

**In vitro Osteokompatibilitätstestung  
strukturierter  
„Zirkoniummischoxidschichten“  
in der humanen enoralen  
Knochenzellstruktur**

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

an der Medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von

Ingo Buttchereit

geboren am 10. September 1983 in Sangerhausen

angefertigt in der

Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie

am

Friedrich-Louis-Hesse-Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde und

Orale Medizin der Universität Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. med. dent. habil. Hans-Ludwig Graf

Prof. Dr. rer. nat. habil. Heidegard Hilbig

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 26.03.2013

# Bibliographische Beschreibung

Name: Buttchereit, Ingo

Titel der Arbeit

## **In vitro Osteokompatibilitätstestung strukturierter „Zirkoniummischoxidschichten“ in der humanen enoralen Knochenzellstruktur**

Universität Leipzig, Dissertation

81 Seiten, 139 Literaturzitate, 26 Abbildungen, 2 Tabellen, 28 Diagramme

Referat:

Mit zunehmender Etablierung der Implantattherapie im zahnärztlichen Alltag stellt die Reduzierung der Einheilzeit durch Oberflächenoptimierung eine der Hauptbestrebungen der forschenden Industrie dar. Dazu treten ästhetische Patientenwünsche nach „weißen“ Materialien, die am ehesten durch das jedoch frakturgefährdete Zirkonmischoxid zu realisieren sind. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Osteokompatibilität verschiedener, metallener Probekörper mit „Zirkoniummischoxidbeschichtung“, in der humanen enoralen Knochenzellkultur. Unter Verwendung einer männlichen Knochenzellkultur über 10 Tage wurden die Expressionen der nonkollagenen Knochenmatrixproteine, Osteocalcin, Osteonectin und Bone Sialo Protein sowie des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  auf 3 Standardoberflächen und 5 experimentell hergestellten Zirkoniummischoxidoberflächen bestimmt. Es galt zu ermitteln, ob die chemische Zusammensetzung und die Mikrostruktur der getesteten Probekörper Einfluss auf die Proteinexpression haben. Die gewonnenen Versuchsergebnisse lassen vermuten, dass vor allem die Oberflächenkonfigurationen der Experimentaloberflächen 3 (ZSG  $\frac{1}{2}$ ), 4 (ZS4-0,5) und 5 (ZS4-2) die Sekretion o.g. Knochenproteine im Vergleich zu den anderen Experimentaloberflächen sowie dem metallenen Positivstandard (PK7) und dem Negativstandard (PK8) begünstigen. Des Weiteren kann für den als keramischen Positivstandard verwendeten CERCON® Probekörper (PK6) auf Grund der Ergebnisse eine gute biologische Eignung in vitro angenommen werden. Von weiteren Versuchen, welche mit mind. 6 Probekörpern pro Standardzeit und Marker durchgeführt werden sollten, lässt sich keine der verwendeten Experimentaloberflächen gerechtfertigt ausschließen.

## Inhaltsverzeichnis

Bibliographische Beschreibung

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1.    | Einleitung und „Zielstellung“ .....   | 1  |
| 2.    | Literatur .....   | 2  |
| 2.1   | Implantatmaterialien .....  | 2  |
| 2.1.1 | Knochen-Implantat-Interface .....   | 3  |
| 2.1.2 | Metallene Materialien und deren Modifikation .....  | 4  |
| 2.1.3 | Strukturiertes Zi-II-Ox.-Material und dessen Modifikation .....                                   | 7  |
| 2.1.4 | Vergleich Titan- vs. Zirkon-Interface .....   | 9  |
| 2.1.5 | Biologische Erkenntnisse in der Zellkultur im Zusammenhang<br>mit Oberflächenmodifikationen ..... | 10 |
| 2.2   | Biochemische Knochenmarker .....  | 12 |
| 2.2.1 | BSP .....   | 12 |
| 2.2.2 | Osteocalcin .....   | 13 |
| 2.2.3 | Osteonectin .....   | 14 |
| 2.2.4 | TGF beta .....  | 16 |
| 3.    | Material und Methoden .....   | 17 |
| 3.1   | Material .....  | 17 |
| 3.1.1 | Chemikalien .....   | 17 |
| 3.1.2 | Puffer .....  | 18 |
| 3.1.3 | Nährmedien .....  | 18 |
| 3.1.4 | Primärantikörper .....  | 18 |
| 3.1.5 | Sekundärantikörper .....  | 19 |
| 3.1.6 | Labortechnisches Zubehör .....  | 19 |
| 3.1.7 | Geräte zur Auswertung .....   | 20 |
| 3.1.8 | Verwendete Probekörper .....  | 21 |
| 3.2   | Methoden .....  | 29 |
| 3.2.1 | Materialgewinnung .....   | 29 |
| 3.2.2 | Anzucht der Knochenzellen .....   | 29 |
| 3.2.3 | Erste Subkultur .....   | 30 |

---

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 3.2.4  | Zweite Subkultur .....                                       | 31 |
| 3.2.5  | Versuchsvorbereitung .....                                   | 32 |
| 3.2.6  | Versuchsaufstellung .....                                    | 32 |
| 3.2.7  | Versuchsbeginn .....   | 33 |
| 3.2.8  | Histochemische Untersuchung der Knochenwachstumsmarker ..... | 33 |
| 3.2.9  | Zellzählung .....  | 35 |
| 3.2.10 | Grauwertanalyse .....  | 35 |
| 3.2.11 | Statistische Auswertung .....                                | 36 |
| 4.     | Ergebnisse .....   | 37 |
| 4.1    | Ergebnisse der Markerexpression .....                        | 37 |
| 4.1.1  | Quantitative Auswertung der BSP-Expression .....             | 38 |
| 4.1.2  | Quantitative Auswertung der Osteocalcin-Expression .....     | 45 |
| 4.1.3  | Quantitative Auswertung der Osteonectin-Expression .....     | 52 |
| 4.1.4  | Quantitative Auswertung der TGF- $\beta$ -Expression .....   | 59 |
| 5.     | Diskussion .....   | 66 |
| 5.1    | Fehlerbetrachtung .....                                      | 66 |
| 5.2    | Aufspannen des Messrahmen .....                              | 68 |
| 5.3    | Diskussion der Ergebnisse .....                              | 69 |
| 5.4    | Ausblick .....   | 77 |
| 6.     | Zusammenfassung .....  | 78 |
| 7.     | Literaturverzeichnis .....                                   |    |
| 6.     | Danksagung .....   |    |
| 6.     | Ehrenwörtliche Erklärung .....                               |    |

## Abkürzungsverzeichnis

|                  |   |
|------------------|---|
| AK               | Antikörper                                |
| at               | technische Atmosphäre                     |
| Aqua dest.       | destilliertes Wasser                      |
| ANOF             | anodische Oxidation unter Funkenentladung |
| BSP              | Bone Sialo Protein                        |
| BZ               | Belichtungszeit                           |
| C                | Kohlenstoff                               |
| Ca               | Calcium                                   |
| CO <sub>2</sub>  | Kohlenstoffdioxid                         |
| CPT              | Commercial pure titan                     |
| CVD              | Chemical vapor deposition                 |
| DAPI             | Diamidino-2-phenylindol×2Hcl              |
| EDTA             | Ethylendiamintetraessigsäure              |
| E-Modul          | Elastizitätsmodul                         |
| EZM              | Extrazelluläre Matrix                     |
| F                | Fluor                                     |
| Fe               | Eisen                                     |
| GW               | Grauwert                                  |
| GW/BZ            | Relativer Grauwert                        |
| H                | Wasserstoff                               |
| HA               | Hydroxylapatit                            |
| H <sub>2</sub> O | Wasser                                    |
| IGF              | Insulin like growth factor                |
| IgG              | Immunglobin G                             |
| IL               | Interleukin                               |
| K                | Kalium                                    |
| Konz.            | Konzentration                             |
| N                | Stickstoff                                |
| O                | Sauerstoff                                |
| OC               | Osteocalcin                               |
| ON               | Osteonectin                               |

---

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| P                             | Phosphor   |
| PBS                           | Phosphatgepufferte Kochsalzlösung                              |
| PDGF                          | Platelet derived growth factor                                 |
| PFA                           | Paraformaldehyd reinst   |
| PK                            | Probekörper  |
| PK1                           | Probekörper 1 = ZSE  |
| PK2                           | Probekörper 2 = ZSG  |
| PK3                           | Probekörper 3 = ZSG $\frac{1}{2}$                              |
| PK4                           | Probekörper 4 = ZS4-0,5  |
| PK5                           | Probekörper 5 = ZS4-2  |
| PK6                           | Probekörper 6 = CERCON®  |
| PK7                           | Probekörper 7 = TICER®   |
| PK8                           | Probekörper 8 = cpt / Titan                                    |
| PVD                           | Physical Vapour Deposition                                     |
| RANK                          | Receptor activator of NF-KB                                    |
| RGD                           | Sequenz dreier Aminosäuren (Arginin, Glycin u. Asparaginsäure) |
| S                             | Schwefel   |
| Strep                         | Streptomycin   |
| TGF- $\beta$                  | Transforming growth factor $\beta$                             |
| Ti                            | Titan  |
| TICER®                        | Titan/Ceramik, Implantatoberfläche der Firma ZL-Microdent      |
| VT                            | Versuchstag  |
| Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | Yttriumoxid  |
| Zr                            | Zirkonium  |
| ZrO <sub>2</sub>              | Zirkoniumdioxid  |

## 1. Einleitung und „Zielstellung“

Der Stellenwert der oralen Implantologie im zahnärztlichen Alltag ist seit den grundlegenden Erkenntnissen von BRANEMARK et al. (1969) und SCHROEDER et al. (1976) deutlich gestiegen. Die Verwendung von Implantaten avanciert nunmehr zu einer Standardtherapie. Die künstlichen Zahnwurzeln verbleiben über einen langen Zeitraum im Kiefer und sichern den Halt von Prothesen, Brücken und Kronen. Zur Inkorporation eines solchen Implantates sind jedoch verschiedene Faktoren von entscheidender Bedeutung.

Zu den geforderten Eigenschaften gehören laut EPPLE (2007) vorwiegend eine hohe Biokompatibilität, eine schnelle Einheilung sowie eine starke Belastbarkeit, eine hohe mechanische Stabilität, eine lange Lebensdauer nach der Implantation, eine einfache Applizierbarkeit durch den behandelnden Zahnarzt und eine Verhinderung des Eindringens von Bakterien in den Knochenraum. Diese Forderungen sind durch moderne Materialien, mit einer optimierten Geometrie sowie einer geeigneten Oberflächenfunktionalisierung erreichbar. Nach Wintermantel et al. 2002 wird zwischen Strukturkompatibilität, die die mechanische Integrität des Implantates gewährleistet, und Oberflächenkompatibilität, die eine erwünschte Reaktion des periimplantären Gewebes hervorruft, unterteilt. Im Zusammenhang mit dem Einbau des Implantates in den Kieferknochen kommt der Grenzfläche zwischen Biomaterial und Biomineral, dem Knochen-Implantat-Interface, eine besondere Bedeutung zu.

Für den Prozess der Osseointegration ist die Beschaffenheit der Implantatoberfläche von elementarer Bedeutung. Dieser Vorgang ist als knöcherner Heilungsprozess anzusehen, bei dem die Knochenzellen direkt an das Implantat heranwachsen und auf den ein Biomaterial positiven oder negativen Einfluss haben kann (DAVIES 1998, 2003; SCHULTZE-MOSGAU et al. 2000; KOHAL et al. 2004). Als weitere Parameter dieser komplexen Gewebereaktion definierten KNÖFLER und GRAF (1989) die chemischen und physikalischen Einflüsse des implantierten Materials, die strukturellen Besonderheiten der Implantatoberfläche, die Makrostruktur und vor allem die biodynamischen Veränderungen unter der Funktion.

In verschiedenen Forschungsgruppen wird seit geraumer Zeit versucht, durch Verwendung von Zirkon am Implantat-Interface eine Verkürzung der Osseointegration und somit der Behandlungszeit sowie eine verbesserte Farbästhetik zu erreichen.

Neben den genannten logischen Gründen für die Integration von Zirkon in die Grenzfläche scheinen jedoch auch emotionale Aspekte wie Metallphobie, Ökochondrie und die kulturelle Assoziation zur Farbe „Weiß“ eine entscheidende Rolle zu spielen.

Um den Prozess des Knochen-Remodelling näher zu erforschen, bedient man sich u.a. einer Vielzahl biochemischer Marker. In der vorliegenden Untersuchung kamen die Marker BSP, Osteocalcin, Osteonectin und TGF- $\beta$  zum Einsatz. Anhand der Markerexpression soll der Versuch unternommen werden, die Osteokompatibilität strukturierter Zirkoniummischoxide in vitro darzustellen. Das Ziel ist es, eine Empfehlung für die Verwendungsmöglichkeiten auf zukünftigen Implantatoberflächen auszusprechen.

## **2. Literatur**

### **2.1 Implantatmaterialien**

Scribonius Largus formulierte bereits vor vielen Jahrhunderten den Grundsatz „Primum non nocere“. Dieser gilt natürlich auch für das Fachgebiet der Implantologie. Die verwendeten Materialien dürfen dem Wirt weder lokal noch systemisch schaden. D.h., sie sollten unter keinen Umständen toxisch, radioaktiv oder karzinogen sein.

Ein Höchstmaß an Biokompatibilität ist ein wichtiges Merkmal moderner Implantatmaterialien. Viele der in der Implantologie verwendeten Materialien sind technische Werkstoffe und daher primär nicht für biologische Zusammenhänge konzipiert. Daher werden die mechanischen Anforderungen z.T. gut erfüllt, wobei jedoch die biologischen Eigenschaften noch Raum für Verbesserungen aufweisen.

Zum einen sind die meisten metallenen Werkstoffe speziell in bakteriell entzündlichen Situationen korrosionsanfällig und zum anderen denaturieren an der Oberfläche angelagerte Eiweiße. Mit zunehmender Popularität bzw. Vermarktung dentaler Implantate wurde die klinische Forderung nach kürzeren Einheilzeiten sowie stabiler Osseointegration und der damit verbundenen Langzeitstabilität der Implantate im Knochen laut. Somit war der Weg für intensive Forschungen im Bereich des Implantat-Knochenverbundes bereitet (BRANDT 1996).



Zunehmend treten die Wirkung verschiedener Materialien und deren Oberflächenkonfiguration auf den Verbund zwischen enossalem Implantat und dem umgebenden Alveolarknochen in den Focus der Untersuchungen.

In diesem Zusammenhang ist heute bekannt, dass strukturelle Eigenschaften der Implantatoberfläche, wie die chemische Zusammensetzung, Energie, Rauigkeit und die Morphologie der Oberfläche, einen direkten Einfluss auf die osteogenetischen Zellen und die Wundheilung haben (STOCK und GEHRKE 2003).

OGAWA und NISHIMURA beobachteten lokale Änderungen der Gen-Regulation im Zusammenhang mit verschiedenen Rauigkeitsgraden der Implantatoberfläche.

### **2.1.1 Knochen-Implantat-Interface**

Nach BRUNSKI (1992) ist das Interface - die Kontaktfläche dentaler Implantate mit dem Knochen - das Ergebnis komplexer Abläufe und somit ein vom Zusammenspiel vieler Faktoren abhängiges Produkt. HEES und SINOWATZ (2000) schlussfolgerten, dass der Auf- und Abbau von Knochen ein ausgewogener Prozess ist der sich physiologischen Reizen anpasst.

Somit lässt sich festhalten, dass der Begriff Interface derzeit nicht eindeutig definiert werden kann, sondern vielmehr eine Variable der genannten Faktoren ist. Deswegen können die Schichtung und der zelluläre Aufbau selbst um ein einzelnes Implantat herum variieren (DAVIES 1998; BRUNSKI 1992).

Die Bildung der Grundsubstanz (Matrix) ist für das Interface von großer Bedeutung. Die Matrix besteht zum größten Teil aus Hydroxylapatitkristallen, welche sich zu 85 % auf Kalziumphosphat und zu 10 % auf Kalziumkarbonat aufteilen (HEES und SINOWATZ 2000). Bereits nach kurzer Zeit ist der Knochen-Implantat-Kontakt, durch eine sich auf der Implantatoberfläche bildende Apatitschicht möglich (CHANG 1996).

Die Knochenneubildung geht mit der Ausschüttung der beiden Proteine Osteopontin und Bone-Sialoprotein einher; beide sind kollagenfrei und besitzen Kalziumbindungsstellen, an die sich Kalzium anlagert. In das so entstandene Kristallgitter lagern sich dann kollagene Fasern ein, welche sich ihrerseits mit weiterem Kalzium umgeben. Somit ist die Matrix durch eine kalzifizierte Schicht vom Knochen getrennt (DAVIES 1998).

Der beschriebene Prozess kann von der Seite des Knochenfundamentes in drei Phasen unterteilt werden. In der ersten Phase, auch als Osteokonduktion bzw. Kontakt-Osteogenese bezeichnet migrieren knochenbildende Zellen (Osteoblasten) über ein temporäres Fibrinnetz

zur Implantatoberfläche. Deren Topographie entscheidet hierbei über die Anzahl der sich anlagernden Zellen und über den Zeitraum, der für diese Anlagerung benötigt wird. In der zweiten Phase, der de-novo-Knochenbildung, setzt sich die knochenspezifische, extrazelluläre Matrix (Kollagen) auf der Implantatoberfläche ab und mineralisiert.

Nach diesem Prozess führen vielfältige zelluläre Aktivitäten am Implantat-Knochen-Interface zu einer Ausbildung trabekulärer Strukturen entlang der Kollagenfasern und infolgedessen zur Reifung des neuen Knochens. Diese dritte Phase wird als Knochenmodellierung bezeichnet. Bedingt durch die Zellbindung, Proliferation und Differenzierung in den Phasen 1 und 2 kann sich nun ein intensiver und stabiler Verbund zwischen Implantat und Knochen bilden (DAVIES 1998).

Die Abläufe nach dem Einbringen eines Implantates entsprechen denen der Frakturheilung (DAVIES 2003). Bei Frakturheilung geht man davon aus, dass der Defekt nach 3 bis 4 Wochen überbrückt ist. Diese Angaben gelten, wenn sich zwei zur Wundheilung befähigte Knochenenden gegenüberstehen. Bei der Implantation läuft dieser Prozess aber nur von einer Seite ausgehend ab, so dass die Heilung nach Schätzung von KNÖFLER und GRAF mindestens die doppelte Zeit in Anspruch nehmen müsste. Bei der Implantation steht dem Knochenende mit dem Implantat aber ein avitales Substrat gegenüber. Dazu kommen jedoch die niedermolekularen Effekte, die von der Implantat-Oberfläche ausgelöst werden (KNÖFLER und GRAF 1989, Graf 2010 pers. Mitteilung).

### **2.1.2 Metallene Materialien und deren Modifikation**

Auf Grund der nach Zahnverlust einsetzenden Resorption bzw. Atrophie des Kieferkammes steht meist relativ wenig Knochen für die Aufnahme eines enossalen Implantates zur Verfügung. Demzufolge wird ein Implantat benötigt, dessen Material eine grazile und stabile Gestaltung zulässt. Diese Forderung erfüllen in der Regel vor allem Metalle.

Jedoch werden die zwischen Metallimplantat und Knochenfundament auftretenden chemischen Reaktionen bereits seit Jahrzehnten kontrovers diskutiert. So kann es zur Korrosion auf Seiten des Implantates und zur Metallose auf Seiten des Lagergewebes kommen. Ein Großteil der heute verwendeten Metallimplantate wird aus Titan in unterschiedlichen Formen und Oberflächenmodifikationen hergestellt. Verwendung findet Titan als Reintitan (99,75 % Ti) oder als Ti-6Al-4V-Legierung (90 % Ti, 6 % Al, 4 % V). Werkstoffkundlich betrachtet sind die Unterschiede zwischen cpTi und der Titanlegierung nur minimal (Tab. 1).

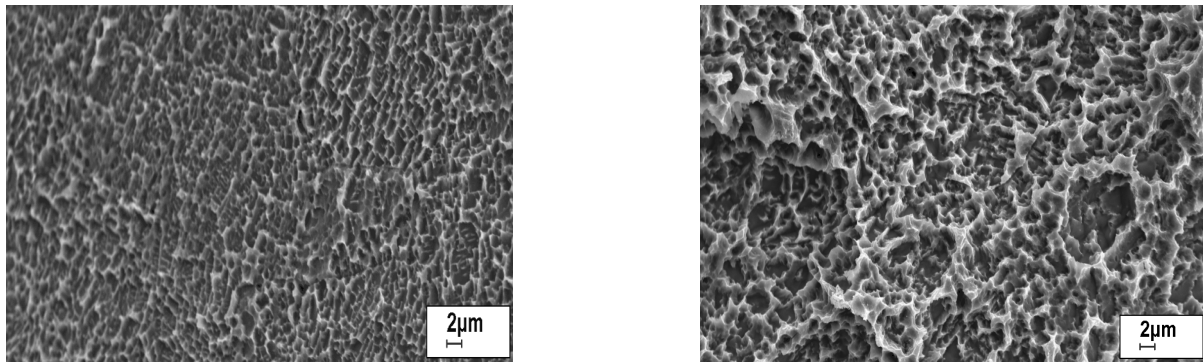
| Parameter                                       | Ti          | Ti6Al4V    |
|---|-------------|------------|
| Elastizitätsmodul [GPa]                         | 100 - 145   | 110 - 140  |
| Schmelzpunkt [°C]                               | 1670 - 1700 |            |
| Härte (nach Vickers)                            | 80 - 105    |            |
| Zugfestigkeit [MPa]                             | 295 - 800   | 900 - 1200 |
| Wärmeausdehnungskoeffizient [ $10^{-6}K^{-1}$ ] | 9,6         |            |
| Härte [ $kg/mm^2$ ]                             | 140 - 310   | 300 - 400  |
| Transformationstemperatur [°C]                  | 890 - 950   | 995        |

**Tabelle 1:** Eigenschaftskenngrößen von Ti und Ti6Al4V im Vergleich (KAPPERT 1994, PETERS und LEYENS 2002, RAUCH 1995)

Die chemische Stabilität von Titanoberflächen wird durch eine 2-20 nm dünne, passive Oxidschicht realisiert die im physiologischen Milieu spontan entsteht, jedoch mechanisch sehr instabil ist. So kommt es durch die differenten Elastizitätsmodule von Knochen und Titan bei Be- und Entlastung bereits zu Scherkräften, die ausreichend sind, die Titanoxidschicht zu schwächen und auch den Substratwerkstoff zu verschleifen. Bei der Repassivierung werden Titanatome „verbraucht“, so dass von einer nicht unerheblichen Korrosion des Titans ausgegangen werden kann. SCHLIEPHAKE et al. (1989) konnten in unterschiedlichen Organen und Geweben Titanmonoxid nachweisen, da durch die reduzierte Sauerstoffspannung im Knochen der Aufbau von Titandioxid offensichtlich nicht möglich ist.

Um die Biokompatibilität des Titans weiter zu verbessern, wurden Verfahren entwickelt, die selbst bei ungenügender Knochenqualität die Osseointegration eines Implantates möglich macht. Prinzipiell wird in diesem Zusammenhang zwischen additiven, transformativen und subtraktiven Modifikationen unterschieden.

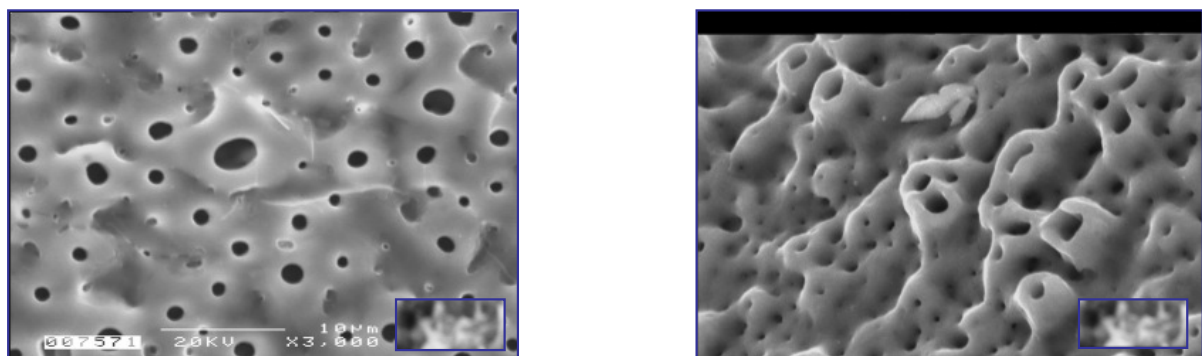
Gängige subtraktive Verfahren sind das Ätzen (z.B. Osseotite®-Oberfläche von 3i®-Implantaten) von maschinenbearbeiteten Oberflächen und Abstrahlen mit Partikeln unterschiedlicher Materialien und verschiedener Größe (z.B. TioBlast®-Oberfläche von Astra Tech®-Implantaten) oder die Kombination aus beiden Verfahren (z. B. SLA®-Oberfläche von Straumann®-Implantaten).



**Abbildung 1:** Subtraktive Titanoberflächen auf Titgrundkörpern, links geätzt - Osseotite® / rechts gestrahlt und geätzt - SLA®

Additive Verfahren stellen beispielsweise die Hydroxylapatitbeschichtung (HA-Oberfläche von IMZ®-TwinPlus-Implantaten) und die Titanplasmabeschichtung (TPS-Oberfläche von ITI®-Implantaten) dar. Letztere sind jedoch kaum noch in Gebrauch. Eine transformative Veränderung der maschinenbearbeiteten Oberflächen wird durch die 1982 von KRYSMANN erstmalig beschriebene „Anodische Oxidation unter Funkenentladung“ -ANOF®- (z.B. TICER®-Oberfläche von ZL-Duraplast-Implantaten) möglich. Dieses Verfahren generiert eine raue, 15-20µm dicke, bis zu 40% Kalzium enthaltende Oxidschicht, welche die Ti-Oberfläche bedeckt.

Vorteil dieser Methode ist, dass neben der Mikrostrukturierung der Oberfläche die Verdickung der Oxidschicht und je nach verwendeter Elektrolytlösung die Anreicherung der Grenzfläche mit zusätzlichen Elementen (z.B.: Kalzium, Phosphor) erreicht werden kann (u.a. Graf 1997). Auf der Grundlage dieses Verfahrens kam es zur Entwicklung weiterer Konversionsoberflächen wie TiActive® (Heraeus-Kulzer), PerioCoat® (Clinical House), TiUnite® (Nobel-Biocare, Schweiz/Schweden), CellNest® (Ostem, Korea) und FBR® (Oratronics GmbH, Bremen).

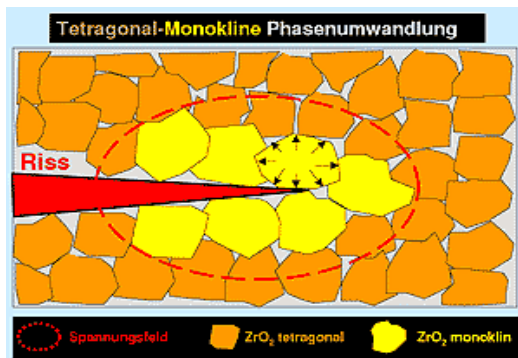


**Abbildung 3:** Konversionsoberflächen basierend auf Anodischer Oxidation unter Funkenentladung, links - TICER® (ZL-Microdent), TiActive® (Heraeus-Kulzer), PerioCoat®(Clinical House) / rechts - TiUnite® (Nobel-Biocare, Schweiz/Schweden)

Des Weiteren werden Versuche unternommen, die chemische Struktur von Oberflächen (in der Regel die Oxidschicht) durch Fluoridierung oder Biologisierung mittels verschiedenster Proteine zu verändern, um auch hierdurch den biologischen Verbund zu verbessern (WAGNER UND AINAWAS 2004).

### **2.1.3 Strukturiertes Zi-II-Ox. Material und dessen Modifikation**

Im Sortiment der polykristallinen Keramiken sind Zirkonoxid und Aluminiumoxid bis dato die beiden einzigen, die für den Einsatz als starkbelastbare Gerüstkeramiken in der Zahnmedizin nutzbar sind (MEYER 2002). ICHIGAWA et al. (1992) führten Implantationsstudien mit  $ZrO_2$ -Implantaten durch und stellten eine gute Gewebeerträglichkeit fest. Diese und viele weitere Studien belegen einheitlich die gute Biokompatibilität des Werkstoffes (CHRISTEL et al. 1989; ICHIGAWA et al. 1992; CALES et al. 1994). Zirkonoxidimplantate sind außerordentlich beständig gegenüber korrosiven und tragebedingten Abnutzungen.  $ZrO_2$  zeichnet sich durch ein polymorphes Verhalten aus. Beim Abkühlen von reinem  $ZrO_2$  kristallisieren die Körner zunächst bei 2680 °C kubisch. Bei 2370 °C erfolgt die Umwandlung in die tetragonale Phase, bei 1170 °C in die monokline Tieftemperaturphase. In den unterschiedlichen Phasen liegt der Werkstoff jeweils in einer verschiedenen Dichte vor. Sie beträgt 5,83 g/cm<sup>3</sup> in der monoklinen Phase, 6,10 g/cm<sup>3</sup> in der tetragonalen Phase und 6,09 g/cm<sup>3</sup> in der kubischen Phase (HELBIG und SCHÖNHOLZER 2001). Somit kommt es beim diffusionsfreien Umklappen des Gitters von tetragonal zu monoklin zu einer Volumenzunahme von 3 bis 5 %. Entsteht ein Riss, lässt der (volumenbedingte) Druck durch die umgebenden Partikel nach. Wenige Partikel, die direkt neben einem Riss liegen, können zur monoklinen Phase transformieren. In Folge dessen nehmen die Partikel an Volumen zu und verhindern durch Kompression weiteres Risswachstum selbst (GUAZZATO et al. 2005). Auf Grund dieser Phasenumwandlung metastabiler Teilchen kann Zirkonoxidkeramik seine Festigkeit und Bruchzähigkeit steigern und wird deshalb oftmals als „keramischer Stahl“ bezeichnet (CHRISTEL et al. 1989).

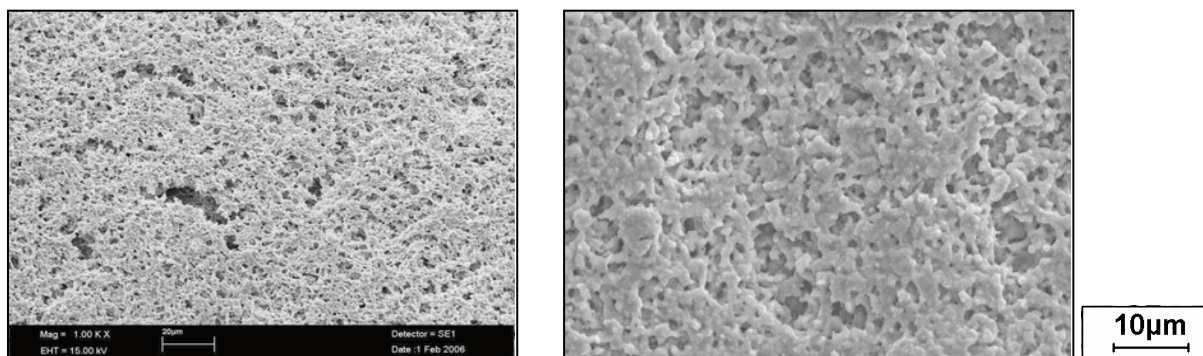


**Abbildung 4:** Phasenumwandlung von Zirkon bei Risseinlauf

(Quelle: [www.alkomdigital.com/produkte/zirkon.html](http://www.alkomdigital.com/produkte/zirkon.html), besucht am 03.06.2010 um 13.35 Uhr)

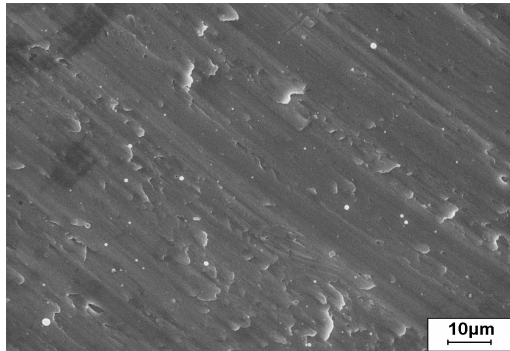
Im Vergleich zu anderen Keramiken, die sich durch hervorragende biokompatible, aber unzureichende physikalische Eigenschaften auszeichnen, dürfte  $ZrO_2$  der keramische Implantatwerkstoff der Wahl sein (KOHAL und KLAUS 2003). Für  $ZrO_2$  ist bereits 1990 der Nachweis seiner Biokompatibilität erbracht worden und ein ISO-Standard etabliert (ISO 13356).

Auf Grund dieser Tatsache wurden diverse Modifikationstechniken für Zirkonoxidoberflächen sowohl auf Zirkonoxidgrundkörpern als auch auf metallenen Grundkörpern entwickelt. In der Rubrik Modifikationstechniken von Zirkonoxidoberflächen auf Zirkonoxidgrundkörpern kommen vor allem subtraktive Techniken und Spacertechniken zum Einsatz. Typische Vertreter aus beiden Gruppen sind White SKY<sup>®</sup> (Bredent), Z-Look<sup>®</sup> (Z-Systems), ZiUnite<sup>®</sup> (Nobel Biocare, Schweiz/Schweden) und Zircapore<sup>®</sup> (Metoxit).



**Abbildung 5:** Zirkonoxidoberflächen auf Zirkonoxidgrundkörpern (Spacertechniken), links - ZiUnite<sup>®</sup> (Nobel Biocare, Schweiz/Schweden) / rechts - Zircapore<sup>®</sup> (Metoxit)

Wie bereits erwähnt, ist  $ZrO_2$  (in nicht-keramischer Form) zusätzlich auch zur Beschichtung von Implantatkörpern anderer Materialien nutzbar. Vertreter der Depositionstechniken von Zirkonoxiden auf metallenen Grundkörpern sind u.a. PVD Deposition – (Biocer Ti,  $ZrO_2$ ) (Leibinger, OMT), elektrochemische Deposition – experimentell (Radice et al.), Ion-beam-Technology – experimentell (IOM Leipzig, Uni Leipzig) und die in unserer Versuchsreihe angewandte elektrochemische Konversion – experimentell (ZL-Microdent).



**Abbildung 6:** Titgrundkörper mit Zirkonoxidoberfläche (Ion-beam-Technology – experimentell, Uni Leipzig)

#### 2.1.4 Vergleich Titan- vs. Zirkon-Interface

ALBREKTSSON konnte für das Interface um Titan histologisch das völlige Fehlen von Bindegewebe nachweisen (ALBREKTSSON et al. 1983,1985).

Das Implantat per se war in eine kollagenfreie Proteoglykanschicht von 200 bis 400 Å Dicke eingebettet. Kalzifizierte Substanz war in direktem Kontakt zum Implantat sichtbar. Nur wenige Zellen sind in dem Interface nachweisbar gewesen. Auch für  $ZrO_2$  konnte gezeigt werden, dass eine direkte Anlagerung reifer trabekulärer Knochenbälkchen ohne Zwischenlagerung einer Bindegewebsschicht stattfinden kann (ALBREKTSSON 1983, 1985). Die lamelläre Struktur des appositionierten Knochens zeigte auf Titan und Zirkon starke Ähnlichkeiten. In Bezug auf die Dynamik und Morphologie der Knochengewebsneubildung kamen AKAGAWA et al. (1993) zu dem Schluss, dass sich  $ZrO_2$  und Titan weitgehend entsprechen. Jedoch zeigte sich bei den Versuchen von SCHULTZEMOSGAU et al. (2000) auf der  $ZrO_2$ -Oberfläche eine signifikant größere Apposition von mineralisiertem Gewebe als auf der Titanoberfläche.

Durch Untersuchung der Knochendichte konnten ABRAHAMSSON et al. (2001) aufzeigen, dass die Dichte des appositionierten Knochens im direkten Interface durch die Rauheit einer Implantatoberfläche - unabhängig vom Material - beeinflusst wird.

SCARANO et al. (2003) folgerten, dass das  $ZrO_2$ -Interface zum größten Teil aus reifen Knochen mit wenigen Markräumen besteht. Anzeichen von Entzündungs- oder mehrkernigen Zellen sowie Interposition von Bindegewebe konnten nicht nachgewiesen werden. Somit schlussfolgern sie, dass das  $ZrO_2$ -Knochen-Interface lichtmikroskopisch dem für Titan beschriebenen entspricht.

### **2.1.5 Biologische Erkenntnisse in der Zellkultur im Zusammenhang mit Oberflächenmodifikationen**

Der Charakter einer Oberfläche beinhaltet das Zusammenspiel all ihrer Eigenschaften: chemische, physikalische, mechanische und topographische (WENNERBERG 1995). THOMAS und COOK (1985) untersuchten 12 verschiedene Oberflächenparameter und deren Einfluss auf die Osseointegration eines Implantates. Sie kamen zu dem Schluss, dass von allen untersuchten Parametern allein die Rauheit signifikante Auswirkungen auf die Festigkeit des Knochen-Implantat-Verbundes hat (THOMAS und COOK 1985). Um den Verbund zwischen Implantat und Knochen zu verbessern, werden Oberflächen, wie bereits beschrieben, auf viele Arten modifiziert. Die Mikro- und Nanostrukturen einer Oberfläche beeinflussen dabei verschiedene Aspekte des zellulären Verhaltens, wie z. B. die Adhäsion, Proliferation, Differenzierung, Morphologie und Orientierung von Zellen (ZINGER et al. 2004).

Chemische Modifikationen generieren bei Keramiken eine Apatit-Oberfläche, die einen stabileren Verbund mit dem umgebenden Knochen ermöglicht. Durch die chemische Nachbearbeitung bilden sich Zr-OH Gruppen auf dem Material. Je mehr Zr-OH Gruppen sich auf der Keramikoberfläche befinden, desto mehr Apatit wird gebildet (UCHIDA et al. 2002).

