

Untersuchung eines porösen, keramischen Biomaterials auf Basis von TiO_2 und Perlit am Modell humaner Osteoblasten

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Matthias Rüger

aus Düsseldorf

Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr. med. O. Paar

Herr Universitätsprofessor
Dr. rer. nat. W. Jahnen-Dechent

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Mai 2005

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Für meine Eltern und Julia

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	1
Grundlagen und Problemstellung	1
Ecopore	16
Die Herstellung von Ecopore	17
Die Biokompatibilität von Ecopore	19
Ziel dieser Untersuchung und weiterer Projektverlauf	22
MATERIALIEN UND METHODEN	25
Vorbereitung der keramischen Materialproben	25
Korrosionsuntersuchung	27
<i>In vitro</i> Untersuchungen an primären humanen Osteoblasten	29
Zellkultur	31
Zellvitalität	34
Zellmorphologie	34
Zellstoffwechsel und Zellproliferation: XTT-Test	35
ELISA-Analyse der Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- α	36
ERGEBNISSE	37
Korrosionsuntersuchung	37
<i>In vitro</i> Untersuchungen an primären humanen Osteoblasten	39
Zellvitalität	40
Zellmorphologie	41
Zellstoffwechsel und –proliferation: XTT-Test	43
ELISA-Analyse der Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- α	45
DISKUSSION	47
ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT	55
LITERATURVERZEICHNIS	57
ABBILDUNGEN UND TABELLEN	71
DANKSAGUNG	75
LEBENS LAUF	77

EINLEITUNG

Grundlagen und Problemstellung

Der mechanisch und biologisch vollwertige Ersatz von Knochengewebe stellt auch zu Beginn des 21. Jahrhunderts eine Herausforderung dar. Der Ersatz von Knochengewebe wird notwendig nach traumatischer Gewebszerstörung (im Sinne eines Hochenergie-traumas), nach Exstirpation von Tumoren und Osteomyelitiden, bei der Behandlung von degenerativen Erkrankungen des Bewegungsapparates und schließlich bei endoprothetischen Eingriffen wie z.B. dem alloarthroplastischen Gelenkersatz. In den USA werden alljährlich 500.000 bis 600.000 operative Eingriffe vorgenommen, bei denen der Ersatz von Knochengewebe notwendig wird. Etwa die Hälfte dieser Operationen entfällt dabei auf Eingriffe an der Wirbelsäule [1].

In nur 10% der oben beschriebenen Fälle wird zur Zeit auf synthetisch erzeugte Knochenersatzwerkstoffe zurückgegriffen, während in der überwiegenden Zahl der Fälle autologer Knochen zu Einsatz kommt. Autologer Knochen ist daher der derzeitige Goldstandard bei der Füllung von knöchernen Defekten. Seine Vorzüge sind vielfältig; er ist vollständig histokompatibel, vaskularisiert, enthält eine vollfunktionelle Matrix, alle notwendigen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, sowie sämtliche Zelltypen (Osteoblasten, Osteoklasten, Osteozyten, Vorläuferzellen sowie pluripotente, mesenchymale Stammzellen), die für das rasche Einheilen des autologen Implantates notwendig sind [2]. Es ist somit sowohl zur **Osteoinduktion** (*de novo* Knochensynthese) als auch **Osteokonduktion** (Leitschiene für von außen

einwachsenden Knochen) befähigt. Auch in mechanischer Hinsicht ist autologer Knochen vielen synthetischen Alternativen überlegen [3].

Diesen Vorteilen autologen Knochens stehen jedoch auch einige Nachteile gegenüber. Dazu zählen zum einen der unausweichliche zusätzliche Eingriff (meist am Beckenkamm) mit assoziierten Risiken und Komorbiditäten, die anatomisch begrenzte Verfügbarkeit, sowie eine keineswegs immer erfolgreiche Osseointegration des autologen Knochens [4;5].

Gebräuchliche Alternativen zu autologem Knochen sind zum einen allogener, explantierter und chemisch aufgereinigter Knochen aus humanen, bovinen und porkinen Quellen, des weiteren demineralisierte Knochenmatrix, sowie synthetische Materialien (Keramiken, Polymere, Metalle) [6;7]. Tabelle 1 gibt einen Überblick über derzeitig eingesetzte bzw. mittelfristig verfügbare Knochenersatzmaterialien.

<u>Knochenersatzmaterialien und Osteobiologica: Marktübersicht 2003</u>		
Materialklasse	Hersteller/Produkt	Merkmale
Hydroxylapatite (HA)	Biomet <i>Endobon</i> [®] Biocomposites <i>Allogran-N</i> [®] Ceramtec <i>BioloX</i> [®] <i>osprovit</i> Interpore-Cross <i>Pro Osteon</i> [®]	Offenporöses Granulat Granulat Beschichtung metallischer Prothesen Korallines HA
Beta-Tricalcium phosphate	Biomet <i>Biobon</i> [®] Biomet <i>Calcibon</i> [®] Biocomposites <i>fortoss</i> [®] Etex <i>α-BSM</i> [®] Orthovita <i>Vitoss</i> [®]	Resorbierbarer Zement Modellierbarer Zement Hydroxylsulfat Matrix Nanokristallines Kalziumphosphate 90% Porosität (Ø ≤ 1000µm), Nanopartikel
Calciumsulfate	Biocomposites <i>Stimulan</i> [®] Wright Medical <i>Osteosef</i> [®]	Synthetische CaSO ₄ Kugeln CaSO ₄ Kugeln, voll resorbierbar

Keramiken	US Biomaterials <i>NovaBone</i> [®]	Granuläres Bioglas
Metalle	Zimmer <i>Trabecular metal</i> [®]	Offenporöses Metallgitter (F&E)
Polymere	Bionx Implants Salumedica <i>Salubria</i> [™]	Schrauben und Clips (PLLA) Nichtresorbierbares elastisches Material
Kollagen	Biocomposites <i>Biosteon</i> [®] Biocomposites <i>Bilok</i> [®] <i>ACL</i>	HA+PLLA Kalzium-basierte polymere Schraube, E-Modul angepasst, pH gepuffert
Komposite	Neucoll <i>Collagraft</i> [®] Orquest <i>Healos</i> [®] Orthovita <i>Cortoss</i> [®] Orthovita <i>Rhakoss</i> [®]	HA+TCP+Kollagen I HA+Kollagen Polymer + Glaskeramik Komposit für ALIF/PLIF Eingriffe (F&E)
	Biomet <i>Septocoll</i> [®]	Gentamicin-behandelte Kollagen I-Matrix
Rekombinante Wachstumsfaktoren	Sulzer/Centerpulse/MSD <i>Infuse</i> [®] / <i>LT Cage</i> [®]	Kollagen+rhBMP und Metallrahmen für ALIF/PLIF Eingriffe
	Orquest <i>HealosMP52</i> [®] Stryker Corp. OP-1	HA+Kollagen+BMP-14/rhGDF-5 BMP-7 (F&E)
Tissue engineering	Osiris Therapeutics	Mesenchymale Stammzellen auf HA-Matrix Autologe Chondrozyten
	Verigen (<i>MACI</i>) [®] Advanced Tissue Sciences/ Smith&Nephew <i>Neocyte</i> [®]	Chondrozyten für den Ersatz von Knorpel und Menisci. Fibroblasten auf resorbierbarer Polymermatrix für den Ersatz von Sehnen und Bändern (F&E)
Tissue banking	Johnson&Johnson/DePuy AcroMed/Lifenet <i>Vertigraft</i> [®]	Kombination von Kompakta und Spongiosa für ALIF/PLIF Eingriffe
	Exactech (RTI) <i>Opteform</i> [®] Osteotech <i>Graftech</i> [®]	Modellierbare Knochenpaste Vorgefertigte Prothesen aus Kortikalis und Spongiosa
	Regeneration Technologies Inc. <i>Reganafil/Reganaform</i> [®] Tutogen <i>Tutoplast</i> [®]	Modellierbare Knochenpaste Allogene und xenogene Spongiosa und Kortikalisplastiken
	Wright Medical <i>Graftjacket</i> [®] Medtronic Sofamor Danek (RTI) <i>Osteofil</i> [®]	Matrix zur Anzucht von Periost Modellierbare Knochenpaste
	Geistlich Biomaterials <i>Bio-Oss</i> [®] Geistlich Biomaterials <i>Bio-Gide</i> [®]	Bovines Xenograft Porcines kollagenes Xenograft
Hyaluronsäure	Orquest <i>Ossigel</i> [®]	Injizierbare Hyaluronsäure + bFGF für die Behandlung von Osteoarthritis

Tabelle 1: Eine aktuelle Marktübersicht von Knochenersatzmaterialien. Alle hier aufgelisteten Produkte sind durch die FDA (USA), die CE (Europa) oder beide zugelassen. Ausnahmen sind durch „**F&E**“ (Forschung und Entwicklung) gekennzeichnet. Eigene Recherche.

Nachteile von allogenen Implantaten sind vor allem das trotz aufwändiger Aufbereitung nicht auszuschließende Infektionsrisiko [8], sowie eine mithin nicht befriedigende Osseointegration. Diese Grenzen sowohl des autologen, wie auch des allogenen Knochenersatzes haben schon vor mehr als einem Jahrhundert zum Einsatz von künstlichem Calciumsulfat (dem so genannten „*Plaster of Paris*“) geführt [9] und bilden auch heute noch den Antrieb für die fortwährende Suche nach besseren künstlichen Knochenersatzmaterialien [10].

Eine wichtige Gruppe der für den Knochenersatz geeigneten, künstlichen Werkstoffe stellen Keramiken dar [11]. Die Vorteile von Keramiken sind vielfältig. Sie können durch Modifikationen ihrer chemischen Zusammensetzung, ihrer Architektur, sowie ihrer Oberflächen für viele Anwendungsbereiche speziell angepasst werden [12;13]. Typischerweise werden keramische Materialien von Knochengewebe gut toleriert und induzieren periprothetisch weder Entzündungs-, noch Fremdkörperreaktionen. Hochbelastbare Keramiken wie z.B. Al_2O_3 oder Si_3N_4 gelten trotz unkritischen Verhaltens *in vitro* [14; 15] eher als bioinert. Ihr Einsatzbereich liegt nicht im Knochenersatz, sondern in der Konstruktion von künstlichen Hüftköpfen oder anderen, stark belasteten und auf Abriebfestigkeit ausgelegten, künstlichen Gelenkflächen. Für den Anwendungsbereich des Knochenersatzes werden Keramiken gewählt, die ein hohes Maß an Kompatibilität mit Knochengewebe zeigen, um so eine möglichst innige und dauerhafte Grenzfläche zwischen Implantat und Gewebe zu erzeugen. Bei Bildung einer festen chemischen Bindung zwischen künstlichem Material und Knochenmineral ohne jegliche bindegewebige Kapselung spricht man von einem bioaktiven Material [16-20].

Zwei der am weitest verbreiteten keramischen Knochenersatzmaterialien sind das Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}_2]$) und das Beta-Tricalciumphosphat ($\text{Ca}_3[\text{PO}_4]_2$). Sie werden sowohl synthetisch erzeugt, als auch aus natürlichen Quellen gewonnen [3; 21-23]. Beide sind in ihrer chemischen Zusammensetzung dem physiologischen Knochenmineral sehr ähnlich und werden typischerweise gut in Knochengewebe integriert [24-26]. Je nach Aufbereitungsform werden Calciumphosphatverbindungen im Verlauf von Monaten bis Jahren vom örtlichen chemischen Milieu aufgelockert und von Knochengewebe zumindest teilweise ersetzt. Hydroxylapatit (Verhältnis von Calcium zu Phosphat = 1,67) ist das am schlechtesten lösliche Calciumphosphat im physiologischen Milieu [110]. Es zeigt in vivo zwar bioaktive Eigenschaften, gilt aber als nicht bioresorbierbar, auch wenn einige Quellen eine gewisse Resorbierbarkeit von porösem HA nachweisen konnten [27; 28]. Tricalciumphosphat (Ca:P = 1,5) hingegen wird unter physiologischen Bedingungen sehr schnell abgebaut [24]; wie vielfach beschrieben wurde, nicht selten sogar zu schnell für den Aufrechterhalt einer kraftschlüssigen Verbindung zwischen Implantat und nachwachsendem Knochengewebe. Um eine kontrollierte, dem Nachwachsen natürlichen Knochens angepasste Abbaurate für bioresorbierbare Calciumphosphatkeramiken zu erreichen, wurden biphasische Calciumphosphate entwickelt, die sowohl Hydroxylapatit, als auch Tricalciumphosphat enthalten. Eine Einstellung des Gesamtverhältnis von Ca:P zwischen 1,5 und 1,67 erlaubt eine gute Anpassbarkeit dieser Materialien für unterschiedliche klinische Anwendungen. Keramiken, die auf Calciumphosphatverbindungen basieren, haben außerdem den Nachteil, dass sie durch geringe Duktilität, Zähigkeit und Druckbelastbarkeit nur für vergleichsweise niedrige mechanische Beanspruchungen in Frage kommen [11].

Es fällt auf, dass bei keramischen Knochenersatzmaterialien die Fähigkeit zu guter Osseointegration oft mit eher geringer mechanischer Belastbarkeit korreliert. Im Verlaufe der vergangenen 30 Jahre wurden viele Versuche unternommen, dieses Paradigma zu lösen, indem chemische Zusammensetzung [29], Oberflächentopografie [30-32] und Materialarchitektur [33;34] verändert, sowie Materialoberflächen physikochemisch [35-38] und biologisch [39-41] funktionalisiert wurden.

Die optimale Integration und der langfristige Erfolg einer jeden mechanisch belasteten Endoprothese hängt zu einem erheblichen Teil davon ab, dass zwischen Endoprothese und Gewebe ein **idealer Kraftfluss** zustande kommt [42-47]. Voraussetzung dafür ist u.a. ein ähnliches Elastizitätsmodul (als Steifigkeitsmaß) von Implantat und umgebendem Gewebe. Sind beide unterschiedlich steif, kommt es zu einem Steifigkeitssprung an der Grenzfläche. Dadurch wird diese Grenzfläche bei Belastung hohen mechanischen Kräften (Spannungen) ausgesetzt, welche wiederum



Abbildung 1: Spaceshuttle Mission STS 93 (23-27 Juli 1999) - Astronaut Steven A. Hawley beim Fitnessstraining zur Erhaltung seiner Muskulatur und Knochendichte in der Schwerelosigkeit [Quelle: NASA]

zu einem Teilversagen der Grenzfläche, zu Mikrobewegungen, und schließlich zu einer vollständigen Lockerung des Implantates in seinem Bett führen können [48]. Außerdem kommt es im Sinne einer Schutzmaßnahme vor den beschriebenen hohen Spitzenbelastungen zur fibrotischen Abkapselung des Implantates durch das umgebende Gewebe [49]. Umgekehrt führt eine zu niedrige Belastung des umgebenden Gewebes zu reaktivem Knochenabbau in den betroffenen Bezirken [50].

Das Elastizitätsmodul von humaner Spongiosa unter Druckbelastung liegt bei 424 ± 208 GPa (distaler Femur) bzw. $3,81$ GPa (Hüftkamm) [51]. Für humane Kortikalis ergeben sich Werte von $11,7 \pm 1,0$ GPa, gemessen in transversaler Richtung, bzw. $18,2 \pm 0,9$ GPa, gemessen in longitudinaler Richtung [52]. Elastizitätsmoduln sind je nach beteiligtem Knochentyp abhängig von Porosität, Mineralisationsgrad, sowie räumlicher Organisation und Dichte kollagener Fasern [53;54].

