

Vergleichende Untersuchungen zur Zellproliferation, Apoptose  
und Expression nonkollagener Knochenproteine auf Zirkon-  
oxidoberflächen unterschiedlicher physikalischer Genese

**Dissertation**  
**zur Erlangung des akademischen Grades**  
**Dr. med. dent.**

**an der medizinischen Fakultät**  
**der Universität Leipzig**

**eingereicht von**  
**Hannes Kohlweyer,**  
**geboren am 25.09.1982 in Quedlinburg**

**angefertigt am**  
**Zentrum für Zahn-, Mund-, und Kieferheilkunde**  
**der Universität Leipzig**

**Betreuer:**  
**Prof. Dr. med. dent. habil. H.-L. Graf, Poliklinik für Mund-, Kiefer- und plastische**  
**Gesichtschirurgie der Universität Leipzig**  
**Prof. Dr. rer. nat. habil. H. Hilbig, Institut für Anatomie der Universität Leipzig**

**Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 24.04.2012**

# Bibliographische Beschreibung

Name: Kohlweyer, Hannes

## Titel der Arbeit

**Vergleichende Untersuchungen zur Zellproliferation, Apoptose und Expression nonkollagener Knochenproteine auf Zirkonoxidoberflächen unterschiedlicher physikalischer Genese**

Universität Leipzig, Dissertation

74 S., 20 Abb., 13 Diagramme, 4 Tab., 95 Literaturzitate

## Referat:

Die vorliegende Arbeit untersucht neuartige Zirkonoxid-Implantatoberflächen hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Proliferation und Apoptose humaner Knochenzellen, die in einer Knochenzellkultur angezüchtet wurden. Weiterhin erfolgte die Messung der auf den jeweiligen Probekörperoberflächen sezernierten Knochenproteine Bone Sialo Protein, Osteonectin, Osteocalcin und des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ . Die Messungen geschahen am dritten, fünften, siebenten und zehnten Versuchstag.

Die neuartigen Probekörper ZrO\_19 und ZrO\_20 haben einen Titgrundkörper und wurden im PVD-Verfahren mit Zirkoniumdioxid beschichtet. Sie mussten sich dem Vergleich mit dem Positivstandard Ticer und dem Negativstandard Titan unterziehen. Weiterhin fanden ein Probekörper aus reiner Zirkoniumdioxidkeramik (Cercon) und eine SLA-ähnliche geätzte Titanschicht Verwendung.

Am meisten Knochenzellen proliferierten auf Ticer. Die kleinsten Messwerte wurden auf der Ättschicht gemessen. Die Werte von ZrO\_19, ZrO\_20 und von Cercon ähnelten sich stark und siedelten sich zwischen denen von Ticer und denen der Ättschicht an. Die größten Expressionen der Knochenproteine wurden auf Cercon und Ticer nachgewiesen. Die neuartigen Zirkoniumdioxid-Oberflächen begünstigten die Proliferation und Expression von Knochenproteinen in vitro nicht in dem Maße, wie es der Positivstandard Ticer vermochte. Möglicherweise könnten jedoch Variationen der Oberflächenzusammensetzung die biologischen Eigenschaften verbessern. Für Cercon kann eine gute biologische Eignung vermutet werden.

## **I. Gliederung**

## **II. Abkürzungsverzeichnis**

	Seite
<b>1. Einleitung und Zielstellung</b>	<b>1</b>
<b>2. Literatur (Stand der Erkenntnis)</b>	<b>3</b>
2.1 Der menschliche Knochen und die Apoptose	3
2.1.1 Aufbau und Struktur des menschlichen Knochens	3
2.1.2 Knochenbestandteile	3
2.1.3 Knochenzellen	4
2.1.4 Struktur und Arten des Knochengewebes	4
2.1.5 Knochenentwicklung	6
2.1.6 Proteine der extrazellulären Matrix	7
2.1.6.1 Bone Sialo Protein	7
2.1.6.2 Osteocalcin	8
2.1.6.3 Osteonectin	9
2.1.7 Der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$	10
2.1.8 Apoptose und ihr Eingriff in den Zellzyklus	10
2.1.8.1 Apoptose im Vergleich zur Nekrose	11
2.1.8.2 Markierung von Zellen für die Apoptose	12
2.1.8.3 Caspasen	12
2.1.8.4 Signalwege der Apoptose	13
2.2 Implantatwerkstoffe	15
2.2.1 Titan als Implantatwerkstoff	15
2.2.2 Oberflächenmodifizierungen von Titan	16
2.2.3 Zirkoniumdioxid in der Zahnmedizin und der Implantologie	18

2.2.4	Eigenschaften von Zirkoniumdioxid	19
2.3	Phasen der Einheilung dentaler Implantate und Ergebnisse der biologischen Prüfung der Implantatoberflächen	21
2.3.1	Phasen der Einheilung dentaler Implantate	21
2.3.1.1	Osseoinduktion	21
2.3.1.2	Osseokonduktion	22
2.3.1.3	Osseointegration	23
2.3.2	In-vitro-Testergebnisse an Titan- und ZrO <sub>2</sub> -Oberflächen	23
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>26</b>
3.1	Chemikalien, Lösungen, Antikörper und labortechnisches Zubehör	26
3.2	Methoden	28
3.2.1	Materialgewinnung	28
3.2.2	Zellanzucht	29
3.2.3	Herstellung der ersten Subkultur	29
3.2.4	Herstellung der zweiten Subkultur	30
3.3	Versuchsablauf	30
3.3.1	Beschreibung der Probekörper	31
3.3.2	Versuchsvorbereitung	35
3.3.3	Versuchsdurchführung	35
3.3.4	Immunhistochemischer Nachweis	36
3.3.5	Untersuchung Apoptose	37
3.4	Versuchsauswertung	38
3.4.1	Interaktive Zellzählung	39
3.4.2	Grauwertanalyse	39

<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	40
4.1	Zellzählung	40
4.2	Statistische Sicherung der Ergebnisse der Proliferation	45
4.3	Vergleich der Zellanzahlen mit den relativen Grauwerten	47
4.4	Grauwertanalyse von Bone Sialo Protein, Osteocalcin, Osteonectin und Transforming Growth Factor – $\beta$	50
4.4.1	Grauwertanalyse von BSP	51
4.4.2	Grauwertanalyse von OC	52
4.4.3	Grauwertanalyse von ON	53
4.4.4	Grauwertanalyse von TGF- $\beta$	55
4.5	Untersuchung des apoptotischen Verhaltens	56
4.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	58
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	60
5.1	Fehlerdiskussion	60
5.2	Aufspannen des Messrahmens	61
5.3	Diskussion der Messergebnisse	61
5.4	Ausblick	69
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	71
	<b>Literaturverzeichnis</b>	nach 74

## Abkürzungsverzeichnis

AIF	Apoptose inhibierender Faktor
Apaf-1	Apoptose-Protease-Aktivierungsfaktor 1
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSP	Bone Sialo Protein
BZ	Belichtungszeit
CAD/CAM	Computer-Aided Design/Computer-Aided Manufacturing
CPTi	Commercially Pure Titanium
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
GW	Grauwert
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
HIP	Hot Isostatic Pressing
IAP	Inhibitors of Apoptosis
OC	Osteocalcin
ON	Osteonectin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PVD	Physical Vapour Deposition
RGD	Aminosäuresequenz aus Arginin, Glycin und Aspartat
SLA	Sandblasted and Acid Etched
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
Y-TZP	Yttrium-stabilisierte Zirkoniumdioxidkeramik
ZrO <sub>2</sub>	Zirkoniumdioxid

## 1. Einleitung und Zielstellung

Das Interesse der Industrie und Wissenschaft an der Erforschung neuer Oberflächentechnologien nahm in den letzten Jahrzehnten stetig zu. Heute existiert kaum noch ein industrielles Produkt, welches keine Oberflächenbehandlung erfährt. Modifiziert werden hierbei die funktionellen Eigenschaften des Grundmaterials wie Härte, Korrosions- und Verschleißbeständigkeit, ebenso wie die Komponenten Farbe, Haptik oder Glanz. Durch die Weiterentwicklungen von Werkstoffen und Schichten mit innovativen elektronischen, katalytischen oder biologischen Prozessen werden viele Produkte erst einsetzbar und marktfähig gemacht. Die Eigenschaften der Oberflächen sind hierbei durch zahlreiche physikalische und chemische Prozesse gekennzeichnet. Eine Oberfläche ist in der Lage, verschiedene Medien voneinander zu trennen, wobei sie das angrenzende Medium unmittelbar beeinflusst. Das Wissen um diesen Effekt hat in der Medizin eine außerordentliche Bedeutung, denn therapeutisch in den Körper eingebrachte Materialien kommen in direkten Kontakt mit menschlichem Gewebe. Hierbei ist die Akzeptanz des Fremdstoffs durch den Körper erwünscht, ohne dass zelluläre Mechanismen von statten gehen, die eine Abstoßungsreaktion erzeugen.

Diese Überlegung ist die Grundlage des hier vorgelegten Versuchs, bei dem neuartig hergestellte Oberflächen zahnärztlicher Implantate, die zum Zahnersatz in den Kieferknochen eingebracht werden, untersucht wurden. Die Zielstellung ist es, neu formulierte Zirkoniumdioxid-Oberflächen unterschiedlicher technologischer Genese in einem zellkulturbasierten Screening auf die Reaktion kultivierter humaner Knochenzellen hin zu prüfen. Als Referenz dienen im Versuch langjährig bewährte Oberflächenmodifikationen von Titanimplantaten aus dem klinischen Alltag.

Die zahnärztliche Implantologie gewann in den letzten Jahren mehr und mehr an Bedeutung und entwickelte sich zu einer eigenständigen Subdisziplin der Zahnmedizin. Der Informationsdienst Wissenschaft fand heraus, dass allein in Deutschland im Jahr 2009 über eine Million Implantate inseriert wurden. Experten gehen für die folgenden Jahre von einer ähnlichen Stückzahl aus. Zunehmend stellt die Implantatversorgung auch für junge Patienten eine interessante Therapiealternative zu herkömmlichen Methoden wie der Anfertigung von Kronen oder Brücken zum Zahnersatz dar.

Die Wahrscheinlichkeit der komplikationslosen Einheilung ist heute sehr hoch und Überlebenszeiten der Implantate von mehreren Jahrzehnten sind möglich (Astrand et al., 2008).

Seit langer Zeit kommen unterschiedliche Oberflächenmodifikationen des Werkstoffs Titan mit großem klinischem Erfolg zum Einsatz. Bereits 1965 führte Branemark die weltweit erste Implantatoperation mit einem Titanimplantat durch (Spiekermann, 1995). Dieser Werkstoff hat sich aufgrund seiner biologischen und physikalischen Eigenschaften bewährt, allerdings kann es bei einem Verlust an Hart- und Weichgewebe zu Problemen im Bereich der Rot-Weiß-Ästhetik kommen, dem optischen Erscheinungsbild von Zahnfleisch und Zahn. Der Rückgang von Knochen und Zahnfleisch stellt eine schwerwiegende Komplikation in der Implantologie dar, ist aber zu einem gewissen Teil auch natürlichen Prozessen unterworfen, die sich durch „länger werdende“ Zähne im Alter zeigen. Dies kann dann zu einer Freilegung oder einem Durchschimmern der metallfarbenen Implantatschulter führen, was eine erhebliche ästhetische Beeinträchtigung für den Patienten bedeutet.

Zurzeit befinden sich bereits zahnfarbene vollkeramische Implantatsysteme aus Zirkoniumdioxid auf dem Markt, die bei diesem Problem Abhilfe schaffen sollen. Sie haben allerdings gegenüber Titan entscheidende Nachteile hinsichtlich ihrer physikalischen Eigenschaften und können derzeit Titanimplantate nicht ersetzen. Die im Versuch verwendeten Implantatoberflächen wurden in einem neuartigen Verfahren mit Zirkoniumdioxidkeramik beschichtet. Hintergrund dieses Gedankens war es, die positiven physikalischen Eigenschaften von Titan mit der guten Ästhetik von Zirkoniumdioxid zu verbinden. Im Falle des Rückgangs von Zahnfleisch und Knochen wäre somit wie bei vollkeramischen Implantaten nicht der metallene Implantatteil, sondern eine zahnfarbenen Implantatschulter sichtbar.

Untersucht wurden die bei der Osseointegration proliferierenden Knochenzellen und deren Expression der Knochenproteine Bone Sialo Protein, Osteocalcin, Osteonectin und des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ . Diese wirken entscheidend bei der Implantateinheilung mit und sind essentiell für die Bildung eines stabilen Implantat-Knochen-Kontaktes. Zudem erfolgte die Zählung apoptotischer Zellpartikel auf jeder Oberfläche.

## **2. Literatur (Stand der Erkenntnis)**

### **2.1 Der menschliche Knochen und die Apoptose**

#### **2.1.1 Aufbau und Struktur des menschlichen Knochens**

Die wesentlichen Aufgaben des Knochens im menschlichen Organismus bestehen in der Stützfunktion, der Formgebung des Körpers, der Schutzfunktion für innere Organe und der Bildung des passiven Bewegungsapparates, an dem die Bestandteile des aktiven Bewegungsapparates (Muskeln und Sehnen) ansetzen. Des Weiteren dient der Knochen als Mineralspeicher und beherbergt das Knochenmark als Produktionsstätte des Blutes.

#### **2.1.2 Knochenbestandteile**

Knochen ist aus Knochenzellen, Interzellulärsubstanz und aus Fasern des Kollagen Typ I aufgebaut. Die Interzellulärsubstanz besteht, bezogen auf das Trockengewicht, zu 67-70% aus anorganischen Bestandteilen und zu 22-23% aus organischen Bestandteilen. Der restliche Anteil wird durch Wasser gebildet.

Der anorganische Teil der Interzellulärsubstanz ist in die organische Knochengrundsubstanz eingelagert und für die Druckfestigkeit verantwortlich. Er setzt sich aus Kalziumphosphatkristallen (Hydroxylapatit) und aus amorphem Kalziumphosphat zusammen. Daneben kommen einige Ionen von Magnesium, Kalzium, Natrium, Karbonat und Zitrat vor.

Die organische Matrix wird zu über 90% aus vollständig mineralisiertem Kollagen gebildet, welches für die Elastizität des Knochens verantwortlich ist. Der Rest sind amorphe Interzellulärsubstanzen, vor allem Glykosaminoglykane und spezielle Proteine, wie zum Beispiel die extrazellulären Matrixproteine Osteonectin (ON), Osteocalcin (OC) und Bone Sialo Protein (BSP).

Bezogen auf das Feuchtgewicht des Knochens wird bis zu 25% Hydratationswasser von Proteoglykanen gebunden. Das Flüssigkeitskompartiment ist wichtig für die Ernährung und den Ionenaustausch im Knochen.

### **2.1.3 Knochenzellen**

Zu den Knochenzellen zählt man Vorläuferzellen, Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten. Die sich aus Vorläuferzellen (pluripotente mesenchymale Stammzellen, Osteoprogenitorzellen) entwickelnden Osteoblasten sind reich mit Organellen zur Proteinsynthese ausgestattet und synthetisieren und sezernieren die organischen Knochenbestandteile, das Osteoid. Sie wandeln sich in Osteozyten um, wenn sie sich selbst in die Knochenmatrix eingemauert haben. Dabei liegen sie in sogenannten Lakunen und sind untereinander durch Fortsätze und gap junctions verbunden. Es erfolgt ein interzellulärer Stoffaustausch.

Die letzte Gruppe innerhalb der osteogenen Zellen bilden die Osteoklasten. Diese sind mehrkernige Riesenzellen, welche für den Abbau der organischen Knochenmatrix und über Demineralisation für die Steuerung des Kalzium- und Phosphathaushaltes verantwortlich sind. Die Osteoklasten entstehen aus Promonozyten und bauen durch Sezernierung von Säure und Proteasen den Knochen ab.

### **2.1.4 Struktur und Arten des Knochengewebes**

Das Knochengewebe wird von einer Knochenhaut, dem Periost, überzogen. Das Periost besteht aus zwei Schichten: dem Stratum fibrosum und dem Stratum osteogenicum. Im Stratum fibrosum befinden sich zahlreiche Kollagenfaserbündel, die in die Hartschicht einstrahlen. Die Aufgabe dieser Schicht ist eine größtmögliche Verteilung der Zugkräfte auf den Knochen. Das Stratum osteogenicum ist stark kapillarisiert und dient der Ernährung des Knochens. Von ihm geht das Knochenwachstum aus.

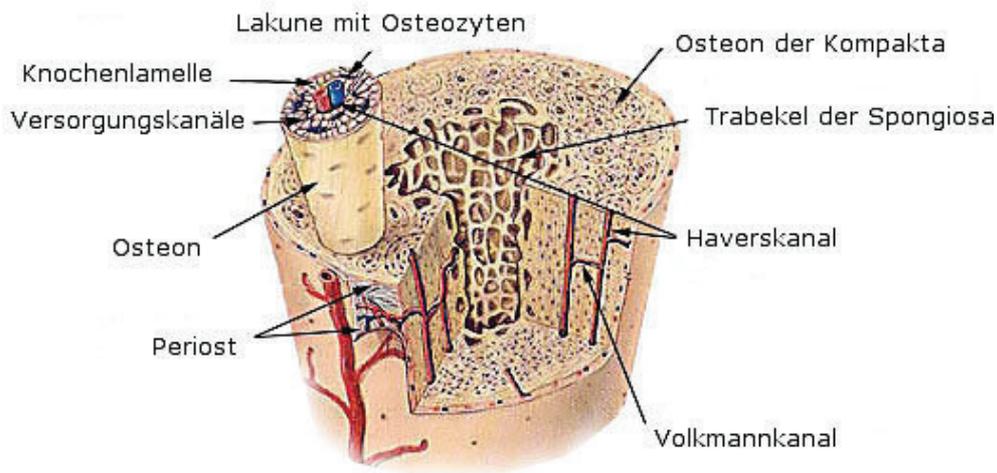
Bei der Knochenstruktur unterscheidet man eine äußere Kompakta und eine innere Spongiosa. Die Substantia compacta ist sehr dicht und umgibt die Substantia spongiosa. Sie besteht aus verschieden gestalteten und ausgerichteten Knochenlamellen, die die Interzellulärsubstanz des Knochengewebes repräsentieren. Zwischen den Lamellen liegen die Osteozyten.

Die Spongiosa bildet den inneren Knochenanteil und besteht aus einem Netzwerk von Knochenbälkchen (Trabekeln). Sie umschließt die knochenmarkhaltigen Räume (hämoretikuläres Knochenmark und Fettmark). Die Trabekel sind in der Lage, ihre Dichte und Ausrichtung je nach Beanspruchung durch die Vektoren Druck und Zug zu ändern.

Histologisch lassen sich zwei Knochenarten unterscheiden: der Geflechtknochen und der Lamellenknochen. Bei jeder Knochenneubildung und bei der sekundären Knochenheilung wird das Stadium des Geflechtknochens durchlaufen. Dieser wird dann durch Lamellenknochen ersetzt.

An einigen Lokalisationen kommt jedoch auch noch im Erwachsenenalter Geflechtknochen vor (Janqueira und Carneiro, 1991). Dies ist der Fall im massiven Bereich des Felsenbeins, um die Strukturen des Innenohrs herum, in den Synostosen der Schädelknochen und im Bereich des kompakten Knochengewebes, wo kräftige Bänder verankert sind.

Typisches Strukturmerkmal des Geflechtknochens sind grobe ungerichtete Bündel kollagener Fasern und relativ viele Osteozyten. Das Knochengewebe ist reich vaskularisiert und durch hohe Zugfestigkeit und Biegungeelastizität gekennzeichnet. Beim Remodelling entsteht durch funktionellen Umbau und Kalzifizierung des Geflechtknochens der Lamellenknochen. Er ist den jeweiligen Funktionsanforderungen optimal angepasst und ist charakterisiert durch Knochenlamellen und Knochenbälkchen. Die Knochenlamellen bestehen aus parallel verlaufenden Kollagenfasern. Unterschieden werden Generallamellen, Speziallamellen und Schaltlamellen. Die Generallamellen liegen an der inneren beziehungsweise äußeren Oberfläche des Knochens. Die Sharpey'schen Fasern der Sehnen und Bänder strahlen in die äußere Generallamelle ein. Die inneren Generallamellen setzen sich in die Spongiosa fort. Die Speziallamellen liegen zwischen den Generallamellen. Sie bestehen aus spiralartig verlaufenden Kollagenfaserbündeln mit wechselnder Richtung. Diese sind konzentrisch um den Zentralkanal (Haverskanal) gruppiert und bilden mit ihm das Havers-System (Osteon). Im Haverskanal findet man Blutgefäße, Nerven und Knochenvorläuferzellen vor. Die Osteozyten liegen in Knochenhöhlen meist an der Grenze einer Speziallamelle. Die Schaltlamellen sind Reste eines Havers-Systems und füllen die Räume zwischen den neu gebildeten Havers-Systemen aus. Sie kommen in der Spongiosa der Epiphyse vor.



**Abbildung 1:** Strukturelle Darstellung des Knochens (Abbildung modifiziert, Homepage Wikipedia, Quelle: U.S. National Cancer Institute and End Results (Seer) Programm)

### 2.1.5 Knochenentwicklung

Die Knochenentwicklung ist ein komplizierter Vorgang, an dem eine Vielzahl von Genen und Signalwegen auf direktem und indirektem Weg beteiligt sind. Grundsätzlich können zwei verschiedene Mechanismen der Knochenentstehung unterschieden werden: die desmale und die chondrale Ossifikation.

Die desmale Ossifikation ist verantwortlich für die Entstehung der perichondralen Knochenmanschette bei der chondralen Ossifikation. Weiterhin werden einige platte Knochen durch die desmale Ossifikation gebildet. Das Knochengewebe entsteht direkt aus dem Mesenchym. Das Mesenchym verdichtet sich und wird stark kapillarisiert. Die Mesenchymzellen unterliegen einer Vergrößerung und werden vermehrt mit Zellorganellen (Mitochondrien, Golgi-Apparat, raues endoplasmatisches Retikulum) ausgestattet. Sie differenzieren sich zu Osteoblasten. Jene produzieren Tropokollagene und Proteoglykane, welche in den Interzellularraum abgegeben werden. Extrazellulär entstehen Kollagenfasern, die in eine homogene Grundsubstanz, das Osteoid, eingebettet sind. Die Osteoblasten mauern sich selbst ein und werden zu Osteozyten. Die entstehenden Osteoidspangen verkalken und werden später zu Knochenstrahlen, die schließlich ein aus Knochenbälkchen bestehendes Knochengüst bilden.

Bei der chondralen Ossifikation wird der Knochen über einen Umweg aus Knorpel gebildet. Sie ist typisch für die Entwicklung langer und kurzer Knochen. Die chondrale Ossifikation wird in eine perichondrale (desmale) und eine enchondrale

Phase unterteilt. Das Ausgangsgewebe für die chondrale Ossifikation ist ein Modell aus hyalinem Knorpel. Dieses wird im Bereich der Epiphyse und bei platten Knochen durch die enchondrale Ossifikation ersetzt. Das Knorpelgewebe wird vaskularisiert. Anschließend ersetzen Vorstufen von Chondroklasten und Osteoblasten den Knorpel durch Osteoid, welches verkalkt und somit das sekundäre Ossifikationszentrum bildet.

Im Bereich der Diaphyse der Röhrenknochen ist der enchondralen Ossifikation eine perichondrale Ossifikation vorgeschaltet. Es kommt zur Ausbildung einer perichondralen Knochenmanschette (primäres Ossifikationszentrum) an der Oberfläche der Diaphyse durch sich aus mesenchymalen Stammzellen entwickelnde Osteoblasten. Aus dem Perichondrium wird das Periost, welches durch Apposition weiter wächst. Das Stoffwechselverhältnis verschlechtert sich im Knorpelinneren, so dass die Knorpelzellen hypertrophieren und blasig degenerieren. Aus dem Periost abwandernde Mesenchymzellen bahnen sich zusammen mit Blutgefäßen und Nerven einen Weg durch das perichondrale Knochengewebe zum Blasenknorpel und differenzieren sich zu Osteoklasten, Chondroklasten und Osteoblasten. Die Chondroklasten beginnen mit dem Abbau des Knorpels. Osteoblasten lagern sich an und synthetisieren Osteoid, welches zu Knochengewebe wird.

### **2.1.6 Proteine der extrazellulären Knochenmatrix**

#### **2.1.6.1 Bone Sialo Protein**

Das Bone Sialo Protein (BSP) ist ein glykolisiertes, sulfatiertes Phosphoprotein, das etwa 12% der nonkollagenen Proteine der Knochenmatrix ausmacht (Fisher et al., 1983). Hauptbildungsort sind die im Knochen vorkommenden Osteoblasten.

BSP gehört zur Familie der SIBLING-Proteine (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein), zu denen ebenfalls Osteopontin (OP), Dentin Matrix Protein 1 (DMP1), Dentin Sialophosphoprotein (DSPP) und Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein (MEPE) gezählt werden. Es ist wahrscheinlich, dass diese Proteine Schlüsselproteine in der Mineralisation des Knochen- und Dentingewebes sind (Qin et al., 2004), da Mutationen ihrer Gene dramatische phänotypische Veränderungen im Mineralisationsprozess hervorrufen (Xu et al., 1998; Feng et al., 2002). Als Folge entstehen Defekte in der Dentinogenese, der Entstehung des Knorpels und der kraniofazialen Entwicklung. Die Osteozyten zeigen Abnormalitäten in der Morphologie, was zur Beeinträchtigung des Mineralisationsprozesses führt.

BSP verfügt über Glutaminsäurereste und ein Arginin-Glycin-Aspartat-Motiv (RGD), wodurch die Bindung von Zelloberflächenintegrinen und Hydroxylapatit möglich ist. Es wird vermutet, dass BSP ein wichtiges Adhäsionsmolekül in mineralisierenden Geweben ist, weil es die Bindung zwischen verschiedenen Zellen und Substraten mittels RGD-abhängiger und RGD-unabhängiger Mechanismen fördert (Oldberg et al., 1988). Weiterhin ist eine Bedeutung als Nucleator biologischer Hydroxylapatitkristalle wahrscheinlich. BSP ist mit der Knochenmatrix assoziiert und wird vor und während der Mineralisation in der Matrix gebildet. Bei der malignen Entartung verschiedener Gewebe konnte ebenfalls eine erhöhte Expression von BSP nachgewiesen werden (Waltregny et al., 1998; Bellahcene et al., 1996). Der zugrundeliegende Prozess ist jedoch noch unklar.

### **2.1.6.2 Osteocalcin**

Osteocalcin (OC) ist ein kleines Protein der extrazellulären Knochenmatrix, welches etwa 15% der nichtkollagenen Knochenbestandteile ausmacht. Es wird durch Osteoblasten, Odontoblasten und Megakaryozyten gebildet (Campion et al., 1989; Thiede et al., 1994; Ducy et al., 1996).

Die genaue Funktion des Osteocalcins in vivo ist noch unbekannt (Seibel, 2000), jedoch ist eine zentrale Rolle bei der Knochenbildung aufgrund der hohen Affinität zu mineralischen Knochenbestandteilen wahrscheinlich (Ismail et al., 1986). Osteocalcin verfügt über drei Gamma-Carboxyglutaminsäurereste, die posttranslational gebildet werden und vermutlich für die Bindung von Kalziumionen und Hydroxylapatit verantwortlich sind (Ismail et al., 1986). Diese posttranslationale Modifikation ist Vitamin K-abhängig. Osteocalcin wird während der Phase der Matrixmineralisation gebildet und gilt daher als ein spezifischer Marker für die Osteoblastenfunktion. 80% des neu synthetisierten Osteocalcins wird direkt im Knochen gespeichert. Die restlichen 20% gelangen in die Zirkulation (Seibel et al., 1993). Der Serumgehalt spiegelt die Aktivität der Umbauvorgänge im Knochen wieder und korreliert gut mit der histomorphometrisch bestimmten Knochenbildungsrate (Delmas et al., 1985).