In der Regel soll mit Hilfe einer topographischen Nachbearbeitung eine Vergrößerung der Oberfläche erreicht werden. Als wichtigsten Faktor zur Beschreibung der Oberfläche geben WAGNER und AL NAWAS (2004) die mittlere Rauheit in Form des  $S_a$  Wertes an.

Wie in der Literatur vielfach beschrieben, vermag sich Fibrin an fast alle Oberflächen anzuheften. Da Fibrinfasern sich in den ersten Stunden der Heilung kontrahieren, muss die Oberfläche so beschaffen sein, dass ein dauerhafter Verbund über diesen Prozess hinaus



möglich ist. Sollten die Fibrinfasern nicht stabil an der Oberfläche haften, bleibt auch die Einwanderung von Zellen über diese Fasern aus. In diesem Fall differenzieren sich die Zellen bereits im umliegenden Gewebe und scheiden Knochenmatrix bestenfalls in Richtung des Implantates ab (DAVIES 2003).

Einer Reihe von Arbeitsgruppen gelang es, für rauere Implantate eine bessere Knochenbildung *in vivo* und *in vitro* nachzuweisen (BUSER et al. 1991, BUSER und BELSER 1998, BUSER et al. 1999, KHANG et al. 2001, BRETT et al. 2004).

Die Konfiguration der Implantatoberfläche hat dabei nicht nur Einfluss auf die Reaktion des Knochens, sondern auch auf die Reaktion des Bindegewebes. Glatte Oberflächen fördern vor allem das Wachstum von Bindegewebe, auf rauen Oberflächen kommt es verstärkt zu einer knöchernen Verankerung (COCHRAN et al. 1994; SIMPSON und SNÉTIVY 1998). Nach BRUNETTE (1988) hat die Textur einer Oberfläche das Potenzial, die Population bestimmter Zelltypen selektiv zu beeinflussen und deren Funktion zu verändern. Die Rauheit einer Oberfläche hat Einfluss auf die Differenzierung von Osteoblasten (BOYAN et al. 1999).

Inwieweit jedoch diese Relation durch die Rauheit der Oberfläche direkt und primär vermittelt wird, ist bis dato noch nicht geklärt. Es ist sehr wahrscheinlich, dass initiale Proteine, wie Fibronectin, diese Zellreaktionen sekundär modulieren. Fibronectin vermittelt die Anheftung und Ausbreitung von Zellen auf Oberflächen. Die anfängliche Anheftung bestimmter Proteine kann auf diese Weise die weitere Entwicklung und Differenzierung nachfolgender Zellpopulationen positiv oder negativ beeinflussen (SCHWARTZ et al. 1996).

Je höher der Wert für die mittlere Rauheit der Oberfläche ist ( $R_a$  oder  $S_a$ ), desto größer ist die Aktivität und Konzentration für den Knochenheilungsprozess wichtiger Zytokine:

PGE2 und TGF- $\beta$ 1 (KIESWETTER et al. 1996).

KIESWETTER et al. (1996) kommen jedoch zu dem Schluss, dass die vergleichsweise wenigen Zellen auf den rauen Oberflächen einen deutlich höheren Differenzierungsgrad aufweisen. Aus diesem Grund ist die Stoffwechselleistung der Einzelzelle erhöht (KIESWETTER et al. 1996).

## 2.2 Biochemische Knochenmarker

Bereits seit Anfang der 90er Jahre sind eine Vielzahl biochemischer Knochenmarker verfügbar. Die Quantifizierung von Knochenmarkern unterstützt und ergänzt die Diagnostik des Knochenstoffwechsels. Jedoch sind zur Bewertung der biochemischen Marker noch keine allgemein anerkannten Kriterien aufgestellt worden.

Die Expression nonkollagener Knochenmatrixproteine wie Osteocalcin (SCHNEIDER et al. 2004, ZINGER et al. 2005), Osteonectin (KNABE et al. 2004 a, b), Bone Sialo Protein (KNABE et al. 2004 a, b, COOPER et al. 2006), und Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$  (BATZER et al. 1998, MUSTAFA et al. 2003, ZINGER et al. 2005) werden u.a. als Maß der Osteoblastendifferenzierung angesehen.

In dieser Arbeit werden Bone Sialo Protein (BSP), Osteocalcin, Osteonectin und TGF- $\beta$  verwendet. Diese Proteine und der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  sind gängige Marker für die Prae-Osteoblasten und Osteoklastendarstellung in vitro (WIENER, 2003; KIRSTEN, 2005).

### 2.2.1 Bone Sialo Protein (BSP)

BSP wurde erstmals aus Kälberknochen isoliert und von HERRING und KENT (1963) beschrieben. Es ist ein posttranslational hoch modifiziertes, phosphoryliertes Glycoprotein (YOUNG 1992) mit O-glykosidisch gebundenen Oligosacchariden, welche posttranslational in den Zisternen des Golgi-Apparates mit Hilfe spezifischer Glucosyltransferasen auf den betreffenden Seryl- bzw. Threonylresten der Peptidkette aufgebaut werden, wobei Nucleosiddiphosphat-aktivierte Zucker das Substrat sind (HEINEGARD und OLDBERG 1989). Das Molekulargewicht von BSP beträgt 70-80 kDa. Es besteht zu 50% aus Proteinen.

BSP wird exprimiert von Knochen-, Knorpel- und Dentin-bildenden Zellen, von Trophoblasten der Plazenta, aber auch durch Krebszellen von Primär- oder Sekundärtumoren (BIANCO et al., 1991; FISHER et al., 1990; OLDBERG et al., 1988).

Im Knochenstoffwechsel übt es neben anderen Molekülen eine regulierende Funktion aus.

Unter anderem wird BSP in Tumorzellen exprimiert, die bevorzugt in den Knochen metastasieren. In diesem Zusammenhang wird von einer bedeutenden Rolle bei der Osteoklastenformation und Knochenresorption in der Literatur ausgegangen (Raynal et al. 1996).

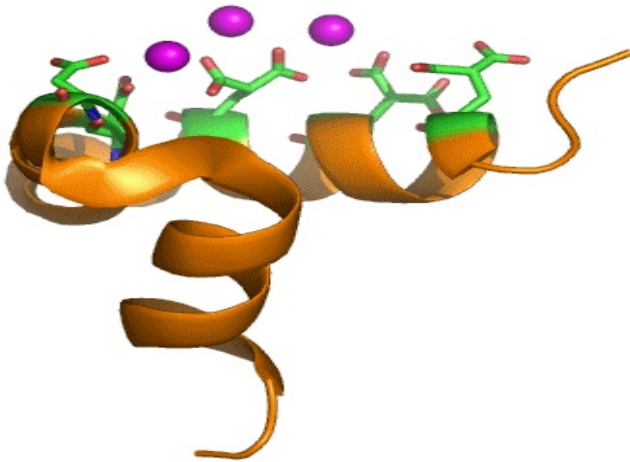
In der Gewebekulturforschung wird BSP als früher Marker für die Osteoblastendifferenzierung verwendet (HATTAR et al. 2005). Es ist zu vermuten, dass BSP bei der Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten eine vermittelnde Rolle spielt. Zudem wurde eine beschleunigte Entwicklung von mesenchymalen Zellen aus dem Knochenmark zu Osteoblasten durch BSP entdeckt (MIZUNO et al. 2000).

BSP kann in der von Osteoblasten gebildeten kollagenfreien Matrix nachgewiesen werden (SHEN et al. 1993), die als erste Schicht auf anresorbiertem Knochen oder Implantatoberflächen abgelagert wird (DAVIES 1996). Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass die Mineralisation von Knochen durch BSP gefördert wird (SOOY et al. 2005). Auch für die Dentinmineralisation scheint BSP eine wichtige Rolle zu spielen. In der Pulpa wurde durch BSP eine erhöhte Mineralisation des Gewebes ausgelöst (SIX et al. 2002).

### 2.2.2 Osteocalcin (OC)

Osteocalcin ist ein kalziumbindendes Protein mit einem Molekulargewicht von 5,2-5,9kDa und wird in Osteoblasten Vitamin K-abhängig synthetisiert. Es enthält 49 Aminosäuren, eine Disulfidbrücke, eine prolinreiche Region und drei  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäure (Gla)-Sequenzen (Price 1976, Viridi et al. 1991).

Während der Mineralisationsphase wird es in die Knochenmatrix integriert, wo es Kalzium bindet. Die Kalziumbindung verursacht eine Konformationsänderung, welche mit der hohen Affinität zu Hydroxylapatit korreliert (DELMAS et al. 1984, ATKINSON et al. 1995). Im Serum ist es ein spezifischer Marker der Knochenbildung. Die physiologische Funktion von Osteocalcin ist weitgehend ungeklärt. Es besitzt eine hohe Affinität zum Hydroxylapatit und induziert wahrscheinlich die Hydroxylapatitbildung in der Knochenmatrix. Ebenso wird OC ein Einfluss auf die Zahnbildung nachgesagt.



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung von Osteocalcin (Kristallstruktur) (aus: Q.Q. Hoang et al. „Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure.“ Nature 2003, 425, 977-980)

Osteocalcin gilt als Marker fortgeschritten differenzierter Osteoblasten, eine Zunahme der Osteocalcinsekretion wird somit als eine weitere Differenzierung aufgefasst. Erhöhte Osteocalcinwerte treten beim Knochenaufbau auf und werden als biochemischer Knochenumsatzmarker zur Bestimmung der Osteoblastenaktivität gemessen. Eine höhere Rauheit der Oberflächen korreliert mit einer vermehrten Osteocalcinproduktion (BOYAN et al. 2001, 2003, LIN et al. 1997, MUSTAFA et al. 2001).

### 2.2.3 Osteonectin (ON)

Das extrazelluläre, kalziumbindende Protein BM-40 (SPARC, Osteonectin) wurde erstmals von TERMINE et al. (1981) als eines der wichtigsten, nichtkollagenen Proteine in bovinem und humanem Knochen beschrieben und mit Osteonectin beschrieben.

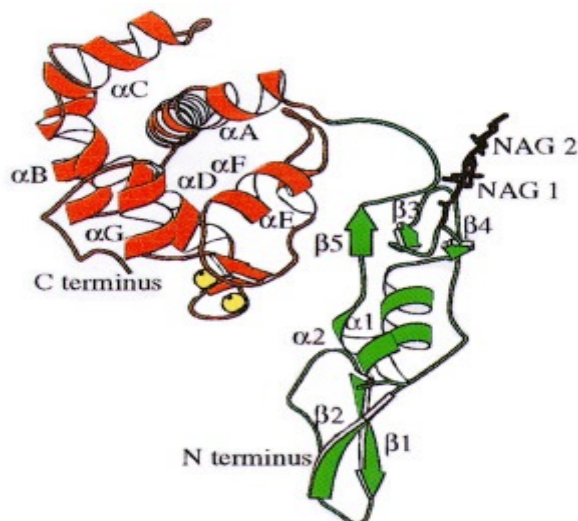
ON wird von verschiedenen Zelltypen wie Endothelzellen, Fibroblasten, Osteoblasten, Chondrozyten und glatten Muskelzellen ausgeschüttet (REED and SAGE, 1996). Das Protein wird zusätzlich in verschiedenen Geweben, insbesondere während der Embryonalentwicklung, Morphogenese und Wundheilung gebildet (REED and SAGE, 1996).

Man vermutet, dass ON Zell-Zell und Zell-Matrix-Interaktionen beeinflusst (LANE and SAGE, 1994). Im weiteren Prozess der Entwicklung wird ON von zahlreichen Geweben wie Knochen, Knorpel, Herz, Lunge, Thymus, Haut, Gehirn, Darm und Blutgefäßen sekretiert.

Die höchste Expression wird dann im Knochen beobachtet, sowie in Geweben, in denen Umordnungsprozesse stattfinden (LANE and SAGE, 1994; BREKKEN and SAGE, 2000). ON wird in allen bis dato untersuchten Spezies von einem einzelnen Gen kodiert. Es bindet an Hydroxylapatit (TERMINE et al., 1981) sowie an Kollagene vom Typ I (TERMINE et al., 1981), Typ II und III (SAGE et al., 1989), Typ IV (MAYER et al., 1991) sowie Typ V (SAGE et al., 1989).

ON bindet ebenfalls an verschiedene Wachstumsfaktoren und hemmt die zelluläre Antwort auf diese. BM-40 interagiert zudem mit den extrazellulären Matrixproteinen. Eine große Anzahl von Effekten des BM-40 ist auf Zellen *in vitro* beschrieben, u.a. eine Veränderung der Zellmorphologie (SAGE et al., 1989; LANE and SAGE, 1990), eine Zerstörung von Fokal-Kontakten von Zellen (MURPHY-ULLRICH et al., 1995), eine Unterbrechung des Zell-Zyklus (FUNK and SAGE, 1991; 1993) und eine Regulation der Zelldifferenzierung (BASSUK et al., 1999).

Aufgrund der potenziellen Wirkung von BM-40 auf Adhäsion, Morphologie, Differenzierung und Proliferation wurde die Existenz eines BM-40- Rezeptors vermutet. Ein solcher Rezeptor konnte jedoch bis dato nicht nachgewiesen werden.



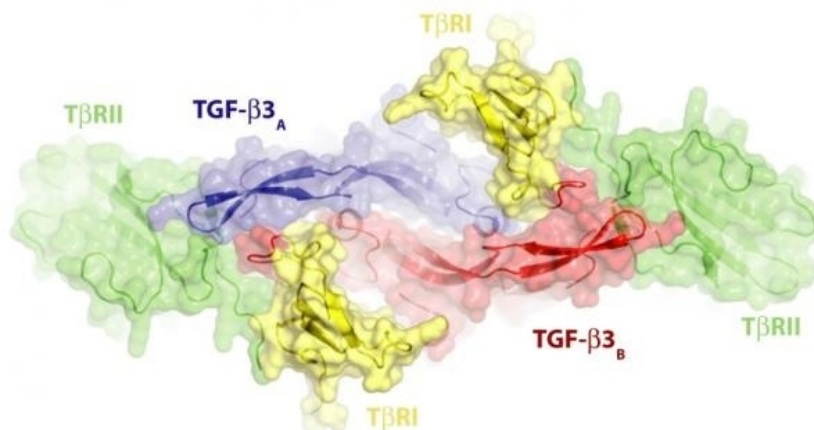
**Abbildung 8:** Kristallstruktur des FS-EC-Domänenpaares von BM-40

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des FS-EC-Domänenpaares basierend auf den Daten der Röntgenstrukturanalyse. Die FS-Domäne ist grün, die EC-Domäne rot und die gebundenen Kalzium-Ionen in Form gelber Kugeln dargestellt. NAG 1 und 2 kennzeichnen die ersten beiden N-Acetylglucosamin-Reste des Oligosaccharids an Asn 99 (aus HOHENESTER et al., 1997).

### 2.2.4 TGF- $\beta$ (*transforming growth factor-beta*)

Dieses homodimere Protein wird von Megakaryocyten, Makrophagen, Lymphocyten und Chondrocyten produziert. Die transformierenden Wachstumsfaktoren, die unter dem Begriff TGF- $\beta$  zusammengefasst werden, haben als bemerkenswerteste Eigenschaft die Janusköpfigkeit. Sie sind in der Lage, die Zellteilung anzutreiben oder zu blockieren, sie können Zellen überleben und sterben lassen. Zu den biologischen Wirkungen von TGF- $\beta$  in Differenzierung, Morphogenese und Wundheilung gehören neben dem Einfluss auf Apoptose (s.o.) auch die Regulation des Zellwachstums (SPORN *et al.*, 1986; WOLLENBERG *et al.* 1987; ROBERTS und SPORN, 1990; MASSAGUE' *et al.*, 1990). Die TGF- $\beta$ -Familie der Säuger besteht aus drei Mitgliedern: TGF- $\beta$  1 bis 3. Von diesen sind die Wirkungen des TGF- $\beta$  1 die bestuntersuchten. Die TGF- $\beta$ -Familie gehört der TGF- $\beta$ -Superfamilie an. Dieser gehören außerdem die Aktivin/Inhibin- und die BMP-Familie (*bone morphogenetic protein*) sowie einige andere Proteine an (ALEVIZOPOULOS und MERMOD, 1997).

Der Wachstumsfaktor begünstigt die Knochenbildung durch Erhöhung der Proliferationsrate von mesenchymalen Stammzellen. Er wird von Osteoblasten sezerniert und in die Knochenmatrix eingebaut, wo er durch die Osteoklastenaktivität wieder freigesetzt wird. Bei dessen Freisetzung hat der Faktor eine inhibitorische Wirkung auf die Osteoklasten und eine exhibitorische auf die Osteoblasten (WERYHA, G.,LECLERE, J., 1995). Die Expression von TGF- $\beta$  findet in der frühen Phase der Osteoblastendifferenzierung statt (JOYCE *et al.* 1990, BOLANDER 1992). Daher scheint eine Analyse genau zu diesem Zeitpunkt sinnvoll, um so die komplexen Mechanismen und Wechselwirkungen zwischen TGF- $\beta$ , den nonkollagenen Knochenmatrixproteinen und der Osteoblastendifferenzierung besser deuten zu können.



**Abbildung 9:** Grafische Darstellung des TGF- $\beta$ -Komplexes mit Rezeptor Untereinheiten, markiert als T $\beta$ RI und T $\beta$ RII (Credit: Image courtesy of University of Texas Health Science Center at San Antonio)

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

| <u>Chemikalien</u>                                 | <u>Hersteller</u>                        |
|--|--|
| Paraformaldehyd                                    | Merck                                    |
| Rinderserumalbumin, Fraktion 5                     | SIGMA                                    |
| Kollagenas, 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 Universitätsklinikum<br>Leipzig |
| Ziegen-Normalserum                                 | DAKO CORPORATION                         |
| Pen/ Strep (10000 IU/ml each)                      | PromoCell bioscience alive               |
| 4,6-Diamidino-2-phenylindol. 2HCL p.A.<br>( DAPI ) | SERVA Feinbiochemica<br>GmbH & Co. KG    |
| Fluoreszent Mounting Medium                        | DAKO CORPORATION                         |

**3.1.2 Puffer**Chemikalien

PBS, pH=7,4

Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat p.a.

Kaliumdihydrogenphosphat p.a.

Natriumchlorid DAB 10

Aqua dest.

Hersteller

Apotheke Universitätsklinikum

Leipzig

1,463 g

0,245 g

8,0 g

ad 1000 ml

HEPES Puffer, pH=7,4

Natriumchlorid DAB 10

HEPES-Puffersubstanz

Aqua dest.

Apotheke Universitätsklinikum

Leipzig

4,383 g

2,603 g

ad 1000 ml

**3.1.3 Nährmedien**Chemikalien

Osteoblast Growth Medium

Supplement Mix/Osteoblast Growth Medium

Fetal Calf Serum (10 %)

Penicillin/Streptomycin/Fungizone

10000 IU/ml, 250 µg/ml Fungizone

Hersteller

PromoCell bioscience alive

PromoCell bioscience alive

**3.1.4 Primärantikörper**Chemikalien

Monoclonaler Antikörper zu Osteonectin

Monoclonaler Antikörper zu Osteocalcin

Hersteller

Acris Antibodies

Acris Antibodies



Mouse Anti-Human TGF- $\beta$ -1-Antikörper,  
monoclonal

Chemicon International

Anti-human-BSP-Antikörper, monoclonal

Immundiagnostik AG

### 3.1.5 Sekundärantikörper

#### Chemikalien

Cy<sup>TM</sup> 3-konjugiertes Ziegen Anti-Maus  
IgG (H+L) Jackson

#### Hersteller

ImmunoResearch  
Laboratories, INC.

### 3.1.6 Labortechnisches Zubehör

#### Gerät

#### Hersteller

Sicherheitswerkbank Herasafe

Kendro Laboratory Products

Brutschrank Thermo Forma

Thermo Electron Corporation

Zentrifuge Eppendorf 5702

Eppendorf-Netheler-Hinz

Analysenwaage Kern 410

Kern

Neubauer Zählkammer

Feinoptik Bad Blankenburg

Schüttler VIPRAMAX 100

Heidolph

Vortex-Mixer

Stuart

Kühlschrank

Liebherr

Tiefkühlschrank

Liebherr

Wasserbad

GFL

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

### 3.1.7 Geräte zur Auswertung

| <u>Gerät</u>                       | <u>Hersteller</u> |
|------------------------------------|-------------------|
| Mikroskop Axiophot                 | Carl Zeiss Jena   |
| Mikroskop Axiovert                 | Carl Zeiss Jena   |
| Mikroskop Laboval                  | Carl Zeiss Jena   |
| Axio Cam MRc5                      | Carl Zeiss Jena   |
| Software Axio Vision               | Carl Zeiss Jena   |
| Tabellenkalkulationsprogramm Excel | Microsoft         |

### 3.1.8 Verwendete Probekörper

Für den Versuch wurden 7 Titgrundkörper sowie ein keramischer Grundkörper mit einem Durchmesser von 6 mm und einer Dicke von 0,5 mm verwendet. In der Versuchsreihe kamen drei Standardoberflächen und fünf experimentelle Oberflächen zum Einsatz.

#### Experimentaloberflächen

##### Probekörper 1 (ZSE)

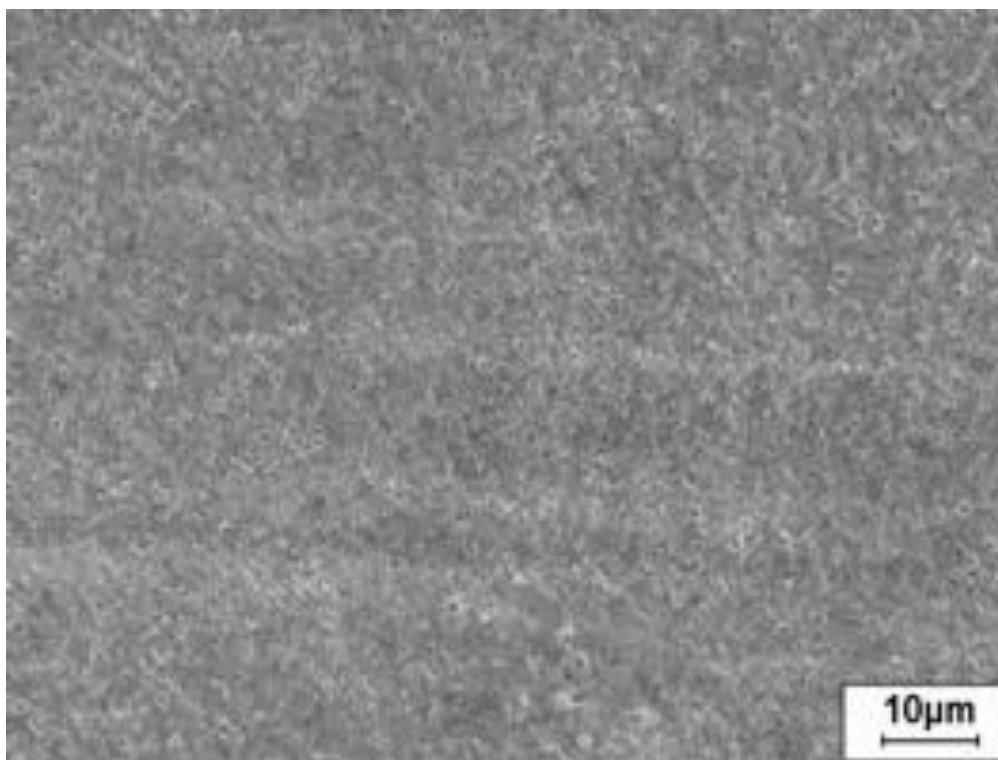


Abbildung 10: ZSE

Spannung: Impulsgenerator

mittlere chemische Zusammensetzung, at %:

Ti 26 - 28, Zr 6 - 9, O 63 - 65, F, K < 2 (EDAX –ZrK- 25 kV)

Ti 28 - 30, Zr 4 - 6, O 65 - 67, F, K < 2 (EDAX –ZrL- 25 kV)

Bemerkungen: hellgraue, dünne homogene Schicht

## Probekörper 2 (ZSG)

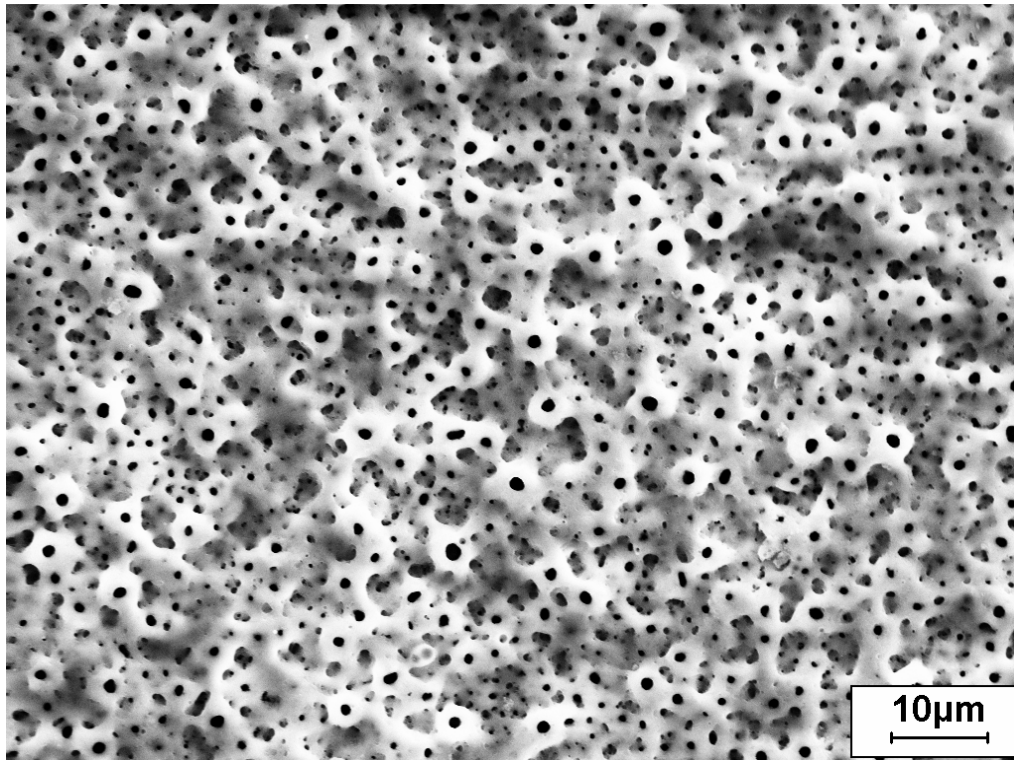


Abbildung 11: ZSG

Spannung: Impulsgenerator 1

mittlere chemische Zusammensetzung, at %:

Ti 16 - 18, Zr 8 - 10, O 69 - 71, P 2 - 5, F,S,K < 2  
(ESMA)

Ti 17 - 19, Zr 8 - 10, O 66 - 68, P 3 - 6, F,S,K < 2  
(EDAX – ZrK - 25 kV)

Ti 18 - 20, Zr 6 - 8, O 68 - 70, P 3 - 6, F,S,K < 2  
(EDAX – ZrL - 25 kV)

Bemerkungen: hellgraue Schicht

## Probekörper 3 (ZSG ½)

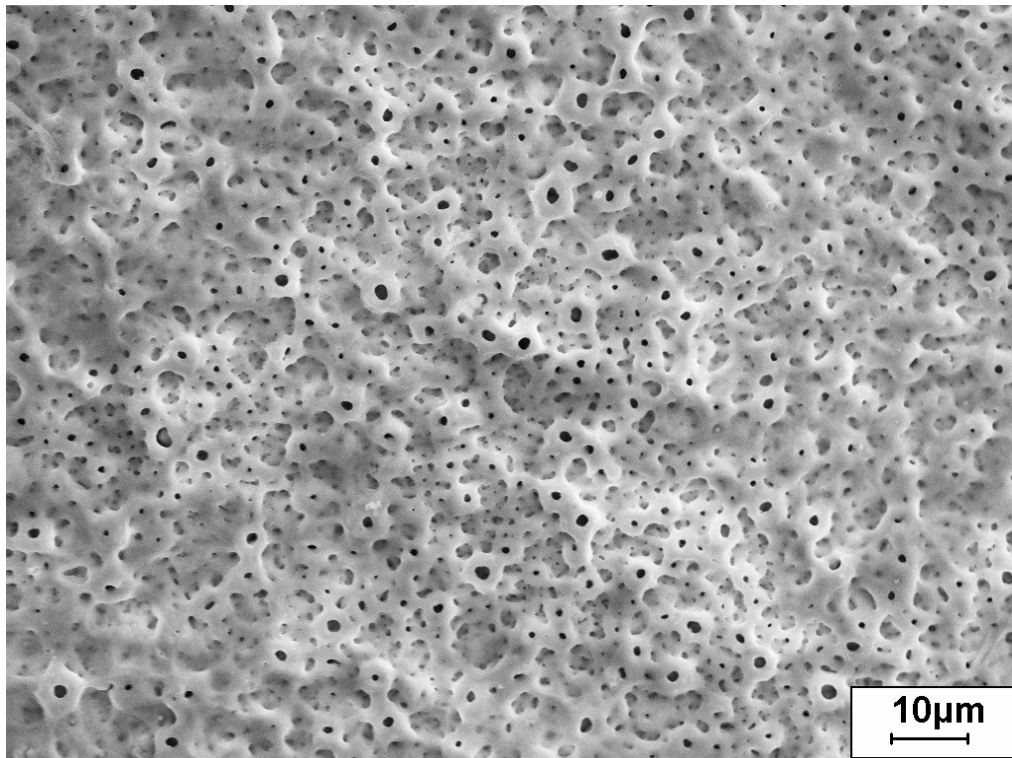


Abbildung 12: ZSG ½

Spannung: Impulsgenerator

mittlere chemische Zusammensetzung, at %:

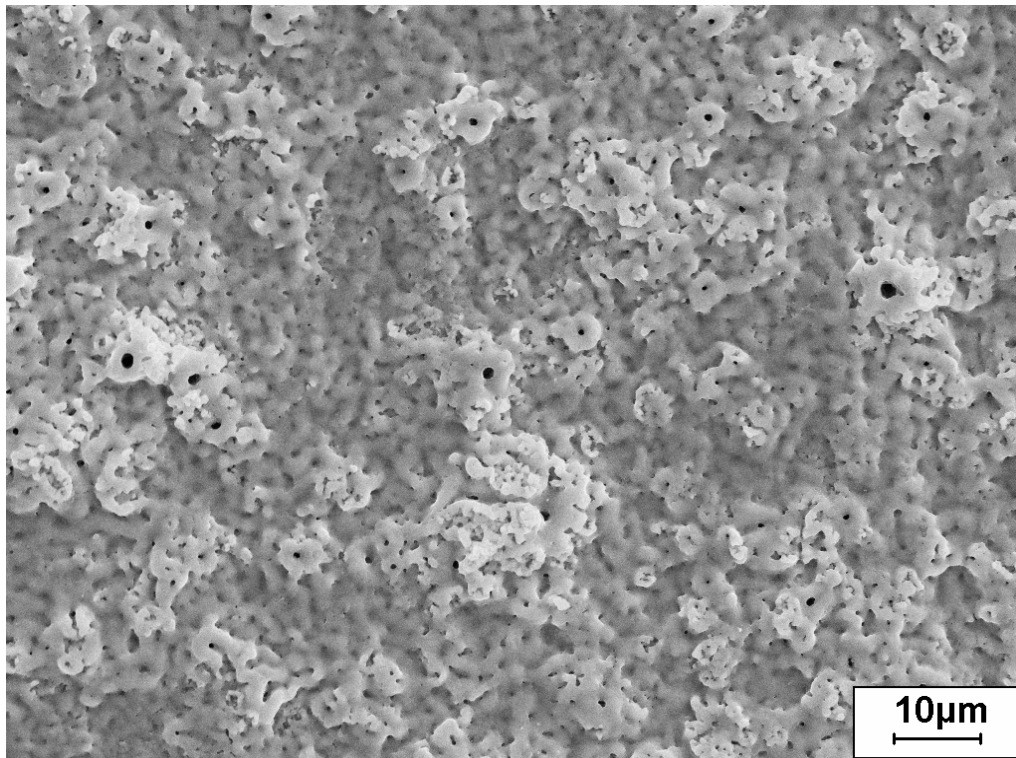
Ti 15 - 17, Zr 9 - 11, O 66 - 68, P 4 - 5, F,S,K < 2

(EDAX – ZrK - 25 kV)

Ti 15 - 17, Zr 11 - 13, O 67 - 69, P 4 - 5, F,S,K < 2

(EDAX – ZrL - 25 kV)

Bemerkungen: dunkelgraue Schicht

**Probekörper 4 (ZS4-0,5)****Abbildung 13:** ZS4-0,5

Spannung: Impulsgenerator

mittlere chemische Zusammensetzung, at % :

Ti 10 - 12, Zr 25 - 27, O 62 - 64, S 0,1 – 0,2  
(EDAX –ZrK- 25 kV)

Ti 11 - 13, Zr 20 - 22, O 67 - 69, S 0,1 – 0,2  
(EDAX – ZrL - 25kV)

Bemerkungen: homogene graue Schicht

## Probekörper 5 (ZS4-2)

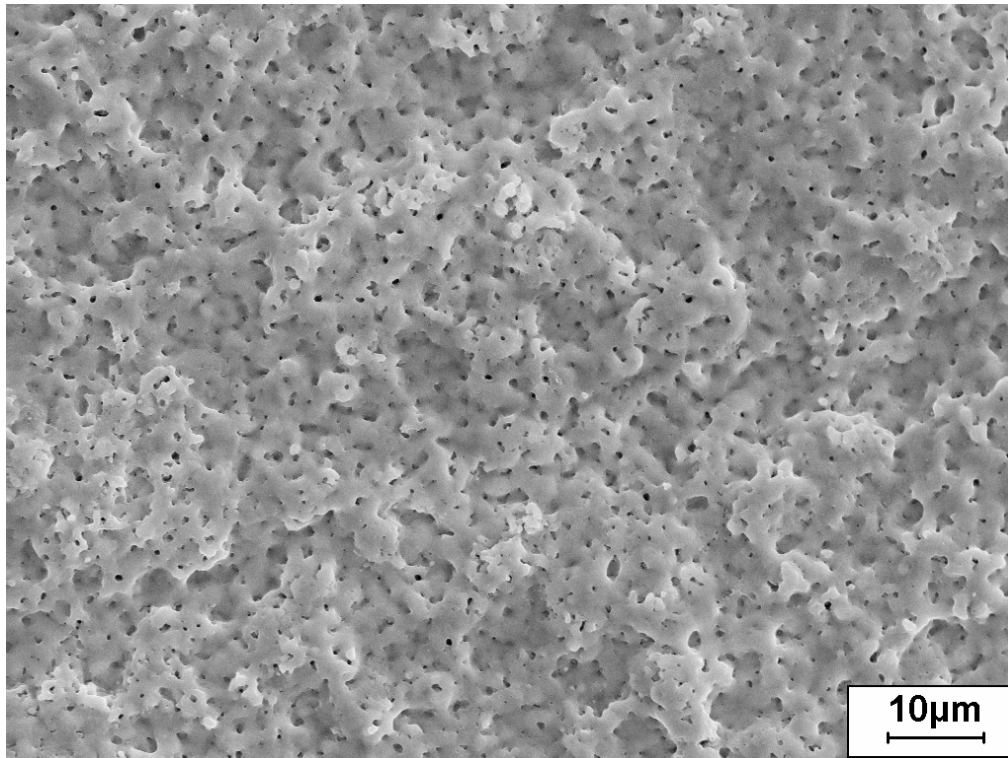


Abbildung 14: ZS4-2

Spannung: Impulsgenerator

mittlere chemische Zusammensetzung, at %:

Ti 8 - 10, Zr 22 - 25, O 65 - 67, S 0,1 - 0,2

(ESMA)

Ti 8 - 10, Zr 22 - 25, O 65 - 67, S 0,1 - 0,2

(EDAX - ZrK - 25 kV)

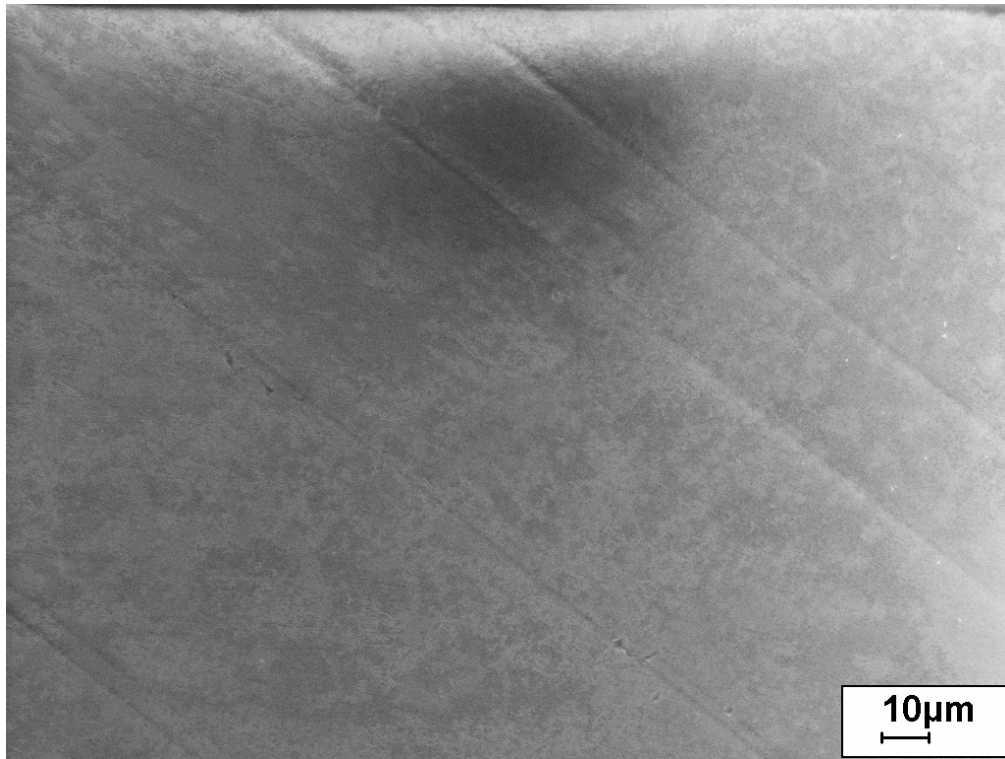
Ti 7 - 9, Zr 21 - 23, O 68 - 70, S 0,1 - 0,2