Ein mechanisch dauerfestes Knochenersatzmaterial sollte also ein Elastizitätsmodul ähnlich dem des Zielgewebes erreichen, da sonst ein erhöhtes Risiko des Totalversagens besteht. Keramische Materialien verfügen typischerweise über weit höhere Elastizitätsmoduln (also höhere Steifigkeiten) als natürlicher Knochen. Hochfeste Keramiken und Metalle weisen hier meist Werte von weit über 200 GPa auf. Unter den o.g. Voraussetzungen sind diese Materialien nicht dazu geeignet, einen optimalen Kraftfluss bei Minimierung der Belastung der Grenzfläche zwischen Implantat und Knochen herzustellen und vor allem, diesen Kraftfluss auf Dauer aufrecht zu erhalten. Ein weiterer Nachteil keramischer Knochenersatzmaterialien liegt in ihrer Versagensmechanik. Polykristalline Keramiken bilden unter zyklischer,

mechanischer Belastung (Schub- /Zug- /Biege- oder Torsionsspannungen) Mikrorisse aus, die im rechten Winkel zur einwirkenden Kraft orientiert sind, sehr schnell durch das gesamte Implantat wandern und damit zum Totalversagen führen können. Man spricht in diesem Zusammenhang von **Materialermüdung**. Auch in der mineralischen Phase von Knochengewebe sind solche Risse in erheblicher Zahl nachweisbar [55]; vergleiche dazu Abb. 2. Physiologischer Knochen enthält im Gegensatz zu polykristallinen Keramiken neben seinen mineralisierten Bestandteilen (Abb. 2 A) kollagene Fasern (Abb. 2 B), die parallel zum vorherrschenden Belastungsvektor und damit senkrecht zur Risslängsachse verlaufen und dadurch das Fortschreiten der Risse (Abb. 2 C) effektiv unterbinden. In der Folge werden die einzelnen Risse durch *Remodelling* Vorgänge (initiiert durch *lining cells*, die per RANK-Signalling Osteoklasten-Vorläufer anlocken und ausgeführt durch sog. *Basic Multicellular Units / BMUs*, bestehend aus Osteoklasten und Osteoblasten) wieder stabilisiert. Vereinfacht dargestellt, phagozytieren hierzu aktivierte Osteoklasten zunächst mineralische und organische Bestandteile alten Knochens und erzeugen dabei Lakunen und schließlich Tunnel. Ihnen nachfolgend wandern Phalanxen von Osteoblasten zeitlich versetzt in den „Bohrkanal“ ein und kleiden die Tunnelwand schichtweise mit neuem Osteoid aus, das daraufhin mineralisiert und dadurch aushärtet. Für die Steuerung des Remodellings ist u.a. ein mechanosensorisches System verantwortlich, das durch Flüssigkeitsverschiebungen im Havers'schen System (Volkmann-Kanäle und Osteozyten-assoziierte Canaliculi) funktioniert [56;57]. Hinzu kommen eine Vielzahl weiterer endokriner und parakriner Signale und Regelkreise, die zu nennen den Rahmen dieser kurzen Einleitung bei weitem sprengen würde. Deshalb sei stellvertretend auf einige Publikationen und Lehrbücher hingewiesen [122, 123, 124].

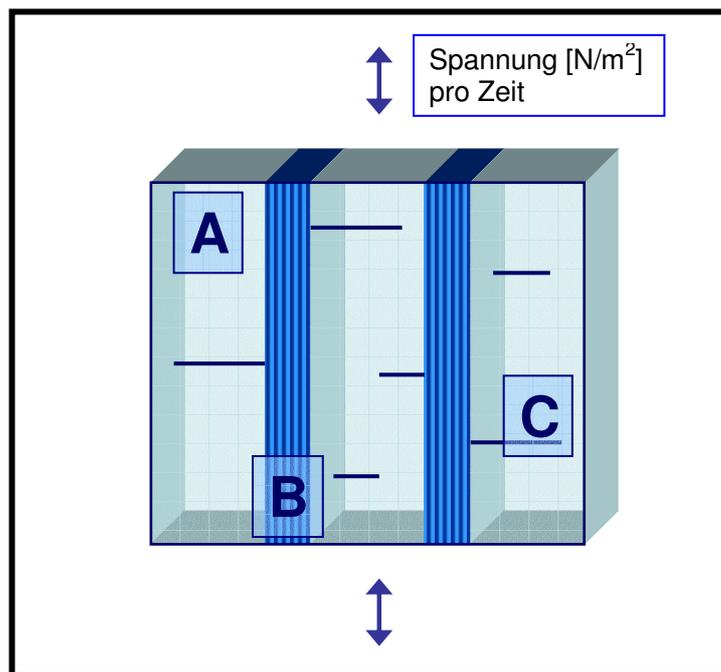


Abbildung 2: Schematische Darstellung von Faserknochen und Prinzip der Materialermüdung. Die einwirkenden Kräfte eröffnen im Knochenzement (A) senkrecht zur Belastungsrichtung Mikrorisse (C). Diese neigen dazu, rasch voranzuschreiten, werden aber von longitudinal verlaufenden Kollagenfasern (B) aufgefangen und konsekutiv durch *BMUs* repariert. [nach: Martin, Burr, Sharkey: Skeletal Tissue Mechanics. Springer 1998. 168ff.]

Physiologisch herrscht ein Gleichgewicht zwischen Rissneubildungsrate und Reparaturaktivität. Da spröde, nicht resorbierbare Knochenersatzmaterialien *in situ* nicht durch *BMUs* repariert werden können, erscheint es sinnvoll, sie zur Vorbeugung von Materialermüdung mit einem zweiten Material zu einer Art Strukturverbund zu kombinieren. Solche Strukturverbunde können aus zwei oder mehr synthetischen Materialien mit unterschiedlicher Zähigkeit bestehen. Es ist aber auch denkbar, ein Material so zu gestalten, dass natürlicher Knochen hineinwachsen kann, um den gewünschten Strukturverbund erst konsekutiv *in situ* herzustellen.

Eine Voraussetzung dafür ist die Gestaltung **poröser Knochenersatzmaterialien**. Nicht nur eignen sich poröse Werkstoffe für die Durchbauung mit Gewebe, sondern bieten zusätzlich die Möglichkeit, Degradationsprozesse zu kontrollieren und dadurch eine neue Materialeigenschaft zu erschließen: die der Bioresorbierbarkeit. Ein ideales Knochenersatzmaterial sollte nach herrschender Lehrmeinung nicht nur schnell einheilen, zügig voll belastbar sein und die im Implantationsbereich auftretenden Kräfte optimal aufnehmen und kraftschlüssig weitergeben. Es sollte außerdem in der Lage sein, durch kontrollierte Resorptions- und Degradationsprozesse einen sukzessiven Ersatz des Implantates durch natürlichen Knochen und damit eine vollständige Restitutio zu gewährleisten. Dabei muss der Abbau des Biomateriales und die gleichzeitige Knochenneubildung im zeitlichen Verlauf genau aufeinander abgestimmt werden, damit die mechanische Stabilität des Gesamtverbundes zu keinem Zeitpunkt kompromittiert ist [111]. Porosität zum einen und Bioresorbierbarkeit zum anderen bieten außerdem Perspektiven für die Entwicklung neuer, leistungsfähigerer Biowerkstoffe, die entweder von ihrer Oberfläche und/oder während ihres Abbaus Biomoleküle (z.B. Wachstumsfaktoren) oder Pharmazeutika (z.B. Antibiotika) kontrolliert freisetzen – *Controlled Drug Release* - und damit den Heilungsprozess im Gegensatz zu nicht funktionalisierten Werkstoffen deutlich verbessern könnten.

Sobald zusätzlich zur chemischen Zusammensetzung des Materials auch die Faktoren Porengröße, Porengrößenverteilung, Verhältnis Gesamtporosität zu offener Porosität und Größe der exponierten Oberfläche eingebracht werden, ändert sich das Abbauverhalten eines Materiales mithin deutlich [114]. Weiterhin spielt die Prozesstechnik (Sinterungstemperatur und –dauer sowie Erhitzungs- und

Abkühlungsraten) bei der Herstellung der Keramik eine große Rolle für die resultierenden mechanischen Eigenschaften, die Bioaktivität, sowie die chemische/biologische Degradation des Endproduktes [113, 115, 116]. Kristalline Inhomogenität, Unreinheiten, die Anwesenheit von Mikroporen $< 10 \mu\text{m}$, sowie durch suboptimale Sinterungsprofile hervorgerufene instabile Korngrenzen erhöhen die Empfindlichkeit eines porösen keramischen Materials für biologische oder chemische Abbauvorgänge nochmals deutlich [111, 112].

Material	Drucklast (MPa)	Zuglast (MPa)	E-Modul (GPa)	Bioaktivitätsindex
Spongiosa	5,5	3	1	13
Korallines HA	9,3	2,8		3
Norian SRS	55	2,1		
Poröses HA	60	2,5	70	3
PMMA	90	6,9		
Poröses Al_2O_3	60	15		
Bioglas	60	42	35	13
Apatit/Wollastonit	-	215	118	6
Bioglas PS	-	103	5	13
Kortikalis	162	151	15	13

Tabelle 1.1: Mechanische und biologische Eigenschaften von autologem Knochen vs. allogene Knochenersatzmaterialien

Gesamtporosität, Porengröße, Porenmorphologie, Orientierung im dreidimensionalen Raum, und vor allem das Ausmaß an Interkonnektivität und Zugänglichkeit der Poren von der Implantatoberfläche aus, sind genau zu charakterisieren, bevor ein neues Material im Tiermodell oder in präklinischen Studien eingesetzt und seine Leistungsfähigkeit überprüft werden kann. Verfahren wie z.B die Quecksilberporosimetrie sind dazu allein meist nicht ausreichend und sollten von bildgebenden Verfahren wie z.B. dem μCT flankiert werden [121].

Das Charakteristikum der **Interkonnektivität** eines Porensystems verdient in diesem Zusammenhang besondere Erwähnung; erst dieses stellt sicher, dass ein hoher Prozentsatz der Materialoberfläche mit der Implantatoberfläche kommunizieren kann und dass es *in vivo* überhaupt zu den angestrebten Effekten wie Zellapposition, Vaskularisation, Austausch von Mineralien und anderen Nährstoffen und letztlich zu Gewebseinsprossung und –neubildung kommen kann. Limitierend wirkt sich hier die Gesamtfestigkeit eines porösen Materials aus, die bei wachsender Porengröße und Interkonnektivität zwangsläufig abnimmt und den Belastungen *in situ* möglicherweise nicht standhält.

In einigen Studien wurde zudem untersucht, welche Porengröße nun für den alloplastischen Knochenersatz, also die angestrebte Durchbauung und Verzahnung eines künstlichen Materials durch natürliches Knochengewebe, am besten geeignet sei. Klawitter et al legten als minimale Poren- bzw. Durchtrittsgröße 100 μm fest [117]. Shors und Holmes zeigten, dass Porengrößen um 200 μm ein Optimum für das Einwachsen von Knochengewebe (Osteokonduktivität) darstellten [118],

Porengröße	Biologische Funktion
20 – 100 μm	Einwanderung osteoblastärer Zellen und Aufrechterhaltung ihrer Vitalität
100 – 350 μm	Optimales Einwachsen von Knochengewebe Minimierte belastungsbedingte Fibrosierung der Implantatgrenzfläche
350 – 1000 μm	Ideale mechanische Verzahnung mit Knochengewebe
350 – 3500 μm	

Tabelle 2: Die Dimensionierung der Poren poröser Knochenersatzmaterialien hat Einfluß auf ihre Leistungsfähigkeit *in vivo* (nach: Handbook of Porous Solids [125], S. 2948 und [120]).

während Porengrößen von 500 – 600 μm ideal für die mechanische Verzahnung von Implantat und umgebendem Gewebe sei [119] und belastungsbedingte Fibrosierung des periprothetischen Knochens am wirkungsvollsten unterbinden (s. Tabelle 2). Eine vollständige Durchbauung eines porösen Knochenersatzmaterials wird einerseits durch Einwachsen benachbarten Knochens und andererseits durch neu

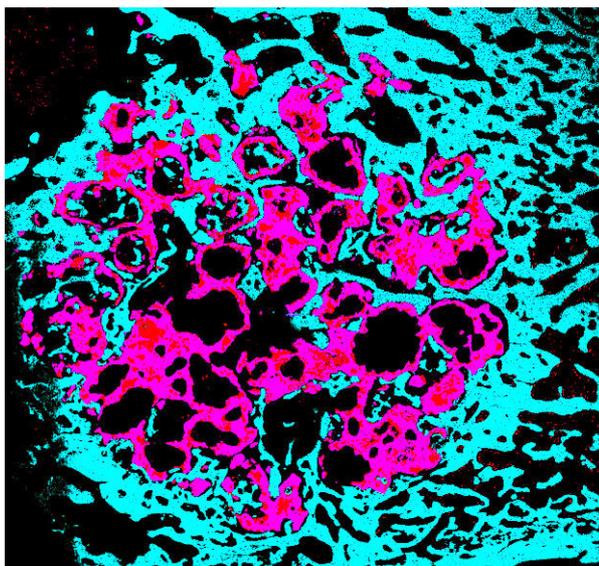


Abbildung 3: Histologischer Schliff einer von Knochen um- und durchbauten Ecoporeprobe nach 6-wöchiger Implantation in die Femurkondyle eines Kaninchens. Komposit und Knochen bilden einen Strukturverbund und stützen sich so wechselseitig. Vorteile sind gute mechanische Verzahnung und höherer Widerstand gegenüber Materialermüdung.

entstehende Knocheninseln in tieferen Bereichen eines Implantates erreicht. Eine Steigerung der Porengröße ist, bedingt durch die damit verbundene, sinkende Festigkeit eines Materials, nicht uneingeschränkt möglich. Eine bimodale Porengrößenverteilung, also die Schaffung großer Poren an der Zirkumferenz und kleinerer Poren im Zentrum eines Implantates ist ein Konzept, um ausreichende Festigkeit mit hinreichenden Porendurchmessern in einem Werkstoff zu kombinieren [120]. Diesem Prinzip folgt u.a. die in Abbildung 6 gezeigte Werkstoffprobe.

Ein offenporöser Knochenersatzwerkstoff mit einer mittleren Porengröße von 100-400 μm ermöglicht *in vivo* eine Vaskularisation und konsekutive Durchbauung mit natürlichem Knochengewebe. Dadurch entstehen eine Reihe von Vorteilen: Zum einen sinkt das Elastizitätsmodul eines porösen Körpers im Vergleich zu einem dichten Körper identischer chemischer Zusammensetzung ab [58], d.h. seine Elastizität nähert sich jener von natürlichem Knochen an, zum anderen sollte in die Poren eingewachsener Faserknochen in der Lage sein, Ermüdungsrisse in den Stegen und Wandungen der Keramik wirkungsvoll abzufangen und so die kraftschlüssige Osseointegration des Implantates nachhaltig zu verbessern (siehe Abb. 2 und 3).

- (i) Poröse Keramiken zeigen zwar eine verminderte Druckbelastbarkeit als dichte Keramiken identischer chemischer Zusammensetzung [59;60], aber dieser primäre Nachteil sollte nach vollständiger Durchbauung des Implantates mit Faserknochen wieder aufgehoben werden. Von einem Anstieg der Druckbelastbarkeit mit zunehmendem Durchbauungsgrad eines offen-porösen Implantates darf deshalb ausgegangen werden.
- (ii) Weiterhin stellt die im Vergleich zu einem dichten Körper deutlich gesteigerte Oberfläche eines porösen Körpers ein erheblich größere Grenzfläche zur Verfügung, die auf makroskopischer Ebene zu einer erhöhten mechanischen Verzahnung zwischen Implantat und umgebendem Knochen führt und bei Vorliegen einer direkten Apposition von Knochen auch den Gesamtwiderstand der Grenzfläche gegen Mikrobewegungen und Implantatlockerung erhöht.

(iii) Schließlich erlaubt ein offenporöses Knochenersatzmaterial im Vergleich zu nichtporösen Materialien eine effektivere Oberflächenmodifikation mit Biomolekülen (z.B. Wachstumsfaktoren) [61;62], Protein (z.B. Kollagen); Pharmazeutika (z.B. Antibiotika) [63;64] oder mit autologen Zellen [65-67] im Sinne einer Biomimikry (Prinzip des *Tissue Engineering*).

In dieser Studie wird ein offen-poröses, keramisches Biomaterial des Instituts für keramische Komponenten im Maschinenbau (IKKM), *Ecopore*, auf seine Eignung als Knochenersatzwerkstoff geprüft. Dazu wurde das Material einem Korrosionstest nach ISO / EN 10993-4 unterzogen, das Eluat auf Toxizität untersucht und schließlich ein Zellkulturversuch des Materials im direkten Kontakt mit primären, humanen Osteoblasten unternommen.