Die Transkription des Osteocalcin-Gens wird durch Vitamin D, Parathormon, Glukokortikoide und verschiedene Wachstumshormone moduliert (Colombo et al., 1993). Auf dem Promoter für Osteocalcin ist ein Vitamin D-Responsive-Element nachweisbar. Der Serumspiegel des Osteocalcins ist nicht konstant und unterliegt einer zirkadianen Rhythmik, die auf die physiologische Varianz des Cortisolspiegels

zurückgeführt wird (Heshmati et al., 1998). Weiterhin verhält er sich linear zu ansteigenden Konzentrationen an Kalzium und Phosphat. Bei Kindern und Jugendlichen sind in Phasen verstärkten Wachstums sehr hohe Serumspiegel nachweisbar.

### **2.1.6.3 Osteonectin**

Osteonectin (ON) wurde erstmals von Termine et al. (1981) als eines der wichtigsten, nonkollagenen extrazellulären Proteine im humanen und bovinen Knochen beschrieben. Osteonectin ist ein Glycoprotein und macht zirka 15% der nichtkollagenen Proteine der extrazellulären Matrix aus.

Später stellte sich heraus, dass Osteonectin mit SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteines), einem durch Endothelzellen und Fibroblasten sekretierten Protein, und BM-40, einem Protein, welches aus dem Basalmembranproduzierenden Engelbreth-Holm-Swarm-Tumor (EHS-Tumor) isoliert werden konnte, identisch ist (Mann et al., 1987). Osteonectin wird von vielen verschiedenen Zelltypen wie Endothelzellen, Fibroblasten, Osteoblasten, Chondrozyten und glatten Muskelzellen sezerniert. Es ist wahrscheinlich, dass Osteonectin an den Prozessen der Zelladhäsion, Zellproliferation, Zellmigration sowie am Gewebsumbau und an der Modulation der Zytokinenaktivität beteiligt ist. Hierbei beeinflusst es die Zellmorphologie durch Reduktion der Anzahl fokaler Kontakte und setzt die Adhäsion zum Substrat und zu benachbarten Zellen herab (Lane et al., 1990). Osteonectin bindet Kalzium und interagiert mit zahlreichen Makromolekülen der extrazellulären Matrix wie Kollagen I, Kollagen II, Kollagen III, Kollagen IV, Kollagen V, Vitronectin und Thrombospondin.

Bei Osteonectin-Knock-out-Mäusen wurde ein vermehrtes Auftreten der Knochenkrankheit Osteoporose und des Grauen Stars (Katarakt) festgestellt. Weiterhin konnte eine verminderte Dehnbarkeit der Haut und eine Verschlechterung der Wundheilung nachgewiesen werden (Framson et al., 2004). Erhöhte Level an Osteonectin bei Tumoren der Brust, des Gehirns, der Prostata und des Ösophagus sowie bei Melanomen und Gliomen lassen auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression von Osteonectin und der Malignität von Tumoren schließen (Framson et al., 2004; Bos et al., 2004).

### **2.1.7 Der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$**

Die Proteine der Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )–Familie sind eine große Gruppe von Wachstumsfaktoren, welche eine Vielzahl biologischer Antworten vermitteln. Fast alle Zelltypen des Körpers sind an der Synthese von TGF- $\beta$  beteiligt (Roberts et al., 1993). Nach Löffler et al. (2003) können die TGF- $\beta$ -Proteine in drei Gruppen eingeteilt werden:

- TGF- $\beta$ -Isoformen (TGF- $\beta$ 1 bis TGF $\beta$ 5),
- Gruppe der Bone morphogenetic proteins (BMP),
- Aktivine.

Bei der Entdeckung von TGF- $\beta$  nahm man an, dass die Funktion des Proteins auf die Tumorentwicklung beschränkt sei. Heute ist allerdings klar, dass eine Vielzahl physiologischer Prozesse durch die Familie der TGF- $\beta$ -Proteine gesteuert und reguliert werden.

Mit Hilfe von Knock-out-Mäusen konnte festgestellt werden, dass TGF- $\beta$  die Proliferation epithelialer und mesenchymaler Zellen induziert. Es ist aber ebenfalls dazu in der Lage, deren Proliferation zu inhibieren und die Apoptose zu induzieren (Kingsley, 1994). Im Jahr 1993 stellten Kulkarni et al. bei TGF- $\beta$ <sub>1</sub>-Knock-out-Mäusen multifokale Entzündungsherde fest, was einen Beweis für die modulativen immunologischen Funktionen von TGF- $\beta$  darstellte. Weiterhin ist TGF- $\beta$  an den Prozessen der Angiogenese und der Produktion extrazellulärer Matrix beteiligt. Es ist nachgewiesen, dass die Dysregulation oder Störung seiner Aktivität zu zahlreichen pathologischen Veränderungen, inklusive der Tumorgenese führen kann (Siegel et al., 2003). Neben der Isoform TGF- $\beta$ <sub>1</sub> kommen in Säugetieren auch noch die Isoformen TGF- $\beta$ <sub>2</sub> und TGF- $\beta$ <sub>3</sub> vor.

### **2.1.8 Apoptose und ihr Eingriff in den Zellzyklus**

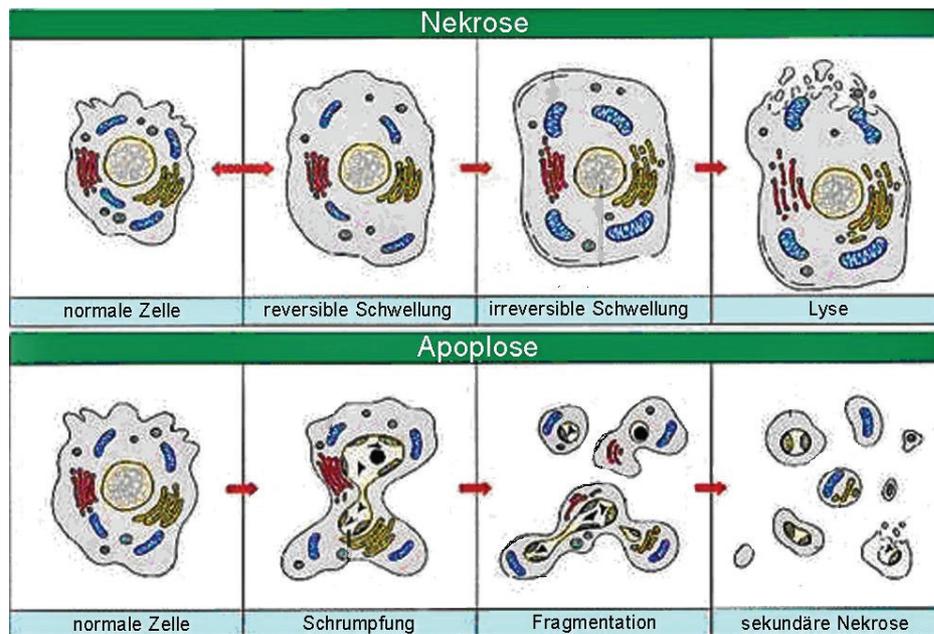
Die Apoptose (griechisch: Niedergang) ist ein genetisch kodierter, physiologischer Prozess zur Eliminierung von Zellen, der auch als „programmierter Zelltod“ bezeichnet wird (Lokshin und Williams, 1965; Kerr et al., 1972). In einer lebenden Zelle sind alle proapoptotischen Moleküle zu finden. Täglich werden in unserem Organismus Millionen von Zellen eliminiert, die infiziert, transformiert, verletzt oder einfach überflüssig sind. Der Vorgang der Apoptose unterscheidet sich somit deutlich

vom Vorgang des pathologischen Zelltods, der Nekrose (Nicotera und Melino, 2004). Die Apoptose ist fein reguliert. Eine Störung innerhalb ihres Ablaufs führt zu schwerwiegenden Folgen. Es ist bekannt, dass bei Krankheiten wie Morbus Parkinson oder AIDS eine verstärkte Apoptose stattfindet (Petit et al., 2005; Gougeon, 2003), wohingegen bei malignen Transformationen von Zellen die apoptotische Aktivität gestört ist (Vermeulen et al., 2003). Inaktivierende Mutationen proapoptotischer Gene sowie Überexpressionen antiapoptotischer Faktoren führen zu unkontrolliert proliferierenden Zellen. Diese Zellen sind resistent gegenüber apoptotischer Stimulanz und haben grundlegende Bedeutung für die Entstehung von Resistenzen gegenüber Zytostatika und immuntherapeutischen Ansätzen.

### **2.1.8.1 Apoptose im Vergleich zur Nekrose**

Apoptose und Nekrose können unter pathologischen Bedingungen koexistieren und ineinander übergehen. Beide Prozesse unterscheiden sich jedoch essentiell. Mechanische Verletzungen, ein Mangel an Sauerstoff, Ischämie oder eine bakterielle Infektion können Ursachen für den nekrotischen Niedergang einer Zelle darstellen. Wie in Abbildung 2 abgebildet, kommt es zu einer irreversiblen Schwellung der Zelle mit anschließender Ruptur der Zellmembran. Wasser tritt in die Zelle ein und Zytosol strömt nach extrazellulär unter Hervorrufung entzündlicher Reaktionen.

Im Unterschied zur Nekrose verläuft die Apoptose ohne das Auftreten von Entzündungszeichen. Es kommt zur Schrumpfung der Zelle mit Kondensation des Chromatins. Die Zelle wird fragmentiert und es entstehen apoptotische Körper, die durch Makrophagen beseitigt werden.



**Abbildung 2:** Morphologische Merkmale des apoptotischen und nekrotischen Zelltods (aus Boehringer Mannheim Apoptosis Guide; Trauth und Keesey, 1995)

### 2.1.8.2 Markierung von Zellen für die Apoptose

Phosphatidylserin ist ein wichtiges Phospholipid, welches überwiegend an der Innenseite einer Zellmembran gebunden ist. An der Außenseite befinden sich vor allem Phospholipide mit Cholin-Kopfgruppen. Dieses Verhältnis wird durch eine Translokase aufrechterhalten (Zwaal und Schroit, 1997). Während der Apoptose kommt es nun zur Inhibition dieser Translokase. Zusätzlich sorgt eine „Flippase“ für den Austausch der Phospholipide. Jener Prozess führt zu einer Anhäufung von Phosphatidylserin an der Außenseite der Zellmembran, welches die Markierung der Zelle für Makrophagen darstellt (Botto, 2004).

### 2.1.8.3 Caspasen

Wesentliche Elemente der Apoptose sind neben den Proteinen der BCL<sub>2</sub>-Familie und den Mitochondrien die Caspasen, welche auch als ausführende Elemente der Apoptose bezeichnet werden können. Caspasen sind spezifische Cystein-abhängige, Aspartat-spaltende Proteasen, die in inaktiver Form als Procaspasen vorliegen und durch Proteolyse aktiviert werden (Thornberry und Lazebnik, 1998). Sie sind Teile einer Caspasenkaskade, die durch gegenseitige Aktivierung gekennzeichnet ist. Apoptotisch relevante Caspasen werden in Initiator- und Effektor-Caspasen unterschieden (Shi, 2002). Die Effektor-Caspasen übernehmen die Ausführung des Todesprogramms, indem sie spezifisch eine Reihe bestimmter Proteine der Zelle

proteolysieren. So kommt es zur Degradierung von Teilen des Zytoskeletts, des Myosins und indirekt der DNA des Zellkerns, was letztlich zum Zelluntergang führt. Die IAPs (Inhibitors of Apoptosis) stellen eine Gruppe von Proteinen dar, die die Fähigkeit besitzen, über direkte Bindung an der aktiven Domäne der Caspasen eine Inhibition dieser zu erzeugen (Wright und Duckett, 2005). IAPs werden in verschiedenen hämatologischen und soliden Tumoren im Vergleich zu Normalgewebe stärker exprimiert und haben prognostische Relevanz bei malignen Erkrankungen (Tamm et al., 2000).

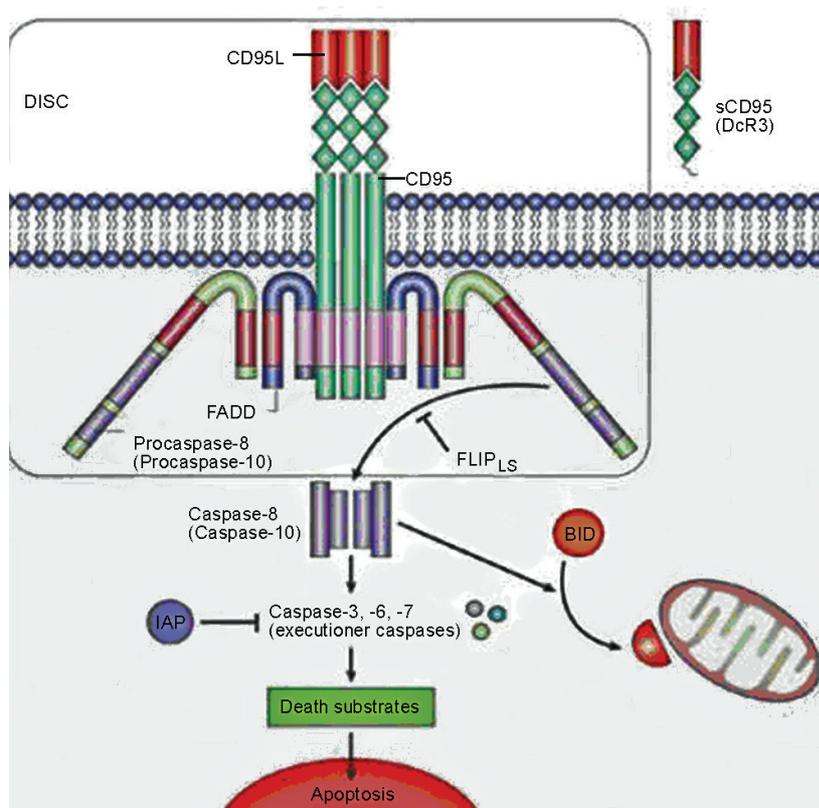
### **2.1.8.4 Signalwege der Apoptose**

Abhängig vom initialen Reiz werden zur Ausführung der Apoptose im Wesentlichen zwei Signalwege eingeschlagen: der externe und der interne Signalweg. Beide sind über Querverbindungen miteinander verbunden und weisen oft eine gleiche Endstrecke auf. In Abbildung 3 sind die Signalwege der Apoptose schematisch dargestellt. Der extrinsische Signalweg verläuft über die Todesrezeptoren TRAIL, Fas oder TNFR1 (Sartorius et al., 2001), die eine Untergruppierung innerhalb der TNF $\alpha$ -Rezeptorfamilie bilden. Über die Bindung entsprechender Liganden (z.B. Fas-Ligand) kommt es zur Trimerisierung des Rezeptors und zur Bindung von Adaptermolekülen, an die sich schließlich die Procaspase-8 anlagert. Dieser Komplex wird auch als Tod-induzierender Signalkomplex (death-inducing signaling complex, DISC) bezeichnet. Die nun aktivierte Caspase-8 kann in den Zellen vom Typ I direkt Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6, -7) aktivieren, während in Typ II-Zellen der intrinsische Apoptoseweg über die Modifizierung von Bid zu tBid (truncated Bid) eingeleitet wird.

Die Mitochondrien stellen die zentrale Kontrolleinheit des intrinsischen Signalwegs (mitochondrialer Weg) dar. Dieser kann beispielsweise durch den Entzug von Wachstumsfaktoren oder durch Interaktionen mit dem extrinsischen Signalweg ausgelöst werden. Nach dem Zusammenbruch der mitochondrialen Membran kommt es zur Ausbildung eines Apoptosoms, einem Komplex bestehend aus Apaf-1- (Apoptose-Protease-Aktivierungsfaktor 1) - Molekülen. Die Anlagerung von Cytochrom C führt zur Konformationsänderung von Apaf-1, welcher daraufhin oligomerisiert (Benedict et al., 2000). Das aktivierte Apoptosom kann nun die Aktivierung der Procaspase-9 initiieren, die wiederum andere Effektorcaspasen aktiviert (Pop et al., 2006). Der Zusammenbruch der Mitochondrienmembran kann durch Toxine, reaktive

Sauerstoffspezies, Strahlung und Energiedysbalancen verursacht werden. Zudem können proapoptotische Proteine der BCL-2-Familie, wie tBid, Bak und Bax (Kroemer und Reed, 2000) eine Porenbildung der Membran verursachen. Durch den Verlust der Membranintegrität kommt es zum Ausstrom proapoptotischer Proteine (Cytochrom C, Smac, Endonuclease G, Apoptose induzierender Faktor (AIF)) ins Zytosol. Cytochrom C und Smac induzieren die Ausbildung des Apoptosoms. Die Endonuclease G und AIF sind an der Spaltung des Chromatins beteiligt (Daugas et al., 2000).

Die Gruppe der BCL-2-Proteine lässt sich prinzipiell in proapoptotische und antiapoptotische Familienmitglieder unterscheiden. Alle BCL-2-Proteine verfügen über mindestens eine Bcl-2-homologe Domäne, mit der sie an Membranen binden können (Hsu und Hsueh, 2000). Das Verhältnis proapoptotischer und antiapoptotischer Bcl-2 Proteine entscheidet, ob die Apoptose ausgelöst wird oder nicht.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Apoptose (aus Nat Rev Cancer. 2002 Apr,2 (4): 277-288)

### Alternative Apoptoseausläufer

Neben der Aktivierung über Todesrezeptoren oder mitochondriale Dysfunktionen können weitere Faktoren die Apoptose auslösen. So führen beispielsweise eine Alzheimer-Erkrankung, Parkinson, neuronale Schäden in Folge einer Ischämie und Diabetes Mellitus zu Stress innerhalb des endoplasmatischen Retikulums, was eine Störung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase und die Aktivierung der Caspasenkaskade zur Folge hat (Ferrari et al., 2002), die den Zelltod verursacht.

Der Transkriptionsfaktor p53 wird nach zellulärem Stress (DNA-Schäden, Hypoxie, mitogene Onkogene) aktiviert. Die proapoptotische Aktivität von p53 kann sowohl über eine Transaktivierung proapoptotischer Proteine des mitochondrialen Signalwegs erfolgen, zum Beispiel die BCL2-Proteine Bax und Bak, Caspase-9 und Apaf-1, als auch durch direkt aktivierende Interaktionen von p53 mit Bax und Mak (Moll et al., 2005).

Weiterhin kann die Ausschüttung von Granzym B, einer Serinprotease, nach Anvisierung bestimmter Zellen durch zytotoxische T-Lymphozyten zur Apoptose führen. Die Enzyme greifen durch Aktivierung der Procaspase-3 und Procaspase-7 direkt in die Caspasenkaskade ein.

## **2.2 Implantatwerkstoffe**

### **2.2.1 Titan als Implantatwerkstoff**

Titan ist inzwischen unbestritten das Material der Wahl für Dentalimplantate, aber auch für Implantate der Orthopädie und der Unfallchirurgie. Titan hat sowohl als reines Leichtmetall (commercially pure Titan, cpTi), als auch als Legierung in Verbindung mit Aluminium und Vanadium als Ti6Al4V eine ausreichende Festigkeit mit einem Elastizitätsmodul von  $E=110$  GPa. Ti6Al4V findet vor allem im medizinischen und weniger im zahnmedizinischen Bereich Einsatz. Die werkstoffkundlichen Unterschiede zwischen cpTi und der Titanlegierung sind jedoch gering.

Die als Passivierung bezeichnete Oxidierung der Titanoberfläche binnen Millisekunden beeinflusst wesentlich die chemischen und biologischen Eigenschaften des Titans. Sie hat ausgeprägte Isolatoreigenschaften. Trotz dieser isolatorischen Eigenschaften ist bewiesen, dass die Titankonzentration im menschlichen Körper in unmittelbarer Nähe zum Implantat eine höhere ist, als in implantatfernen Regionen (Graf, 1997). Schliephake et al. (1991) konnten in ihrer Untersuchung signifikant

erhöhte Titankonzentrationen post implantationem in Lunge, Leber, Milz und Niere nachweisen. Über die pathogene Bedeutung der Titan-Ionen im Organismus besteht jedoch keine Klarheit.

Die Stöchiometrie der Titanoxidschicht kann durch entsprechende Wahl der Potenziale beziehungsweise der Parameter der Plasmabehandlung beeinflusst werden. Zu beachten ist auch die Möglichkeit der Veränderung der Oxidschicht bei der Autoklavierung der Implantate.

Die oxidierte Titanoberfläche ist bioinert, das heißt sie verhält sich träge im umliegenden Gewebe und wird in engem Implantat-Knochen-Kontakt osseointegriert. Die Implantation von Titan und seinen üblichen Verbindungen ruft eine gutes Einwachsverhalten ohne klinische Entzündungserscheinungen hervor (Escalas et al., 1976).

Das günstige Gewicht, die hohe Korrosionsfestigkeit durch eine sich rasch ausbildende Passivierungsschicht sowie seine gute Biokompatibilität bei ausreichender mechanischer Festigkeit führten zur weiten Verbreitung von Titan als Implantatwerkstoff. Somit sind Vergleiche neuerer Implantatwerkstoffe immer gegen den „Goldstandard“ des Reintitanimplantats durchzuführen.

### **2.2.2 Oberflächenmodifizierungen von Titan**

Die Veränderung der Oberflächenstruktur und die chemische Oberflächenmodifizierung beschreiben zwei Ansätze zur Verbesserung der Knochenintegration von Titanimplantaten.

Es ist unbestritten, dass die Topographie der Oberfläche, zum Beispiel Porosität und Rauigkeit, einen großen Einfluss auf die biologische Antwort des Gewebes hat. Während bei Strukturen im Millimeterbereich eher mechanische Effekte für die Stabilität des Verbundes, beispielsweise eine Schraube im Knochen, verantwortlich sind, spielen Strukturen im Mikrometer- und Submikrometerbereich eine entscheidende Rolle für die direkte Anbindung des Knochens an das Implantat. Aufgrund dessen sollte eine ideale Implantatoberfläche rau sein. Man kann sich eine Verzahnung der aufgerauten Oberfläche im Knochen vorstellen. Aufgrund zahlreicher Studien ist heute bekannt, dass raue Titanimplantate eine wesentlich bessere Verankerung im Knochen erzielen als glatt strukturierte, maschinell gedrehte. Eine raue Oberfläche erlaubt neben einer Makro- auch eine Mikroverzahnung mit dem umgebenden Medium (Buser und Belser 1998). Die

gängigsten Verfahren zur Aufrauung der Implantatoberfläche sind das Abstrahlen der Implantatoberfläche mit Partikeln in Kombination mit Säureätzung sowie die anodische Oxidation unter Funkenentladung (ANOF), welche in der Arbeitsgruppe um Bethmann, Graf, Knöfler, Krysmann und Kurze entwickelt wurde (Graf, 1997).

Über den idealen Wert der Oberflächenrauigkeit (Mittenrauwert  $r_a$ ) existieren unterschiedliche Meinungen: So berichtet Hansson (2000) von der stärksten biomechanischen Bindung bei einer Oberflächenrauigkeit von  $1,5\mu\text{m}$ , wohingegen Wennerberg (1996) eine optimale Oberflächenstruktur bei einer Rauigkeit von  $1\mu\text{m}$  und einer gemittelten Rautiefe ( $r_z$ ) von  $11\mu\text{m}$  sieht. Einig ist man sich aber darüber, dass eine aufgeraute Oberfläche eine wesentlich bessere und schnellere Knochenintegration bei signifikant höheren Knochen-Implantat-Kontakten und einer erhöhten mechanischen Verbundfestigkeit erzielt (Buser et al., 1998, Carlsson et al., 1988). Die klassischen Rauheitsparameter genügen allerdings nicht, um das Verhältnis von Festigkeit und Rauheit im Interface darzustellen, da die Oberflächenzusammensetzung ebenso eine Rolle spielt.

Neuere Versuche beschäftigen sich neben den topographischen Oberflächeneigenschaften mit der chemischen Beschichtung der Implantate, auch hinsichtlich einer Bioaktivierung der Oberfläche, um neben dem biomechanischen auch einen biochemischen Verbund zu erzielen. Man möchte hierbei eine Bioaktivität der Implantatoberfläche erreichen. Dies kann durch Oberflächenmodifikationen des Titans erfolgen. Bereits vermarktet wurden Implantate mit Kalziumphosphat-dotierten Oxidoberflächen (zum Beispiel Ticer (ZL Duraplant) und TiUnite (Nobel Biocare)) und fluoridierten Oberflächen (Osseospeed-Oberfläche der Firma ASTRA). So zeigen Kalziumphosphat-beschichtete Titanimplantate einen größeren Knochenkontakt und beschleunigen das Knochenwachstum (Lind et al., 1999, Yang 2001). Dabei können sie an ihrer Oberfläche apatitähnliche Mineralien oder Carbonat-Hydroxylapatit bilden. Hilbig et al. (2005) beschrieben den im Vergleich zum Reintitan verbesserten Verbund zwischen Implantat und Implantatlager einer von Graf (1997) im Verfahren der anodischen Oxidation unter Funkenentladung (ANOF) (Krysmann, 1982) entwickelten Oberflächenstruktur aus Titanoxid mit Hydroxylkeramik (Ticer). Bei der ebenfalls klinisch vielfach erfolgreich angewendeten TiUnite-Oberfläche der Firma Nobel Biocare handelt es sich im Wesentlichen um ein technisches Pendant der Ticer-Oberfläche. Der Grundkörper wird als Anode in einer Elektrolysezelle geschaltet. Der Elektrolyt besteht aus einem Gemisch aus Schwefel- und

Phosphorsäure. Bei Anlegen einer Gleichspannung über 150 V bei Raumtemperatur und Normaldruck entsteht eine Oberfläche, in der Sauerstoff, Schwefel und Phosphor nachgewiesen werden können.

Die Beschichtung mit Hydroxylapatit, einem wesentlichen Bestandteil des Knochens, wird nach wie vor als eine der Erfolg versprechendsten Strategien zur Verbesserung der osseokonduktiven Eigenschaften von Knochenimplantaten angesehen. Es werden aber zunehmend auch andere Kalziumphosphate wie  $\alpha$ - und  $\beta$ -Trikalziumphosphat, Tetrakalziumphosphat, amorphe Kalziumphosphatasen und Fluorapatit untersucht und klinisch getestet (Foitzek und Stamm, 1997).

Die Modifizierung von Titanoberflächen umfasst zudem neben der Beschichtung mit bioaktiven Gläsern und Keramiken wie Kalziumphosphaten auch eine Immobilisierung biologisch aktiver Wirkstoffe wie Proteine, Peptide oder Antibiotika. So beschäftigen sich neueste Untersuchungen mit der Oberflächenmodifizierung durch Beschichtung mit körpereigenen Proteinen der extrazellulären Matrix (Fibronektin, Kollagen oder BSP) (Hilbig et al, 2007; Graf et al, 2009). Weitere Untersuchungen widmen sich einer möglichen, den Implantat-Knochen-Kontakt verstärkenden Wirkung des Wachstumsfaktors BMP-2 (von Walter et al., 2008).

### **2.2.3 Zirkoniumdioxid in der Zahnmedizin und der Implantologie**

Keramische Materialien sind in der Zahnmedizin seit Jahren verbreitet, was auf ihre positiven Materialeigenschaften zurückzuführen ist. Oxidkeramische Werkstoffe sind gekennzeichnet durch eine hohe Biokompatibilität und eine sehr gute Ästhetik. Sie finden in der zahnärztlichen Prothetik Anwendung als Brücken, Einzelkronen, Inlays, Onlays und Verblendschalen. Neben der Rekonstruktion von Zähnen werden sie auch zur Versorgung von Implantaten verwendet. Dabei scheint sich vor allem Zirkoniumdioxid (Zirkonium(IV)-oxid) aufgrund seiner physikalischen und biologischen Eigenschaften zu bewähren. Zu den besonderen Charakteristika zählen eine hohe Biegefestigkeit und Härte sowie seine Risszähigkeit. Es verhält sich bioinert, das heißt die Wechselwirkungen mit dem umliegenden Gewebe sind relativ träge.

