

4. Diskussion

In der Diskussion sollen drei Sachverhalte schwerpunktmäßig diskutiert werden. Es sollen die eigenen Ergebnisse mit denjenigen anderer Arbeitsgruppen verglichen werden, daraufhin das eigene experimentelle Modell und schließlich das beobachtete Verhalten der MNGC besprochen werden.

4.1 Diskussion der Ergebnisse

Die Degradierbarkeit der unterschiedlichen Kompositionen verhielt sich entsprechend früheren in-vitro Versuchen [21, 22]. Die löslichste Keramik, 45s5, zeigte die stärksten Veränderungen bezüglich des langen Partikeldurchmessers, die am wenigsten lösliche Keramik, 55s, die geringsten Veränderungen. Auch der Anteil an Taschen reflektiert dieses Verhalten: 45s5 zeigt bereits nach 28 d einen frühen Zerfall der Partikel, der bei 52s und 55s erst nach 84 d erreicht wird. Die scheinbar paradoxe Tatsache, dass 45s5 nach 84 d kaum noch Taschen aufweist, ist gut mit der Entstehung kleinerer Bruchstücke aus ehemaligen Taschenformationen zu erklären.

Die vorausgesagten knochenbindenden Eigenschaften [21, 22] konnten hinsichtlich der Kinetik ebenso nachvollzogen werden; so zeigte 45s5 ein früheres Binden von Knochen als 55s; 52s nahm eine Mittelstellung ein. Die knöcherne Durchbauung des Defekts erwies sich jedoch für alle Materialien als unbefriedigend. Zwar wurde in der Peripherie - bei allen Materialien - eine gute Durchbauung unter Integration von Implantatmaterial erreicht. Außer 55s, welches eine kontinuierliche Zunahme des Knochenkontaktes auch im Zentrum aufwies, zeigte sich jedoch bei den anderen Materialien nach anfänglicher Zunahme eine Rückbildung des Knochenkontaktes im Zentrum des ehemaligen Implantatgebietes. Bei allen Materialien kam es dabei zu einer Vermehrung der Fremdkörperriesenzellen in diesen Bereichen - und somit umgekehrt proportional zum beobachteten Knochenkontakt. Die von Bakki [23] erzielten Ergebnisse mit Partikeln unterschiedlicher Calciumphosphat-Keramiken - unter Verwendung desselben experimentellen Modells - zeigen deutlich das mögliche Potential von Knochenersatzmaterialien. Hier fand sich zum Teil bereits nach 28 d eine vollständige Durchbauung des ehemaligen Defekts. Mehrkernige Riesenzellen wurden hier nicht

beobachtet. Somit erscheinen Bioglass[®]-Implantate in der hier getesteten Applikationsform noch nicht ausgereift und weiter verbesserungswürdig.

Andere Arbeitsgruppen, die Bioglass[®]45s5 untersuchten, kamen zu abweichenden Ergebnissen. Die jeweiligen Rahmenbedingungen sind jedoch sehr unterschiedlich, so dass ein direkter Vergleich der Ergebnisse kaum möglich ist. Drei Aspekte erscheinen dabei besonders wichtig: das Implantationsmodell, die Partikelgröße, und das Verhältnis von Implantatoberfläche zum Volumen des Implantatbettes.

Oonishi et al. [5] konnten einen vollständigen, knöchernen Durchbau des Implantatgebietes innerhalb von 2 Wochen zeigen. Dabei wurden Partikel aus Bioglass[®]45s5 in einer Größe von 300 bis 360 µm verwendet, welche in einen 6 mm großen, quer durch die Femurkondylen von Kaninchen gebohrten Defekt gefüllt wurden. Durch die Lage des Defektes wurden jedoch in erheblichem Maße lasttragende Knochentrabekel zerstört, so dass von einem hohen Regenerationspotential des Knochens ausgegangen werden muss, und die Kriterien eines Critical Size Defect (CSD) vermutlich nicht erfüllt werden [13]. In einem experimentellen Modell wie diesem wird man also lediglich zeigen können, inwieweit ein Implantationsmaterial die knöcherne Regeneration hemmt, da der Defekt an sich eine große Selbstheilungstendenz in sich birgt. Hollinger untersuchte in seiner Arbeitsgruppe Partikel aus Bioglass[®]45s5 mit einem Durchmesser von 90-710 µm in 20 mm großen, unilateralen Defekten des Kaninchenradius [24], welche den Ansprüchen eines CSD gerecht werden. Es zeigte sich hier, dass nur in einem von 6 Fällen eine Durchbauung des Defektes innerhalb von 8 Wochen erfolgte. Wie bereits in Abschnitt 1.4 dargelegt wurde, erfüllt unser Modell die Bedingungen eines CSD.