Ecopore

Ecopore ist ein offen-poröses Material, das aus keramischem Titandioxid und dem vulkanischen Mineral Perlit als Porenbildner besteht [68-70]. Perlit ist ein natürlich vorkommendes und industriell abgebautes, vulkanisches Silikat, das wegen chemisch gebundenen H_2O unter Hitzeeinwirkung zwischen dem vier- und zwanzigfachen an Volumen gewinnt. Es resultieren Glasflocken mit einer Gesamtporosität von bis zu 95 Vol.-%. Die Hauptelemente von Ecopore sind nach Niemann et al. SiO_2 (~ 67 m%), Al_2O_3 (~ 13 m%), Na_2O (~ 6 m%), K_2O (~ 5 m%), CaO (> 1 m%) und andere (< 1 m%) [71]. Geblähtes Perlit wird industriell erzeugt und vertrieben.

Das Endprodukt weist eine Gesamtporosität von 60% auf, wovon 2/3 offen, d.h. von aussen zugänglich sind. Das Elastizitätsmodul unter Druckbelastung liegt zwischen 3 und 5 GPa, also im Bereich sehr dichter Spongiosa [51]. Gleichzeitig verfügt Ecopore über eine Druckfestigkeit von ca. 23 Mpa [Quelle: IKKM Aachen].

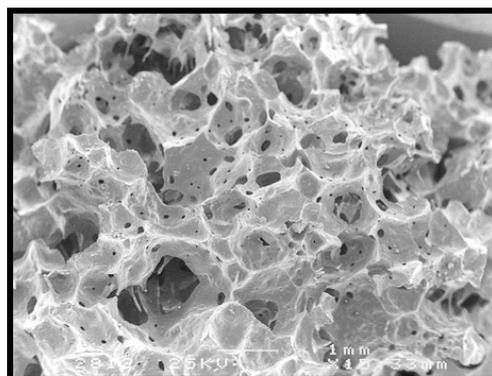


Abbildung 4: Mikrostruktur eines Blähperlitkornes

Die Herstellung von Ecopore

Der Herstellungsprozess von Ecopore beginnt damit, Blähperlitzkörner (vergl. Abb. 4; Perlit EL, Deutsche Perlite GmbH, Dortmund) mit einer wässrigen Suspension aus TiO_2 (Tronox TR, Kerr-McGee, Antwerpen, Belgien) und organischen Additiven (Dispex A40, Ciba Specialty Chemicals Inc. und Rhoximat RH50MD, Bayer Cropscience) zu mischen. Das Masseverhältnis Perlit zu TiO_2 beträgt 1:5. Die organischen Additive dienen dazu, angesichts des sehr niedrigen Wasseranteils von 15,5 Gew.-% eine homogene Verteilung von Wasser, Perlit und TiO_2 zu erreichen. Diese Mischung wird zur Vermeidung von Inhomogenitäten gesiebt und dann in einer

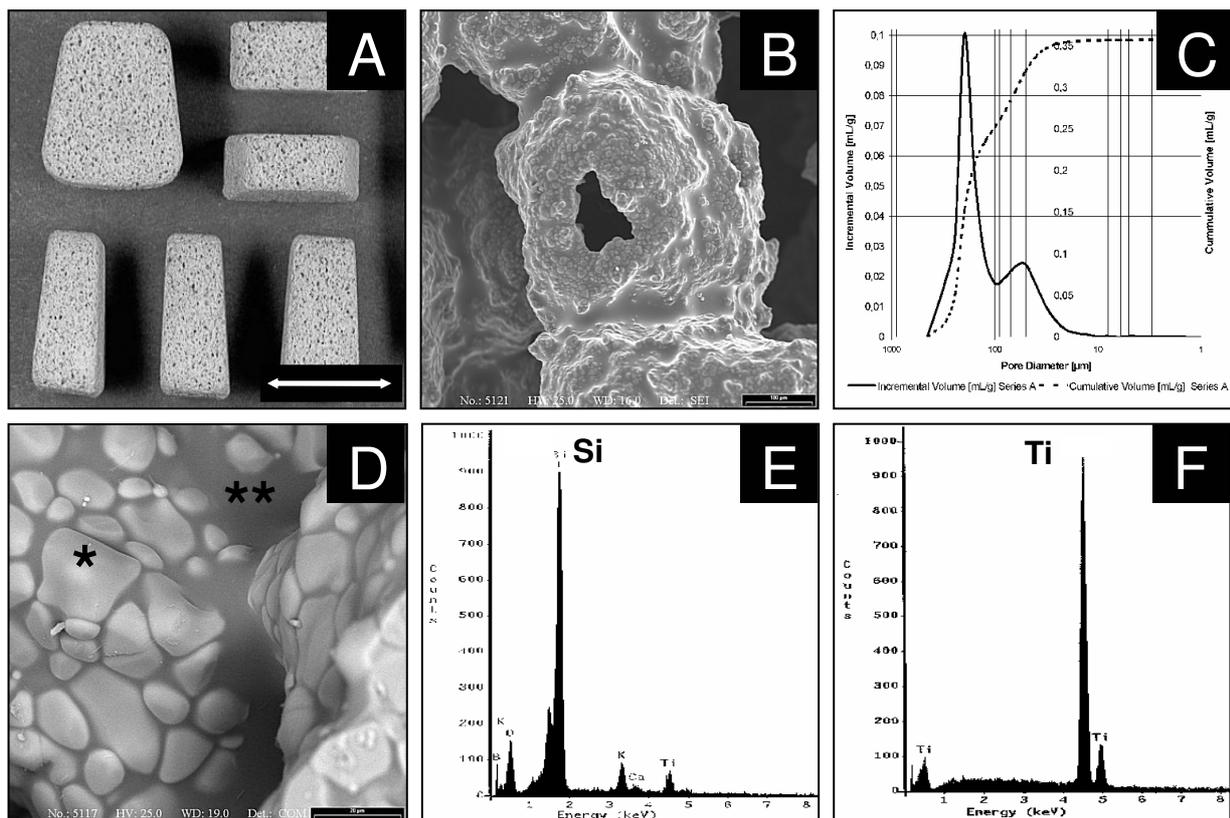


Abbildung 5: Ecopore. Makroskopischer Aspekt (A), Poren- und Stegstruktur (B), Quecksilberporosimetrie (C), Phasenverteilung (D) (* TiO_2 , **Perlitglas), EDX-Analysen der Glasphase (E) und der keramischen Phase (F).

Stahlform uniaxial gepressed (50kPa). Es folgt ein Trocknungsprozess (72 h bei 50 °C) und schließlich der Brand (Erhitzung von 300 K/h, 2 h bei $T_{\max}=1600$ °C, danach passives Abkühlen bis auf Raumtemperatur). Während des Erhitzens werden bei 800 °C alle organischen Additive verbrannt. Bei etwa 1000 °C beginnt das Perlitglas zu schmelzen. Bei weiter steigender Temperatur sintert das suspendierte TiO_2 zu einer festen Stegstruktur. Bei $T_{\max}=1600$ °C schließlich schmilzt das Perlit vollständig auf das gesinterte und dadurch verfestigte TiO_2 auf und hinterlässt die charakteristische offene Porenstruktur im Material. Es resultiert eine Struktur aus zum Teil offenen und zum Teil geschlossenen Poren, wobei die Gesamtporosität 60 % und der Anteil der offenen Poren am Gesamtvolumen des Körpers 40 % betragen.

Abbildung 5 A zeigt einen makroskopischen Aspekt des Materials (in Form von Interponaten für Spondylodesen). Abbildung 5 B zeigt in stärkerer Vergrößerung eine typische Porenstruktur mit offenen, konvexen Außenflächen und teilweise offenen, konkaven Innenflächen. Abbildung 5 C zeigt das Ergebnis einer Quecksilberporosimetrie mit einer bimodalen Porengrößenverteilung von 50 und 200 μm . Die Ultrastruktur von Ecopore entsteht aus in der flüssigen Perlitglasschmelze sinterndem TiO_2 . Das aufgeschmolzene Glas lässt sich besonders gut an den Korngrenzen des TiO_2 und auf den Poreninnenseiten beobachten. Abbildung 5 D zeigt den Materialkontrast zwischen hell imponierender, keramischer/rutiler Phase (TiO_2 , *) und dunkel imponierender, amorpher Glasphase (Perlit, **). Abbildung 5 E und 5 F schließlich zeigen EDS (elektronendispersions-spektroskopische) Analysen der keramischen und gläsernen Phasen und stützen die These, dass keramische/rutile Phase und Glasphase weitgehend getrennt voneinander vorliegen. Während die EDS-Analysen der hellen TiO_2 Körner keinerlei Spuren von Perlit

anzeigen (Abb. 5 F), weist die Glasphase durchaus auch Spuren von TiO_2 auf (Abb. 5 E). Dies mag sowohl auf eine begrenzten Löslichkeit des TiO_2 in der Glasschmelze jenseits von 1554 °C zurückzuführen sein [72], könnte aber auch durch nicht sichtbares, nahe der Glasoberfläche liegendes TiO_2 verstärkt werden. Zusätzliche Röntgenbrechungsanalysen (XRD) des IKKM Aachen unterstützen diese Einschätzung: Es liegen sowohl eine rutile Phase, als auch eine amorphe Glasphase, aber keine weiteren Kristallphasen in Ecopore vor.

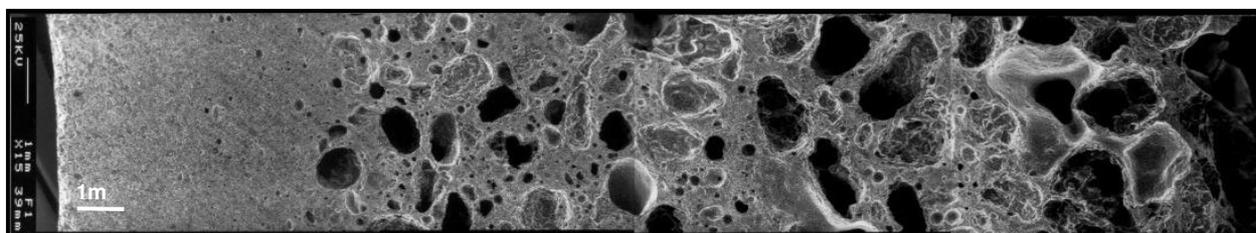


Abbildung 6: Ecopore lässt sich auch mit gradiertem Porenaufbau herstellen. Dies erlaubt ein hohes Maß an mechanischer Verzahnung mit Knochengewebe an der Zirkumferenz bei gleichzeitig hoher Druckfestigkeit des Gesamtverbundes.

Die Biokompatibilität von Ecopore

In einer ersten Biokompatibilitätsuntersuchung an L929 Fibroblasten und humanem Vollblut, durchgeführt durch ein zertifiziertes Testlabor (BMP GmbH, Aachen, Deutschland) nach ISO / EN 10993-5, konnte Ecopore die grundsätzliche Biokompatibilität attestiert werden.

Zunächst wurden Eluate hergestellt, indem definierte Mengen von Ecopore (0,2 g/ml) mit RPMI 1640 Zellkulturmedium inkubiert wurden (72 h bei 37 °C). Dieses so konditionierte Medium wurde dann für die Kultur von L929 Fibroblasten in herkömmlichen Petrischalen verwendet. Die Kulturdauer betrug 24 h. Unkonditioniertes RPMI Medium diente als Negativkontrolle, RPMI mit einem Zusatz von 10 Vol.-% Ethanol als Positivkontrolle. Die Vitalität der Zellen wurde durch eine Fluoreszenzdoppelfärbung, bestehend aus Fluoresceindiacetat und Ethidiumbromid, untersucht. Die Morphologie der Zellen wurde mit einer klassischen Hämatoxylinfärbung untersucht. Zur Messung von Zellproliferation und Zellstoffwechsel diente der XTT-Test (Tetrazoliumsalz-Spaltest) und die Inkorporation von Bromodesoxyuridin (BrdU). Die Auswertung der Proliferationsuntersuchung erfolgte colorimetrisch in einem Photometer. Mit keinem der untersuchten Parameter konnte unter mit Ecopore inkubiertem Medium eine Kompromittierung der verwendeten L929 Fibroblasten festgestellt werden. Sämtliche Ergebnisse lagen im Bereich der Negativkontrolle.

In einem weiteren Modell wurde untersucht, ob der direkte Kontakt von humanem Vollblut mit gemörsertem Ecopore eine primäre Entzündungsreaktion auslöste. Humanes, heparinisiertes Vollblut wurde dazu in einer modifizierten Chandler-Einheit

unter dynamischen Bedingungen (275 /s) inkubiert. Heparinisiertes Vollblut ohne weitere Additive diente als Negativkontrolle, 100 cm² Cuprophanfolie als Positivkontrolle. Als Parameter für eine primäre immunologische Reaktion diente der Komplementfaktor C5a [73;74]. In keinem unabhängigen Experiment konnte eine signifikante C5a-Erhöhung festgestellt werden. Die gemessenen Werte lagen im Bereich der einfachen Standardabweichung der Negativkontrolle.

Ziel dieser Untersuchung und weiterer Projektverlauf

Nach der oben beschriebenen Feststellung der generellen Biokompatibilität von Ecopore sollte in einer weiteren *in vitro* Untersuchung geklärt werden, inwieweit Ecopore für die Implantation in Knochen und letztlich für den Einsatz als endoprothetischer Knochenersatzwerkstoff geeignet ist.

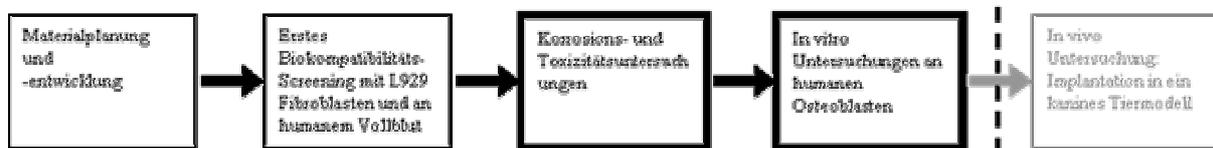


Abbildung 7: Chronologische Darstellung der Einzeluntersuchungen im Rahmen der Entwicklung des porösen Knochenersatzwerkstoffes *Ecopore*. Hervorgehoben sind die Untersuchungen, die Hauptgegenstand der vorliegenden Arbeit sind. Blau dargestellt sind in Vorbereitung befindliche *in vivo* Experimente.

Diese Untersuchung, deren Darstellung Hauptgegenstand dieser Arbeit ist, bestand aus zwei Teilen; zunächst wurde ein Korrosionsversuch nach ISO / EN 10993-4 durchgeführt, um das Biodegradationsverhalten des Materials zu prüfen. Es galt zu klären, ob sich das Material in quasi-physiologischem Milieu (pH 7,4 und Körpertemperatur) als korrodierbar oder inert erweisen würde. Diese Untersuchung wurde über einen Zeitraum von 21 Tagen durchgeführt. Das Eluat wurde asserviert und einer Toxizitätsuntersuchung durch ein zertifiziertes Labor zugeführt. Da weder über rutilen TiO_2 , noch über Perlit Daten zu Korrosionsverhalten oder Toxizität vorlagen, war dies ein wichtiger Schritt für die weitere Entwicklung des Materials (s. Abb. 7).

Im zweiten Teil wurde ein Zellkulturmodell gewählt, das das avisierte Zielgewebe Knochen genauer abbilden konnte, als dies mit L929 Fibroblasten möglich war. Dazu wurden primäre humane Osteoblasten *in vitro* in direkten Kontakt mit nichtporösen Proben von Ecopore, von reinem Perlit und von reinem, rutilem TiO₂ gebracht und 9 Tage lang auf diesen Proben inkubiert.

MATERIALIEN UND METHODEN

Vorbereitung der keramischen Materialproben

Ziel dieser Untersuchung war es, humane Osteoblasten in direkten Kontakt mit Proben von Ecopore, sowie seiner beiden Einzelkomponenten zu bringen. Um einen direkten Vergleich der drei in ihrer Beschaffenheit sehr unterschiedlichen Materialien zu ermöglichen, war es erforderlich, gleich große und topographisch möglichst ähnliche Oberflächen zu erzeugen. Zu diesem Zweck wurden dichte und somit nicht-poröse Proben hergestellt. Die Proben hatten die Form von runden Scheiben der Dimension $\varnothing 24 \times 3$ mm.