Die Entwicklung dentaler CAD/CAM-Systeme (Computer-Aided Design/Computer-Aided Manufacturing) zur Bearbeitung der Keramiken beschleunigte die Etablierung von keramischen Werkstoffen in der Zahnmedizin. In anderen Bereichen der Medizin wird Zirkoniumdioxid als Werkstoff für Gehör-, Finger- und Hüftendoprothesen

verwendet. Aufgrund gestiegener Ansprüche hinsichtlich ästhetisch anspruchsvoller Restaurationen und zunehmender Bedenken bezüglich langfristiger Biokompatibilität metallener Materialien gilt der Untersuchung von Zirkoniumdioxid als Implantatwerkstoff besonderes Interesse. Forciert durch die Industrie, die vor allem mit der Metallfreiheit und der weißen Farbe keramischer Werkstoffe wirbt, entsteht ein regelrechter „Wahn zum Weiß“. Zudem symbolisiert die Farbe Weiß in unserem Kulturkreis Unschuld, spirituelle Reinheit, Weisheit und den ewigen Frieden.

Sandhaus (1971) war einer der ersten, der Erfahrungen mit keramischen Implantaten aus Aluminiumoxid sammelte. Schulte et al. (1978) griffen diese Idee mit dem Tübinger Sofortimplantat auf, welches ebenfalls aus Aluminiumoxid bestand. Unzureichende physikalische Eigenschaften wie eine ungenügende Biegefestigkeit und eine hohe Frakturrate schränkten jedoch das Indikationsgebiet stark ein. Die Hoffnungen der Fachwelt ruhen derzeit auf dem Implantatmaterial Zirkoniumdioxid. Obwohl es an validen, auf hohem Evidenzgrad basierenden klinischen Studien mangelt, befinden sich bereits mehrere aus diesem Werkstoff bestehende Implantatsysteme auf dem Markt (Z-Look3 Implantat von Z-Systems, Zit-Z-Implantat der Firma Ziterion GmbH, u.a.).

### **2.2.4 Eigenschaften von Zirkoniumdioxid**

Aufgrund seiner guten mechanischen und biologischen Eigenschaften zählt Zirkoniumdioxid (Yttrium-stabilisierte Zirkoniumdioxidkeramik (Y-TZP)) seit Jahren zu den besten Werkstoffen in der orthopädischen Endoprothetik für Gelenkflächen. Die Oberfläche zeichnet sich durch elektrische Neutralität und eine gute Beständigkeit gegenüber korrosiven Erscheinungen aus. Weitere Charakteristika sind eine hohe Dichte, feine Partikelgröße, Reinheit und eine gute Bruchfestigkeit sowie Bruchzähigkeit. Trotz verschiedener Modifikationen wie der Einbringung eines Stabilisators (Yttriumoxid) oder dem Nachverdichten nach dem Sinterungsvorgang („hot isostatic pressing“ (HIP)-Prozess), ist das Gefüge aber nie völlig frei von Rissen und Spalten, was zu einer Einschränkung der Möglichkeiten der Oberflächenbearbeitung (Rauigkeit) führt.

Albrektsson et al. entdeckten bereits 1985 in einem Tierversuch, dass auf Oberflächen aus Zirkoniumdioxid eine direkte Apposition trabekulärer Knochenbälkchen ohne Zwischenlagerung einer Bindegewebsschicht stattfinden kann. Akagawa et al. (1993) beobachteten ebenfalls in einem Tierversuch in Bezug

auf Dynamik und Morphologie der Knochengewebsbildung weitgehend entsprechende Eigenschaften von Titan- und Zirkoniumdioxid-Oberflächen. Es konnte ein zu großen Teilen aus reifem Knochen mit wenig Markräumen bestehendes Interface beobachtet werden, welches frei von Entzündungszeichen war. Man kam zu dem Schluss, dass das Zirkoniumdioxid-Interface dem des für Titan beschriebenen Interfaces entspricht.

In einem Tierversuch mit Minischweinen verglichen Gahlert et al. (2007) herkömmliche Titanimplantate mit einer SLA-Oberfläche (Straumann) mit neuartigen Implantaten aus Zirkoniumdioxid bezüglich der Stabilität des Implantat-Knochen-Kontaktes. Hierbei wurden nach erfolgreicher Osseointegration Ausdrehversuche durchgeführt, bei denen sie das Ausdrehmoment ermittelten, welches zum Lösen des Implantats aus dem Kieferknochen führte. Die Titanimplantate erreichten zu jedem Zeitpunkt erheblich größere Ausdrehmomente als die Zirkoniumdioxid-Implantate. Dies spricht für ein stabileres Interface bei Titanimplantaten zum jeweiligen Versuchszeitpunkt.

Andriotelli et al. untersuchten 2009 in einem Modellversuch die Bruchfestigkeit von Zirkoniumdioxid-Implantaten. Es wurden 120 Zirkoniumdioxid- und Titanimplantate verschiedener Genese verwendet. Als Titanimplantate fanden ein zweiteiliges Branemark-Implantat der Firma Nobel Biocare (3,75 × 15 mm) und ein einteiliges Implantat (NobelDirect) desselben Herstellers mit denselben Abmessungen Verwendung. Weiterhin wurden Yttrium-stabilisierte Zirkoniumdioxid-Implantate (Y-TZP) der Firma Sigma (4,28 × 14,4 mm), Y-TZP-Implantate mit Zusatz von Aluminiumoxid (Y-TZP-A) der Firma Bio-Hip (4,3 × 16 mm) und Y-TZP-A –Implantate mit einer ZiUnite Oberfläche der Firma Nobel Biocare (4,3 × 16 mm) auf ihre Bruchfestigkeit überprüft. 72 der 120 Implantate durchliefen vor der Frakturtestung eine Kausimulation, die eine 5-jährige klinische Belastung nachahmen sollte. Die Implantate wurden in speziellen Halterungen mit Hilfe eines Autopolymerisats befestigt. Alle Implantate, die die Kausimulation überstanden, wurden danach auf ihre Bruchfestigkeit überprüft. Im Ergebnis frakturierten 7 Implantate bereits während der Kausimulation. Davon ein Titan-Implantat und 6 Zirkoniumdioxid-Implantate. Der Autor betont aber hierbei, dass die Zirkoniumdioxid-Implantate alle im Bereich des Befestigungsmaterials frakturierten. Beim Bruchfestigkeitstest erreichten die einteiligen Titanimplantate die höchsten Werte. Die Frakturwerte der zweiteiligen Titanimplantate und der Zirkoniumdioxid-Implantate seien in einem ähnlichen

Wertebereich anzusiedeln, wobei eine zuvor durchgeführte Kausimulation keinen Einfluss auf die Bruchfestigkeit der Zirkoniumdioxid-Implantate habe.

Bei der Bewertung der Versuchsergebnisse ist zu bemerken, dass alle Zirkoniumdioxid-Implantate einen Durchmesser von zirka 4,3 mm, hingegen die Titanimplantate einen Durchmesser von 3,75 mm aufwiesen. Eine Wertung der Ergebnisse gestaltet sich somit als sehr schwierig und lässt sich keinesfalls auf den klinischen Alltag übertragen. Allein dieser Versuch rechtfertigt eine oxidkeramische Beschichtung metallener Grundkörper wie in der hier vorgelegten Arbeit. Es ist offensichtlich, dass weiterhin ein dringender Bedarf an verlässlichen Studien besteht, die sich mit der klinischen Verwendung von Zirkoniumdioxid als Implantatmaterial beschäftigen.

### **2.3 Phasen der Einheilung dentaler Implantate und Ergebnisse der biologischen Prüfung der Implantatoberflächen**

#### **2.3.1 Phasen der Einheilung dentaler Implantate**

Ein funktionell belastbarer, unmittelbarer Implantat-Knochenkontakt (ankylotische Einheilung, Osseointegration) stellt die günstigste Form der Implantateinheilung dar. Der von Brånemark im Jahre 1969 eingeführte Begriff der Osseointegration ist durch einen lebenslangen Prozess von Knochenbildung und Knochenadaptation auf Belastung und Repair-Mechanismen gekennzeichnet. Graf und Knöfler (1988, 1989) fanden heraus, dass die Vorgänge der Osseointegration große Ähnlichkeit mit denen der knöchernen Wundheilung haben und dass die Einheilung dentaler Implantate als Sonderfall der primären Frakturheilung betrachtet werden kann.

Nach Albrektsson und Johansson (2001) kann die knöcherne Integration dentaler Implantate in drei miteinander verbundene Phasen eingeteilt werden:

- Osseoinduktion
- Osseokonduktion
- Osseointegration.

##### **2.3.1.1 Osseoinduktion**

Die Osseoinduktion ist ein Prozess, bei dem die Osseogenese induziert wird. Dies beinhaltet den Vorgang der Mitogenese undifferenzierter mesenchymaler Stammzellen, die zur Formation von Osteoprogenitorzellen führt. Anschließend ist

eine Bildung von Knochen möglich. Bei dem operativen Eingriff kommt die Implantatoberfläche zuerst mit Blut in Kontakt (Wolf, 1981). Das im Blut enthaltene Fibrinogen wird zu Fibrin und lagert sich an die Implantatoberfläche an, was eine Zellwanderung zum Implantat hin ermöglicht. Aus dem verletzten Knochen werden extrazelluläre Flüssigkeiten, nichtkollagene Proteine und Wachstumsfaktoren freigesetzt, die die Reparatur des Knochens aktivieren (Schenk und Buser, 1998). Osteoprogenitorzellen werden angelockt und proliferieren zu Osteoblastenvorläuferzellen, welche sich dann zu Osteoblasten differenzieren. Es ist wahrscheinlich, dass die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), die der TGF- $\beta$ -Familie angehören, eine bedeutsame Rolle bei der Osseinduktion spielen (Albrektsson und Johansson, 2001). Sie werden als Antwort auf traumatische Vorgänge oder beim Remodelling sezerniert und besitzen induzierende Eigenschaften.

### **2.3.1.2 Osseokonduktion**

Die Osseokonduktion bezieht sich auf die Fähigkeit der Implantatoberfläche, die Knochenbildung als Matrix zu führen. Es kommt zum Heranwachsen von Kapillaren, Gewebe und Osteoprogenitorzellen an das Implantat. Die Osseokonduktion benötigt hierfür eine ausreichende Blutzufuhr. Das gebildete Blutgerinnsel, welches sich durch die Migration kontrahiert, muss auf der Implantatoberfläche haften bleiben, damit die Zellen diese auch erreichen. Die Anheftung auf der Implantatoberfläche erfolgt durch Fibrin, welches als biologischer Kleber fungiert. Die Fähigkeit zur dauerhaften Fixierung des sich während der Wundheilung kontrahierenden Gewebes an der Implantatoberfläche hängt von deren Osseokonduktivität ab (Albrektsson und Johansson, 2001). Bleibt die Fixierung aus, kommt es zur Ablösung des sich retrahierenden Fibringerinnsels und damit zur Knochenbildung im Abstand zum Implantat. Geschieht die Differenzierung der Osteoprogenitorzellen vor Erreichen der Implantatoberfläche, so ist ein ähnliches Phänomen zu beobachten (Davies, 1998). Auf osseokonduktiven Implantatoberflächen wird das Fibringerinnsel stabilisiert und die Zellen erreichen die Oberfläche vor der Ausdifferenzierung. Eine Knochenbildung direkt an der Implantatoberfläche ist möglich. Die Osteoblasten beginnen mit der Bildung des Osteoids und es kommt zur Anheftung von Kalziumphosphat an sezernierte nichtkollagene Proteine (BSP, OC, ON). Das Kalziumphosphat bildet eine

fächerförmige Kristallstruktur, an die sich die im Laufe der Zeit kalzifizierten Kollagenfasern anlagern und Geflechtknochen bilden.

### **2.3.1.3 Osseointegration**

Die Osseointegration setzt eine erfolgreiche Osseinduktion und Osseokonduktion voraus. Sie beschreibt, bei jeder Begriffsdefinition, eine langjährig anhaltende Fixation des Implantates im Knochen. Es wird eine umfangreiche, vollständige Umwachsung des Implantats im Knochen angestrebt, wobei eine 100%ige Kontaktfläche nie beobachtet werden konnte (Albrektsson und Johansson, 2001; Schenk und Buser 1998). Während des Prozesses der Osseointegration wird der bei der Osseokonduktionsphase gebildete Geflechtknochen durch die Prozesse des Remodellings in lamellaren Knochen umgebaut, wodurch eine Stabilisierung des Implantates im biomechanisch beanspruchten Knochen erreicht wird (Schenk und Buser, 1998). Es ist wahrscheinlich, dass die Fortsätze der Knochenzellen in diesem Zusammenhang von großer Bedeutung sind, da sie auftretende Stimuli weiterleiten und somit eine Adaptation des Knochengewebes realisieren sollen. Der genaue Prozess ist jedoch noch unklar (Steflik et al, 1998).

### **2.3.2 In-vitro-Testergebnisse an Titan- und Zirkoniumdioxidoberflächen**

In einem von Trentz et al. (1997) durchgeführten Versuch wurde das Verhalten humaner Knochenzellen, die einer Zellkultur entstammten, auf drei unterschiedlichen Oberflächen untersucht: Titan, Hydroxylapatit und Stahl. Hierbei konnte am meisten Proliferation auf der Titanoberfläche nachgewiesen werden. Am wenigsten Knochenzellen bildeten sich auf der Stahl-Oberfläche. Auf der Hydroxylapatit-Oberfläche fand ebenfalls ein sehr geringes Wachstum statt, obwohl sich gerade auf diesem Material eine angeregte Proliferation vermuten ließe. Hinsichtlich des Versuchsergebnisses von Titan deckten sich aber die Beobachtungen mit der langjährigen klinischen Erfahrung, dass Titanimplantate eine gute Osseointegration ermöglichen.

Hilbig et al. (2005) beschäftigten sich in einer Zellkultur-basierten Studie mit der Auswirkung verschiedener Oberflächenmodifikationen von Titan auf die Proliferation humaner Knochenzellen und auf die Expression von Bone Sialo Protein. Bone Sialo Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Kristallisation von Hydroxylapatit und ist an der Initialisierung des Mineralisationsprozesses der Knochenmatrix beteiligt.

Untersucht wurden Ticer, eine hydroxylapatithaltige Titanoxidoberfläche (ZL-Microdent), eine Oberfläche aus kommerziellem reinem Titan (CPT), eine gestrahlte und geätzte Titanoberfläche (ITI-SLA) und eine im Verfahren der elektrolytischen Oxidation hergestellte Titanoxidschicht (ANOX). In Bezug auf die Proliferation und Bildung von BSP zeigte sich die Überlegenheit der Ticer-Oberfläche gegenüber den anderen Oberflächenmodifikationen, was den klinischen Erfolg von Ticer bestätigte. Graf et al. (2009) fanden heraus, dass neben der Expression von Bone Sialo Protein auch die Bildung von Osteocalcin und Osteonectin in hohem Maße durch Ticer begünstigt wird. Sehr große Messwerte erreichte dabei ebenfalls eine Ti-Unite-ähnliche-Oberfläche, bei der es sich im Wesentlichen um ein technisches Pendant zu Ticer handelt und die auch im ANOF-Verfahren hergestellt wurde. Zudem entdeckten sie, dass eine Beschichtung mit Magnesium beziehungsweise Magnesiumfluorid zu einer beschleunigten Organisation der Knochenmatrix führte.

Aktuelle Versuche bestätigen Beobachtungen und Erfahrungen, die bereits vor mehr als 30 Jahren gemacht wurden und dem Werkstoff Titan aufgrund des guten Einwachsverhaltens ohne klinische Entzündungszeichen eine besonders gute Eignung als Implantatmaterial zusprachen (Escalas et al., 1976). Titan hat sich langjährig im klinischen Einsatz bewährt und neu entwickelte Implantatwerkstoffe müssen stets dem Vergleich mit dem „Goldstandard“ Titan unterzogen werden.

Neuerdings gilt dem Werkstoff Zirkoniumdioxid als mögliche Alternative zu Titan besonderes Interesse und Albrektsson (1985) und Akagawa (1993) postulierten bereits vor langer Zeit, dass auf Oberflächen aus Zirkoniumdioxid eine direkte Apposition trabekulärer Knochenbälkchen ohne klinische Entzündungszeichen stattfindet und dass sich die Eigenschaften von Titan und Zirkoniumdioxid in Bezug auf Dynamik und Morphologie der Knochengewebsbildung weitgehend entsprechen.

Ko et al. (2007) untersuchten in einem Kurzzeit-in-vitro-Versuch die initiale Reaktion osteoblastenähnlicher Zellen auf Oberflächen aus purem Titan und Zirkonium/Aluminium-Keramik. Als Messparameter dienten unter anderem die Zellanzahlen und die Aktivität der alkalischen Phosphatase als Maß der Osteoblastendifferenzierung. Des Weiteren wurde die Expression an mRNA von Zyklin D1, Osteonectin, Integrin- $\beta$ 1, und  $\beta$ -Actin ermittelt. Im Ergebnis erreichten die keramischen Oberflächen immer gleiche beziehungsweise größere Messwerte als die Titanoberflächen. Dies könnte auf eine gute biologische Eignung der keramischen Werkstoffe als Implantatmaterial hindeuten.

In einem weiteren Versuch entdeckten Hempel et al. (2009), dass Zirkoniumdioxid einen stärkeren Effekt auf die Adhäsion, Proliferation und Differenzierung osteoblastenähnlicher Zellen hat als Titan. Auf den Zirkoniumdioxidoberflächen konnte ein größeres Zellwachstum nachgewiesen werden und die Aktivität der alkalischen Phosphatase war ebenfalls größer.

Nach Mellinghoff (2010) finde auf Zirkoniumdioxidoberflächen oftmals sogar weniger Plaque- und Bakterienbesiedlung als auf Titanoberflächen statt.

Die hier vorgestellten Arbeiten und In-vitro-Untersuchungen verdeutlichen, dass Zirkoniumdioxid viel versprechende biologische Eigenschaften zugeschrieben werden und dass man eine gute Eignung als Implantatmaterial erwartet. Jedoch haben diese Versuche hinsichtlich einer sicheren klinischen Verwendbarkeit nur wenig Aussagekraft. Diese rechtfertigenden Untersuchungen müssen erst noch erbracht werden. Zudem besteht weiterhin das Problem der physikalischen Eigenschaften, wie der Versuch von Andreiotelli et al. (2009) zeigte.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien, Lösungen, Antikörper und labortechnisches Zubehör

##### Chemikalien:

- Paraformaldehyd	Merck
- Rinderserumalbumin, Fraktion 5	SIGMA
- Kollagenase, Typ IV Konz.: 166 U/mg	Biochrom AG
- Ethanol, absolut	J.T. BakerT
- Trypsin 0,5% in PBS, mit EDTA	PromoCell bioscience alive
- Aqua dest.	Apotheke der Universitätsklinik Leipzig
- Ziege-normal-Serum	DakoCytomation
- Pen/Strep (10000 IU/ml each)	PromoCell bioscience alive
- 4,6-Diamidino-2-phenylindol. 2HCL p.a. (DAPI)	SERVA Feinbiochemica GmbH & Co KG
- Fluoreszent Mounting Medium	DAKO CORPORATION

##### Puffer:

- PBS, pH=7,4	Apotheke der Universitätsklinik Leipzig
- Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat p.a.	1,463 g
- Kaliumdihydrogenphosphat p.a.	0,245 g
- Natriumchlorid DAB 10	8,0g
- Aqua dest.	ad 1000 ml
- HEPES Puffer, pH=7,4	Apotheke der Universitätsklinik Leipzig
- Natriumchlorid DAB 10:	4,383 g
- HEPES-Puffersubstanz:	2,603 g
- Aqua dest	ad 1000 ml



- Tiefkühlschrank	Liebherr
- Wasserbad	GFL
- Zellkulturflaschen mit Filter Top (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> )	Greiner bio one
- Pipettierhilfe Accu–Jet	Brandt
- Serologische Einmalpipetten	Sarstedt
- Minisart Spritzenfilter	Sarstedt
- Einmalspritzen, Omnifix	B. Braun Melsungen AG
- Lab Tec® II Chamber Slide™ System	Nalge Nunc International
- Eppendorf Reaktionsgefäße 2,0 ml	Hamburg Eppendorf
- Deckgläschen	Menzel Gläser
- Zentrifugenröhrchen (15 ml)	Greiner bio one
- Skalpell	Aesculap

### Geräte zur Auswertung:

- Mikroskop Axiophot	Carl Zeiss Jena
- Mikroskop Axiovert	Carl Zeiss Jena
- Mikroskop Laboval	Carl Zeiss Jena
- Axio Cam MRc5	Carl Zeiss Jena
- Software AxioVision	Carl Zeiss Jena
- Tabellenkalkulationsprogramm Excel	Microsoft

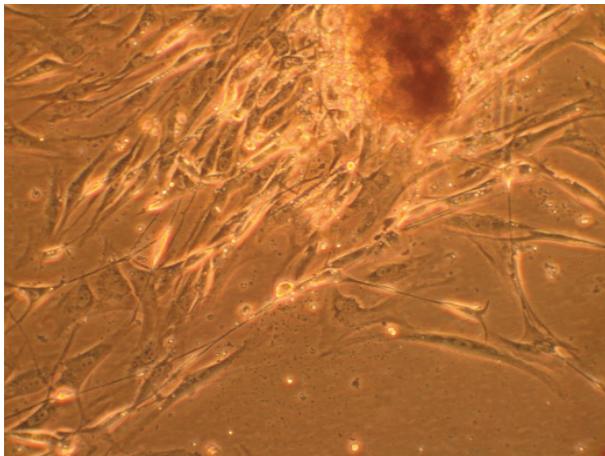
## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Materialgewinnung**

Nach der Aufklärung des Patienten mit schriftlicher Einverständniserklärung und erfolgter Genehmigung des Versuchs durch die Ethikkommission der Universität Leipzig konnte während der operativen Entfernung eines Weisheitszahns Mandibularknochen eines männlichen Patienten entnommen werden. Der Knochen wurde sofort in ein Medium aus PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung), Streptomycin und Penicillin gegeben.

### 3.2.2 Zellanzucht

In der sterilen Werkbank erfolgte anschließend die mechanische Befreiung von Blut- und Bindegewebsresten und eine manuelle Zerkleinerung des Knochens mittels Skalpell. Nach erneuter Spülung mit frischem PBS wurde der Knochen mit 0,25%iger Kollagenase versetzt und für 30 Minuten in den Brutschrank gestellt (konstante Bedingungen bei 37 C°, 5 Vol. % CO<sup>2</sup> und 95% Luftfeuchtigkeit). Daraufhin konnte die Kollagenase abgesaugt werden; der Überstand wurde verworfen und neue Kollagenase dazugegeben. Nach zweistündiger Inkubation folgte eine zehnmünütige Zentrifugation bei 1000 U/min. Der Überstand wurde abpipettiert, 1 ml Kulturmedium hinzugefügt, das Pellet vorsichtig resuspendiert, anschließend der Inhalt des Zentrifugenröhrchens in eine Zellkulturflasche überführt und mit 2 ml frischem Nährmedium aufgefüllt. Nach 24 Stunden wurden weitere 2 ml Nährmedium hinzugefügt. Die Inkubationszeit der Kulturflasche im Brutschrank betrug 7 Tage. Ein Wechsel des Mediums war aller drei Tage erforderlich. Es erfolgte eine regelmäßige mikroskopische Kontrolle des Zellwachstums. Nachdem die Zellen konfluent wuchsen, schloss sich die erste Passage der Zellkultur an.

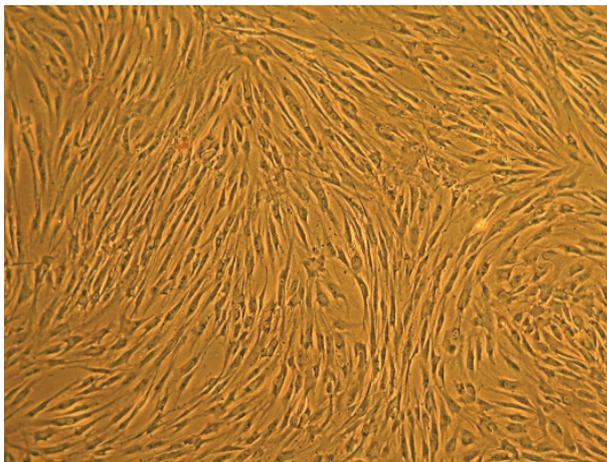


**Abbildung 4:** Beginnendes Wachstum der Knochenzellen des Spendergewebes in der Primärkultur (Mikroskop Axiovert 25, 100fache Vergrößerung)

### 3.2.3 Herstellung der ersten Subkultur

Das Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS gespült. Im Anschluss wurde 1 ml Trypsin in die Kulturflasche pipettiert und 1 Minute im Brutschrank inkubiert. Der Vorgang der Trypsinierung unterlag mikroskopischer Kontrolle. Nachdem die Zellen eine kugelige Form annahmen, das heißt, eine Lösung der interzellulären Verbindungen stattgefunden hatte, konnten die Zellen durch

vorsichtiges Klopfen an der Unterseite der Kulturflasche vom Boden des Gefäßes abgelöst werden. Es wurden 2 ml Kulturmedium hinzugefügt. Nach dem Abpipettieren schloss sich eine Zentrifugation für 10 min bei 1000 U/min an. Der Überstand wurde entfernt und verworfen. Es erfolgte die Resuspension des Pellets mit 2 ml frischem Nährmedium. Je 1 ml der Suspension wurde in eine 75 cm<sup>3</sup> große Zellkulturflasche pipettiert und mit 14 ml frischem Osteoblastenmedium aufgefüllt. Der Mediumwechsel erfolgte weiterhin aller 3 Tage. Nach Erreichen eines konfluenten Wachstums erfolgte die Herstellung der zweiten Subkultur.



**Abbildung 5:** Konfluentes Wachstum der Knochenzellen des Spendergewebes in der Primärkultur (Mikroskop Axiovert 25, 50fache Vergrößerung)

### 3.2.4 Herstellung der zweiten Subkultur

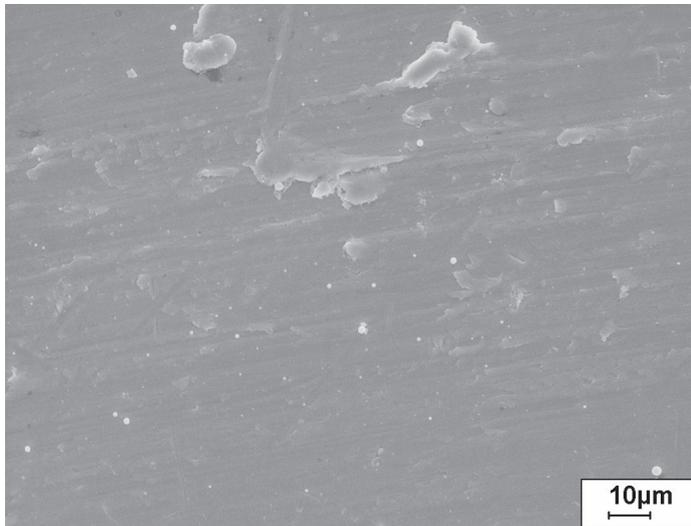
Die Herstellung der zweiten Subkultur wurde analog der ersten Passage der Zellkultur vorgenommen. Nach der Trypsinierung der beiden Zellkulturflaschen wurden die Zellen in jeweils drei weitere Zellkulturflaschen zum fortlaufenden Wachstum überführt.

### 3.3 Versuchsablauf

Der Versuch wurde als einfach verblindeter Versuch angelegt und durchgeführt. Die beteiligten Personen erhielten erst nach Bekanntwerden der Ergebnisse der interaktiven Zellzählung und der Grauwertanalyse Kenntnis über die Oberflächenstruktur der Probekörper.