(EDAX - ZrL - 25kV)

Bemerkungen: homogene graue Schicht

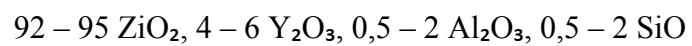
## Standardoberflächen

### Probekörper 6 (CERCON®) als keramischer Positivstandard



**Abbildung 15:** CERCON®

mittlere chemische Zusammensetzung, at %:



Bemerkungen: homogene, weiße Schicht

(FRIADENT\_CERCON\_Wissenschaftliches\_Bulletin, 2004)



### Probekörper 7 (TICER®) als metallener Positivstandard

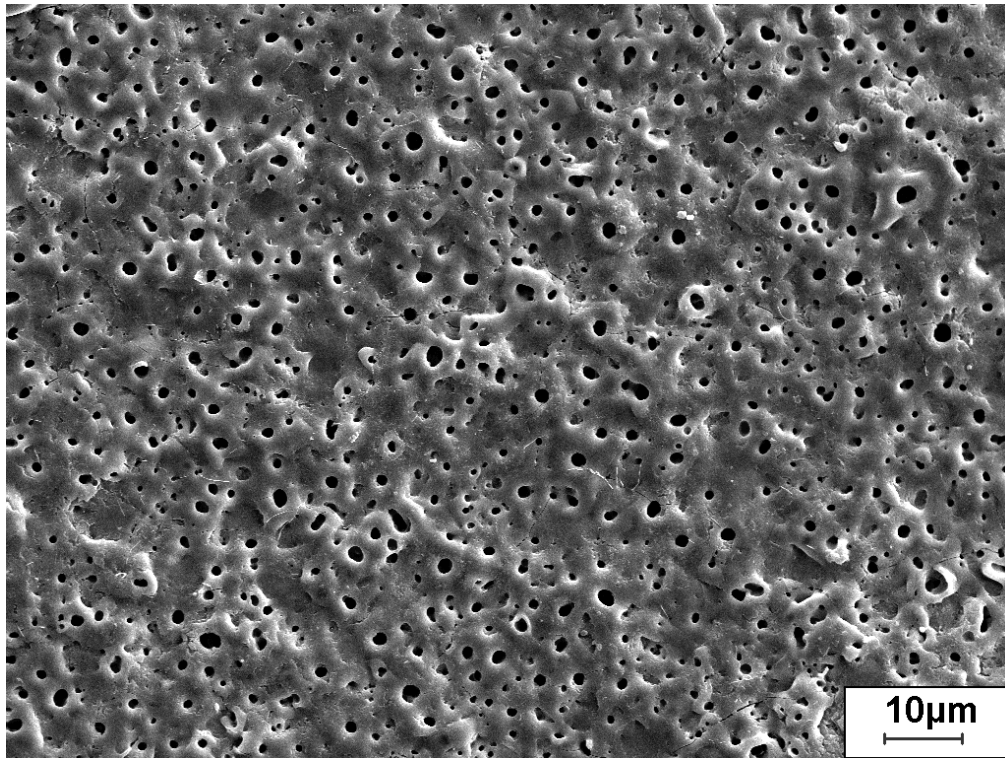


Abbildung 16: TICER®

Spannung: Impulsspannung, 1

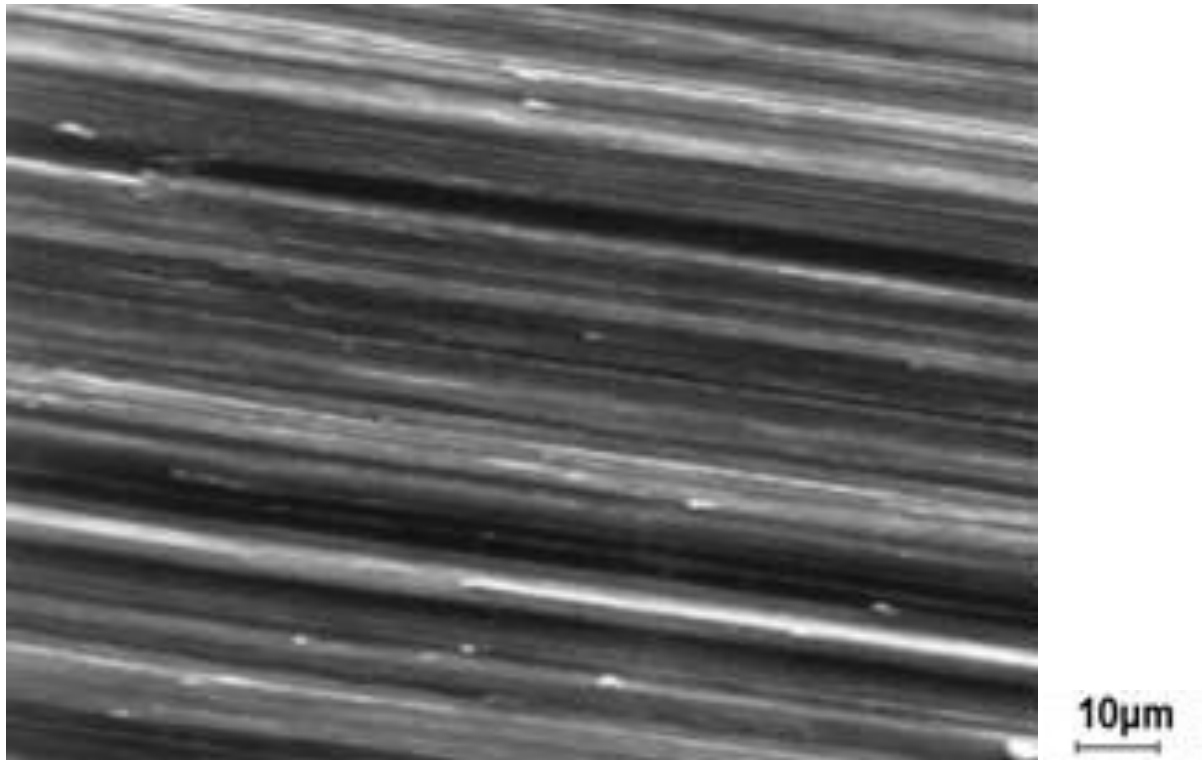
mittlere chemische Zusammensetzung, at %:

Ti 11-21, O 59-71, Ca 3-9, P 11-17, Ca/P = 0,3-0,8

Bemerkungen: graue, glatte Schicht

Die TICER®-Oberfläche (Titan/Ceramic) wird durch die Firma ZL-Microdent auf dem klinisch bewährten und sehr gut untersuchten Implantatsystem ZL-Duraplant eingesetzt. Der Grundkörper besteht aus Reintitan und die Oberfläche wird unter Zuhilfenahme einer Konversionstechnik hergestellt.

### Probekörper 8 (cpt/Titan) als Negativstandard



**Abbildung 17:** cpt/Titan

mittlere chemische Zusammensetzung:

0,2-0,4 Fe, 0,1-0,2 C, 0,1-0,2 H<sub>2</sub>O, 0,04-0,06 N, 0,012-0,014 H<sub>2</sub>

Bemerkung: kommerziell reines Titan (CPT)

Oberfläche maschinert

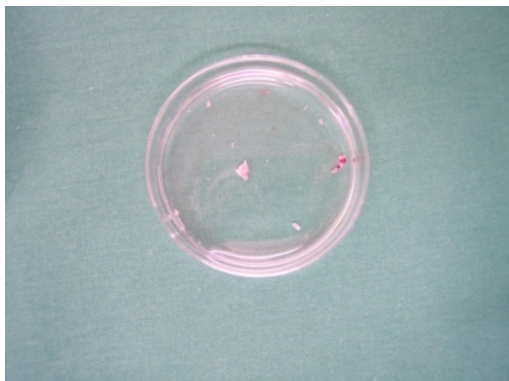
charakteristisches Rillenmuster, welches durch „Abstechen“ von einem größeren Titankörper entsteht

Bei der Reintitan-Oberfläche (ZL-Microdent) handelt es sich um eine maschinenbearbeitete Titanoberfläche, die infolge Spontanoxidation als Titanoxidoberfläche vorliegt.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Materialgewinnung

Nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Universität Leipzig und nach vorheriger Aufklärung des Spenders, wurde im Rahmen eines oralchirurgischen Eingriffes im Bereich des Zahnes 48 in der Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Leipzig Knochengewebe entnommen und sofort nach der Entnahme in steriles PBS mit Pen/Strep (Antibiotikamischung aus Penicillin, Streptomycin und stabilisierendem Natriumchlorid) eingelegt.



**Abbildung 18:** Knochenmaterial in PBS Puffer

### 3.2.2 Anzucht der Knochenzellen

Das entnommene Knochenmaterial wurde in einer sterilen Werkbank mechanisch von Blut gereinigt und mit frischem PBS gespült. Anschließend wurde das Knochengewebe für 30 Minuten, bei 37 °C, 95 % Luftfeuchte und 5 % CO<sub>2</sub> Gehalt, mit 0,25 %iger Kollagenase-Lösung im Brutschrank zur enzymatischen Reaktion gebracht.

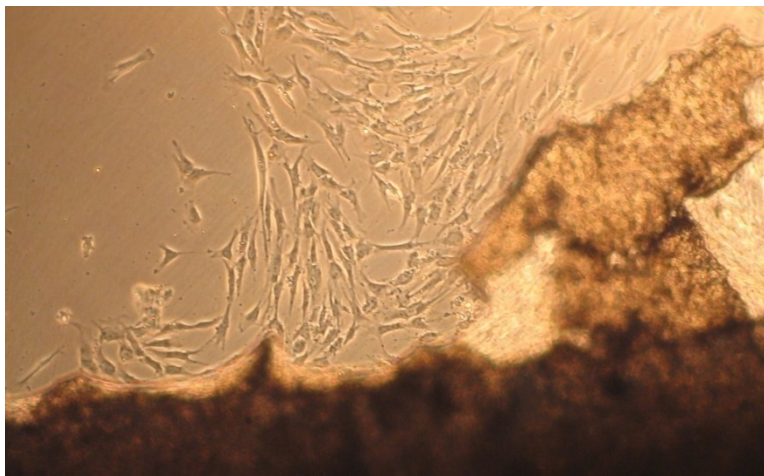
Nach 30 Minuten pipettierten wir den Überstand ab und verwarfen ihn. Dem Knochenmaterial ist nun noch einmal Kollagenase zugesetzt worden. Das Gemisch wurde für 3 Stunden unter den genannten Bedingungen wiederholt zur Reaktion gebracht.

Nach Ablauf von 3 Stunden wurde die Kollagenaselösung bei 150 G für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und der Rückstand mit 2 ml Nährmedium resuspendiert.

Es folgte die Überführung samt Knochenstücken in eine Zellkulturflasche 25 cm<sup>2</sup> mittels Pipette. In die Zellkulturflasche gaben wir zusätzlich 3 ml frisches Nährmedium hinzu.

Im Anschluss daran wurde die Kulturflasche in einem Brutschrank aufbewahrt und dort bei konstanten Bedingungen bei 37°C, 95% Luftfeuchte und 5% CO<sub>2</sub> Gehalt für 7 Tage belassen. Jegliche Berührungen der Flasche waren zu vermeiden, da sonst die Anheftung der Zellen am Flaschenboden gestört worden wäre.

Nach dem 7. Tag wechselten wir jeden 3. Tag das Nährmedium. Das Zellwachstum wurde mikroskopisch regelmäßig überwacht. Nachdem die Primär-Knochenzellen subkonfluent gewachsen waren, erfolgte die erste Subkultur der Zellen.



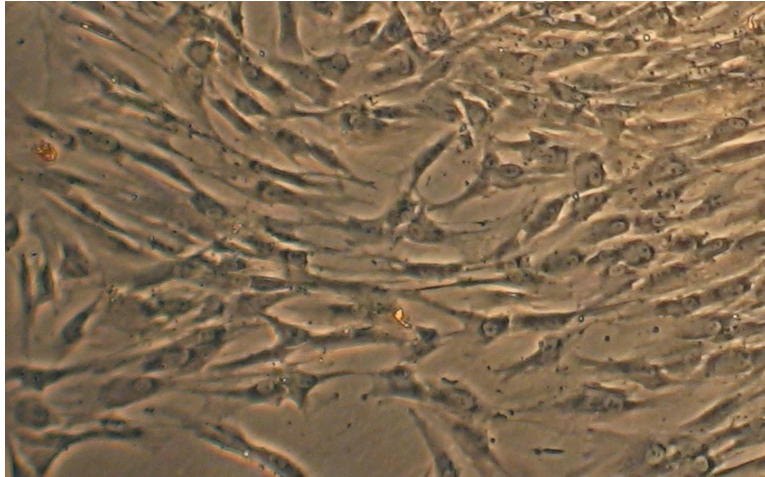
**Abbildung 19:** Wachstum der Knochenzellen nonkonfluent  
(20-fache Vergrößerung, inverses Mikroskop)

### 3.2.3 Erste Subkultur

Um die Knochenzellen vom Boden der Kulturflasche ablösen zu können, mussten das Nährmedium abgesaugt und die Zellen gründlich mit PBS gespült werden. Im Anschluß wurde 1ml Trypsinlösung in die Zellkulturflasche gegeben. Die Trypsinierung erfolgte im Brutschrank unter oben angeführten Bedingungen. Nach 1 Minute wurde das Trypsin abgesaugt und das Ablösen der Zellen mikroskopisch kontrolliert. Durch ein Klopfen an die Unterseite der Kulturflasche lösten sich die Zellen vollständig ab. Der enzymatische Vorgang wurde durch die Zugabe von 4 ml Nährmedium gestoppt.

Das Medium mit den Zellen ist abpipettiert, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 10 Minuten bei 150 G zentrifugiert worden. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 2 ml frischem Medium resuspendiert. Jeweils 1 ml dieser Zelllösung wurde in eine 75 cm<sup>2</sup> große Zellkulturflasche überführt, mit 15 ml Nährmedium aufgefüllt und zum weiteren

Zellwachstum im Inkubator gelagert. Alle 3 Tage ist das Medium gewechselt worden. Sobald die Zellen subkonfluent gewachsen waren, konnte mit dem Verfahren zur Herstellung der 2. Subkultur begonnen werden.



**Abbildung 20:** Subkonfluentes Wachstum der Knochenzellen  
(20-fache Vergrößerung, inverses Mikroskop)

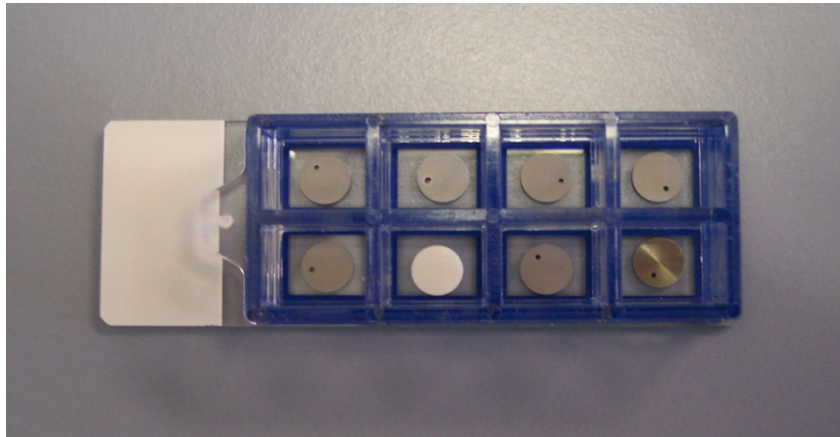
#### 3.2.4 Zweite Subkultur

Die Gewinnung der 2. Subkultur begann analog der 1.. Jedoch wurde das Zellpellet nach dem Zentrifugieren mit 3 ml Nährmedium resuspendiert und je 1 ml aus dem Zentrifugenglas in eine von drei 75 cm<sup>2</sup> Flaschen überführt.

Die drei Flaschen wurden jeweils mit 15 ml Nährmedium aufgefüllt. Es folgte die Überführung in den Brutschrank. Alle 3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Das Zellwachstum wurde bei jedem Mediumwechsel mikroskopisch kontrolliert. Nachdem ein subkonfluentes Wachstum zu beobachten war, konnte der Versuchsaufbau durchgeführt werden.

### 3.2.5 Versuchsvorbereitung

Die Probekörper wurden bei 134 Grad Celsius autoklaviert und analog der Versuchsaufstellung in die 8 Kammern des Lab Tec™ II Chamber Slide™ System eingelegt.



**Abbildung 21:** Chamber Slide mit vorbehandelten Probekörpern

### 3.2.6 Versuchsaufstellung

#### 3. Versuchstag

BSP

|      |      |      |      |
|------|------|------|------|
| PK 1 | PK 2 | PK 3 | PK 4 |
| PK 5 | PK 6 | PK 7 | PK 8 |

TGF- $\beta$

|      |      |      |      |
|------|------|------|------|
| PK 1 | PK 2 | PK 3 | PK 4 |
| PK 5 | PK 6 | PK 7 | PK 8 |

Osteocalcin

|      |      |      |      |
|------|------|------|------|
| PK 1 | PK 2 | PK 3 | PK 4 |
| PK 5 | PK 6 | PK 7 | PK 8 |

Osteonectin

|      |      |      |      |
|------|------|------|------|
| PK 1 | PK 2 | PK 3 | PK 4 |
| PK 5 | PK 6 | PK 7 | PK 8 |

#### 5. Versuchstag

BSP

|      |      |      |      |
|------|------|------|------|
| PK 1 | PK 2 | PK 3 | PK 4 |
| PK 5 | PK 6 | PK 7 | PK 8 |

TGF- $\beta$

|      |      |      |      |
|------|------|------|------|
| PK 1 | PK 2 | PK 3 | PK 4 |
| PK 5 | PK 6 | PK 7 | PK 8 |

Osteocalcin

|      |      |      |      |
|------|------|------|------|
| PK 1 | PK 2 | PK 3 | PK 4 |
| PK 5 | PK 6 | PK 7 | PK 8 |

Osteonectin

|      |      |      |      |
|------|------|------|------|
| PK 1 | PK 2 | PK 3 | PK 4 |
| PK 5 | PK 6 | PK 7 | PK 8 |

#### 7. Versuchstag

BSP

|      |      |      |      |
|------|------|------|------|
| PK 1 | PK 2 | PK 3 | PK 4 |
| PK 5 | PK 6 | PK 7 | PK 8 |

TGF- $\beta$

|      |      |      |      |
|------|------|------|------|
| PK 1 | PK 2 | PK 3 | PK 4 |
| PK 5 | PK 6 | PK 7 | PK 8 |

Osteocalcin

|      |      |      |      |
|------|------|------|------|
| PK 1 | PK 2 | PK 3 | PK 4 |
| PK 5 | PK 6 | PK 7 | PK 8 |

Osteonectin

|      |      |      |      |
|------|------|------|------|
| PK 1 | PK 2 | PK 3 | PK 4 |
| PK 5 | PK 6 | PK 7 | PK 8 |

#### 10. Versuchstag

BSP

|      |      |      |      |
|------|------|------|------|
| PK 1 | PK 2 | PK 3 | PK 4 |
| PK 5 | PK 6 | PK 7 | PK 8 |

TGF- $\beta$

|      |      |      |      |
|------|------|------|------|
| PK 1 | PK 2 | PK 3 | PK 4 |
| PK 5 | PK 6 | PK 7 | PK 8 |

Osteocalcin

|      |      |      |      |
|------|------|------|------|
| PK 1 | PK 2 | PK 3 | PK 4 |
| PK 5 | PK 6 | PK 7 | PK 8 |

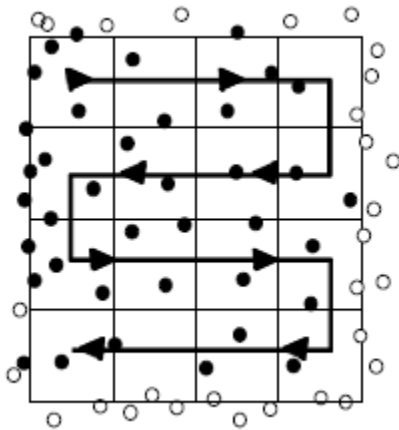
Osteonectin

|      |      |      |      |
|------|------|------|------|
| PK 1 | PK 2 | PK 3 | PK 4 |
| PK 5 | PK 6 | PK 7 | PK 8 |

**Tabelle 2:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

### 3.2.7 Versuchsbeginn

Zuerst erfolgte die Trypsinierung der 2. Subkultur, wie unter Punkt 2.2.3 beschrieben. Nach dem Zentrifugieren und Verwerfen des Überstandes wurden die Proben mit 5ml Nährmedium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zelldichte kam eine Neubauer Zählkammer zum Einsatz.



**Abbildung 22:** Auszählalgorithmus der Zellen (schwarz) in einem großen Quadrat der Zählkammer

Für den Versuch wurde die Zellsuspension bis zu einem Wert von 2000 Zellen auf 500  $\mu$ l mit Nährmedium verdünnt. Im Folgenden wurden je 500 $\mu$ l der Verdünnungsreihe in jede der 8 Kammern der Chamber Slides hinzugegeben. Insgesamt wurden 16 Chamber Slides mit je 8 Prüfkörpern hergestellt.

Danach kamen die Slides in den Brutschrank. Jeden 2. Tag erfolgte ein Nährmediumwechsel, um ein ideales Zellwachstum zu ermöglichen. Am 3. Versuchstag wurden die ersten vier Kammern entnommen.

### 3.2.8 Histochemische Untersuchung der Knochenwachstumsmarker ON, OC, BSP und TGF- $\beta$

Am jeweils 3., 5., 7. und 10. Versuchstag wurden die Chamber Slides mit den Prüfkörpern für die entsprechende Untersuchung mit den Markern BSP, ON, OC und TGF- $\beta$  aus dem Brutschrank entnommen und wie folgt weiterbehandelt.

Zuerst erfolgte eine Fixation mit 4%igem Paraformaldehyd auf einem Schüttler mit vorangegangenem Absaugen des NM. Das Paraformaldehyd wurde abgesaugt und die Probekörper jeweils viermal für fünf Minuten mit frischem PBS gespült. Die Probekörper für Osteonectin wurden analog den anderen, jedoch statt mit PBS, mit Hepes-Puffer gespült.

Das weitere Vorgehen fand unter Lichtausschluss statt. Die Probekörper wurden zur Blockung unspezifischer Reaktionen mit 10 %igem Ziegennormalserum für 60 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Serum wieder abpipetiert. Zu allen Probekörpern des entsprechenden Chamber Slides kamen daraufhin die mit PBS auf 1:100 verdünnten monoklonalen Primärantikörper zu Osteocalcin, der ebenso entsprechend verdünnte monoklonale anti-human-BSP-Antikörper und der ebenfalls verdünnte monoklonale Mouse Anti-Human TGF- $\beta$ -1-Antikörper.

Der monoklonale Antikörper für Osteonection wurde mit HEPES auf 1:100 verdünnt und auf die zu untersuchenden Probekörper gegeben. Danach erfolgte die Überführung aller Slides in einen Kühlschrank. Nach Ablauf von 16 Stunden wurden die Slides aus dem Kühlschrank entnommen und die AK im Anschluss abpipetiert. Nach 3 Spülvorgängen a 5 Minuten mit PBS oder PBS bei ON bestand der nächste Schritt aus der Markierung mit dem Sekundärantikörper Cy<sup>TM</sup> 3-konjugiertes Ziegen Anti-Maus IgG (H+L).

Dieser wurde für Osteonection mit HEPES und für BSP, Osteocalcin, TGF- $\beta$  mit PBS auf 1:200 verdünnt. Im Anschluss folgte eine 30-minütige lichtgeschützte Inkubation auf dem Rüttler.

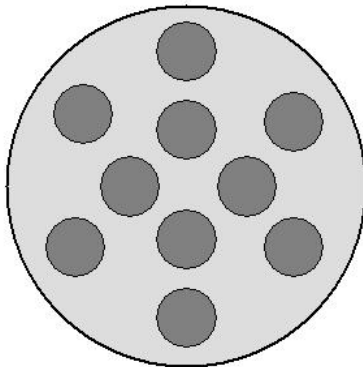
Im folgenden Schritt wurden die Probekörper für BSP, Osteocalcin, TGF- $\beta$  dreimal für 5 Minuten mit PBS gespült. Die Spülung der Probekörper für Osteonection erfolgte mit Hepes. Anschließend wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Hierfür wurde ein mg DAPI in einem ml absolutem unvergälltem Alkohol gelöst, um eine Stammlösung zu gewinnen. Die Stammlösung wurde mit PBS auf 1:1000 verdünnt und danach 1 Minute auf den Probekörpern mit den entsprechenden Markern lichtgeschützt inkubiert.

Nachfolgend wurden die Probekörper mit Osteocalcin, BSP und TGF- $\beta$  zweimal für 5 Minuten mit PBS und zweimal für 5 Minuten mit destilliertem Wasser gespült. Danach sind alle Probekörper mit Fluoreszenzmedium eingedeckt und mit einem Deckgläschen bedeckt worden. Bis zur Auswertung erfolgte die Lagerung der Probekörper im Kühlschrank bei 4°C.



### 3.2.9 Zellzählung

Für jeden Versuchstag standen 4 präparierte Objektträger mit jeweils 8 Probekörpern zur Verfügung. Insgesamt wurden an jedem Tag des Versuches 32 Probekörper ausgewertet. Unter zu Hilfenahme des TRITC-Filter konnte fluoreszenzoptisch die Expression der genannten Marker dargestellt werden. Die Messung wurde mit 200-facher Vergrößerung an je 10 Messpunkten pro Probekörper durchgeführt.



**Abbildung 23:** Zählchema mit Zählfeldgröße 440 x 330 Mikrometer

Sechs der Messfelder waren im randnahen und vier im zentral gelegenen Bereich des Probekörpers situiert. Die für den Versuch nötigen Bilder wurden mit der digitalen Kamera Axio Cam über eine Mehrkanalaufnahme aufgezeichnet. Unter Verwendung der Software AxioVision wurden für jedes Messfeld die Belichtungszeit (red), der Grauwert (red), im Rahmen der Untersuchung für die Osteogenese bestimmt.

### 3.2.10 Grauwertanalyse

Zur Bestimmung des Grauwertes jedes aufgenommenen Bildes kam ein Referenzrahmen zum Einsatz, welcher jedem Bild eingefügt wurde. Für die Fläche von 440 x 330  $\mu\text{m}$  errechnete das Programm Axiovision 4.5 den Grauwert, welcher von der Belichtungszeit abhängt. AxioVision arbeitet mit einer automatischen Belichtungszeit, die dokumentiert wird. Da die Fluorochrome umso mehr fluoreszieren, je länger sie vom Licht angeregt werden, ist der Grauwert umso kleiner bei kurzer Belichtungszeit und vergrößert sich bei langer Belichtungszeit. Der relative Grauwert (rot) wurde aus dem Quotient aus absolutem Grauwert und Belichtungszeit (rot) errechnet. Die Verwaltung aller gesammelten Daten und die grafische Darstellung erfolgte mit Hilfe des Programmes MS Exel 2007.

### 3.2.11 Statistische Auswertung

Unter Zuhilfenahme des relativen Grauwertes (rot) ist es möglich, die Markerexpression zu quantifizieren bzw. sichtbar zu machen. Nach Ermittlung des relativen Grauwertes (rot) wurde eine Signifikanztestung wie folgt durchgeführt:

1. Fragestellung:

Unterscheiden sich die Kennwerte (Markerexpression) zwischen verschiedenen Probekörpern zu einem bestimmten Tag?

2. Testmethode:

Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-U-Test

3. Signifikanz/Testung:

Wie groß ist die Irrtumswahrscheinlichkeit, wenn wir von einem Unterschied in der Grundgesamtheit (global; alle Männer unter 40 Jahren) ausgehen?

Üblich ist ein Signifikanzniveau von 5 %.

Zunächst wurde mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests ermittelt, ob es insgesamt signifikante Unterschiede gibt, bevor mit dem Mann-Whitney-U-Test in Einzelvergleichen geprüft wurde, welche Probekörper sich speziell bezüglich der untersuchten Parameter unterscheiden. Getestet wird jeweils die Nullhypothese: Es gibt keine Unterschiede.

Wenn sich ein signifikantes Ergebnis zeigt, dann bedeutet das: Die Nullhypothese muss verworfen werden, es gibt Unterschiede. Das gilt für alle  $p < 0,05^*$ . Meistens wird gelten: Je ähnlicher die Mittelwerte, desto unwahrscheinlicher sind Signifikanzen. Bei nichtparametrischen Tests kann es Ausnahmen geben, wenn extreme Ausreißer vorkommen (diese könnten auf Messfehlern beruhen). Da die verwendeten Tests auf Rangplätzen beruhen, gehen Ausreißer nur mit ihrem Rangplatz in die Berechnung ein, nicht mit dem großen metrischen Abstand.

Beim U-Test werden zwei Signifikanzen ausgegeben: mit und ohne Korrektur für Bindungen (engl. ties). Da Bindungen (gleiche Rangplätze) einen Hinweis auf geringe Unterschiede darstellen, ist es in der Regel sinnvoll, die Korrektur für Bindungen

durchzuführen (asymptotische Signifikanz). Meist kommt man ohnehin zur gleichen Schlussfolgerung.

Je geringer die Fallzahl (Zahl der Messungen oder Probanden etc.), desto größer/deutlicher müssen Unterschiede sein, um signifikant zu werden. Je größer die Fallzahl, desto eher werden auch kleine Unterschiede signifikant. Der durchgeführte Kruskal-Wallis-Test liefert zu jedem getesteten Zeitpunkt (3., 5., 7. und 10. VT) ein signifikantes Ergebnis (Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$ ). Daraus folgt, dass es insgesamt signifikante Unterschiede zwischen den Probekörpern hinsichtlich der getesteten Parameter gibt.

Die Resultate des U-Tests werden im folgenden Ergebnisteil dieser Arbeit übersichtshalber im Zusammenhang mit der grafischen Aufarbeitung der allgemeinen Ergebnisse dargestellt.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Ergebnisse der Markerexpression**

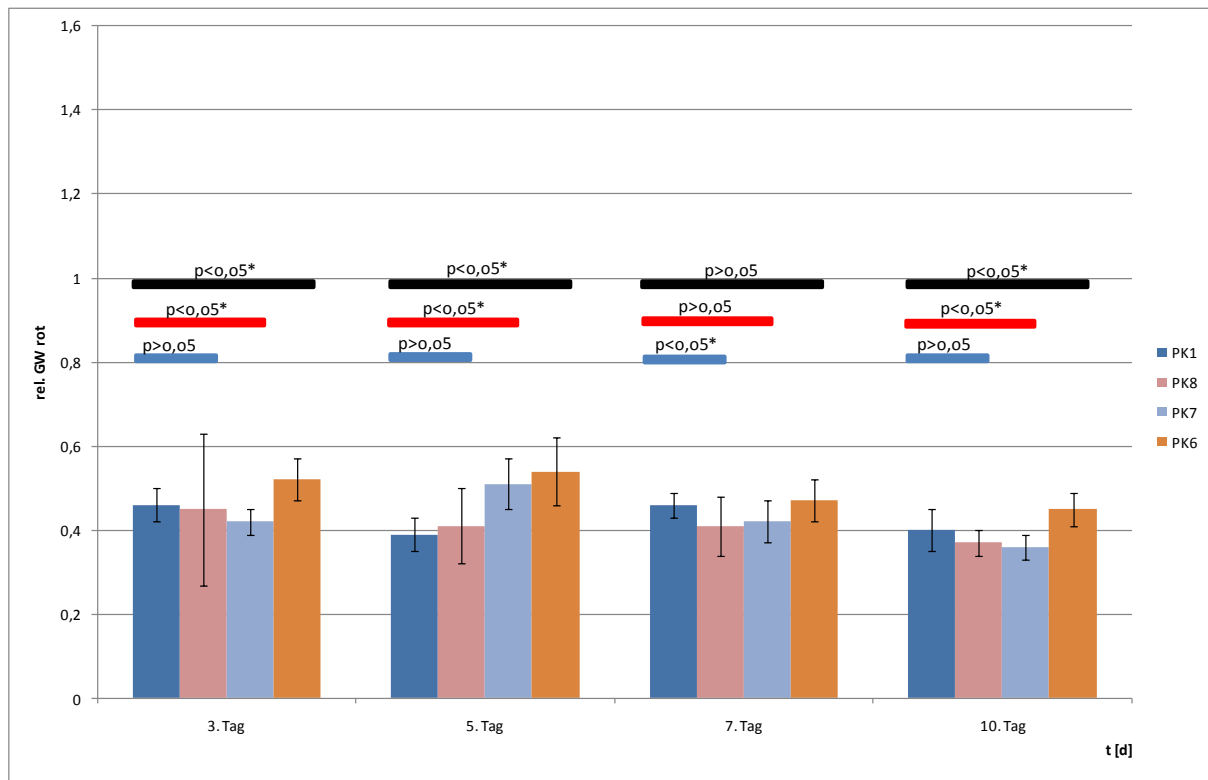
In der folgenden quantitativen Auswertung wird jede Experimentaloberfläche auf die Expression der Knochenmarker BSP, OC, ON und TGF- $\beta$  untersucht und mit den entsprechenden Signifikanzen den Standardoberflächen 6, 7 und 8 gegenübergestellt.

Diese werden jeweils gefolgt von einer zusammenfassenden Darstellung der Expression der genannten Knochenmarker auf allen Probekörpern.

Der Anfangs- und Endpunkt der horizontal über dem Säulendiagramm dargestellten Balken markiert die jeweils auf Signifikanz untersuchten Probekörper.

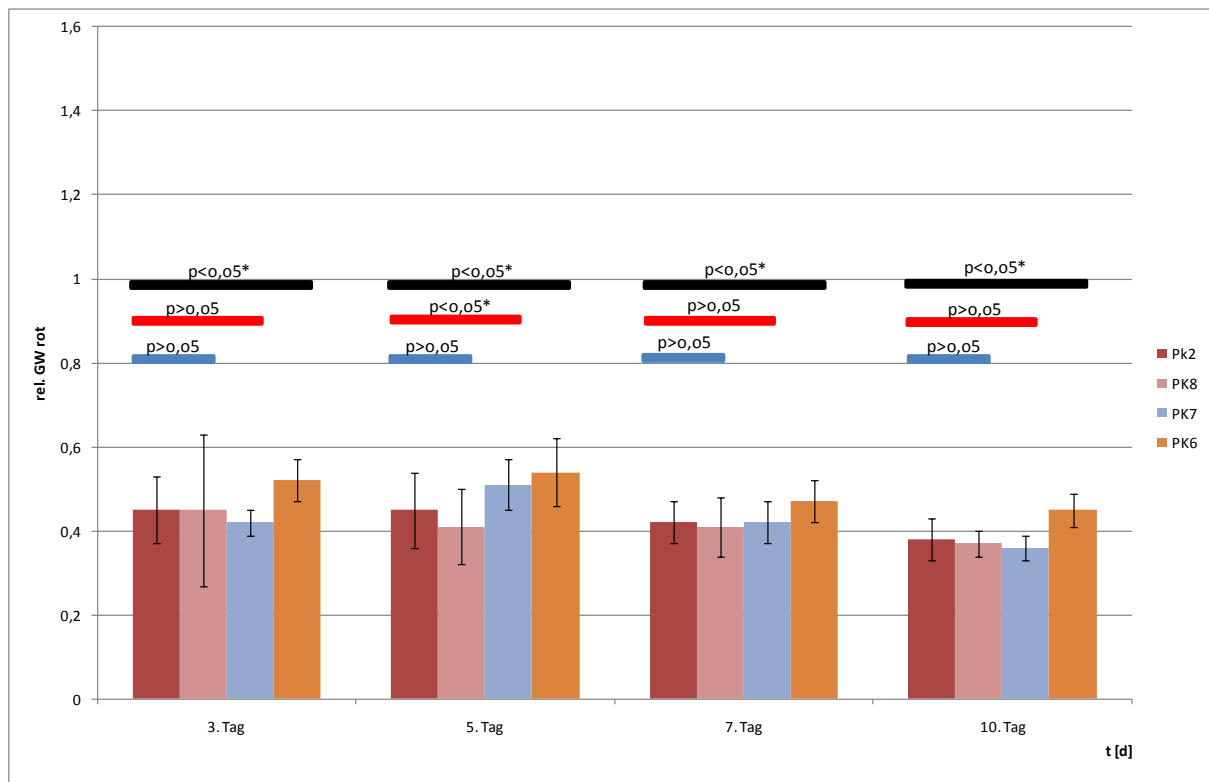
Das entsprechende Ergebnis des U-Tests ist mit  $p < 0,05^*$  (signifikant) oder  $p > 0,05$  (nicht signifikant) über dem jeweiligen Balken vermerkt.