Die eingesetzte Partikelgröße scheint ebenfalls Einfluss auf die knöcherne Regeneration zu nehmen. Schepers et al. [3] implantierten Glas-Partikel derselben chemischen Zusammensetzung wie Bioglass[®]45s5 in 4 verschiedenen Größenordnungen in teilweise entzahnte Mandibulae von Hunden. Partikel im Durchmesser von 300-355 µm zeigten nach 3 Monaten Knochenkontakt innerhalb des ganzen Defektes. Partikel im Durchmesser von 100-710 µm zeigten hingegen eine größtenteils bindegewebige Reaktion. Wheeler et al. [25] verglichen

Bioglass®45s5 Partikel in der Größenordnung von 90-710 µm mit Biogran® Partikeln (chemische Zusammensetzung wie Bioglass®45s5, Durchmesser 300-360 µm) und konnten für Bioglass® ein höheres Verhältnis von Knochen zu Implantat nachweisen als für Biogran®. MacNeill [4] wie auch Hall [26] haben ebenfalls die beiden letztgenannten Implantatmaterialien in der Tibia von Kaninchen bzw. der Mandibula von Hunden miteinander verglichen und haben keinerlei Unterschiede bezüglich der Knochenbindungsfähigkeit festgestellt.

Diese sehr unterschiedlichen Ergebnisse lassen zwei Interpretationen zu. Es ist durchaus denkbar, dass die Partikelgröße keinen wesentlichen Einfluss auf die knöcherne Regeneration hat. Die Unterschiede der einzelnen Arbeitsgruppen sind möglicherweise auf veränderte Rahmenbedingungen zurückzuführen, wie unterschiedliche Modelle, Methoden, etc.. Selbst feinste Unterschiede im Herstellungsprozess können sich biologisch bemerkbar machen. Gatti [7] verglich Bioglass®-Partikel mit Glas-Partikeln aus Eigenherstellung, welche dieselbe Größe und chemische Zusammensetzung aufwiesen, und zeigte ein unterschiedliches Degradationsverhalten. Beide Materialien waren nach der herkömmlichen Glas-Herstellungsmethode produziert worden.

Hält man die Partikelgröße für einen entscheidenden Parameter, so zwingt dies zu einer kritischen Auseinandersetzung mit den bisher verwendeten experimentellen Modellen. Auf diesem Hintergrund erscheinen engere Standardisierungsbestrebungen, auch bezüglich der zu benutzenden Implantationsmodelle, durchaus sinnvoll und wünschenswert. Eine wichtige Größe fehlt bislang in der Diskussion, nämlich das Verhältnis der Implantatoberfläche zum Volumen des Implantatgebietes. Schließlich ist es möglich, mit einer dichten Verfüllung von großen Partikeln das gleiche Verhältnis von Oberfläche zu Volumen zu erreichen wie mit einer lockeren Verfüllung von kleinen Partikeln. Dies wäre die wohl einfachste Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse im Zusammenhang mit der Partikelgröße. In allen Publikationen sollten ausreichende Angaben bezüglich der Oberfläche der implantierten Materialien (Menge) und des Volumens des Implantatgebietes erfolgen. Dabei scheint die zum Teil immense, inherente Dynamik der Oberflächenveränderung erwähnenswert.

Greenspan et al. [27] dokumentierten die Oberflächenveränderungen von Bioglass[®] mittels N₂-Absorptionsverfahren und zeigten eine Zunahme der Oberfläche für 45s5 (90-710 µm) von etwa 50 m²/g auf 125 m²/g nach 20 h Exposition in TRIS-Puffer.