### 3.3.1 Beschreibung der Probekörper

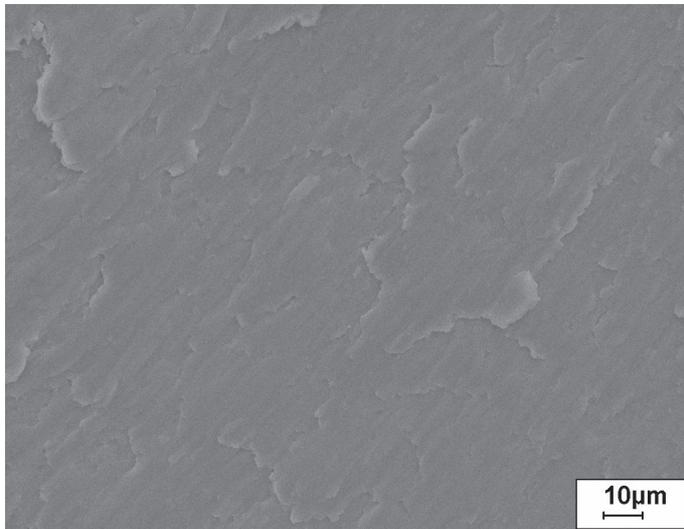
Der Versuch wurde mit sechs Probekörpern unterschiedlicher Oberflächenbeschichtung durchgeführt. Die Durchmesser der Probekörper betragen 6 mm, die Höhe 0,5 mm. Die Oberfläche des Probekörpers 1 ist dadurch gekennzeichnet, dass ein Titgrundkörper mit Hilfe des PVD-Verfahrens (Physical Vapour Deposition) mit Zirkoniumdioxid aus der Gasphase beschichtet wurde. Die daraus resultierende ZrO<sub>20</sub>-Oberfläche ist homogen und enthält die chemischen Elemente Kohlenstoff und Stickstoff in geringen Mengen sowie metallurgisch bedingt Hafnium mit einer Elementkonzentration von 5-8 at.%. Der Wert der Oberflächenrauigkeit ( $r_a$ ) liegt bei 0,25  $\mu\text{m}$ , die gemittelte Rautiefe ( $r_z$ ) bei 0,8  $\mu\text{m}$ . Inhomogenitäten treten auf der PVD-beschichteten Oberfläche in Form von Droplets auf (helle Punkte). Dabei handelt es sich um kugelförmige Ablagerungen, welche durch Aggregation von Zirkoniumdioxid-Teilchen aus dem Gasraum des PVD-Reaktors entstehen und sich auf dem Beschichtungsgut ablagern. Eventuell könnten diese auch als vagabundierende Teilchen auf dem Probekörper erscheinen. Die Abbildung 6 zeigt die Oberflächenstruktur des Grundmaterials des Probekörpers 1.



**Abbildung 6:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Probekörpers 1 mit der ZrO<sub>20</sub>-Oberfläche

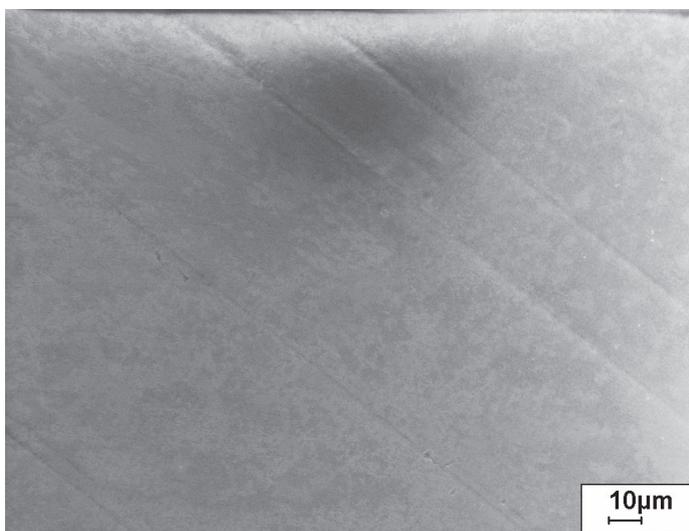
Die ZrO<sub>19</sub>-Oberfläche des Probekörpers 2 ist ebenfalls durch die PVD-Beschichtung eines Grundkörpers aus Titan mit Zirkoniumdioxid entstanden. Sie weist einen leichten Sauerstoffüberschuss an der Oberfläche auf. Kohlenstoff, Stickstoff und Hafnium sind wie auf der ZrO<sub>20</sub>-Oberfläche in geringen Mengen enthalten. Die Rauigkeit beträgt 0,40  $\mu\text{m}$  und ist im Wesentlichen von der Rauheit

des Grundkörpers bestimmt. Die Rautiefe liegt bei  $1,1\ \mu\text{m}$ . Beide Probekörper wurden vom Leibnitz-Institut für Oberflächenmodifizierung Leipzig (IOM) hergestellt.



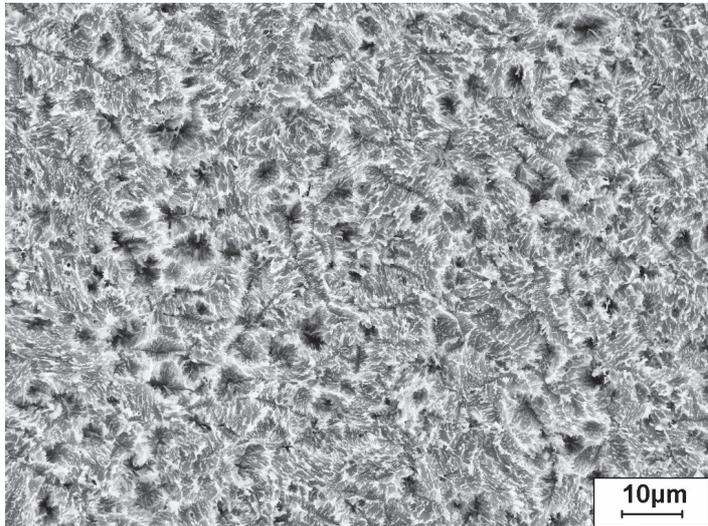
**Abbildung 7:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Probekörpers 2 mit der ZrO<sub>19</sub>-Oberfläche

Der Probekörper 3 besteht aus Cercon, einem von der Firma Degudent hergestellten Werkstoff aus reiner Yttrium-stabilsierter Zirkoniumdioxidkeramik (Y-TZP). Es ist sehr dicht, polykristallin und setzt sich aus vielen kleinen Körnchen mit einer Größe von 200–300 nm zusammen. Außerdem sind Hafniumoxid und Aluminiumoxid in geringen Mengen enthalten. Die unbehandelte Oberfläche ist sehr glatt und zeigt nahezu keine Defekte (Abbildung 3.4). Der Wert der Rauigkeit beträgt  $0,03\ \mu\text{m}$ , die Rautiefe  $0,1\ \mu\text{m}$ .



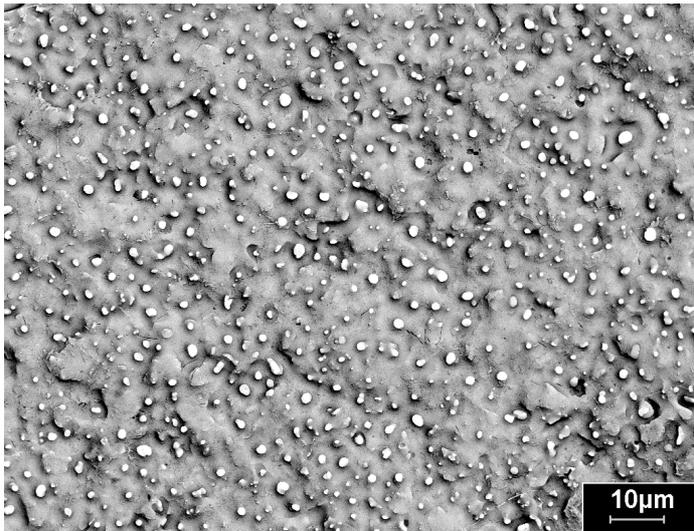
**Abbildung 8:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Cercon-Probekörpers

Die Oberfläche des Probekörpers 4 besteht aus einer geätzten Titanoxidschicht, die Ähnlichkeit mit der langjährig bewährten SLA-Oberfläche der Firma Straumann hat. Sie wurde mit konzentrierter Salz- und Schwefelsäure (Verhältnis 2:1) für 35 Minuten bei Normaldruck behandelt. Die Rauigkeit liegt im Bereich von 2  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 9:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Probekörpers 4 mit der geätzten Titanoxid-Oberfläche

Die Ticer-Oberfläche des Probekörpers 5 besteht aus kommerziellem reinen Titan und wird mit Hilfe transformativer Techniken modifiziert. Man nutzt dabei das Verfahren der anodischen Oxidation unter Funkenentladung (ANOF) (Graf et al., 1992). In einer Elektrolysezelle wird das Implantat als Anode und eine Titanelektrode als Kathode geschaltet. Nach Anlegen von gepulstem Gleichstrom bildet sich eine Kalziumdihydrogenphosphatoxidschicht auf der Oberfläche aus. Aufgrund der steigenden Spannung wird an energetisch begünstigten Punkten auf der Implantatoberfläche ein Funkendurchschlag mit hoher thermischer Intensität induziert (8000K und  $10^7\text{PA}$ ) (Graf, 1997). Hierdurch entstehen an der Oberfläche des als Anode geschalteten Implantats durch Oxidation Rauigkeiten erster Ordnung im Grundmaterial und Rauigkeiten zweiter Ordnung in der Oxidschicht. Der Wert der Rauigkeit liegt bei 1,25  $\mu\text{m}$ , die Rautiefe bei 2,9  $\mu\text{m}$ . Die Überlegenheit dieser Oberfläche gegenüber anderen Oberflächenstrukturen konnte von Grobitzsch (2003) in-vitro bewiesen werden. Ticer wurde im Versuch als Positivstandard verwendet.



**Abbildung 10:** Rasterelektronenmikroskopisches Bild der Oberflächenstruktur der Ticer-Oberfläche

Die Oberfläche des Probekörpers 6 (Abbildung 3.8) besteht aus kommerziellem reinen Titan und wurde durch Maschinenbearbeitung geglättet. Der äußere Bereich der Probekörperoberfläche weist eine Rauigkeit von  $0,45\ \mu\text{m}$  auf. Die Rauigkeit im Bereich der Mitte beträgt  $0,35\ \mu\text{m}$ . Die Rautiefe ist etwa  $1,1\ \mu\text{m}$ . Titan wurde im Versuch als Negativstandard verwendet.



**Abbildung 11:** Rasterelektronenmikroskopisches Bild der Oberflächenstruktur der Titan-Oberfläche

### 3.3.2 Versuchsvorbereitung

Vor dem Einlegen der Probekörper in die Kammern des Chamber Slide Systems erfolgte eine Spülung dieser mit Propanol und Aqua dest. Nach der Trocknung wurden die Probekörper bei 134 °C autoklaviert und wie im angefügten Versuchsaufbauschema in die Kammern des Chamber Slides eingelegt (Abbildung 12).

#### 3. Versuchstag

BSP	TGF-β	Osteocalcin	Osteonectin	Apoptose
PK 1 PK 2 PK 3 PK 4	PK 1 PK 2 PK 3 PK 4	PK 1 PK 2 PK 3 PK 4	PK 1 PK 2 PK 3 PK 4	PK 1 PK 2 PK 3 PK 4
PK 5 PK 6				

#### 5. Versuchstag

BSP	TGF-β	Osteocalcin	Osteonectin	Apoptose
PK 1 PK 2 PK 3 PK 4	PK 1 PK 2 PK 3 PK 4	PK 1 PK 2 PK 3 PK 4	PK 1 PK 2 PK 3 PK 4	PK 1 PK 2 PK 3 PK 4
PK 5 PK 6				

#### 7. Versuchstag

BSP	TGF-β	Osteocalcin	Osteonectin	Apoptose
PK 1 PK 2 PK 3 PK 4	PK 1 PK 2 PK 3 PK 4	PK 1 PK 2 PK 3 PK 4	PK 1 PK 2 PK 3 PK 4	PK 1 PK 2 PK 3 PK 4
PK 5 PK 6				

#### 10. Versuchstag

BSP	TGF-β	Osteocalcin	Osteonectin	Apoptose
PK 1 PK 2 PK 3 PK 4	PK 1 PK 2 PK 3 PK 4	PK 1 PK 2 PK 3 PK 4	PK 1 PK 2 PK 3 PK 4	PK 1 PK 2 PK 3 PK 4
PK 5 PK 6				

Abbildung 12: Schema Versuchsaufbau

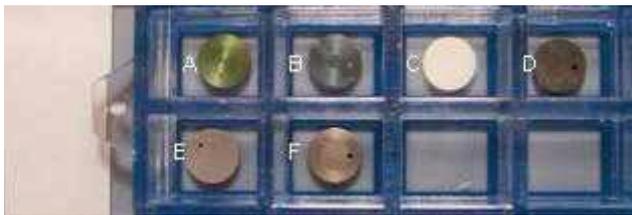
### 3.3.3 Versuchsdurchführung

Die Trypsinierung der Zellen geschah analog der Arbeitsschritte der ersten Subkultivierung. Nach dem Zentrifugieren wurden die Zellen mit 5 ml frischem Osteoblastenmedium resuspendiert. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer erfolgte die Zellanzahlbestimmung durch Auszählung aller vier Eckfelder. Das Ergebnis errechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Anzahl Zellen}}{\text{Ausgezählte Fläche (mm}^2\text{) x Kammertiefe (mm) x Verdünnung}} = \text{Zellen pro 1}\mu\text{l Flüssigkeit}$$

**Abbildung 13:** Formel zur Berechnung der Zellanzahlen

Die Zellsuspension wurde dann soweit verdünnt, dass sich in 0,5 ml Medium zweitausend Zellen befanden. Es schloss sich das Auffüllen der Kammern des Chamber Slide Systems mit jeweils 0,5 ml der Zellsuspension und die Aufbewahrung im Brutschrank an. Die Bestimmung der von der extrazellulären Matrix exprimierten Antigene Bone Sialo Protein (BSP), Osteocalcin (OC), Osteonectin (ON), und Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) erfolgte am dritten, fünften, siebenten und zehnten Tag des Versuchszyklus. Dazu wurden jeweils vier Chamber Slides entnommen. Zusätzlich sind in einem Chamber Slide die Knochenzellen auf ihr apoptotisches Verhalten untersucht worden.



**Abbildung 14:** Anordnung der Probekörper im Chamber Slide nach folgendem Schema: A = ZrO<sub>20</sub>, B = ZrO<sub>19</sub>, C = Cercon, D = Titanoxid geätzt, E = Ticer, F = Titan

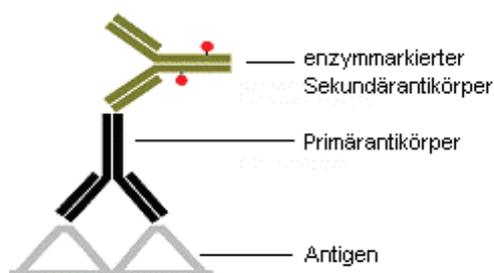
### 3.3.4 Immunhistochemischer Nachweis

Der immunhistochemische Nachweis wurde nach dem Prinzip der „Zwei-Schritt-Indirekten-Methode“ durchgeführt. Diese beinhaltet, dass ein unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen (BSP, OC, ON, TGF- $\beta$ ) bindet und anschließend ein enzymmarkierter Sekundärantikörper den Primärantikörper durch eine Substrat-Chromogenreaktion markiert. Im Versuch stammt der Primärantikörper von der Maus. Dementsprechend ist der Sekundärantikörper gegen Mausimmunglobuline gerichtet. Es wurde wie folgt vorgegangen:

Nach der Entnahme des Chamber Slides war es notwendig, das Medium abzusaugen und den Objektträger anschließend mit PBS zu spülen. Die Fixation der Zellen erfolgte mit 4%igem Paraformaldehyd. Eine erneute Spülung mit PBS, je dreimal für 5 Minuten schloss, sich an. Die folgenden Arbeitsschritte wurden unter

Ausschluss von Lichtzufuhr durchgeführt. Um die unspezifischen Bindungen zu blockieren, musste nach der dritten Spülung 10%iges Ziegen-Normalserum appliziert und damit eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert werden. Nach dem Abpipettieren folgte das Hinzufügen der im Verhältnis 1:100 verdünnten Primärantikörper. Für die Verdünnung der ON spezifischen Antikörper wurde eine mit 2%igem Rinder-Serum-Albumin versetzte HEPES-Puffersubstanz verwendet. Die Verdünnung der Antikörper für BSP, OC und TGF- $\beta$  geschah mit PBS und 2%igem BSA. Die Zellen konnten nun über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt werden. Nach der Entnahme erfolgten an jedem Auswertungstag drei Spülungen auf dem Schüttler für jeweils 5 Minuten mit PBS beziehungsweise HEPES. Es schloss sich die Markierung mit dem Sekundärantikörper an. Dieser wurde mit den jeweiligen Puffern im Verhältnis 1:200 verdünnt. Die Inkubation erfolgte lichtgeschützt und für eine Dauer von 30 Minuten. Anschließend wurde wiederholt dreimal für fünf Minuten mit den dazugehörigen Puffern gespült.

Im nächsten Arbeitsschritt mussten die Zellkerne mit DAPI gefärbt werden. Hierzu wurden 1 mg DAPI in einem Milliliter absolutem, unvergälltem Alkohol gelöst, eine Verdünnung von 1:1000 hergestellt und für eine Minute inkubiert. Die Spülung erfolgte anschließend zweimal für 5 Minuten mit PBS, danach zweimal für 5 Minuten mit Aqua dest. Die Kammern der Chamber Slides wurden abgelöst und die Präparate mit Fluoreszenz-Eindeckmedium eingedeckt. Die Aufbewahrung erfolgte ebenfalls unter Lichtausschluss bei 4 °C.



**Abbildung 15:** enzymmarkierter Sekundärantikörper bindet an Primärantikörper

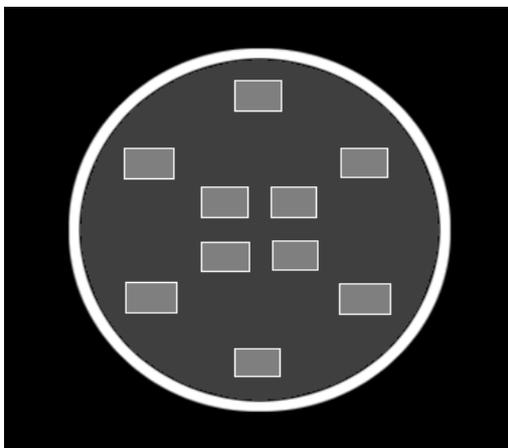
### 3.3.5 Untersuchung der Apoptose

Zur Untersuchung des apoptotischen Verhaltens wurden die Zellen wie folgt vorbereitet: Das Zellkulturmedium wurde abpipettiert. Es folgte eine kurze Spülung mit PBS. Die Fixierung der Zellen konnte anschließend für 60 Minuten mit 4%igem

Paraformaldehyd in PBS vorgenommen werden. Daraufhin erfolgte erneut eine Spülung mit PBS (zweimal fünf Minuten). Anschließend wurde die Permeabilisationslösung bei 2 - 8 C° auf Eis (0,1% Triton X – 100 in 0,1% Natriumcitrat) hergestellt. Nach einer wiederholten Spülung mit PBS auf dem Schüttler (zweimal fünf Minuten) geschah die Herstellung des Tunel Reaktionsgemischs (1 Teil Enzymlösung und 9 Teile Markierungslösung). Mit dieser Lösung musste 60 Minuten im Brutschrank bei 37 C° inkubiert werden. Es wurde erneut mit PBS gespült. Im nächsten Arbeitsschritt konnte die DAPI Kernfärbung (Verdünnung 1:1000) vorgenommen werden. Es schloss sich eine weitere Spülung mit PBS und daraufhin mit Aqua dest. für zweimal fünf Minuten an. Danach erfolgte die Eindeckung des Reaktionsgemisches mit Fluoreszenzeindeckmedium. Die Aufbewahrung geschah bei 4 C° unter Ausschluss von Lichtzufuhr.

### 3.4 Versuchsauswertung

Ausgewertet wurden die Zellproliferation, das apoptotische Verhalten der Knochenzellen und die Expression der nonkollagenen Knochenproteine BSP, OC, ON und des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  durch die Knochenzellen auf den unterschiedlichen Oberflächen. Für die fluoreszenzoptische Auswertung fanden das Fluoreszenzmikroskop Axiophot und die Software Axiovision 4.6 Verwendung. An jedem Versuchstag wurden dazu die Zellanzahlen der proliferierten Zellen und der apoptotischen Zellfragmente sowie die Grauwerte bestimmt. Weiterhin konnten die Grauwerte der exprimierten Knochenproteine BSP, OC, ON und des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  ermittelt werden. Die Messungen erfolgten bei 20facher Vergrößerung in 6 peripher und 4 zentral gewählten Messfeldern (Abbildung 16). Alle Messfelder wurden fotografisch festgehalten und gespeichert.



**Abbildung 16:** Schema der Messfelder (dunkelgraue Rechtecke) auf dem Probekörper

### **3.4.1 Interaktive Zellzählung**

Bei der interaktiven Zellzählung wurde wie folgt vorgegangen: In jedem der 10 Messfelder auf einem Probekörper konnte auf den unterschiedlichen Oberflächen die Zahl der proliferierten Zellen ermittelt werden. Diese wurden mit Hilfe des DAPI-Filters blau dargestellt. Die Zählung der Zellen geschah interaktiv durch Mausklick. An jedem Versuchstag wurde zusätzlich die Zahl der apoptotischen Partikel auf den unterschiedlichen Probekörpern in einem separaten Chamber Slide bestimmt. Die apoptotischen Partikel wurden rot dargestellt (TRITC-Filter) und analog den lebenden Zellen gezählt.

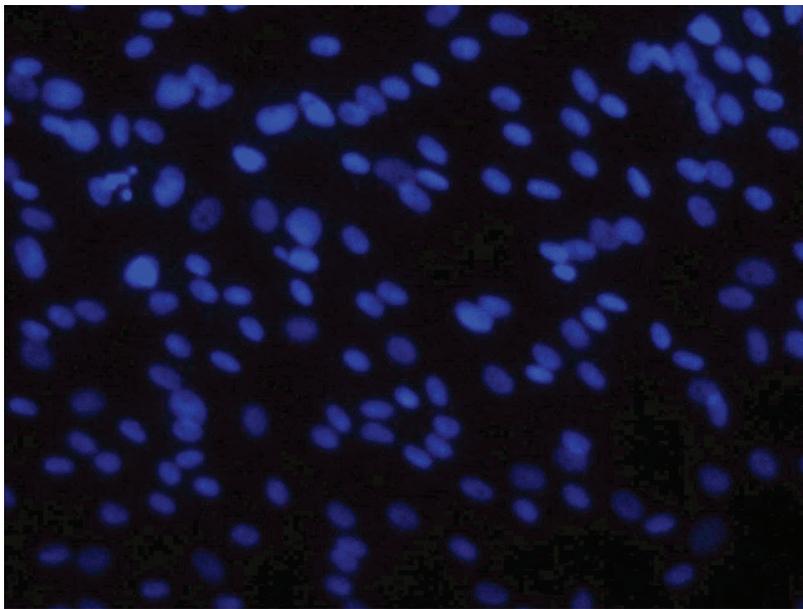
### **3.4.2 Grauwertanalyse**

Zusätzlich zur interaktiven Bestimmung der Zellanzahl wurden an jedem Versuchstag die Grauwerte der proliferierten Zellen, der apoptotischen Zellen und der exprimierten nonkollagenen Knochenproteine BSP, OC, ON und TGF- $\beta$  automatisiert mit Hilfe der Software AxioVision ermittelt. In der Bildverarbeitung stellt der Grauwert den Helligkeits- oder Intensitätswert eines einzelnen Bildpunktes dar. Für die Auswertung wurde der relative Grauwert als Quotient aus Grauwert (GW) und Belichtungszeit (BZ) verwendet. Alle Messwerte konnten in Excel-Tabellen gespeichert und in Diagrammen wiedergegeben werden.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Zellzählung

Die Zellzählung geschah mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen in den Messfeldern der einzelnen Probekörper. Die Abbildung 17 zeigt eine solche Aufnahme von Ticer am 5. Versuchstag. Es sind deutlich die durch Proliferation entstandenen blau markierten Knochenzellen zu erkennen, die interaktiv durch Mausclick gezählt wurden.

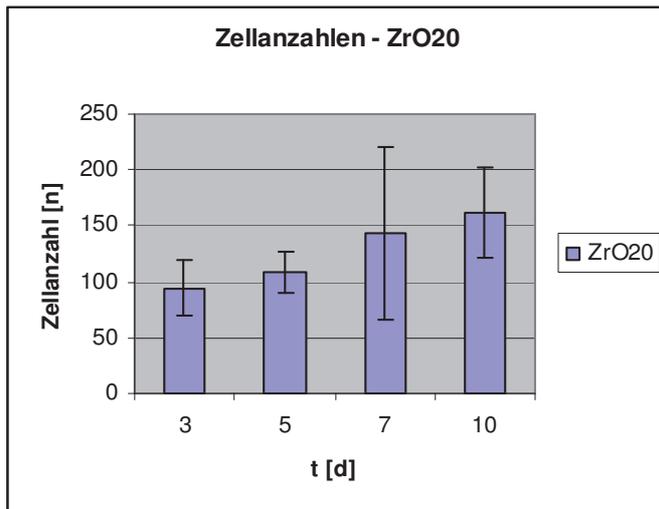


**Abbildung 17:** fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Proliferation auf Ticer am 5. Versuchstag (20fache Vergrößerung, Axiophot (Carl Zeiss Jena))

## Ergebnisse

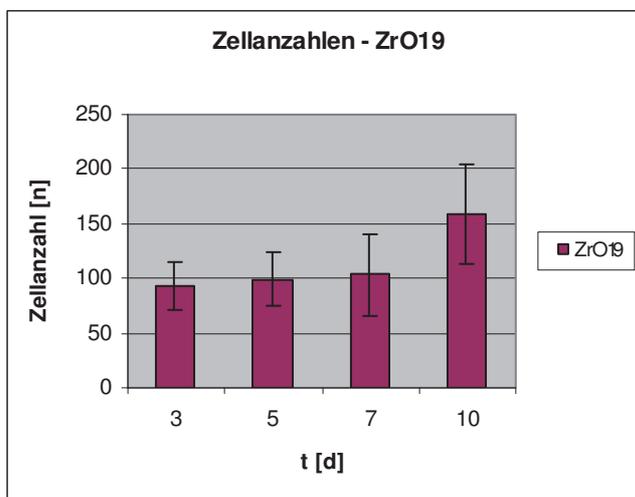
---

Die Entwicklung der Proliferation auf den unterschiedlichen Probekörpern lässt sich in Diagrammen veranschaulichen. Hierzu wurden die Versuchstage auf der Abszisse und die durchschnittlichen Zellanzahlen pro Messfeld auf der Ordinate dargestellt. Betrachtet man die Entwicklung der Zellanzahlen auf der ZrO<sub>20</sub>-Oberfläche im Diagramm 1, so ist eine stetige Zunahme der Knochenzellen mit Erreichen des Wachstumsmaximums am zehnten Versuchstag erkennbar.



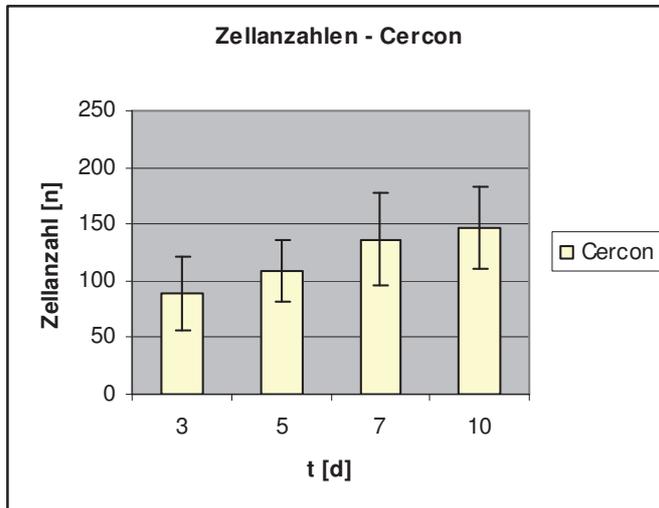
**Diagramm 1:** Darstellung der ermittelten Zellanzahlen auf ZrO<sub>20</sub> am 3., 5., 7. und 10. Versuchstag

Die Proliferation der Knochenzellen auf der ZrO<sub>19</sub>-Oberfläche nahm ebenfalls im Verlauf der Messungen zu. Jedoch unterscheiden sich die Messwerte der ersten drei Versuchstage nur gering, während zwischen dem 7. und 10. Versuchstag eine deutliche Zunahme der Proliferation stattfand (Diagramm 2).