### 4.1.1 Quantitative Auswertung der BSP-Expression



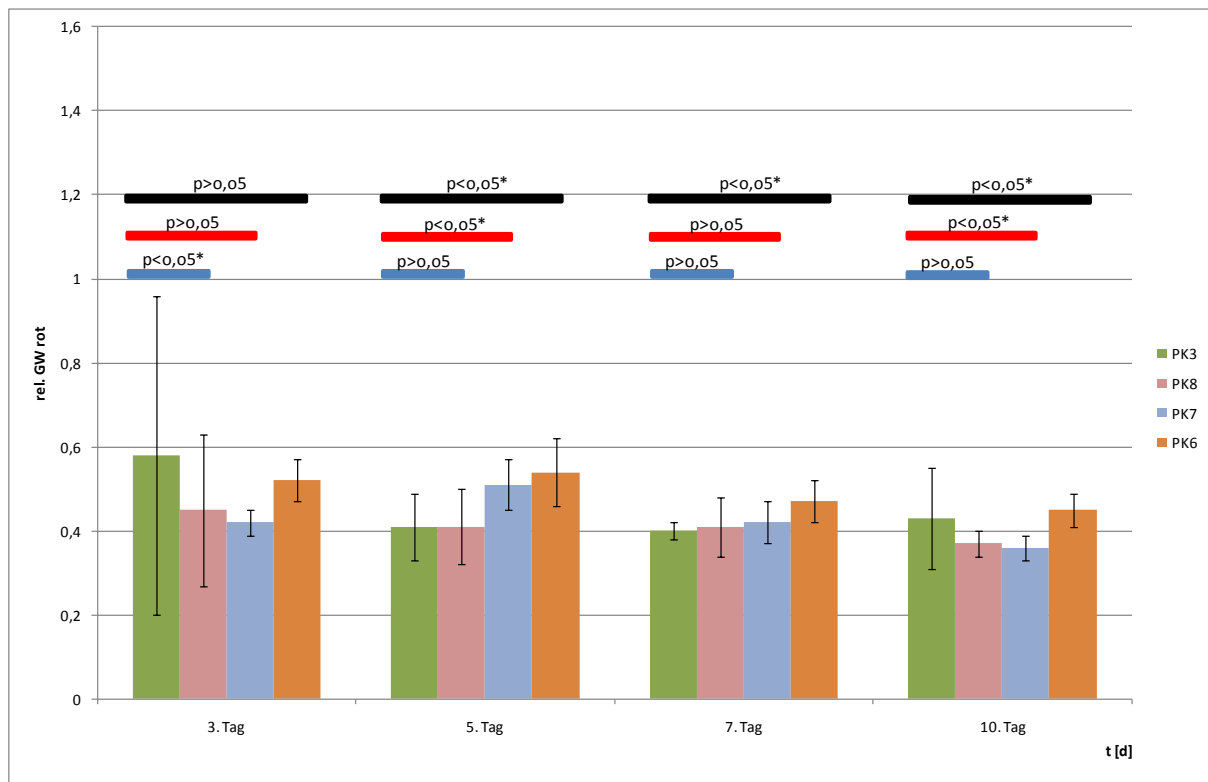
**Diagramm 1:** Expression von BSP (fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen/als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10-tägiger in vitro Testung, auf der Experimentaloberfläche PK1 im Vergleich mit den ermittelten Werten auf den Positivstandards PK6 und PK7 sowie des Negativstandards PK8. [ $p < 0,05^*$  (signifikant) und  $p > 0,05$  (nicht signifikant)]

Vergleicht man die Werte der BSP-Expression des PK1 mit denen der Positivstandards, so stellt man fest, dass PK1 über die nahezu vollständige Versuchsdauer, außer am 7. VT, signifikante Ergebnisse im Vergleich mit PK6 und PK7 erzielt. Im Gegenzug lassen sich im Vergleich der Werte zwischen PK1 und dem Negativstandard bis auf den 7. VT keine Unterschiede ermitteln. Dabei zeichnet sich ab, dass sich die Expression von BSP auf PK1 umgekehrt proportional im Vergleich zu PK6 und PK7 darstellt. D.h., während die Werte auf PK6 und PK7 vom 3. auf den 5. VT steigen, sinken die Werte auf PK1. Dieser Vorgang wiederholt sich vom 5. auf den 7. VT in umgekehrter Weise. Somit ist für PK1 ein weitestgehend differentes Verhalten -im Bezug auf die BSP-Expression- verglichen mit den Positivstandards feststellbar. Die BSP-Expression nimmt über die Zeit gesehen bei allen vier Probekörpern ab. Die Oberfläche auf PK1 induziert sowohl am 3. VT als auch am 7. VT eine vorläufig maximale BSP-Expression. Ein vorläufiges Minimum ist am 5. VT zu verzeichnen.



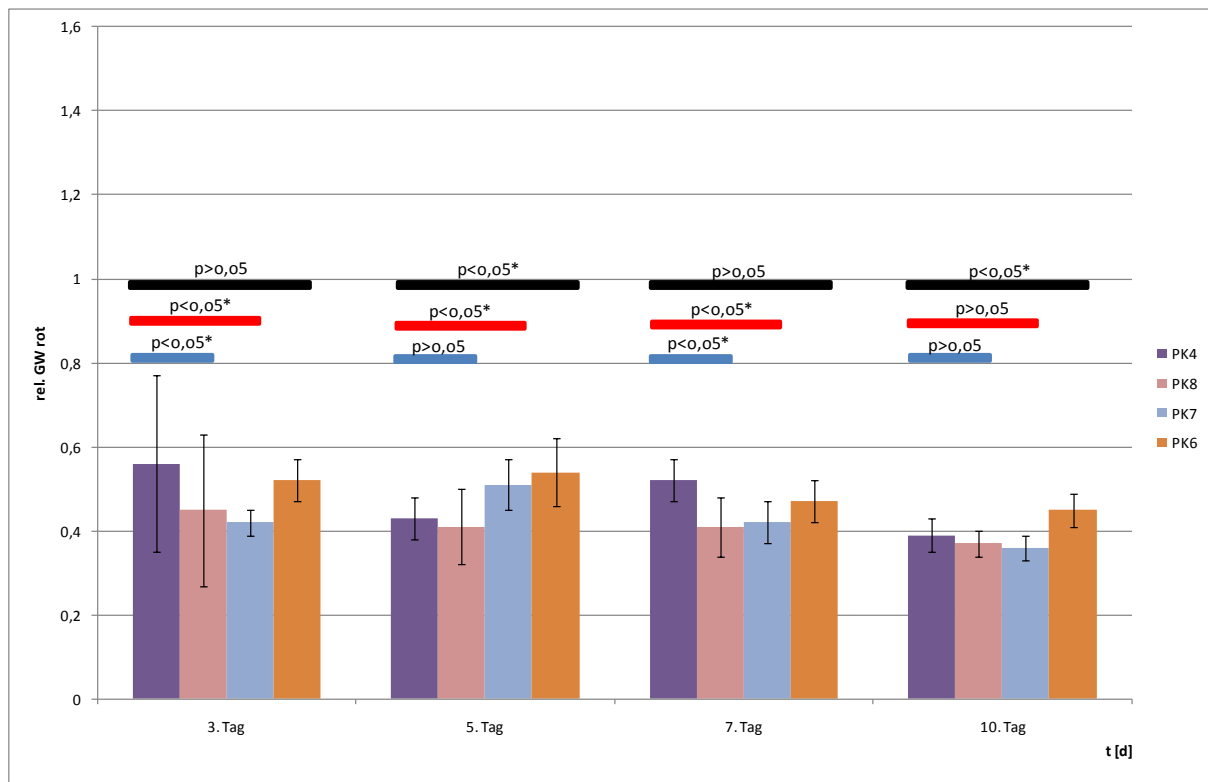
**Diagramm 2:** Expression von BSP (fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen/als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10-tägiger in vitro Testung, auf der Experimentaloberfläche PK2 im Vergleich mit den ermittelten Werten auf den Positivstandards PK6 und PK7 sowie des Negativstandards PK8. [ $p < 0,05^*$  (signifikant) und  $p > 0,05$  (nicht signifikant)]

Die auf PK2 gemessene BSP-Expression ist zu den auf PK7 und PK8 ermittelten Werten nahezu identisch (Ausnahme PK7 am 5. VT). Jedoch ergeben sich über die vollständige Versuchsdauer signifikante Unterschiede zu den Werten auf PK6. Somit sind starke Ähnlichkeiten zwischen PK2 und dem metallenen Positivstandard sowie dem Negativstandard im Bezug auf die Expression von BSP zu vermuten. Die BSP-Expression ist in diesem Vergleich bei PK6 stets höher als bei PK2, PK7 und PK8, nimmt jedoch ebenfalls zum Versuchende ab. Das vorläufige Maximum der BSP-Expression wird auf PK2 bereits am 5. VT erreicht. Das vorläufige Minimum liegt zum Versuchsende an.



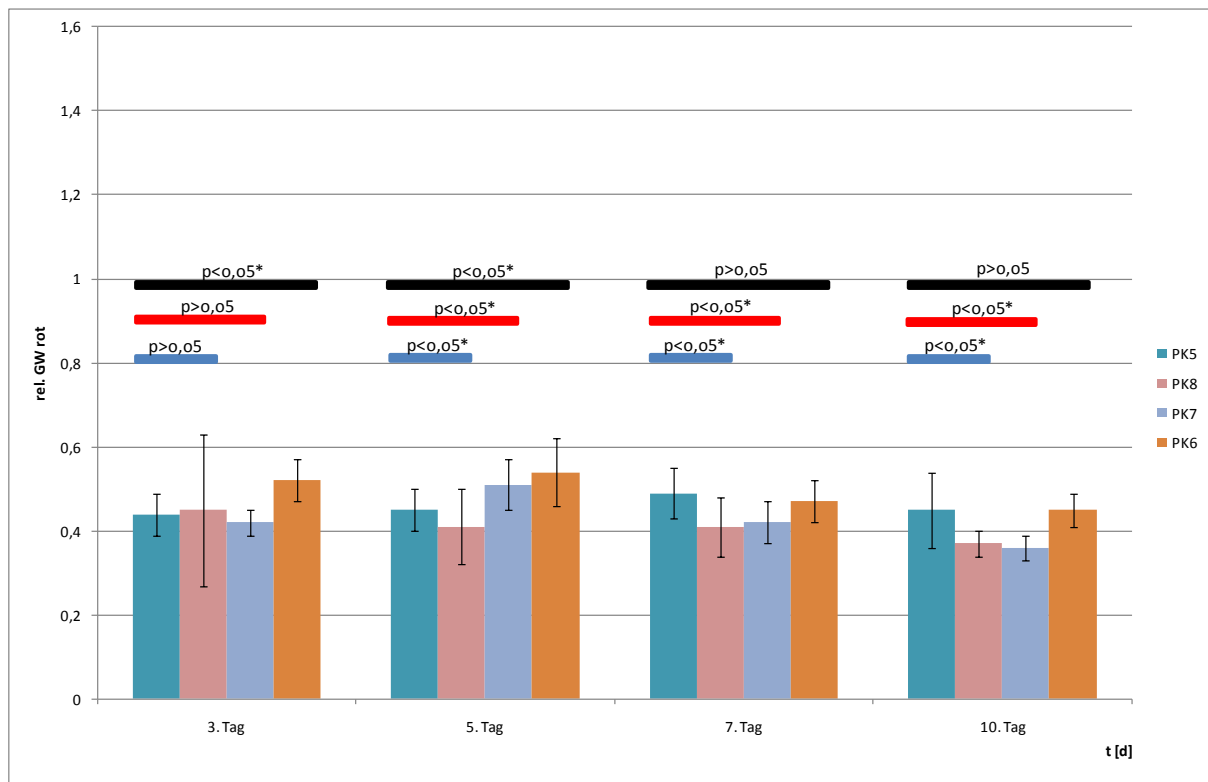
**Diagramm 3:** Expression von BSP (fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen/als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10-tägiger in vitro Testung, auf der Experimentaloberfläche PK3 im Vergleich mit den ermittelten Werten auf den Positivstandards PK6 und PK7 sowie des Negativstandards PK8. [ $p < 0,05^*$  (signifikant) und  $p > 0,05$  (nicht signifikant)]

Die zur Bestimmung der BSP-Expression auf PK3 ermittelten Werte sind zum Versuchsbeginn nicht signifikant zu denen der Positivstandards, jedoch signifikant zu denen des Negativstandards. Ein gegenläufiges Ergebnis zeigt sich am 5. und 10. VT. An diesen Versuchstagen liegen signifikante Werte im Vergleich zu den Positivstandards vor. Am 7. VT sind Signifikanzen nur zwischen den Messwerten von PK3 und PK6 feststellbar. Ein vorläufiges Maximum der BSP-Expression ist auf PK3 bereits am 3. VT erreicht. Die BSP-Expression scheint sich auf PK3 früher als auf PK6 und PK7 zu verringern. Bereits am 5. VT kommt es zu einer deutlichen Verringerung der Messwerte. Jedoch steigt die Expression von BSP auf der PK3 vom 7. VT auf den 10. VT wieder leicht an. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass einzig auf PK3 ein Anstieg der BSP-Expression gegen Versuchsende zu verzeichnen ist. Durch den Vergleich der Messwerte wird deutlich, dass PK3 im Bezug auf die BSP Expression dem Negativstandard am ähnlichsten ist. Die größten Unterschiede sind im Vergleich zum keramischen Positivstandard zu verzeichnen. Der metallene Positivstandard nimmt in diesem Zusammenhang eine Mittelstellung ein. Der PK3 erreicht ein vorläufiges Maximum am 3. VT und ein vorläufiges Minimum am 7. VT.



**Diagramm 4:** Expression von BSP (fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen/als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10-tägiger in vitro Testung, auf der Experimentaloberfläche PK4 im Vergleich mit den ermittelten Werten auf den Positivstandards PK6 und PK7 sowie des Negativstandards PK8. [ $p < 0,05^*$  (signifikant) und  $p > 0,05$  (nicht signifikant)]

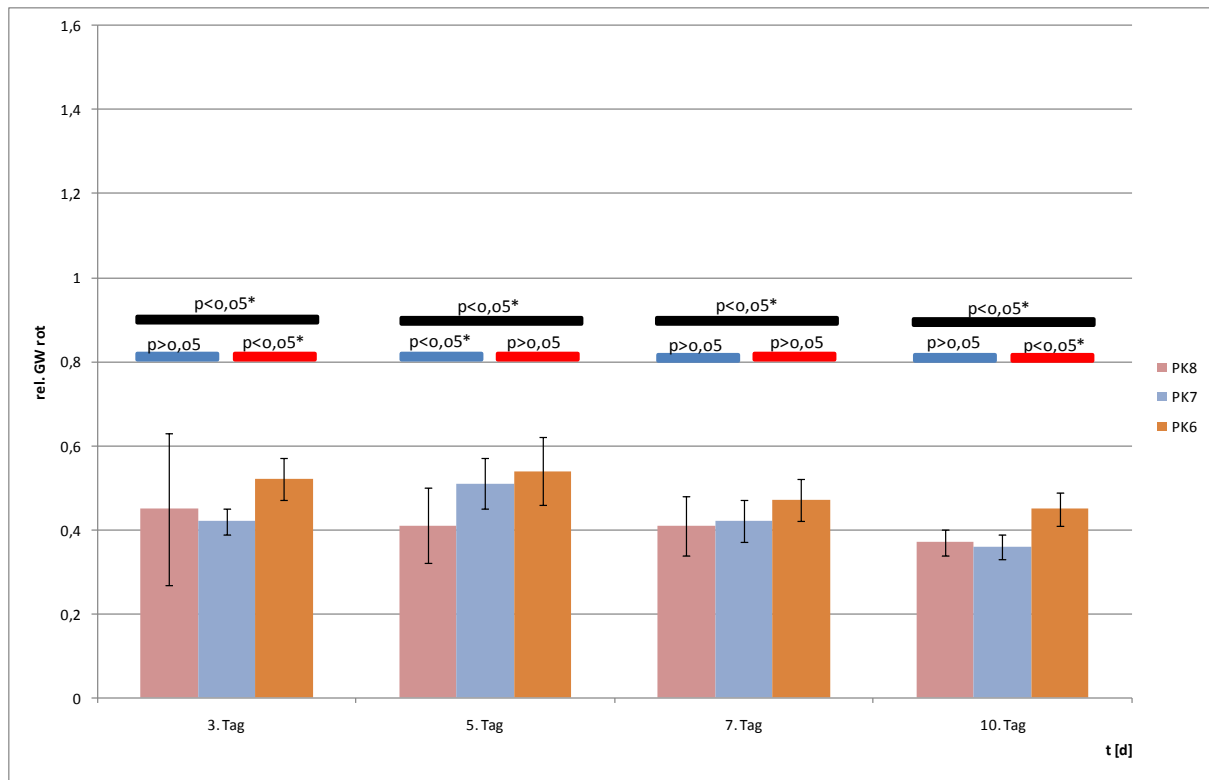
Die BSP-Expression auf PK4 ist am 3. und 7. VT nicht signifikant zu den Werten auf PK6. Jedoch ergeben sich an diesen Tagen Signifikanzen zu den auf PK8 gemessenen Werten. Im Vergleich zu den erhobenen Messwerten auf PK7 liegen, ausgenommen zum Versuchsende, signifikante Ergebnisse vor. Während auf PK4 und PK8 bereits am 3. VT ein vorläufiges Maximum gemessen werden kann, ist dieses bei PK6 und PK7 erst am 5. VT der Fall. Dabei ist festzustellen, dass sich die Expression von BSP auf PK4 umgekehrt proportional im Vergleich zu PK6 und PK7 darstellt. D.h., während die Expressionswerte auf PK6 und PK7 vom 3. auf den 5. VT steigen, sinken die Werte für PK4. Dieser Vorgang wiederholt sich vom 5. auf den 7. VT in umgekehrter Weise. Somit ist für PK4 ein weitestgehend differentes Verhalten -in Bezug auf die BSP-Expression- verglichen mit PK6, 7 und 8 festzustellen. Die ermittelten Werte nehmen jedoch bei allen vier Probekörpern gegen Versuchsende hin ab. Auf PK4 konnten über die Versuchsdauer summiert die höchsten Messwerte im Bezug auf die BSP-Expression aller Experimentaloberflächen ermittelt werden.



**Diagramm 5:** Expression von BSP (fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen/als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10-tägiger in vitro Testung, auf der Experimentaloberfläche PK5 im Vergleich mit den ermittelten Werten auf den Positivstandards PK6 und PK7 sowie des Negativstandards PK8. [ $p < 0,05^*$  (signifikant) und  $p > 0,05$  (nicht signifikant)]

Die Werte der BSP-Expression auf PK5 sind zum Versuchsbeginn nicht signifikant zu denen von PK7 und PK8. Im Vergleich zu den Werten von PK6 sind am 3. VT Signifikanzen zu verzeichnen. Am 5. VT ergeben sich im Vergleich zu beiden Positivstandards und dem Negativstandard signifikante Ergebnisse. Dieses setzt sich für PK8 und PK7 für die weiteren Versuchstage fort. Die Messwerte des keramischen Positivstandards sind ab dem 7. VT, verglichen mit den Werten auf PK5, nicht signifikant. Ein vorläufiges Maximum an BSP-Expression erreicht PK5 am 7. VT. Das vorläufige Minimum liegt am 3. VT an. Die Messwerte nehmen bei allen vier Probekörpern gegen Versuchende hin ab. Im Vergleich zur BSP-Expression aller anderen Probekörper wird deutlich, dass die Messwerte für PK5 am stabilsten über die komplette Versuchsdauer sind. D.h., PK5 induziert eine vergleichsweise konstant hohe Menge an BSP. Anhand der Werte lässt sich feststellen, dass die Oberfläche auf PK5 -bezüglich der BSP-Expression- nach der Startphase, Ähnlichkeiten zum keramischen Positivstandard aufweist.

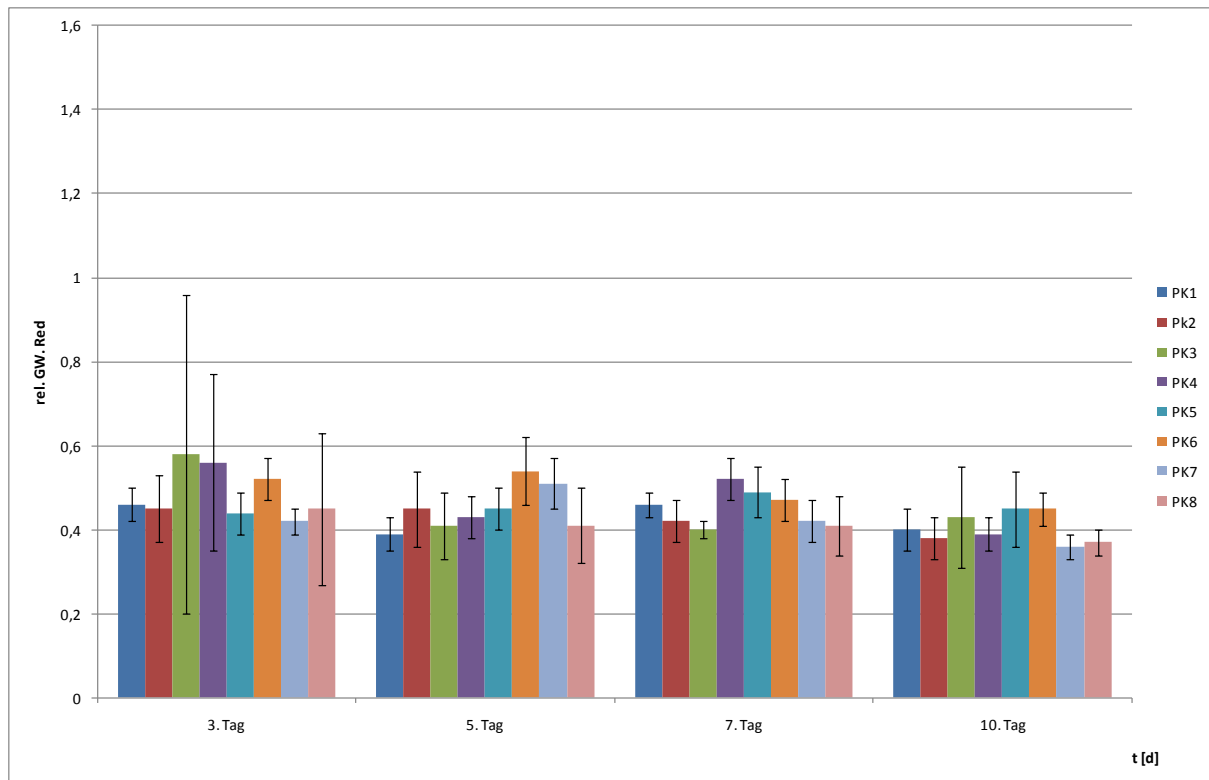




**Diagramm 6:** Expression von BSP (fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen/als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10-tägiger in vitro Testung, auf dem Negativstandard PK8 im Vergleich mit den ermittelten Werten auf den Positivstandards PK6 und PK7. [ $p < 0,05^*$  (signifikant) und  $p > 0,05$  (nicht signifikant)]

Der Vergleich des keramischen Positivstandards mit dem Negativstandard zeigen sich über den gesamten Versuchsverlauf signifikante Ergebnisse. Zwischen den Messwerten des metallenen Positivstandards und denen des Negativstandards sind nur am 5. VT Signifikanzen feststellbar.

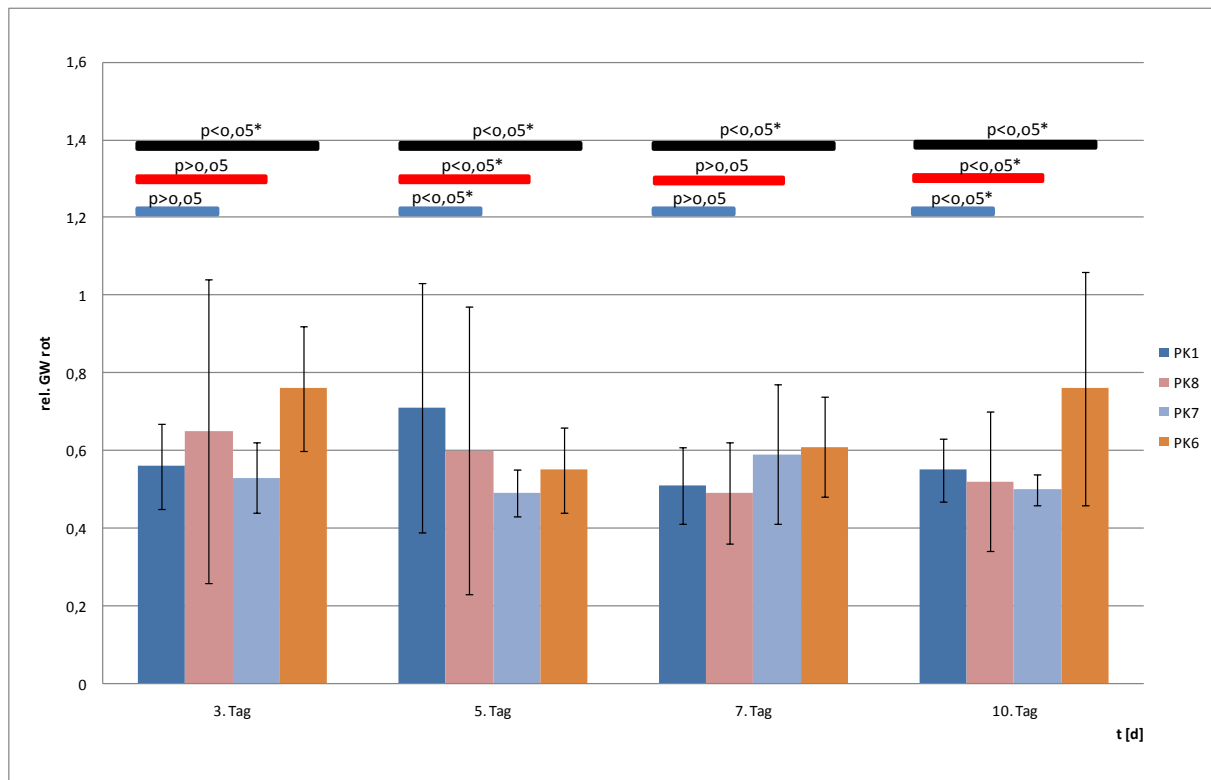
Dabei nimmt die BSP-Expression bei allen drei Probekörpern zum Versuchsende ab, ist jedoch bei PK6 immer deutlich höher als bei PK8 und PK7. Während auf PK6 und PK7 am 5. VT ein Maximum erreicht wird, liegt dieses bei PK8 bereits am 3. VT an. Das Minimum auf PK6, PK7 und PK8 konnte am 10. VT ermittelt werden.



**Diagramm 7:** Grafische Darstellung der Expression von BSP (fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen/als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10-tägiger in vitro Testung auf allen Probekörpern.

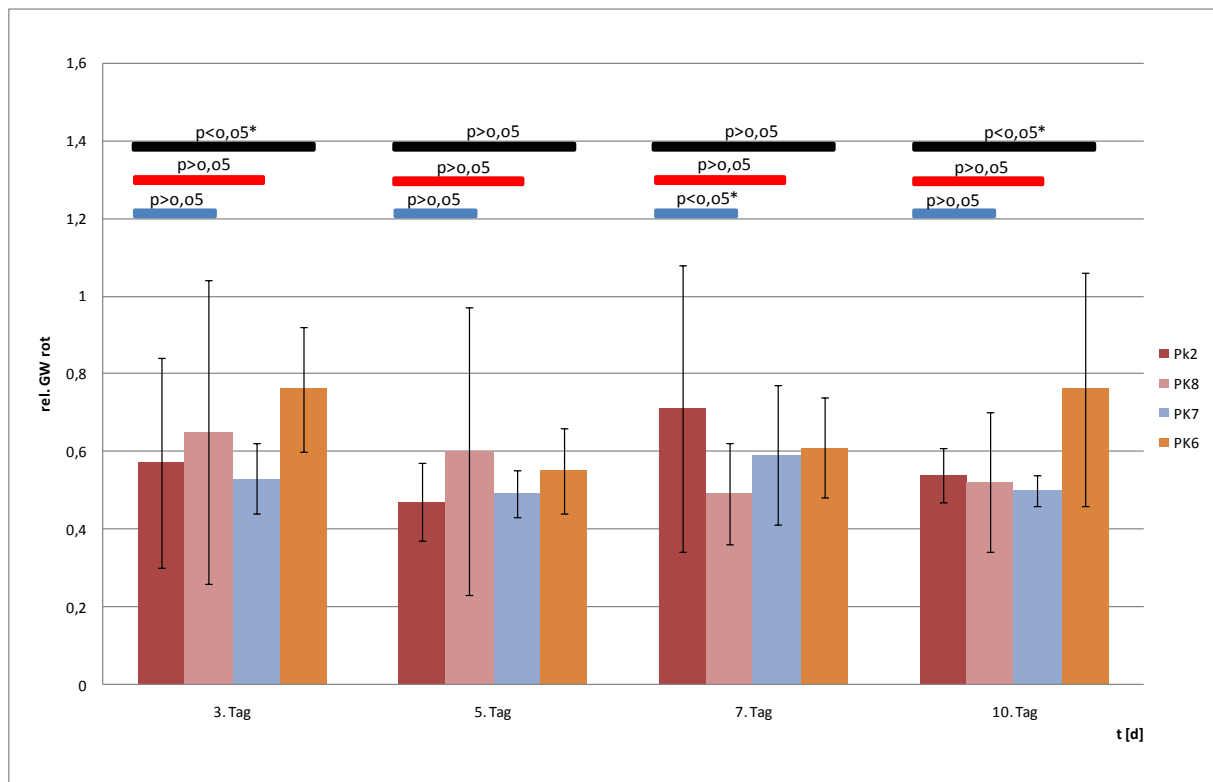
Zu beobachten ist eine erhöhte systemische Streuung der BSP-Messwerte am 3. VT, gefolgt von einem Anstieg der Werte am 5. VT, sowie einer Plateau-Phase am 7. VT und einem Abfall der Werte zum 10. VT hin. Auf allen Oberflächen, außer der auf PK3, sinken die Messwerte vom 7. auf den 10. VT. PK3 weist zudem ein weitestgehend antizyklisches Verhalten gegenüber dem Rest der Probekörper auf. So fallen die Werte auf dieser Oberfläche vom 3. VT bis zum 7. VT kontinuierlich ab und steigen zum 10. VT wieder an. Die Oberflächen auf Probekörper 1-4 und 8 induzieren bereits am 3. VT ihr vorläufiges Maximum an BSP. Auf PK6 und PK7 liegt das vorläufige Maximum am 5. VT an. PK5 exprimiert seine vorläufig maximale BSP-Konzentration am 7. VT. Auf PK4 konnte während der gesamten Versuchsdauer summiert die höchste Menge an BSP aller Experimentalprobekörper ermittelt werden. Eine Sonderstellung nimmt PK6 ein. Die Oberfläche folgt dem systemischen Verlauf, exprimiert dabei jedoch summiert die höchste Menge an BSP im Vergleich aller Probekörper.

### 4.1.2 Quantitative Auswertung der Osteocalcin-Expression



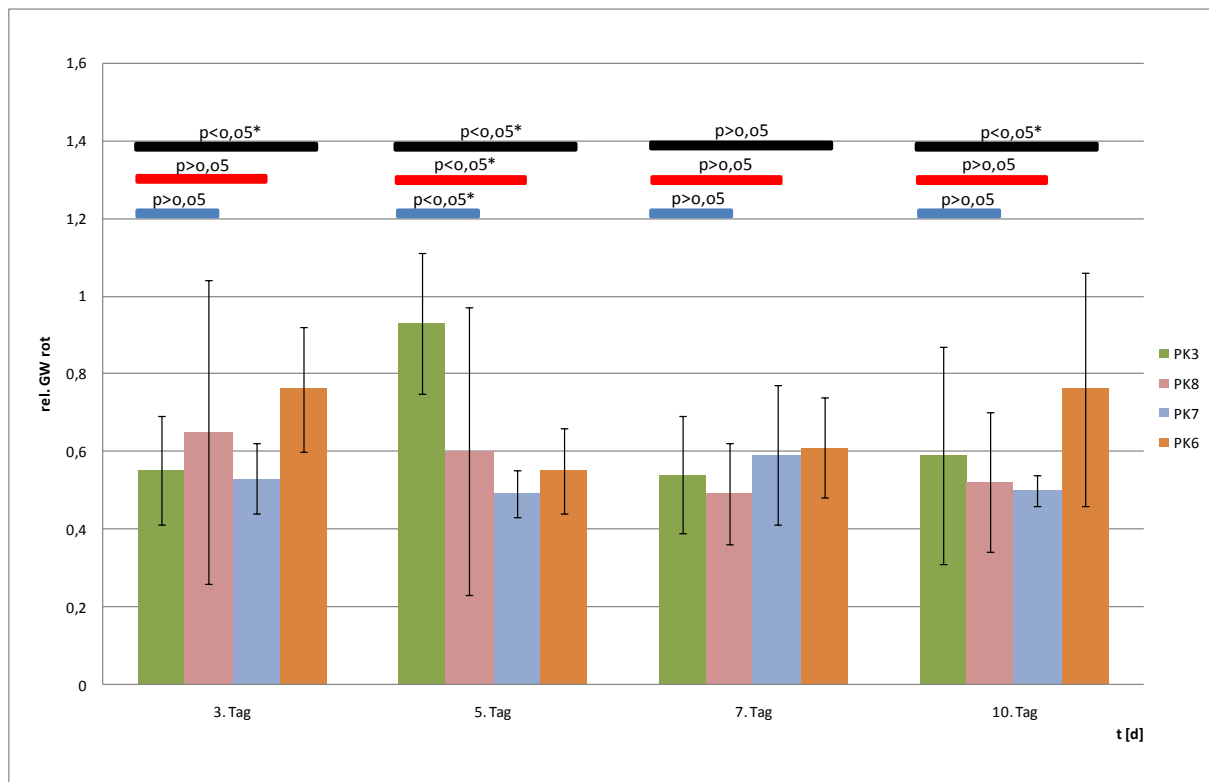
**Diagramm 8:** Expression von Osteocalcin (fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen/als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10-tägiger in vitro Testung, auf der Experimentaloberfläche PK1 im Vergleich mit den ermittelten Werten auf den Positivstandards PK6 und PK7 sowie des Negativstandards PK8. [ $p < 0,05^*$  (signifikant) und  $p > 0,05$  (nicht signifikant)]

Auf der Oberfläche des PK1 ist ein vorläufiges Maximum an OC am 5. VT zu verzeichnen, während die Werte am 7. VT auf ein vorläufiges Minimum sinken und zum Versuchsende wieder ansteigen. Dabei sind die Messwerte des PK1 über die vollständige Versuchsdauer signifikant zu denen des keramischen Positivstandards. Im Vergleich zum PK7 und PK8 ergeben sich am 5. und am 10. VT signifikante Ergebnisse. Bei näherer Betrachtung der OC-Expression auf PK1 und PK6 stellt man ein gegenläufiges Verhalten vom 3. bis zum 7. VT fest. Die Werte auf PK1 steigen vom 3. auf den 5. VT, während die OC-Expression auf PK6 in diesem Zeitraum sinkt. Vom 5. auf den 7. VT kommt es zu einem umgekehrten Prozess. Jedoch steigen die Werte für beide zum Versuchsende an.



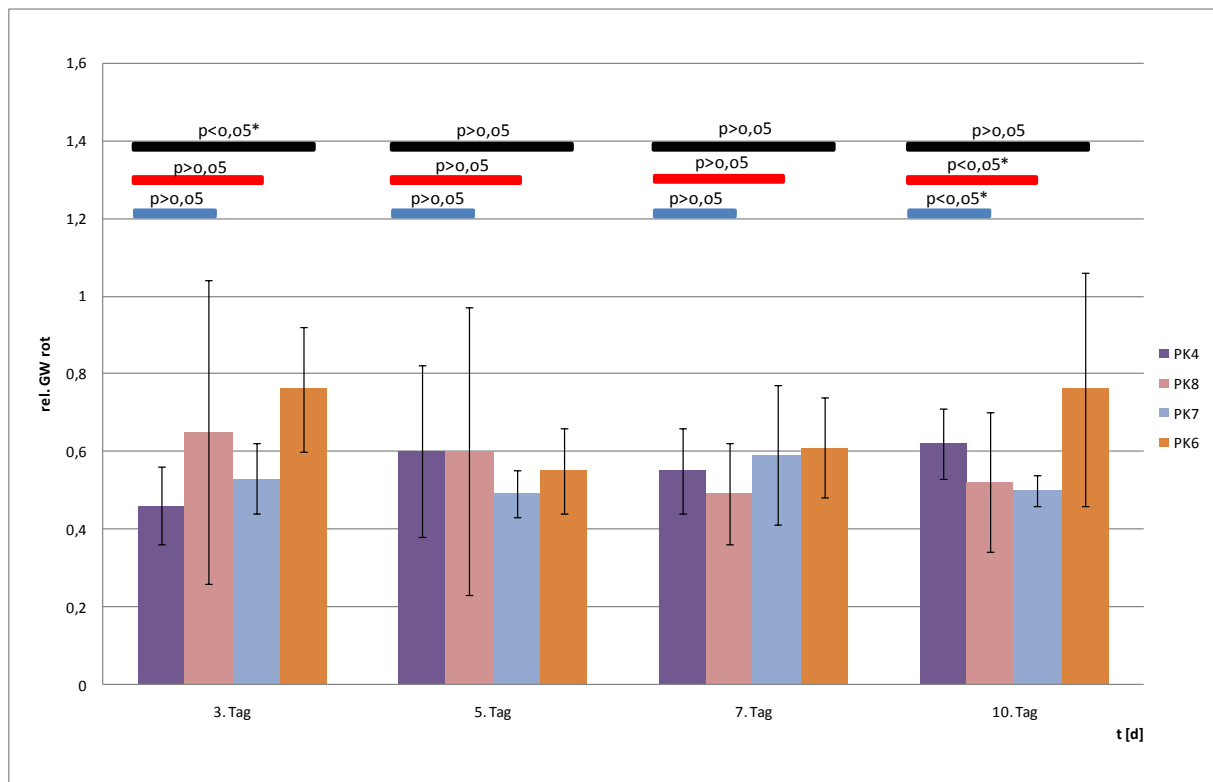
**Diagramm 9:** Expression von Osteocalcin (fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen/als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10-tägiger in vitro Testung, auf der Experimentaloberfläche PK2 im Vergleich mit den ermittelten Werten auf den Positivstandards PK6 und PK7 sowie des Negativstandards PK8. [ $p < 0,05^*$  (signifikant) und  $p > 0,05$  (nicht signifikant)]

Probekörper 2 induziert eine vorläufig maximale OC-Ausschüttung am 7. VT. Das vorläufige Minimum liegt am 5. VT an. Vom 7. VT zum 10. VT kommt es zu einem Abfall der Werte. Im Vergleich des PK2 mit PK7 und PK8 sind über die vollständige Versuchsdauer (außer PK8 am 7. VT) keine Signifikanzen feststellbar. Demzufolge verhalten sich die Oberflächen auf diesen drei Prüfkörpern in Bezug auf die OC-Ausschüttung ähnlich. Verglichen mit PK6 zeigen sich zum Versuchsbeginn und zum Versuchsende signifikante Ergebnisse. Am 5. und 7. VT sind jedoch keine signifikanten Unterschiede messbar. Die Zellen auf PK2 und PK6 exprimieren demzufolge wahrscheinlich nur zum Versuchsbeginn und zum Versuchsende unterschiedliche Mengen an OC. Währenddessen die Werte auf PK2 und PK7 zum Versuchsende fallen, steigen die Messwerte auf PK6 und PK8.