Ecopore wurde gemäß dem im vorangegangenen Abschnitt dargelegten Herstellungsprozess erzeugt. Zur Herstellung nicht-poröser Proben war allerdings die Zermörserung der Blähperlitflocken zu feinem Pulver notwendig. Nach Herstellung der primären Mischung aus TiO_2 , Perlit, 15,5 Gew.-% entionisiertem Wasser und organischen Zusatzstoffen in einer Industrieknetmaschine (Knetdauer 18 h), wurde diese durch eine runde Öffnung gepresst und so zu zylindrischen Rohlingen mit einem Durchmesser von 40 mm verarbeitet. Trocknung, Brand und Abkühlungsphase fanden wie oben beschrieben statt. Aus den abgekühlten Rohlingen wurden schließlich mit Diamantwerkzeugen Zylinder mit einem Durchmesser von 24 mm gefräst und diese dann in Scheiben von 3 mm Dicke zersägt.

Reines keramisches TiO_2 wurde im Schlickerguss-Verfahren hergestellt. Dazu wurden 74 Gew.-% TiO_2 Pulver mit entionisiertem Wasser und organischen Additiven in Suspension gebracht und diese Mischung wie beschrieben 18 h lang geknetet. Danach wurde die Mischung in Gipsformen überführt und nach dem schon beschriebenen Temperaturprofil gebrannt. Schließlich wurden aus dem Rohling die Probenkörper gefräst/gesägt.

Zur Herstellung der Probenkörper aus reinem Perlitglas wurde zunächst wieder Perlitpulver hergestellt. Dieses wurde dann isostatisch gepresst um eine weitere Verdichtung zu erzeugen. Das vollständige Aufschmelzen erfolgte bei $1700\text{ }^\circ\text{C}$ für 2 h in einem speziellen Platingefäß. Die höhere Temperatur im Vergleich zum Herstellungsprozess von Ecopore wurde gewählt, um die Zahl verbliebener Poren auf ein Mindestmaß zu reduzieren. Die Rohlinge wurden dann passiv bis auf Raumtemperatur abgekühlt. Ein Zylinder ($\text{Ø } 24\text{ mm}$) wurde aus dem im Platingefäß befindlichen Rohling heraus gefräßt und in 3 mm dicke Scheiben zersägt.

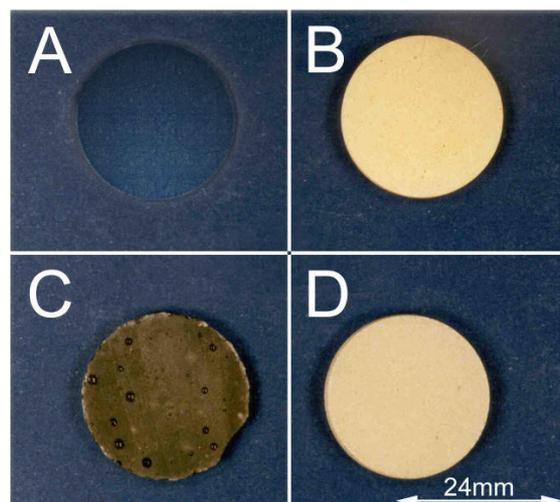


Abbildung 8: Materialproben für die direkte Cokultur mit humanen Osteoblasten. Kontrolle aus plasma-behandeltem Polystyrol (Thermanox[®]), sowie nicht-poröse Proben von Ecopore (B), Perlit (C) und keramischem TiO_2 (D).

Alle Scheiben wurden nach ihrer Herstellung mit einer D76 Diamantscheibe geschliffen und damit eine mittlere Rauigkeit von $R_a = 1,53 \mu\text{m}$ erzeugt. Abschließend erfolgte eine kurze Erhitzung auf $800 \text{ }^\circ\text{C}$ (Erhitzung 400 K/h) mit anschließender passiver Abkühlung bis auf Raumtemperatur, um eine theoretische Kontamination mit organischem Material weitestgehend auszuschließen (vergl. Abb. 8).

Korrosionsuntersuchung

Materialkorrosion wurde unter Berücksichtigung der ISO / EN 10993-4 Norm ermittelt. Dazu wurden dichte, nicht-poröse Materialproben einem definierten Volumen physiologischer Kochsalzlösung ausgesetzt ($1,3 \text{ ml} / \text{mm}^2$ Probenoberfläche). Die Proben wurde zusammen mit der Kochsalzlösung in 20 ml Falcon-Tubes überführt und bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ für einen Zeitraum von 21 Tagen unter leichter Schwenkbewegung inkubiert. Nach Ablauf des Zeitraumes wurden die Proben jeweils zweimal mit entionisiertem Wasser gespült, für 2 h bei $80 \text{ }^\circ\text{C}$ getrocknet und schließlich auf einer Präzisionswaage gewogen.

Die Überstände aus dem Korrosionsversuch, also die eluierte Kochsalzlösung, wurde zunächst asserviert und eingefroren. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden die Eluate gemäß ISO / EN 11885 (Atomemissionsspektroskopie, ICP-AES) und EN 1483 (Atomabsorptionsspektroskopie, AAS) in einem zertifizierten Labor (FGK – Forschungsinstitut für anorganische Werkstoffe Glas/Keramik GmbH, Hör-

Grenzhausen, Deutschland) einer Elementaranalyse unterzogen, um so einerseits etwas über das Spektrum von in Perlit enthaltenen Spurenelementen zu erfahren und andererseits festzustellen, ob diese Spurenelemente in kritischen und somit toxischen Mengen freigesetzt werden.

Die Daten wurden einem Student'schen T-Test unterzogen, um die Irrtumswahrscheinlichkeit beim Vergleich der Mittelwerte der unabhängigen Stichproben mit den Referenzwerten der WHO einschätzen zu können.

***In vitro* Untersuchungen an primären humanen Osteoblasten**

Osteoblasten sind differenzierte Zellen, verantwortlich für die Bildung und Mineralisation von Knochen. Sie sind bei optimaler Anhaftung am Untergrund kuboid geformt, basophil und enthalten viel raues endoplasmatisches Retikulum als Zeichen ihrer hohen Proteinproduktion. Man findet sie in Havers'schen Systemen, wo sie eine Phalanx bilden, die die von vorgeschalteten Osteoklasten gebildeten Havers'schen Kanäle mit neuem Osteoid auskleiden und schichtweise mineralisieren. Adäquater Reiz für die Aktivierung von Osteoklasten und Osteoblasten sind nach heutigem Kenntnisstand vor allem mechanische und endokrine Stimuli.

Osteoblasten bilden vor allem große Mengen des Enzyms Alkalische Phosphatase, das für die Zugbelastbarkeit der Kortikalis verantwortliche Protein Kollagen I und nicht-kollagenhaltige Proteine der Knochenmatrix, zum Beispiel Fibronectin, Bone-Sialoprotein oder Vitronectin.

Ihre Vorläuferzellen sind die so genannten Präosteoblasten, die einige, aber nicht alle der oben bezeichneten Charakteristika von Osteoblasten aufweisen. Zum Ende der Bildung eines Havers'schen Kanals mauern sich Osteoblasten in Osteoid ein und werden zu stationären Zellen, die miteinander durch feine Kanäle kommunizieren und vermutlich versorgende Aufgaben übernehmen. In diesem Zustand werden sie Osteozyten genannt. Ob diese bei erneuten Umbauvorgängen wieder reaktiviert werden, ist noch ungeklärt.

Osteoblasten werden nur zu einem geringen Teil zu Osteozyten (ca. 20%). Der Rest hat eine definierte Lebensdauer und geht vermutlich durch Apoptose zugrunde. Der Nachschub junger Osteoblasten wird durch die Präosteoblasten sichergestellt, die ihrerseits von mesenchymalen Stammzellen gebildet werden, die im angrenzenden Bindegewebe und der Spongiosa zu finden sind. Auch gibt es so genannte Colony-Forming-Unit Fibroblasten (CFU-F) - polypotente Zellen, die sich in Osteoblasten, Chondroblasten, Adipozyten und Fibroblasten umformen können (diesen Differenzierungspfad nennt man *asymmetrische Mitose*). Auch in vitro konnten diese unterschiedlichen Differenzierungspfade induziert werden. Dies gelingt in vielen Fällen mit Steroidhormonen, im Fall von Osteoblasten mit Dexamethason und D-Hormon. Auch an klonierten Zelllinien von Mäusen (embryonale Fibroblasten C3H 10T1/2) und Ratten (ROB-C26 und RCJ 3.1 aus Schädelknochen und C1 aus Muskelgewebe) konnte eine distinkte Differenzierungshierarchie nachgewiesen werden: Multipotente Zellen wandeln sich zunächst in tri- oder bipotente Zellen und diese schließlich in monopotente Zellen (wie Osteoblasten, Chondroblasten, Myozyten oder Adipozyten) um. Der Zelltyp, der in dieser Hierarchie nur noch Knochenzellen bilden kann, wird Osteoprogenitor-Cell oder auch Vorläuferzelle genannt. Letztere ist ein Beispiel für eine tri- oder bivalente Zelle.

Solche Knochen-Vorläuferzellen sind nicht immer sehr aktiv. Es gibt einerseits Kolonien von ihnen, die ohne spezielle Stimuli in vitro voll ausdifferenzierte Osteoblasten heranbilden und andererseits auch solche, die dies nur unter Zuhilfenahme von Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel Bone Morphogenetic Protein tun.

Bei der Anlage von Primärkulturen aus humaner oder tierischer Spongiosa mit dem Ziel einer Osteoblastenkolonie (zum Beispiel zur *in vitro* Testung von Knochenersatzwerkstoffen) ist es somit ratsam, dem Kulturmedium Dexamethason und/oder BMP hinzuzufügen, um eben ein Ausdifferenzieren in den Bindegewebs- oder Knorpeltyp zu verhindern.

Osteoblasten bilden und reagieren auch auf Prostaglandine, speziell Prostaglandin E₂, durch die bestimmte Reaktionen induziert und moduliert werden. Adäquate Reize für eine Prostaglandinbildung sind verschiedene Hormone, Zytokine und auch mechanische Einwirkungen auf den Zellverband.

Zellkultur

Humane Osteoblasten wurden aus explantierter Beckenkammspongiosa unfallchirurgischer Patienten angezüchtet, die vorher schriftlich dazu eingewilligt hatten. Aus diesen Explantaten wurden Zellen isoliert und gemäß einem Standardprotokoll kultiviert [75;76]. Als Kulturmedium diente Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit den Nährstoffzusätzen F-12 und Glutamax (alle Gibco-BRL, UK), sowie Penicillin (100 U/L), Streptomycin (10 µg/mL) (beide Sigma-Aldrich), 10 % fetales Kälberserum (FKS), Dexamethason (100 nmol) und Vitamin C (0,05 mmol). Bei Erreichen eines konfluenten Zellrasens wurden die Kulturen suspendiert und im Verhältnis 1:2 auf neue Kulturflaschen aufgeteilt. Um die Zellen vom Untergrund abzulösen, wurden sie mit einer Lösung aus 0,05 % Trypsin, 0,04 % EDTA (beide Sigma-Aldrich) und PBS bei 37 °C für 5 Minuten inkubiert. Nach der zweiten Passage (typischerweise nach 14 Tagen) wurden die Zellen auf ihren Phänotyp untersucht. Osteoblasten weisen im Gegensatz zu Fibroblasten oder

Im nächsten Schritt wurden auf jede Materialprobe 4×10^4 Zellen, suspendiert in 1 ml Medium, aufpipettiert. Zum Einsatz kamen vier Materialvarianten: Nicht-poröse Proben von Ecopore, reinem Perlit und reinem TiO_2 , sowie als Kontrollmaterial Plasmagas-behandeltes Polystyrol (Thermanox®, Ø 24 mm). Die Proben wurden in 6-Well Platten (Falcon Multiwell, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) aufbewahrt und in einer angefeuchteten, karbogenen Atmosphäre (5 % CO_2 , 95 % Raumluft) bei 37 °C inkubiert. Das Suspensionsvolumen wurde genau so gewählt, damit sich auf allen Materialien ein stehender Tropfen entwickelte, der die Oberfläche der Scheiben größtenteils abdeckte und so primär ein breiten Besatz der verfügbaren Materialoberfläche zuließ, ohne dabei aber seitlich von den Scheiben in die Kulturschale abzufließen und so die Ausgangszellzahl zu vermindern. Der Tropfen wurde 2 h lang so belassen, um ein Absedimentieren und Anheften der Zellen auf das jeweilige Material zu gewährleisten. Danach wurde jedes Well mit weiteren 2 mL Kulturmedium aufgefüllt. Auf Thermanox wurden anstatt 4×10^4 Zellen nur 2×10^4 Zellen ausgesät, um eine frühzeitige Hyperkonfluenz im Verlaufe des Beobachtungszeitraumes zu verhindern [77]. Die Thermanox-Kontrollproben entziehen sich so jedoch weitgehend einem quantitativen Vergleich und können nur der qualitativen Kontrolle dienen [78].

Für dieses Experiment wurden drei unabhängige Ansätze mit Zellen unterschiedlicher Spender durchgeführt. Zwei Spender waren männlich und 55 bzw. 20 Jahre alt, eine Spenderin war 51 Jahre alt. Über Komorbiditäten der Spender zum Zeitpunkt der Explantation, die die Aktivität der Zellen beeinflussen könnten, ist uns nichts bekannt. Die Zellen wurden nicht gepoolt und in drei unabhängigen Experimenten jeweils an drei Stichtagen (3, 6, 9 Tage) getestet.

Zellvitalität

Die Vitalität der verwendeten Zellen wurde durch eine Fluoreszenzmarkierung mit Fluoresceindiacetat und Propidiumiodid getestet. Fluoresceindiacetat permeiert die Zellmembran intakter Zellen und färbt ihr Zytoplasma grün an, während Propidiumiodid diese Plasmamembran intakter Zellen nicht durchdringen kann. Defekte Plasmamembranen kann es jedoch passieren und interkaliert dann mit der im Zytoplasma oder Nukleus befindlichen DNA. Diese Markierung imponiert dann rot bis orange.

Zellmorphologie

Zur Darstellung der Zellmorphologie und der Anheftung der Zellen auf den soliden und mithin dunklen Probenkörpern war der Einsatz von Hämatoxylin und konventioneller Lichtmikroskopie nicht geeignet. Deshalb setzten wir zur morphologischen Untersuchung die Rasterelektronenmikroskopie (REM) ein. Zur Vorbereitung darauf wurden die mit Zellen besetzten Materialproben zunächst mit Phosphatpuffer (PBS) gespült und in 3 % Glutaraldehyd 2 h fixiert. Danach wurden die Proben wiederum 1 h mit PBS gespült, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30, 50, 70, 90, 100 %) entwässert und dann in einem Critical-Point-Dryer (Polaron, Plano, Göttingen, Deutschland) mit CO₂ getrocknet. Schließlich wurden die Proben mit Gold ummantelt und mit einem Rasterelektronenmikroskop (Philips SEM 515, Eindhoven, Niederlande) und einer Beschleunigungsspannung von 20 keV begutachtet.

Zellstoffwechsel und Zellproliferation: XTT-Test

Die Proliferation der einzelnen Zellkulturen wurde näherungsweise durch Darstellung ihrer metabolischen Aktivität nachgewiesen. Dazu diente der XTT-Test (Tetrazoliumsalz-Spalttest). Der Test bietet den Zellen ein Substrat an, welches durch mitochondriale Aktivität gespalten und zu einem farbigen Produkt umgesetzt wird, das colorimetrisch gemessen werden kann. In einem Vorversuch konnte gezeigt werden, dass XTT-Werte sehr eng mit der Zellzahl in einer jeweiligen Kultur korrelierten. In dieser Studie wurde deshalb auf die Bestimmung der Zellzahl zum Proliferationsnachweis verzichtet.