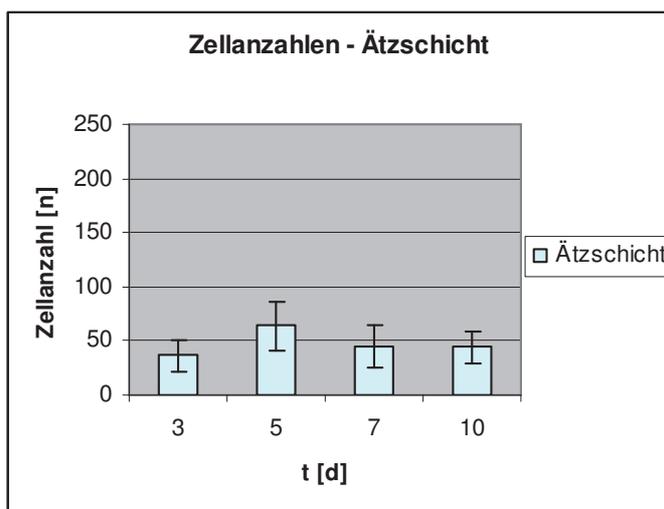
**Diagramm 2:** Darstellung der ermittelten Zellanzahlen auf ZrO<sub>19</sub> am 3., 5., 7. und 10. Versuchstag

Auf der Cercon-Oberfläche ließ sich eine ähnliche Entwicklung des Zellwachstums wie auf der ZrO<sub>20</sub>-Oberfläche nachweisen. Im Diagramm 3 stellt sich eine konstante Zunahme der Zellanzahlen über den Versuchsverlauf mit Erreichen des Maximums am 10. Versuchstag dar.



**Diagramm 3:** Darstellung der ermittelten Zellanzahlen auf Cercon am 3., 5., 7. und 10. Versuchstag

Auf der geätzten Titanschicht wurden deutlich geringere Zellanzahlen als auf allen anderen Oberflächen bestimmt. Der Maximalwert war bereits am fünften Versuchstag erreicht. Danach fand eine Stagnation der Proliferation statt (Diagramm 4).

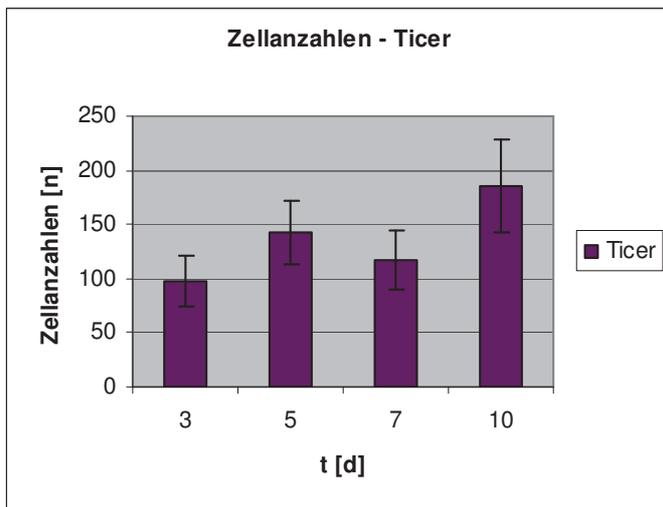


**Diagramm 4:** Darstellung der ermittelten Zellanzahlen auf der Ätzschrift am 3., 5., 7. und 10. Versuchstag

## Ergebnisse

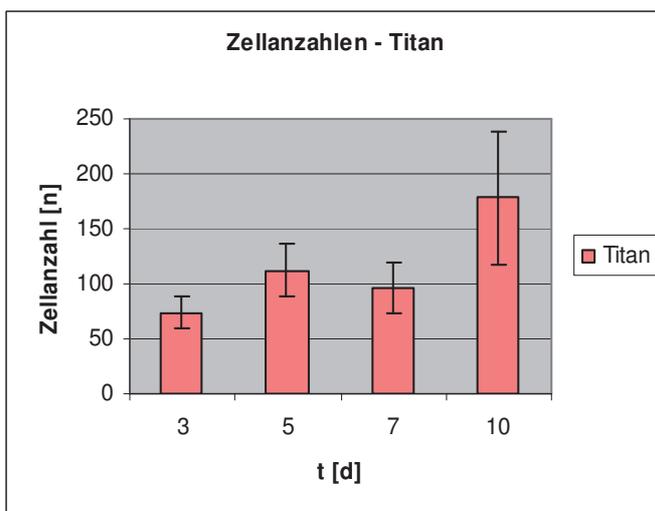
---

Die Entwicklung der Zellanzahlen auf Ticer beschreibt im Diagramm einen wellenförmigen Verlauf. Einer Zunahme der Proliferation zwischen drittem und fünftem Versuchstag schloss sich eine Abnahme bis zum siebenten Versuchstag an. Zwischen siebentem und zehntem Versuchstag kam es erneut zum deutlichen Anstieg der Zellanzahl auf das Maximum von 186 Zellen pro Messfeld (Diagramm 5).



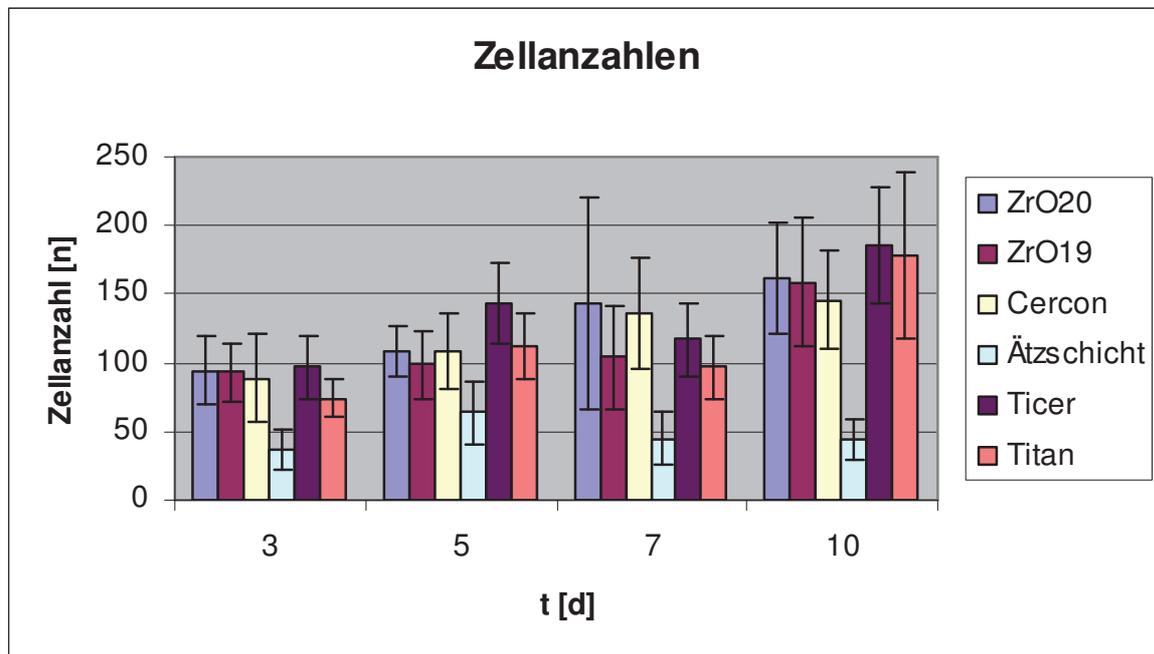
**Diagramm 5:** Darstellung der ermittelten Zellanzahlen auf Ticer am 3., 5., 7. und 10. Versuchstag

Die Proliferationszunahme auf Titan beschrieb eine ähnliche Entwicklung wie auf Ticer (Diagramm 6).



**Diagramm 6:** Darstellung der ermittelten Zellanzahlen auf Titan am 3., 5., 7. und 10. Versuchstag

Um die Zellanzahlen auf allen sechs Probekörpern miteinander vergleichen zu können, wurden diese zusammen in einem Diagramm dargestellt (Diagramm 7):



**Diagramm 7:** Vergleichende Darstellung der ermittelten Zellanzahlen auf allen Probekörpern am 3., 5., 7. und 10. Versuchstag

Bei Betrachtung des Diagramms fällt auf, dass die auf der ZrO<sub>20</sub>- und ZrO<sub>19</sub>-Oberfläche ermittelten Zellanzahlen am dritten, fünften und zehnten Versuchstag fast identische Werte annahmen. Diese lagen am dritten Versuchstag bei etwa 90, am fünften Versuchstag bei zirka 100 und am letzten Versuchstag im Bereich von durchschnittlich 180 Zellen pro Messfeld. Lediglich am fünften und am siebenten Versuchstag war ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Probekörpern festzustellen. Die auf Cercon bestimmten Zellanzahlen liegen in einem ähnlichen Wertebereich wie die der ZrO<sub>20</sub>- und ZrO<sub>19</sub>-Oberfläche. Die geringste proliferative Aktivität wurde auf der Ättschicht nachgewiesen. Alle Messwerte lagen zwischen 37 und 64 Zellen pro Messfeld und stagnierten im Versuchsverlauf.

Am dritten, fünften und zehnten Versuchstag wurde die maximale Zellanzahl auf Ticer gemessen. Die Messwerte waren vor allem am fünften (143 Zellen) und zehnten Versuchstag (186 Zellen) deutlich größer als die der anderen Probekörper. Die auf Titan bestimmten durchschnittlichen Zellanzahlen lagen am fünften und zehnten Tag an zweiter Stelle. Am dritten und siebenten Versuchstag siedelten sie sich zwischen den Messwerten der Ättschicht und der anderen Probekörper an.

## 4.2 Statistische Sicherung der Ergebnisse der Proliferation

Da die meisten Parameter laut Kolmogorov-Smirnov-Test nicht normalverteilt sind, wurde auf nichtparametrische Testverfahren zurückgegriffen. Im Gegensatz zu parametrischen Verfahren wie t-Test oder Varianzanalyse handelt es sich dabei um sog. verteilungsfreie Verfahren, d. h. die Tests stellen keine Bedingungen an die Verteilungsform der Daten. Die Prüfgrößen werden aus Rangplätzen errechnet. Alle Tests beziehen sich auf Vergleiche zum jeweils gleichen Zeitpunkt (Horizontaltests).

### Proliferation: Wie unterscheiden sich die Zellanzahlen auf den unterschiedlichen Probekörpern?

Zunächst ermittelten wir mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests, ob es insgesamt signifikante Unterschiede gab, bevor wir mit dem Mann-Whitney-U-Test in Einzelvergleichen prüften, welche Probekörper sich konkret unterschieden. In beiden Fällen lautet die zu testende Nullhypothese: Es gibt keine Unterschiede zwischen den Probekörpern hinsichtlich der Zellenanzahl.

Der Kruskal-Wallis-Test liefert zu jedem Testzeitpunkt (3., 5., 7. und 10. Tag) ein signifikantes Ergebnis (Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$ ), d. h. es gibt insgesamt signifikante Unterschiede zwischen den Probekörpern hinsichtlich der Zellenanzahl.

Die Ergebnisse der U-Tests sind in Tab. 1, 2, 3, und 4 zusammengefasst:

3.Tag	PK1	PK2	PK3	PK4	PK5	PK6
PK1	*****	0	0	X	0	0
PK2	*****	*****	0	X	0	0
PK3	*****	*****	*****	X	0	0
PK4	*****	*****	*****	*****	X	X
PK5	*****	*****	*****	*****	*****	0
PK6	*****	*****	*****	*****	*****	*****

**Tabelle 1:** Signifikanztests (U-Tests) zu Zellanzahlen auf den Probekörpern am 3. Versuchstag

Erklärend für alle Diagramme: 0 = bei  $p < 0,05$  nicht signifikant verschieden

X = bei  $p < 0,05$  signifikant verschieden

Lesebeispiel für Tabelle 1: Die Probekörper 1, 2, 3, 5 und 6 unterscheiden sich alle signifikant von Probekörper 4.

## Ergebnisse

5.Tag	PK1	PK2	PK3	PK4	PK5	PK6
PK1	*****	X	0	X	X	0
PK2	*****	*****	0	X	X	0
PK3	*****	*****	*****	X	X	0
PK4	*****	*****	*****	*****	X	X
PK5	*****	*****	*****	*****	*****	X
PK6	*****	*****	*****	*****	*****	*****

**Tabelle 2:** Signifikanztests (U-Tests) zu Zellanzahlen auf den Probekörpern am 5. Versuchstag

7.Tag	PK1	PK2	PK3	PK4	PK5	PK6
PK1	*****	X	0	X	0	X
PK2	*****	*****	0	X	X	0
PK3	*****	*****	*****	X	0	0
PK4	*****	*****	*****	*****	X	X
PK5	*****	*****	*****	*****	*****	X
PK6	*****	*****	*****	*****	*****	*****

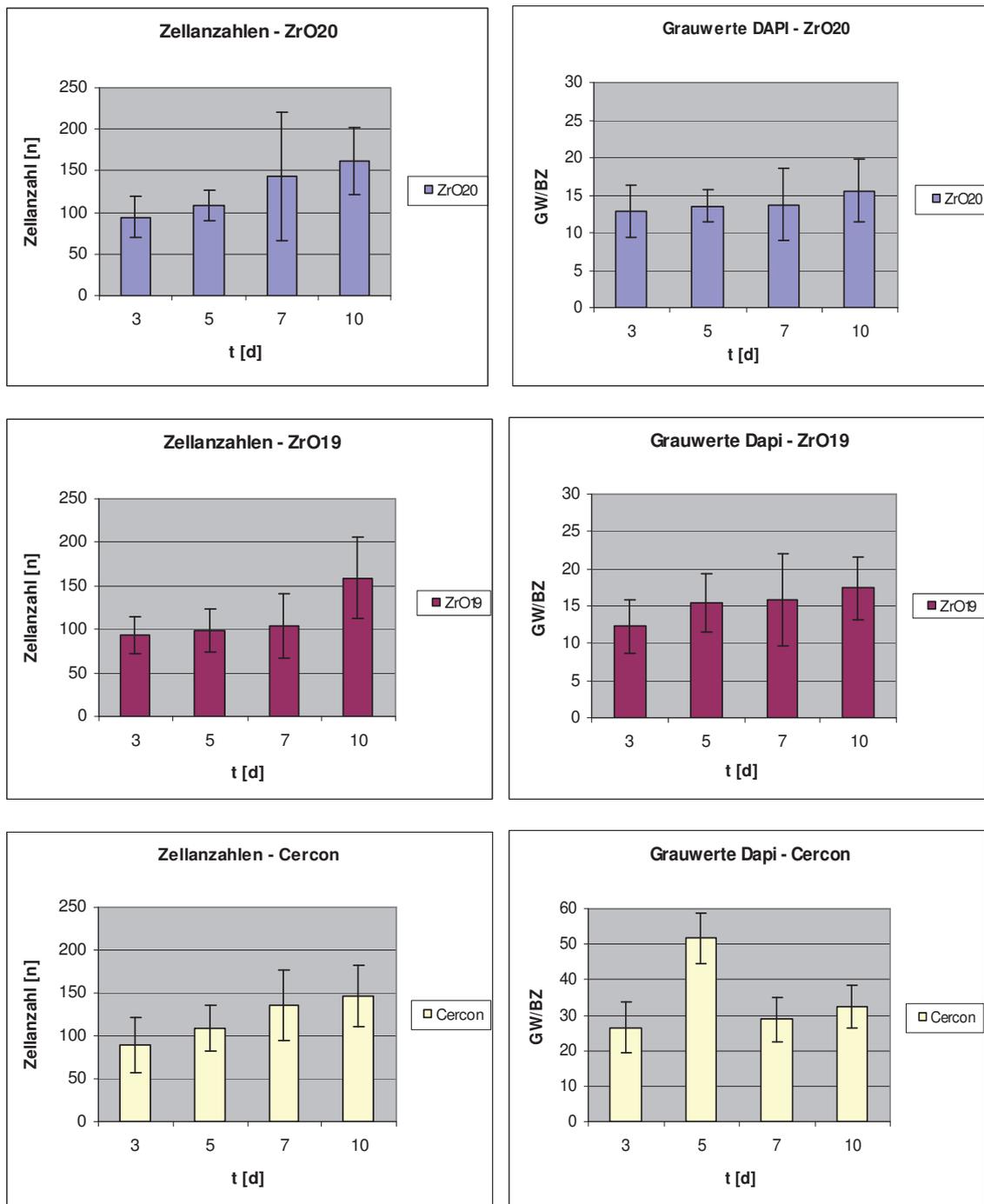
**Tabelle 3:** Signifikanztests (U-Tests) zu Zellanzahlen auf den Probekörpern am 7. Versuchstag

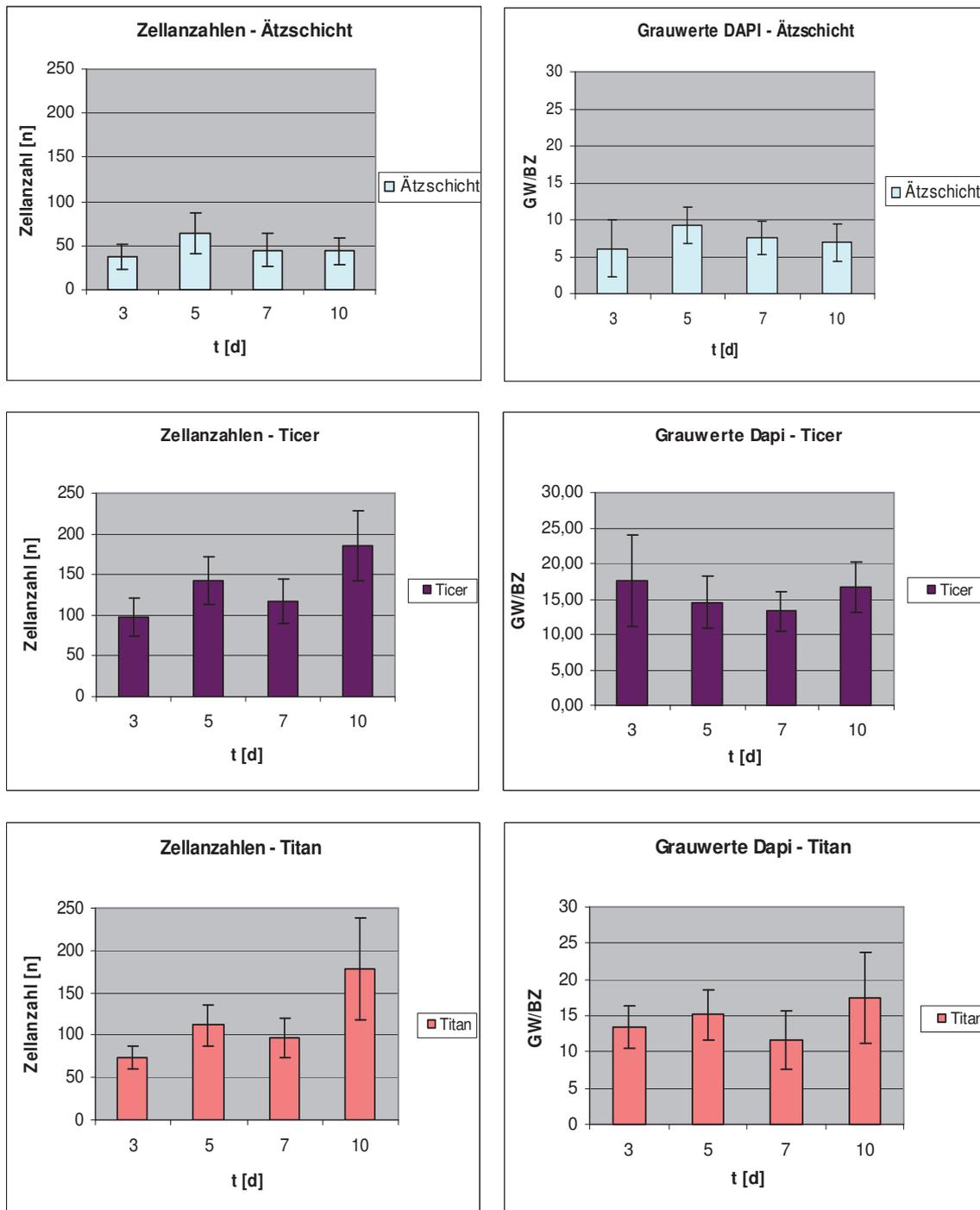
10.Tag	PK1	PK2	PK3	PK4	PK5	PK6
PK1	*****	0	0	X	X	0
PK2	*****	*****	0	X	X	0
PK3	*****	*****	*****	X	X	X
PK4	*****	*****	*****	*****	X	X
PK5	*****	*****	*****	*****	*****	0
PK6	*****	*****	*****	*****	*****	*****

**Tabelle 4:** Signifikanztests (U-Tests) zu Zellanzahlen auf den Probekörpern am 10. Versuchstag

### 4.3 Vergleich der Zellanzahlen mit den relativen Grauwerten

Die vergleichende Analyse zwischen den durchschnittlichen Zellanzahlen pro Messfeld und den relativen Grauwerten soll klären, ob ein Zusammenhang zwischen beiden Messwerten besteht. Es lässt sich vermuten, dass mit zunehmender Zellanzahl auch der Intensitäts- oder Helligkeitswert der punktförmigen Zellen steigt. In Abbildung 18 sind den Zellanzahlen der einzelnen Oberflächen die jeweilig gemessenen relativen Grauwerte gegenübergestellt.

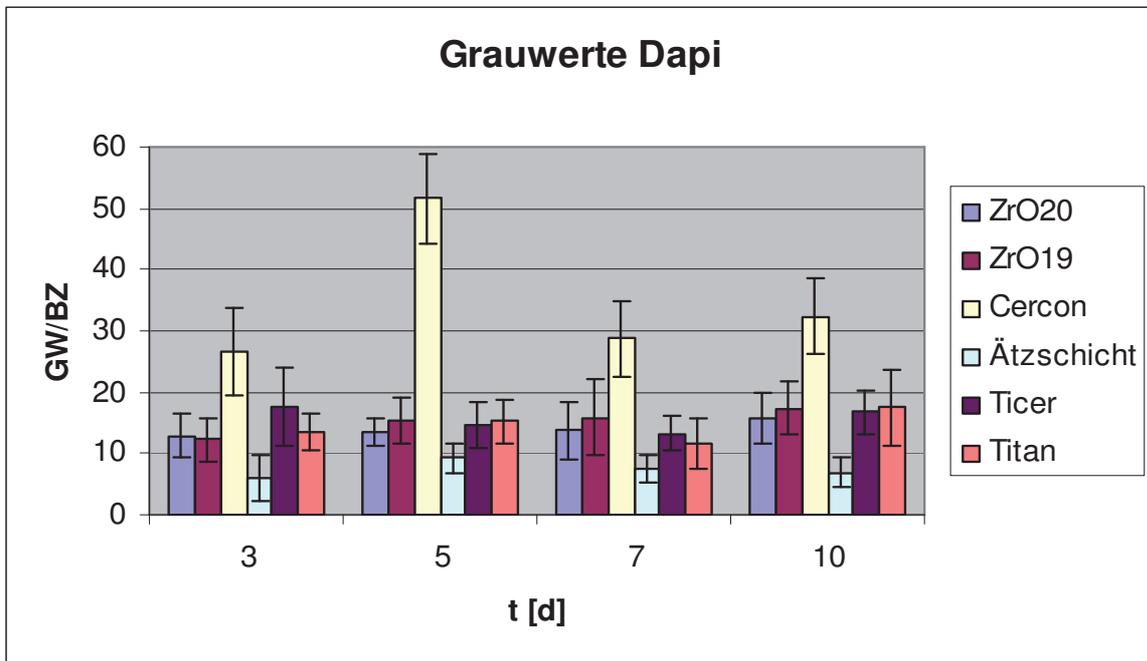




**Abbildung 18:** Gegenüberstellung der Zellanzahlen mit den relativen Grauwerten aller Probekörper

Auf den Oberflächen ZrO<sub>20</sub>, ZrO<sub>19</sub>, Titan und der Ätzschrift ist eine gleichartige Entwicklung der Zellanzahlen und der relativen Grauwerte erkennbar. Das heißt, dass bei zunehmender Zellanzahl auch die relativen Grauwerte der Zellen anstiegen. Ein ähnlicher Verlauf war auf der Cercon- und der Ticer-Oberfläche zu beobachten, wobei jedoch die relativen Grauwerte von Cercon am fünften Versuchstag und von Ticer am dritten Versuchstag weitaus größere Werte annahmen.

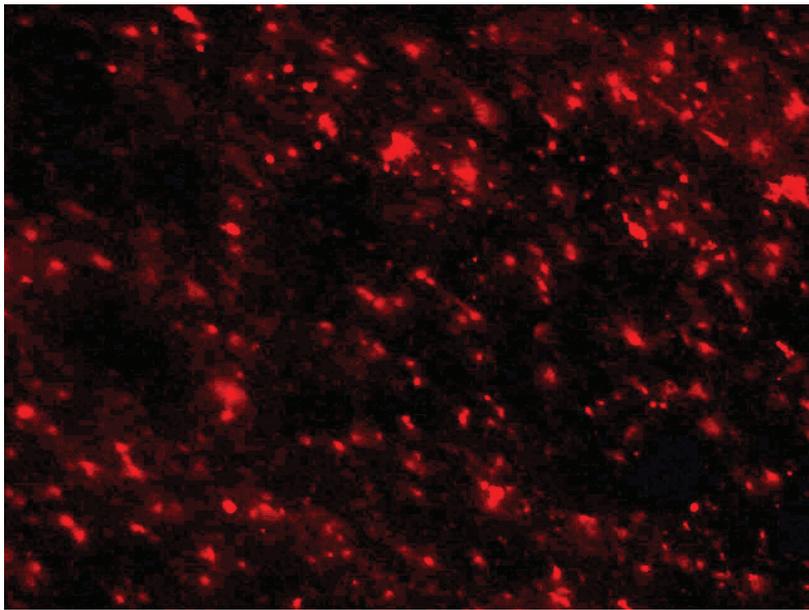
Beim Vergleich der relativen Grauwerte untereinander fallen vor allem die im Vergleich zur Zellanzahl übermäßig hohen Messwerte auf Cercon auf (Diagramm 8).



**Diagramm 8:** Vergleichende Darstellung der ermittelten Grauwerte auf allen Probekörpern am 3., 5., 7. und 10. Versuchstag

#### 4.4 Grauwertanalyse von Bone Sialo Protein, Osteocalcin, Osteonectin und Transforming Growth Factor- $\beta$

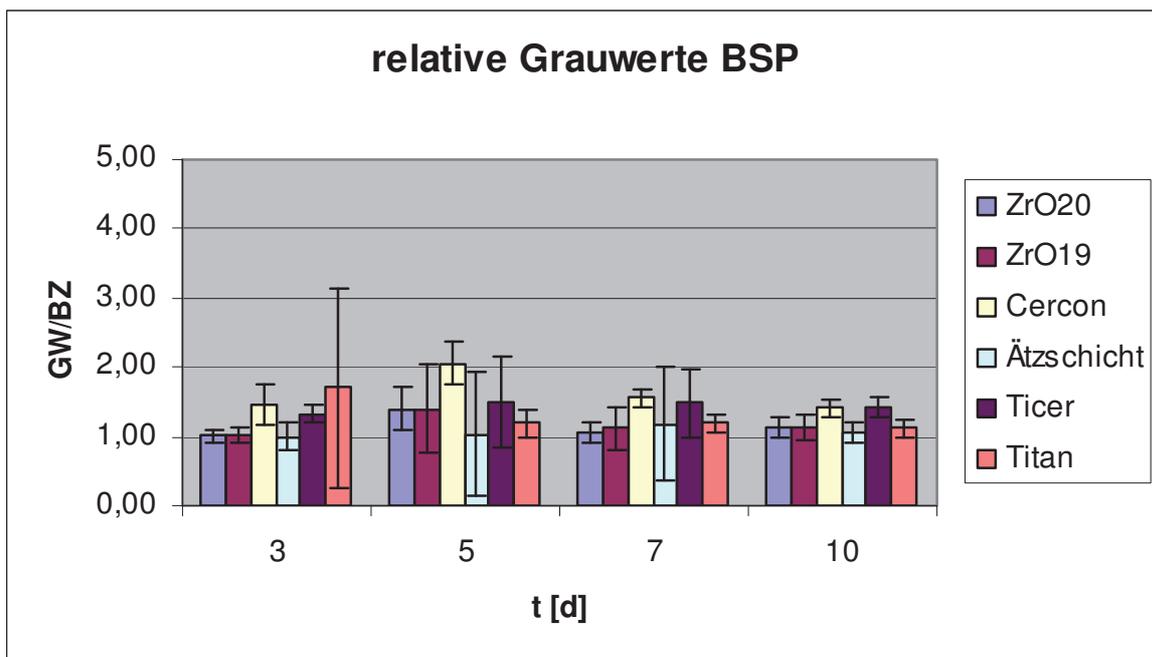
Um die Expression von BSP, OC, ON und TGF- $\beta$  zu quantifizieren, wurde der relative Grauwert der nonkollagenen Knochenproteine bestimmt. In der Abbildung 4.4 ist zur Veranschaulichung der Knochenproteinmessungen die Messaufnahme der BSP-Expression auf Ticer am fünften Versuchstag dargestellt. Die rot gefärbten Areale markieren das durch die Knochenzellen sezernierte BSP.