In unserem Experiment wurden indirekt unterschiedliche Oberfläche zu Volumenverhältnisse verglichen, geht man davon aus, dass die verwendeten Implantatmaterialien sich im Wesentlichen nur in ihrer Löslichkeit unterscheiden. Das löslichste Implantat, 45s5, zeigte gute Knochenbindung in der Peripherie des Implantatgebietes. In diesen Regionen ist eine bessere Blutversorgung und somit ein höherer interstitieller Flüssigkeitsaustausch anzunehmen als im Zentrum des Implantatgebietes. Im Zentrum kam es zu wenig beziehungsweise rückläufiger Knochenbindung und man darf annehmen, dass dies auf veränderte lokale Bedingungen im Vergleich zur Peripherie zurückzuführen ist. Die anzunehmende geringere Blutversorgung im Zentrum des Implantatgebietes ist ein möglicher Grund. Ist der interstitielle Flüssigkeitsaustausch zu gering, um die Partikel-Eluate unter Wahrung eines für die knöcherne Regeneration förderlichen Milieus abzutransportieren, kommt es zur Stagnation beziehungsweise Rückbildung der Knochenbildung. Peaker et al. [28] untersuchten in-vitro den Effekt von Bioglass[®]-Eluaten auf humane Osteoblasten. Sie wiesen konzentrationsabhängig einen stimulierenden beziehungsweise zytotoxischen Effekt auf diese knöcherne Zelllinie nach. 55s, das am wenigsten lösliche Implantatmaterial, zeigte in unserem Experiment bessere knochenbindende Eigenschaften im Zentrum des Implantatgebietes als Bioglass[®] 45s5. Die Konzentration von Bioglass[®]-Eluaten am Implantationsort scheint somit eine wichtige Einflussgröße für den Erfolg des Implantates zu sein, abhängig von der lokalen Durchblutung, der Löslichkeit des Implantats, und vom Verhältnis der Oberfläche des Implantats zum Volumen des Implantationsortes.

Der unterschiedliche interstitielle Flüssigkeitsaustausch ist vermutlich auch der Grund für die untypische (lichtmikroskopische) Anfärbung von Gewebe und Partikeln in Arealen mit rückläufiger Knochenbildung und vermehrtem Vorkommen an MNGC. Wenn die Reaktion des hier verwendeten basischen Fuchsin und Toluidin-Blaus auch viel zu unspezifisch ist, um

daraus nähere Rückschlüsse zu ziehen, so untermauert dies doch die Hypothese, dass sich das Milieu im Zentrum des Implantatgebietes von dem der Peripherie unterscheidet.

4.2 Diskussion des Modells

Die generelle Eignung unseres Modells zur Testung der Bioaktivität von Implantatmaterialien wurde bereits oben erörtert. Hier soll noch einmal auf ein Detail der Auswertung eingegangen werden, die Unterteilung des Implantatgebietes in die Schichten 1 bis 5. Wie bereits im Ergebnisteil gezeigt wurde, unterscheiden sich die Schichten 1 bis 5 nicht immer signifikant voneinander. Dies kann einerseits dadurch bedingt sein, dass unsere - willkürliche - Einteilung des Implantatgebietes in 5 Schichten nicht adäquat die tatsächlichen biologischen Verhältnisse widerspiegelt. Andererseits ist es möglich, dass wir unsere technischen Möglichkeiten überschätzt haben und eine derart feine Einteilung in 5 Schichten praktisch nicht umsetzbar ist. Daher wurden folgende Überlegungen angestellt, um den technischen Fehler möglichst genau quantifizieren zu können.

