230
- 112. Marchisio M, Di Carmine M, Pagone R, et al.**  
Implant surface roughness influences osteoclast proliferation and differentiation. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater* 2005; 75: 251-256
- 113. Mann K, Deutzmann R, Paulsson M, et al.**  
Solubilization of protein BM-40 from a basement membrane tumor with chelating agents and evidence for its identity with osteonectin and SPARC. *FEBS Letters* 1987; 218: 167-172
- 114. Martinesi M, Bruni S, Stio M, et al.**  
In vitro interaction between surface-treated Ti-6Al-4V titanium alloy and human peripheral blood mononuclear cells. *J Biomed Mater Res A* 2005; 74: 197-207
- 115. Martinovic S, Mazic S, Kusic V, et al.**  
Expression of bone morphogenetic proteins in stroma cells from human bone marrow long-term culture. *J Histochem Cytochem* 2004; 52: 1159-67
- 116. McMinn D, Treacy R, Lin K, et al.**  
Metal on metal surface replacement of the hip. Experience of the McMinn prosthesis. *Clin Orthop Relat Res* 1996; 329: 89-98

- 117. Meyer U, Büchter A, Wiesmann HP, et al.**  
Basis reaction of osteoblasts on structures material surfaces. *Eur Cells and Mater* 2005, 9: 39-49
- 118. Mittelmeier H**  
Hip joint replacement in young patients. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1984; Jan-Feb 122(1): 20-26
- 119. Moore AT**  
Metal hip joint; a new self-locking vitallium prosthesis. *South Med J* 1952 Nov; 45: 1015-19
- 120. Morais S, Dias N, Sousa JP, et al.**  
In vitro osteoblastic differentiation of human bone marrow cells in the presence of metal ions. *J Biomed Mater Res* 1999; 44: 176-190
- 121. Morinobu M, Ishijima M, Rittling SR, et al.**  
Osteopontin expression in osteoblasts and osteocytes during bone formation under mechanical stress in the calvarial suture in vivo. *J Bone Miner Res* 2003; 18: 1706-15
- 122. Müller U, Imwinkelried T, Horst M, et al.**  
Do human osteoblasts grow into open-porous titanium? *Eur Cell Mater* 2006; 11: 8-15

- 123. Munting E, Schmitz P, Van Sante N, et al.**  
Effect of a stemless femoral implant for total hip arthroplasty on the bone mineral density of the proximal femur: a prospective longitudinal study. *J Arthroplasty* 1997; 12: 373-379
- 124. Mustafa K, Wennerberg A, Wroblewski J, et al**  
Determining optimal surface roughness of TiO<sub>2</sub> blasted titanium material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clin Oral Implant Res* 2001; 12: 515-525
- 125. Naji A, Harmand M**  
Study of the effect of the surface state on the cytocompatibility of a Co-Cr alloy using human osteoblasts and fibroblasts. *J Biomed Mater Res* 1990, 24: 861- 871
- 126. Nakamura M, Kawahara H, Haeuchi Y**  
In vitro cell response to cobalt-chromium-molybdenum alloy containing Beryllium. *J Prost Dent* 1984; 51: 790-796
- 127. Noda M, Camilliere JJ**  
In vivo stimulation of boneformation by transforming growth factor-beta. *Endocrinology* 1989; 124: 2991-4
- 128. Novak L, Bartakova V, Puza A**  
In-vitro Untersuchungen zur Biokompatibilität einer Cobalt-Chrom-Legierung. *Deutsche Stomatologie* 1991; 41: 326-331