Der Test wurde gemäß dem Arbeitsprotokoll des Herstellers (Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden 50 µL der XTT Lösung mit 0,1 mL Reagenz gemischt. Nach der Inkubationszeit wurden 50 µL der fertigen XTT-Lösung zu jedem Well hinzu pipettiert, so dass die resultierende Konzentration 0,3 mg/mL betrug. Die Materialproben wurden dann weitere 2 h inkubiert und die metabolische Aktivität dann bei einer Wellenlänge von 490 nm in einem Photometer (Molecular Devices) ausgelesen. Die Ergebnisse wurden um den Blankwert (zellfreies Medium) reduziert und als optische Dichte (OD490) wiedergegeben. Alle Materialproben wurden dreifach bestimmt. Die Ergebnisse sind grafisch zusammengefasst und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung.

ELISA-Analyse der Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- α

Während der Inkubationszeit wurde das Zellkulturmedium alle 2 Tage ausgetauscht (3 mL/Well). Die verbrauchten Überstände wurden an jedem Stichtag asserviert und bei -80 °C eingefroren. Die Überstände wurden dann unter Zuhilfenahme klinischer ELISA Diagnosekits (Promocell, Heidelberg, Deutschland) auf ihren Inhalt von Interleukin-1, Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor- α untersucht. Die Ergebnisse wurden mit der metabolischen Aktivität (XTT-Werte) normalisiert, um relative und damit vergleichbare Daten zu erhalten.

ERGEBNISSE

Korrosionsuntersuchung

Diese Untersuchung wurde vorgenommen, um abschätzen zu können, wie sich Ecopore bei permanenter Implantation in einen lebenden Organismus verhalten würde, so wie es auch beim Einsatz als Knochenersatzmaterial der Fall wäre. Dazu wurden nicht-poröse Materialproben (die gleichen Scheiben, die auch für die Kokultur mit humanen Osteoblasten verwendet wurden) 21 Tage lang bei 37 °C in physiologischer Kochsalzlösung inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Materialproben gespült, getrocknet und auf einer Präzisionswaage gewogen. Tabelle 3 fasst die Ergebnisse zusammen.

Masse der Proben [g]	Probe 1	Probe 2	Probe 3
1. Wägung	6,9493	6,9281	7,3150
2. Wägung	6,9485	6,9283	7,3163
3. Wägung	6,9486	6,9286	7,3160
Mittelwert	6,9488	6,9283	7,3158
Mittelwert Wägung vorher	6,9500	6,9294	7,3168
Differenz	-0,0012	-0,0009	-0,0010
Prozentualer Masseverlust	0,017%	0,013%	0,014%

Tabelle 3: Korrosionsprüfung mittels Präzisionswägung

Ecopore erwies sich mit einem mittleren Masseverlust von $0,01460 \pm 0,00002$ % in diesem Modell als korrosionsunempfindlich. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass Ecopore nicht resorbierbar ist und sich *in situ* weitgehend unempfindlich gegenüber herrschendem pH-Wert und Temperatur verhalten wird.

ELEMENTAR ANALYSE	Kontrolle (Kochsalzlösung)	Ecopore-inkubierte Kochsalzlg.	p	WHO
Element	mg/l	mg/l		mg/l
Al	0.0010	0.0010±0	n.a.	
As	0.0020	0.0020±0	n.a.	0.01
B	0.0220	0.0197±0.0023	0.08	0.5
Ba	0.0004	0.0177±0.0144	0.05	0.7
Ca	0.0890	0.6433±0.1904	<0.01	
Cd	0.0001	0.0001±0	n.a.	
Co	0.0001	0.0241±0.0332	0.14	
Cr	0.0010	0.0010±0	n.a.	0.05
Fe	0.0010	0.0031±0.0011	0.02	
Ga	0.0001	0.0001±0	n.a.	
K	0.5500	1.8433±0.2570	<0.01	
Mg	0.0097	0.0450±0.0135	<0.01	
Mn	0.0001	0.0060±0.0040	<0.03	0.4
Mo	0.0006	0.0174±0.0141	0.05	0.07
Ni	0.0018	0.0039±0.0018	0.05	0.02
PO4	0.1400	0.8000±0.5126	0.04	
SO4	0.0110	0.0230±0.0070	0.02	
Si	0.0380	0.2263±0.2034	0.09	
Sr	0.0005	0.0041±0.0014	<0.01	
Ti	0.0001	0.0132±0.0198	0.16	
Zn	0.0030	0.0373±0.0085	<0.01	
Zr	0.0001	0.0001±0	n.a.	
Hg	<0.0002	<0.0002	n.a.	

Tabelle 4: Elementaranalyse der Überstände aus dem Korrosionsversuch. Unbenutzte Kochsalzlösung diente als Kontrolle. Zum Vergleich die aktuellen Trinkwasserempfehlungen der WHO.

Sowohl rutilen TiO₂, als auch und vor allem Perlit sind in dieser Form bislang noch nicht in einem alloplastischen Material verwendet worden. Insbesondere Perlit könnte aufgrund seines vulkanischen Ursprungs und der somit nicht kontrollierbaren chemischen Zusammensetzung eine Vielzahl metallischer Spurenelemente enthalten, die wiederum seinen Einsatz als Teil eines Knochenersatzwerkstoffes unter Umständen einschränken würden. Deshalb wurden die im oben beschriebenen Korrosionsversuch benutzten Kochsalzlösungen zunächst asserviert und später einer

Analyse in einem zertifizierten Labor zugeführt. Als Kontrolle diente eine Probe unbenutzter Kochsalzlösung derselben Charge wie die der Überstände des Korrosionsversuches. Der gesamte Versuch wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Von 23 getesteten Elementen waren, verglichen mit der Kontrolle, 7 unverändert, darunter potentiell zytotoxische und genotoxische Elemente wie Arsen, Bor, Cadmium, Chrom und Quecksilber. 16 Elemente lagen in signifikant ($p \leq 0.05$) erhöhter Konzentration in den Korrosionslösungen vor, darunter Barium, Mangan, Molybdän, Nickel und Strontium. Ausserdem lagen 3 weitere Elemente (Cobalt, Silizium und Titan) erhöht vor, jedoch in mit grosser Variabilität ($0.16 > p > 0.05$). In Ermangelung von Vergleichsdaten wurden die aktuellen Empfehlungen der WHO für Trinkwasserqualität herangezogen und die verfügbaren Referenzwerte in Tabelle eingebunden.

***In vitro* Untersuchungen an primären humanen Osteoblasten**

Nach Feststellung der allgemeinen Biokompatibilität mit L929 Fibroblasten sollte in einem weiteren *in vitro* Experiment aufgeklärt werden, ob Ecopore und seine einzelnen Komponenten auch mit Zellen des späteren Anwendungsbereiches, also Osteoblasten, kompatibel sein würden. Dazu wurden primäre humane Osteoblasten aus Spongiosaexplantaten angezüchtet und diese direkt auf Proben der unterschiedlichen Materialien ausgesäht. Es handelt sich also um ein *in vitro* Modell, welches durch den direkten Kontakt von Material und spezifischen Knochenzellen eine realitätsnahe Aussage über Ecopores biologische Eignung als Implantatmaterial im Knochenbereich erlaubt. In dieser Untersuchung wurden die Parameter

Zellvitalität, Zellmorphologie, Zellstoffwechsel und Zellproliferation und schließlich immunologische Aktivierung bestimmt.

Zellvitalität

Die Vitalität von Zellen ist nur bei intakter Plasmamembran gewährleistet. Die Integrität der Zellmembranen wurde durch eine Doppelmarkierung mit Fluoreszeindiacetat (FDA) und Propidiumiodid (PI) untersucht. Die Vitalität der Zellen war auf allen Materialien und an allen Stichtagen generell sehr gut, rot markierte DNA als Zeichen geschädigter Zellen und Toxizität der assoziierten Materialien war nicht zu beobachten. Es konnte im Verlauf des Beobachtungszeitraumes auf allen Materialien eine zunehmende Konfluenz der Zellen beobachtet werden. Auf der Kontrollprobe aus Polystyrol (THERMANOX[®]) bildeten die Zellen lange Fortsätze, so dass die Zellen nicht selten eine maximale Ausdehnung von 200 µm erreichten. Durch die Ausrichtung in der Longitudinalachse und enge Anlagerung dieser langen Zellfortsätze ergab sich im Vergleich zu den keramischen Proben und Perlit ein deutlich unterschiedliches Übersichtsbild der Zellkultur (Abb. 10 A). Auch die Proliferationsrate (also die Zeit bis zum Erreichen eines konfluenten Zellrasens) war auf THERMANOX deutlich höher als auf den anderen Materialproben. Auf ECOPORE waren die ausgesähten Zellen erheblich weniger ausgedehnt und hatten eine eher kuboide Form mit einem typischen Durchmesser von 20-40 µm (Abb. 10 B). Initiale Anheftung und Vitalität, Morphologie und Proliferationsrate der Zellen erschienen auf PERLIT (Abb. 10 C) und TiO₂ (Abb. 10 D) weitgehend identisch mit ECOPORE.

Zellmorphologie

Zur Untersuchung der Zellmorphologie und zur Detailstudie der extrazellulären Matrix der Zellen und Grenzfläche zwischen einzelnen Zellen und Untergrund wurden rastelektronenmikroskopische Bilder angefertigt (Abb. 10 E-H). Hier fiel zunächst auf, dass die in der Fluoreszenzfärbung beobachteten, distinkten morphologischen Unterschiede zwischen Zellen, die auf THERMANOX kultiviert wurden und solchen, die auf den anderen Materialproben kultiviert wurden, nicht so deutlich imponierten. Dennoch waren die Zellen auf THERMANOX generell weiter ausgebreitet, als auf den anderen Materialien. Auf allen Materialien inklusive der THERMANOX Kontrollproben konnten ausgebreitete und somit fest verankerte Zellen, neben kugelig retrahierten, mitotischen Zellen beobachtet werden. Auch konnte eine reiche extrazelluläre Matrix (Abb. 10 G) und an späteren Stichtagen auch Mineralisationskerne beobachtet werden.

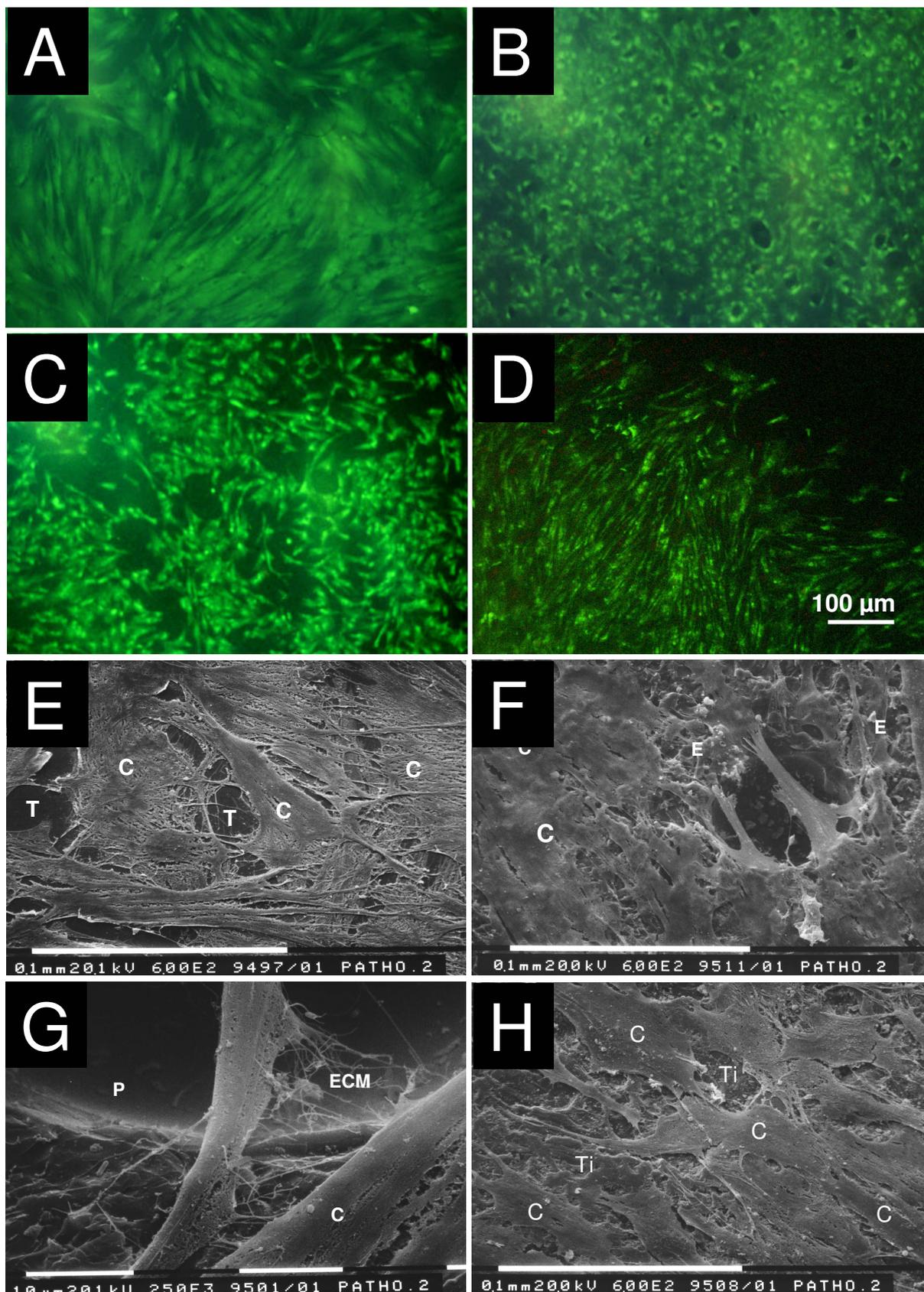


Abbildung 10: Vital-Färbung von humanen Osteoblasten auf Thermanox (A), Ecopore (B), Perlit (C) und TiO₂ (D). Auf allen Proben Nachweis ungestörter Membranintegrität. REM-Aufnahmen der Materialproben in gleicher Reihenfolge (C: Zelle, T, E, P, Ti: Materialien. ECM: kollagene Matrix).

Zellstoffwechsel und –proliferation: XTT-Test

Durch den XTT-Test konnte auf allen Zellen an allen Stichtagen eine metabolische Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 11). In allen unabhängigen Experimenten konnte eine ungebremste Aktivitätssteigerung im Beobachtungszeitraum gezeigt werden. Das Profil der Aktivitätssteigerung nimmt auf allen Materialien eine linearen bis exponentiellen Verlauf an, was die Proliferation der einzelnen Zellkulturen nahe legt, da die metabolische Aktivität der einzelnen Zellen durch die beteiligten Enzyme natürlich begrenzt ist und so auch das Aktivitätsprofil einer nicht-proliferierenden Kultur eher einen logarithmischen Verlauf nehmen würde. Diese Interpretation wurde durch unsere mikroskopischen Beobachten voll unterstützt.

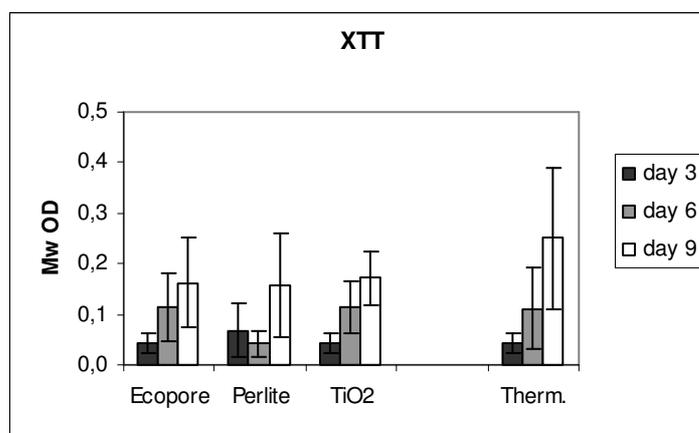


Abbildung 11: Verlauf der Proliferation/XTT-Werte der Zellen in direktem Kontakt mit den verwendeten Materialien über 9 Tage (jeweils MWt \pm Standardabweichung, n=3). Das Inokulum bei Thermanox lag bei 2×10^4 Zellen vs. 4×10^4 Zellen bei den anderen Materialien.