Wie bereits erwähnt, wurde jeweils der Schnitt ausgewählt, der möglichst zentral das Implantatgebiet sagittal schneidet. Aufgrund des hohen Materialverlusts an der Innenlochsäge ist es unter besten Voraussetzungen möglich, den zentralen Schnitt im Abstand von 0-175 μm vom eigentlichen Zentrum zu gewinnen. Im nächsten Arbeitsschritt wurden auf der Übersichtsfotographie die Schichten von außen nach innen hin abgetragen, ausgehend von einem idealen Schnitt durch das Zentrum des Implantatgebietes. Nun ist bekannt, dass nur im Zentrum eines Kreises der Kreischnitt gleich dem Durchmesser ist. Entfernt man sich vom Zentrum, wie dies in unserer Versuchsanordnung nicht auszuschließen ist, so verändert sich die Strecke des jeweiligen Kreischnitts, und zwar um so stärker, je tangentialer der Kreis angeschnitten wird (Abb. 4.1). Diesem Effekt konnte in unserem Experiment aus technischen Gründen nicht Rechnung getragen werden. Es resultiert daher eine elliptische Entartung der Schichtenverteilung, wie auf Abb. 4.2 zu erkennen ist. Man kann nun den relativen Fehler als Verhältnis der Differenz von abgetragener und tatsächlicher Schichtstrecke zur abgetragenen Schichtstrecke berechnen, und in Abhängigkeit von der Entfernung des Schnittes vom Zentrum des Implantatgebietes darstellen (Abb. 4.3). Wie man sieht, liegt der relative Fehler

für Schicht 5 bei einem Abstand von 175 μm (oberste Grenze unter besten Voraussetzungen) bei etwa 40 %. Mit anderen Worten, die eingetragene Messzone beträgt 444 μm , während Schicht 5 realiter lediglich 267 μm beträgt.

Unberücksichtigt bleiben in dieser Betrachtung Fehler, die durch ein schiefes Anschneiden des Implantatbettes entstehen können, d.h. es kann möglich sein, dass man den Knochendeckel mittig anschneidet, das Ende des idealisierten Implantatzylinders jedoch nur noch streift. Dieser Fehler ist zwar auch quantifizierbar, es ist jedoch nicht möglich seine Bedeutung abzuschätzen, da das Implantatbett in Wirklichkeit nicht so scharf begrenzt ist wie ein mathematisch idealisierter Zylinder. Es ist also im Nachhinein nicht abschätzbar, ob der Zylinder abweichend von seiner Längsachse angeschnitten wurde.

Aus diesen Betrachtungen folgt, dass eine statistisch nicht einwandfreie Trennung vor allem der Schichten 4 und 5 mitbedingt sein kann durch technisch begrenzte Möglichkeiten und nicht nur aufgrund mangelnder biologischer Relevanz.

4.3 Diskussion der MNGC

Das Auftreten von MNGC im Verlauf der Wundheilung ist in zahlreichen Untersuchungen beobachtet und publiziert worden [3, 4, 6, 29 - 32]. Eine genaue Quantifizierung der MNGC in-vivo ist jedoch bislang unterblieben. Wir konnten zeigen, dass die Vermehrung von MNGC umgekehrt proportional zum Knochenbindungsverhalten der Materialien stattfindet, i.e. insbesondere nach 84 d finden sich in zentralen Abschnitten des Implantatgebietes zahlreiche MNGC, gleichzeitig einhergehend mit einem Rückgang des Knochenkontaktes in diesen Abschnitten. Wie wir in elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen konnten, weisen die Zellen in der ganz überwiegenden Mehrheit morphologische Charakteristika von Fremdkörperriesenzellen (FBGC) auf, und befinden sich stets in Kontakt zum Implantat. Die Ontogenese dieser Zellen darf mittlerweile als gesichert angesehen werden und verläuft über die weitere Differenzierung von Monozyten beziehungsweise Makrophagen. Athanasou et al. [33] konnten desweiteren zeigen, dass Makrophagen aus Hüftrevisionsgewebe, i.e. Gewebe belastet mit partikulärem Materialabrieb, ein identisches Expressionsmuster von Antigenen aufwiesen wie FBGC. So wird allgemein angenommen, dass FBGC auf der Grundlage einer

durch Fremdkörper induzierten Entzündung entstehen. Sind die Fremdkörper nicht durch einen Makrophagen allein phagozytierbar, kommt es durch Konfluenz mehrerer Makrophagen zu der Bildung einer Fremdkörperriesenzelle.