**Abbildung 19:** fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Expression von BSP auf Ticer am 5. Versuchstag (20fache Vergrößerung, Axiophot (Carl Zeiss Jena))

#### 4.4.1 Grauwertanalyse von BSP

Das Diagramm 9 zeigt eine geringe Zunahme der relativen Grauwerte von BSP auf fast allen Probekörpern zwischen dem dritten und fünften Versuchstag, die dann wiederum bis zum siebenten Versuchstag auf ein ähnliches Niveau der ersten Messung abfielen und schließlich stagnierten.



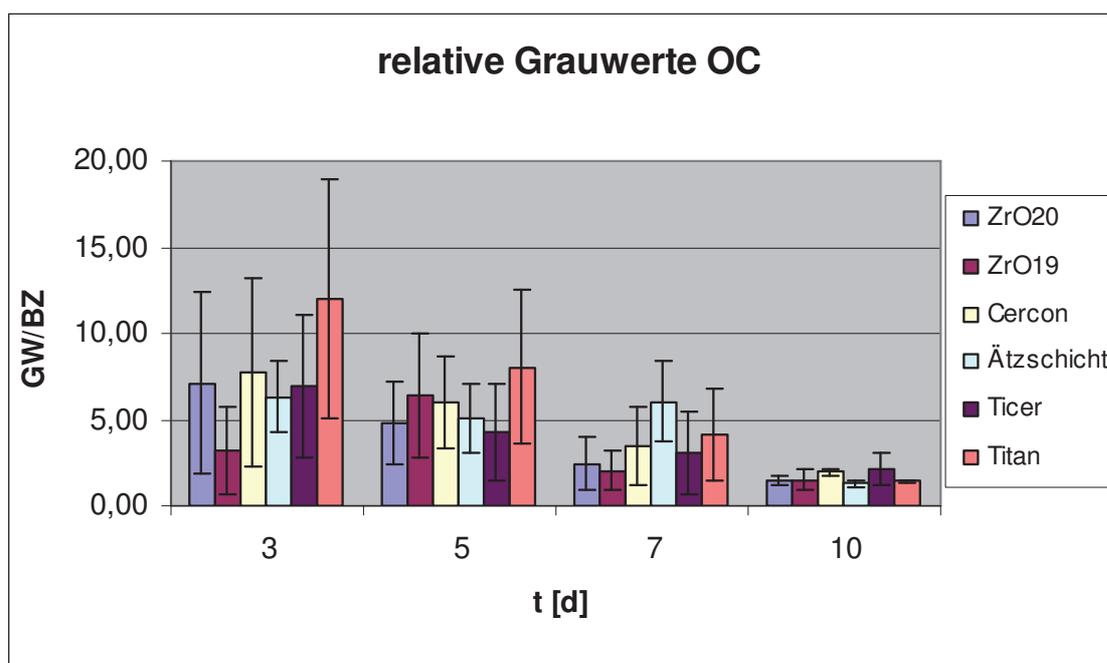
**Diagramm 9:** Vergleichende Darstellung der ermittelten Grauwerte von BSP auf allen Probekörpern am 3., 5., 7. und 10. Versuchstag

Am dritten Versuchstag wurde der maximale relative Grauwert auf der Titanoberfläche bestimmt ( $GW/BZ=1,70$ ). Etwas kleiner waren die Messwerte auf dem Cercon-Probekörper ( $GW/BZ=1,47$ ) und auf Ticer ( $GW/BZ=1,33$ ). Auf den restlichen Oberflächen wurden durchschnittliche relative Grauwerte um 1,00 ermittelt. Am fünften Versuchstag wiesen wir den größten relativen Grauwert mit 2,01 auf Cercon nach. Deutlich kleiner war das Ergebnis auf Ticer ( $GW/BZ=1,51$ ) beziehungsweise auf den Zirkonoxidoberflächen ZrO<sub>20</sub> und ZrO<sub>19</sub> ( $GW/BZ=1,40$ ). Die geringste BSP-Expression beobachteten wir auf Titan und auf der Ätzschrift mit relativen Grauwerten von 1,19 und 1,03. Wie auch am fünften Versuchstag wurde der größte relative Grauwert am siebenten Versuchstag erneut auf dem Cercon-Probekörper bestimmt ( $GW/BZ=1,56$ ). Geringfügig kleiner war der Wert für Ticer ( $GW/BZ=1,49$ ). Die relativen Grauwerte der restlichen Probekörperoberflächen lagen im Bereich von 1,20. Am zehnten Versuchstag wurden wiederholt die maximalen

relativen Grauwerte auf Cercon und Ticer nachgewiesen. Beide Messwerte lagen bei 1,42. Die relativen Grauwerte der restlichen Probekörper nahmen Größenordnungen von ungefähr 1,15 an. Klammert man den Messwert von Titan am dritten Versuchstag im Sinne einer Extremwertstreichung aus, so erreichte der Cercon-Probekörper an allen Versuchstagen die größten Messwerte, gefolgt vom Positivstandard Ticer. Die Werte von ZrO\_20 und ZrO\_19 ähnelten den Messwerten von Titan und der Ättschicht, die im Vergleich zu Cercon und Ticer deutlich kleiner waren.

#### 4.4.2 Grauwertanalyse von OC

Die Bildung von Osteocalcin nahm auf allen Probekörpern im Verlauf des Versuches ab (Diagramm 10).



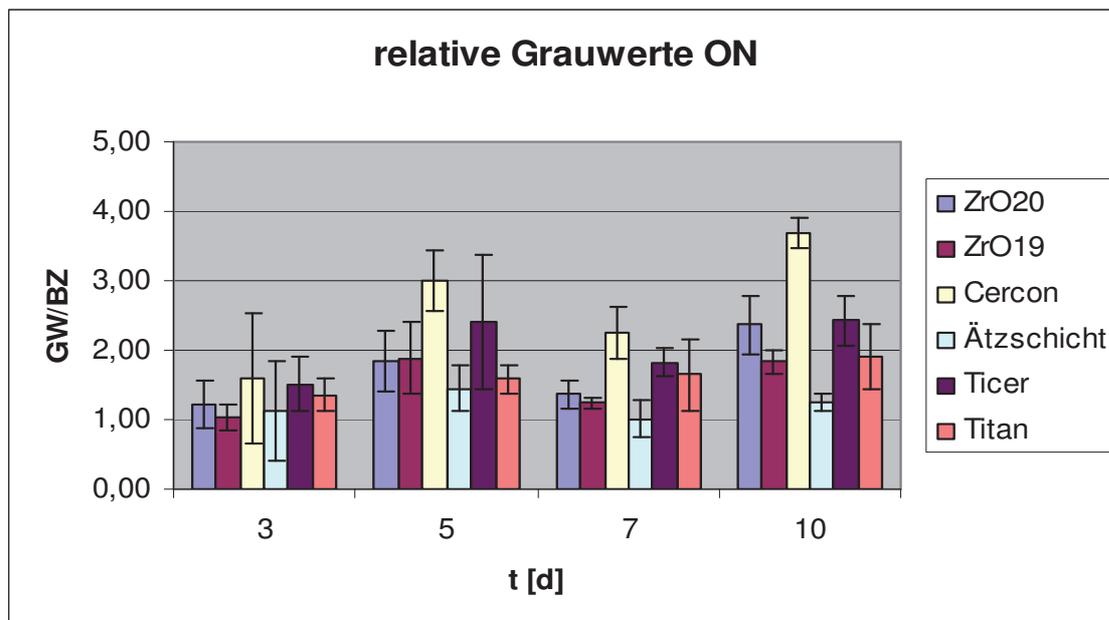
**Diagramm 10:** Vergleichende Darstellung der ermittelten Grauwerte von OC auf allen Probekörpern am 3., 5., 7. und 10. Versuchstag

Am dritten Versuchstag fällt vor allem der hohe relative Grauwert von 12,00 auf der Titanoberfläche auf. Die Messwerte der ZrO\_20-Oberfläche (GW/BZ=7,10), des Cercon-Probekörpers (GW/BZ=7,73), der Ättschicht (GW/BZ=6,33) und von Ticer (GW/BZ = 6,94) nahmen ähnliche Werte an und waren wesentlich kleiner als der auf Titan bestimmte relative Grauwert. Am wenigsten OC-Expression fand auf der ZrO\_19-Oberfläche statt (GW/BZ=3,20). Auch am fünften Versuchstag konnte die

maximale Expression von OC auf der Titanoberfläche nachgewiesen werden. Bestimmt wurde ein relativer Grauwert von 8,02. Im Gegensatz zum dritten Versuchstag ermittelten wir den zweitgrößten Messwert mit 6,45 auf der ZrO<sub>19</sub>-Oberfläche. Auf Cercon wurde ein durchschnittlicher relativer Grauwert von 5,98, auf der Ättschicht ein Wert von 5,07 und auf der ZrO<sub>20</sub>-Oberfläche ein Wert von 4,75 bestimmt. Am wenigsten Osteocalcin wurde auf Ticer gebildet (GW/BZ=4,29). Am siebenten Versuchstag war eine Zunahme der Expressionsaktivität auf der Ättschicht feststellbar. Die Messwerte aller anderen Probekörper nahmen jedoch ab. Auf Titan wurde ein relativer Grauwert von 4,10, auf dem Cercon-Probekörper 3,50 und auf Ticer 3,12 bestimmt. Die geringste Expression von Osteocalcin konnte auf den Zirkonoxidoberflächen ZrO<sub>20</sub> und ZrO<sub>19</sub> nachgewiesen werden. Am zehnten Versuchstag lagen alle Messwerte auf einem sehr geringen Niveau.

#### 4.4.3 Grauwertanalyse von ON

Im Unterschied zu Osteocalcin nahm die Expression von Osteonectin im Laufe des Versuches zu. Dieser Prozess verlief wellenförmig, das heißt nach einem leichten Abfall der Messwerte zwischen fünftem und siebentem Versuchstag stiegen die Werte bis zum zehnten Versuchstag auf ihr Maximum an (Diagramm 11).

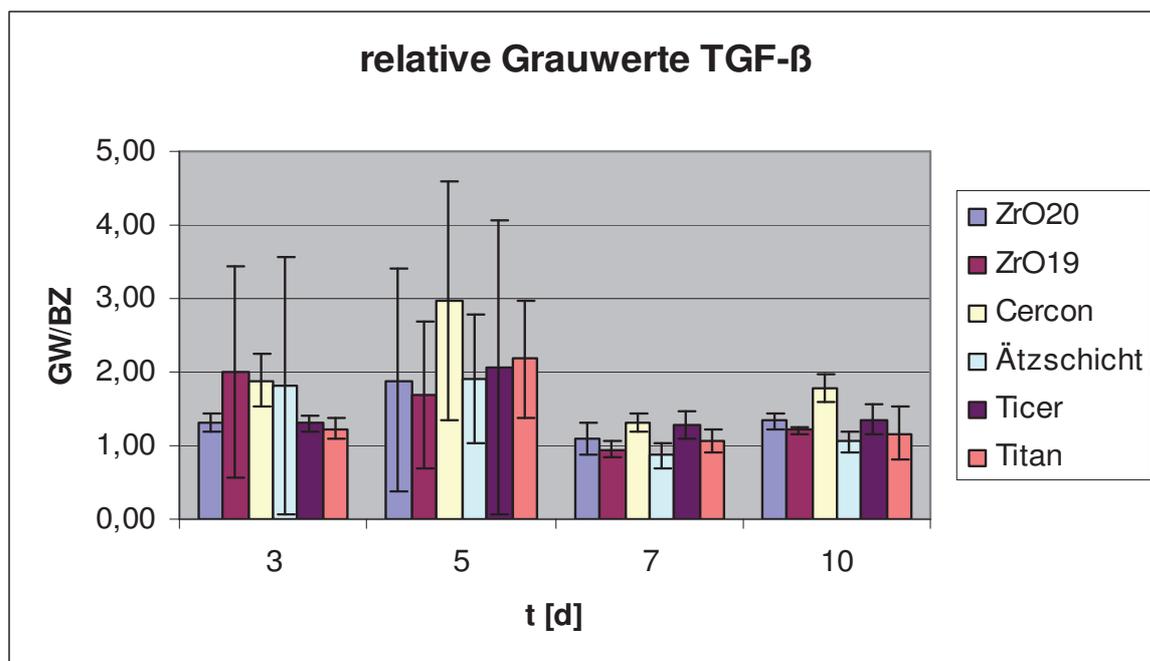


**Diagramm 11:** Vergleichende Darstellung der ermittelten Grauwerte von ON auf allen Probekörpern am 3., 5., 7. und 10. Versuchstag

An allen Tagen konnten die größten relativen Grauwerte auf Cercon nachgewiesen werden. Betrachtet man die am dritten Versuchstag ermittelten Messwerte, so ist erkennbar, dass der Wert für Ticer (GW/BZ=1,51) nur geringfügig kleiner als der des Cercon-Probekörpers (GW/BZ=1,60) war. Etwas weniger Osteonectin wurde auf Titan (GW/BZ=1,35) gebildet. Die auf der ZrO<sub>20</sub>-Oberfläche und auf der Ättschicht ermittelten Werte lagen im Bereich von 1,20. Die geringste Osteonectin-Expression wurde auf der ZrO<sub>19</sub>-Oberfläche (GW/BZ=1,03) nachgewiesen. Auch am fünften Versuchstag konnte die maximale Expression mit einem relativen Grauwert von 2,99 auf Cercon bestimmt werden. Deutlich kleiner war der auf Ticer bestimmte relative Grauwert von 2,40. Die Messwerte der ZrO<sub>20</sub>- und ZrO<sub>19</sub>-Oberfläche lagen im Bereich von 1,85 und waren fast identisch. Am wenigsten Expression fand auf Titan und auf der Ättschicht statt. Am siebenten Versuchstag wurden die größten relativen Grauwerte erneut auf Cercon (GW/BZ=2,26) und Ticer (GW/BZ=1,82) gemessen. Die Messwerte von Titan nahmen geringfügig kleinere Werte an (GW/BZ=1,65). Auf den Probekörpern ZrO<sub>20</sub> und ZrO<sub>19</sub> wurden ähnliche relative Grauwerte im Bereich von 1,30 ermittelt. Die kleinste Osteonectin-Expression konnte wie auch am fünften Versuchstag auf der Ättschicht nachgewiesen werden. Am letzten Versuchstag lag der auf Cercon bestimmte relative Grauwert bei 3,69. Deutlich kleinere Werte wurden auf Ticer (GW/BZ=2,43) und ZrO<sub>20</sub> (GW/BZ=2,37) ermittelt. Die Messwerte von ZrO<sub>19</sub> und von Titan lagen mit relativen Grauwerten von 1,83 beziehungsweise 1,91 noch deutlich über den Messwerten der Ättschicht (GW/BZ=1,01).

#### 4.4.4 Grauwertanalyse von TGF- $\beta$

Betrachtet man die Entwicklung der TGF- $\beta$ -Sekretion, so ist auf fast allen Probekörpern ein Anstieg zwischen drittem und fünftem Versuchstag erkennbar. Nach dem fünften Versuchstag sanken die Messwerte dann auf ihr Minimum ab und stiegen bis zum zehnten Versuchstag nur noch leicht an (Diagramm 12).



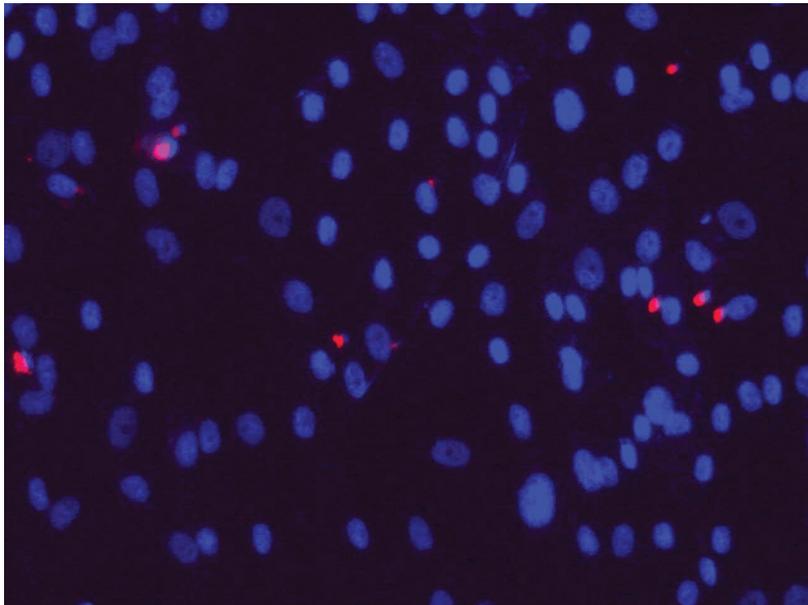
**Diagramm 12:** Vergleichende Darstellung der ermittelten Grauwerte von TGF- $\beta$  auf allen Probekörpern am 3., 5., 7. und 10. Versuchstag

Am dritten Versuchstag konnte die maximale Expression von TGF- $\beta$  mit einem durchschnittlichen relativen Grauwert von 2,01 auf der ZrO<sub>19</sub>-Oberfläche nachgewiesen werden. Etwas kleiner waren die Messwerte auf Cercon (GW/BZ=1,89) und auf der Ättschicht (GW/BZ=1,82). Die auf ZrO<sub>20</sub> und auf Ticer gemessenen relativen Grauwerte lagen bei 1,32 und 1,30. Der kleinste relative Grauwert wurde mit 1,22 auf Titan erhoben. Am fünften Versuchstag wurde die größte Expression auf Cercon bestimmt. Der relative Grauwert betrug 2,97. Sehr viel kleinere Messwerte waren auf Titan (GW/BZ=2,18) und auf Ticer messbar (GW/BZ=2,06). Die Werte der ZrO<sub>20</sub>-Oberfläche und der Ättschicht lagen im Bereich von 1,90. Der kleinste relative Grauwert wurde mit 1,69 auf der ZrO<sub>19</sub>-Oberfläche bestimmt. Am siebenten Versuchstag sank die Expression von TGF- $\beta$  deutlich ab. Der auf Cercon bestimmte relative Grauwert lag bei 1,32. Einen ähnlichen Messwert erreichte Ticer (GW/BZ=1,37). Auf ZrO<sub>20</sub> und auf Titan wurden

fast identische Messwerte im Bereich von 1,10 bestimmt. Die kleinsten durchschnittlichen relativen Grauwerte wurden auf der ZrO<sub>19</sub>-Oberfläche (GW/BZ=0,95) und der Ättschicht (GW/BZ=0,86) ermittelt. Am letzten Versuchstag stiegen alle Messwerte geringfügig an. Auf Cercon wurde erneut der größte relative Grauwert erhoben (GW/BZ=1,78). Auf der Oberfläche ZrO<sub>20</sub> und auf Ticer wurden Messwerte von 1,33 beziehungsweise 1,35 bestimmt. Die relativen Grauwerte der ZrO<sub>19</sub>-Oberfläche und von Titan lagen im Bereich von 1,20. Am wenigsten TGF- $\beta$  konnte auf der Ättschicht (GW/BZ=1,06) nachgewiesen werden.

### 4.5 Untersuchung des apoptotischen Verhaltens

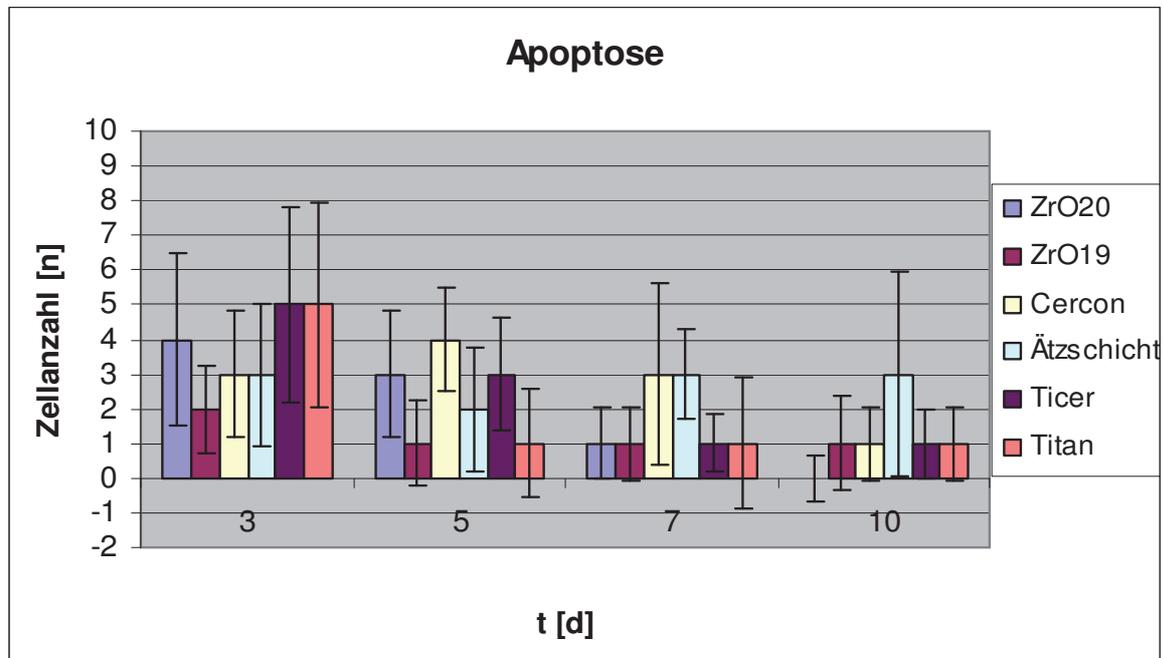
Analog zur Untersuchung der Zellproliferation geschah an jedem Versuchstag die Zählung der apoptotischen Partikel auf allen Probekörpern. Die Abbildung 20 zeigt die Messaufnahme zur Bestimmung der apoptotischen Partikel auf Ticer am fünften Versuchstag. Hierbei stellen die rot markierten Punkte die apoptotischen Zellfragmente und die blauen Punkte die lebenden Knochenzellen dar.



**Abbildung 20:** fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Apoptose auf Ticer am 5. Versuchstag (20fache Vergrößerung, Axiophot (Carl Zeiss Jena))

Die Messwerte sind im Diagramm 13 zusammengefasst. Es ist auffällig, dass die Standardabweichungen auf allen Probekörpern sehr große Werte annehmen. Dies entspricht einer großen Streuung der Messwerte um den Mittelwert.

Im Versuchsverlauf war ein genereller Trend zur Abnahme der Apoptose erkennbar.



**Diagramm 13:** Vergleich der durchschnittlich ermittelten apoptotischen Partikel pro Messfeld aller Probekörper

So wurden beispielsweise auf den Messfeldern des ZrO<sub>20</sub>-Probekörpers am dritten Versuchstag zwischen einem und neun apoptotischen Partikeln gezählt, woraus sich dann ein durchschnittlicher Wert von vier Partikeln bildet.

Die größte apoptotische Aktivität wurde auf fast allen Probekörpern am dritten Versuchstag nachgewiesen. Sie nahm dann an den folgenden Versuchstagen ab. Am dritten Versuchstag waren auf den Oberflächen Ticer und Titan jeweils durchschnittlich fünf apoptotische Zellfragmente pro Messfeld zählbar. Auf ZrO<sub>20</sub> lag der Messwert bei durchschnittlich vier apoptotischen Partikeln. Die Werte von Cercon und der Ättschicht lagen bei drei, ZrO<sub>19</sub> bei zwei apoptotischen Partikeln. Betrachtet man die Messergebnisse des fünften Versuchstages, so ist eine Abnahme der apoptotischen Aktivität auf fast allen Probekörpern erkennbar. Lediglich auf der Oberfläche des Cercon-Plättchens stieg der Messwert um ein Zellfragment an. Am siebenten Versuchstag wurde auf der ZrO<sub>20</sub>- und der ZrO<sub>19</sub>-Oberfläche sowie auf Ticer und Titan nur noch ein apoptotischer Partikel pro Messfeld ermittelt. Die

Ergebnisse der Ättschicht und des Cercon-Plättchens lagen bei drei Partikeln. Am letzten Versuchstag konnte auf den Messfeldern der ZrO<sub>20</sub>-Oberfläche keine Apoptose mehr festgestellt werden. Die Werte von Cercon, Ticer, Titan und der ZrO<sub>19</sub>-Oberfläche lagen bei durchschnittlich einem Zellfragment. Nur der Messwert der Ättschicht stagnierte auf dem Niveau des vorletzten Versuchstages.

Im Gegensatz zur Zellproliferation war eine Abnahme der apoptotischen Aktivität im Verlauf des Experimentes feststellbar. Die einzige Ausnahme bildete die Oberfläche der Ättschicht, auf der auch am letzten Versuchstag noch drei apoptotische Zellfragmente bestimmt wurden.

### **4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Die Untersuchung der Zellproliferation zeigte eine konstante Zunahme der Zellanzahlen auf der ZrO<sub>20</sub>-, der ZrO<sub>19</sub>-Oberfläche und auf dem Cercon-Plättchen. Das Wachstum auf den Oberflächen Ticer und Titan beschrieb einen wellenförmigen Verlauf, dass heißt nach einer Abnahme der Zellanzahlen zwischen fünftem und siebentem Versuchstag wurde das Maximum der Messwerte ebenfalls am zehnten Versuchstag erreicht. Lediglich auf der geätzten Titanschicht konnte keine Zunahme der Zellanzahlen beobachtet werden und es fand am wenigsten Proliferation statt. Die größten Messwerte wurden auf Ticer erhoben. Die Zellanzahlen der keramischen Oberflächen ZrO<sub>20</sub>, ZrO<sub>19</sub> und Cercon waren ähnlich und siedelten sich zwischen den Messwerten von Ticer und der Ättschicht an.

Der Vergleich der Proliferation mit den relativen Grauwerten zeigte einen ähnlichen Verlauf beider Parameter. Zwischen beiden Messgrößen scheint ein direkter Zusammenhang in diesem Versuch und auf diesen Materialien zu bestehen.

Die Messung der Sekretion von BSP ergab eine Stagnation der Werte im Versuchsverlauf. Am meisten BSP wurde auf Cercon und Ticer gebildet. Die kleinsten Messwerte ermittelten wir auf der Ättschicht.

Die Erhebung der relativen Grauwerte von Osteocalcin ergab wesentlich größere Messwerte als die der anderen Knochenproteine. Hingegen verzeichnete die Sekretion eine stetige Abnahme bis zum zehnten Versuchstag. Am dritten und fünften Versuchstag wurden die größten Messwerte auf Titan bestimmt. Am siebenten Versuchstag war der auf der Ättschicht gemessene Wert maximal. Am wenigsten Osteocalcin wurde am dritten und siebenten Versuchstag auf der ZrO<sub>19</sub>-

Oberfläche und am fünften Versuchstag auf Ticer exprimiert. Am letzten Versuchstag waren nur noch minimale Unterschiede erkennbar.

Die Sekretion von Osteonectin nahm im Versuchsverlauf zu. Die größten Werte konnten auf Cercon bestimmt werden. Etwas weniger Expression fand auf Ticer statt.

Die kleinsten Messwerte wurden auf Titan nachgewiesen.