Trotz der kleineren Inokula, die auf den THERMANOX Kontrollproben ausgesät wurden (2×10^4 vs. 4×10^4 Zellen), zeigte sich schon an Tag 3 eine fast gleich große Gesamtstoffwechselaktivität der Zellen auf allen Materialien. An den folgenden Stichtagen war die Aktivität auf THERMANOX ausnahmslos erheblich größer als auf den Ecopore-assoziierten Materialproben. Dies legt eine deutlich höhere Proliferationsgeschwindigkeit der auf THERMANOX inkubierten Zellen nahe.

ELISA-Analyse der Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- α

Die Konzentrationen der klassischen Entzündungsmediatoren Interleukin-1 und Tumornekrosefaktor- α lagen unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten ELISA-Kits. Wir konnten für alle Materialien, im Vergleich zu den THERMANOX Kontrollproben in allen unabhängigen Experimenten und an allen Stichtagen keinerlei Erhöhung der genannten Parameter feststellen. Die gemessenen Konzentrationen von Interleukin-6 waren demgegenüber etwas erhöht. Diese Erhöhung war konsistent an allen Stichtagen und in allen unabhängigen Experimenten. Folgende Konzentrationen, ausgedrückt als arithmetisches Mittel über alle Stichtage und unabhängigen Experimente (n=3), wurden beobachtet (Tab. 5):

Interleukin-6	MW [pg/mL]
Ecopore	8,78 \pm 4,77
Perlit	7,71 \pm 3,48
TiO ₂	12,75 \pm 5,40
Thermanox	8,49 \pm 5,39

Tabelle 5: Durchschnittliche Konzentration von Interleukin-6, bei direktem Kontakt der Zellen mit den verwendeten Materialien über 9 Tage (jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung, n=3).

Unterschiede zwischen THERMANOX Kontrollproben und den anderen Materialien wurden nicht beobachtet. Die Rohdaten wurden mit der XTT-Aktivität als Ausdruck der Zellzahl normalisiert und sind in Abbildung 10 grafisch dargestellt. Es fiel auf, dass die Sekretion von IL-6 pro Zelle zwischen Tag 3 und Tag 9 kontinuierlich sank.

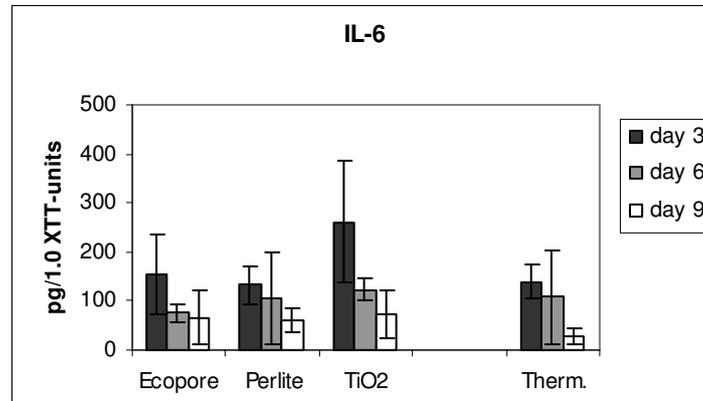


Abbildung 12: Verlauf der Sekretion vom Interleukin-6, bei direktem Kontakt der Zellen mit den verwendeten Materialien über 9 Tage (jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=3$). Die Daten wurden mit den XTT-Werten der einzelnen Proben normalisiert.

DISKUSSION

In dieser Studie wurde die Eignung eines neuartigen porösen Biomaterials für den alloplastischen Knochenersatz geprüft. Bei dem genannten Biomaterial handelt es sich um einen Verbundwerkstoff, bestehend aus keramischem Titandioxid und dem vulkanischen Mineralglas Perlit. Aus industriell hergestellten, prozesstechnisch aufbereiteten Blähperlitkörnern und einem Schlicker auf Titandioxid, Wasser und organischen Additiven wird eine homogene Mischung erzeugt, die zunächst getrocknet und dann nach einem bestimmten Temperaturprofil gebrannt wird. Das so

I Das Elastizitätsmodul von Ecopore (3-5 GPa) liegt im Bereich dichter Spongiosa (4 GPa), aber weit unterhalb von Kortikalis (11 bzw. 18 GPa). Bei Belastung gibt Ecopore deshalb nach und widerstrebt nicht der elastischen Verformung des umgebenden Knochens. Gleichzeitig verfügt Ecopore auch über eine Druckfestigkeit von ca. 23 Mpa [Quelle: IKKM Aachen].

II Durch die makroporöse Architektur von Ecopore ist ein Einwachsen von Knochen möglich. Die mechanische Verzahnung an der Grenzfläche von Implantat und Knochen führt zu einer erhöhten Widerstandsfähigkeit gegenüber Implantatlockerung. Bei zunehmendem Durchbauungsgrad des Strukturverbundes aus Ecopore und eingewachsenem Knochen verbessert sich evtl. auch die Druckfestigkeit.

III Die kollagenen Lamellen einwachsenden Knochens könnten dazu beitragen, eine unter zyklischer Belastung in Ecopore zu erwartende Materialermüdung (Mikrorisse) zum Stillstand zu bringen und so einem Gesamtversagen vorzubeugen.

IV Die um Größenordnungen erweiterte Oberfläche von Ecopore im Vergleich zu nicht-porösen Werkstoffen vergrößert die Grenzfläche von Implantat und Knochen. Diese könnte mit Pharmazeutika oder Wachstumsfaktoren effektiv funktionalisiert oder präoperativ mit autologen Zellen besiedelt werden.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Vorteile einer offenen Porenstruktur für den Erfolg eines Knochenersatzmaterials

entstandene Material weist eine offene Porenstruktur auf, die aus verschiedenen Gründen an einen Einsatz als Knochenersatzmaterial denken lässt (s. Tab. 6).

Hauptbestandteil dieser Arbeit waren die Untersuchung der Kompatibilität des *Ecopore* genannten Komposites aus keramischem TiO_2 und Perlitglas mit Osteoblasten, sowie die Untersuchung von Korrosionsempfindlichkeit des Werkstoffes in einem quasi-physiologischen Milieu mit Toxizitätsprüfung. Die Zellkompatibilität hängt zwangsläufig von einer oder beider Komponenten, oder von etwaigen, durch den Herstellungsprozeß eingetragenen, physikalischen oder chemischen Veränderungen ab.

Keramisches TiO_2 hat im Gegensatz zu metallischem TiO_2 bisher wenig Verwendung in der biomedizinischen Technik oder als Alloplastik im Knochenbereich gefunden. Demzufolge sind bislang wenige Daten zur biologischen Verträglichkeit von keramischem TiO_2 publiziert. Keramisches TiO_2 ist nicht zytotoxisch in Gegenwart von Hepatozyten und Kardiomyozyten von Ratten [79]. Aufgrund seiner engen chemischen Verwandtschaft zu den Oxidschichten, die sich typischerweise auf metallenen TiO_2 Implantaten bilden, erwarteten wir für keramisches TiO_2 eine generell gute Kompatibilität mit Osteoblasten [80;81]. Noch weniger Informationen sind über geschmolzenes Perlit erhältlich, das bislang keinerlei Verwendung im biomedizinischen Bereich gefunden hat. Abgesehen von wenigen Studien, die sich mit den pulmonalen Auswirkungen eingeatmeten Perlitstaubes befassen [82], gibt es für die Verträglichkeit von geschmolzenem Perlitglas in biologischen Systemen unterschiedlichster Art keine Daten. Aufgrund seines vulkanischen Ursprungs und seiner komplexen und möglicherweise je nach Lagerungsstätte unterschiedlichen

chemischen Zusammensetzung war auch keine Abschätzung seiner Biokompatibilität im Vergleich zu Biogläsern oder glaskeramischen Dentalendoprothesen möglich [83;84]. Perlite werden an verschiedenen Lagerstätten weltweit abgebaut und könnten neben ihren Hauptelementen auch Spuren bestimmter Metalle enthalten, die in gewissen Konzentrationen potentiell zytotoxisch oder sogar genotoxisch sein können [85-93]. Zwar ließen die Biokompatibilitätsuntersuchungen von Ecopore an L929 Fibroblasten keine unmittelbare Zytotoxizität von Perlit erkennen, doch wurde zur Verifizierung dieser Einschätzung in dem hier ausgeführten Experiment zusätzlich zu Ecopore auch reines TiO_2 und reines, geschmolzenes Perlit untersucht. Somit war eine zentrale Fragenstellung dieser Studie, ob Perlit nicht nur als Teil von Ecopore, sondern überhaupt als implantierbares Biomaterial in Frage kommt.

Nachdem die allgemeine Biokompatibilität des Materials, untersucht durch die BMP GmbH, Aachen, feststand, ging es in dieser Folgestudie um zwei grundsätzliche Fragenkomplexe:

1. Wie verhält sich Ecopore strukturell, wenn es in ein Versuchstier implantiert wird? Würde es durch das herrschende Milieu (Temperatur, pH, aktivierte Phagozyten) korrodiert werden oder weitgehend stabil bleiben? Würden sich aus den verwendeten Ecopore Proben bestimmte metallische Spurenelemente in toxikologisch bedenklichen Mengen herauslösen, die die weitere Verwendung von Ecopore als Biomaterial in Frage stellen könnten?

2. Wie gut haften primäre Osteoblasten an Ecopore und seinen Komponenten an, wie gut proliferieren sie? Behalten sie ihren typischen Phänotyp und finden sich Spuren von von extrazellulärer Matrix und von Mineralisation?

Im ersten Experiment dieser Studie wurde die Korrosionsempfindlichkeit von Ecopore überprüft. Dazu wurden Proben des Materials mit definierter Oberfläche in ein nach ISO / EN 10993-4 festgelegtes Volumen 0,9% physiologischer Kochsalzlösung eingebracht und bei 37 °C unter leichter Schwenkbewegung 21 Tage lang inkubiert. Im statistischen Mittel verloren die Proben weniger als 0,02 % ihrer Ausgangsmasse, was Ecopore als korrosionsunempfindlich und nicht resorbierbar kennzeichnet. Da unser Modell zellfrei war und somit keine aktivierten Phagozyten (also auch keine Superoxide und sonstigen aggressiven Substanzen) beinhaltete, ist es nicht ausgeschlossen, dass *Ecopore* unter langfristiger Implantation *in vivo* bei gleichzeitiger mechanischer Belastung ein abweichendes Verhalten zeigen wird. Zur Beantwortung dieser und vieler anderer offener Fragen sind Tierexperimente unausweichlich. Weiterhin wurde die Korrosionsflüssigkeit asserviert, eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt einer Elementaranalyse zugeführt. Perlit kann als vulkanisches Mineral eine Anzahl metallischer Spurenelemente enthalten, die die Anwendung von Ecopore als implantierbares Biomaterial stark einschränken könnten. Nach einer oben beschriebenen, 21-tägigen Inkubation in Kochsalzlösung erreichte keines der gefundenen Spurenelemente kritische Konzentrationen im Vergleich zu aktuellen Empfehlungen der WHO für die Qualität von Trinkwasser [94]. Die Empfehlungen toxikologischer Grenzwerte bestimmter chemischer Elemente variieren deutlich und bieten leider zur Zeit keine eindeutigen Anhaltspunkte für die Entwickler biomedizinischer Produkte und

Implantate. Daher erschien uns die WHO Grenzwertetabelle für Trinkwasser in diesem Zusammenhang sowohl zweckmäßig, als auch ausreichend. Die Ergebnisse dieser Untersuchung legen nahe, dass sich Ecopore generell als Implantatmaterial eignet.

Nun wurde ein Modell primärer humaner Osteoblasten angewandt, um die ermutigenden Ergebnisse aus Biokompatibilitäts- und Korrosionsuntersuchung unter anwendungsnahen Bedingungen zu verifizieren [95]. Spongiosaexplantate enthalten zu Beginn ihrer *in vitro* Kultivierung auch andere Zellen der mesenchymalen Reihe, u.a. Fibroblasten und Adipozyten. Durch Wahl spezieller Kulturmedien und –zusätze ist es aber möglich, während der ca. 14 Tage währenden Primärkulturphase die Proliferation dieser Zellen relativ zur Proliferation der Osteoblasten zu reduzieren und so sukzessive Osteoblastenkulturen hoher Reinheit zu erzeugen. Das Ergebnis sollte vor Weiterverwendung der Zellen dann durch Nachweis der Aktivität des Enzyms Alkalische Phosphatase mittels quantitativem photometrischem Assay oder färbereich in der Kulturschale geprüft werden. Obwohl Osteoblastenlinien wie SaOS-2 Osteosarkomzellen, oder auch MC3T3- bzw. C3H Fibroblasten-Vorläuferzellen in dem Ruf stehen, gegenüber primären Zellen konsistentere Ergebnisse hinsichtlich Phänotyp, Proliferation, Mineralisation, Stoffwechselaktivität zu liefern, eignen sich primäre humane Osteoblasten ebenso gut für die Erfordernisse dieses Experimentes und sind auch unter ökonomischen Aspekten vorteilhaft.

In dieser Untersuchung sollte im Unterschied zu den beschriebenen Biokompatibilitätsuntersuchungen sowohl eine anwendungsnähere Zellgattung, als auch der direkte Kontakt von Zellen und Material sowie seinen Einzelkomponenten geprüft werden. Die beteiligten Werkstoffe (also TiO_2 , Perlit und Ecopore) mussten folglich in *nicht-poröser* Form vorliegen, damit die Zellsuspension direkt aufgetropft werden konnten und weitgehend gleich große und gleich strukturierte Oberflächen vorlagen. Als Kontrolle diente plasmabehandeltes Zellkulturplastik (Thermanox®) aus Polystyrol. Die auf Ecopore und seinen Komponenten gezüchteten Zellen wiesen die typische Morphologie von Osteoblasten auf und erschienen vital [96]. Auch zeigte sich im XTT-Test ein linear bis exponentiell gesteigerter Zellstoffwechsel, was einen mittelbaren Hinweis auf eine Proliferation der Kultur darstellt. Die auf Thermanox gezüchteten Zellen zeigten eine deutlich unterschiedliche Morphologie. Sie wiesen erheblich größere Fortsätze auf und erschienen insgesamt besser angeheftet im Vergleich zu den von Ecopore abgeleiteten Materialproben, was auf eine höhere Dichte von *Focal Adhesions* schließen lässt [97]. Die vom Hersteller von Thermanox angegebene Behandlung mit Plasmagas soll die Dichte von Hydroxylgruppen auf der Materialoberfläche und damit die Zelladhäsion verbessern, was sich somit im Vergleich mit Ecopore und seinen Komponenten bestätigen lässt. Der XTT-Test zeigte für Thermanox einen deutlich steileren Anstieg des Zellstoffwechsels, was wiederum mit hoher Wahrscheinlichkeit eine höhere Proliferationsrate auf diesem Material anzeigt. Gleichzeitig zeigt dieser Vergleich auch, dass die Zelladhäsion durch physikochemische oder biochemische Veränderung der Materialoberflächen generell gesteigert werden kann. Auch für Ecopore würden sich solche Modifikationen anbieten und werden im weiteren Projektverlauf geprüft.