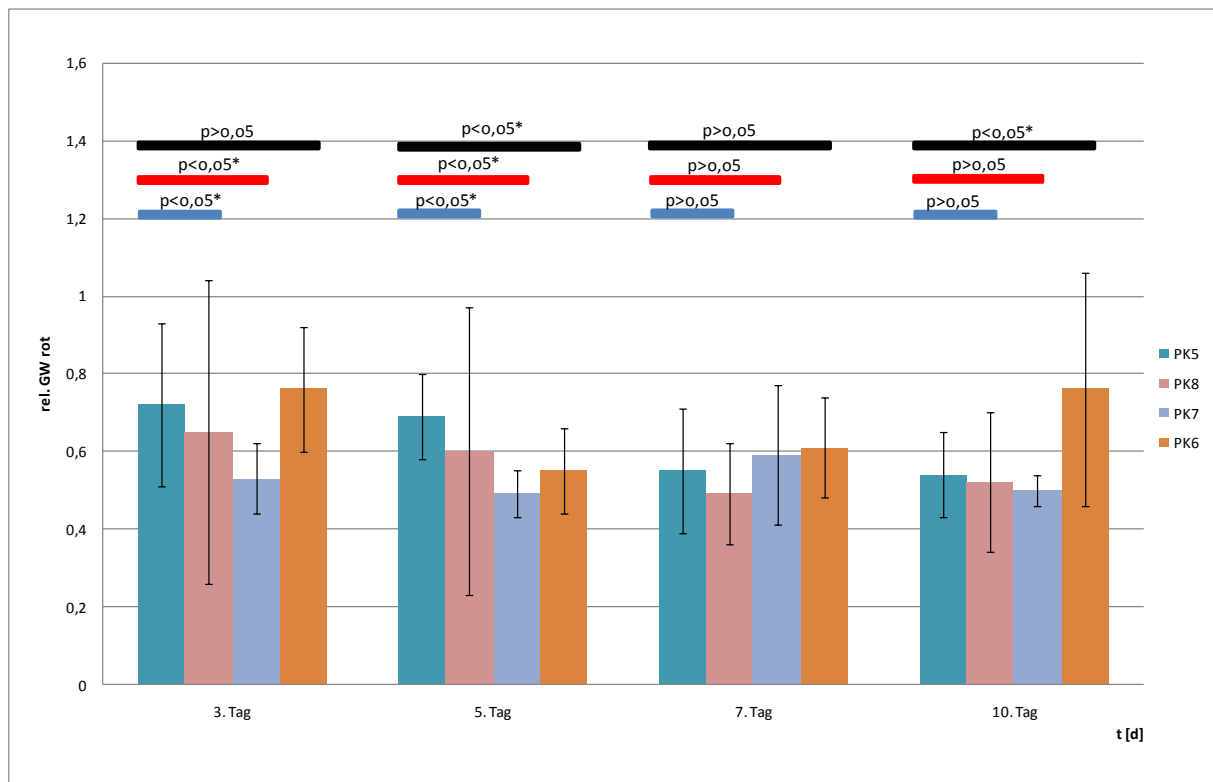
**Diagramm 10:** Expression von Osteocalcin (fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen/als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10-tägiger in vitro Testung, auf der Experimentaloberfläche PK3 im Vergleich mit den ermittelten Werten auf den Positivstandards PK6 und PK7 sowie des Negativstandards PK8. [ $p < 0,05^*$  (signifikant) und  $p > 0,05$  (nicht signifikant)]

Auf PK3 ist das vorläufige Maximum an OC am 5. VT messbar, gefolgt von einem vorläufigen Minimum am 7. VT. Die Messwerte steigen vom 3. zum 5. VT an, sinken zum 7. VT ab und steigen gegen Versuchsende wieder leicht. Zum metallenen Positivstandard und zum Negativstandard zeigen sich nur am 5. VT Signifikanzen. Im Vergleich zum PK6 sind bis auf den 7. VT signifikante Ergebnisse ermittelbar. Somit ist die OC-Expression auf PK3 ähnlich der auf PK7 und PK8 (mit Ausnahme am 5. VT). Auf PK3 wurde am 5. VT das vorläufig absolute Maximum aller PK für die OC-Expression während der kompletten Versuchsdauer ermittelt. Summiert sind die Messwerte der OC-Expression auf PK3 die höchsten aller Experimentaloberflächen und die zweithöchsten aller im Versuch untersuchten Probekörper.



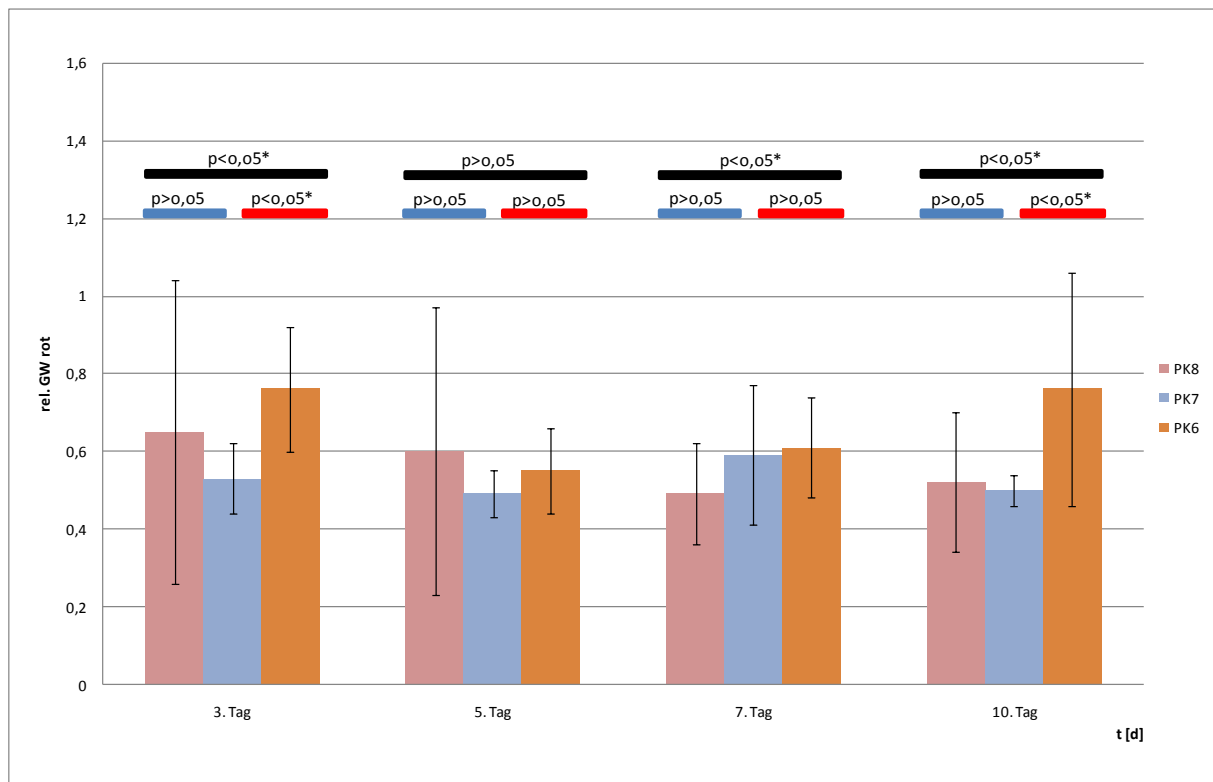
**Diagramm 11:** Expression von Osteocalcin (fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen/als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10-tägiger in vitro Testung, auf der Experimentaloberfläche PK4 im Vergleich mit den ermittelten Werten auf den Positivstandards PK6 und PK7 sowie des Negativstandards PK8. [ $p < 0,05^*$  (signifikant) und  $p > 0,05$  (nicht signifikant)]

Die Knochenzellen auf PK4 induzieren am 10. VT ihr vorläufiges Maximum an OC. Somit exprimiert PK4 sein vorläufiges Maximum, im Vergleich aller Probekörper, zu einem späten Zeitpunkt während des Versuches. Das vorläufige Minimum wird auf PK4 zum Versuchsbeginn erreicht. Die Messwerte bzgl. der OC-Expression auf der PK4 sind nur zum Versuchsbeginn signifikant zu denen auf PK6. Im weiteren Versuchsverlauf ergeben sich in diesem Zusammenhang keine weiteren Signifikanzen. Im Vergleich des PK4 mit PK7 und PK8 zeichnen sich erst am 10. VT signifikante Ergebnisse ab. Die Messwerte auf PK4 sind somit mit wenigen Ausnahmen ähnlich denen auf PK6, PK7 und PK8.



**Diagramm 12:** Expression von Osteocalcin (fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen/als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10-tägiger in vitro Testung, auf der Experimentaloberfläche PK5 im Vergleich mit den ermittelten Werten auf den Positivstandards PK6 und PK7 sowie des Negativstandards PK8. [ $p < 0,05^*$  (signifikant) und  $p > 0,05$  (nicht signifikant)]

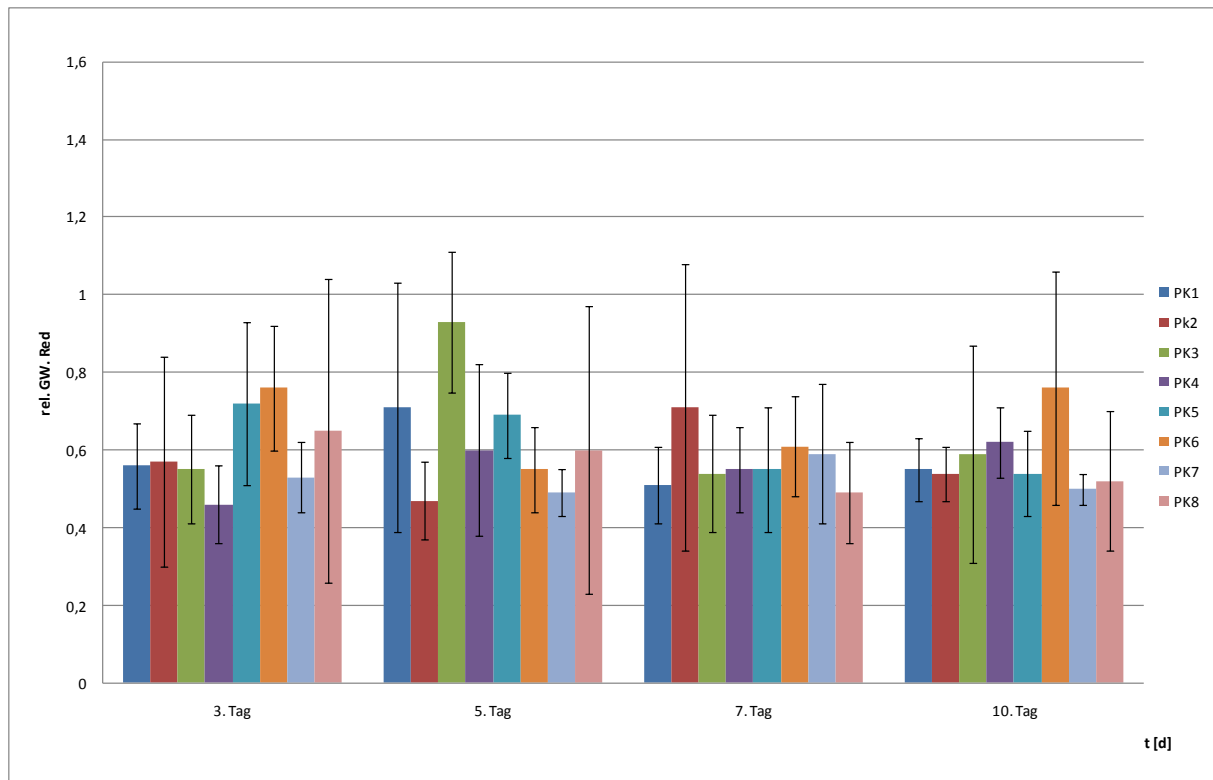
Das vorläufige Maximum der OC-Expression auf PK5 liegt bereits am 3. VT an. Die Messwerte nehmen über die Versuchsdauer bis zum 10. VT ab. Somit liegt das vorläufige Minimum zum Versuchsende an. Zu Versuchsbeginn zeigen sich Signifikanzen zum PK7 und PK8. Am 5. und 10. VT zeichnen sich Signifikanzen zum PK6 ab. Am 7. VT lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen PK5 und dem metallenen Positivstandard sowie dem Negativstandard feststellen. Der PK5 zeigt zu Versuchsbeginn ein unterschiedliches Verhalten -im Bezug auf die OC-Expression- verglichen mit PK7 und PK8. Es lässt sich des Weiteren festhalten, dass PK5 von Beginn an relativ hohe Mengen an Osteocalcin exprimiert. Zum Versuchsende hin scheinen die Messwerte auf PK5 den auf PK7 und PK8 ermittelten Werten zu gleichen.



**Diagramm 13:** Expression von Osteocalcin (fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen/als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10-tägiger in vitro Testung, auf dem Negativstandard PK8 im Vergleich mit den ermittelten Werten auf den Positivstandards PK6 und PK7. [ $p < 0,05^*$  (signifikant) und  $p > 0,05$  (nicht signifikant)]

PK6 induziert ein vorläufiges Maximum an OC am 10. VT und ein vorläufiges Minimum am 5. VT. PK8 erreicht ein vorläufiges Maximum bereits am 3. VT und induziert ein vorläufiges Minimum am 7. VT. Auf PK7 hingegen lassen sich die höchsten Werte am 7. VT ermitteln und die geringsten am 5. VT. Bis auf den 5. VT ergeben sich im Vergleich des PK6 mit PK8 signifikante Ergebnisse. Im Vergleich des PK7 mit PK8 sind keine signifikanten Ergebnisse messbar. Es treten nur zum Versuchsbeginn und zum Versuchende signifikante Unterschiede zwischen keramischem und metallendem Positivstandard auf. Die OC-Expression auf PK6 ist bis auf den 5. VT stets höher als die auf PK7 und PK8.

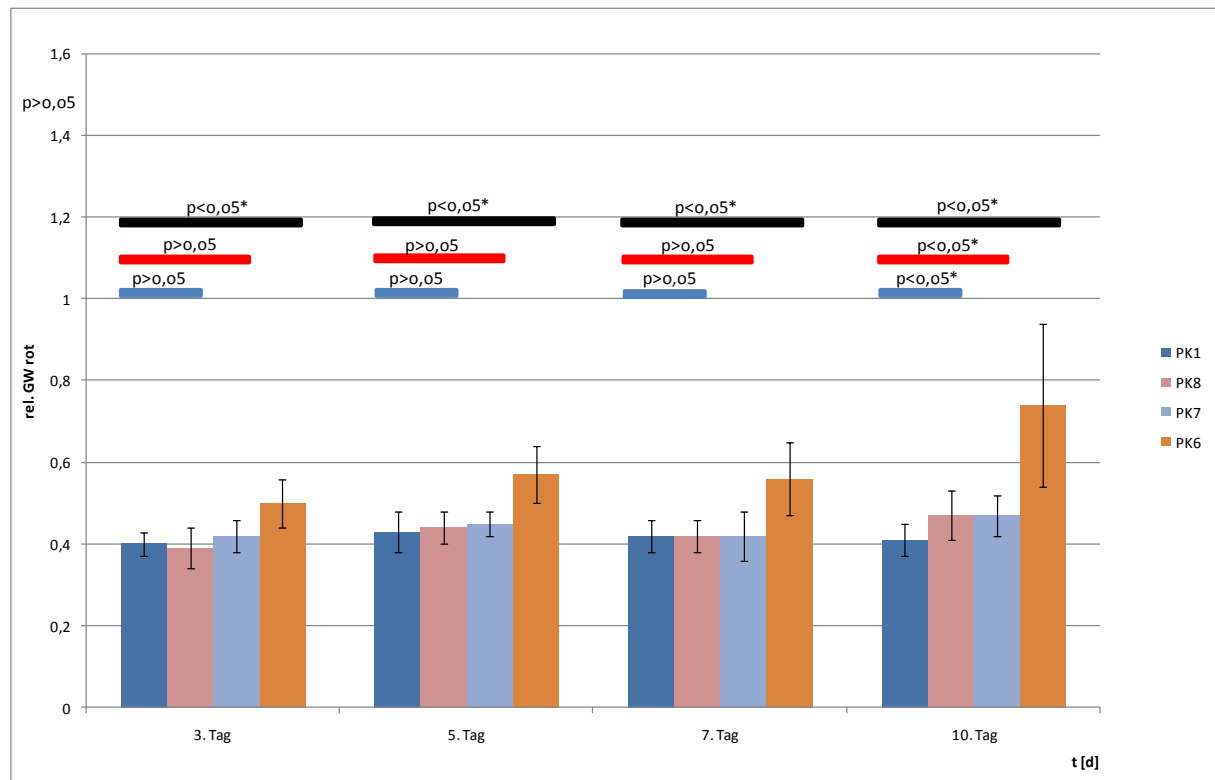




**Diagramm 14:** grafische Darstellung der Expression von Osteocalcin (fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen/als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10-tägiger in vitro Testung, auf allen Probekörpern.

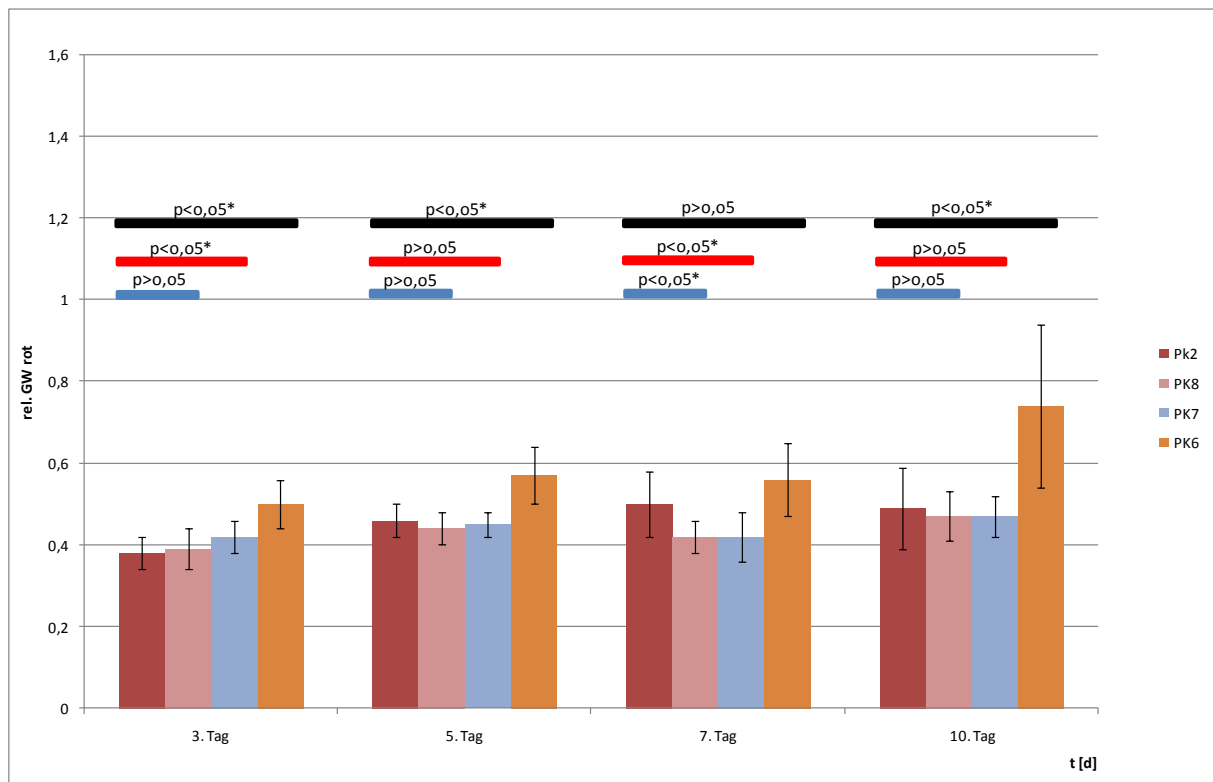
Am 3. VT liegt eine erhöhte systemische Streuung im Bezug auf die Expression von Osteocalcin vor. Die Streuung wird am 5. VT größer und nimmt zum 7. VT hin deutlich ab. Am 10. VT ist wieder ein leichter Anstieg der Systemischen Streuung zu verzeichnen. Es fällt auf, dass auf allen Oberflächen -außer der auf PK5 und PK6- auf einen hohen Wert an Osteocalcin ein verringerter Wert folgt. Die Werte für die OC-Expression auf PK5 hingegen nehmen kontinuierlich vom 3. zum 10. VT ab. Auf PK3 konnte während der gesamten Versuchsdauer summiert die höchste Menge an OC, verglichen mit den anderen Experimentaloberflächen, ermittelt werden. Zu erkennen ist, dass auf den PK5, PK6 und PK8 bereits am 3. VT eine hohe Expression erreicht wird, während auf PK1, PK3 und PK4 diese erst am 5. VT einsetzt. Auf PK2 und PK7 ist dies erst am 7. VT der Fall. Auf PK4 und PK6 ist am 10. VT eine erneute Streuung zu verzeichnen. Es ist auffällig, dass der Grad, mit dem die Werte schwanken, davon abhängig ist, wie sich die OC-Expression von Versuchstag zu Versuchstag ändert. D.h. auf eine starke Erhöhung folgt eine starke Verringerung und auf eine leichte Verringerung i.d.R. nur ein geringer Anstieg. Die Oberfläche auf PK6 exprimiert während des vollständigen Versuches summiert die höchste Menge an OC im Vergleich aller Probekörper.

### 4.1.3 Quantitative Auswertung der Osteonectin-Expression



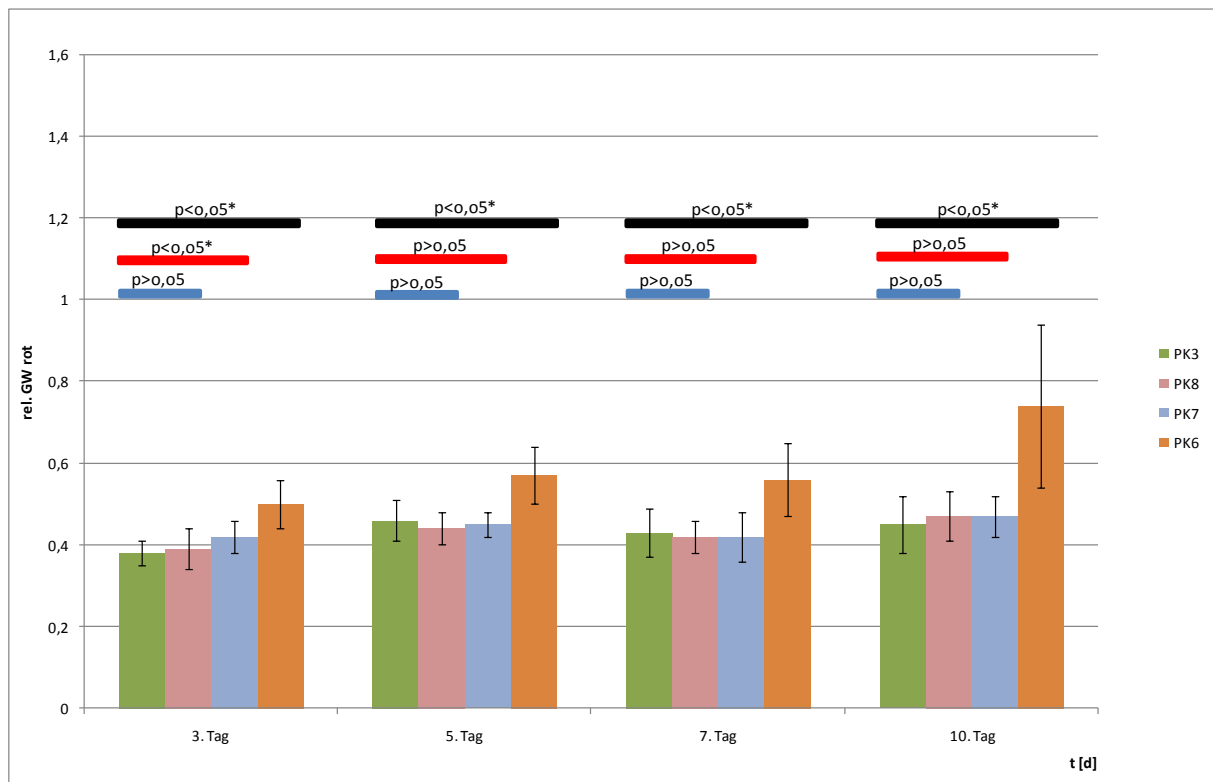
**Diagramm 15:** Expression von Osteonectin (fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen/als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10-tägiger in vitro Testung, auf der Experimentaloberfläche PK1 im Vergleich mit den ermittelten Werten auf den Positivstandards PK6 und PK7 sowie des Negativstandards PK8. [ $p < 0,05^*$  (signifikant) und  $p > 0,05$  (nicht signifikant)]

Auf PK1 ist das vorläufige Maximum der ON-Expression für diesen Probekörper am 5. VT messbar. Die Messwerte steigen vom 3. zum 5. VT an und sinken zum 7. und 10. VT ab. Jedoch bleiben die Werte trotz leichter Schwankungen relativ stabil. D.h., PK1 exprimiert über die komplette Versuchszeit eine kontinuierliche Menge an ON. Im Vergleich zum PK7 und PK8 zeigen sich nur am 10. VT Signifikanzen. Verglichen mit PK6 zeichnen sich über die komplette Versuchszeit signifikante Ergebnisse ab. Somit ist im Vergleich PK1, PK7 sowie PK8 bezüglich der ON-Expression ein ähnliches Verhalten feststellbar (mit Ausnahme des 10. VT). Während die Werte für PK6, PK7 und PK8 zum Versuchsende hin steigen, bleiben die selbigen für PK1 vom 7. auf den 10. VT unverändert.



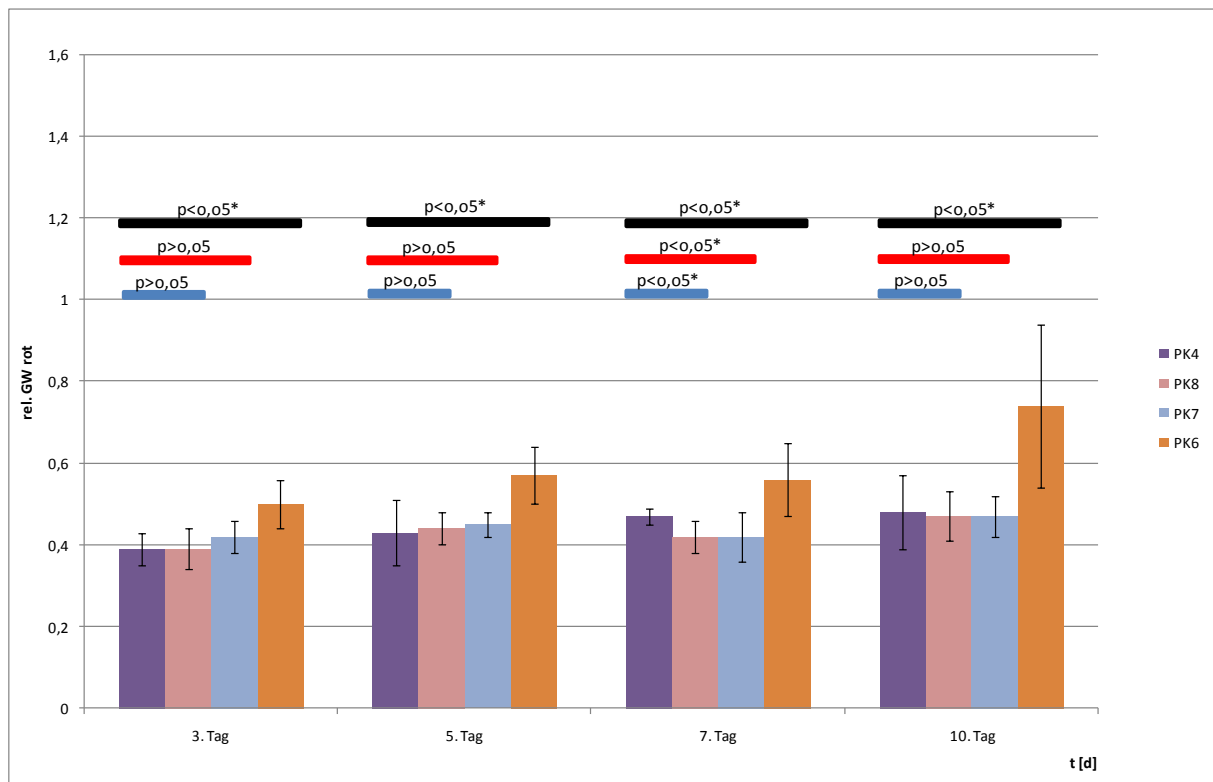
**Diagramm 16:** Expression von Osteonectin (fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen/als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10-tägiger in vitro Testung, auf der Experimentaloberfläche PK2 im Vergleich mit den ermittelten Werten auf den Positivstandards PK6 und PK7 sowie des Negativstandards PK8. [ $p < 0,05^*$  (signifikant) und  $p > 0,05$  (nicht signifikant)]

PK2 induziert sein vorläufiges Maximum an ON am 7. VT und sein vorläufiges Minimum am 3. VT. Bis auf den 7. VT ergeben sich im Vergleich des PK2 mit PK6 signifikante Ergebnisse. Somit sind bezüglich der ON-Expression zwischen PK2 und PK6 geringe Ähnlichkeiten feststellbar. Verglichen mit PK7 sind am 3. und 7. VT signifikante Unterschiede messbar. Im Test zwischen PK8 und PK2 zeigen sich nur am 7. VT signifikante Ergebnisse. PK2 zeigt demzufolge große Ähnlichkeiten bezüglich der ON-Expression verglichen mit PK8. Während die Werte auf PK6, PK7 und PK8 zum Versuchsende hin steigen, sinken die Messwerte auf PK2.



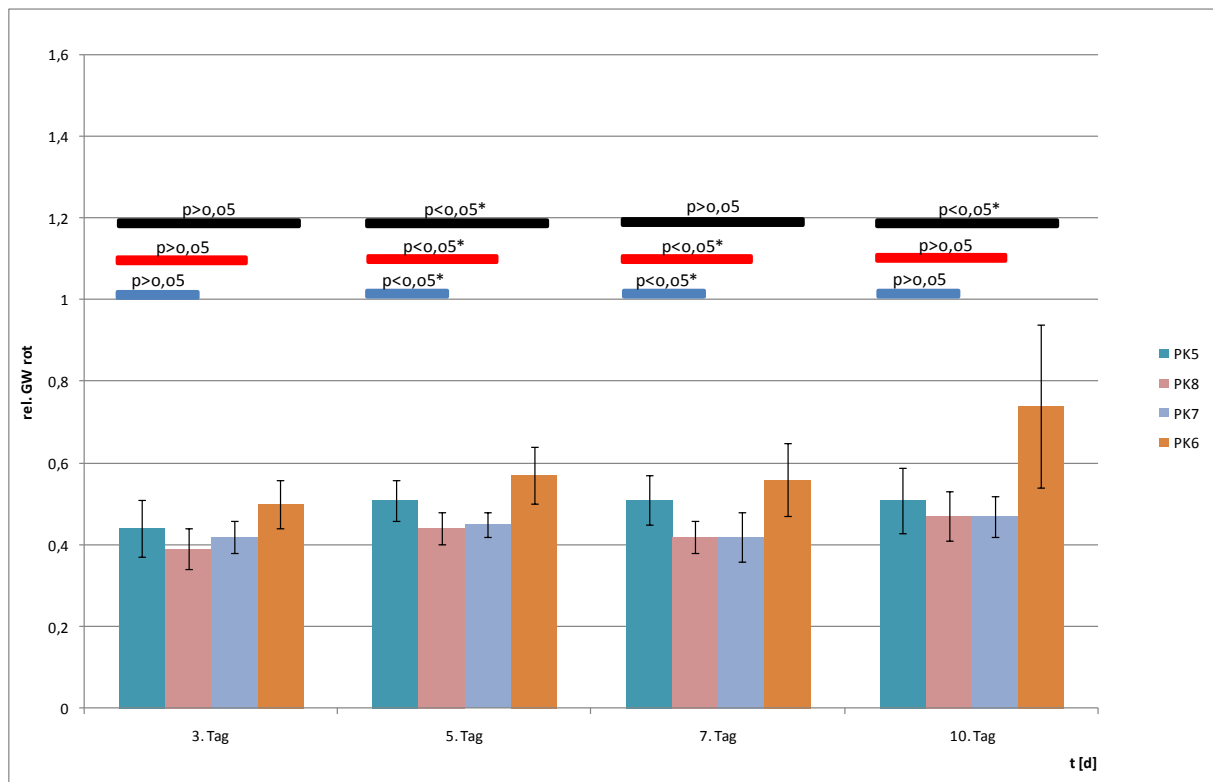
**Diagramm 17:** Expression von Osteonectin (fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen/als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10-tägiger in vitro Testung, auf der Experimentaloberfläche PK3 im Vergleich mit den ermittelten Werten auf den Positivstandards PK6 und PK7 sowie des Negativstandards PK8. [ $p < 0,05^*$  (signifikant) und  $p > 0,05$  (nicht signifikant)]

Auf PK3 ist ein vorläufiges Maximum der ON-Expression am 5. VT messbar. Das Minimum liegt zum Versuchsbeginn an. Die Messwerte steigen vom 3. zum 5. VT an, sinken zum 7. VT hin ab und steigen gegen Versuchsende wieder leicht an. Es ist jedoch festzustellen, dass die Werte nur geringfügigen Schwankungen unterworfen sind und somit relativ stabil verlaufen. Zum PK6 zeigen sich über die vollständige Versuchsdauer Signifikanzen. Im Vergleich zum PK7 sind (mit Ausnahme des 3. VT) nichtsignifikante Ergebnisse feststellbar. Es wurden keine signifikanten Unterschiede bei der Testung des PK3 mit PK8 ermittelt. Somit ist die OC-Expression auf PK3 ähnlich der auf PK8. Die Messwerte aller vier Probekörper steigen gegen Versuchsende hin an.



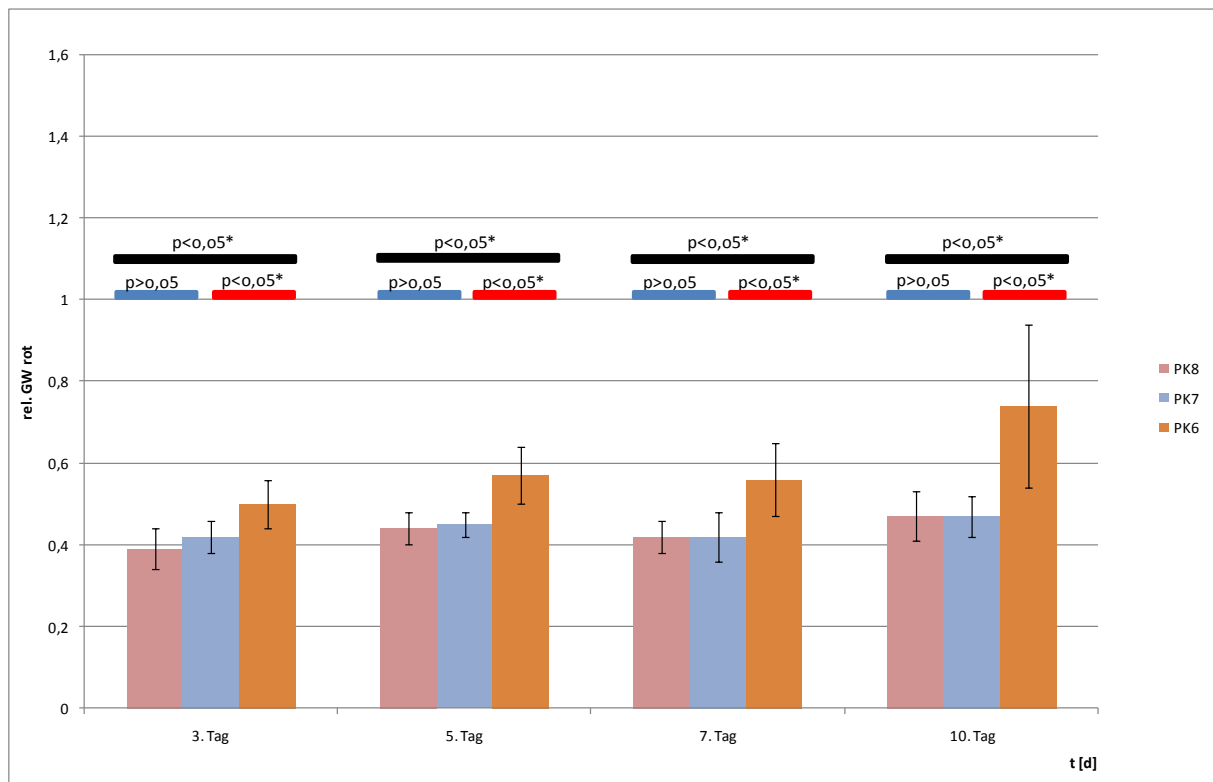
**Diagramm 18:** Expression von Osteonectin (fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen/als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10-tägiger in vitro Testung, auf der Experimentaloberfläche PK4 im Vergleich mit den ermittelten Werten auf den Positivstandards PK6 und PK7 sowie des Negativstandards PK8. [ $p < 0,05^*$  (signifikant) und  $p > 0,05$  (nicht signifikant)]

Ein vorläufiges Maximum der ON-Expression auf PK4 liegt am 10. VT vor. Das vorläufige Minimum ist zum Versuchsbeginn messbar. Die für die ON-Ausschüttung auf PK4 ermittelten Werte steigen kontinuierlich bis zum Versuchsende an. Im Vergleich des PK4 mit PK6 zeigen sich signifikante Ergebnisse über die vollständige Versuchszeit. Verglichen mit PK7 und PK8 sind nur am 7. VT signifikante Unterschiede ermittelbar. Es ist ein genereller Anstieg der Messwerte bei allen vier Prüfkörpern zum Versuchsende hin zu verzeichnen. Die gewonnenen Messwerte auf PK4 ähneln denen des metallenen Positivstandards sowie des Negativstandards, sind aber sehr verschieden zu denen des keramischen Positivstandards.