Die relativen Grauwerte von TGF- $\beta$  nahmen nach einem deutlichen Anstieg zwischen drittem und fünftem Versuchstag ab und stiegen dann erneut zwischen siebentem und zehntem Versuchstag leicht an. Am meisten TGF- $\beta$  wurde auf Cercon sezerniert. Am siebenten und zehnten Versuchstag konnte die geringste Expression von TGF- $\beta$  auf der Ättschicht nachgewiesen werden. Am dritten Versuchstag wurde der kleinste Messwert auf Titan und am fünften Versuchstag auf der ZrO<sub>2</sub>-Oberfläche erhoben.

Die Untersuchung der Apoptose hatte eine Abnahme der Zahlen toter Zellfragmente im Versuchsverlauf als Ergebnis. Am letzten Versuchstag wurde auf fast allen Probekörpern nur noch ein beziehungsweise kein apoptotischer Partikel nachgewiesen. Die einzige Ausnahme bildete die Ättschicht, auf der auch am letzten Versuchstag noch durchschnittlich drei Partikel gezählt wurden.

## 5. Diskussion

### 5.1 Fehlerdiskussion

Die Zählung der proliferierten Knochenzellen erfolgte in 10 verschiedenen Messfeldern auf dem jeweiligen Probekörper. Da aus diesen Werten der Durchschnitt gebildet wurde, konnten mögliche Fehler bei der interaktiven Zählung minimiert werden. Es erfolgte eine viermalige Wiederholung der Zellanzahlmessungen an jedem Versuchstag. In der Auswertung fand dann der Mittelwert Verwendung. Die Messung der Knochenproteinmengen geschah analog der Zellanzahlbestimmung in 10 verschiedenen Messfeldern. Sie wurde automatisch mit Hilfe der Software AxioVision (Zeiss) durchgeführt. Die Fehlerwahrscheinlichkeit ist somit gering.

Es gilt zu bemerken, dass eine mögliche Beeinflussung des Kulturmediums und der Knochenzellen durch den im Objektträger (Chamber Slide) enthaltenen Werkstoff Polystyrol nicht auszuschließen ist. Im Sinne eines systematischen Fehlers sind davon jedoch alle im Versuch durchgeführten Vorgänge und Messergebnisse gleichermaßen betroffen. Zudem beinhaltet die Auswertung nicht Absolutwerte, sondern wurde vergleichend vorgenommen.

In der Versuchsanordnung fand das Wachstum der Knochenzellen auf der Oberfläche eines runden, flachen Probekörpers statt. Der Rand des Probekörpers stellt hierbei eine Grenze für die Knochenzellen dar, die natürlicherweise nicht existiert. Denn im Gegensatz zu unserem In-vitro-Versuch ist ein in den menschlichen Knochen inseriertes schraubenförmiges Implantat komplett von Knochen umgeben, und die Knochenzellen können ihr Wachstum und die Bildung der Knochenmatrix in alle Dimensionen fortsetzen, wohingegen auf dem Probekörper eine Monolayer-Schicht aus Knochenzellen gebildet wird.

Weiterhin muss erwähnt werden, dass auf Probekörper-Oberflächen energetisch begünstigte Stellen existieren, die eine vermehrte Proliferation und Knochenproteinbildung anregen können. So wies Grobitzsch (2003) eine größere Proliferation in zentralen als in randnahen Oberflächenarealen nach. Die Beobachtungen bestätigten sich in der Arbeit von Hilbig et al. (2007).

## 5.2 Aufspannen des Messrahmens

Der Probekörper aus reinem maschinengeborenen Titan diente im Versuch als Negativstandard. Ticer bildete den Positivstandard. Diese beiden Probekörper spannten den erwarteten Versuchsmessrahmen auf.

Aufgrund der mehrmaligen Wiederholung der Messungen der Zellanzahlen konnte eine Signifikanzprüfung durchgeführt werden. Diese ergab, dass zwischen dem Negativstandard Titan und den restlichen Probekörpern hinsichtlich der Proliferation nur selten signifikante Unterschiede bestanden (siehe auch: 4.2 Statistische Sicherung der Ergebnisse der Proliferation). Eine ähnliche Beobachtung wurde bei der Messung der nonkollagenen Knochenproteine BSP, OC, ON und TGF- $\beta$  gemacht.

Für den Negativstandard Titan lag die Erwartung in deutlich geringeren Messwerten im Vergleich zu den restlichen Probekörpern. Diese Annahme konnte mit dem hier durchgeführten Versuchsansatz nicht erfüllt werden. Auf mögliche Erklärungen dafür wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

## 5.3 Diskussion der Messergebnisse

Die biologische Antwort des Gewebes ist im Wesentlichen von zwei implantat-spezifischen Faktoren abhängig: Dies ist zum einen die Topografie der Implantatoberfläche. Sie wird vor allem durch den Mittenrauwert ( $r_a$ ) charakterisiert. Über den optimalen Mittenrauwert existieren unterschiedlichste Ansichten. Jedoch ist man sich in einem Punkt einig, dass eine aufgeraute Implantatoberfläche eine beschleunigte Osseointegration und damit eine erhöhte mechanische Verbundfestigkeit zum Knochen bedingt (Buser et al., 1998, Carlsson et al., 1988). Die zweite wesentliche, die Osteoblastenantwort beeinflussende, Komponente ist die chemische Zusammensetzung (Tsukimura et al., 2008) des Oberflächenmaterials, da diese direkt auf das angrenzende Medium einwirkt.

Beide Faktoren stellen ein modifizierbares Charakteristikum einer Implantatoberfläche dar und verändern die Reaktion des umliegenden Gewebes unmittelbar.

Um diesen Effekt zu untersuchen, bestimmten wir quantitativ die Anzahl der auf den verschiedenen Probekörpern gebildeten Knochenzellen und die Menge der von ihnen sezernierten Knochenproteine (OC, ON, BSP und des Wachstumsfaktors TGF-

β), die mit großer Wahrscheinlichkeit essenziell für die Osseointegration und die Initiierung dieser sein dürften.

Im Versuch wurden keramische Zirkoniumdioxid-Oberflächen unterschiedlicher physikalischer Genese mit herkömmlichen, langjährig klinisch bewährten Titanoberflächen verglichen. Zu den keramischen Oberflächen gehören der ZrO<sub>20</sub>- und der ZrO<sub>19</sub>-Probekörper sowie Cercon. Sie sind durch eine ähnliche Oberflächenchemie gekennzeichnet. Der Cercon-Probekörper besteht aus einem rein keramischen Werkstoff, Yttrium-stabilsierter Zirkoniumdioxidkeramik. Hingegen haben die Probekörper ZrO<sub>20</sub> und ZrO<sub>19</sub> einen Grundkörper aus Titan und wurden in einem neuartigen Verfahren mit einer keramischen Schicht aus Zirkoniumdioxid versehen.

Der Hintergrund dieser Überlegung ist ein klinisches Phänomen: Nach dem Setzen eines Implantats kann es durch ein multifaktorielles Geschehen zum Rückgang von Zahnfleisch und Knochen im Bereich des Implantats kommen. Oftmals liegt dann eine metallfarbene Implantatschulter frei, was zu einer erheblichen ästhetischen Beeinträchtigung für den Patienten führt, vor allem im Bereich der Frontzähne. Das Beschichten eines Titanimplantats mit Keramik (Zirkoniumdioxid) soll hierbei Abhilfe schaffen. Weiterhin können die positiven Materialeigenschaften von Titan mit der guten Ästhetik und biologischen Verträglichkeit von Zirkoniumdioxid verbunden werden.

Zu den verwendeten Titanoberflächen gehören die klinisch erfolgreich verwendete Ticer-Oberfläche sowie eine mittels Säure geätzte Schicht, die der langjährig bewährten SLA-Oberfläche der Firma Straumann ähnelt. Als Negativstandard wurde reines maschinenbearbeitetes Titan verwendet.

Vergleicht man die Anzahl der auf den Implantatoberflächen gebildeten Knochenzellen mit der Menge der von ihnen sezernierten Knochenproteine (OC, ON, BSP und des Wachstumsfaktors TGF-β), so scheint ein Zusammenhang beider Messgrößen erkennbar. Das bedeutet, wenn sich viele Knochenzellen auf einem Probekörper bildeten, stellten diese zumeist auch große Mengen der Knochenproteine her. Dies trifft beispielsweise für die Ticer-Oberfläche zu: An allen Versuchstagen wurde die Entstehung großer Zellanzahlen und Knochenproteinmengen nachgewiesen. Dies lässt eine gute biologische Eignung der Ticer-Oberfläche vermuten, die durch die klinische Erfahrung bestätigt wird (Graf et al., 2001).

Betrachtet man die Messwerte des Cercon-Probekörpers, der aus reiner Yttrium-stabilisierter Zirkoniumdioxidkeramik (Y-TZP) besteht, so ist eine im Vergleich zu den anderen Probekörperoberflächen extrem hohe Expression an OC, ON, BSP und TGF- $\beta$  erkennbar. Die Zellanzahlen waren jedoch bei fast allen Messungen kleiner als die von Ticer und lagen in einem ähnlichen Bereich wie die Messwerte der anderen keramischen Probekörper ZrO\_20 und ZrO\_19 sowie von Titan.

Es ist wahrscheinlich, dass bestimmte Zellen eine besonders hohe Expressionsaktivität aufweisen und dass auch unabhängig von der Zellanzahl große Mengen der für die Osseointegration notwendigen Knochenproteine gebildet werden, was sich positiv auf die knöcherne Einheilung auswirken könnte. Dies wäre auch eine mögliche Erklärung dafür, dass eine Oberfläche wie die geätzte SLA-ähnliche Titanschicht, die im Versuch die geringsten Zellanzahlen aufwies, klinisch ein gutes Einwachsverhalten zeigt und langjährig erfolgreich verwendet wird. Denn auch auf der SLA-ähnlichen Oberfläche wurden im Verhältnis zu den Zellanzahlen relativ große Mengen an Knochenproteinen gebildet. Die gleichen Beobachtungen machte Grobitzsch (2003) an originalen SLA-Oberflächen.

Der Maximalwert der Zellanzahlen wurde an fast allen Versuchstagen (3., 5. und 10. Versuchstag) auf der Ticer-Oberfläche bestimmt. Ticer scheint die Entstehung von Knochenzellen in hohem Maße zu begünstigen.

Die Zellanzahlen der Zirkoniumdioxid-Probekörper ZrO\_20, ZrO\_19 und Cercon ähnelten sich an allen Versuchstagen, wobei die Messwerte von ZrO\_20 etwas größer als die der beiden anderen Probekörper waren. Ursächlich für die Ähnlichkeit könnte die Zirkoniumdioxidoberfläche sein, die diesen Probekörpern gleich ist.

Eine Beschichtung der Titgrundkörper mit Zirkoniumdioxid brachte somit keinen Vorteil hinsichtlich der Proliferation von Knochenzellen gegenüber langjährig bewährten Titanoberflächen wie Ticer.

Beim Vergleich der Zellanzahlen mit den relativen Grauwerten, das heißt dem Helligkeits- oder Intensitätswert der blau gefärbten Knochenzellen, war ein proportionaler Zusammenhang beider Messgrößen über den Versuchszeitraum erkennbar. Diese Beobachtung zeigt, dass sich die Kernflächen der Knochenzellen über die Zeit nicht wesentlich vergrößern oder verkleinern.

Die Grauwerte der auf Cercon gebildeten Knochenzellen erreichten weitaus größere Messwerte als die der auf den anderen Oberflächen gebildeten Zellen, was auf ein größeres Volumen der Knochenzellen auf Cercon hindeuten könnte. Denkbar wäre

auch eine höhere Aktivität oder ein vermehrtes Spreizen, welches die stark erhöhten relativen Grauwerte verursachen könnten.

Die durch die Knochenzellen gebildeten Proteine sind für die Initialisierung und die weitere Organisation des Interfaces zwischen Implantat und Knochengewebe verantwortlich. Sie binden Hydroxylapatit und Kalzium, stellen Zell-Zell und Zell-Matrix-Verbindungen her und ermöglichen das Heranwachsen von Kapillaren, Gewebe und Osteoprogenitorzellen an das Implantat. Eine große Anzahl von Knochenzellen begünstigt also mit hoher Wahrscheinlichkeit die Einheilungsmechanismen dentaler Implantate, da diese große Mengen der Knochenproteine herstellen.

Die Messwerte der geätzten Titanschicht, auf der an allen Versuchstagen die wenigsten Knochenzellen entstanden waren, deuten darauf hin, dass eine erhöhte Rauheit einer Oberfläche vor allem die Differenzierung *in vitro* und weniger die Proliferation begünstigen könnte. Dies bestätigen die von Graf et al. (2009) und anderen Autoren (Lincks et al., 1998) gemachten Beobachtungen, welche sich unter der Annahme zweier verschiedener Wege, die zur Osseointegration führen, erklären ließen: Dabei wäre denkbar, dass einige Oberflächenmodifikationen die Osseointegration über einen zellulären Weg bedingen, das heißt durch die Bildung großer Mengen an Knochenzellen, während subtraktiv bearbeitete Oberflächen mit einer größeren Rauigkeit die Einheilung über einen azellulären Weg, das heißt durch Einscheidung des Implantats durch Kalzium- und Phosphationen ohne Beteiligung von Zellen, bevorzugen.

Dabei würde mit zunehmender Oberflächenrauigkeit die Proliferation abnehmen (Boyan et al., 2003). Im Gegensatz dazu wäre eine Zunahme der Differenzierung der Knochenzellen und als Ausdruck davon eine erhöhte Osteocalcinproduktion zu verzeichnen, denn Osteocalcin gilt als Marker differenzierter Osteoblasten. Die niedrigen Zellanzahlen und eine verhältnismäßig hohe Expression an Osteocalcin auf der Ättschicht, vor allem am siebenten Versuchstag, untermauern diese Erklärung.

Somit ließe sich folgende Hypothese formulieren: Bestimmte, die Oberfläche aufrauende Strukturen im Bereich von wenigen Mikrometern, begünstigen eine Anlagerung von Proteinen, Kalzium und Phosphat. Die Implantateinheilung erfolgt hierbei nicht über den biogenen Mineralisationstyp „Osteogenese“ sondern durch einen chemisch-physikalischen Prozess, der womöglich an die degenerative

Verkalkung bei der Arteriosklerose erinnert. Im Gegensatz dazu unterstützen nicht subtraktiv bearbeitete Oberflächen mit einer geringeren Rauigkeit, beispielsweise im Bereich der Rauigkeit von Ticer ( $1,25\ \mu\text{m}$ ) und weniger, eine Einheilung über zelluläre Mechanismen.

Osteonectin moduliert die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, organisiert die Entstehung der extrazellulären Matrix und hat eine grundlegende Bedeutung für die Osseointegration von Implantaten. Besonders große Mengen von Osteonectin konnten auf Cercon und Ticer ermittelt werden. Die Ergebnisse der Messungen deuten auf eine frühe Ausbildung der extrazellulären Knochenmatrix und der Prozesse der Zelladhäsion und Zellmigration auf diesen Oberflächen hin.

Die mit Zirkoniumdioxid beschichteten Titgrundkörper ZrO\_20 und ZrO\_19 wiesen deutlich kleinere Messwerte auf, die im Bereich des Negativstandards Titan lagen. Eine Erklärung hierfür könnte in der Ähnlichkeit der Oberflächenstruktur von Titan und der Probekörper ZrO\_20 und ZrO\_19 liegen. Möglicherweise hat die Beschichtung mit Zirkoniumdioxid nur einen kleinen Einfluss auf die Osteonectin-Expression, und die gerillte durchscheinende Oberfläche des Titgrundkörpers bedingt die Ähnlichkeit zum Negativstandard Titan.

Der Knochenmarker Osteocalcin spielt eine wichtige Rolle während der Phase der Matrixmineralisation und wird als Maß für die Osteoblastendifferenzierung angesehen. Wie bereits beschrieben, wird Osteocalcin bevorzugt auf rauen Oberflächen exprimiert. Obwohl der Probekörper aus maschinell bearbeitetem Titan im Versuch als Negativstandard verwendet wurde, ermöglichte er an den ersten beiden Versuchstagen die größte Expression von Osteocalcin. Dies würde besagen, dass eine Oberfläche aus reinem Titan, die im Gegensatz zu komplizierten aufrauenden Verfahren (zum Beispiel Ätzung) durch Maschinenbearbeitung strukturiert wurde, eine frühzeitige Osteoblastendifferenzierung fördert und die Matrixmineralisation beschleunigt. Diese Annahme erscheint unter Einbeziehung der anerkannten Meinung, dass die Aufrauung einer Implantatoberfläche einen besonders stabilen Implantat-Knochen-Kontakt erzeugt und die mechanische Verbundfestigkeit entscheidend verbessert (Lincks et al., 1998; Buser et al., 1998), sehr fraglich. Eine mögliche Erklärung liegt darin, dass die im Versuch verwendete Titanoberfläche nicht glatt war, sondern durch die Maschinenbearbeitung eine gerillte Oberfläche aufwies, wie die stichprobenweise von uns angefertigten

rasterelektronischen Mikroskopaufnahmen belegen (siehe auch Abbildung 11). Dies könnte ursächlich für die erhöhte Osteocalcinsekretion sein.

Die Expression von Bone Sialo Protein stagnierte im Versuchsverlauf. In fast identischer Weise wie bei der Messung von Osteonectin waren die größten Mengen des Proteins auf Cercon und Ticer feststellbar. Die Bildung von BSP geht einher mit der Initialisierung der Knochenmineralisation, und es wird vermutet, dass BSP das Zentrum der Kristallisation für die Hydroxylapatit-Bildung darstellt. Da auf Cercon und Ticer besonders viel BSP gebildet wurde, ist es wahrscheinlich, dass die Knochenzellen auf diesen Oberflächen eine rasche Initialisierung der Knochenmineralisation ermöglichen. Bei beiden Oberflächen ist eine gute Einheilung denkbar, da der Schlüssel zum Erfolg eines Implantats von den initialen Heilungsprozessen abhängig ist (Lekic et al., 1996).

Der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  vermittelt zahlreiche biologische Antworten und ist unter anderem an der Induktion der epithelialen und mesenchymalen Proliferation beteiligt. Er stimuliert die Angiogenese und gilt als wichtiger Bestandteil bei der Bildung der extrazellulären Matrix. Die größten Messwerte wurden wiederholt auf Cercon und Ticer ermittelt, was für eine schnelle Ausbildung des das Implantat umgebenden Gewebes spricht.

Die Messung der apoptotischen Zellfragmente zeigte eine Abnahme des programmierten Zelltods im Versuchsverlauf. Dies lässt sich in dem hier durchgeführten Experiment als genereller Trend formulieren. Die Werte auf den einzelnen Probekörpern differierten zwischen einer und fünf apoptotischen Fragmenten und es kam zu sehr großen Standardabweichungen, so dass eine generelle Aussage zu der Auswirkung der einzelnen Oberflächen auf die apoptotische Aktivität nur schwer zu treffen ist. Auffallend war jedoch eine nicht kleiner werdende apoptotische Aktivität auf der Ättschicht.

Die Abnahme der Apoptose im in-vitro-Versuch bei kurzen Versuchszeiten ließe sich durch folgende Hypothese erklären: Eine Oberfläche bedeutet Stress für die Zelle. Infolge dessen werden einige Zellen apoptotisch, das heißt sie sterben durch programmierten Zelltod. Den robusteren, überlebenden Zellen hingegen gelingt es, oberflächenmaskierende Proteine zu sezernieren. Weiterhin werden unabhängig davon zunehmend Mineralien adsorbiert. Dies führt dazu, dass die Oberfläche im Laufe der Zeit verträglicher für die Zellen wird und die Apoptose abnimmt. Möglicherweise trifft diese Annahme auch für Cercon zu, dessen Oberfläche durch

eine außerordentlich große Proteinexpression zunehmend verträglicher würde. Ausgehend von den Versuchsergebnissen lässt sich eine gute biologische Eignung von Cercon als Implantatmaterial vermuten.

Die Messwerte von Ticer bestätigten die von Graf (2001, 2009) und Hilbig (2005) gemachten Beobachtungen und waren durch große Zellanzahlen und Knochenproteinmengen gekennzeichnet.

Erstaunlich waren die Analogien zwischen den Zirkoniumdioxidoberflächen ZrO<sub>20</sub>, ZrO<sub>19</sub> und Cercon bei der Messung der Zellanzahlen, wofür die ähnliche Oberflächenchemie dieser Probekörper verantwortlich sein könnte.

Hingegen unterschieden sich die Proteinmengen von Cercon deutlich von ZrO<sub>20</sub> und ZrO<sub>19</sub>, trotz ähnlicher Oberflächenchemie. Die Messwerte von Titan hingegen zeigten große Ähnlichkeit mit ZrO<sub>20</sub> und ZrO<sub>19</sub>. Eine mögliche Ursache hierfür kann der durchscheinende Titangrundkörper von ZrO<sub>20</sub> und ZrO<sub>19</sub> sein, welcher die Ähnlichkeiten in der Oberflächenstruktur bedingt.

Es lässt sich nicht mit letzter Sicherheit sagen, dass hohe Zellanzahlen und große Mengen gebildeter Knochenproteine eine gute Osseointegration im klinischen Alltag bedingen. Die niedrigen Messwerte der geätzten Titanoberfläche zeigen, dass trotzdem eine erfolgreiche Einheilung eines Implantats geschehen kann. Führt man sich jedoch die Funktionen der Knochenzellen und der Knochenproteine bei der Osseointegration vor Augen, so besteht mit großer Wahrscheinlichkeit ein Zusammenhang zwischen angeregter Proliferation und Sekretion und einer komplikationslosen Implantateinheilung. Der klinische Erfolg von Ticer, welches konstant große Messergebnisse ermöglichte, bekräftigt diese Vermutung.

Unter diesem Gesichtspunkt erzielte die Beschichtung von Titan mit Zirkoniumdioxid keinen Vorteil hinsichtlich der Proliferation und Sekretion gegenüber langjährig bewährten Titanoberflächen wie Ticer. Im klinischen Alltag wäre jedoch die zahnfarbene Ästhetik des Implantats ein entscheidendes Kriterium für eine derartig beschichtete Oberfläche, mit der man sich trotz einer keramischen Beschichtung die physikalischen Eigenschaften von Titan zu nutze machen könnte. Möglicherweise kann in Zukunft durch weiterführende Untersuchungen, gegebenenfalls mittels Bioaktivierung der Oberfläche, ein keramisch beschichtetes zahnfarbenedes Implantat mit Titangrundkörper hergestellt werden, welches auch im Sinne der biologischen Eignung dem Titan ebenbürtig ist.

Legt man die Versuchsergebnisse von Cercon zu Grunde, so scheint dieser Werkstoff eine gute biologische Eignung als Implantatmaterial zu haben. Einige Autoren beschreiben entscheidende Vorteile von Zirkoniumdioxid gegenüber Titan: So seien neben den ästhetischen Eigenschaften die Metallfreiheit und die bessere biologische Verträglichkeit ein Kriterium für diesen Werkstoff (Gahlert et al., 2007). Laut einer Literaturrecherche von Mellinghoff (2010), die er mit den Erfahrungen aus der eigenen Praxis verglich, findet auf Implantaten aus Zirkoniumdioxid gleich viel oder weniger Plaqueadhäsion und bakterielle Besiedlung im Vergleich zu Titanimplantaten statt. Unbestritten ist, dass Zirkoniumdioxidimplantate ästhetische Vorteile gegenüber Titanimplantaten haben, insbesondere im Falle eines Knochen- oder Bindegewebsverlusts im Bereich der Frontzähne (Kohal et al., 2003). Zudem besteht eine rege Nachfrage nach einem weißen, nicht metallfarbenen Implantatsystem. Eine ähnliche Entwicklung ist in der zahnärztlichen Prothetik zu beobachten, wo vollkeramische Restaurationen trotz jahrzehntelanger erfolgreicher Verwendung der Metallkeramik den Einzug erhielten.

Jedoch stellen die physikalischen Eigenschaften von Zirkoniumdioxid die Forschung und den Behandler vor große Probleme. Gahlert et al. (2007) verglichen in einem Tierversuch Zirkoniumdioxidimplantate mit einer glatten und einer aufgerauten Oberfläche mit herkömmlichen SLA-Implantaten aus Titan. Die SLA-Implantate erreichten zu jedem Zeitpunkt erheblich größere Messwerte im Ausdrehversuch als die Zirkoniumdioxidimplantate, was eine stabilere Verbindung zwischen Implantat und umgebendem Knochen bedeutet. Es wurde aber herausgefunden, dass die Aufrauung der Zirkoniumdioxidoberflächen einen Vorteil gegenüber glatten unbearbeiteten Oberflächen brachte. Dabei gilt zu bemerken, dass die Bearbeitbarkeit der Zirkoniumdioxidoberfläche zur Erzeugung einer für die Osseointegration wichtigen Rauigkeit einen limitierenden Faktor darstellt. Hierbei entstehen Risse und Spalten im Gefüge des Materials, die die Festigkeit erheblich beeinträchtigen.

Die Stabilität vollkeramischer Implantate und der prothetischen Versorgung soll durch einteilige Systeme aus Zirkoniumdioxid verstärkt werden, aber auch diese haben im klinischen Alltag entscheidende Nachteile: Die Möglichkeit der Achsenkorrektur wie bei einem zweiteiligen Implantatsystem aus Titan ist nicht gegeben und müsste durch Präparation des Abutments erzeugt werden, was wiederum das Zirkoniumdioxid-Gefüge nachhaltig schwächt. Zudem kann eine stabile Implantat-

Abutment-Verbindung zweiteiliger Zirkoniumdioxid-Implantate derzeit nicht erzeugt werden. Diese bestanden die Belastungstests in der bisher einzigen in-vitro-Untersuchung nicht (Kohal et al., 2008).

Einige Studien (Andreotelli et al., 2009; Stadlinger et al., 2010) suggerieren eine uneingeschränkte Eignung von Zirkoniumdioxid als Implantatwerkstoff. Es ist aber zu bemerken, dass keine klinisch basierten Daten zur Verwendung von Zirkoniumdioxidimplantaten existieren. Gegenwärtig lassen die vorhandenen Studien keinen routinemäßigen Einsatz von Zirkoniumdioxidimplantaten im klinischen Alltag zu und forcieren die Untersuchungen mit keramisch beschichteten Titanimplantaten.

### **5.1 Ausblick**

Die zahnärztliche Implantologie entwickelte sich in den letzten Jahren zu einer eigenständigen Subdisziplin der Zahnmedizin. Durch die Anwendung dentaler Implantate ließ sich ein Zugewinn an therapeutischen Möglichkeiten realisieren, der einen hohen Wert für die Patientenversorgung darstellt. Die Möglichkeiten erstrecken sich hierbei vom Ersatz eines verloren gegangenen Frontzahns bis zur Stabilisierung vorhandener Totalprothesen.

Sogar in die Kieferorthopädie hielten dentale Implantate als Verankerungselemente Einzug. Bis vor einiger Zeit galt dabei die stabile Osseointegration als oberstes Ziel. Die anfänglichen Probleme konnten mit wachsender Erfahrung und umfangreichen diagnostischen und chirurgischen Hilfsmitteln weitestgehend gelöst werden, doch stieg mit der Erweiterung der Indikationen auch der ästhetische Anspruch der Patienten und des Behandlers. So stellt beispielsweise die Implantatinsertion im Frontzahnggebiet bei einem Mangel an Knochen- und Bindegewebe eine höchst komplizierte Therapie dar, die bei einem Misserfolg zu einer erheblichen ästhetischen Beeinträchtigung des Patienten führen kann.

Eine mögliche Komplikation ist der Rückgang des Knochens und des Weichgewebes im Bereich des Implantats. Hierbei kann es zu einer Freilegung der metallenen Implantatschulter kommen, was die Rot-Weiß-Ästhetik stark verschlechtert.

Das Beschichten von herkömmlichen Titanimplantaten mit einer zahnfarbenen Oberfläche aus Zirkoniumdioxidkeramik könnte hierbei Abhilfe schaffen. Auch vor dem Hintergrund der steigenden Nachfrage nach einem zahnfarbenen Implantatmaterial wäre diese Erfindung eine nützliche Therapiealternative zu Titanimplantaten.

Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigten jedoch, dass die in diesem Versuch angewendeten Beschichtungen mit Zirkoniumdioxid die Proliferation von Knochenzellen und die Herstellung von Knochenproteinen nicht in dem Maße begünstigen, wie es die im Versuch als Positivstandard verwendete Titanoberfläche Ticer ermöglichte.