- 129. Ohgushi H, Okumura, M**  
Osteogenetic capacity of rat and human bone marrow cells and porous ceramics. *Acta Orthop Scand* 1990; 61: 431-434
- 130. Ohgushi H, Okumura M, Tamai S**  
Marrow cell induced osteogenesis and chondrogenesis in porous calcium phosphate ceramics. *Clinical Implant Materials, Advances in Biomaterials Vol. 9*, 1990b G. Heimke, U. Soltesz, A.J., C. Lee, Elsevier Science Publishers, B.V. Amsterdam: 2255-230
- 131. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al.**  
Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143-147
- 132. Puleo D, Huh WW**  
Acute toxicity of metal ions in cultures of osteogenic cells derived from bone marrow stromal cells. *J Appl Biomater* 1995; 6: 109-116
- 133. Puleo D, Holleran L, Doremus R, et al.**  
Osteoblast response to orthopaedic implant materials in vitro. *J Biomed Mater Res* 1991; 25: 711-723
- 134. Puleo D, Preston K, Shafer J, et al.**  
Examination of osteoblast-orthopaedic biomaterial interaction using molecular techniques. *Biomaterials* 1993; 14: 111-114

- 135. Raue F, Ziegler R,**  
Knochenstoffwechsel und -erkrankungen. *Orthopäde* 1996; 25: 567- 577
- 136. Rea SM, Brooks RA, Schneider A, et al.**  
Osteoblast-like cell response to bioactive composites-surface-topography and composition effects. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater* 2004; 70: 250-261
- 137. Redey Sa, Nardin M, Bernache-Assolant D, et al.**  
Behavior of human osteoblastic cells on stoichiometric hydroxyapatite and type A carbonate apatite: Role of surface energy. *J Biomed Mater Res* 2000; 50: 353-364
- 138. Refai AK, Textor M, Brunette DM, et al.**  
Effect of titanium surface topography on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Biomed Mater Res A* 2004; 70: 194-205
- 139. Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, et al.**  
Osteopontin- a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Atl Acad Sci USA* 1990; 87 (12): 4473-5
- 140. Resch H, Bernecker P**  
Parameter für Knochenneubildung und Knochenabbau, klinische Relevanz der biochemischen Marker des Knochenstoffwechsels. *Rheuma plus* 2004, 3.Jahrgang Nr. 4

- 141. Rodil SE, Olivares R, Arzate H**  
In vitro cytotoxicity of amorphous carbon films. *Biomed Mater Eng* 2005; 15: 101-12
- 142. Sabokbar A, Itonaga I, Sun SG, et al.**  
Arthroplasty membrane derived fibroblasts directly induce osteoclast formation and osteolysis in aseptic loosening. *J Orthop Res* 2005; 23: 511-519
- 143. Scales JT**  
Arthroplasty of the hip using foreign materials: a History. *Proc Instn Mech Engrs* 1966-67; 181: 63-84
- 144. Scales JT, Wait ME, Wright KWJ**  
Intramedullary fixation of custom-made major endoprotheses with special references to the bone response. *Engineer Med* 1984; 13: 185-190
- 145. Schmidt C, Ignatius AA, Claes LE**  
Proliferation and differentiation parameters of human osteoblasts on titanium and steel surfaces. *J Biomed Mater Res* 2001; 54: 209-215
- 146. Schmidt C, Kaspar D, Sarkar MR, et al.**  
A scanning electron microscopy study of human osteoblast morphology on five orthopaedic metals. *J Biomed Mater Res* 2002; 63: 252-261
- 147. Schmidt C, Steinbach G, Decking R, et al.**  
IL-6 and PGE2 release by human osteoblasts on implant materials. *Biomaterials* 2003; 24: 4191-4196

**148. Schneider VS**

Osteoporose und Weltraumflug. Aus: *Osteoporose*, Hrsg Schild HH, Sonderausgabe Ciba-Giga 1992, Thieme Verlag: 222- 228

**149. Shaama FA**

An in vitro comparison of implant materials cell attachment, cytokine and osteocalcin production. *West Indian Med J* 2005; 54: 250-256

**150. Sherman SS, Tobin DJ, Hollins BW, et al.**

Biochemical parameters associated with low bone density in healthy man and women. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 1123-1130

**151. Smith R, Ransjo M, Tatarczuch L, et al.**

Activation of protease-activated receptor-2 leads to inhibition of osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res* 2004;19: 507-16.