**Diagramm 19:** Expression von Osteonectin (fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen/als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10-tägiger in vitro Testung, auf der Experimentaloberfläche PK5 im Vergleich mit den ermittelten Werten auf den Positivstandards PK6 und PK7 sowie des Negativstandards PK8. [ $p < 0,05^*$  (signifikant) und  $p > 0,05$  (nicht signifikant)]

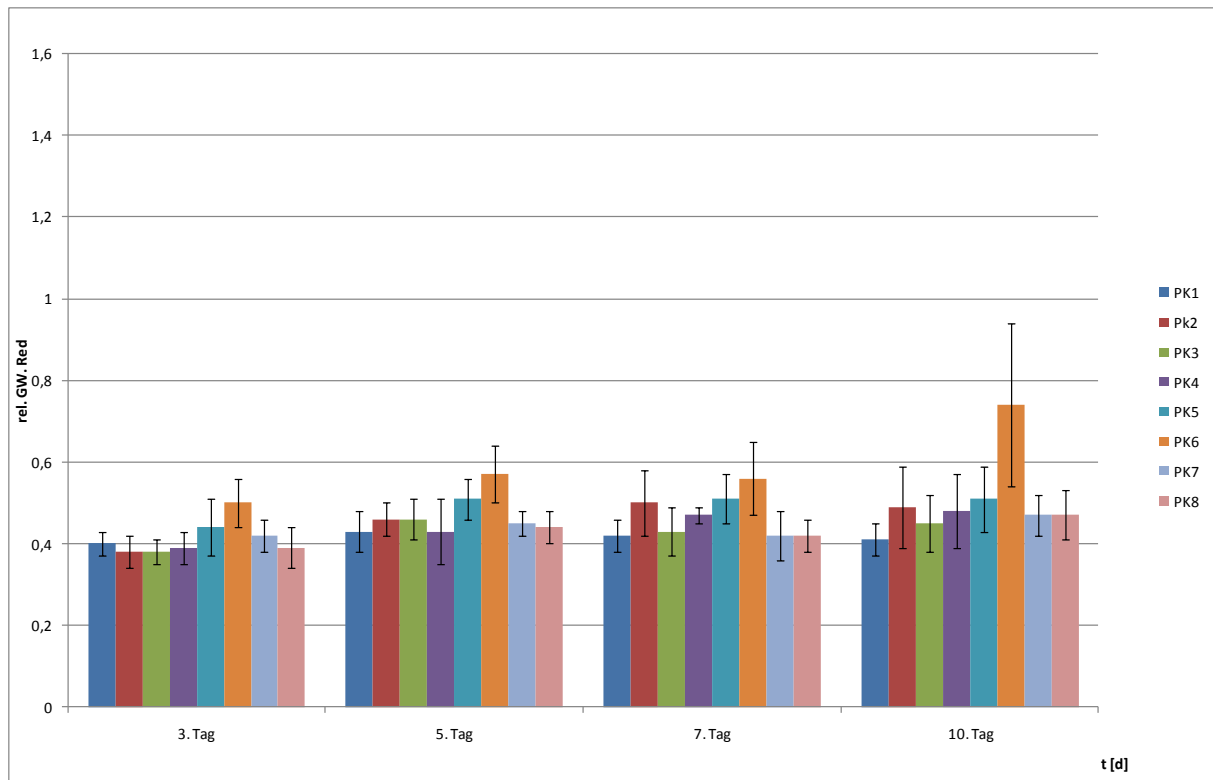
PK 5 induziert eine vorläufig maximale ON-Ausschüttung vom 5. bis zum 10. VT. Das vorläufige Minimum liegt am 3. VT an. Im Vergleich zu PK6, PK7 und PK8 ergeben sich am 5. VT, sowie für PK8 und PK7 am 7. VT, ebenso für PK6 am 10. VT, Signifikanzen zum PK5. Die Messwerte des PK5 bzgl. der ON-Expression sind im Vergleich zu den anderen Probekörpern am stabilsten. Summiert werden auf PK5 die zweithöchsten Expressionswerte für ON gemessen (neben PK6).



**Diagramm 20:** Expression von Osteonectin (fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen/als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10-tägiger in vitro Testung, auf dem Negativstandard PK8 im Vergleich mit den ermittelten Werten auf den Positivstandards PK6 und PK7. [ $p < 0,05^*$  (signifikant) und  $p > 0,05$  (nicht signifikant)]

Probekörper 6, 7 und 8 induzieren ihr vorläufiges ON-Maximum am 10. VT und ihr vorläufiges Minimum am 3. VT. Die Messwerte auf PK6 steigen zum Versuchsende hin an. Gleiches gilt für die Messwerte auf PK7 und PK8. Im Vergleich des PK6 mit PK7 und PK8 ergeben sich über den vollständigen Versuchszeitraum signifikante Ergebnisse. Zwischen PK7 und PK8 sind bezüglich der ON-Expression keine signifikanten Unterschiede zu ermitteln.

Demzufolge ist die ON-Expression auf PK6 stets different zu der auf PK7 und PK8. Im Durchschnitt werden auf PK6 die höchsten Expressionswerte für ON gemessen.

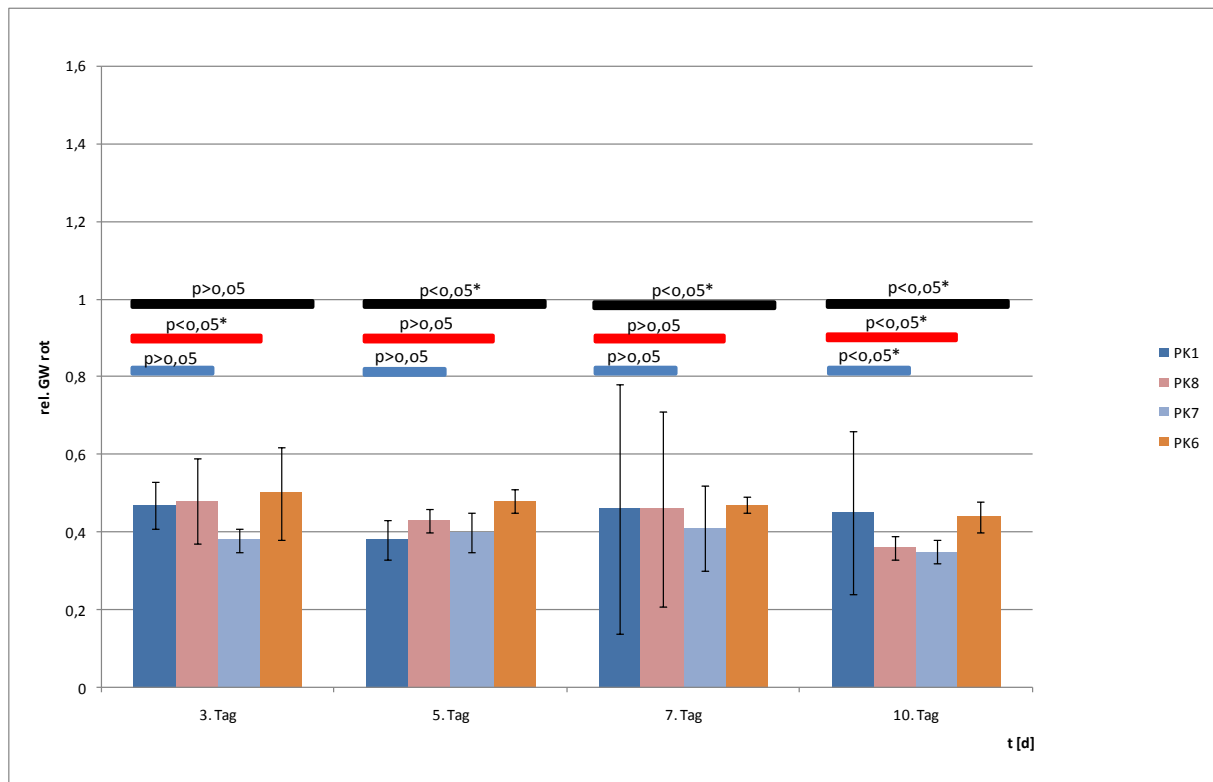


**Diagramm 21:** Grafische Darstellung der Expression von Osteonectin (fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen/als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10-tägiger in vitro Testung, auf allen Probekörpern.

Mit Ausnahme von PK6 ist für die Testung der ON-Expression ein eher statisches Verhalten zu erkennen. Dies geht mit einer sehr geringen systemischen Streuung einher. Vom 3. zum 5. VT kommt es auf allen Oberflächen zu einem Anstieg der ON-Expression. Am 7. VT ist auf PK1 sowie PK3 und PK6-8 ein Absinken der Werte zu verzeichnen, währenddessen es auf PK2 und PK4 zu einem Anstieg kommt. Am 10. VT sinken die Werte auf PK1 und PK2 ab wogegen sie auf den Probekörpern 3, 4 und 6 bis 8 ansteigen. Auf PK6 wird über die gesamte Versuchsdauer summiert der absolute Höchstwert für die ON-Expression vgl. mit allen anderen Probekörpern ermittelt. Im Besonderen ist der Messwertsprung vom 7. zum 10. VT zu erwähnen. Auf der Oberfläche von PK5 ist nach einem leichten Anstieg vom 3. zum 5. VT keine Änderung der Messwerte zu erkennen. Jedoch konnte während der gesamten Versuchsdauer auf PK5 summiert die höchste Menge an ON -verglichen mit den anderen Experimentaloberflächen- ermittelt werden. Es fällt des Weiteren auf, dass sich die Messwerte auf PK7 und PK8 ab dem 5. VT relativ synchron verändern. Mit zunehmender Versuchsdauer werden die Unterschiede besonders zwischen PK6 und PK7 sowie PK8 deutlicher.

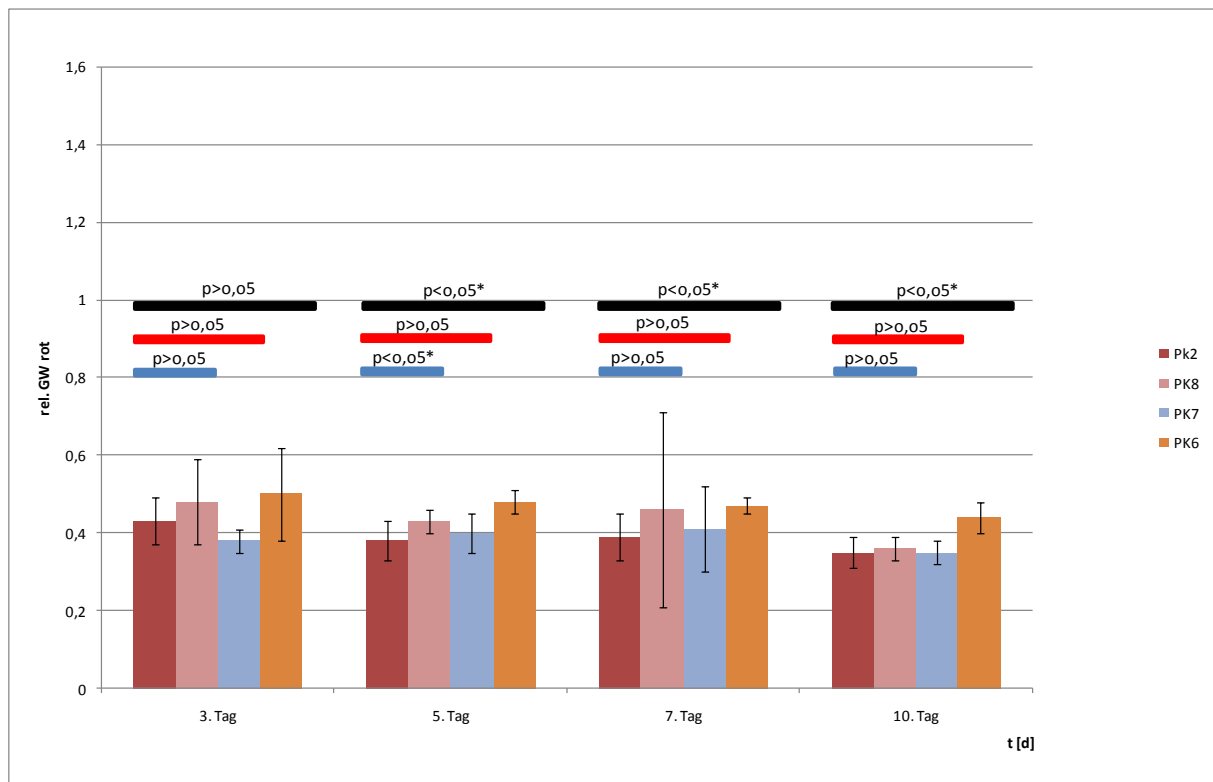


#### 4.1.4 Quantitative Auswertung der TGF- $\beta$ -Expression



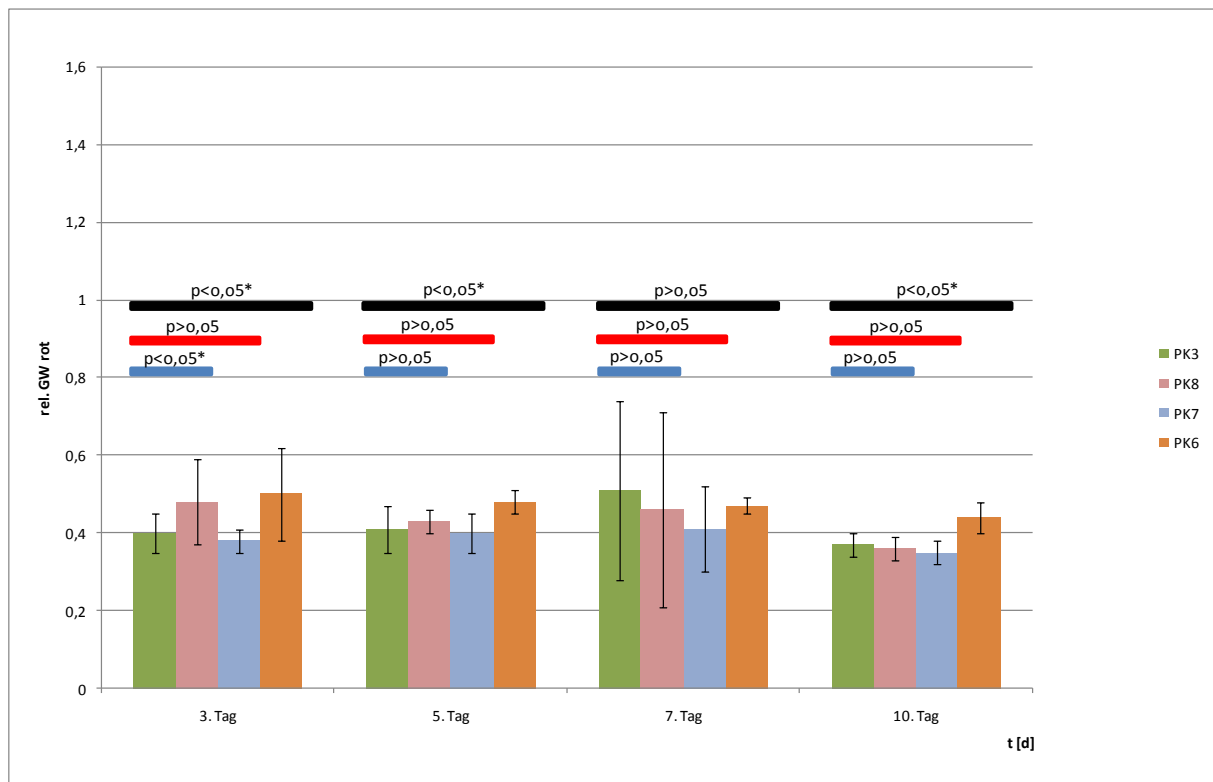
**Diagramm 22:** Expression von TGF- $\beta$  (fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen/als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10-tägiger in vitro Testung, auf der Experimentaloberfläche PK1 im Vergleich mit den ermittelten Werten auf den Positivstandards PK6 und PK7 sowie des Negativstandards PK8. [ $p < 0,05^*$  (signifikant) und  $p > 0,05$  (nicht signifikant)]

Der PK1 induziert am 3. VT seine vorläufig maximale TGF- $\beta$ -Expression. Darauf folgt das vorläufige Minimum am 5. VT. Die Werte steigen zum Versuchsende hin an. Zwischen PK1 und PK6 zeichnen sich zum Versuchsbeginn keine signifikanten Unterschiede ab. Im weiteren Verlauf lassen sich Signifikanzen nachweisen. Im Vergleich PK1 und PK7 liegen zu Versuchsbeginn und Versuchsende Unterschiede vor. In der übrigen Versuchszeit sind keine Signifikanzen messbar. Zwischen PK1 und PK8 können nur am 10. VT Signifikanzen ermittelt werden. Der PK6 zeigt im Schnitt die höchste Expression von TGF- $\beta$  im Vergleich aller PK. PK1 schließt sich mit den zweithöchsten Werten an. Auf Grund der geringen Unterschiede lässt sich feststellen, dass es zwischen PK1 und PK8 bezüglich der TGF- $\beta$ -Expression die größten Ähnlichkeiten in diesem Vergleich gibt.



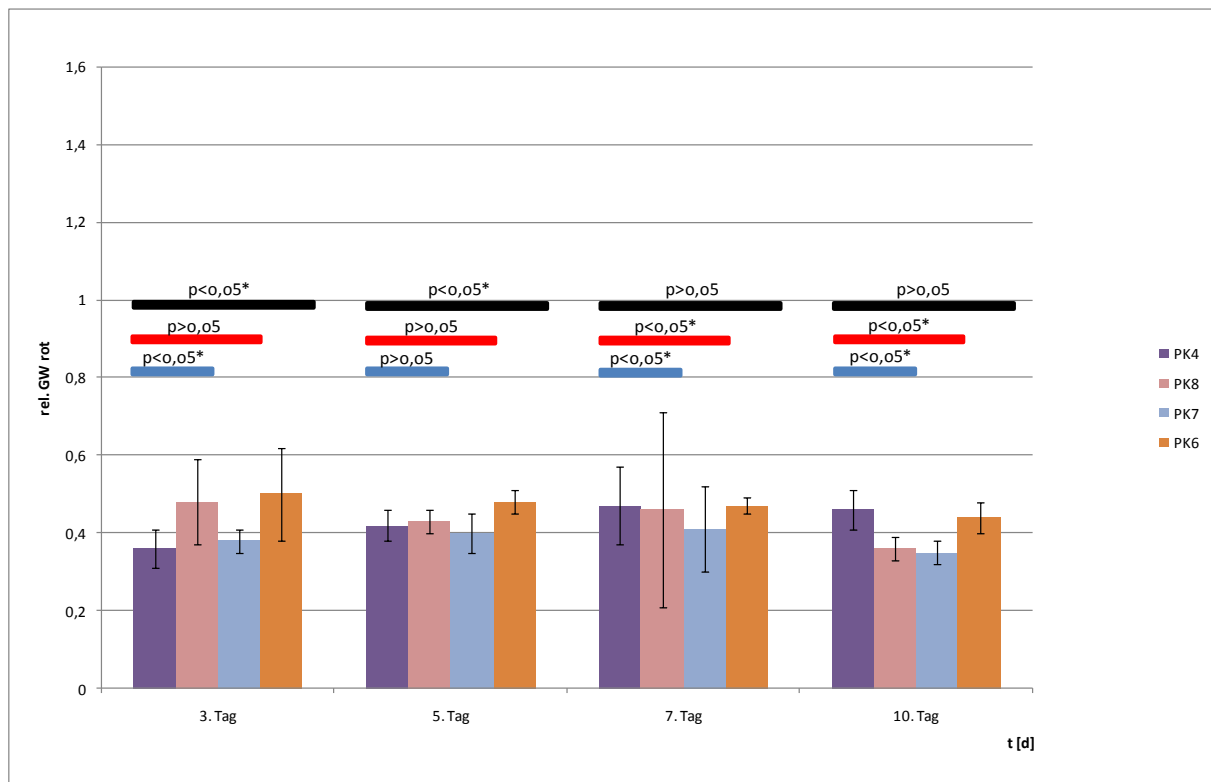
**Diagramm 23:** Expression von TGF- $\beta$  (fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen/als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10-tägiger in vitro Testung, auf der Experimentaloberfläche PK2 im Vergleich mit den ermittelten Werten auf den Positivstandards PK6 und PK7 sowie des Negativstandards PK8. [ $p < 0,05^*$  (signifikant) und  $p > 0,05$  (nicht signifikant)]

Auf PK2 zeichnet sich zum Versuchsbeginn ein vorläufiges Maximum der TGF- $\beta$ -Expression ab. Das vorläufige Minimum ist zum Versuchsende hin erreicht. Die Werte nehmen somit während der Versuchsdauer ab. Zwischen PK2 und PK6 zeichnen sich zum Versuchsbeginn keine signifikanten Unterschiede ab. Ab dem 5. VT lassen sich für die weitere Versuchsdauer Signifikanzen nachweisen. Im Vergleich PK2 und PK7 gibt es bezüglich der TGF- $\beta$ -Expression über den kompletten Versuchsverlauf keine signifikanten Unterschiede. Somit ist diesbezüglich zwischen beiden Probekörpern ein sehr ähnliches Verhalten feststellbar. Die Kollation von PK2 und PK8 ergibt nur am 5. VT signifikante Unterschiede. Die Messwerte aller 4 Probekörper sinken gegen Versuchsende hin ab.



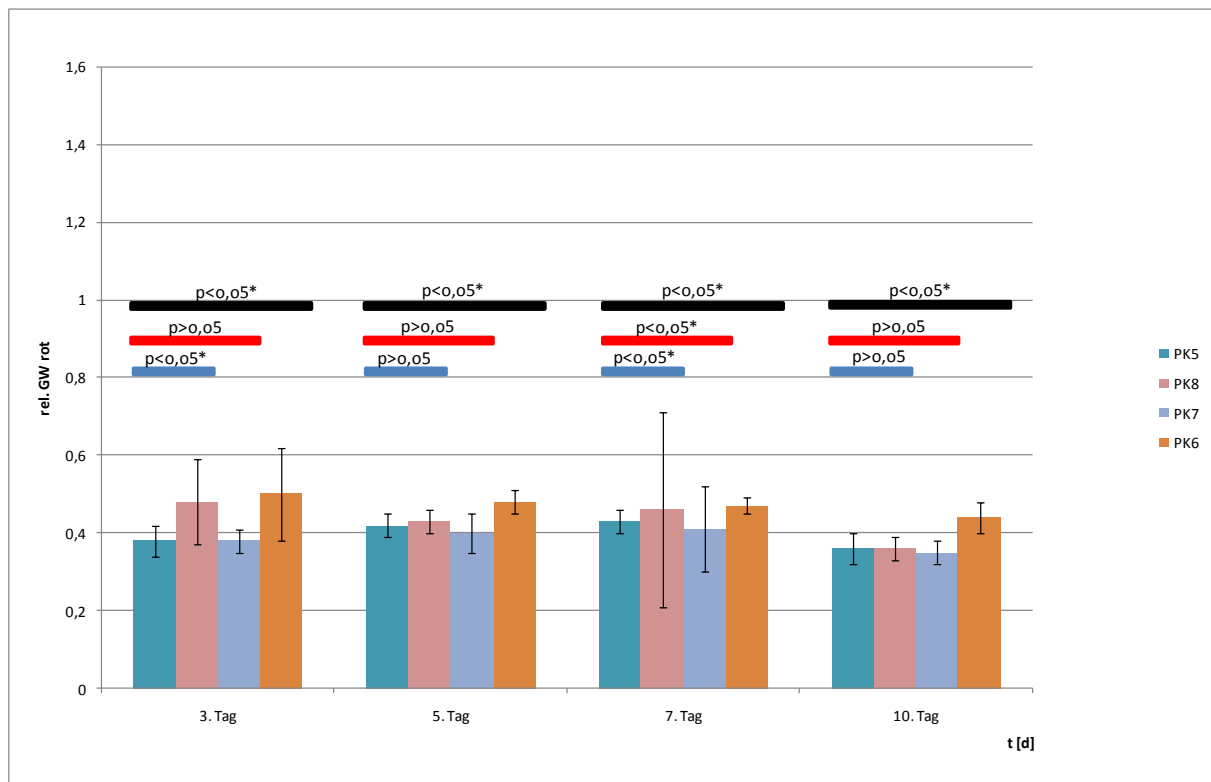
**Diagramm 24:** Expression von TGF- $\beta$  (fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen/als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10-tägiger in vitro Testung, auf der Experimentaloberfläche PK3 im Vergleich mit den ermittelten Werten auf den Positivstandards PK6 und PK7 sowie des Negativstandards PK8. [ $p < 0,05^*$  (signifikant) und  $p > 0,05$  (nicht signifikant)]

PK3 induziert sein vorläufiges Maximum an TGF- $\beta$  am 7. VT. Am 10. VT ist ein vorläufiges Minimum an TGF- $\beta$  messbar. Zwischen PK3 und PK6 zeichnen sich (bis auf den 7. VT) signifikante Unterschiede ab. Im Vergleich PK3 und PK7 gibt es bzgl. der TGF- $\beta$ -Expression über den kompletten Versuchsverlauf keine signifikanten Unterschiede. Es ist somit von einem sehr ähnlichen Verhalten der beiden Oberflächen bezüglich der TGF- $\beta$ -Expression auszugehen. Den gleichen Sachverhalt beobachten wir auch auf PK2. Zwischen PK8 und PK3 liegen nur am 3. VT signifikante Ergebnisse vor. Die Messwerte aller 4 Probekörper nehmen gegen Versuchsende ab.



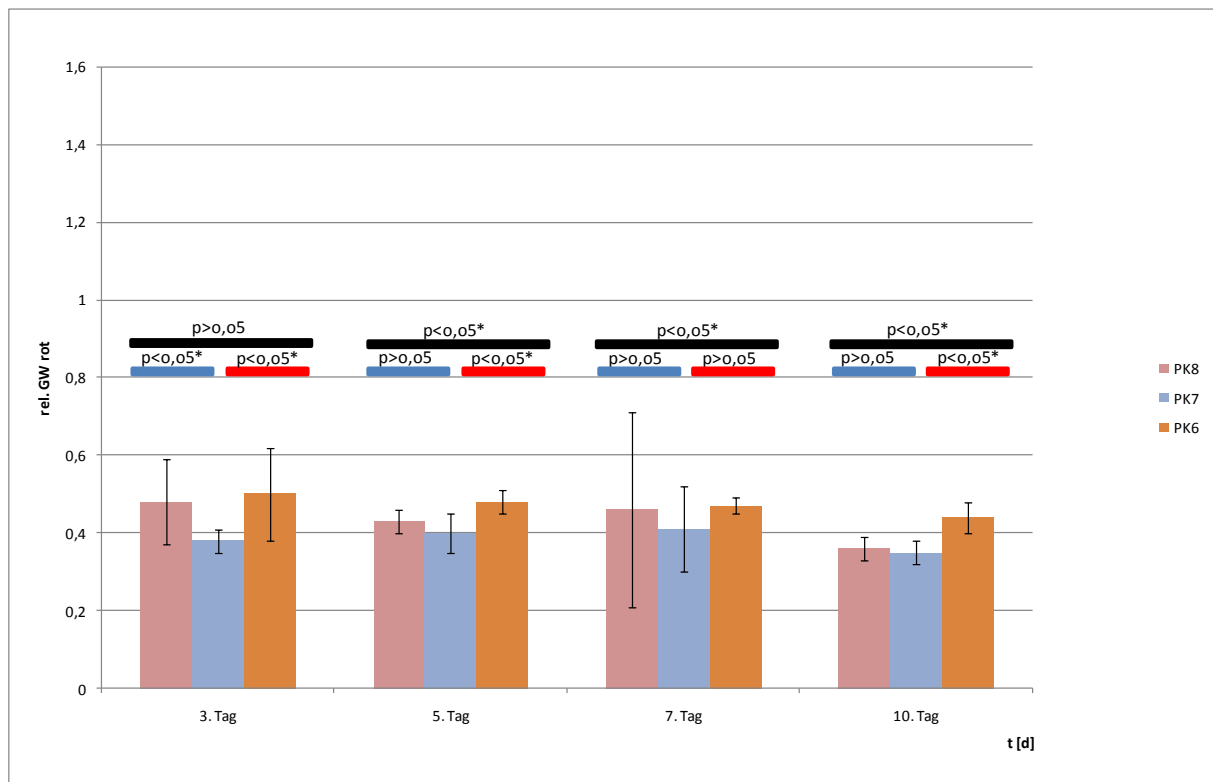
**Diagramm 25:** Expression von TGF- $\beta$  (fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen/als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10-tägiger in vitro Testung, auf der Experimentaloberfläche PK4 im Vergleich mit den ermittelten Werten auf den Positivstandards PK6 und PK7 sowie des Negativstandards PK8. [ $p < 0,05^*$  (signifikant) und  $p > 0,05$  (nicht signifikant)]

Die TGF- $\beta$ -Expression auf PK4 steigt von einem vorläufigen Minimum am 3. VT bis zu einem vorläufigen Maximum am 7. VT an und sinkt zum Versuchsende hin wieder leicht ab. Zwischen PK4 und PK6 zeichnen sich am 3. und am 5. VT signifikante Unterschiede ab. Am 7. und am 10. VT sind keine Signifikanzen messbar. Im Vergleich PK4 und PK7 zeigt sich ein umgekehrtes Bild. Hier liegen am 3. und 5. VT keine signifikanten Unterschiede vor, jedoch ergeben sich Signifikanzen zum Versuchsende. Demzufolge verhält sich PK4 zum Versuchsbeginn ähnlich PK7 und zum Versuchsende ähnlich dem PK6. Diesen Verlauf beobachten wir in Bezug auf die TGF- $\beta$ -Expression nur bei PK4. Die Kollation der TGF- $\beta$ -Expression von PK8 und PK4 ergibt bis auf den 5. VT signifikante Unterschiede.



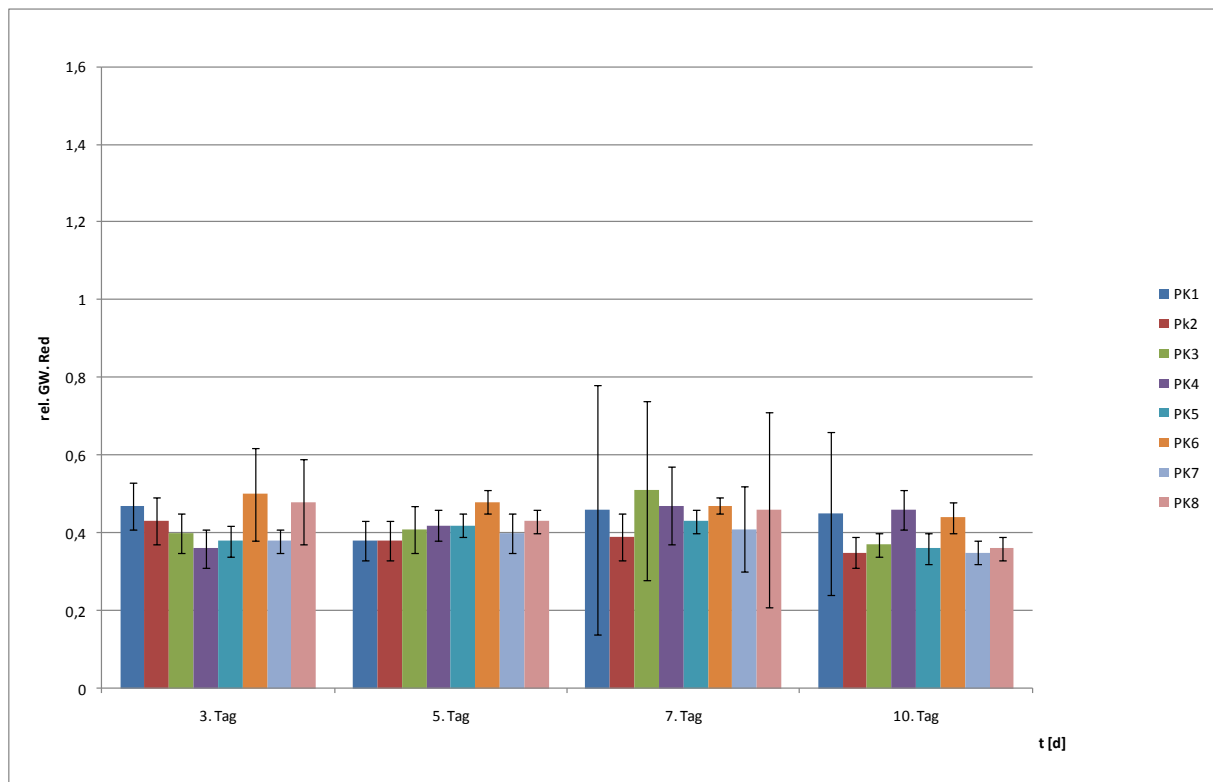
**Diagramm 26:** Expression von TGF- $\beta$  (fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen/als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10-tägiger in vitro Testung, auf der Experimentaloberfläche PK5 im Vergleich mit den ermittelten Werten auf den Positivstandards PK6 und PK7 sowie des Negativstandards PK8. [ $p < 0,05^*$  (signifikant) und  $p > 0,05$  (nicht signifikant)]

Der PK5 induziert ein vorläufiges Maximum an TGF- $\beta$  am 7. VT. Zum 10. VT hin ist ein vorläufiges Minimum an TGF- $\beta$  messbar. Ein ähnliches Verhalten beobachten wir bei PK3. Zwischen PK5 und PK6 zeichnen sich über die vollständige Versuchszeit signifikante Ergebnisse ab. Die Kollation der TGF- $\beta$ -Expression von PK8 und PK5 ergibt bis auf den 5. und 10. VT signifikante Unterschiede. Im Vergleich PK5 und PK7 sind bezüglich der TGF- $\beta$ -Ausschüttung nur am 7. VT Signifikanzen messbar. Demzufolge ist für PK5, genau wie auch für PK2, PK3 und PK4, diesbezüglich eher eine Ähnlichkeit zum PK7 zu sehen. Die Messwerte aller 4 Probekörper sinken gegen Versuchsende hin ab.



**Diagramm 27:** Expression von TGF- $\beta$  (fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen/als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10-tägiger in vitro Testung, auf dem Negativstandard PK8 im Vergleich mit den ermittelten Werten auf den Positivstandards PK6 und PK7. [ $p < 0,05^*$  (signifikant) und  $p > 0,05$  (nicht signifikant)]

PK6 induziert ein vorläufiges Maximum an TGF- $\beta$  am 3. VT. Die Werte sinken zum Versuchsende hin kontinuierlich ab. Das vorläufige Minimum liegt am 10. VT vor. PK8 zeigt ebenfalls ein vorläufiges Maximum am 3. VT und induziert ein vorläufiges Minimum auch am 10. VT. Die Zellen auf PK7 erreichen ein vorläufiges Maximum an TGF- $\beta$  am 7. VT. Die Werte steigen vom 3. bis 7. VT an und sinken zum 10. VT ab. Im Vergleich des PK6 mit PK8 ergeben sich (bis auf den 3. VT) signifikante Ergebnisse. Zwischen PK7 und PK8 sind bezüglich der TGF- $\beta$ -Expression nur am 3. VT signifikante Unterschiede ermittelbar. Die Kollation der TGF- $\beta$ -Ausschüttung auf PK7 und PK6 ergibt nur am 7. VT keine signifikanten Unterschiede. Die TGF- $\beta$ -Expression auf PK6 ist stets höher als die auf PK7 und PK8.



**Diagramm 28:** Grafische Darstellung der Expression von TGF- $\beta$  (Fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen /als relativer Grauwert rot), durch Osteoblastenkulturen während 10 tägiger in vitro Testung, auf allen Probekörpern.

Die grafische Darstellung der TGF- $\beta$ -Expression zeigt eine systemische Streuung ab dem 7. VT. Diese setzt sich bis zum 10. VT leicht vermindert fort. Am 3. und 5. VT ist ein eher statisches System zu erkennen. Die niedrigsten Messwerte sind am 10. VT mit 0,35 sowohl auf PK7 als auch auf PK2 messbar. Der höchste Messwert kann auf PK3 am 7. VT mit 0,51 ermittelt werden. Die Werte nehmen vom 7. auf den 10. VT auf allen Probekörpern ab. Die ermittelten Messwerte auf PK6 sinken bereits ab dem 3. VT kontinuierlich ab. Eine ähnlich kontinuierliche Abnahme ist auch auf PK7 zu beobachten. Bei allen anderen Probekörpern sind leichte Schwankungen feststellbar. Auf PK6 wird über die gesamte Versuchsdauer summiert der absolute Höchstwert für die TGF- $\beta$ -Expression, verglichen mit allen anderen Probekörpern, ermittelt. Betrachtet man PK6, PK7 und PK8 separat, so stellt man fest, dass die Werte auf PK6 stets höher sind als die von PK7 und PK8. Dabei sind die Messwerte auf PK8 höher als die auf PK7.