Im Verlauf dieses Versuches wurde auch geprüft, ob die beteiligten Zellen durch die eingesetzten Materialien zu einer Entzündungsreaktion angeregt wurden. Dazu wurden die Zytokine bzw. Mediatoren Interleukin-1, Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor- α gemessen [98-100]. Die klassischen Entzündungsmediatoren IL-1 und TNF- α zeigten sich dabei nicht erhöht. Alle eingesetzten Materialien inklusive der Kontrolle wiesen Werte aus, die unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Im Gegensatz zu IL-1 und TNF- α wird IL-6 eine vielfältigere Funktion nachgesagt [101-107] und korreliert generell mit Zellaktivierung. IL-6 wurde als sowohl pro-, als auch antiinflammatorisch beschrieben. Im Knochenstoffwechsel spielt es sowohl für den Aufbau, als auch den Abbau von Knochen eine Rolle. IL-6 zeigte sich demgegenüber leicht erhöht. Auf allen Materialien inklusive der Kontrolle zeigten sich variable Konzentrationen im Bereich von 4-17 pg/mL. Klinische Vergleichsdaten zeigen Konzentrationen um 1pg/mL beim gesunden Menschen, eine leichte Erhöhung während der Menstruation, Konzentrationen um 10pg/mL bei manchen neoplastischen Erkrankungen, bis hin zu Konzentrationen von 30-430 pg/mL nach Traumata und chirurgischen Eingriffen. *In vitro* Studien an Osteoblasten berichten von vergleichsweise hohen Konzentrationen von IL-6 [108]. Nach Normalisierung der Rohdaten mit den XTT-Werten der jeweiligen Kultur zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme der IL-6 Sekretion pro Zelle; eine Beobachtung, die sich mit Literaturdaten deckt, in der in den ersten 48 h ein Anstieg der IL-6 Sekretion [106] und danach eine Abnahme beschrieben wird [109]. Insgesamt sind die beobachteten Konzentrationen von IL-6 als unkritisch zu werten. In Zusammenfassung der in diesem Experiment erhobenen Daten kann Ecopore und seinen beiden Komponenten eine gute Kompatibilität mit primären humanen Osteoblasten bescheinigt werden. Aus materialchemischer Sicht bestehen demnach gute Voraussetzungen für eine hohe

Kompatibilität und enge Apposition von Biomaterial und Knochengewebe *in vivo*. Eine abschließende Einschätzung der postulierten, hohen Funktionalität von *Ecopore* als Knochenersatzmaterial erlaubt das gewählte *in vitro* Modell jedoch nicht.

ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT

Ecopore ist ein biokompatibles, leicht herzustellendes, offen-poröses Biomaterial, das für unterschiedliche biomedizinische Anwendungen geeignet erscheint [69]. Seine gute Kompatibilität mit humanen Osteoblasten, sein unkritisches toxikologisches Verhalten und seine vielsprechende Architektur machen vor allem den Einsatz im Bereich des alloplastischen Knochenersatz interessant. Oberflächenmodifikationen wie z.B. Ätztechniken oder die Koppelung mit Biomolekülen könnten die Leistungsfähigkeit von Ecopore sowohl *in vitro* also auch *in vivo* noch steigern und sind deshalb zu empfehlen. Aufgrund der inhärenten Grenzen, die *in vitro* Experimente mit sich bringen, konnte das klinische Potential von Ecopore, insbesondere die postulierten mechanischen Vorteile eines Strukturverbundes aus porösem Material und Knochengewebe, in dieser Studie nicht abgeschätzt werden. Hierzu sind zusätzliche *in vivo* Studien unumgänglich.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Bucholz RW. Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes. Clin Orthop 2002;(395):44-52.
- (2) Abbott L.C. The use of iliac bone in the treatment of ununited fractures. Instructional Course Lectures. The American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1944: 13-22.
- (3) McConnell JR, Freeman BJ, Debnath UK, Grevitt MP, Prince HG, Webb JK. A prospective randomized comparison of coralline hydroxyapatite with autograft in cervical interbody fusion. Spine 2003; 28(4):317-323.
- (4) Simon SR. Orthopaedic Basic Science. 2 ed. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1994.
- (5) Marchesi DG. Spinal fusions: bone and bone substitutes. Eur Spine J 2000; 9(5):372-378.
- (6) Truumees E, Herkowitz H.N. Alternatives to Autologous Bone Harvest in Spine Surgery. University of Pennsylvania Orthopaedic Journal 12, 77-88. 1999.
- (7) Christie MJ. Clinical applications of Trabecular Metal. Am J Orthop 2002; 31(4):219-220.
- (8) WHO. Report of WHO consultation on medical and other products in relation to human and animal transmissible spongiform encephalopathies. 1-1-1997.
- (9) Dreesmann H. Ueber Knochenplombierung. Beitr.Klin.Chir. 9, 804-810. 1894.
- (10) Rueger JM. [Bone substitutes. State of the art and: what lies ahead?]. Unfallchirurg 1996; 99(3):228-236.

- (11) Wintermantel E, Ha SW. Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen. 2 ed. Berlin: Springer, 1998.
- (12) Damien CJ, Parsons JR. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater* 1991; 2(3):187-208.
- (13) Al Ruhaimi KA. Bone graft substitutes: a comparative qualitative histologic review of current osteoconductive grafting materials. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001; 16(1):105-114.
- (14) Sohrabi A, Holland C, Kue R, Nagle D, Hungerford DS, Frondoza CG. Proinflammatory cytokine expression of IL-1beta and TNF-alpha by human osteoblast-like MG-63 cells upon exposure to silicon nitride in vitro. *J Biomed Mater Res* 2000; 50(1):43-49.
- (15) Kue R, Sohrabi A, Nagle D, Frondoza C, Hungerford D. Enhanced proliferation and osteocalcin production by human osteoblast-like MG63 cells on silicon nitride ceramic discs. *Biomaterials* 1999; 20(13):1195-1201.
- (16) Ducheyne P, Qiu Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* 1999; 20(23-24):2287-2303.
- (17) Ducheyne P. Bioactive ceramics. *J Bone Joint Surg Br* 1994; 76(6):861-862.
- (18) Hench LL. Bioactive materials: the potential for tissue regeneration. *J Biomed Mater Res* 1998; 41(4):511-518.
- (19) Loty C, Sautier JM, Boulekbache H, Kokubo T, Kim HM, Forest N. In vitro bone formation on a bone-like apatite layer prepared by a biomimetic process on a bioactive glass-ceramic. *J Biomed Mater Res* 2000; 49(4):423-434.
- (20) Ohgushi H, Dohi Y, Yoshikawa T, Tamai S, Tabata S, Okunaga K et al. Osteogenic differentiation of cultured marrow stromal stem cells on the surface of bioactive glass ceramics. *J Biomed Mater Res* 1996; 32(3):341-348.

- (21) Thalgott JS, Klezl Z, Timlin M, Giuffre JM. Anterior lumbar interbody fusion with processed sea coral (coralline hydroxyapatite) as part of a circumferential fusion. *Spine* 2002; 27(24):E518-E525.
- (22) Shors EC. Coralline bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am* 1999; 30(4):599-613.
- (23) Demers C, Hamdy CR, Corsi K, Chellat F, Tabrizian M, Yahia L. Natural coral exoskeleton as a bone graft substitute: a review. *Biomed Mater Eng* 2002; 12(1):15-35.
- (24) Wiltfang J, Merten HA, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Kloss FR, Rupprecht S et al. Degradation characteristics of alpha and beta tri-calcium-phosphate (TCP) in minipigs. *J Biomed Mater Res* 2002; 63(2):115-121.
- (25) Rangavittal N, Landa-Canovas AR, Gonzalez-Calbet JM, Vallet-Regi M. Structural study and stability of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate: two important bioceramics. *J Biomed Mater Res* 2000; 51(4):660-668.
- (26) LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop* 2002;(395):81-98.
- (27) Handschel J, Wiesmann HP, Stratmann U, Kleinheinz J, Meyer U, Joos U. TCP is hardly resorbed and not osteoconductive in a non-loading calvarial model. *Biomaterials* 2002; 23(7):1689-1695.
- (28) Goto T, Kojima T, Iijima T, Yokokura S, Kawano H, Yamamoto A et al. Resorption of synthetic porous hydroxyapatite and replacement by newly formed bone. *J Orthop Sci* 2001; 6(5):444-447.
- (29) Zreiqat H, Howlett CR. Titanium substrata composition influences osteoblastic phenotype: In vitro study. *J Biomed Mater Res* 1999; 47(3):360-366.
- (30) Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Dufresne E, Judas D, Iost A et al. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on

- materials with various surface roughnesses. J Biomed Mater Res 2000; 49(2):155-166.
- (31) Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Iost A, Hardouin P. Effect of grooved titanium substratum on human osteoblastic cell growth. J Biomed Mater Res 2002; 60(4):529-540.
- (32) Boyan BD, Batzer R, Kieswetter K, Liu Y, Cochran DL, Szmuckler-Moncler S et al. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to 1 alpha,25-(OH)2D3. J Biomed Mater Res 1998; 39(1):77-85.
- (33) Cornell CN, Lane JM. Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. Clin Orthop 1998;(355 Suppl):S267-S273.
- (34) Lane JM, Tomin E, Bostrom MP. Biosynthetic bone grafting. Clin Orthop 1999;(367 Suppl):S107-S117.
- (35) Agathopoulos S, Nikolopoulos P. Wettability and interfacial interactions in bioceramic-body-liquid systems. J.Biomed.Mater.Res. 29[4], 421-429. 1995.
- (36) Zreiqat H, Evans P, Howlett CR. Effect of surface chemical modification of bioceramic on phenotype of human bone-derived cells. J Biomed Mater Res 1999; 44(4):389-396.
- (37) Howlett CR, Zreiqat H, Wu Y, McFall DW, McKenzie DR. Effect of ion modification of commonly used orthopedic materials on the attachment of human bone-derived cells. J Biomed Mater Res 1999; 45(4):345-354.
- (38) Weetall HH. Covalent coupling methods for inorganic support materials. Methods Enzymol 1976; 44:134-148.
- (39) Puleo DA. Release and retention of biomolecules in collagen deposited on orthopedic biomaterials. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 1999; 27(1):65-75.

- (40) Helm G, Anderson DG, Andersson G, Boden SC, Damien C, Ebara S et al. Summary Statement: Bone Morphogenetic Proteins. *Basic Science. Spine* 2002; 27(16 Suppl 1):S9.
- (41) Ferris DM, Moodie GD, Dimond PM, Gioranni CW, Ehrlich MG, Valentini RF. RGD-coated titanium implants stimulate increased bone formation in vivo. *Biomaterials* 1999; 20(23-24):2323-2331.
- (42) Maistrelli GL, Fornasier V, Binnington A, McKenzie K, Sessa V, Harrington I. Effect of stem modulus in a total hip arthroplasty model. *J Bone Joint Surg Br* 1991; 73(1):43-46.
- (43) Davidson JA, Mishra AK, Kovacs P, Poggie RA. New surface-hardened, low-modulus, corrosion-resistant Ti-13Nb-13Zr alloy for total hip arthroplasty. *Biomed Mater Eng* 1994; 4(3):231-243.
- (44) Rotem A. Effect of implant material properties on the performance of a hip joint replacement. *J Med Eng Technol* 1994; 18(6):208-217.
- (45) Jallot E. Correlation between hydroxyapatite osseointegration and Young's Modulus. *Med Eng Phys* 1998; 20(9):697-701.
- (46) Misch CE, Qu Z, Bidez MW. Mechanical properties of trabecular bone in the human mandible: implications for dental implant treatment planning and surgical placement. *J Oral Maxillofac Surg* 1999; 57(6):700-706.
- (47) Haddock SM, Debes JC, Nauman EA, Fong KE, Arramon YP, Keaveny TM. Structure-function relationships for coralline hydroxyapatite bone substitute. *J Biomed Mater Res* 1999; 47(1):71-78.
- (48) Ramamurti BS, Orr TE, Bragdon CR, Lowenstein JD, Jasty M, Harris WH. Factors influencing stability at the interface between a porous surface and cancellous bone: a finite element analysis of a canine in vivo micromotion experiment. *J Biomed Mater Res* 1997; 36(2):274-280.

- (49) Meunier A, Christel P, Sedel L, Witvoet J, Blanquaert D. [The influence of the elasticity module of the femoral shaft and neck of a total hip prosthesis on the distribution of stress in the femur]. *Int Orthop* 1990; 14(1):67-73.
- (50) Wolff J. *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. Berlin: Hirschwald, 1892.
- (51) Kuhn JL, Goldstein SA, Choi K, London M, Feldkamp LA, Matthews LS. Comparison of the trabecular and cortical tissue moduli from human iliac crests. *J Orthop Res* 1989; 7(6):876-884.
- (52) Reilly DT, Burstein AH. Review article. The mechanical properties of cortical bone. *J Bone Joint Surg Am* 1974; 56(5):1001-1022.
- (53) Hoffler CE, Moore KE, Kozloff K, Zysset PK, Brown MB, Goldstein SA. Heterogeneity of bone lamellar-level elastic moduli. *Bone* 2000; 26(6):603-609.
- (54) Jorgensen CS, Kundu T. Measurement of material elastic constants of trabecular bone: a micromechanical analytic study using a 1 GHz acoustic microscope. *J Orthop Res* 2002; 20(1):151-158.
- (55) Martin RB, Burr DB, Sharkey NA. *Skeletal Tissue Mechanics*. Springer, 1998.
- (56) Smit TH, Burger EH, Huyghe JM. A case for strain-induced fluid flow as a regulator of BMU-coupling and osteonal alignment. *J Bone Miner Res* 2002; 17(11):2021-2029.
- (57) Smit TH, Huyghe JM, Cowin SC. Estimation of the poroelastic parameters of cortical bone. *J Biomech* 2002; 35(6):829-835.
- (58) Lopes MA, Silva RF, Monteiro FJ, Santos JD. Microstructural dependence of Young's and shear moduli of P2O5 glass reinforced hydroxyapatite for biomedical applications. *Biomaterials* 2000; 21(7):749-754.

- (59) Lopes MA, Monteiro FJ, Santos JD. Glass-reinforced hydroxyapatite composites: fracture toughness and hardness dependence on microstructural characteristics. *Biomaterials* 1999; 20(21):2085-2090.
- (60) Le Huec JC, Schaefferbeke T, Clement D, Faber J, Le Rebeller A. Influence of porosity on the mechanical resistance of hydroxyapatite ceramics under compressive stress. *Biomaterials* 1995; 16(2):113-118.
- (61) Wozney JM. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine* 2002; 27(16 Suppl 1):S2-S8.
- (62) Hollinger JO, Schmitt JM, Buck DC, Shannon R, Joh SP, Zegzula HD et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 and collagen for bone regeneration. *J Biomed Mater Res* 1998; 43(4):356-364.
- (63) Puleo DA, Kissling RA, Sheu MS. A technique to immobilize bioactive proteins, including bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), on titanium alloy. *Biomaterials* 2002; 23(9):2079-2087.
- (64) Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* 1999; 20(23-24):2311-2321.
- (65) Yoshikawa T, Ohgushi H, Nakajima H, Yamada E, Ichijima K, Tamai S et al. In vivo osteogenic durability of cultured bone in porous ceramics: a novel method for autogenous bone graft substitution. *Transplantation* 2000; 69(1):128-134.
- (66) Ohgushi H, Caplan AI. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res* 1999; 48(6):913-927.
- (67) Ohgushi H, Miyake J, Tateishi T. Mesenchymal stem cells and bioceramics: strategies to regenerate the skeleton. *Novartis Found Symp* 2003; 249:118-127.
- (68) Pfaff E, Aneziris C, Maier HR. Verfahren zur Herstellung poröser keramischer Formkörper, danach hergestellte Formkörper aus Titandioxid sowie deren Verwendungen. Germany patent 19605149. 2003 2003.

- (69) Maier HR, Otten K. Immobilisierung von aeroben Mikroorganismen in keramischen Funktionshohlräumen. IPAK Projekt-Portraits 2001 [2002], 83-90. 2003. Aachen, Institut für Prozeß- und Anwendungstechnik Keramik an der RWTH Aachen.
- (70) Ceramic bone replacement based on porous TiO₂/glass composites. Munich: 2000.
- (71) Niemann R. Perlit – ein neuer sinteraktiver Mineralfüllstoff für die keramische Industrie. ZI International 44, 125. 1991.
- (72) deVries RC, Roy R, Osborn EF. The system TiO₂-SiO₂. Trans Brit Ceram Soc 1954; 53(9):531.
- (73) Riedemann NC, Guo R, Hollmann TR, Gao H, Neff TA, Reuben JA et al. Regulatory role of C5a in LPS-induced IL-6 production by neutrophils during sepsis. FASEB J 2003; express article 10.1096/fj.03-0708fje.
- (74) Riedemann NC, Guo R, Bernacki KD, Reuben JA, Laudes IJ, Neff TA et al. Regulation by C5a of Neutrophil Activation during Sepsis. Immunity 2003; 19(August 2003):193-202.
- (75) Sodek J, Berkman FA. Bone cell cultures. Methods Enzymol 1987; 145:303-324.
- (76) Arnett TR. Methods in Bone Biology. In: Arnett TR, Henderson B, editors. Chapman & Hall, 1998: 132.
- (77) Wiedmann-Al-Ahmad M, Gutwald R, Lauer G, Hubner U, Schmelzeisen R. How to optimize seeding and culturing of human osteoblast-like cells on various biomaterials. Biomaterials 2002; 23(16):3319-3328.
- (78) Toquet J, Rohanizadeh R, Guicheux J, Couillaud S, Passuti N, Daculsi G et al. Osteogenic potential in vitro of human bone marrow cells cultured on macroporous biphasic calcium phosphate ceramic. J Biomed Mater Res 1999; 44(1):98-108.