**152. Spranger M, Eder H**

Frühkomplikationen beim alloplastischen Gelenkersatz mit der Schalenprothese nach Wagner. *Arch Orthop Trauma Surg* 1980; 97: 145-150

**153. Springer TA, Wang J**

The three-dimensional structure of integrins and their ligands, and conformational regulation of cell adhesion. *Adv Protein Chem* 2004; 68: 29-63

**154. Stein G, Lian J, Stein J**

Mechanisms regulating osteoblast proliferation and differentiation. *San Diego: Academic press*, 1996

- 155. Stevens A, Lowe J**  
Lehrbuch der Histologie. Übersetzt von K. Thiedemann, Chapman & Hall Verlag 1992
- 156. Stock CA, Yang Y, Ong J**  
Protein adsorption and cell adhesion on different implant metals. 2005
- 157. Svehla M, Morberg P, Zicat B, et al.**  
Morphometric and mechanical evaluation of titanium implant integration: Comparison of five surface structures. *J Biomed Mater Res* 2000; 51: 15-22
- 158. Takahashi N, Udagawa N, Suda T**  
A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/ OPGL/ TRANCE/ RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 256: 449-55
- 159. Teitelbaum SL**  
Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289: 1504
- 160. Teitelbaum SL, Ross FP**  
Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 638-649
- 161. Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, et al.**  
Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 1981; 26: 99-105

- 162. Thomas RJ, Guise TA, Yin JJ, et al.**  
Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation.  
*Endocrinology* 1999, 140: 4451-4458
- 163. Ungethüm M, Blömer W**  
Technology of cementless hip endoprosthesis. *Orthopäde* 1987; 16: 170-184
- 164. Vaheri A**  
Fibronectin (cold-insoluble globulin): role in defence. *Schweiz Med Wochenschr.* 1980 Oct 4;110: 1437-40
- 165. Valverde P, Tu Q, Chen J**  
BSP and RANKL induce Osteoclastogenesis bone resorption synergistically.  
*J Bone Miner Res* 2005; 20:1669-79
- 166. von Recum AF, van Kooten TG**  
The influence of micro-topography on cellular response and the implications for silicone implants. *J Biomater Sci Polym Ed* 1995; 7: 181-98
- 167. Vrouwenvelder W, Groot C, de Groot K**  
Histological and biomechanical evaluation of osteoblasts cultered on bioactive glass, hydroxylapatite, titanium alloy, and stainless steel. *J Biomed Mater Res* 1993; 27: 465-75
- 168. Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, et al.**  
Enhanced function of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials* 2000; 21: 1803-1810

- 169. Wennerberg A, Albrektsson T, Johansson C, et al.**  
Experimental study of turned and grit-blasted screw-shaped implants with special emphasis on effects of blasting material and surface topography. *Biomaterials* 1996; 17: 15-22
- 170. Wennerberg A, Hallgren C, Johansson C, et al.**  
A histomorphogenetic evaluation of screw-shaped implants each prepared with surface roughnesses. *Clin Oral Implants Res* 1998; 9: 11-19
- 171. Wilke A, v. Hirschheydt S, Orth J, et al.**  
Die humane Knochenmarkzellkultur- Eine sensitive Methode zur Beurteilung der Biokompatibilität von Materialien, die in der Orthopädie verwendet werden. *Z Orthop* 1994; 132: 1-7
- 172. Wilke A, Orth J, Kienapfel H, et al.**  
Sensitivity of human bone marrow cell culture to test the biocompatibility of different biomaterials. *Fourth World Biomaterials Congress*, April 1992
- 173. Wilke A, Ahmed M, Nagel R, et al.**  
Cell-differentiation of human bone marrow cells depending on applied biomaterials. A cell culture study with orthopaedic implant materials. Aus: *Materials in clinical Applications* 1995a, ed. P. Vincenzini, Techna Srl.: 343-348
- 174. Wilke A, Orth J, Nagel R, et al.**  
Vergleich der Zytotoxizität und Biokompatibilität von TiAl<sub>6</sub>Nb<sub>7</sub>-ODH und TiAl<sub>6</sub>Nb<sub>7</sub> in einer humanen Knochenmarkzellkultur, *Osteologie* 1995b; 4, 1-6