## 5. Diskussion

### 5.1 Fehlerbetrachtung

Für die Untersuchung *in vitro* wurde in dieser Versuchsreihe die humane Knochenzellkultur verwendet. Damit ergeben sich Limitierungen und Unterschiede im Gegensatz zur Situation *in vivo*. So ist u.a. in der nicht vaskulär versorgten Zellkultur die Entstehung eines funktionell mehrschichtigen Gewebes derzeit nicht zu realisieren. Somit betrachtet man in der Zellkultur primär eine Zell-Monolayer. Durch den vorherrschenden Platzmangel auf dem Probekörper und das Fehlen dreidimensionaler Strukturen müssen Limitationen hinsichtlich der Vergleichbarkeit mit der Situation *in vivo* hingenommen werden. Deshalb können in der Zellkultur die Umgebungsbedingungen im lebenden menschlichen Knochen nur annähernd simuliert werden. Ein regelmäßiges Wachstum, auch in der dritten Dimension, ist in der Zellkultur bis dato nicht zu realisieren. Zudem laufen in diesem Versuch auch keine Entzündungseffekte ab, da keinerlei zusätzliche Bestandteile des Immunsystems in der Zellkultur angezüchtet wurden. Diese sind jedoch *in vivo* bei der Fremdkörperreaktion des Knochens stets zu beobachten.

Um die früh ablaufenden Mechanismen der Osseointegration dentaler Implantate besser zu untersuchen, wurde der Versuch über 10 Tage mit Messungen der nonkollagenen Knochenproteine Osteonectin, Osteocalcin, Bone Sialo Protein und des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  an den Versuchstagen 3, 5, 7 und 10 durchgeführt. Mit diesem Versuchsaufbau ist es möglich, die Menge der exprimierten Proteine auf den einzelnen Oberflächen und an den genannten Zeitpunkten zu messen und zu bewerten. Die Eignung und Durchführung der Grauwertmessung wurde bereits in Vorversuchen getestet und ausgewertet. Um eine Über- oder Unterbelichtung und damit fehlerhafte Messwerte zu vermeiden, kam eine variable Belichtungszeit zum Einsatz. Für jede Aufnahme errechnete das Programm Axiovision 4.0 automatisch die Belichtungszeit, um eine ideal belichtete Aufnahme zu erzeugen.

In Vorversuchen wurde beobachtet, dass Probekörper nicht vollständig besiedelt waren. Bei zufälliger Auswahl eines Messfeldes waren bei 400-facher Vergrößerung mehrfach keine Osteoblasten im Messfeld zu erkennen. Um derartige Fehler durch „unbesiedelte“ Areale zu minimieren und größere Flächen untersuchen zu können, erfolgte die Messung nunmehr mit 200-facher Vergrößerung, anstatt 400-facher Vergrößerung.



Aus vielen Versuchen auf alloplastischen Oberflächen ist bekannt, dass die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten vornehmlich von der Topographie und der chemischen Zusammensetzung der verwendeten Oberfläche bestimmt werden.

Insbesondere die Oberflächentopographie wird von zahlreichen Autoren (MUSTAFA et al. 2001, NASATZKY et al. 2003, MARINUCCI et al. 2006) für die Osteoblastenantwort auf den Implantatprobekörper verantwortlich gemacht. In den meisten Fällen kam man zu dem Schluss, dass „raue“ Oberflächen sowohl in vivo als auch in vitro deutliche Vorteile gegenüber „glatten“, maschinenbearbeiteten Oberflächen gleichen Materiales aufweisen. Die Kompliziertheit des Vergleiches verschieden rauer Oberflächen liegt in der Ermittlung der Rauheit jeder einzelnen Oberfläche. Die Kenngrößen der Rauheit, z.B. Rz, Ra oder Rq werden unter Verwendung eines Perthometers ermittelt. Mit Hilfe einer Tastspitze wird die zu untersuchende Oberfläche abgefahren. Unebenheiten werden durch Auslenkung der Tastspitze entsprechend der Oberflächenbeschaffenheit registriert. Die Auslenkung der Tastspitze wird in elektrische Signale umgewandelt und zur Ermittlung der verschiedenen Kennwerte verwendet.

Die im vorliegenden Versuch untersuchten Probekörper weisen zum Teil Oberflächen auf, welche viele unter sich gehende Bereiche enthalten. Diese Areale sind mit der beschriebenen Methode der Rauheitsmessung unter Verwendung eines Perthometers nicht zu erreichen. Somit muss von einer Verfälschung der Messwerte ausgegangen werden. Die Rauheit als klassischer oberflächenphysikalischer Parameter ist deshalb als Unterscheidungsmerkmal bzw. Diskussionsgrundlage für die hier untersuchten Oberflächen nur bedingt geeignet.

## 5.2 Aufspannen des Messrahmens

Der Untersuchungsbereich spannt sich zwischen 2 Positivstandards und einem Negativstandard auf. Bei den zu untersuchenden 5 Experimentaloberflächen handelt es sich um Zirkoniummischoxidmodifikationen eines Titgrundkörpers, welche mit den Standardoberflächen verglichen werden.

Wie im Ergebnissteil dieser Arbeit dargestellt, unterscheiden sich der metallene Positivstandard und der Negativstandard nur gering und selten (TGF- $\beta$ -Expression am 3. Versuchstag und BSP-Expression am 5. Versuchstag). Diese solitären Unterschiede könnten im Bereich der Zufallswahrscheinlichkeit anzusiedeln sein ( $p < 5\%$ ).

Auf der Ebene der formalen Konstruktion eines Zellkulturversuches, der Reaktionen auf Oberflächenchemismus und -struktur beschreiben soll, könnte ein methodischer Fehler vorliegen, welcher darin besteht, dass die Titanoberfläche maschinert ist und sich somit der Vergleich zum metallenen Positivstandard, dessen Oberfläche ebenfalls rau ist, verbietet. Dem steht allerdings die Ebene der klinischen Einheilungstatsachen gegenüber, wonach maschiniertes Titan eine geringere Einheilungsgeschwindigkeit und einen geringeren Knochenkontakt als TICER® aufweist. Da das jedoch auch höheren Regelsystemen, die in der Zellkultur ausgeblendet sind, zugeschrieben werden kann, dürften die in diesem Zusammenhang gewonnenen Messwerte kein oder kein signifikanter Prediktor für den klinisch zu erwartenden Osseointegrationsprozess sein.

Eine mögliche Begründung für diesen Sachverhalt liefern SCHNEIDER et al. (2004). Sie zeigen, dass die Mikrotopographie einen entscheidenden Einfluss auf die Osteoblastenproliferation hat. In der genannten Arbeit kamen -wie in unserem Versuch- gerillte Oberflächen zum Einsatz. Es wurde gezeigt, dass die Osteoblastenproliferation und -anhaftung auf rauer und gerillter Oberfläche annähernd gleich waren. Die Osteoblasten nutzen die Rillen offensichtlich als Leitschiene zur Anhaftung und Orientierung.

### 5.3 Diskussion der Ergebnisse

Die Interaktion zwischen künstlicher Implantatoberfläche und lebendem Gewebe ist hochkomplex und bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Entscheidend für eine suffiziente Verankerung der Implantatmaterialien im Knochen ist die Art des Verbundes zwischen Implantatoberfläche und Knochen. Man geht davon aus, dass Zelladhäsion, Gewebewachstum und somit Osseointegration von den Oberflächeneigenschaften des Implantates abhängen (BAGNO und DI BELLO 2004). In der Literatur ist heute zu finden, dass für einen stabilen Verbund zwischen Knochen und Implantat in erster Linie die physikalischen Eigenschaften der Implantatoberfläche zu betrachten sind (SCHWARTZ et al. 1996, 1997; CHEHROUDI et al. 1989, 1990; DEN BRABER et al. 1998; CHOU et al. 1995, 1998; BOWERS et al. 1992; ONG et al. 1997).

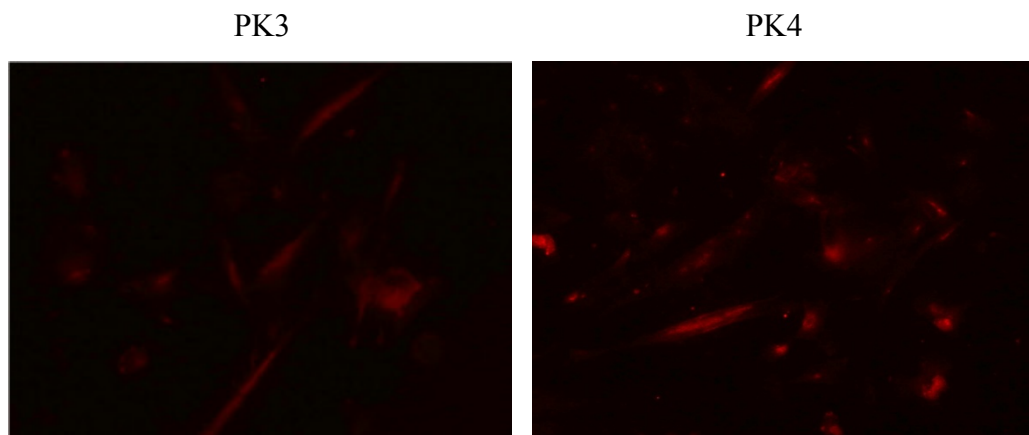
Auf der modifizierten Oberfläche lagern sich während der Osseointegration körpereigene Proteine an. Diese durch Knochenzellen gebildeten Proteine sind für den Start und die Organisation des Interfaces zwischen Implantat und Knochengewebe verantwortlich. Sie binden u.a. Hydroxylapatit und Kalzium, vermitteln Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen und ermöglichen das Heranwachsen von Kapillaren, Gewebe und Osteoprogenitorzellen an das Implantat.

Die quantitative Auswertung der BSP-Expression zeigt zum Versuchsbeginn hohe Werte auf PK3 und PK4. Die übrigen Experimentaloberflächen weisen zu diesem Zeitpunkt geringere Werte auf. Die Analyse der BSP-Expression über den gesamten Versuchszeitraum zeigt, dass auf PK4 die größte Menge an BSP -verglichen mit den anderen Experimentaloberflächen- gebildet wurde. Die auf PK4 aufgebrachte Oberfläche weist als einzige Experimentaloberfläche regelmäßig signifikante Unterschiede zu allen drei Standardoberflächen bezüglich der BSP-Expression auf.

Das Potenzial von BSP, an Hydroxylapatitkeime in vitro zu binden (HUNTER und GOLDBERG 1993) -in Kombination mit dem Auftreten während der frühen Mineralisationsphase des Knochengewebes (CHEN et al. 1991, YAO et al. 1994)- lässt die Vermutung zu, dass es eine wichtige Rolle bei der Initialisierung der Mineralisierung von Geweben in vivo hat (HUNTER und GOLDBERG 1993).

Analog der Messwerte könnte man in diesem Zusammenhang ableiten, dass die Oberflächenmodifikation auf PK4 vorteilhaft bei der Initialisierung des Mineralisierungsprozesses -im Vergleich mit den anderen Experimentaloberflächen- sein könnte. Der versuchstagspezifische, vorläufige Maximalwert aller Experimentaloberflächen

wurde auf PK3 am 3. VT gemessen. Dieser geht jedoch mit einer erheblichen Standardabweichung einher. Interessant ist weiterhin, dass auf allen Oberflächen, außer der auf PK3, die Messwerte vom 7. auf den 10. VT sinken. Die systemisch zum Versuchsende sinkenden Werte könnten mit einer geringeren Knochenzellproliferation zu erklären sein. Unter alleiniger Betrachtung der statistischen Ergebnisse gibt es bezüglich der BSP-Expression kaum Unterschiede zwischen PK3 und dem Negativstandard. Einzig die auf PK3 zum Versuchsbeginn ermittelten hohen Messwerte weisen auf Unterschiede zum PK8 hin. Ein ähnliches Bild zeigt sich auch bei Betrachtung der BSP-Messwerte von PK1. Auch hier gibt es kaum Unterschiede zum Negativstandard, jedoch Signifikanzen zu beiden Positivstandards. PK2 zeigt über die vollständige Versuchsdauer keine signifikanten Unterschiede zum Negativstandard sowie dem metallenen Positivstandard. Im Vergleich zum keramischen Positivstandard sind jedoch über den gesamten Versuchszeitraum signifikante Ergebnisse messbar. Wie bereits erwähnt, ist die Oberfläche des Negativstandards maschinert. Deswegen ist eine Anheftung der Osteoblasten an bzw. in die vorhandenen Rillen im Sinne einer Leitlinie nicht auszuschließen. Somit sind Ähnlichkeiten zum Negativstandard in diesem Zusammenhang nicht zwangsläufig als schlecht zu bewerten. Dieses wird auch durch die kaum statistisch nachweisbaren Unterschiede zwischen dem Negativstandard und dem metallenen Positivstandard deutlich.



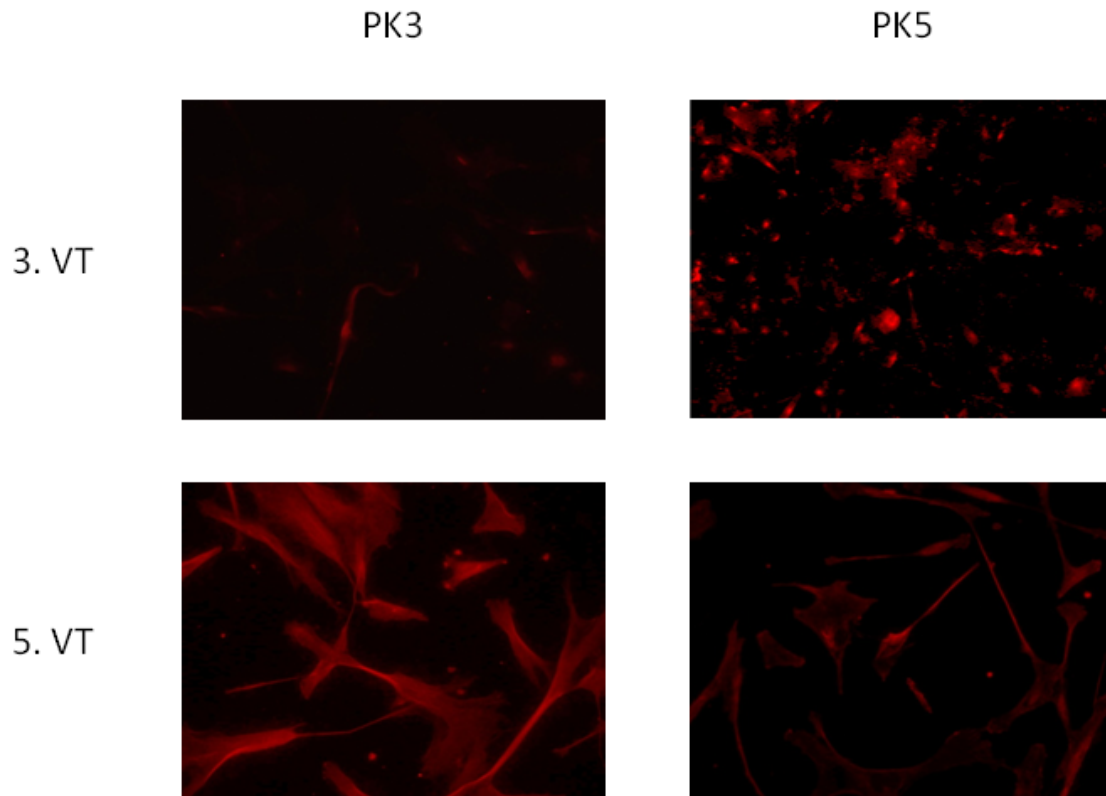
**Abbildung 24:** Vergleich der Expression von BSP (rot) auf den Probekörpern 3 und 4 am 3. Versuchstag in Kultur. Rhodamin-Färbung. Zwanzigfache Vergrößerung.

Die Auswertung der gemessenen OC-Messwerte der Experimentalprobekörper zeigt vor allem am 3. und 5. VT ein sehr uneinheitliches Bild. In dieser Phase des Versuches ist eine hohe Streuung der Werte zu erkennen. Diese Streuung lässt den Schluss zu, dass sich die Zellen auf den einzelnen Probekörpern in unterschiedlichen Wachstumsstadien bzw.

Differenzierungsstadien befinden. Erst ab dem 7. VT zeichnet sich ein einheitlicheres Bild ab. Das bedeutet, dass die Zellkultur gerade in der Anfangsphase des Versuches deutlich messbar und unterschiedlich empfindlich auf die modifizierten Oberflächen reagiert hat. Die größte Menge Osteocalcin wurde während der gesamten Versuchszeit auf PK3 ermittelt. Osteocalcin wird als Marker für fortgeschrittene, differenzierte Osteoblasten angesehen. Die Zunahme der Osteocalcinmenge wird als weitere Differenzierung dieser interpretiert (BATZER et al. 1998). Durch Carboxylierungsvorgänge innerhalb des Proteins während der Produktion erhält Osteocalcin eine negative Ladung, wodurch die Wechselwirkung mit Kalzium ermöglicht wird (LÖFFLER et al. 2002). Diese Kalziumbindung löst eine Konformationsänderung aus, welche mit der hohen Affinität zu Hydroxylapatit übereinstimmt (ATKINSON 1995, DELMAS 1984). Erhöhte Osteocalcinkonzentrationen treten beim Knochenaufbau auf. Es wird angenommen, dass Osteocalcin die Hydroxylapatitbildung in der Knochenmatrix induziert. Die Zahl der differenzierten Osteoblasten könnte initial -auf Grund der hohen Messwerte in der ersten Versuchshälfte- auf PK3 und PK5 höher liegen als auf den anderen Experimentaloberflächen. Zudem werden auf PK3 während der Versuchsreihe summiert die zweithöchsten Messwerte an OC -verglichen mit allen anderen Probekörpern- ermittelt. PK5 zeigt am 3. und 5. VT signifikante Ergebnisse bezüglich der OC-Expression zum Negativstandard und zum metallenen Positivstandard. Gegen Versuchsende sind diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede messbar. Deutlich erkennbar ist, dass auf PK5 am 3. VT eine hohe Expression und damit ein relativ hohes Maß an differenzierten Zellen erreicht wird, während auf PK1 und PK3 dieses erst am 5. VT zu verzeichnen ist. PK1 weist im Vergleich zum keramischen Positivstandard über die gesamte Versuchsdauer signifikante Unterschiede auf, wogegen Signifikanzen zum Negativstandard und metallenen Positivstandard nur am 5. VT und 10. VT auftreten.

Aus dem Umstand, dass auf allen Oberflächen, außer der auf PK5, auf einen hohen Wert an Osteocalcin ein geringerer Wert folgt, könnte man schließen, dass nach der Ausschüttung von OC durch die Zelle, diese einen Zustandswechsel durchführt. Die geringste OC-Expression wurde auf PK4 erreicht. Das erst am 10. VT gemessene vorläufige Maximum könnte darauf hindeuten, dass diese Oberfläche gerade in der Anfangsphase des Versuches nur ein geringes Zelldifferenzierungspotenzial aufweist. Der Rückgang der Osteocalcinmenge auf einigen der getesteten Oberflächen gegen Versuchsende könnte durch die Ausbildung eines Filmes von extrazellulärer Matrix auf rauen Oberflächen durch genügend Knochenzellen begründet sein. Dieser würde zu einem Rückgang der Oberflächenrauheit führen. Somit ist der Anreiz zur weiteren Osteocalcinsekretion nicht mehr vorhanden. Eine erhöhte Rauheit der Oberfläche

wurde von vielen Autoren (LIN et al. 1997, MUSTAFA et al. 2001, BANNISTER et al. 2002, BOYAN et al. 2001, 2003) mit gesteigerter Osteocalcinproduktion in Verbindung gebracht. Da die Oberflächenrauheit in unserem Versuch nicht ermittelt wurde, fällt letztere Aussage jedoch in den Bereich einer Spekulation.



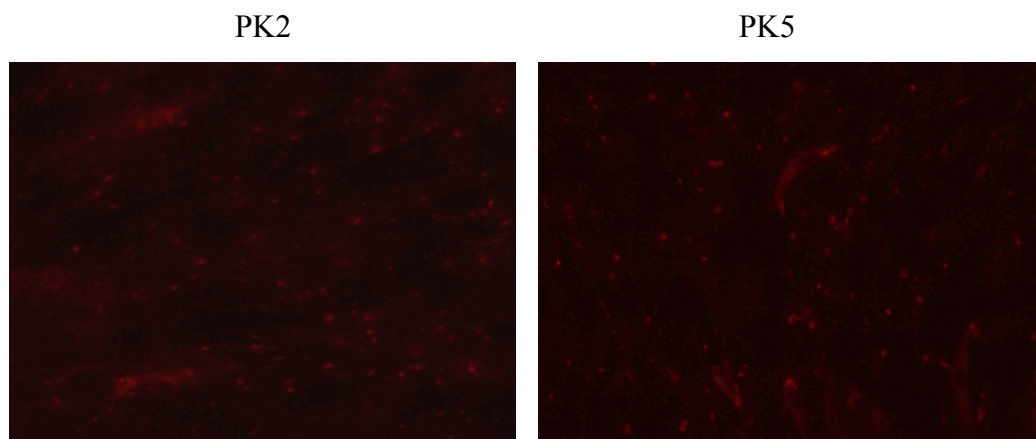
**Abbildung 25:** Vergleich der Expression von Osteocalcin (rot) auf den getesteten Probekörpern am 3. bis 10. Versuchstag in Kultur. Rhodamin-Färbung. Zwanzigfache Vergrößerung.

Die Betrachtung der gewonnenen ON-Messwerte der Experimentaloberflächen zeigt ein eher statisches System. Demzufolge sind die Unterschiede in Bezug auf die ON-Expression zwischen den einzelnen Experimentalprobekörpern -abgesehen von PK2 und PK5- als sehr gering einzuschätzen. Die höchste Osteonectin-Expression aller Experimentaloberflächen wurde im Versuchsverlauf auf dem PK5 gemessen. Osteonectin ist ein Marker der Umbauprozesse innerhalb des Knochens. Es steuert die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen (LANE und SAGE 1994) und ist somit wichtig für die Organisation der extrazellulären Knochenmatrix und die Wundheilung. (BASU et al. 2001). Weiterhin dient es wahrscheinlich der Quervernetzung und damit Stabilisierung der extrazellulären Matrix des Knochens (AESCHLIMANN et al. 1995, HOHENADL et al. 1995). Davon ausgehend, dass Osteonectin eine wichtige Rolle bei der Organisation der extrazellulären Matrix spielt, könnte anhand der gewonnenen Daten PK5 im Vergleich mit den anderen Experimentaloberflächen

dbzgl. Vorteile besitzen. Die auf PK5 ermittelten konstant hohen Werte lassen zudem darauf schließen, dass auf dieser Oberfläche über die vollständige Versuchsdauer eine Vielzahl durch Zellwachstum und Zellteilung verursachte Umbauprozesse stattfinden. Die daraus resultierende erhöhte Notwendigkeit der Organisation, reguliert u.a. durch die ON-Expression, ist ebenfalls auf PK2 zu verzeichnen, jedoch nicht so ausgeprägt wie auf PK5. Vom 3. zum 5. Versuchstag kommt es auf allen Oberflächen zu einem Anstieg der ON-Expression. Dieses könnte u.U. mit einer Erhöhung der Zellzahl und der damit verbundenen erhöhten Notwendigkeit der durch ON vermittelten Organisation zu erklären sein. Am 7. VT ist auf PK1 und PK3 ein Rückgang der Messwerte zu verzeichnen, der mit einem erhöhten Zellwachstum und verringerter Zellteilung zu begründen sein dürfte. Zum Versuchsende fallen die Werte auf PK1 und PK2 ab wogegen sie auf PK3 und PK4 ansteigen. Der Anstieg der Osteonectinproduktion auf PK3 und PK4 gegen Versuchsende könnte darauf hindeuten, dass die Prozesse der Organisation der extrazellulären Knochenmatrix auf den Probekörperoberflächen über den 10. VT hinaus andauern. Aussagen über den weiteren Verlauf sind dabei aufgrund des Versuchsaufbaus nicht möglich. Es bleibt zu vermuten, ob dieser Umstand einen positiven Einfluss auf die Osseointegration hat. PK1-4 weisen im Vergleich zum keramischen Positivstandard über die gesamte Versuchsdauer (außer PK2 am 7. VT) signifikante Unterschiede auf. Wohingegen Signifikanzen zum Negativstandard und metallenen Positivstandard auf PK1 nur am 10. VT, auf PK2 am 7. VT und PK4 ebenfalls am 7. VT auftreten. Auf PK2 und PK3 wurden signifikante Ergebnisse zum metallenen Positivstandard am 3. VT ermittelt.

Die geringen Unterschiede der ON-Messwerte der PK1 bis 4 im Vergleich zu der klinisch etablierten TICER®-Oberfläche könnten darauf schließen lassen, dass diese gegenüber dem metallenen Positivstandard keine wesentlichen Vorteile im Zusammenhang mit einer beschleunigten Osseointegration besitzen. Da jedoch PK5 vor allem am 5. und 7. VT signifikant höhere Messwerte erreicht und zudem am 3. und 7. VT keine signifikanten Unterschiede bezüglich der ON-Messwerte verglichen mit dem keramischen Positivstandard zeigt -welcher seinerseits über die vollständige Versuchsdauer signifikant zum metallenen Positivstandard ist- könnten die Modifikationen auf PK5 eine Verbesserung der Osseointegration bedingen. Wobei die Frage, ob eine hohe Menge an ON über einen längeren Zeitraum zu einer deutlichen Beschleunigung der Osseointegration führt -unter Berücksichtigung des aktuellen Standes der Wissenschaft- derzeit nicht beantwortet werden kann. In den Versuchen von GRAF et al. (2009) konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche

Fluoridbeigabe einen noch größeren Effekt auf die Osteonectinexpression haben kann. Dieses deckt sich mit den Ergebnissen von COOPER et al., welche eine gesteigerte Differenzierung von Osteoblasten durch Fluoridmodifikationen erreichten. Die in unserem Versuch verwendete zusätzliche Fluoridbeigabe auf den Oberflächen der Probekörper 1-3 scheint, in den verwendeten Konzentrationen, keine relevanten Effekte auf die Osteonectinproduktion zu haben. Signifikante Unterschiede, bezüglich der Osteonectinproduktion sind nur am 7. und 10. Versuchstag zwischen PK1 und PK3 vorhanden. An allen anderen Versuchstagen gibt es diesbezüglich keine Unterschiede zwischen PK1, PK2 und PK3. Somit scheint die Verwendung von Fluor in Verbindung mit Depositionstechniken von Zirkonoxiden auf metallenen Grundkörpern in dieser Kurzzeituntersuchung keinen messbaren Einfluss auf das Zellverhalten zu haben.



**Abbildung 26:** Vergleich der Expression von Osteonectin (rot) auf den getesteten Probekörpern am 7. Versuchstag in Kultur. Rhodamine-Färbung. Zwanzigfache Vergrößerung.

Bei der Analyse der TGF- $\beta$ -Expression ist eine systemische Streuung ab dem 7. Versuchstag festzustellen. Die höchste Menge des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  wurde über den vollständigen Versuchszeitraum auf dem keramischen Positivstandard (PK6) ermittelt. TGF- $\beta$  vermittelt eine Vielzahl von biologischen Antworten und ist unter anderem an der Induktion der epithelialen und mesenchymalen Proliferation beteiligt. Zudem stimuliert er die Angiogenese und gilt als wichtiger Bestandteil bei der Bildung von extrazellulärer Matrix. Bei Betrachtung der Wertetabelle und Standardabweichung zeigt sich, dass die zwischen den Experimentaloberflächen gemessenen Differenzen in Größenordnungen der Zufallswahrscheinlichkeit liegen könnten. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Erkenntnissen von MUSTAFA et al. (2003), dass die Oberflächenrauheit keinen Einfluss auf die Menge des exprimierten TGF- $\beta$  hat. Die Messwerte stehen im Gegensatz zu in der Literatur



beschriebenen hohen TGF- $\beta$ -Produktion in der frühen Phase der Osteoblastendifferenzierung (Joyce et al. 1990, Bolander 1992). Eine mögliche Erklärung wäre, dass es im vorliegenden Versuch nicht zu einer Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen zu Osteoblasten kommt, sondern dass die verwendeten Zellen bereits Osteoblasten waren. Ein weiterer Grund könnte sein, dass das gemessene TGF- $\beta$  größtenteils in den Zellen vorliegt. Die stimulierende Wirkung auf Osteoblasten wird jedoch zum größten Teil durch autokrine Sekretion erreicht. Somit wird TGF- $\beta$  in vivo als inaktive Vorstufe in der Knochenmatrix gespeichert. Beim Abbau durch Osteoklasten wird es freigesetzt, durch proteolytische Prozesse aktiviert, um dann auf Osteoblasten zu wirken.

Dieser komplexe Vorgang kann in vitro nicht nachgestellt werden, so ist es denkbar, dass die Messaussage der TGF- $\beta$ -Expression verfälscht wird. Ungeachtet dessen ergab die statistische Untersuchung der TGF- $\beta$ -Messwerte -wie im Ergebnisteil dieser Arbeit dargestellt- vereinzelt signifikante Ergebnisse im Vergleich der Experimentaloberflächen mit den Standardoberflächen. Ob jedoch diese geringen Unterschiede eine Aussage über die Osteokompatibilität der einzelnen Experimentaloberflächen möglich machen, scheint fraglich.

Nachwievor kann die Frage, ob große Mengen sekretierter Knochenproteine eine gute Osseointegration im klinischen Alltag bedingen, nicht eindeutig beantwortet werden. Im Bezug auf die Funktionen der Knochenproteine bei der Osseointegration ist jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit von einem Zusammenhang zwischen vermehrter Sekretion und einer störungsfreien Osseointegration auszugehen. Gemessen am metallenen Positivstandard TICER® scheinen vor allem der PK3 (ZSG  $\frac{1}{2}$ ), PK4 (ZS4-0,5) und PK5 (ZS4-2) Oberflächenmodifikationen zu besitzen, die zu einer Verbesserung der Osteokompatibilität führen könnten. Im Ergebnis dieser Studie lässt sich jedoch keine der untersuchten Experimentaloberflächen grundsätzlich von weiterführenden Untersuchungen ausschließen.

Die vorliegenden Ergebnisse belegen auch, dass nahezu alle Messwerte auf reinem Zirkon (PK6) absolute Höchstwerte erreichen. Demzufolge scheint der in diesem Versuch als keramischer Positivstandard verwendete Probekörper CERCON® als Implantatwerkstoff gute biologische Eigenschaften zu besitzen. Dieser Umstand ist zunächst als sehr positiv zu werten, bedenkt man die bereits von KOHAL et al. (2003) beschriebenen ästhetischen Vorteile von Zirkoniumdioxidimplantaten gegenüber Titanimplantaten speziell im Fall eines Knochen oder Bindegewebsverlustes im Bereich der Frontzähne. Wie jedoch aus der Literatur bekannt ist, verlieren die Fibrinfasern speziell auf glatten Zirkonoberflächen nach Kontraktion

ihren Kontakt mit der Implantatoberfläche. Andererseits wird dieses Fibrinnetz als Maß für eine schnelle Osseointegration, vor allem für gestrahlte und geätzte Oberflächen, angesehen. Die Untersuchungen von GAHLERT et al. (2007) zeigen, dass insbesondere glatte Zirkonoberflächen deutlich geringere RTQs (mean removal torque tests) aufweisen als vergleichsweise raue Zirkonoberflächen bzw. raue Titanoberflächen. Das lässt den Schluss zu, dass die Verbundstärke zwischen Implantat und Knochen bei glatten Zirkonoberflächen deutlich reduziert ist. Demzufolge stellt sich die Frage, ob alle als Parameter verwendeten Knochenmarker im Fall von Probekörper 6 geeignet sind, die Osseointegrationsfähigkeit der Oberfläche darzustellen, oder ob die erhöhte Markerexpression auf dem keramischen Positivstandard als überschießende Reaktion der Knochenzellen auf das Fehlen der Leitschiene in Form des Fibrinnetzes anzusehen ist. Denkbar wäre, dass eine solche Reaktion in vivo durch komplexe Mechanismen reguliert wird, jedoch in vitro ungehindert abläuft. Eine uneingeschränkte Freigabe von Zirkonmischoxiden als Implantatwerkstoff erscheint - obgleich der Studien von ANDREOTELLI et al. (2009)- derzeit auf Grund fehlender klinischer Langzeitstudien nicht sinnvoll. In Anbetracht der aktuellen Studienlage dürfte die Untersuchung und Entwicklung eines mit Keramik beschichteten Titan-Implantates am ehesten geeignet sein, einen Brückenschlag zwischen den exzellenten Eigenschaften von Titan und den ästhetischen Vorzügen der Keramik zu ermöglichen.

Die Unterschiede in den Ergebnissen der Untersuchungen zur Expression von OC, ON, BSP und TGF- $\beta$  auf den beschriebenen Implantatoberflächen lassen die Spekulation zu, dass es zwei Wege der Osseointegration geben könnte. Dieser mögliche Zusammenhang wurde bereits von Hofmann (2009) beschrieben. Während viele Oberflächenmodifikationen eine Osseointegration durch zelluläre Reaktionen auslösen, ist für subtraktiv bearbeitete Oberflächen die Einheilung über einen azellulären Weg denkbar. In diesem Zusammenhang würde die Einscheidung des Implantatkörpers durch Kalzium- und Phosphationen aus der Umgebung ohne Beteiligung von Zellen erfolgen. Diese Ionen müssten sich nach Anlagerung an die Implantatoberfläche in kristalline Strukturen umwandeln. Subtraktiv bearbeitete Oberflächentypen würden folglich nicht durch biologische, sondern durch physikalisch-chemische Reaktionen osseointegrieren. Unter Berücksichtigung dieser Möglichkeit müsste man zu dem Schluss kommen, dass unsere Versuchsmethode nicht gänzlich geeignet für subtraktiv bearbeitete Oberflächen ist, da als Messgrößen ausschließlich Proteine dienen, wie sie bei zellulär bedingten Mechanismen vorkommen. Man könnte des Weiteren davon ausgehen, dass die Osteoblastenproliferation durch subtraktiv erzeugte

Oberflächenvergrößerung zu einem späteren Zeitpunkt erfolgt. Das würde wahrscheinlich bedeuten, dass die subtraktive Oberflächenmodifikation zu einer langsameren Osseointegration in vivo führt. Diese Hypothese wird jedoch durch klinische Beobachtungen nicht bestätigt (Hofmann 2009).

Weitere Kausalitätsvermutungen driften, allein der eingesetzten Probekörpermenge wegen, in den Bereich der Spekulation. Es empfiehlt sich eine Versuchswiederholung mit mind. 6 Probekörpern pro Standzeit und Marker.

## **5.4 Ausblick**

Weiterführende Untersuchungen sind nötig, um die Osteokompatibilität von Zirkoniummischoxiden auf der Implantatoberfläche nach weiterer Modifikation zu überprüfen. Die spezifischen Schwierigkeiten, die mit Oberflächenbehandlungen bei diesem Werkstoff einhergehen, wurden im Kapitel 2 eingehend beschrieben. Sie werden auch zukünftig die Übertragbarkeit der mit Titan erreichten Ergebnisse auf Zirkoniummischoxidschichten limitieren. Sofern es möglich ist, analog der Entwicklung bei Titan-Implantaten, die Rauheit von Zirkoniummischoxidschichten weiter zu steigern, ist auch für diese eine vergleichbar gute und stabile Einheilung denkbar.

## 6. Zusammenfassung

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

**In vitro Osteokompatibilitätstestung  
strukturierter „Zirkoniummischoxidschichten“  
in der humanen enoralen Knochenzellstruktur**

eingereicht von  
Ingo Buttchereit  
geboren am 10.09.1983 in Sangerhausen

angefertigt in der  
Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie  
am  
Friedrich-Louis-Hesse-Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde und  
Orale Medizin der Universität Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. med. dent. habil. Hans-Ludwig Graf  
Prof. Dr. rer. nat. habil. Heidegard Hilbig

September 2011

Inhalt der vorliegenden Arbeit ist der Vergleich von 5 neu entwickelten Zirkoniummischoxid-Implantatoberflächen mit 3 Standardoberflächen in einer humanen Knochenzellkurzzeitkultur über 10 Tage. Als Parameter dienten die nonkollagenen Knochenmatrixproteine Osteocalcin, Osteonectin, Bone Sialo Protein sowie der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ . Es sollte an Hand der Messwerte versucht werden, die Reaktion der Zellkultur auf die Zirkoniummischoxide an der Grenzfläche näher zu untersuchen. Das geschah mit der Absicht, einen Beitrag für den zukünftigen Einsatz von Zirkoniummischoxiden auf der Implantatoberfläche zur Optimierung der Osseointegration dentaler Implantate in vivo zu leisten. Die 5 Experimentaloberflächen wurden mit dem keramischen Positivstandard CERCON® (PK6) verglichen, bei welchem es

sich um eine reine yttriumstabilisierte Zirkoniumdioxidkeramik handelt. Des Weiteren wurden die Zirkoniummischoxidmodifikationen mit dem metallenen Positivstandard TICER® (PK7) verglichen, welcher seit geraumer Zeit klinisch etabliert ist. Als Negativstandard wurde in diesem Versuch maschinenbearbeitetes, kommerzielles, reines Titan (PK8) verwendet. Die Herstellung der experimentellen Oberflächen erfolgte mittels elektrochemischer Konversion, einer Depositionstechnik von Zirkonoxiden auf metallenen Grundkörpern. Das Kernmaterial aller verwendeten Experimentalprüfkörper ist Titan. Die experimentellen Oberflächen unterscheiden sich jedoch in Bezug auf die Oberflächenbeschaffenheit und chemische Zusammensetzung. Zu prüfen war, inwieweit die Zirkoniummischoxidmodifikationen der Experimentaloberflächen einen Einfluss auf die Expression von Knochenproteinen besitzen.