- (79) Wintermantel E, Eckert KL, Huang NP, Textor M, Brunette DM. Titanium ceramics for cell-carriers and for medical applications. In: Brunette DM, et.al., editors. Titanium in Medicine. Springer, 2001: 649ff.
- (80) Keller JC, Stanford CM, Wightman JP, Draughn RA, Zaharias R. Characterizations of titanium implant surfaces. III. J Biomed Mater Res 1994; 28(8):939-946.
- (81) Thull R. Biokompatibilitätsbestimmende Eigenschaften der Grenzfläche zwischen Werkstoff und Biosystem. Biomaterialien 2000; 1(1):6-11.
- (82) Polatli M, Erdinc M, Erdinc E, Okyay E. Perlite exposure and 4-year change in lung function. Environ Res 2001; 86(3):238-243.
- (83) Hench LL. Bioceramics: From Concept to Clinic. Journal of the American Ceramic Society 1991; 74:1487.
- (84) Beham G. IPS-Empress: Eine neue Keramik-Technologie. Ivoclar-Vivadent Report 1990; 6(Sept. 1990).
- (85) Stea S, Visentin M, Donati ME, Granchi D, Ciapetti G, Sudanese A et al. Nitric oxide synthase in tissues around failed hip prostheses. Biomaterials 2002; 23(24):4833-4838.
- (86) Stea S, Visentin M, Granchi D, Cenni E, Ciapetti G, Sudanese A et al. Apoptosis in peri-implant tissue. Biomaterials 2000; 21(13):1393-1398.
- (87) Granchi D, Verri E, Ciapetti G, Savarino L, Cenni E, Gori A et al. Effects of chromium extract on cytokine release by mononuclear cells. Biomaterials 1998; 19(1-3):283-291.
- (88) Ciapetti G, Granchi D, Stea S, Savarino L, Verri E, Gori A et al. Cytotoxicity testing of materials with limited in vivo exposure is affected by the duration of cell-material contact. J Biomed Mater Res 1998; 42(4):485-490.
- (89) McKay GC, Macnair R, MacDonald C, Grant MH. Interactions of orthopaedic metals with an immortalized rat osteoblast cell line. Biomaterials 1996; 17(13):1339-1344.

- (90) Horowitz SM, Luchetti WT, Gonzales JB, Ritchie CK. The effects of cobalt chromium upon macrophages. *J Biomed Mater Res* 1998; 41(3):468-473.
- (91) Puleo DA, Huh WW. Acute toxicity of metal ions in cultures of osteogenic cells derived from bone marrow stromal cells. *J Appl Biomater* 1995; 6(2):109-116.
- (92) Puleo DA, Holleran LA, Doremus RH, Bizios R. Osteoblast responses to orthopedic implant materials in vitro. *J Biomed Mater Res* 1991; 25(6):711-723.
- (93) Dohi Y, Sugimoto K, Yoshikawa T, Ohgushi H, Katsuda T, Tabata S et al. Effect of cadmium on osteogenesis within diffusion chambers by bone marrow cells: biochemical evidence of decreased bone formation capacity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993; 120(2):274-280.
- (94) WHO. Guidelines for drinking-water quality - 3rd edition. WHO . 2003. URL:
- (95) Malekzadeh R, Hollinger JO, Buck D, Adams DF, McAllister BS. Isolation of human osteoblast-like cells and in vitro amplification for tissue engineering. *J Periodontol* 1998; 69(11):1256-1262.
- (96) Malik MA, Puleo DA, Bizios R, Doremus RH. Osteoblasts on hydroxyapatite, alumina and bone surfaces in vitro: morphology during the first 2 h of attachment. *Biomaterials* 1992; 13(2):123-128.
- (97) Puleo DA, Bizios R. Formation of focal contacts by osteoblasts cultured on orthopedic biomaterials. *J Biomed Mater Res* 1992; 26(3):291-301.
- (98) Algan SM, Purdon M, Horowitz SM. Role of tumor necrosis factor alpha in particulate-induced bone resorption. *J Orthop Res* 1996; 14(1):30-35.
- (99) Horowitz SM, Purdon MA. Mediator interactions in macrophage/particulate bone resorption. *J Biomed Mater Res* 1995; 29(4):477-484.

- (100) Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature* 1986; 319(6053):516-518.
- (101) Horowitz MC, Levy JB. The LIF/IL-6 subfamily of cytokines induce protein phosphorylation and signal transduction by nonreceptor tyrosine kinases in human and murine osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 1995; 56 Suppl 1:S32-S34.
- (102) Horowitz SM, Gonzales JB. Inflammatory response to implant particulates in a macrophage/osteoblast coculture model. *Calcif Tissue Int* 1996; 59(5):392-396.
- (103) Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res* 1998; 13(5):793-802.
- (104) Nakashima Y, Sun DH, Trindade MC, Maloney WJ, Goodman SB, Schurman DJ et al. Signaling pathways for tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression in human macrophages exposed to titanium-alloy particulate debris in vitro. *J Bone Joint Surg Am* 1999; 81(5):603-615.
- (105) Roodman GD. Interleukin-6: an osteotropic factor? *J Bone Miner Res* 1992; 7(5):475-478.
- (106) Shida J, Trindade MC, Goodman SB, Schurman DJ, Smith RL. Induction of interleukin-6 release in human osteoblast-like cells exposed to titanium particles in vitro. *Calcif Tissue Int* 2000; 67(2):151-155.
- (107) Tamura T, Udagawa N, Takahashi N, Miyaura C, Tanaka S, Yamada Y et al. Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(24):11924-11928.
- (108) Spyrou P, Papaioannou S, Hampson G, Brady K, Palmer RM, McDonald F. Cytokine release by osteoblast-like cells cultured on implant discs of varying alloy compositions. *Clin Oral Implants Res* 2002; 13(6):623-630.

- (109) Gori F, Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S, Riggs BL. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology* 2000; 141(12):4768-4776.
- (110) Van Raemdonck W, Ducheyne P, De Meester P. Calcium Phosphate Ceramics. [In:] Ducheyne P, Hastings GW (Eds.), *Metal and Ceramic Biomaterials, Vol. II Strength and Surface*. CRC Press, Boca Raton, 1984; 143-166.
- (111) Liu DM. *Mater. Sci. Forum* 1997, 150; 183-208.
- (112) Frayssinet P, Trouillet JL, Rouquet N, Azimus E, Autefage A. *Biomaterials* 1993, 14; 423-429.
- (113) Klein C, Driessen AA, De Groot K, Van den Hooff A. *J. Biomed. Mater. Res.* 1983, 17; 769-784.
- (114) Ducheyne P, Radin S, King L. *J. Biomed. Mater. Res.* 1993, 17; 25-34.
- (115) Wang PE, Chaki TK. *J. Mater. Sci.* 1993, 4; 150-158.
- (116) Frayssinet P, Rouquet N, Fages J, Durand M, Vidalain PO, Bonel G. *J. Biomed. Mater. Res.* 1997, 35; 337-347.
- (117) Klawitter JJ, Hulbert SF. *J. Biomed. Mater. Res. Symp.* 1971, 2; 161.
- (118) Shors EC, Holmes RE. Porous Hydroxyapatite. [In:] Hench LL, Wilson J (Eds.). *An Introduction to Bioceramics*. World Scientific, London, 1993; 181-198.
- (119) Hulbert SF, Bvokros JC, Hench LL, Wilson J, Heimke G. [In:] Vincenzini P (Ed.). *Ceramics in Clinical Applications: Past, Present, and Future*. Elsevier, Amsterdam, 1987; 189-213.
- (120) Simske SJ, Ayers RA Bateman TA. *Mater. Sci. Forum* 1997, 250; 151-182.

- (121) Müller R, Rüeegsegger P. Micro-tomographic imaging for the nondestructive evaluation of trabecular bone architecture. [In:] Lowet G et. al. (Ed.): Bone Research in Biomechanics. IOS Press Amsterdam, 1997, 61-80.
- (122) Urist MR. Bone formation by autoinduction. Science, 1965, 150; 893-899.
- (123) Dewitt N (Ed.). Nature insight: Bone and cartilage. Nature Vol. 423, 2003.
- (124) Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (Eds.). Principles of Bone Biology, 2nd Edition. Academic Press, 2002. ISBN 0120986523.
- (125) Schuth F, Sing KSW, Weitkamp J (Eds.). Handbook of Porous Solids, 1st Edition. Wiley 2002. ISBN 3-527-30246-8.

ABBILDUNGEN UND TABELLEN

- Abb. 1:** Ein Astronaut beim täglichen Training in der Schwerelosigkeit. Ohne eine adäquate Belastung durch die Schwerkraft und alltägliche Bewegungsabläufe kommt es zur osteoklastären Resorption von Knochenmineral. Der Knochen verliert an Dichte und damit an Bruchstabilität. Die Mechanotransduktion von Knochen und Knorpel ist zwar schon einige Jahrzehnte lang bekannt, gewinnt aber in jüngster Zeit bei der Entwicklung von verbesserten Zellkulturtechniken für das *Tissue Engineering* stark an Aufmerksamkeit und praktischer Bedeutung.
- Abb. 2:** Schematische Darstellung von Faserknochen, sowie Prinzipien von Materialermüdung und Remodelling [nach: Martin, Burr, Sharkey: Skeletal Tissue Mechanics. Springer 1998. 168ff.]
- Abb. 3:** Querschnitt von Ecopore, durchbaut von Knochengewebe, nach 6-wöchiger Implantation in die Femurkondyle eines Kaninchens. Falschfarben (Ecopore/Titan rosa, Knochen/Kalzium türkis dargestellt) bei energiedispersiver Röntgenanalyse (EDX). Grundprinzip offenporöser Knochenersatzwerkstoffe: Komposit und Knochen bilden einen Strukturverbund und stützen sich so wechselseitig. Bild ist Teilergebnis eines laufenden Biomat Teilvorhabens (B77) an der RWTH Aachen; Veröffentlichung geschieht mit Erlaubnis des Projektleiters.
- Abb. 4:** Mikrostruktur eines Blähperlitkornes. Geblähtes Perlit wird industriell durch Erhitzung natürlichen, vulkanischen Perlits erzeugt.
- Abb. 5:** Ecopore. Makroskopischer Aspekt (A), Poren- und Stegstruktur (B), Quecksilberporosimetrie (C), Ultrastruktur und Phasenverteilung (D) (*TiO₂, **Perlitglas), EDX-Analysen der Glasphase (E) und der keramischen Phase (F).
- Abb. 6:** Gradiertes Porenaufbau als eine weitere verfahrenstechnische Option bei der Herstellung von Implantaten aus dem Werkstoff *Ecopore*.

Abb. 7: Chronologische Darstellung der Einzeluntersuchungen im Rahmen der Entwicklung des porösen Knochenersatzwerkstoffes Ecopore.

Abb. 8: Materialproben für die direkte Cokultur mit humanen Osteoblasten. Kontrolle aus plasma-behandeltem Polystyrol (Thermanox®), sowie nicht-poröse Proben von Ecopore (B), Perlit (C) und keramischem TiO₂ (D).

Abb. 9: Schematische Darstellung eines Osteoblasten mit Signalkaskaden, Strukturproteinen, Adhäsionsmolekülen und extrazellulärer Matrix. Eigene Darstellung nach www.biocarta.com (E. Schaefer, PhD).

Abb. 10: Vital-Färbung von humanen Osteoblasten auf Thermanox (A), Ecopore (B), Perlit (C) und TiO₂ (D). Auf allen Proben Nachweis ungestörter Membranintegrität. REM-Aufnahmen der Materialproben in gleicher Reihenfolge. Nachweis von guter Zelladhäsion und kollagener Matrix bei allen Proben.

Abb. 11: Verlauf der Proliferation/XTT-Werte der Zellen in direktem Kontakt mit den verwendeten Materialien über 9 Tage (jeweils MW ± Standardabweichung, n=3). Das Inokulum bei Thermanox lag bei 2×10^4 Zellen vs. 4×10^4 Zellen bei den anderen Materialien.

Abb 12: Verlauf der Sekretion vom Interleukin-6, bei direktem Kontakt der Zellen mit den verwendeten Materialien über 9 Tage (jeweils MW ± Standardabweichung, n=3). Die Daten wurden mit den XTT-Werten der einzelnen Proben normalisiert.

Tab. 1: Eine aktuelle Marktübersicht von Knochenersatzmaterialien. Alle hier aufgelisteten Produkte sind durch die FDA (USA), die CE (Europa) oder beide zugelassen. Ausnahmen sind durch „F&E“ (Forschung und Entwicklung) gekennzeichnet. Eigene Recherche.

- Tab. 2:** Die Dimensionierung der Poren eines porösen Knochenersatzwerkstoffes hat Einfluß auf seine biologische Funktionalität.
- Tab. 3:** Ergebnisse der *in vitro* Korrosionsprüfung mittels Präzisionswägung
- Tab. 4:** Elementaranalyse der Überstände aus dem Korrosionsversuch. Unbenutzte Kochsalzlösung diente als Kontrolle. Zum Vergleich die aktuellen Trinkwasserempfehlungen der WHO.
- Tab. 5:** Durchschnittliche Konzentration von Interleukin-6, bei direktem Kontakt der Zellen mit den verwendeten Materialien über 9 Tage (jeweils MW \pm Standardabweichung, n=3).
- Tab. 6:** Zusammenfassung der Vorteile einer offenen Porenstruktur für den klinischen Erfolg eines Knochenersatzmaterials

DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. med. Hans-Josef Erli, zum einen für die Überlassung des Themas, zum anderen dafür, dass er die Arbeit mit großem Zeitaufwand, Engagement und Interesse betreute und immer Zeit für ihren Autor hatte.

Ebenfalls gilt mein Dank Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Othmar Paar, der die Bearbeitung des Themas in seiner Klinik ermöglichte und freundlicherweise das Referat für die entstandene Arbeit übernommen hat.

Desweiteren geht ein besonderes Dankeschön an meine Kollegen, vor allem Frau E. Raby, Herrn Dipl.-Ing. Chr. Ragoss und Herrn Dipl.-Biol. M. v. Walter.

Schließlich gilt mein ganz persönlicher, tief empfundener Dank meinen Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglichten und mir immer zur Seite standen.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name:	Matthias Rüger
Geburtsdatum	15. November 1973
Geburtsort	Düsseldorf
Eltern	Gerda Rüger, geb. Fröhlich Wolfgang Rüger

SCHUL AUSBILDUNG

1980 – 1984	Ev. Grundschule Erkelenz
1984 – 1990	Cusanus-Gymnasium Erkelenz
1990 – 1991	Redan High School, Stone Mountain, Georgia
1991 – 1993	Cusanus-Gymnasium Erkelenz
Juni 1993	Abitur

STUDIUM

1995 – 2003	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen
September 1998	Ärztliche Vorprüfung
November 2003	Ärztliche Prüfung

FAMULATUREN

1999	Chirurgie und Sportmedizin (Praxis Dr. med. R. Yahya, Erkelenz)
2000	Unfallchirurgie (Klinik für Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Aachen, Direktor: Univ..-Prof. Dr. med. O. Paar)
2001	Urologie (Universität Kapstadt, Leiter: Dr. Alan R. Pontin)

PRAKTISCHES JAHR

Okt. 2002 – Feb. 2003	Medizinische Kliniken I, II und III, Universitätsklinikum Aachen
Feb. 2003 – Mai 2003	Anästhesiologische Klinik, Universitätsklinikum Aachen
Jun. 2003 - Sep. 2003	Chirurgische Universitätsklinik, Universitätsklinikum Aachen

ÄRZTLICHE TÄTIGKEIT

April – September 2004

Arzt im Praktikum, Klinik für Unfallchirurgie,
Universitätsklinikum Aachen. Direktor: Univ.-Prof.
Dr. med. O. Paar.

Seit Oktober 2004

Assistenzarzt in o.g. Klinik