Bioglass®-Partikel sind wie jedes allogene Material a priori als Fremdkörper anzusehen und von daher ist eine Fremdkörperreaktion zu erwarten. Jedoch standen bislang die bioaktiven Eigenschaften dieses Materials stark im Vordergrund [34]. Die gut verträglichen Eigenschaften werden allgemein auf die Ausbildung einer calciumphosphatreichen Schicht an der Oberfläche der Partikel zurückgeführt [8, 35]. Es ist jedoch zu bemerken, dass diese Ca-P Schicht lediglich Ähnlichkeiten mit natürlichem Hydroxylapatit aufweist. Gatti et al. konnten zeigen, dass die Stöchiometrie in der Ca-P-Schicht von Bioglass®-Partikeln über der von Knochen liegt [7], bzw. darunter [36]. Der makrophagenstimulierende Effekt von Calcium-Phosphatkeramiken und Hydroxylapatit ist mittlerweile durch in-vitro und in-vivo Versuche dokumentiert [37]. Dabei scheint der Herstellungsprozess [38] wie auch die Größe der Partikel [39] einen entscheidenden Einfluss auf die zelluläre Reaktion von Makrophagen zu haben. Doch auch Silizium scheint einen stimulierenden Effekt auf Makrophagen zu haben. Bosetti [40] konnte eine 50-fach erhöhte Stoffwechselaktivität von Makrophagen nach Stimulation mit Bioglass®-Partikeln nachweisen. Auch Laczka-Osyczka et al. [41] konnten eine erhöhte Stoffwechselaktivität von Makrophagen nach Exposition mit verschiedenen Glaskeramiken nachweisen.

Diese Ausführungen zeigen, dass Bioglass®-Partikel eindeutig allogene Eigenschaften besitzen. Ein ausreichender interstitieller Flüssigkeitsaustausch unterbindet möglicherweise die erfolgende Fremdkörperreaktion. So ließe sich die unterschiedliche Gewebeantwort in Peripherie und Zentrum des Implantatgebietes gut erklären. Die hier getestete Applikationsform von Bioglass®-Partikeln erscheint noch unbefriedigend. Eine erfolgreiche Verwendung im Sinne einer gerichteten knöchernen Regeneration mit einhergehendem Ersatz des Implantatmaterials durch Knochen erscheint jedoch angesichts der Erfolge des Materials in der Peripherie des Implantatgebietes möglich. Dabei muss jedoch vor allem die zu erwartende Menge an Eluat im Verhältnis zu den lokalen Flüssigkeitsaustausch-Kapazitäten beachtet

werden. Dieses Ergebnis hat erhebliche Bedeutung für den klinischen Einsatz des partikulären Bioglass[®]. Es muss offensichtlich ein optimales Verhältnis von Partikeln, deren Oberfläche zum Volumen des Implantatbettes und der Verfügbarkeit von Knochen aufbauenden Zellen existieren für eine Knochenbildung an den Bioglass[®]-Partikeln.

5. Zusammenfassung

Bioglass[®]-Partikel der Kompositionen 45s5, 52s und 55s wurden in die distale Epiphyse des Kaninchenfemurs implantiert. Nach 7, 28, und 84 Tagen (d) wurden die Proben gewonnen und der licht- und elektronenmikroskopischen sowie histomorphometrischen Untersuchung zugeführt.

Die Knochenbindung bzw. -neubildung erfolgte in zentripetaler Richtung, wobei 45s5 die schnellste Kinetik aufwies. Die Knochenbildung im Zentrum des Implantatgebietes schien gestört; hier war die Knochenbindung - bis auf 55s - nach 28 d wieder rückläufig. Dieses Phänomen ging einher mit einer Zunahme multinukleärer Riesenzellen (MNGC) im Zentrum des Implantatgebietes. Insbesondere im Vergleich mit anderen bioaktiven Implantatmaterialien erscheint somit eine weitere Optimierung der getesteten Bioglass[®]-Applikationen wünschenswert.

Bioglass[®]45s5 erwies sich als besonders leicht degradierbar, gefolgt von 52s und 55s. Ein vollständiger Ersatz des Implantatmaterials durch Knochen erscheint aufgrund unserer Beobachtungen denkbar.

Implantationsmodell, Partikelgröße und das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen werden als mögliche wichtige Einflussgrößen im Vergleich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen diskutiert. Ferner wird die klinische Bedeutung der Untersuchung hervorgehoben.