Die Messung der von den an gezüchteten Zellen sekretierten Knochenproteine BSP, OC, ON und TGF- $\beta$  erfolgte jeweils am 3., 5., 7. und 10. Versuchstag. Für jeden Versuchstag standen 4 präparierte Objektträger mit je 8 Probekörpern zur Verfügung. Unter Verwendung des TRITC-Filters konnte fluoreszenzoptisch die Expression der Knochenproteine sichtbar gemacht werden. Die notwendigen Messungen wurden mit 200-facher Vergrößerung an jeweils 10 Messpunkten pro Probekörper durchgeführt. Die versuchsrelevanten Bildaufnahmen wurden mit der digitalen Kamera Axio Cam über eine Mehrkanalaufnahme aufgezeichnet. Mit Einsatz der Software AxioVision sind für jedes Messfeld die Belichtungszeit (rot) und der Grauwert (rot) im Rahmen der Untersuchung für die Osteogenese bestimmt worden. In Folge dessen wurde unter Verwendung des Kruskal-Wallis-Tests statistisch bestimmt, ob es insgesamt signifikante Unterschiede gibt, bevor mit dem Mann-Whitney-U-Test in Einzelvergleichen geprüft wurde, welche Probekörper sich bezüglich der untersuchten Parameter unterscheiden.

Die quantitative Erhebung der Expression des Bone Sialo Proteins ergab, dass auf dem keramischen Positivstandard (Probekörper 6/CERCON®) und Probekörper 4 (ZS4-0,5) die größten Mengen dieses für die Osseointegration benötigten Faktors gebildet wurden. Ein vorläufiges absolutes Maximum an BSP konnte am 3. Versuchstag auf Probekörper 3 (ZSG ½) ermittelt werden. Dieses Ereignis geht jedoch mit einer erhöhten Standardabweichung einher. Es wäre denkbar, dass die Konfiguration auf Probekörper 4 (ZS4-0,5) Vorteile bei der Initialisierung der Mineralisierung von Geweben in vivo im Vergleich mit den anderen Experimentaloberflächen besitzt.

Die größte Menge an Osteocalcin konnte während der Versuchszeit auf dem Probekörper 3 (ZSG ½) und dem keramischen Positivstandard (Probekörper 6/CERCON®) ermittelt werden. Es erscheint deshalb wahrscheinlich, dass die Oberfläche auf Probekörper 3 (ZSG ½) im Vergleich mit den anderen Experimentaloberflächen bessere Bedingungen für die Osteoblastendifferenzierung besitzen könnte.

Während der gesamten Versuchszeit konnte die höchste Sekretion von Osteonectin auf dem keramischen Positivstandard (Probekörper 6/CERCON®) und dem Probekörper 5 (ZS4-2) ermittelt werden. Geht man davon aus, dass Osteonectin eine wichtige Rolle bei der Organisation der extrazellulären Matrix und der Wundheilung per se spielt, wäre eine diesbezüglich Vorteilhaftigkeit des Probekörpers 5 (ZS4-2) -im Vergleich mit den anderen Experimentaloberflächen- denkbar.

Die höchste Menge des Wachstumsfaktors TGF-β konnte über den gesamten Versuchszeitraum auf dem keramischen Positivstandard (Probekörper 6/CERCON®) ermittelt werden. Unter Berücksichtigung der für die Experimentaloberflächen gewonnen Messwerte und der durchgeführten Signifikanztestung ist es denkbar, dass die hierbei aufgetretenen Differenzen in Größenordnung der Zufallswahrscheinlichkeit liegen. Grund für eine eventuell aufgetretene Verfälschung der Ergebnisse könnte die in vitro nicht darstellbare, jedoch in vivo ablaufende Freisetzung einer inaktiven Vorstufe von TGF-β aus der Knochenmatrix durch Osteoklasten sein.

Der hier durchgeführte Versuch zeigt, dass vor allem die Zirkoniummischoxidkonfigurationen der Experimentaloberflächen 3 (ZSG ½), 4 (ZS4-0,5) und 5 (ZS4-2) die Sekretion spezieller Knochenproteine, im Vergleich zu den anderen Experimentaloberflächen sowie den metallenen Positivstandard und dem Negativstandard begünstigen.

Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit zeigt jedoch auch, dass nahezu alle Messwerte auf reinem Zirkon (Probekörper 6/CERCON®) absolute Höchstwerte erreichen. Daraus könnte man schlussfolgern, dass CERCON® als Implantatwerkstoff gute biologische Eigenschaften besitzt. Entsprechende klinische Langzeitstudien zum Einsatz von reinen Zirkonimplantaten stehen bis dato noch aus. Die Verwendung eines reinen Zirkonimplantates bzw. eines mit Zirkon beschichteten metallenen Grundkörper könnte vor allem im Frontzahngebiet bei einem Mangel an Knochen- und Bindegewebe zu einem langfristig ästhetisch besseren Ergebnis

führen. Ungeachtet dessen stellen die physikalischen Eigenschaften des Zirkons eine Limitation für die klinische Anwendbarkeit dar da bei der Oberflächenaufrauung Risse und Spalten im Gefüge des Materials auftreten, welche die Stabilität erheblich beeinträchtigen.

Weiterführende Untersuchungen mit den verwendeten Experimentaloberflächen erscheinen auf Grund der gewonnenen Daten sinnvoll. Im klinischen Alltag dürfte das zahnfarbene Aussehen des Implantates ein gewichtiger Grund für eine mit Zirkoniummischoxiden beschichtete Titanoberfläche sein.

## Literaturverzeichnis

**Abrahamsson, I., Zitzmann, N. U., Berglundh, T., Wennerberg, A., Lindhe, J.** (2001): Bone and soft tissue integration to titanium implants with different surface topography: an experimental study in the dog. *Int J Oral Maxillofac Impl*, 16: 323-332.

**Adilstam, F., Iverhed, M.** (2003): Method and Arrangement for a Dental Installation, Patent SE 0302539-2. 24.09.2003.

**Aeschlimann, D., Kaupp, O., Paulsson, M.** (1995): Transglutaminase-catalyzed matrix cross-linking in differentiating cartilage: identification of osteonectin as a major glutaminyl substrate. *J Cell Biol.* 129(3), 881-92.

**Akagawa, Y., Hosokawa, R., Sato, Y., Kamayama, K.** (1998): Comparison between freestanding and tooth-connected partially stabilized zirconia implants after two years' function in monkeys: a clinical and histologic study. *J Prosth Dent*, 80 (5): 551-558.

**Akagawa, Y., Ichigawa, Y., Nikai, H., Tsuru, H.** (1993): Interface histology of unloaded and early loaded partially stabilized zirconia endosseous implant in initial bonehealing. *The journal of prosthetic dentistry* 69 (6): 599-604.

**Albrektsson, T., Branemark, P.-I., Hansson, H.-A., Karemo, B., Larsson, K., Lundström, I., McQueen, D.H., Skalak, R.** (1983): The interface zone of inorganic implants in vivo: titanium implants in bone. *Ann Biomed Eng*, 11: 1-27.

**Albrektsson, T., Hansson, H.A., Ivarsson, B.** (1985): Interface analysis of titanium and zirconium bone implants. *Biomater*, 6: 97-101.

**Atkinson, RA., Evans, JS., Hauschka, PV., Levine, BA., Meats, R., Triffitt, JT., Viridi, AS., Williams, RJ.** (1995): Conformational studies of osteocalcin in solution. *Eur. J. Biochem.* 232, 515-521.

**Bagno, A, Di Bello, C.** (2004): Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials. *J Mater Sci Mater Med.* 2004 Sep; 15(9):935-49.



**Bannister, S.R., Lohmann, C.H., Liu, Y., Sylvia, V.L., Cochran, D.L., Dean, D.D., Boyan, B.D., Schwartz, Z.** (2002): Shear force modulates osteoblast response to surface roughness. *J Biomed Mater Res.* 60(1), 167-74.

**Bassuk, J.A., Birkebak, T., Rothmier, J.D., Clark, J.M., Bradshaw, A., Muchowski, P.J., Howe, C.C., Clark, J.I. and Sage, E.H.** (1999): Disruption of the SPARC locus in mice alters the differentiation of lenticular epithelial cells and leads to cataract formation. *Exp. Eye Res.* 68, 321-331.

**Basu, A., Kligman, L.H., Samulewicz, S.J., Howe, C.C.** (2001): Impaired wound healing in mice deficient in a matricellular protein SPARC (osteonectin, BM-40). *BMC Cell Biol.* 2:15.

**Batzer, R., Liu, Y., Cochran, D.L., Szmuckler-Moncler, S., Dean, D.D., Boyan, B.D., Schwartz, Z.** (1998): Prostaglandins mediate the effects of titanium surface roughness on MG63 osteoblast-like cells and alter cell responsiveness to 1 alpha,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. *J Biomed Mater Res.* 41(3), 489-96.

**Bianco, P., Fisher L.W., Young M.F., Termine J.D., Robey P.G.** (1991): Expression of Bone Sialo Protein (BSP) in developing human tissues. *Calcif Tissue Int.* 49: 421-426.

**Blom, E.J., Klein-Nulend, J., Klein, C.P.A.T., Kurashina, K., van Waas, M.A.J., Burger, E.H.** (2000): Transforming growth factor-β1 incorporated during setting in calcium phosphate cement stimulates bone cell differentiation in vitro. *J. Biomed Mater Res* 50, 67-74.

**Bolander, M.E.** (1992): Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med.* 200(2), 165-70.

**Bowers, K., Keller, J., Randolph B., Wick, D., Michaelis C.** (1992): Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants* 7, 302-10.

**Boyan, B.D., Lincks, J., Lohmann, C.H., Sylvia, V.L., Cochran, D.L., Blanchard, C.R., Dean, D.D., Schwartz, Z.** (1999): Effect of surface roughness and composition on costochondral chondrocytes is dependent on cell maturation state. *Journal of orthopaedic research* 17 (3): 446-57.

**Boyan, B.D., Batzer, R., Kieswetter, K., Liu, Y., Cochran, D.L., Szmuckler-Moncler, S., Dean, D.D., Schwartz, Z.** (1998): Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to 1 alpha,25-(OH)2D3. *J Biomed Mater Res.* 39(1), 77-85.

**Boyan, B.D., Lohmann, C.H., Sisk, M., Liu, Y., Sylvia, V.L., Cochran, D.L., Dean, D.D., Schwartz, Z.** (2001): Both cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mediate osteoblast response to titanium surface roughness. *J Biomed Mater Res.* 55(3), 350-9.

**Boyan, B.D., Lossdorfer, S., Wang, L., Zhao, G., Lohmann, C.H., Cochran, D.L., Schwartz, Z.** (2003): Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies. *Eur Cell Mater.* 6, 22-7.

**den Braber, E.T., Jansen, H.V., de Boer, M.J., Croes, H.J., Elwenspoek, M., Ginsel, L.A., Jansen, J.A.** (1998): Scanning electron microscopic, transmission electron microscopic, and confocal laser scanning microscopic observation of fibroblasts cultured on microgrooved surfaces of bulk titanium substrata. *J Biomed Mater Res.* 40(5), 425-33.

**Branemark, P.-I., Breine, U., Adell, R., Hansson, B.O., Lindström, J. and Ohlsson, A.** (1969): Intra-osseous anchorage of dental protheses. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery* 3: 81-100.

**Brandt, H.H.** (1996): Einführung in die Implantologie. München: Wien: Baltimore: Urban und Schwarzenberg, 1-17.

**Brekken, R.A., Sage, E.H.** (2000): SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cellmatrix. *Matrix Biology* 19, 569-580.

**Brett, P.M., Harle, J., Salih, V., Milhoc, R., Olsen, I., Jones, F.H., Tonetti, M.** (2004): Roughness response genes in osteoblasts. *Bone* 35 (1): 124-33.

**Brunette, D.M.** (1988): The effects of implant surface topography on the behavior of cells. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 5: 360-367.

**Brunski, J.B.** (1992): Biomechanical factors affecting the bone dental implant interface." *Clin Mater*, 10: 153-201.

**Buser, D., Schenk, R.K., Steinemann, S., Fiorellini, J.P., Fox, C.H., Stich, H.** (1991): Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *Journal of biomedical materials research* 25 (7): 889-902.

**Buser, D., Beelser, U.C.** (1998): Fortschritte und aktuelle Trends in der oralen Implantologie. *Schweizer Monatszeitschrift Zahnmedizin* Vol. 108: 4 327-342.

**Buser, D., Nydegger, T., Oxland, T., Cochrane, D.L., Schenk, R.K., Hirt, H.P., Snetivy, D., Nolte, L.P.** (1999): Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. *Journal of biomedical materials research* 45 (2): 75-83.

**Cales, B., Stefanie, Y., Lilley, E.** (1994): Long-term in vivo and in vitro aging of a zirconia ceramic used in orthopaedy. *Journal of biomedical materials research* 28 (5):619-24.

**Chang, Y.S., Oka, M., Nakamura, T., Gu, H.O.** (1996): Bone remodelling around implant ceramics. *J Biomed Mat Res*, 30: 117-24.

**Chehroudi, B., Gould, T.R.L., Brunette, D.M.** (1989): Titanium coated micromachined grooves of different dimensions affect epithelial and connective tissue cells differently in vivo. *J Biomed Mater Res*. 23, 1067-85.

**Chehroudi, B., Gould, T.R.L., Brunette D.M.** (1990): Effects of a grooved titanium coated implant surface on epithelial cell behaviour, in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res*. 23, 1067-85.

- Chen, J.K., Shapiro, H.S., Wrana, J.L., Reimers, S., Heersche, J.N., Sodek, J.** (1991): Localization of Bone Sialo Protein (BSP) expression to sites of mineralized tissue formation in fetal rat tissues by in situ hybridization. *Matrix*. 11(2), 133-43.
- Christel, P., Meunier, A., Heller, M., Torre, J.P., Peille, C.N.** (1989): Mechanical properties and short-term in vivo evaluation of yttrium-oxide-partially-stabilized zirconia. *Journal of biomedical materials research* 23 (1): 45-61.
- Cochran, D. L., Simpson, J., Weber, H. P., Buser, D.** (1994): Attachment and growth of periodontal cells on smooth and rough titanium. *Int J Oral Maxillofac Impl*, 9: 289-297.
- Cooper, L.F., Zhou, Y., Takebe, J., Guo, J., Abron, A., Holmen, A., Ellingsen, J.E.** (2006): Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO(2) grit-blasted c.p. titanium endosseous implants. *Biomaterials*. 27(6), 926-936.
- Chou, L., Firth, J.D., Uitto, V.J., Brunette, D.M.** (1995): Substratum surface topography alters cell shape and regulates fibronectin mRNA level, mRNA stability, secretion and assembly in human fibroblasts. *J Cell Sci*. 108, 1563-73.
- Chou, L., Firth, J.D., Uitto, V.J., Brunette, D.M.** (1998): Effects of titanium substratum and grooved surface topography on metalloproteinase-2 expression in human fibroblasts. *J Biomed Mater Res*. 39, 437-45.
- Davies, J.E., Dziedzic, D.M.** (1996): Bone Growth in Metallic Bone Healing Chambers Faculty of Dentistry and Centre for Biomaterials at the University of Toronto. (Toronto, Ontario, Canada) Presented at the Fifth World Biomaterials Congress. Vol.2, S.124.
- Davies, J.E.** (1996): In Vitro Modeling of the Bone-Implant Interface. *The Anatomical Record* 245, 426-445.
- Davies, J.E.** (1998): Mechanisms of Endosseous Integration. *The International Journal of Prosthodontics*, Vol.11, No.5 391-401.

**Davies, J.E.** (2003): Understanding peri implant endosseous healing. *J Dent Educ*, 67: 932-94.

**Delmas, P.D., Stenner, D.D., Romberg, R.W., Riggs, B.L., Mann, K.G.** (1984): Immunochemical studies of conformational alterations in bone gamma-carboxyglutamic acid containing protein. *Biochemistry*. 23(20), 4720-5.

**Epple, M., Baeuerlein, E.** (2007): *Biom mineralisation: Medical and Clinical Aspects*. Weinheim: Wiley-VCH.

**Ferron, M. et al.** (2008): Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 105/-/2008: 5266-5270.

**Fisher, L.W., Mc Bride O.W., Termine J.D., Young M.F.** (1990): Human Bone Sialo Protein. Deduced protein sequence and chromosomal localization. *J Biol Chem*. 265:2347-2351.

**Fujisawa, R., Mizuno, M., Nodasaka, Y., Kuboki, Y.** (1997): Attachment of osteoblastic cells to hydroxyapatite crystals by a synthetic peptide (Glu7-Pro-Arg-Gly-Asp-Thr) containing two functional sequences of Bone Sialo Protein. *Matrix Biol*. 16: 21-28.

**Funk, S.E., Sage, E.H.** (1991): SPARC modulates cell cycle progression in bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2648-2652.

**Funk, S.E., Sage, E.H.** (1993): Differential effects of SPARC and cationic SPARC peptides on DNA synthesis by endothelial cells and fibroblasts. *J. Cell Physiol*. 154, 53-63.

**Ganss, B., R.H. Kim, et al.** (1999): Bone Sialo Protein. *Crit Rev Oral Biol Med* 10(1): 79-98.

**Gahlert, M. et al.** (2007): Biomechanical and histomorphometric comparison between zirconia implants with varying surface textures and ... . *Clin. Oral Impl. Res.* 18; 662–668.

**Graf, H.-L.** (1997): Zur Entwicklung und Charakterisierung eines neuen Implantatsystems. Univ. Leipzig: Habilitationsschrift.

**Graf, H.-L., Geu, B., Knöfler, W., Hemprich, A.** (2001): Klinisches Verhalten des ZL-Duraplant-Implantatsystems mit TICER® Oberfläche. Prospektive Studie. Mitteilung I: Überlebensraten. zzi 17. 3 S. 124-131.

**Graf, H.-L.** (2008): Implantatoberflächen – aktueller Stand und Perspektiven. Vortrag im Rahmen des 22. Kongress der DGI.

**Graf, H.-L., Hofmann J., Tröger U., Schreckenbach J., Hilbig H.** (2009): In-vitro-Untersuchungen zum Screening von Implantatoberflächeneigenschaften. zzi 25 (3) S. 250-262.

**Guazzato, M., Quach, L., Albakry, M., Swain, M. V.** (2005): Influence of surface and heat treatments on the flexural strength of Y-TZP dental ceramics. J Dent, 33: 9-18.

**Gudehus, H.T.** (2006): Untersuchung des Einwachsverhaltens von Zirkondioxid-Implantaten in die Kieferknochenstruktur – Eine experimentelle Studie an Miniaturschweinen. Deutsche Nationale Bibliothek, deposit.d-nb.de URN: urn:nbn:de:bvb:19-60179, 1-133.

**Hattar, S., Asselin, A., Greenspan, D., Oboeuf, M., Berdal, A., Sautier, J.M.** (2005): Potential of biomimetic surfaces to promote in vitro osteoblast-like cell differentiation. Biomaterials. 2005 Mar;26(8):839-48.

**Helbig, H., Schönholze,r U.** (2001): Grundzüge der Keramik, Skript zur Vorlesung Ingenieur–keramik I, Professur für nichtmetallische Werkstoffe, ETH Zürich, 31-42, 58-80.

**Hees, H., Sinowatz, F.** (2000): Histologie, Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie, 3. überarbeitete Auflage, Deutscher Ärzteverlag Köln, 133-142.

**Heinegard, D., Oldberg, A.** (1989): Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. FASEB J. 3(9), 2042-51.

**Herring, G.M., Kent, P.W.** (1963): Some studies on mucosubstances of bovine cortical bone. *Biochem J.* 89: 405-414.

**Hilbig, H., Wiener, T., Armbruster, F.P., Bekele, A., Kirsten, M., Graf, H.-L.** (2005): Effects of dental implant surfaces on the expression of Bone Sialo Protein in cells derived from human mandibular bone. *Med Sci Monit.* 11(4), BR111-5.

**Hohenadl, C., Mann, K., Mayer, U., Timpl, R., Paulsson, M., Aeschlimann, D.** (1995): Two adjacent N-terminal glutamines of BM-40 (osteonectin, SPARC) act as amine acceptor sites in transglutaminase C-catalyzed modification. *J Biol Chem.* 270(40), 23415-20.

**Hohenester, E., Maurer, P. and Timpl, R.** (1997). Crystal structure of a pair of follistatin-like and EF-hand calcium-binding domains in BM-40. *EMBO J.* 16, 3778-3786.

**Hofmann, F.** (2006): Prospektive Untersuchung zur Überlebensrate und zustandsbeschreibenden Parametern des periimplantären Gewebes an ZL-Duraplast-Implantaten. Medizinische Dissertation. Leipzig.

**Hofmann, J.** (2009): Zum Einfluss oberflächenmodifizierter Titanstrukturen auf Ausprägung verschiedener Knochenmatrixproteine in der Osteoblastenkultur. Medizinische Dissertation. Leipzig.

**Hunter, G.K., Goldberg, H.A.** (1993): Nucleation of hydroxyapatite by BSP. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90(18), 8562-5.

**Ichigawa, Y., Akagawa, Y., Nikai, H., Tsuru, H.**: Tissue compatibility and stability of a new zirconia ceramic in vivo. *J Prosthet Dent,* 68: 322-326, 1992.

**Joyce, M.E., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Bolander, M.E.** (1990): Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol.* 110(6), 2195-207.

**Kaufmann, B.** (2001): Analyse unterschiedlich glykosylierter Isoformen des extrazellulären Matrixproteins BM-40/SPARC/Osteonectin in verschiedenen Zell- und Gewebesystemen. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Dissertation Universität Köln, S 3-9.

**Karsenty, G., Na Kyung Lee** (2007): Department of Genetics & Development (College of Physicians and Surgeons) der Columbia University in New York, NY 10032, USACell, Band 130, S. 456-469, vom 10. August 2007.

**Kieswetter, K., Schwartz, Z., Hummert, T.W., Cochran, D.L., Simpson, J., Dean, D.D., Boyan, B.D.** (1996): Surface roughness modulates the local of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. J Biomed Mater Res, 32: 55-63.

**Kirsten, M.** (2005): Auswirkungen von Titanimplantatoberflächenstrukturen auf das Wachstum humaner mandibulärer Knochenzellen und deren Expression von Bone Sialo Protein und TGF- $\beta$ . Dissertation, Leipzig.

**Knabe, C., Klar, F., Fitzner, R., Radlanski, R.J., Gross, U.** (2002): In vitro investigation of titanium and hydroxyapatite dental implant surfaces using a rat bone marrow stromal cell culture system. Biomaterials. 23(15), 3235-45.

**Knabe, C., Berger, G., Gildenhaar, R., Klar, F., Zreiqat, H.** (2004a): The modulation of osteogenesis in vitro by calcium titanium phosphate coatings. Biomaterials. 25(20), 4911-9.

**Knabe, C., Howlett, CR., Klar, F., Zreiqat, H.** (2004b): The effect of different titanium and hydroxyapatite-coated dental implant surfaces on phenotypic expression of human bone derived cells. J Biomed Mater Res. 71(1), 98-107.

**Knöfler, W., Graf, H. -L.** (1989): Zur Knochenreaktion auf Biomaterialien–I. Komplexes Versuchsmodell zur Beschreibung der Knochenumbauvorgänge und Interfacereaktionen unter Biomaterialeinfluss. Z Zahnärztl Implant, 5: 256-262.

**Kohal, R.J., Klaus, G.** (2003): Eine vollkeramische Implantatversorgung als Einzelzahnersatz. Zahnärztliche Mitteilungen 16: 1952-1956.



**Kohal, R.j., Wenig, D., Bächle, M., Strub, J.R.** (2004): Loaded custom-made zirconia and titanium implants show similar osseointegration: an animal experiment.

Journal of periodontology 75 (9):1262-8.

**Kohlweyer, H.:** Expression nonkollagener Knochenproteine auf ion-beam Zirkoniumoxide Oberflächen in vitro. Med.Dent.Diss.Leipzig (eingereicht 2011)

**Köbel, S; Weber, W., Rieger, W.** (2006): Verfahren zur Herstellung einer porösen keramischen Oberflächenschicht. Patent DE 10 2006 037 067 A1, 08.08.

**Krysmann, W.** (1982): Beitrag zur Anodischen Oxidation von Aluminium unter Funkenentladung. Nat. Diss., Karl-Marx-Stadt (Chemnitz).

**Laing, P.G., Ferguson, A.B., Hodge, E.S.** (1967): Tissue reaction in rabbit muscle exposed to metallic implants. J Biomed Mater Res I: 135-149.

**Lambrich, M.** (2007): Vergleich der Überlebensrate von enossalen Zirkondioxid-Implantaten und Titan-Implantaten ... Master Thesis Steinbeis-Hochschule Berlin.

**Lane, T.F. and Sage, E.H.** (1990): Functional mapping of SPARC: peptides from two distinct Ca<sup>2+</sup>-binding sites modulate cell shape. *J. Cell Biol.* 111, 3065-3076.

**Lane, T.F., Sage, E.H.** (1994): The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J.* 8(2), 163-73.

**Lin, T.W., Corvelli, A.A., Frondoza, C.G., Roberts, J.C., Hungerford, D.S.** (1997): Glass peek composite promotes proliferation and osteocalcin production of human osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res.* 36(2), 137-44.

**Löffler, G., Petrides, P.E., Heinrich, P.C.** (2002): Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.

**Massagué, J.** (1990): The transforming growth factor- $\beta$  family. *Annu Rev Cell Biol* 6, 597-641.

**Mayer, U., Aumailley, M., Mann, K., Timpl, R., Engel, J.** (1991): Calcium-dependent binding of basement membrane protein BM-40 (osteonectin, SPARC) to basement membrane collagen type IV. *Eur. J. Biochem.* 198, 141-150.

**Meyer, L.** (2002): Zirkon das unbekannte Erfolgsprodukt. *ZWP* 9/18-22.

**Mizuno, M., Imai, T., Fujisawa, R., Tani, H., Kuboki, Y.** (2000): Bone Sialo Protein (BSP) is a crucial factor for the expression of osteoblastic phenotypes of bone marrow cells cultured on type I collagen matrix. *Calcif Tissue Int.* 66(5): 388-396.

**Murphy-Ullrich, J.E., Lane, T.F., Pallero, M.A. and Sage, E.H.** (1995): SPARC mediates focal adhesion disassembly in endothelial cells through a follistatin-like region and the calciumbinding EF-hand. *J. Cell Biol.* 57, 341-350.

**Mustafa, K., Rubinstein, J., Lopez, B.S., Arvidson, K.** (2003): Production of transforming growth factor beta1 and prostaglandin E2 by osteoblast-like cells cultured on titanium surfaces blasted with TiO<sub>2</sub> particles. *Clin Oral Implants Res.* 14(1), 50-6.

**Mustafa, K., Wennerberg, A., Wroblewski, J., Hultenby, K., Lopez, B.S., Arvidson, K.** (2001): Determining optimal surface roughness of TiO<sub>2</sub> blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clin Oral Implants Res.* 12(5), 515-25.

**Ogawa, T., Nishimura, I.** (2003): Different bone integration profiles of turned and acid-etched implants associated with modulated expression of extracellular matrix genes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 18:200-210.

**Ong, J.L., Carnes, D.L., Cardenas, H.L., Cavin, R.** (1997): Surface roughness of titanium on bone morphogenetic protein-2 treated osteoblast cells in vitro. *Implant Dent.* 6(1), 19-24.

**Pecher, I., Peyruchaud, O., Serre, C.M., Guglielmi, J., Voland, C., Bourre, F., Margue, C., Cohen-Solal, M., Buffet, A., Kieffer, N.** (2002): Integrin  $\alpha v \beta 3$  expression confers on tumor cells a greater propensity to metastasize to bone. *FASEB Journal* 16 1266–1268.

**Pesakova, V., Kubies, D., Hulejova, H., Himmlova, L.** (2007): The influence of implant surface properties on cell adhesion and proliferation, *J Mater Sci: Mater Med* 18:465–473.

**Price, P.A., Otsuka, A.A., Poser, J.W., Kristaponis, J., Raman, N.** (1976): Characterization of a gamma-carboxyglutamic acidcontaining protein from bone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 73(5), 1447-51.

**Radice, S., Kern, P., Bürki, G., Michler, J., Textor, M.** (2002): Electrophoretic deposition of zirconia-Bioglass composite coatings for biomedical implants, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* DOI 10.1002/jbm.a.

**Raschke, D.** (2007): Zur Interaktion dentaler Implantate mit humanen Osteoblasten in der Kurzzeitkultur. Medizinische Dissertation. Leipzig.

**Raynal, C., Delmas, P.D. and Chenu, C.** (1996): Bone Sialo Protein stimulates in vitro bone resorption. *Endocrinology*, Vol 137, 2347-2354, Copyright © by Endocrine Society.

**Reed, M.J. and Sage, E.H.** (1996): SPARC and the extracellular matrix: Implications for cancer and wound repair. In Güthert, U., and Birchmeier, W., (eds.). *Attempts to Understand Metastasis Formation I. Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 231, 81-94.

**Reuther, J.F., Reinhart, E., Eulert, A.** (2002): Die Versorgung teilbezahnter und zahnloser Patienten mit dentalen Implantaten – Langzeitergebnisse und Nachuntersuchung des Patientengutes von 1989 bis 1997. dokserv (Besuch am 28.04.2010 12.00 Uhr).

**Roberts, A. B., Sporn, M. B.** (1990): The transforming growth factor betas. In *Peptide growth factors and their receptors*. Edited by Roberts, A. B., Sporn, M. B. Heidelberg: Springer-Verlag; 1990: 419-72.

**Rupietta, R.** (2008): Versuche zur organischen Beschichtung von Implantatmaterialien Medizinische Dissertation. Leipzig.

**Sage, E.H., Vernon, R., Funk, S., Everitt, E. und Angello, J.** (1989): SPARC, a secreted protein associated with cellular proliferation, inhibits cell spreading in vitro and exhibits Ca<sup>2+</sup>-dependent binding to the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 109, 341-356.

- Sammons, R., Lumbikanonda, N., Gross, M., Cantzler, P.:** Osteoblast interactions on different microstructured implant surfaces: Comparative study of cell attachment, migration, proliferation and differentiation. *J Dent Res* 2003; 82 (Special Issue B; IADR Abstracts): No. 1840.
- Scarano, A., Di Carlo, F., Quaranta, M., Piatelli, A. (2003):** Bone response to zirconia ceramic implants: an experimental study in rabbits. *Oral implantology* 29 (1): 8-12
- Schliephake, H., Neukam, F.W., Urban, R. (1989):** Titanbelastung parenchymatöser Organe nach Insertion von Titanschraubenimplantaten. Erste Ergebnisse. *Z Zahnärztl Implantol*, 5: 180-184.
- Schroeder, A., Pohler, O., Sutter, F. (1976):** Gewebsreaktion auf ein Titan-Hohlzylinder-Implantat mit Titanspritzschichtoberfläche. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 86: 713–727.
- Schultze-Mosgau, S., Schliephake, H., Radespiel-Tröger, M., Neukam, F.W. (2000):** Osseointegration of endodontic endosseous cones. *Oral Surg Oral Med Oral Path*, 91-98.
- Schwartz, Z., Martin, J.Y., Dean, D.D., Simpson, J., Cochran, D.L., Boyan, B.D. (1996):** Effect of titanium surface roughness on chondrocyte proliferation, matrix production, and differentiation depends on the state of cell maturation. *J Biomed Mater Res*, 30: 145-155.
- Shen, X., Roberts, E., Peel, S.A.F., Davies, J.E. (1993):** Organic extracellular matrix components at the bone cell/substratum interface. *Cells Materials*. 3, 257-272.
- Sooy, K., Sabbagh, Y., Demay, M.B. (2005):** Osteoblasts lacking the vitamin D receptor display enhanced osteogenic potential in vitro. *J Cell Biochem*. 2005 Jan 1; 94(1):81-7.
- Six, N., Decup, F., Lasfargues, J.J., Salih, E., Goldberg, M. (2002):** Osteogenic proteins (Bone Sialo Protein and bone morphogenetic protein-7) and dental pulp mineralization. *J Mater Sci Mater Med*. 2002 Feb;13(2):225-32.
- Sporn, M.B., Roberts, A.B., Wakefield, L.M. und Assoian, R.K. (1986):** Transforming growth factor- $\beta$ : biological function and chemical structure. *Science* 233, 532-4.

**Stock, M., Gehrke, P.** (2003): Grundlegende Mechanismen der knöchernen Integration am Material-Biosystem-Interface. Wissenschaftliche Veröffentlichung Densply Friadent.

**Termine, J.D., Belcourt, A.B., Conn, K.M., Kleinman, H.K.** (1981): Mineral and Collagen-binding Proteins of Fetal Calf Bone. *J Biol Chem.* 256(20), 10403-8.

**Thomas, K.A., Cook, S.** (1985): An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. *J Biomed Mater Res*, 19: 875-901.

**Uchida, M., Kim, H.-M., Kokubo, T., Nawa, M., Asano, T., Tanaka, K., Nakamura, T.** (2002): Apatite-forming ability of a zirkonia/alumina nano-composite induced by chemical treatment. *Inc J Biomed Mater Res*, 60: 277-282.

**Viridi, A.S., Willis, A.C., Hauschka, P.V., Triffitt, J.T.** (1991): Primary aminoacid sequence of rabbit osteocalcin. *Biochem Soc Trans.* 19(4), 373S.

**Wagner, W., Nawas, B.A.,** (2004): Implantatmaterialien und Konstruktionsprinzipien der Implantate aus chirurgischer Sicht. *Implantologie*, Koeck B., Wagner W. (Hrsg.), Urban & Fischer, 2. Auflage 61-97.

**Weryha, G., Leclere, J.,** (1995): Paracrine regulation of bone remodeling, *Horm. Res.* 43, 96-75

**Wiener, T.** (2003): BSP – Antikörper: Optimierung der Anwendung in vitro und im Schnitt. Dissertation Leipzig.

**Wintermantel, E., Ha, S.W.** (2002): Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren. Springer.

**Wennerberg, A., Albrektson, T., Andderson, B., Krol, J.** (1995): A histometric and removal torque study on screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. *Clin Oral Impl Res*, 6: 24-30.

**Wollenberg, G.K., Semple, E., Quinn, B.A. und Hayes, M.A.** (1987): Inhibition of proliferation of normal, preneoplastic und neoplastic rat hepatocytes by transforming growth factor- $\beta$ . *Cancer Res* 47, 6595-9.

**Woodman, J.L., Jacobs, J.J., Galante, J.O., Urban, R.M.** (1984): Metal ion release from titanium-based prosthetic segmental replacement of long bones in baboons: A long-term study. *J Orthop Res I*: 421-430.

**Wuttke, M., S. Muller, et al.** (2001). Structural characterization of human recombinant and bone-derived Bone Sialo Protein. Functional implications for cell attachment and hydroxyapatite binding. *J Biol Chem* 276(39): 36839-48.

**Yao, K.L., Todescan, R. Jr, Sodek, J.** (1994): Temporal changes in matrix protein synthesis and mRNA expression during mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in culture. *J Bone Miner Res.* 9(2), 231-40.

**Young, M.F., Kerr, J.M., Ibaraki, K., Heegaard, A.M., Robey, P.G.** (1992): Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin Orthop Relat Res.* (281), 275-94.

**Zinger, O., Zhao, G., Schwartz, Z., Simpson, J., Wieland, M., Landolt, D., Boyan, B.** (2005): Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. *Biomaterials.* 26(14), 1837-47.

**Zinger, O., Anselme, K., Denzer, A., Habersetzer, P., Wieland, M., Jeanfils, J., Hardouin, P., Landolt, D.** (2004): Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. *Biomater*, 25: 2695-2711.

## Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name: Ingo Buttchereit  
Wohnort: Ruhlebener Str. 141  
13597 Berlin

Geburtstag und -ort: 10.09.1983, Sangerhausen  
Familienstand: ledig  
Eltern: Barbara (geb. Schröder) und Dieter Buttchereit

### Schulbildung

1990 - 1994 Otto-Grotewohl-Grundschule, Sangerhausen  
1994 - 2003 Geschwister Scholl-Gymnasium, Sangerhausen  
2003 Allgemeine Hochschulreife

### Studium

10/2003 – 10/2008 Studium der Zahnmedizin an der Universität  
Leipzig  
12/2008 Staatsexamen, Erteilung der Approbation als  
Zahnarzt

### Beruf:

01.02.2009 – 31.01.2011 Vorbereitungsassistent im Implantologischen Zentrum Zerbst

seit 01.03.2011 Weiterbildungsassistent zum Fachzahnarzt für  
Oralchirurgie (MKG-Praxis Dr. Dietrich in Berlin)

Berlin, 09.12.2011

Ingo Buttchereit

## **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.

Berlin, den 09.12.2011

Ingo Buttchereit



## **Danksagung**

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. dent. habil. Hans-Ludwig Graf und Frau Prof. Dr. rer. nat. habil. Heidegard Hilbig sowie Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Alexander Hemprich, welche mich jederzeit tatkräftig unterstützten.

Für die Hilfe im Labor und die Bereitstellung der Labormaterialien möchte ich mich bei Frau Ursula Tröger herzlichst bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei meinen lieben Eltern, Barbara und Dieter Buttchereit sowie meinen Großeltern für die Förderung meines beruflichen Werdeganges, ihre Unterstützung in den zurückliegenden Jahren und ihr Vertrauen von ganzem Herzen bedanken.