- 175. Wilke A, Orth J, Lomb M, et al.**  
Biocompatibility analysis of different biomaterials in human bone marrow cell cultures. *J Biomed Mater Res* 1998; 40: 301-6
- 176. Wilke A, Jäger M, Endres S, et al.**  
Comprehensive biocompatibility testing of a new semirigid titanium spine implant in vitro. *Eur J Trauma* 2002; 28: 279–88
- 177. Williams DF**  
Titanium and titanium alloys. In: Biocompatibility of clinical implant materials. ed. Williams, DF, Volume I, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida 1981
- 178. Williams DF**  
Consensus and definitions in biomaterials. Implant materials in biofunction, C. de Putter, G.L. de Lange, K. de Groot and A.J.C. Lee. *Advances in Biomaterials* 1988, Elsevier Science Publishers B.V., 8: 11-16
- 179. Wright LM, Maloney W, Yu X, et al.**  
Stromal cell-derived factor-1 binding to its chemokine receptor CXCR4 on precursor cells promotes the chemotactic recruitment, development and survival of human osteoclasts. *Bone* 2005; 36: 840-53
- 180. Young MF, Ibarki K, Kerr JM, et al.**  
Molecular and cellular biology of the major non collageneous proteins in bone. *Cellular and Molecular Biology of the bone*, Hrsg. Noda M, Academic Press Inc, New York 1993; 193-200

**181. Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, et al.**

High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A* 2005; 74: 49-58

**182. Ziegler R**

Der Knochen und seine Erkrankungen– Der Dialog zwischen Osteoblasten und Osteoklasten. *Dtsch Med Wochenschr* 1995; 120: 571-572

**183. Zinger O, Zhao G, Schwartz Z, et al.**

Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. *Biomaterials* 2005; 26: 1837-47

## 7 Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Herrn PD Dr. med. M. Jäger für die freundliche Überlassung des Themas. Seine wertvollen Anregungen, stete Unterstützung, seine zu jeder Zeit hilfreichen Impulse und notwendige Geduld haben für das erfolgreiche Gelingen dieser Arbeit einen wesentlichen Beitrag geleistet.

Auch Herrn Prof. Dr. med. R. Krauspe gebührt mein Dank für die Möglichkeit, diese Studie in seiner Klinik durchführen zu können.

Ebenso ganz besonders möchte ich mich bei Fr. S. Lensing-Höhn und Fr. H. Denck aus der Orthopädischen Klinik für deren freundliche Hilfe und Unterstützung bei sämtlichen technisch-praktischen Tätigkeiten besonders im Bereiche der Zellkultur, immunhistochemischen Färbungen bedanken.

Herrn Dr. rer. nat. K. Zanger aus dem anatomischen Institut der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf danke ich herzlich für die Kooperation, Hilfe und Planung bei der Durchführung der rasterelektronenmikroskopischen Analysen sowie bei Herrn Dr. med. F. Witte aus der Orthopädischen Klinik im Annastift der Medizinischen Hochschule Hannover für die Oberflächenanalyse der Prüfkörper.

Bedanken möchte ich mich bei der Firma DePuy Orthopädie Deutschland GmbH, Johnson & Johnson für die Bereitstellung der verwendeten Prüfkörper.

Ein weiterer Dank gilt meiner Familie und Partnerin für die stete Unterstützung und Geduld.