Für den vollkeramischen Werkstoff Cercon kann eine sehr gute biologische Eignung als Implantatmaterial vermutet werden, jedoch stellen die physikalischen Eigenschaften derzeit Limitationen in der klinischen Anwendbarkeit dar.

Weitere Untersuchungen sollten sich der Herstellung und Erprobung eines keramisch beschichteten Titan-Implantats widmen, welches vergleichbare biologische Eigenschaften wie Titan (Ticer) aufweist. Die Verbindung der Ästhetik von Keramik mit den physikalischen Eigenschaften von Titan würde für die Implantologie einen Meilenstein bedeuten.

Zudem müssen die in In-vitro-Versuchen gemachten Beobachtungen vollkeramischer Werkstoffe durch verlässliche klinische Studien belegt werden, denn nur diese können einen routinemäßigen Einsatz im klinischen Alltag rechtfertigen.

## 6. Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. med. dent.

### **Vergleichende Untersuchungen zur Zellproliferation, Apoptose und Expression nonkollagener Knochenproteine auf Zirkondioxidoberflächen unterschiedlicher physikalischer Genese**

eingereicht von  
Hannes Kohlweyer

angefertigt an der Klinik für  
Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
der Universität Leipzig

betreut von:

Prof. Dr. med. dent. habil. H.-L. Graf, Poliklinik für Mund-, Kiefer- und plastische  
Gesichtschirurgie der Universität Leipzig

Prof. Dr. rer. nat. habil. H. Hilbig, Institut für Anatomie der Universität Leipzig

Mai 2011

Die vorliegende Arbeit untersucht die Auswirkung von neuartigen Zirkoniumdioxid-Implantatoberflächen unterschiedlicher physikalischer Genese auf die Proliferation und Apoptose von Knochenzellen, sowie auf die Expression von Knochenproteinen, die mit größter Wahrscheinlichkeit für eine komplikationslose Osseointegration dentaler Implantate verantwortlich sind. Implantatoberflächen müssen den Knochenzellen die Bedingungen bieten, die für eine rasche Einheilung in den menschlichen Knochen notwendig sind.

Die Zirkoniumdioxidoberflächen wurden mit dem Positivstandard Ticer verglichen, der in der zahnärztlichen Implantologie seit vielen Jahren erfolgreich verwendet wird. Als Negativstandard diente maschinenbearbeitetes, kommerzielles, reines Titan. Weiterhin fand eine SLA-ähnliche geätzte Titanoberfläche Verwendung.

Die Beschichtung der neuartigen Oberflächen geschah mit Hilfe des PVD-Verfahrens (Physical Vapour Deposition) mit Zirkoniumdioxid. Hierbei entstand der Probekörper ZrO\_20, der durch eine homogene Zirkoniumdioxidschicht gekennzeichnet ist, und der Probekörper ZrO\_19, welcher einen leichten Sauerstoffüberschuss an der Oberfläche aufweist. Beide Probekörper haben einen Grundkörper aus Titan. Weiterhin fand ein vollkeramischer Probekörper aus Cercon, einer reinen Yttrium-stabilisierten Zirkoniumdioxidkeramik, Verwendung.

Die zentrale Fragestellung des Versuches war, in welcher Art und Weise die Zirkoniumdioxidoberflächen die Proliferation der Knochenzellen und die Sekretion der Knochenproteine beeinflussen. Nach der Anzucht der Knochenzellen in einer Zellkultur erfolgte die Zählung der vitalen Zellen und der apoptotischen Zellpartikel, sowie die Messung der Mengen an exprimiertem Bone Sialo Protein, Osteocalcin, Osteonectin und TGF- $\beta$ , jeweils am 3., 5., 7. und 10. Versuchstag. Die Zellanzahlen wurden durch interaktive Zählung per Mausclick in 6 peripher und 4 zentral gelegenen Messfeldern ermittelt. Zusätzlich konnte automatisiert mittels der Software AxioVision (Zeiss) die Menge der exprimierten Knochenproteine bestimmt werden.

Der Maximalwert der Zellanzahlen wurde an fast allen Versuchstagen auf der Ticer-Oberfläche bestimmt. Die Zellanzahlen der Zirkoniumdioxid-Probekörper ZrO\_20, ZrO\_19 und Cercon ähnelten sich an allen Versuchstagen und unterschieden sich nur gering von denen des Negativstandards Titan.

Am wenigsten Proliferation fand auf der geätzten Titanoberfläche statt, welche jedoch klinisch ein gutes Einwachsverhalten zeigt und seit vielen Jahren erfolgreich in der Implantologie Verwendung findet. Dies bekräftigt die Annahme, dass Oberflächen mit einer großen Rauigkeit vermehrt die Differenzierung und weniger die Herstellung großer Mengen an Knochenzellen begünstigen. Der Einheilungsmechanismus scheint somit hauptsächlich über Einscheidung des Implantats durch Kalzium- und Phosphationen zu geschehen. Weiterführend verdeutlicht diese Beobachtung, dass nicht allein die Herstellung zahlreicher Knochenzellen für eine komplikationslose Einheilung und den klinischen Erfolg verantwortlich ist.

Die Messung der relativen Grauwerte der proliferierten Zellen ergab sehr große Messwerte auf Cercon im Vergleich zu den anderen Probekörpern. Dies könnte auf eine vermehrte Aktivität oder Spreizung im Sinne einer Volumenvergrößerung dieser Zellen hinweisen.

Zwischen der Entwicklung der Proliferation und der relativen Grauwerte war ein Zusammenhang erkennbar.

Die Messung der Expression der Knochenproteine Bone Sialo Protein, Osteonectin und des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  brachten hervor, dass auf den Oberflächen Ticer und Cercon die größten Mengen dieser für die Osseointegration benötigten Faktoren hergestellt wurden.

Die größte Expression von Osteocalcin geschah auf der Oberfläche aus reinem Titan und auf der SLA-ähnlichen geätzten Titanoberfläche. Es ist bekannt, dass raue Oberflächen die Bildung von Osteocalcin in besonderem Maße unterstützen, wodurch die Messergebnisse der geätzten Titanoberfläche erklärbar sind. Bei dem Probekörper aus reinem maschinengeborenen Titan scheint die gerillte Oberfläche für eine vermehrte Osteocalcin-Herstellung verantwortlich zu sein, die dem Probekörper trotz seiner Maschinenbearbeitung eine gewisse Rauigkeit verschafft.

Bei der Quantifizierung der Apoptose durch Zählung apoptotischer Partikel ließ sich ein genereller Trend zur Abnahme der apoptotischen Aktivität im Versuchsverlauf feststellen. Die einzige Ausnahme bildete hierbei der geätzte Titan-Probekörper, dessen Messwerte bis zum Versuchsende konstant blieben.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die hohe Proliferationsaktivität, sowie die Expression großer Mengen an Knochenproteinen auf der Ticer-Oberfläche die guten klinischen Erfahrungen mit diesem Oberflächenmaterial bestätigen.

Cercon scheint aufgrund der In-vitro-Messungen eine sehr gute biologische Eignung als Implantatmaterial zu haben. Weitere Untersuchungen müssen sich jedoch mit dem In-vivo-Verhalten von Cercon beschäftigen, um zu klären, ob die experimentellen Ergebnisse auf den klinischen Alltag übertragbar sind. Zudem stellen die physikalischen Eigenschaften weiterhin entscheidende Limitationen in der Verwendbarkeit von reinem Zirkoniumdioxid als Implantatmaterial dar.

Die Messwerte von ZrO<sub>20</sub> und ZrO<sub>19</sub> lagen bei der Proliferation der Knochenzellen deutlich unter den Messwerten des Positivstandards Ticer. Die Herstellung der Knochenproteine geschah ebenfalls in deutlich geringeren Mengen als auf Ticer und Cercon. Eine Beschichtung der Titgrundkörper mit

Zirkoniumdioxid, wie sie in diesem Versuch durchgeführt wurde, konnte somit die biologischen Vorgänge der Proliferation und Herstellung von Knochenproteinen nicht in dem Maße begünstigen, wie es die als Positivstandard verwendete Ticer-Oberfläche vermag.

Es sollte darauf aufbauend erforscht werden, ob durch eine andersartig durchgeführte Beschichtung eine Verbesserung der biologischen Eigenschaften bezweckt werden kann. Gegebenenfalls könnte durch Variationen der chemischen Zusammensetzung oder durch eine Bioaktivierung, wie sie bereits auf Titanoberflächen mittels Beschichtung mit körpereigenen Mineralien geschieht, eine Verbesserung der biologischen Eigenschaften erzielt werden.

Da vollkeramische Implantatsysteme aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften bisher keinen adäquaten Ersatz von Titanimplantaten realisieren können, wäre eine derartig hergestellte zahnfarbene Implantatoberfläche, die die physikalischen Eigenschaften von Titan mit der Ästhetik von Zirkoniumdioxid verbindet, ein erstrebenswerter Fortschritt für die zahnärztliche Implantologie.

## Literaturverzeichnis

Akagawa Y, Ichikawa Y, Nikai H, Tsuru H, 1993

Interface histology of unloaded and early loaded partially stabilized zirconia  
Endosseous implant in initial bone healing.  
J Prosth Dent 69, 599-604

Albrektsson T, Hansson HA, Ivarsson B, 1985

Interface analysis of titanium and zirconia bone implants.  
Biomater 6, 97-101

Albrektsson T, Johansson C, 2001

Osteoinduction, Osteoconduction and Osseointegration.  
Eur Spine J 2001 Oct; 10 Suppl 2: 96-101. Review.

Andreiotelli M, Wenz H, Kohal R, 2009

Are ceramic implants a viable alternative to titanium implants? A systematic  
literature review.  
Clin. Oral Impl. Res. 20, 32-47

Astrand P, Ahlqvist J, Gunne J, Nilson H, 2008

Implant treatment of patients with edentulous jaws: a 20-year follow-up.  
Clinical Implant Dentistry 10, 207-217

Bellahcene A, Menard S, Bufalino R, Moreau C, Castronovo V, 1996

Expression of bone sialoprotein in primary human breast cancer is associated  
with poor survival.  
Int J Cancer 69, 350-3

Benedict MA, HuY, Inohara N, Nunez G, 2000

Expression and functional analysis of Apaf-1 isoforms. Extra Wd-40 repeat is  
required for cytochrome c binding and regulated activation of procaspase-9.  
J Biol Chem 275, 8461-8

Branemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A, 1969

Intra-osseous anchorage of dental prosthesis. I. Experimental studies.

Scand J Plast Reconstr Surg 3, 81-100

Bos TJ, Cohn SL, Kleinmann HK, et al., 2004

International Hermelin brain tumor symposium on matricellular proteins in normal and cancer cell-matrix interactions.

Matrix Biol 23, 63-9

Botto M, 2004

Phosphatidylserine receptor and apoptosis: consequences of a non-ingested meal.

Arthritis Res Ther 6, 147-50

Boyan BD, Lossdorfer S, Wang L, Zhao G, Lohmann CH, Cochran DL, Schwartz Z, 2003

Osteoblasts generate an osteogenetic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies.

Eur Cell Mater 6, 22-7

Buser D, Nydegger T, Hirt H, Cochran D, Nolte L, 1998

Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs.

Int J Oral Maxillofac Implants 13, 611-619

Buser D, Belser UC, 1998

Fortschritte und Trends in der oralen Implantologie.

Schweiz Monatsschr Zahnheilk 108, 327-342

Campion GV, Delmas PD, Dieppe PA, 1989

Serum and synovial fluid osteocalcin (bone G1a protein) levels in joint disease.

Br J Rheumatol 28, 393-398

Carlsson L, Röstlund T, Albrektsson B, Albrektsson T, 1988

Removal torque values for polished and rough titanium implants.

Int J Oral Maxillofac Implants 3, 21-24

Colombo G, Fanti P, Yao C, Maluche HH, 1993

Isolation and complete amino acid sequence of osteocalcin from canine bone.

J Bone Miner Res 8, 733-743

Daugas E, Nochy C, Ravagnan C, Loeffler M, Zamzami N, Kroemer G, Susin SA, 2000

Apoptosis-Inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis.

FEBS Lett 476, 118-23

Davies JE, 1998

Mechanisms of Endosseous Integration.

Int J Prosthodont, 11, No.5: 391-400

Delmas PD, Malaval L, Arlot ME, Meunier PJ, 1985

Serum bone Gla-protein compared to bone histomorphometry in endocrine diseases.

Bone 6, 339-41

Ducy B, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G, 1996

Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice.

Nature 382, 448-452

Escalas F, Galante J, Rostoker W, 1976

Biokompatibility of materials for total joint replacement.

J Biomed Mater Res 10, 175-95

Ferrari D, Pinton P, Szabadkei G, Chami M, Cempanella M, Pozzan T, Rizzuto R, 2002

Endoplasmatic reticulum, Bcl-2 and Ca<sup>2+</sup> handling in apoptosis.

Cell Calcium 32, 413-20

Feng JQ, Ye L, Chen D, Huang H, Zhang J, Lu Y, et al., 2002

Dmp1 deficient mice develop dwarfism, chondrodysplasia, and exhibit  
Disorganizes bone mineralization during post-natal development.

J Bone Miner Res 17 (Suppl 1), S.127

Fisher LW, Whitson SW, Avioli LV, Termine JD, 1983

Matrix sialoprotein of developing bone.

J Biol Chem 258, 12723-12727

Foitzek C, Stamm M, 1998

Quintessenz 48, 1365

Framson PE, Sage EH, 2004

SPARC and tumor growth: where the seed meets the soil?

J cell Biochem 92, 679-90

Gahlert M, Gudehus T, Eichhorn S, Steinhauser E, Kniha H, Erhardt W, 2007

Biomechanical and histomorphometric comparison between zirconia implants  
with varying surface textures and a titanium implant in the maxilla of miniature  
pigs.

Clin Oral Implants Res18, 662-8

Graf HL, 1997

Zur Entwicklung eines neuen Implantatsystems.

Habilitationsschrift Universität Leipzig

Graf HL, Hofmann J, Tröger U, Schreckenbach J, Hilbig H, 2009

In-vitro-Untersuchungen zum Screening von Implantatoberflächeneigenschaften

Zahnärztliche Impl 25, 250-262

Graf HL, Geu B, Knöfler W, Hemprich A, 2001

Klinisches Verhalten des ZL-Duraplant-Implantatsystems mit Ticer-Oberfläche.

Z Zahnärztliche Implantol; 17: 124-131

Grobitzsch M, 2003

Einfluss der Randstruktur eines Implantatkörpers auf Wachstumsfaktoren einer humanen Knochenzellkultur in vitro.

Dissertation Universität Leipzig

Gougeon ML, 2003

Apoptosis as an HIV strategy to escape to immune attack.

Nat Rev Immunol 10, 392-404

Hansson S, 2000

Surface roughness parameters as predictors of anchorage strength in bone: a critical analysis.

J Biomech 33, 1297-303

Hempel U, Hefti T, Kalbacova M, Wolf-Brandstetter C, Dieter P, Schlottig F, 2009

Response of osteoblast-like SAOS-2 cells to zirconia ceramics with different surface topographies.

Clin Oral Implants Res. 2009 Aug 6.

Heshmati HM, Riggs BL, Burrit MF, McAllister CA, Wollan PC, Koshla S, 1998

Effects of the Circadian Variation in Serum Cortisol on Markers of Bone turnover and Calcium Homeostasis in Normal Postmenopausal Women.

J Clin Endocrinal Metab 83, 751-756

Hilbig H, Wiener T, Armbruster FP, Bekelele A, Kirsten M, Graf HL, 2005

Effects of dental implant surfaces on the expression of bone sialoprotein derived from human human mandibular bone.

Med Sci Monit 11, 114-115

Hilbig H, Kirsten M, Rupiotta R, Graf HL, Thalhammer S, Strasser S, Armbruster FP, 2007

Implant surface coatings with bone sialoprotein, collagen, and fibronectin and their effects on cells derived from human maxillar bone.

Eur J Med Res. 12, 6-12

Hsu, Hsueh, 2000

Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm.  
Physiol Rev 80, 593-614

Informationsdienst Wissenschaft, 2008

2008 fast eine Million Implantate.  
Zahnärztliche Patientenberatung, Quelle: Informationsdienst  
Wissenschaft. 13.12.2008

Ismail F, Epstein S, Pacifici R, Droke D, Thomas SB, Avioli CC, 1986

Serum bone gla protein (BGP) and other markers of bone mineral metabolism in  
postmenopausal osteoporosis.  
Calcif. Tissue Int 39, 230-237

Janqueira LC, Carneiro J, 1991

Histologie. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen.  
Springer-Verlag 1991

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR, 1972

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue  
kinetics.  
Br J Cancer 26, 239-57

Kingsley DM, 1994

The TGF- $\beta$  superfamily: new members, new receptors and new genetic tests of  
function in different organisms.  
Genes Dev 8, 133-46

Knöfler W, Graf HL, 1988

Untersuchungen zur Charakteristik der Knochenreaktion im Interfacebereich  
verschiedener inerter und bioaktiver Materialien.  
Universität Leipzig: Forschungs- und Entwicklungsbericht, S. 177

Knöfler W, Graf HL, 1989

Zur Knochenreaktion auf Biomaterialien I. Mitt.: Komplexes Versuchsmodell zur Beschreibung der Knochenumbauvorgänge und Interfacereaktionen unter Bio-Materialeinfluß.

Zahnärztl Implantol V, 256-262

Ko HC, Han JS, Bächle M, Jang JH, Shin SW, Kim DJ, 2007

Initial osteoblast-like cell response to pure titanium and zirconia/alumina ceramics.

Dent Mater. 23, 1349-55

Kohal RJ, Wenig D, Bächle M, Klaus G, 2003

Zirkonoxidimplantate unter Belastung. Eine vergleichende histologische, tier-experimentelle Untersuchung.

Z Zahnärztliche Impl; 24(3)

Kohal RJ, Finke HC, Klaus G, 2008

Stability of prototype two-piece zirconia and titanium implants after artificial aging.

Clin Implant Dent Relat Res. 2009 Dec;11(4):323-9. Epub 2008 Sep 9.

Kroemer G, Reed JC, 2000

Mitochondrial control of cell death.

Nat Med 6, 513-9

Krysmann W, 1982

Beitrag zur anodischen Oxidation von Aluminium unter Funkenentladung.

Nat Diss, Karl-Marx-Stadt (Chemnitz), 1982

Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flonders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S, 1993

Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death.

Proc Nat Acad Sci USA 90, 770-4

Lane TF, Sage EH, 1990

Functional mapping of SPARC: peptides from two distinct Ca<sup>2+</sup>-binding sites modulates cell shape.

J Cell Biol 111, 3065-76

Lekic P, Sodek J, Mc Gulloch C, 1996

Osteopontin and bone sialoprotein expression in regenerating rat periodontal ligament and alveolar bone.

Anat Rec 244, 50-58

Lind M, Overgaard S, Büniger C, Soballe K, 1999

Improved bone anchorage of hydroxiapatite coated implants compared with tricalciumphosphate coated implants in trabecular bone in dogs.

Biomaterials 20, 803-808

Lincks J, Boyan BD, Blanchard CR, Lohmann CH, Liu Y, Cochran DL, Dean DD, Schwartz Z, 1998

Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium-alloy is dependent on surface roughness and composition.

Biomaterials 19, 2219-32

Lockshin RA, Williams CM, 1965

Programmed Cell Death-I. Cytology of Degeneration in the Intersegmental Muscles of the Pernyi Silkworm.

J Insect Physiol 11, 123-33

Löffler G, Petrides PE, 2003

Biochemie und Pathobiochemie

Springer Verlag 2003

Mann K, Deutzmann R, Paulsson M, Timpl R, 1987

Solubilization of protein BM-40 from a basement membrane tumor with chelating agents for its identity with osteonectin and SPARC.

FEBS Letters 218, 167-172

Mellinghoff J, 2010

Qualität des periimplantären Weichgewebeattachements von Zirkondioxid-  
Implantaten (Abutments)

Zeitschrift für Zahnärztliche Implantologie, 1/2010

Moll UM, Wolff S, Speidel D, Deppert W, 2005

Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53.

Curr Opin Cell Biol 17, 631-6

Nicotera P, Melino G, 2004

Regulation of the apoptosis-necrosis switch.

Oncogene 23, 2757-65

Oldberg Å, Franzén A, Heinegård D, Pierschbacher M, Ruoslahti E, 1988

Identification of bone sialo receptor in osteosarcoma cells.

J Biol Chem 263, 19433-19435

Petit A, Kawarai T, Paitel E, Sanjo N, Maj M, Scheid M, Chen F, Gu Y, Hasegawa H,  
Salehi-Rad S, Wang L, Rogaeva E, Fraser P, Robinson B, St George-Hyslop P,  
Tandon A, 2005

Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective  
effect abrogated by Parkinson disease-related mutations.

J Biol Chem 280, 34025-32

Pop C, Timmer J, Sperandio S, Salvesen GS, 2006

The apoptosome activates caspase-9 by dimerization.

Mol Cell 22, 269-75

Richter HA, Kaden P, Mittermayer C, 2009

Biomedizinische Technik. Band 33, Heft s2,

Seiten 173-174

Roberts AB, Sporn MB, 1993

Mini Review: Physiological Actions and Clinical Applications of TGF- $\beta$ .

Growth Factors 8, 1-9

Qin C, Baba O, Butler WT, 2004

Post-translational modification of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis.

Crit Rev Oral Biol Med 15, 126-36

Sandhaus S, 1971

Wissenschaftlicher Beitrag zum Gebiet der Oralrehabilitation mit Hilfe des Implantationsverfahrens CBS.

Zahnärztliche Welt 80, 597-604

Sartorius U, Schmitz I, Krammer PH, 2001

Molecular mechanisms of death-receptor mediated apoptosis.

Chembiochem 2, 20-9

Schenk RK, Buser D, 1998

Osseointegration: a reality.

Periodontol 2000.17,22-35

Schliephake H, Reiss J, Urban R, Neukam FW, Günay H, 1991

Freisetzung von Titan aus Schraubenimplantaten.

Z Zahnärztl Implantol VII, S. 6-10

Schulte W, Kleineikenscheidt H, Schareyka R, Heimke G, 1978

Concept and testing of the Tübingen immediate implant.

Deutsche Zahnärztliche Zeitung 33, 319-325

Seibel MJ, 2000

Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects.

Osteoporos Int 11 Suppl 6, 18-29

Seibel MJ, Woitge HW, Zeigler R, 1993

Biochem. Marker des Knochenstoffwechsels.

Klin. Lab. 39, 717-727 und 839-850

Siegel PM, Massague J, 2003

Cytostatic and apoptotic actions of TGF-Beta in homeostasis and cancer.  
Nat. Rev. cancer 3, 807-821

Shi Y, 2002

Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis.  
Mol Cell 9, 459-470

Spiekermann H, Donath K, Hassel T, Jovanovic S, Richter J, 1995

Color Atlas of Dental Medicine: Implantology  
Thieme Verlag

Stadlinger B, Henning M, Eckelt U, Kuhlisch E, Mai R, 2010

Comparison of zirconia and titanium implants after a short healing period.  
A pilot study in minipigs.  
Int J Oral Maxillofac Surg, Feb 2010

Stefflik DE, Corpe RS, Lake FT, Young TR, Sisk AL, Parr GR, Hanes PJ, Berkery DJ,  
1998

Ultrastructural analysis of the attachment (bonding) zone between implanted  
biomaterials.  
J Biomed Mater Res. 39(4):611-20

Tamm I, Kornblau SM, Segall H, Krajewski S, Welsh K, Kitada S, Scudiero DA,  
Tudor G, Qui YH, Monks A, Andreeff M, Reed JC, 2000

Expression and prognostic significance of IAP family genes in human cancers and  
myeloid leukemias.  
Clin Canc Res 6, 1796-803

Termine JD, Kleinmann HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR, 1981

Osteonectin, a bone specific protein linking mineral to collagen.  
Cell 26, 99-105

Thiede MA, Smock SL, Petersen DN, 1994

Presence of messenger ribonucleic acid encoding osteocalcin, a marker of bone turnover, in bone marrow megakaryocytes and peripheral blood platelets.

Endocrin 135, 929-937

Thornberry NA, Lazebnik Y, 1998

Caspases: Enemies Within

Science Vol. 281 no. 5381, 1312-1316

Trauth und Keeseey, 1995

Boehringer Mannheim Apoptosis Guide.

Trentz OA, Zellweger R, Amgwerd MG, Uhlschmid GK, 1997

Testing bone implants in cell lines and human osteoblasts.

Unfallchirurg. 100. 39-43

Tsukimura N, Kojima N, Kubo K, Att W, Takeuchi K, Kameyama Y, Maeda H, Ogawa T, 2008

The effect of superficial chemistry of titanium on osteoblastic function.

J Biomed Mater Res A 84, 108-16

Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR, 2003

Cellcycle and apoptosis.

Cell Prolif 36, 165-75

Von Walter M, Herren C, Gensior TJ, Steffens GC, Hermanns-Sachweh B, Johnen-Dechent W, Ruger M, Erli HJ, 2008

Biomimetic modification of the TiO<sub>2</sub>/glass composite Ecopore with heparinized collagen and the osteoinductive factor BMP-2.

Acta Biomater, 2008

Waltregny D, Bellahcene A, Van Riet, Fisher LW, Young M, Fernandez P, et al., 1998

Prognostic value of bone sialo expression in clinically localized human prostate cancer.

J Nat Cancer Inst 90, 1000-8

Wennerberg A, 1996

On surface roughness an implant incorporation.

Thesis Univ Göteborg, 1996

Wolf H, 1981

Zur komplexen Wechselwirkung von Blut mit nichtbiologischen Oberflächen – ein Überblick aus biophysikalischer Sicht. I. Allgemeine Aspekte, Plasmaproteinadsorption, Thrombozyten- und Erythrozytenadhäsion.

Dt Gesundheitswesen 36 (1981), Nr. 16, S. 717-720

Wright CW, Duckett CS, 2005

Reawakening the cellular death program in neoplasia through the therapeutic blockade of IAP function.

J Clin Invest 115, 2673-2687

Xu T, Bianco P, Fisher LW, Longenecker G, Smith E, Goldstein S, et al., 1998

Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice.

Nat Genet 20, 78-82

Yang C, 2001

The effect of calciumphosphate implant coating on osteoinduction.

Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 92, 606-609

Zwaal RF, Schroit AJ, 1997

Pathophysiologic implications of membrane phospholipids asymmetry in blood cells.

Blood 89, 1121-11

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Hannes Kohlweyer
Anschrift	Schuhstraße 6, 38350 Helmstedt
Telefon	05351/5988016
Geburtsdatum	25.09.1982
Geburtsort	Quedlinburg
Familienstand	ledig
Eltern	Dr. Bettina Kohlweyer Dr. Frank Kohlweyer
Geschwister	Eva Kohlweyer

## Schulausbildung

1988 - 1993	Kleers-Grundschule Quedlinburg
1993 - 2002	GutsMuths-Gymnasium Quedlinburg

## Wehrdienst

01.10.2002 - 30.07.2003	Clausewitz – Kaserne Burg
-------------------------	---------------------------

## Studium

01.10.2003 - 30.10.2008	Studium der Zahnmedizin an der Universität Leipzig
März 2006	Zahnärztliche Vorprüfung
Oktober 2008	Staatsexamen
November 2008	Erteilung der Approbation

## Assistenzzeit

15.01.2009 -15.01.2011	Assistenzzahnarzt
seit März 2011	angestellter Zahnarzt

## **Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Helmstedt, den

Hannes Kohlweyer

## **Danksagung**

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. dent. Hans-Ludwig Graf, Frau Prof. Dr. rer. nat. Heidegard Hilbig und Herrn Prof. Dr. Dr. med. dent. Alexander Hemprich für die jederzeit tatkräftige Unterstützung sowie bei Frau Ursula Tröger für die Hilfe im Labor und die Bereitstellung der Labormaterialien.

Für die Herstellung der Implantatprobekörper möchte ich Herrn PD Dr. rer. nat. Mändl und dem Leibniz-Institut für Oberflächenmodifizierung (Leipzig) danken.

Weiterhin danke ich meiner Familie für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht.