

Tierärztliche Hochschule Hannover
Klinik für Kleintiere

**Nanostrukturiertes Biomaterial als
Gehörknöchelchenersatz: tierexperimentelle
Untersuchungen zur Biokompatibilität**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Veterinärmedizin
- Doctor medicinae veterinariae -
(Dr. med. vet.)

vorgelegt von
Julia Charlotte Vogt
aus Rheinbach

Hannover 2008

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. med. vet. Ingo Nolte
für die Tierärztliche Hochschule Hannover

Prof. Dr. med. Thomas Lenarz
für die Medizinische Hochschule Hannover

1. Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Ingo Nolte
und Prof. Dr. med. Thomas Lenarz

2. Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Marion Hewicker-Trautwein

Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2008

Für alle meine Lieben

Diese Dissertation basiert auf zwei Veröffentlichungen in reviewten, international anerkannten, wissenschaftlichen Zeitschriften. Die Arbeiten wurden am 27. 12. 2007 und 19.06.2008 zur Publikation angenommen.

INHALT:

I. Einleitung	1
II. Zusammenfassung der Ergebnisse beider Studien	6
III. Übergreifende Diskussion	10
IV. Publikationen	18
A comparison of different nanostructured biomaterials in subcutaneous tissue	18
1. Abstract	19
2. Introduction	20
3. Materials and Methods	22
4. Results.....	24
5. Discussion	27
6. Conclusions	31
7. Acknowledgements	31
8. Figures.....	32
9. References	34
Free Bioverit® II implants coated with a nanoporous silica layer in a mouse ear model – A histological study	37
1. Abstract	38
2. Introduction	39
3. Materials and Methods	40
4. Results.....	42
5. Discussion	45
6. Conclusions	49
7. Acknowledgements	49
8. Figures.....	50
9. References	55
V. Zusammenfassung (englisch)	59
VI. Zusammenfassung (deutsch)	61
VII. Schrifttumsverzeichnis	64
VIII. Abkürzungen	68
IX. Weitere Publikationen im Rahmen dieser Arbeit	70
X. Danksagung	71

I. Einleitung

Säugetiere besitzen Gehörknöchelchen, die im Mittelohr den Schall vom Trommelfell weiter zum Innenohr verstärken.

Durch verschiedene Einflussfaktoren, wie zum Beispiel chronische Otitis media, Otosklerose oder Frakturen kann es zur Zerstörung der Gehörknöchelchenkette und damit zu eingeschränkter Funktion oder völligem Funktionsverlust kommen. Das Ausmaß der so entstandenen Mittelohrschwerhörigkeit läßt sich bei verschiedenen Haustieren, z.B. dem Hund und natürlich auch beim Menschen mittels audiologischen Messungen feststellen (1).

Im Fall eines völligen Funktionsverlustes ist der Einsatz von Hörhilfen in Form von Gehörknöchelchenprothesen oder Hörgeräten, die die Knochenleitung des Schalls verstärken, bei Tieren noch nicht Standard. Der experimentelle Einsatz an Tiermodellen belegt aber die Tauglichkeit verschiedener, in erster Linie für den Einsatz beim Menschen entwickelter Hörhilfen (2).

Beim Menschen ist die Therapie der Wahl eine Gehörknöchelchenprothese, die den entstandenen Defekt der Kette überbrückt und die Schalleitung wiederherstellt. Man unterscheidet zwischen TORPs (Total Ossicular Replacement Protheses) und PORPs (Partial Ossicular Replacement Protheses), je nachdem, ob die gesamte oder nur ein Teil der Gehörknöchelchenkette ersetzt werden muss (3).

Mögliche Materialien für die Herstellung von Gehörknöchelchenprothesen sind autologen, homologen oder alloplastischen Ursprungs.

Von autologen Materialien spricht man, wenn das Prothesenmaterial vom betroffenen Patienten selber gewonnen wird. Im günstigsten Fall sind die eigenen Gehörknöchelchen zu bearbeiten; leider sind sie in den meisten Fällen nicht zu erhalten.

Des weiteren kann man auf Materialien wie Dentin, Knorpel oder Knochen zurückgreifen. Die Nachteile hierbei sind, dass sich die Dauer des operativen Eingriffes verlängert, wenn man an einer Stelle Gewebe entnimmt und es im Ohr wiedereinsetzt. Die Menge des zu entnehmenden Gewebes ist begrenzt und die Gefahr, dass körpereigenes Gewebe in einem möglicherweise infizierten Mittelohrmilieu abgebaut wird, ist hoch.

Homologe Materialien stammen von anderen Menschen (Organspender). Entscheidender Nachteil hierbei ist neben begrenzter Verfügbarkeit und schlechter Lagerfähigkeit die Gefahr der Krankheitsübertragung, die durch Sterilisationsverfahren nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann. Insbesondere gefürchtet sind HIV oder Hepatitis. Die Nutzung homologer Materialien ist daher nicht mehr üblich.

Auf Grund dieses Materialnotstandes wurde die Entwicklung alloplastischer Prothesen vorangetrieben. Diese bestehen aus synthetisch hergestellten Materialien wie Kunststoffen, Ionomeren, Metallen oder Keramiken.

Die erste alloplastische Gehörknöchelchenprothese wurde 1952 von Wullstein eingesetzt. Dabei handelte es sich um Vinylacryl („Paravit“), was sich als nicht geeignet erwies.

Seither sind unterschiedlichste alloplastische Materialien entwickelt worden. Vielfach eingesetzt werden heute z.B. Titan, Aluminiumoxidkeramik, Hydroxylapatitkeramik oder Glaskeramiken (2,4).

Jedoch besitzen bislang alle eingesetzten Materialien sowohl Vor- als auch Nachteile hinsichtlich ihres Anpassungsvermögens intra operationem, sowie ihrer Biokompatibilität, Langzeitstabilität, Interaktion mit dem anliegenden Gewebe und nicht zuletzt Funktionalität bezogen auf die Schallübertragungsleistung.

Die vorliegende Arbeit ist im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 599 „Zukunftsfähige bioresorbierbare und permanente Implantate aus metallischen und keramischen Werkstoffen“ (SFB 599 - Biomedizintechnik) entstanden.

Der SFB 599 ist ein interdisziplinärer Zusammenschluss von Forschern aus der Medizin, der Tiermedizin und den Materialwissenschaften, die sich der Grundlagenforschung für die Entwicklung von Implantaten widmen.

Ziel des Teilprojektes D1 (Dauerimplantate) des SFB 599 ist, eine biokompatible Gehörknöchelchenprothese zu entwickeln, die einen Mukosaüberzug fördert, eine Verbindung zu Trommelfell und Stapesrest eingeht, dabei aber weder knöchern fixiert und damit versteift, noch resorbiert wird.

Eine solche Prothese soll die Qualität der Hörergebnisse und die Langzeitstabilität des Materials deutlich verbessern.

In der vorliegenden Studie wurden Bioverit[®] II mit einer Siliziumdioxid-nanostrukturierten Oberfläche (Bioverit[®] II + SiO₂) und Chitosan-Hydroxylapatit (Chi-HA) eingesetzt.

Als Kontrolle diente unbeschichtetes Bioverit[®] II.

Dabei handelt es sich um eine biokompatible Glaskeramik, die bereits erfolgreich in der rekonstruktiven Kopfchirurgie eingesetzt wird. Die Beschichtung mit einer Nanostruktur soll eine verbesserte Interaktion mit umgebendem Gewebe und eine erhöhte Materialstabilität mit sich bringen. Man spricht von Nanostrukturen, wenn Materialien Partikel bzw. Poren in einer Größe von weniger als 100 nm aufweisen. Für die Beeinflussung von Zellen ist dabei weniger die chemische Zusammensetzung des Materials als vielmehr die Größe und die Topographie der Nanostruktur entscheidend (5). Insbesondere durch die Poren, die eine starke Oberflächenvergrößerung bedingen, hat man die Möglichkeit, eine nanostrukturierte Oberfläche durch Ankopplung von Faktoren als Drug delivery System zu nutzen (6,7).

Die verwendete Siliziumdioxid-Nanobeschichtung besitzt Oberflächenstrukturen in der Größenordnung von 3-12 nm Größe und erwies sich in Zellkulturuntersuchungen als auch in in vivo Studien als biokompatibel (8,9).

Chi-HA wurde in Anlehnung an die natürliche Zusammensetzung von Knochen kombiniert. Dabei ist Hydroxylapatit ein bereits alleine eingesetztes, anorganisches Material, was biokompatibel aber sehr brüchig ist. Durch die organische Komponente des Chitosans soll die Brüchigkeit vermindert werden. Chitosan ist ein Polysaccharid, das durch Deacetylierung aus Chitin gewonnen wird. Im chemischen Herstellungsprozess des Chi-HAs entsteht eine natürliche Nanostruktur.

Die gleichen Materialien wurden von Turck et al. (9) als TORPs im Mittelohr von Kaninchen getestet. Um mechanische Einwirkungen als Einfluss auf die Materialstabilität auszuschließen, wurden die Materialien in der vorliegenden Studie in die Unterhaut im Nackenbereich von Kaninchen eingesetzt. Die Unterhaut an dieser Stelle ist für eine solche Materialtestung besonders geeignet. Sie ist operativ sehr gut zu erreichen und nahezu frei von mechanischen Störungen, d.h. alle auftretenden Effekte eines Materialabbaus sind auf das Material selbst zurückzuführen und nicht auf mechanische Belastung. Weiterhin stellt die Haut ein

gut durchblutetes, immunologisches Organ dar, in welchem Entzündungs- und Abwehrreaktionen des Körpers schnell und deutlich stattfinden und histologisch gut dargestellt werden können. Somit ist die Unterhaut nach Untersuchungen in vitro ein unspezifisches Organ, was wichtige Hinweise auf die Bioverträglichkeit und Stabilität von Materialien liefern kann.

Die drei Materialien verblieben für 28, 85 bzw. 300 Tage in der Unterhaut von 38 Kaninchen. Nach Euthanasie der Tiere wurden die Probekörper mit anhaftendem Gewebe in Glutardialdehyd fixiert, dehydriert, getrocknet und in Epoxid Harz eingebettet.

Nach Anschleifen und Polieren der Proben mit einem Mikroschleifverfahren wurde die Oberfläche der Epoxidblöcke angefärbt und mittels Auflichtmikroskopie und externer Lichtquelle untersucht. Jeweils zwei verschiedene Ebenen, die neben dem Probekörper möglichst auch die Epidermis darstellten, wurden pro Probe angefertigt und mit bis zu 320facher Vergrößerung durchgemustert. Die Aufzeichnung und Bearbeitung der Befunde erfolgte mit einer digitalen Kamera und einem speziellen Bildverarbeitungsprogramm (Analysis pro 3.2).

Die Studie kann die Bioverträglichkeit und den Effekt der Nanostrukturen der beiden Testmaterialien in der mechanisch unbelasteten Lokalisation nachweisen.

Das Tiermodell Kaninchen ist aufgrund seiner Größenverhältnisse sehr gut geeignet für die Erprobung von Gehörknöchelchen-Ersatzmaterialien. Die operativen Zugangswege zum Mittelohr sind standardisiert und audiologische Messungen zur Überprüfung der Funktionalität der Prothesen sind möglich.

Die histologischen Ergebnisse der Materialien im Mittelohr und in der Unterhaut lieferten bereits wichtige Hinweise auf die Verträglichkeit und Stabilität der Materialien. Die durch die Implantate bedingte Induktion auf zellulärem Niveau lässt sich aufgrund eines noch nicht vollständig bekannten Genoms bei Kaninchen derzeit nicht erkennen.

Die Maus hingegen ist eine Spezies, deren Genom bis in Detail bekannt ist. Dieses Wissen wird routinemäßig in weiten Bereichen der biomedizinischen Forschung genutzt, wobei Mäuse mit verschiedensten Mutationen gezielt eingesetzt werden.

Auch in der Mittelohrforschung, insbesondere im Rahmen der Erforschung der Pathomechanismen der Otitiden werden Mäuse sehr erfolgreich eingesetzt.

In den bisher für die Gehörknöchelchenforschung eingesetzten Versuchstierspezies können unterschiedliche Reaktionen auf eingesetztes Material im Mittelohr auftreten, wie beispielsweise überschießende Knochenneubildung beim Meerschweinchen (10).

Deshalb wurde im zweiten Teil der vorliegenden Studie getestet, ob die im Mausmodell erhobenen Daten eine Aussage im Hinblick auf eine spätere Anwendbarkeit der Implantate im menschlichen Mittelohr liefern können.

Um die Eignung des Mausmodells zu überprüfen, setzen wir die bereits im Kaninchen in Unterhaut und Mittelohr getesteten Materialien erneut ein, um einen direkten histologischen Vergleich zwischen den Spezies ziehen zu können. Durch die Etablierung des Mausmodells wird die Möglichkeit zur ergänzenden Genanalyse verbessert.

Um gleiche Bedingungen für histologische und genanalytische Untersuchungen zu schaffen, wurden 65 Mäuse operiert und Tiere für die jeweilige Untersuchung willkürlich ausgewählt.

Aufgrund der anatomischen Größenverhältnisse setzten wir 1 mm große Probekörper als freie Implantate in die linke Bulla tympanica der Mäuse ein. Nach 2, 6 und 12 Wochen wurden für die histologische Untersuchung vier Tiere pro Material getötet. Die Felsenbeine wurden entnommen und nach dem gleichen Verfahren wie bereits bei den Kaninchenversuchen verarbeitet und histologisch untersucht. Einzige Unterschiede waren hier eine Untersuchung von vier Schnittebenen pro Probe und eine Vergrößerung von lediglich bis zu 200fach.

Die restlichen Tiere wurden ebenfalls nach 6 bzw. 12 Wochen getötet und die Proben der genanalytischen Untersuchung zugeführt. Diese Untersuchungen sind nicht Teil der vorliegenden Arbeit.

II. Zusammenfassung der Ergebnisse beider Studien

Wie bereits im Mittelohr vom Kaninchen gezeigt, fanden wir auch in der Unterhaut eine gute Biokompatibilität bei allen drei getesteten Materialien (Bioverit[®] II + SiO₂, unbeschichtetes Bioverit[®] II und Chi-HA). Dies zeigte sich in einem völligen Fehlen von Entzündungs- oder Abstoßungsreaktionen zu allen drei Untersuchungszeitpunkten.

Die Proben des unbeschichteten Bioverit[®] II waren in allen Fällen intakt und homogen (Fig. 1A, 2A). Nur nach 300 Tagen trat in einer von drei Proben ein kleines, disloziertes Fragment auf, was sich unmittelbar neben dem Probekörper in der diesen umgebenden Bindegewebskapsel befand. Auch das beschichtete Bioverit[®] II war völlig unverändert (Fig. 2B). Nur in zwei Fällen der 85 Tage Gruppe traten kleine Materialabsprengungen auf. Auch hier befanden sich die kleinen Fragmente innerhalb der bindegewebigen Kapsel. Ein Einwandern von Zellen in die Bioverit[®] II Materialien konnte nicht beobachtet werden.

Im Gegensatz dazu zeigten alle Proben des Chi-HAs deutliche Anzeichen von Materialinstabilität (Fig. 1B, 2C). Diese traten in Form von Löchern und Fissuren auf, die zum Teil mit Zellen besiedelt waren (Fig. 2E, F). Weiterhin konnten kleine Fragmente gefunden werden (Fig. 2D).

Sowohl beim unbeschichteten als auch beim beschichteten Bioverit[®] II waren bereits nach 28 Tagen alle Probekörper von einer dünnen Bindegewebskapsel umgeben, die dem Material direkt auflag. Auch nach 85 und 300 Tagen waren ähnliche Kapseln zu finden (Fig. 2A, B). Zu allen Zeitpunkten variierten sie rund um die Probekörper sehr stark in ihrer Dicke, was einen direkten Vergleich erschwerte. Eine quantitative Analyse, bei der die Kapseldicke aller auf Bioverit[®] II - basierenden Proben an unterschiedlichen Stellen gemessen wurde, ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Materialien oder zwischen den verschiedenen Zeitpunkten. Jedoch konnte man nach 300 Tagen eine Tendenz zu etwas dickeren Kapseln beim beschichteten Material ausmachen (Fig. 4).

Die Zellen innerhalb dieser Kapseln besaßen größtenteils flache Zellkerne, einige mit runden Zellkernen konnten in direkter Nachbarschaft zum Material erkannt werden.

Insgesamt war die Zellzahl in der Nähe des Materials größer als peripher und nahm mit der Zeit ab (Fig. 3 A, B, D, E).

Beim Chi-HA traten zu allen Zeitpunkten bindegewebige Kapseln auf, die signifikant dicker waren, als die der beiden anderen Materialien (Fig. 1B, 2C). Ein Verifizieren dieses Unterschiedes durch genaue Messungen konnte aufgrund des deutlich erkennbaren ca. vierfach stärker ausgeprägten Umfangs unterbleiben.

Die Zellzahl innerhalb der Kapseln war sehr viel höher als bei den anderen beiden Materialien, wobei auch hier eine Verringerung der Anzahl über die Zeit stattfand (Fig. 3C, F). Der Anteil der Zellen mit flachen Zellkernen nahm jedoch dabei zu und ihre fischzugartige Anordnung verstärkte sich mit zunehmender Implantationsdauer. In direkter Nähe zum Material und auch in der Peripherie konnten einige rundkernige Zellen erkannt werden. Durch das bereits erwähnte Einwandern von Zellen in das Material war bei einigen Proben keine Grenze mehr zwischen Material und Bindegewebskapsel vorhanden.

Bei keinem der Materialien konnten Fremdkörperriesenzellen oder auf eine Entzündung hindeutende Zellen gefunden werden.

Die extrazelluläre Matrix der bindegewebigen Kapseln bestand bei allen Proben aus kollagenen Fasern, die in Bündeln um das Material herum sortiert waren. Im Fall von beschichtetem Bioverit® II nahm der Gehalt an extrazellulärer Matrix mit der Zeit zu (Fig. 3B, E). Beim Chi-HA war die extrazelluläre Matrix zunächst im geringeren Gehalt vorhanden als bei den beiden anderen Materialien. Mit zunehmender Implantationsdauer vergrößerte sich die Menge jedoch deutlich (Fig. 3C, F).

Die Entstehung kleiner Blutgefäße innerhalb der Kapseln trat beim unbeschichteten Bioverit® II erst nach 85 Tagen auf und ihre Anzahl blieb dann konstant. Beim beschichteten Bioverit® II traten sie bereits nach 28 Tagen auf und es zeigte sich mit der Zeit eher eine Verringerung ihrer Anzahl. Beim Chi-HA waren nach 28 Tagen deutlich Kapillaren und größere Gefäße erkennbar. Auch hier reduzierte sich die Anzahl mit zunehmender Implantationszeit.

Bei keinem der Materialien konnten wir Spuren von neu gebildetem Knorpel oder Knochen finden.

Das die Kapsel umgebende Gewebe, was mit einer Ausnahme in allen Proben physiologisch erschien, war in einigen Fällen so mit der Kapsel verwachsen, dass keine Grenze sichtbar war. In einer Probe des beschichteten Bioverit® II trat nach

300 Tagen eine Ansammlung von rundkernigen Zellen im subepidermalen Gewebe auf.

In der Mittelohrstudie überstanden alle Mäuse die Implantation von Bioverit[®] II + SiO₂ bzw. unbeschichtetem Bioverit[®] II als freie Probekörper in die linken Mittelohren äußerst gut. Sie zeigten keinerlei Einschränkung ihres Verhaltens. Typische Folgen von Eingriffen im Ohr wie z.B. Nystagmus oder Kopfschiefhaltung, wurden nicht beobachtet. Die Wundheilung verlief problemlos und zum Zeitpunkt der Euthanasie waren der äußere Gehörgang und das Trommelfell aller Tiere reizfrei.

Alle mikroskopisch untersuchten Strukturen (Innenohr mit Cochlea und Vestibular Organ sowie das Mittelohr) waren in unverändertem Zustand (Fig. 5G).

Lediglich in vier von vierundzwanzig Fällen trat ein kleiner Defekt im Bereich des Malleus auf, der aber die Stabilität der gesamten Gehörknöchelchenkette nicht beeinflusste.

Bei jeweils einem Tier der zwei Wochen Gruppe jedes Materials war der Probekörper zum Zeitpunkt der Explantation außerhalb der Bulla gelegen. Diese beiden Proben wurden von der Untersuchung ausgeschlossen.

Bei allen anderen Tieren lagen die Implantate zum Zeitpunkt der Explantation der Bullawand in direkter Nachbarschaft zur Cochlea an (Fig. 5G). Das Material selbst war immer intakt.

Entzündungszellen oder eine gesteigerte Angiogenese konnten zu keinem Zeitpunkt weder im Kontakt zum Material, noch in anderen Bereichen der Bulla gefunden werden.

Das läßt auch in dieser Lokalisation auf eine zum Kaninchen vergleichbare, hohe Bioverträglichkeit der Materialien schließen.

Bereits nach zwei Wochen zeigten beide Materialien eine Besiedelung mit Fibroblasten an der Oberfläche. Da dieser Vorgang an einer Kontaktstelle des Materials mit der Bullawand startete, fand sich in der Nähe solcher Bereiche bereits ein konfluenter Zellverband (Fig. 7A, B).

Auf frei in die Bulla hineinragenden Bereichen des Probekörpers traten zu diesem Zeitpunkt einzelne Zellen auf. Bei den Proben des Bioverit[®] II + SiO₂ war der

Zellverband minimal weiter ausgebreitet als beim unbeschichteten Bioverit[®] II (Fig. 8A, B).

Nach sechs Wochen hatten sich die Fibroblasten bei Bioverit[®] II + SiO₂ zu einem konfluenten Zellverband um die gesamten Probekörper ausgebreitet (Fig. 7D, 8D). Beim unbeschichteten Bioverit[®] II trat dies bei einigen Proben auf, andere zeigten noch vereinzelt liegende Zellen am freien Ende des Implantats (Fig. 7C, 8C). Bei beiden Materialien nahm die Dicke des Zellverbandes am freien Ende der Implantate im Vergleich zu den Berührungspunkten mit der Bullawand ab. In einigen Proben breiteten sich einzelne Epithelzellen über das Bindegewebe.

Nach zwölf Wochen zeigten alle Proben geschlossene Fibroblasten-Zellverbände, wobei der bereits geschilderte Gradient in der Dicke des bindegewebigen Überzugs von Kontaktbereichen zu frei liegenden Bereichen bestehen blieb (Fig. 7E, F und 8E, F). Im Fall des Bioverit[®] II + SiO₂ war insgesamt eine Tendenz zu verringerten Zellzahlen und Verminderung in der Dicke der bindegewebigen Kapsel zu erkennen. Bei beiden Materialien konnten anfangs einzelne Bindegewebs-Brücken zwischen der Bullawand und der Kapsel nachgewiesen werden, deren Anzahl im Laufe der Zeit zunahm.

Epithelzellen überzogen die bindegewebige Kapsel in stärkerem Ausmaß als nach sechs Wochen.

Bei beiden Materialien trat zu allen Untersuchungszeitpunkten eine Bildung von neuem Knochen in direkter Beziehung zum Implantat auf (Fig. 6, Tab. 1).

Das Wachstum dieses neuen Knochens ging in den meisten Fällen von der knöchernen Bullawand aus, in einem Fall bildete sich zwischen einem Defekt am Malleus und dem Implantat eine Knochenbrücke. Zwischen dem knöchernen Gewebe und dem Material bestand zum Teil direkter Kontakt. In anderen Bereichen traten Fibroblasten und in einem Fall Osteoklasten zwischen Material und Knochen auf. Mit zunehmender Implantationsdauer stieg die Zahl der Proben mit Knochenbildung und auch die Menge von neuem Knochen in den einzelnen Proben nahm zu. Insgesamt war ein deutlich häufigeres Auftreten von neuem Knochen beim beschichteten Bioverit[®] II im Vergleich zum unbeschichteten zu vermerken (Tab. 1).

III. Übergreifende Diskussion

Tiermodell

Der erste Teil dieser Studie beschäftigte sich mit der Testung von Materialien in der Unterhaut von Kaninchen. So hatte man die Möglichkeit am selben Tier die Biokompatibilität der Materialien an zwei verschiedenen Lokalisationen zu vergleichen. Die Einheilung des Materials im Mittelohr (9) zeigt Unterschiede zu der in der Unterhaut. Materialtestungen in der Unterhaut sind durchaus üblich (11), die Auswahl der Tierart ist hierbei nicht so entscheidend. Man kann auch andere gängige Versuchstierarten wie beispielsweise Mäuse oder Ratten verwenden (11,12).

Die Beurteilung der Wechselwirkungen zwischen Implantat und Mittelohrgewebe hingegen erfordert die Berücksichtigung verschiedener Aspekte bei der Wahl des Tiermodells.

Zunächst ist es wichtig, dass die Gewebereaktion der gewählten Tierart vergleichbar mit der des Menschen ist und vor allem keine überschießenden Reaktionen auftreten.

Solche Reaktionen finden beispielsweise im Mittelohr von Meerschweinchen statt. Hier werden die eingesetzten Mittelohrprothesen durch eine überschießende Knochenneubildung fixiert. Selbst wenn entnommene Gehörknöchelchen nicht durch Materialien ersetzt werden, kommt es zu einer brückenartigen Knochenneubildung zwischen Trommelfell und Stapesfußplatte, die als Substitut angesprochen werden kann (10,13,14).

Ein häufig genutztes Tiermodell in der Mittelohrforschung stellt das Kaninchen dar (2,9). In dieser Spezies sind die Gewebereaktionen vergleichbar zu denen des menschlichen Mittelohres. Weitere Vorteile von Kaninchen sind die vergleichbare Größe des Mittelohres und ein ähnlicher operativer Zugangsweg. Dadurch hat man die Möglichkeit, Materialien in Form von richtigen PORPs oder TORPs einzusetzen. So kann man neben der Erprobung des Materials im Implantatlager Mittelohr funktionale Messungen durchführen (15,16,17). Dies kann weitere wichtige Hinweise auf die Tauglichkeit des Materials als Gehörknöchelchenerersatz geben.

Allerdings ist beim Kaninchen die Verträglichkeitsuntersuchung des Materials bisher auf histologische Untersuchungen beschränkt geblieben. Denn für eine Mikroarray

Analyse des Gewebes sind die Datenbanken des Genoms bisher zu lückenhaft, um den Grad der Homologie von Sequenzen zu humanen bzw. murinen Genen bestimmen zu können. Das Expressionsmuster einzelner Proteine im Kaninchen läßt sich bisher erst nach Aufreinigung und Klonierung analysieren.

Wir haben uns aus mehreren Gründen für die Maus entschieden.

Zunächst stellt sie eine führende Versuchstierspezies dar. Sie ist ein preisgünstiges, leicht zu handelndes, bis ins Detail erforschtes Tier. Nicht nur ihr Genom ist bekannt, eine Vielzahl von transgenen und Inzucht-Stämmen eröffnen Forschern aus aller Welt vielfältige Möglichkeiten. In Braunschweig ist die Maus die Versuchstierspezies des Helmholtz Zentrums für Infektionsforschung, wo mit Hilfe der Genanalyse die Zellbiologie von Infektions- und Einheilungsprozessen untersucht wird.

Bisher wurden Mäuse vielfach für die Erforschung der Otitis media genutzt (18,19,20). Eine Arbeitsgruppe hat bereits das Maus-Mittelohr für die Erforschung von Gehörknöchelchenerersatz Materialien eingesetzt (21,22,23).

Der einzige Nachteil dieser Spezies ist die winzige anatomische Größe, die ein Operieren unter einem Mikroskop unbedingt erforderlich macht und eine funktionale Untersuchung sehr erschwert.

Bei den hier verwendeten BALB/c Mäusen handelt es sich um einen immunologisch sehr gut charakterisierten Stamm (24). Die vorliegende Studie soll die Übertragbarkeit der Daten auf den Menschen feststellen.

Biokompatibilität / Fremdkörperreaktion

In keinem Fall der beschichteten und unbeschichteten Bioverit® II Proben beider untersuchten Lokalisationen wurden Entzündungszellen als Zeichen einer Fremdkörperreaktion gefunden.

Die mehr oder weniger stark ausgebildeten bindegewebigen Kapseln, die die Probekörper umgaben, konnten ohne ein Auftreten von entsprechenden Zellen als bloße Einheilungsreaktion angesprochen werden.

Die Bioverträglichkeit von Bioverit® II konnte auch im Meerschweinchenmodell bestätigt werden, wo ein Gemisch aus Bioverit® I + II im Mittelohr getestet wurde und keinerlei Fremdkörperreaktionen auftraten (10).

Im Gegensatz hierzu traten bei einer Studie mit Bioverit® II mit bzw. ohne nanostrukturierter Siliziumdioxid-Beschichtung im Mittelohr von Kaninchen einige Fremdkörperriesenzellen auf (9).

Im Fall von Chi-HA, welches wir nur in der Unterhaut von Kaninchen getestet haben, konnten wir sehr stark ausgeprägte bindegewebige Kapseln aber keinerlei Entzündungsreaktionen nachweisen. Die Ergebnisse aus der Literatur waren hiermit weitestgehend übereinstimmend. So schien die Kombination der beiden Materialien die Biokompatibilität im Vergleich zu der der einzelnen Materialien zu verstärken (25).

Andere Materialien konnten ebenfalls durch Zusatz von Chi-HA oder auch nur von Chi in ihrer Biokompatibilität verbessert werden (26,27). Die einzelnen Materialien Chitosan und Hydroxylapatit betreffend, waren die Angaben aus der Literatur widersprüchlich. So konnten in in vivo Studien mit HA einerseits keine Entzündungszellen festgestellt werden (28), in anderen Studien traten sowohl Entzündungszellen (29) als auch Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen auf, welche das Material phagozytierten (30). Auch Chi löste die Aktivität von neutrophilen Granulozyten aus (12,31).

Insgesamt zeigen unsere Befunde bei allen getesteten Materialien eine sehr gute Bioverträglichkeit.

Materialbeschaffenheit / Biodegradation

Die Materialien Bioverit® II und Bioverit® II + SiO₂ zeigten in der Unterhaut lediglich in einigen Proben kleine, abgesplitterte Fragmente, die sich in der die Probekörper umgebenden Kapsel befanden. Es konnten jedoch keine Auflösungserscheinungen in den Materialien beobachtet werden. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den gleichen Materialien, die als TORPs in Kaninchenmittelohren eingesetzt waren (9). Im Mausmodell hingegen wurden zu keinem Zeitpunkt Veränderungen am Material festgestellt.

Im Gegensatz zu dieser guten Materialbeschaffenheit zeigten alle Chi-HA Probekörper in der Unterhaut gravierende Veränderungen. Diese traten in Form von Löchern und Rissen auf, weiterhin waren abgesplitterte Fragmente und zerbrochene Probekörper vorhanden. Im Mittelohr von Kaninchen zeigten TORPs aus Chi-HA ein

ähnliches Verhalten wie in der Unterhaut. Fissuren und Aggregate von isoliertem Material wurden hier mit einer Ausdehnung der Prothesen bei Feuchtigkeit und Zusammenziehen bei Trockenheit erklärt (9). In der Literatur ist reines Chi als bioresorbierbares Biopolymer, welches insbesondere in Gegenwart von Lysozym abgebaut wird, bekannt (32). Andererseits zeigten in vivo Studien Resultate von langsamer Degradation mit Erhalt der Form der Implantate nach vier Wochen (33) über Chi Schwämme, die subkutan von neutrophilen Granulozyten durchtunnelt wurden, aber dennoch stabil zusammen hielten (12) bis hin zu subkutanen bzw. intraperitonealen Chi Implantaten, die nach zwölf Wochen keinerlei Anzeichen einer Degradation zeigten (31). Eine Paste aus Chi-HA-Zinkoxid-Calziumoxid Gemisch wurde subkutan phagozytiert (11).

Kapselbildung / Gewebseinsprossung in das Material

In der Unterhaut vom Kaninchen waren die auf Bioverit® II basierten Materialien zu allen Zeitpunkten von dünnen, bindegewebigen Kapseln umgeben. Nach 28 und 85 Tagen waren keine signifikanten Unterschiede in ihrer Ausprägung zu erkennen, nach 300 Tagen zeigte sich eine leichte Tendenz zu etwas dickeren Kapseln beim beschichteten Material. Im Gegensatz hierzu verringerte in einer anderen Studie eine Siliziumdioxid Nanostruktur das Anhaften von Fibroblasten und verlangsamte ihr zelluläres Verhalten (8).

Im Mittelohr der Maus zeigte sich bereits nach zwei Wochen eine dünne Bindegewebsschicht auf allen Probekörpern. Diese ging immer von einem Berührungspunkt mit der Bullawand aus und auch hier schien die Siliziumdioxid Nanobeschichtung den Bewuchs zu fördern. Im Mittelohr ist ein Bewuchs mit ortsständigem Epithel, dem ein Überzug aus Bindegewebe vorausgehen muss, besonders wichtig. Häufig ist das Implantatlager infiziert, wenn ein Gehörknöchelchenimplantat eingesetzt werden soll. Für die Stabilität des Materials ist es unabdingbar, dass es selbst nicht von Bakterien besiedelt wird. Ein Zellüberzug schützt hier vor (34). So ist es von großem Interesse zu sehen, dass die verwendeten Materialien auch ohne feste Fixierung in der Bulla sehr schnell von Zellen besiedelt wurden.

In verschiedenen anderen Studien wird der Bewuchs mit Epithel bei freien Implantaten mit dem bei TORPs verglichen. Die Ergebnisse hierbei waren recht unterschiedlich. So zeigten freie Titan Implantate in Kaninchenmittelohren nach 504 Tagen weniger Epithelbewuchs als TORPs (35), in einer anderen Studie waren die meisten bereits nach 168 Tagen epithelisiert (36). In einer dritten Studie über freie Titan Implantate waren die meisten nach 336 Tagen mit Mukosa überzogen, andere nach 504 Tagen noch gar nicht (37).

Freie Glas Ionomer Zement Implantate zeigten bereits nach 84 (36) bzw. 56 (38) Tagen einen kompletten Mukosaüberzug. Im Gegensatz hierzu waren Kolumellas mit Kontakt zu verletzter Mukosa der Bullawand bereits nach 28 Tagen epithelisiert (38). Im Kaninchenmittelohr zeigten TORPs aus beschichtetem und unbeschichtetem Bioverit® II bereits nach 28 Tagen Epithelbewuchs, der bei den beschichteten Implantaten deutlicher ausgeprägt war (9).

In einer anderen Studie im Mausmittelohr (21) bildeten sich nach ein und zwei Monaten dünne kollagene Kapseln, die von respiratorischem Epithel überzogen wurden, um Bioglas Implantate. Plasti-Pore hingegen bewirkte nach einem Monat in derselben Lokalisation eine dicke, entzündliche Bindegewebskapsel (21).

Ein Einwachsen von Gewebe in die Bioverit® II basierten Materialien wurde in der vorliegenden Studie weder in der Unterhaut vom Kaninchen, noch im Mittelohr der Maus nachgewiesen.

Eine deutlich ausgeprägtere, bis zu vierfach dickere Kapselbildung konnte bei den Chi-HA Implantaten in der Unterhaut gezeigt werden. Zusätzlich waren Zellen in die Implantate eingewandert. Vermutlich nahmen sie den Platz des degradierten Chi's innerhalb des Komposits ein.

In der Literatur findet man häufig Angaben über das Gewebsverhalten von Chi oder HA, oder von einer Kombination der beiden mit noch weiteren Komponenten, was den direkten Vergleich erschwert.

Ausser in der vorliegenden Untersuchung wurde Chi-HA bereits im Mittelohr von Kaninchen getestet. Hier rief es die Entstehung von Granulationsgewebe um die Prothesen hervor (9).

Betrachtet man die einzelnen Komponenten, findet man bei purem HA Angaben über fibröse Kapseln, die sich um die Implantate gebildet haben (29,30,39). In einer Studie

kam es zu keiner Kapselbildung, wenn das Implantat durch Hineinschrauben in die Tibia befestigt war (28). Ebenso sorgt Chi für die Entstehung von fibrösen Kapseln um die Implantate (12,31). In vitro verbessert nanostrukturiertes Chi das Wachstum von Fibroblasten (40). Studien mit weiteren Komponenten ergaben im Fall der Substitution von Apfelsäure, Zinkoxid und Calciumoxid ebenfalls deutliches Granulationsgewebe (11), im Fall der Substitution von PMMA (Polymethylmethacrylate) trat jedoch keinerlei Kapselbildung auf (27).

Angiogene Aktivität

Eine geringe angiogene Aktivität riefen unbeschichtete Bioverit® II Implantate in der Unterhaut hervor. Bedingt durch die nanostrukturierte Beschichtung schien diese Aktivität verstärkt aufzutreten. In den Bullae der Mäuse hingegen zeigten die unbeschichteten als auch die beschichteten Materialien keinerlei verstärkte Blutgefäßbildung, weder in der die Implantate umgebenden Kapsel, noch im umliegenden Gewebe. In der Kaninchenmittelohr-Studie fand die angiogene Aktivität bei keinem der drei Testmaterialien Erwähnung (9).

In den Kapseln der Chi-HA Implantate in der Unterhaut trat im Vergleich zu den Bioverit® II Materialien eine noch stärkere Blutgefäßneubildung auf. Neben Kapillaren konnten auch größere Gefäße nachgewiesen werden. Diese Reaktion korreliert mit der verstärkten Umbauaktivität innerhalb der Bindegewebskapsel dieser Proben. In Übereinstimmung dazu zeigte eine Studie über reines Chi ebenfalls nach 12 Wochen eine angiogene Aktivität in der Nähe der Implantate (31).

Osteogenese

In der Unterhaut wurde bei keinem der Implantate eine Knochenneubildung nachgewiesen.

Im Mittelohr der Maus hingegen zeigten beide Materialgruppen eine mit der Zeit zunehmende Osteogenese um die Implantate herum. Diese Knochenbildung ging jeweils von einem Kontaktpunkt zwischen Material und umliegender Bullawand aus und dehnte sich von dort unterschiedlich über die Implantate aus. Vergleichend konnte beim nanostrukturiert beschichtetem Bioverit® II ein häufigeres Auftreten und auch größere Mengen von neuem Knochen festgestellt werden. In einer anderen

Mittelohrstudie der Maus führte Proplast als Gehörknöchelchenersatz ebenfalls zur Bildung von neuem Knochen, wohingegen die anderen getesteten Materialien wie Bioglas, Silastic und Plasti-Pore keinerlei osseogene Aktivität zeigten (21).

Auch im Mittelohr von Kaninchen zeigten unbeschichtetes und beschichtetes Bioverit[®] II sowie Chi-HA eine geringe Knochenbildung. Allerdings war hier eine geringere Ossifikation beim beschichteten Bioverit[®] II im Vergleich zum unbeschichteten vorhanden (9). In einer anderen Studie förderte die Bioverit[®] II Oberfläche die Ausbreitung von vorhandenem Stützgewebe (10).

Kalziumphosphat- und Chi-HA-Gemische sind ebenfalls bekannt für eine Stimulation der Knochenbildung (27,28,29). Reines Kalziumphosphat war sogar in der Lage, in der Muskulatur von Hunden neuen Knochen zu induzieren (41).

Neben diesen Material-abhängigen Eigenschaften wurden nanostrukturierte Oberflächen in Zellkulturen als adhäsionsfördernd für Osteoblasten charakterisiert (38,42). Dabei ist die Chemie des Materials weniger entscheidend als die Struktur der Oberfläche (42). Die Anwesenheit von Proteinen wirkt sich zusätzlich positiv auf das Anhaften der Zellen an die Materialoberfläche aus (42). Neben einem positiven Effekt auf die Osseointegration (43) konnten nanostrukturierte Oberflächen auch die Anhaftung und Ausbreitung von mesenchymalen Stammzellen verbessern (44).

Eine knöcherne Fixierung einer Gehörknöchelchenprothese ist nur im Bereich der Stapesfußplatte erwünscht. Hier ist sie wichtig, um eine Dislokation der Prothese zu vermeiden. Andere Bereiche der Prothese sollen die Zubildung von Knochen nicht fördern, um die Schallübertragung durch eine Versteifung nicht zu verschlechtern.

Um eine so gezielte Verknöcherung zu erhalten, wäre eine modular aufgebaute Prothese ideal. Diese wäre nur an der Verbindungsstelle zum Stapesrest so beschaffen, dass sie eine Knochenbildung fördert. Da sich in der Mausstudie zeigte, dass eine Siliziumdioxid Nanostruktur eine solche Knochenbildung verstärkt, wäre eine Nanostrukturierung nur an der Spitze des Prothesenschaftes von Vorteil. In den anderen Bereichen hingegen müsste man eher eine Beschichtung aufbringen, die eine Knochenbildung vermindert und den Epithelbewuchs fördert.

Fazit

Von den getesteten Biomaterialien ist Chi-HA aufgrund seiner mangelnden Integrität für den Einsatz als Gehörknöchelchenersatz nicht geeignet. Da es sich aber als biokompatibel erwiesen hat und einen sehr engen Kontakt mit den umgebenden sowie einwandernden Zellen zuließ, wäre sein Einsatz als transientes Implantatmaterial zu favorisieren.

Die beiden auf Bioverit[®] II basierenden Materialien zeigten in beiden Tiermodellen eine hohe Stabilität sowie eine sehr gute Biokompatibilität. Da die Nanostruktur die Bildung von neuem Knochen förderte, könnte man durch gezielte Oberflächenmodifizierung die lokale knöcherne Anbindung von Gehörknöchelchenprothesen an die Stapesfußplatte verbessern.

Das neu etablierte Mausmodell ist aufgrund der hohen Manipulationstoleranz der Tiere und den zum Kaninchen vergleichbaren Gewebsreaktionen sehr gut für die Testung neuer Materialien für den Gehörknöchelchenersatz geeignet. Es bietet den Vorteil der detaillierten genanalytischen Untersuchung von zellulären Reaktionen.

Die tierexperimentellen Ansätze für die Erforschung von Hörhilfen für den Menschen gehen oftmals über eine reine Biokompatibilitätsprüfung des Materials hinaus und liefern Aussagen über die funktionellen Eigenschaften. Obwohl der medizinische Einsatz von Hörhilfen beim Tier noch nicht Standard ist, erfordern die immer häufiger nachgewiesenen Schwerhörigkeiten bzw. Taubheiten auch in der Veterinärmedizin eine therapeutische Versorgung. Bereits entwickelte Hörhilfen lassen sich prinzipiell sowohl für die Innenohr- als auch Mittelohrschwerhörigkeiten beim Tier einsetzen. Allerdings würde eine Mittelohrschwerhörigkeit, wie sie z.B. nach einer Fremdkörper induzierten Otitis media oder im Alter auftreten kann, mit einem anderen Implantat zu versorgen sein als eine Innenohrschwerhörigkeit (z.B. die erbliche Taubheit der Dalmatiner).

IV. Publikationen

1. Eingereicht in „Journal of Materials Science: Materials in Medicine“; akzeptiert am 27.12.2007

A comparison of different nanostructured biomaterials in subcutaneous tissue

Julia C. Vogt^{1,4}, Gudrun Brandes², Ilka Krüger³, Peter Behrens³, Ingo Nolte⁴,
Thomas Lenarz¹ and Martin Stieve¹

¹Department of Otolaryngology, Medical School Hannover, Germany

²Department of Cell Biology-Center for Anatomy, Medical School Hannover,
Germany

³Institute of Inorganic Chemistry, Leibniz University Hannover, Germany

⁴Small Animal Clinic, University of Veterinary Medicine Hannover, Germany

1. Abstract

The nanostructured surface of a material can improve its interaction with cells and its acceptance as an implant. We compared two novel biomaterials with different nanostructures: Bioverit[®] II with a coating of nanoporous silica and chitosan-hydroxyapatite composite materials. Pure Bioverit[®] II served as a control. Platelets of these materials were implanted for 28, 85 and 300 days in the subcutaneous tissue in the neck of 38 rabbits. After excising the specimens they were fixed, embedded in epoxy resin and analyzed histologically. All coated Bioverit[®] II implants showed a thin capsule of connective tissue. After 300 days, these capsules tended to be thicker than in pure Bioverit[®] II. No signs of inflammation were observed and the materials appeared unaltered by visual inspection. In case of chitosan-hydroxyapatite composites, massive capsules consisting of dense connective tissue were found, and the material showed signs of biodegradation in form of fissures and cavities. In conclusion, the nanoporous coating showed no obvious positive effect with regard to capsule formation; the chitosan-hydroxyapatite implants provoked a stronger interaction between cells and material. However, most Bioverit[®] II implants showed no alterations optically, whereas chitosan-hydroxyapatite was partly degraded in all cases.

Keywords: Bioverit, chitosan-hydroxyapatite composites, biocompatibility, histology, rabbit

2. Introduction

In medicine, there is a general need of novel biomaterials serving as scaffolds for a variety of applications. Biological autografts are highly biocompatible and their use is generally favoured, but their availability is restricted and time of surgery is increased [1]. Biological allo- and xenografts show a high risk for infections combined with immunological reactions, which limit their application. Alloplastic materials as polymers and ceramics are already in use and seem to be a viable alternative to biological grafts [2,3,4]. Especially for the tissue engineering of bones, Ca-containing ceramics, polymers and polymer-ceramic hybrid materials have been used.

Bioverit[®] is a group of well established bioglass ceramics, which exist in four different types (Bioverit[®] I-IV). Chemically, all types are based on a glass of composition $\text{SiO}_2 - \text{Al}_2\text{O}_3 - \text{MgO} - \text{Na}_2\text{O} - \text{K}_2\text{O} - \text{F} + \text{CaO} + \text{P}_2\text{O}_5$ [5]. The bioactivity and stability of the material can be varied through changes in the composition [6]. Bioverit[®] II is inert, biocompatible and osteoconductive. Implants made from this biomaterial are easily processed during operation and are long-term stable [5,6,7]. Bioverit[®] II has proven well suited for bone replacement in non-load bearing locations, for instance for dental restoration, reconstruction of multidimensional craniofacial defects of the skull and as ossicular chain replacement material [4,5,6,7].

Nanostructured materials can strongly influence the behaviour of cells [8,9,10,11]. Observed effects are mainly influenced by the size and dimensions as well as by the topography of the nanostructures, but depend less on the type of material [8]. For example, Webster postulated that osteoblast adhesion can be augmented by every nanostructured material independent of its chemistry [8,9].

Lately, a special class of nanostructured materials has been tested with regard to biomedical applications [12,13,14,15]. These also named mesoporous materials possess pores in the lower nanometer range of 3-12 nm in an amorphous silica matrix. The pore system of these substances is too small to allow an ingrowth of cells. However, cell behaviour may be influenced indirectly, e.g. by a promoted interaction between the materials' surface and adsorbed proteins [8]. Furthermore, previous studies showed that these materials have potential as drug delivery systems [16]. In simulated body fluid, an apatite layer is formed, indicating favourable properties as a bone replacement material [12,17]. However, biological investigations

on these types of biomaterials are restricted: Cell-culture tests using nanoporous silica films indicate a favourable biocompatibility [10]. Studies involving rabbits with middle-ear implants of plain and nano-coated Bioverit® II showed that the mucosa formation is slightly enhanced on the nano-coated prostheses whereas the formation of new bone was reduced [7]. In the case of middle-ear implants this is a desired feature.

In addition to these Bioverit® II materials we used in the present animal study chitosan-hydroxyapatite (Chi-HA) composites. Hydroxyapatite (HA) is non-toxic and non-inflammatory and it does not induce a foreign body response; when used as a bone replacement material, it reveals osteoconductive properties and no fibrous tissue is formed between the implant and bone [18]. A disadvantage is its brittleness [18]. This might be overcome by composite materials, which mimic to a certain degree the structure of natural bone, where apatite nanocrystals are embedded in a collagen matrix [19,20,21].

Chitosan (Chi), a polysaccharide derived from chitin and consisting of glucosamine and N-acetyl glucosamine monomers, possesses high biocompatibility and osteoconductive properties [22,23]; it is non-toxic [24] and does not provoke immunogenic reactions. Chi is soluble in acidic solutions and can be degraded by lysozyme [24,25]. However, Chi implants maintain their integrity in vivo [26,27].

In cell cultures, Chi-HA composites exhibited better biocompatibility than the individual materials alone [22,23]. However, Chi-HA composites became surrounded by a capsule of fibrous tissue when tested in rabbits [7].

The purpose of this interdisciplinary study was to investigate in vivo the biological influence of nanostructured materials, i.e. silica-nano-coated Bioverit® II and Chi-HA composites. Plain Bioverit® II served as a control. For studying possible immunological reactions, we needed an implantation site providing a good blood supply. To minimize effects induced by mechanical stress we chose the subcutaneous tissue in the neck of rabbits in which only little mechanical influence is present.

3. Materials and Methods

3.1. Materials

Each implant consisted of a round platelet with a diameter of approx. 10 mm and a thickness of approx. 1.5 mm. The Bioverit[®] II implants were provided by 3di GmbH, Jena, Germany. Nanostructured silica coatings were applied using a dip-coating procedure, which was specifically adapted to coat this material. Implants were immersed in and then slowly withdrawn from an acidic water-alcohol solution containing tetraethoxysilane as a silicon source and Pluronic[®] P123 (BASF, Ludwigshafen, Germany) as amphiphilic block copolymer. Implants were coated four to five times, resulting in a layer of silica coatings with a thickness of some micrometers. The dried coated implants were heated to 415 °C in air in order to burn off the remaining organic amphiphile. Afterwards, the nanostructure consists of pores opening to the surface of the coated layer. X-ray diffraction indicated a periodicity of the nanostructure of approx. 10 nm and pores with a diameter of approx. 4 nm.

Chi-HA composite prostheses were obtained by dissolving chitosan (Acros Organics, Geel, Belgium) in an acetic acid solution at pH 4, followed by dissolution of calcium acetate (Fluka, Switzerland) and potassium dihydrogenphosphate (Fluka), joint precipitation of chitosan and calcium phosphate was initiated by increasing the pH to 8 using potassium hydroxide solution. The resulting material was washed with water and then mechanically densified by stuffing into a glass tube. Finally, it was dried for two weeks at room temperature. The dehumidified material was composed of 25 wt% Chi and 75 wt% HA. Investigation of this material showed that it was a nanocomposite material, with small (approx. 20 to 50 nm) hydroxyapatite nanocrystals embedded in a continuous chitosan matrix.

3.2. Animal study

The animal study (Administrative district council of Hannover, AZ 509.6-42502-04/819 on May 25, 1998) involved 38 New Zealand White female rabbits (age 6 months) bred by the animal breeding farm Charles River (Sulzfeld, Germany).

After an intramuscular injection of 1.25 mg/kg midazolam (Midazolam 5 mg Curamed Injektionslösung, DeltaSelect, Pfullingen, Germany) and 25 mg/kg ketamin (Ketamin Gräub[®], Albrecht, Aulendorf, Germany) for sedation and anaesthesia, the platelets

were implanted. In order to extend anaesthetic medication, 2 mg/kg of 1% Propofol-Lipuro[®] (Braun, Melsungen, Germany) were injected intravenously. Also, 5 µg/kg of analgesic buprenorphin (Temgesic[®], Essex Pharma, München, Germany) were administered subcutaneously. The animals were intubated, and narcosis was maintained with Isofluran (Forene[®], Abbott, Wiesbaden, Germany). To stabilize the circulatory system, 10 ml/kg/h of Sterofundin-HEG-5[®] (Braun) were infused during surgery. After the implantation, 4 mg/kg carprofen (Rimadyl[®], Pfizer, Karlsruhe, Germany) was given subcutaneously for three days to inhibit inflammation and pain. A subcutaneous injection of 5 mg/kg enrofloxacin (Baytril[®], Bayer Leverkusen, Germany) was also given daily for a period of ten days.

One platelet was implanted subcutaneously in the neck of each rabbit. One group had the materials implanted for 28 days (plain Bioverit[®] II n = 3; nano-coated Bioverit[®] II n = 5; Chi-HA n = 6), another group for 85 days (plain Bioverit[®] II n = 3; nano-coated Bioverit[®] II n = 5; Chi-HA n = 5) and a third group for 300 days (plain Bioverit[®] II n = 3; nano-coated Bioverit[®] II n = 5; Chi-HA n = 3). After these periods the rabbits were sacrificed by injecting 1.6 g/kg pentobarbital (Eutha[®] 77, Essex Pharma, Munich, Germany) intravenously.

3.3. Analysis

For histological analysis, the implants were excised immediately after euthanasia with adhering tissue and perfused in 4% glutardialdehyde (Merck, Darmstadt, Germany) in phosphate-buffered saline (GIBCO tm, Invitrogen Corporation, Paisley, UK) at +4 °C overnight. The specimens were dehydrated with increasing concentrations of ethanol and dried in a drying chamber at 65 °C. The dried specimens were embedded in epoxy resin (SpeciFix 20 Kit[®], Struers A/S, Rodovre, Denmark) under vacuum conditions.

The samples were wet-sanded to reveal vertical planes of the platelets, which permit to observe the adjacent epidermis and the surrounding subcutis (Fig. 1). Silicon carbide grinding paper (SiC Paper; Struers A/S, Rodovre, Denmark) was used in a grinding and polishing machine (LaboPol-5[®]; Struers A/S, Rodovre, Denmark). The polished surfaces of the specimens were stained with a modified staining by Mann-Dominici. It consists of 0.5% Toluidine Blue 0 (Sigma, Chemical Company, St. Louis,

Montana, USA), 0.1% Eosin G (Certistain[®], Merck) and 0.25% Orange G (Certistain[®], Merck) in 50% ethanol.

For the examination of two different planes of each sample, a light microscope (Orthoplan[®], Leitz, Wetzlar, Germany) with 40, 100, 200 and 320-fold magnification and an external cold light source was used. This light source projected light downward onto the surface of the specimen. The images were produced with a digital camera system (Colorview XS, Soft Imagine Systems GmbH, Münster, Germany), which was attached to the light microscope. They were analyzed with Analysis 3.2 (Soft Imaging Systems GmbH) and processed with Adobe Photoshop 7.0.

For the quantitative analysis, we randomly defined six measure points of the capsule around each pure and nano-coated Bioverit[®] II implant. Mean and standard deviation has been calculated and a statistical analysis by t-test has been performed.

4. Results

As expected, pure Bioverit[®] II showed good biocompatibility. Both experimental materials, i.e. nano-coated Bioverit[®] II and Chi-HA, were also obviously well tolerated even for the period of 300 days, since no clinical signs of inflammation or incompatibility occurred after implantation. In the group that received Chi-HA implants, one rabbit died. However, in the necropsy there was no evidence for a connection of this death with the implant.

4.1. Bioverit[®] II

After 28 and 85 days the material was homogeneous and did not show any degradation. In the 300-day-group, a fragment was found in one of three specimens. It was a small, longish particle, which was embedded in the capsule. There was no sign of inflammation. The material of the other two specimens was intact and showed no alterations or immigration of cells (Fig. 1A, 2A).

At all times, specimens were completely covered by a capsule of connective tissue (Fig. 2A, 3A and D). At different sides of the specimens, a great variance occurred in the thickness of this capsule until 85 days. Even on the same side of a specimen, the thickness of the capsule varied in some cases. Usually the small sides of the

specimens showed the thinnest tissue layer. The quantitative analysis showed that after 85 days the capsules appeared to be thinner (Fig. 4). The thickness of the capsule at 300 days did not change obviously in comparison to the 85 day group, but the capsules were more uniform.

Most cells of the capsule possessed flat nuclei, only some, located next to the material, showed round nuclei (Fig. 3A). The number of such cells increased a little after 85 days and then decreased again after 300 days (Fig. 3D). On the whole, the number of cells was relatively constant until 85 days and usually higher next to the material. After 300 days the number of cells reduced (Fig. 3D). Inflammatory cells like macrophages or giant cells were not found in any case.

Only after 85 days some small blood vessels had developed within the capsule. Their appearance remained constant until 300 days.

The extracellular matrix in the capsule was represented primarily by bundles of collagen fibers, which were arranged around the surface of the specimens (Fig. 3A and D). A direct contact between the tissue and the material was observed (Fig. 3A and D).

The tissue surrounding the capsule showed no alterations and was directly attached to it. In some cases, no obvious border between the capsule and the surrounding tissue was visible (Fig. 2A). There was no sign of osteogenesis or accretion of cartilage in any of the samples.

4.2. Bioverit® II coated with nanoporous silica

In most cases the material appeared unaltered (Fig. 2B). An ingrowth of tissue into the material was not found. In the 85-day group two implants showed small dislocated fragments. In the first case, a small longish particle of the material was separated from the implant by connective tissue. In the second case, there were three small particles at one spot. They were lying within the connective tissue capsule being separated from each other and from the implant by thin layers of cells only.

All specimens possessed an entire capsule of connective tissue, which was directly bonded to the material (Fig. 2B, 3B and E). The capsules were thicker on the

epidermal side. At the small sides of the specimens, the capsules were smaller. The thinnest part of the capsule occurred in direction to the subcutis.

The quantitative analysis of the thickness of the capsule revealed no significant differences between both Bioverit[®] II implant groups, because of the great variance of the thickness in every specimen (Fig. 4). After 28 days, the capsule was comparable and decreased in thickness after 85 days as demonstrated in plain Bioverit[®] II. In the 300-day-group the capsule tended to be a slightly thicker than in pure Bioverit[®] II.

By comparison with Bioverit[®] II, there occurred more cells inside the capsule of the nano-coated samples after 28 days. At all times most cells were flat-nucleated, and until 85 days some round nucleated cells were visible as well (Fig. 3B). The number of cells diminished over time. In general, the number of cells was higher next to the material (Fig. 3B and E). The smallest number of cells existed at the subcutis side.

Some small blood vessels occurred in the capsule. Their number decreased over time.

The extracellular matrix of the capsule was composed of densely packed parallel collagen fibres at all times (Fig. 3B and E). Their amount increased especially after 300 days.

The existing surrounding tissue was directly attached to the capsule (Fig. 2B). In some regions around the capsule we did not observe a distinct border line between the capsule and the surrounding tissue. Only in one specimen, an accumulation of round nucleated cells in the subepidermal tissue was observed after 300 days. Otherwise the surrounding tissue showed no alterations or signs of inflammation. Bone or cartilage formation occurred at no time.

4.3. Chitosan-hydroxyapatite

All specimens showed certain signs of biodegradation. Typically, cavities and fissures were observed (Fig. 1B, 2C, E and F). Some of these alterations were already colonized by cells (Fig. 2E and F). The number of populated pits increased over time. However, at any time, also cavities and fissures free from cells were present. Also, abruptions occurred (Fig. 2D). With one exception, all specimens of the 28-day group showed some small fragments directly next to the material.

The connective tissue capsules found around the implants were approx. 4 times thicker than in the case of the Bioverit® II-based materials (Fig. 2C). Especially after 28 and 85 days, the capsules were very tight (Fig. 3C and F). After 300 days the thickness of the capsule decreased but still was significant thicker than with both Bioverit® II implants. Sometimes the borderline between capsule and material was not clearly visible because cells seemed to migrate into the implant material (Fig. 3C).

At comparable times, the number of cells inside the capsules was noticeably higher than observed with the other materials (Fig. 3C and F). Usually their concentration increased next to the material. Over time, the number of flat-nucleated cells increased, but in total the number of cells decreased. Mostly they were sorted like a shoal around the material. This ordering increased over time. However, in the periphery of the capsule some cells were round-nucleated and less orderly arranged. The layer next to the material had dispersed more round-nucleated cells.

Some capillaries and also bigger blood vessels were formed inside the capsules. Their number decreased over time.

After 28 days, the extracellular matrix, which was composed of collagen fibres, was present to a lesser extent than was observed with the other materials (Fig. 3C). At day 85 and 300, the amount had increased clearly (Fig. 3F).

The surrounding of the capsules appeared normal. Sometimes, it was hard to differentiate the surrounding tissue from the capsules.

There was no indication of bone or cartilage formation in any of the samples.

5. Discussion

After in vitro cell culture investigations the study of the soft tissue reaction occurring around an implant material in vivo is a further important step to evaluate its general biocompatibility as well as its qualities. Therefore, two novel implant materials were investigated in the subcutaneous neck tissue of rabbits. This is a soft tissue where few mechanical influences disturbing the healing process or the stability of the implant should occur. Whereas other researchers [27] implanted subcutaneously on the back, we chose the implantation site in the neck, because this area can be expected to be even less exposed to any load-bearing stresses. Subcutaneous

tissue is well suited for testing new materials, because it shows clear immune responses. The influence of the material on the growth of fibroblasts will show up noticeably under subcutaneous conditions.

In the study presented, the absence of immunologic reactions demonstrates that all materials, i.e. plain Bioverit[®] II, nano-coated Bioverit[®] II and chitosan-hydroxyapatite (Chi-HA), are highly biocompatible.

5.1. Capsule / tissue ingrowth

Cousins et al. reported about a decreased adherence and a prolonged effect on the cellular behaviour of fibroblasts caused by a silica nanostructure [10]. In contrast, we found capsules of similar thickness after 28 and 85 days with plain Bioverit[®] II and with nano-coated Bioverit[®] II. After 300 days, Bioverit[®] II coated with a nanoporous silica layer had a slight increase of the connective tissue compared to plain Bioverit[®] II. In general, these tissue layers were only thin in comparison to Chi-HA implants. An ingrowth of tissue into the Bioverit[®] II-based materials could not be observed.

Until now, Chi and HA were mostly investigated in vitro and often in combination with other ingredients [22,23,28,29]. With regard to the individual components, ectopic placement of pure HA usually resulted in the formation of fibrous tissue surrounding HA [2,3,30]. Jansen et al. also found a capsule of fibrous tissue surrounding subcutaneous HA implants; however, no capsules were observed when implants were fixed by screwing into the tibia [31]. Chi implants were encapsulated by fibrous tissue containing purulent cells [26,27]. Nanostructured Chi seems to enhance fibroblast growth in vitro [11]. Kawakami et al. report on the application of a self hardening Chi-HA paste in rats, which also contained small amounts of malic acid, zinc oxide and calcium oxide [29]: Transiently, cell rich granulation tissue composed mainly of fibroblasts, macrophages and collagen bundles appeared around the paste. However, the mass of this tissue decreased over time and after 30 weeks no encapsulation by fibrous tissue could be seen. Other researchers also did not report any encapsulation surrounding Chi-HA-PMMA (polymethylmethacrylate) bone cement implanted in rabbit tibias [28]. The same material as used here induced formation of granulation tissue around Chi-HA prostheses in the middle ear of rabbits

[7]. These results are similar to ours because we also found capsules of connective tissue surrounding the implants at any time.

The ingrowth of tissue we observed is probably related to the degradation of the Chi part of the Chi-HA composites, leaving space for cells to intrude.

5.2. Foreign body reaction / Biocompatibility

Turck et al. observed some sporadic foreign body giant cells in the vicinity of prostheses of plain Bioverit[®] II and of silica-covered Bioverit[®] II, which were placed in the middle ear of rabbits [7]. This finding cannot be transferred to the subcutaneously placed implants. We did not observe inflammatory or foreign body cells. This implies that these materials possess an excellent biocompatibility.

This good biocompatibility also relates to the Chi-HA composites in our studies where again no inflammatory cells or any foreign body reactions were observed at any time. This is in line with literature results where the combination of Chi and HA increased the biocompatibility [22] compared to the individual materials. Also, it was shown that it is possible to upgrade the biocompatibility of other materials by adding Chi or Chi-HA [23,28]. With regard to in vivo studies on pure HA, the results are contradictory: whereas no inflammatory cells were discovered in one study [31], in other cases some inflammatory cells migrated into pores of the material [2] or foreign body macrophages and giant cells occurred, which phagocytosed particles of the material [30]. In case of pure Chi, some neutrophils [26] or even purulent cells [27] occurred.

5.3. Biodegradation

Bioverit[®] II and silica-covered Bioverit[®] II displayed only some small fragments in the tissue surrounding the implants in the subcutis. However, signs of dissolution, erosion, abrasion or fissure formation have been detected so far, neither in this study nor in the parallel investigation in the middle ear [7].

In contrast to the Bioverit[®] II-based materials, the Chi-HA composites showed clear signs of degradation in all cases. These structural changes occurred in form of cavities or fissures. Some specimens showed fragments or were even broken.

Chi is generally accepted as a bioresorbable biopolymer, being degraded especially in the presence of lysozyme [24]. In vivo studies show conflicting results, however.

Some researchers observed only slow degradation, with the shape of implants remaining almost unchanged after four weeks [25]. VandeVord et al. did not find any signs of degradation of Chi implants placed intraperitoneally and subcutaneously in mice even after 12 weeks [26]. Subcutaneously applied Chi sponges mostly maintained their integrity although some channels occurred in the material, which were filled with purulent cells [27]. In contrast, a paste of HA, Chi, zinc oxide and calcium oxide showed a phagocytosis-conditioned decrease in mass over time when placed subcutaneously in rats [29]. When used as ossicular chain replacement prostheses, Chi-HA demonstrated instabilities in the form of defects, fissures and also aggregates of fragmented material in the periphery of the implant [7].

5.4. Angiogenic activity

In this study we observed only minor angiogenic activity for plain Bioverit[®] II and the nanoporous coating appeared to enhance the activity. Also, Chi-HA composites showed rather strong angiogenic activity. Pure Chi implants had been reported before to show some angiogenic activity in the vicinity of the external surface of the implant after 12 weeks [26].

5.5. Osteogenesis

In our studies in the subcutaneous tissue none of the materials induced new bone formation. However, Bioverit[®] II is known to possess osteoconductive abilities [6] in the vicinity of existing bone or cartilage. In a recent study on rabbits, the formation of bone around ossicular replacement prostheses of Bioverit[®] II was diminished by a nanoporous silica layer [7]. In the same study, prostheses from Chi-HA composites provoked some newly formed bone tissue in the middle ear [7]. In general, calcium phosphates and Chi-HA composites are known to stimulate bone formation [2,28,31]. In addition, for pure calcium phosphates osteoinductive abilities were demonstrated in soft tissues. 30 days after implantation new bone occurred in the dorsal muscle of dogs [32].

6. Conclusions

In conclusion, this study shows that both nanostructured materials investigated, i.e. nano-coated Bioverit[®] II and Chi-HA composites, are highly biocompatible in subcutaneous tissue during a period of 300 days. The Bioverit[®] II implants are characterized by good stability and surrounded by a thin capsule of connective tissue. Due to its good properties nano-coated Bioverit[®] II appears to be a promising material for permanent implantation.

In spite of its brittleness Chi-HA composites can be successfully used in tissue engineering. The connective tissue cells interact strongly not only with the surface of the material, but also with all internal disruptions.

7. Acknowledgements

This work was supported by the German Research Foundation (DFG-SFB Collaborative Research Centre 599). The authors would like to thank Peter Erfurt from Department of Otolaryngology, Medical School Hannover, Hannover (MHH, Department of ENT), for technical support.

8. Figures

Figure 1: General view of the wet-sanded planes of plain Bioverit[®] II (A) and Chi-HA composites (B)

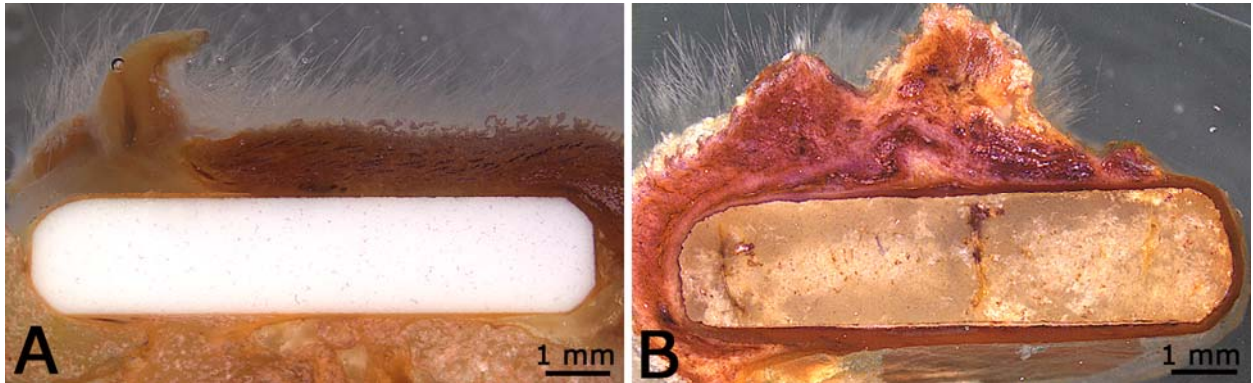
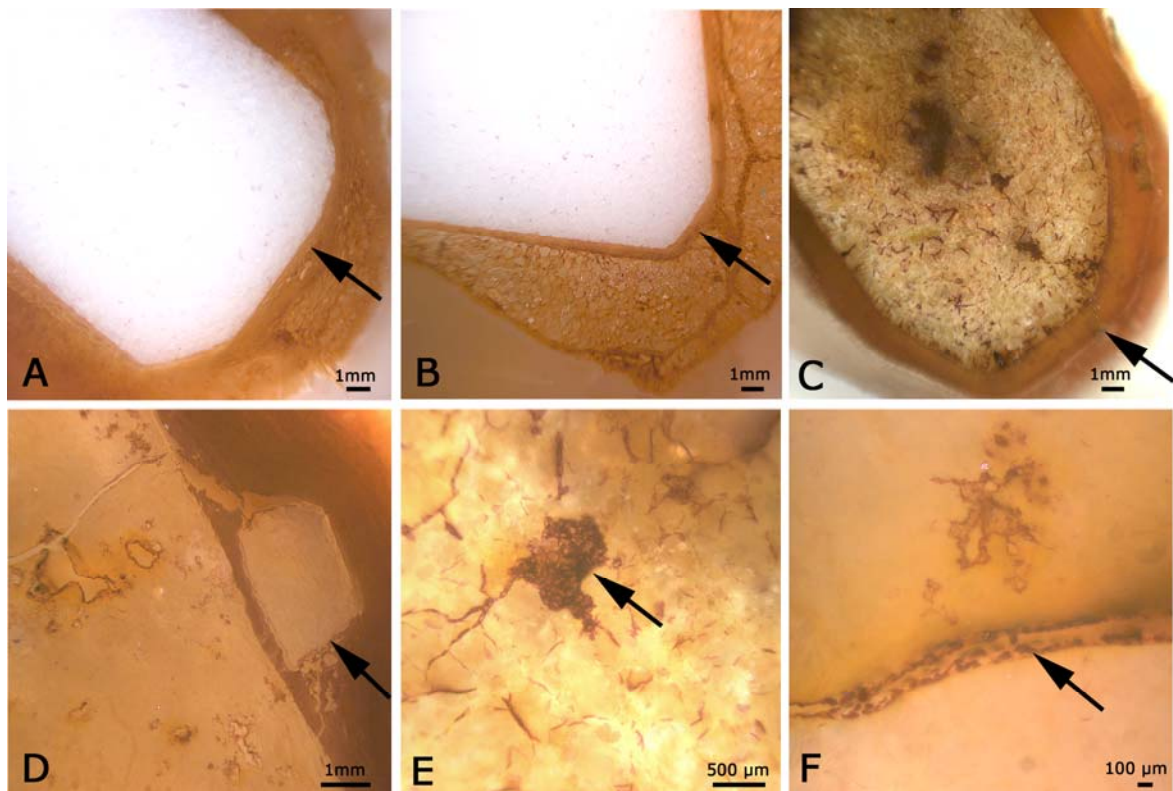
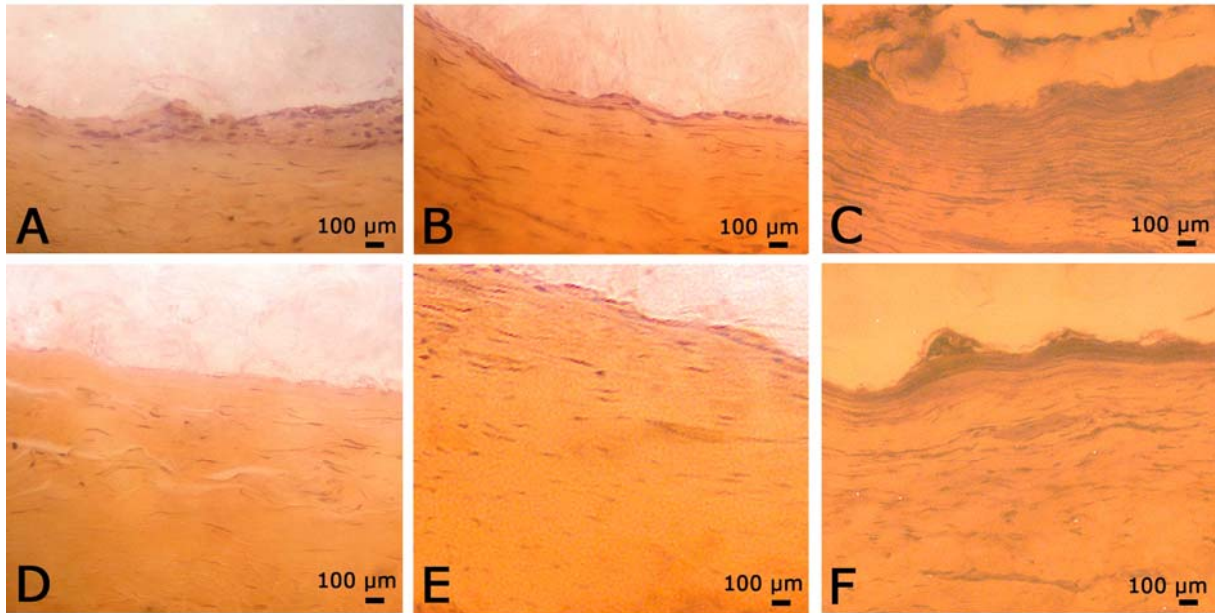


Figure 2: Material conditions and comparison of the capsule

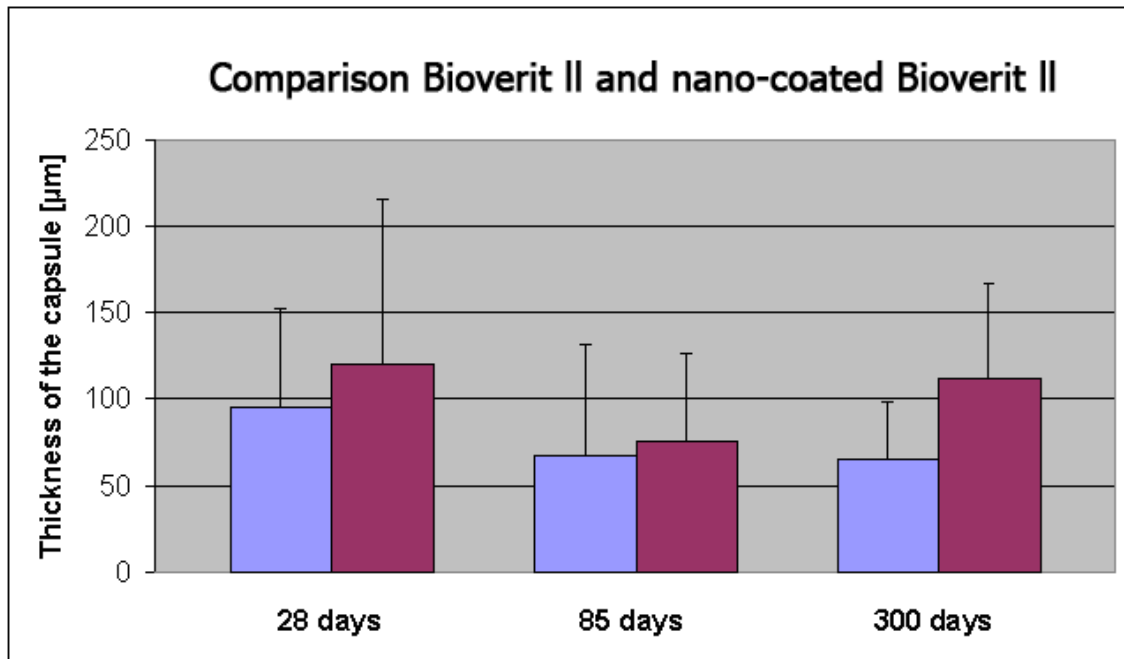


After 300 days the intact Bioverit[®] II implant (A) is surrounded by a thinner capsule than the nano-coated Bioverit[®] II (B), whereas the fragmented Chi-HA material (C) possesses the thickest layer (arrow).

The Chi-HA specimen shows abruptions (arrow in D). Cavities (arrow in E) and fissures (arrow in F) are colonized by invading cells.

Figure 3: Fibrous capsule

The cellular content within the capsule decreases depending on the distance to the surface of the material and also over time (**A**: Bioverit[®] II 85 days; **B**: nano-coated Bioverit[®] II 28 days **C**: Chi-HA 28 days, **D**: Bioverit[®] II 300 days; **E**: nano-coated Bioverit[®] II 300 days; **F**: Chi-HA 85 days)

Figure 4: Thickness of the fibrous capsule

Bioverit[®] II (**blue**); nano-coated Bioverit[®] II (**aubergine**)
Comparison after 28, 85 and 300 days

9. References

- [1.] Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *Anz J Surg* 2001;71:354-361.
- [2.] van Blitterswijk CA, Hesselting SC, Grote JJ. The biocompatibility of hydroxyapatite ceramic: A study of retrieved human middle ear implants. *J Biomed Mater Res* 1990;24(4):433-453.
- [3.] van Blitterswijk CA, Grote JJ. Biocompatibility of clinically applied hydroxylapatite ceramic. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1990;144:3-11.
- [4.] Siebert H, Schleier P, Beinemann J, Fried W, Zenk W, Schumann D. Evaluierung individueller, in der CAD/CAM-Technik gefertigter Bioverit-Keramik-Implantate zur Wiederherstellung mehrdimensionaler kraniofazialer Defekte am menschlichen Schädel. *Mund Kiefer Gesichts Chir* 2006;10:185-191.
- [5.] Höland W, Vogel W, Schuber T, Schulze KJ, Carl G, Götz W, Gummel J. Structure and properties of bioverit glass ceramics. In „*Bioceramics*“, edited by G. Heimke (2. Deutsche Keramische Gesellschaft, Cologne) 1990;97-104.
- [6.] Dost P, Ellermann S, Missfeldt NN, Leyden PJ, Jahnke K. Reconstruction of the Stapes Superstructure with a combined Glass-Ceramic (Bioverit®) Implant in Guinea Pigs. *ORL* 2002;64:429-432.
- [7.] Turck C, Brandes G, Krueger I, Behrens P, Lenarz T, Stieve M. Histological Evaluation of Novel Ossicular Chain Replacement Protheses: An Animal Study in Rabbits. *Acta Otolaryngol*, 2007;127:801-8
- [8.] Webster TJ, Siegel RW, Bizios R. Osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Biomaterials* 1999;20:1221-1227.
- [9.] Webster TJ, Ejiófor JU. Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo. *Biomaterials* 2004;25(19):4731-4739.
- [10.] Cousins BG, Doherty PJ, Williams RL, Fink J, Garvey MJ. The effect of silica nanoparticulate coatings on cellular response. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15(4):355-359.

- [11.] Chung TW, Wang YZ, Huang YY, Pan CI, Wang SS. Poly (ϵ -caprolactone) grafted with nano-structured chitosan enhances growth of human dermal fibroblasts. *Artif Organs* 2006;30(1):35-41.
- [12.] Vallet-Regí M, Ruiz-González L, Izquierdo-Barba I, González-Calbet JM. Revisiting silica based ordered mesoporous materials: medical applications. *J Mater Chem* 2006;16:26-31.
- [13.] Vallet-Regí M. Ordered mesoporous materials in the context of drug delivery systems and bone tissue engineering. *Chem Eur J* 2006;12:5934-5943.
- [14.] Vallet-Regí M, Rámila A, del Real RP, Pérez-Pariente J. A new property of MCM- 41: drug delivery system. *Chem Mater* 2001;13:308-311.
- [15.] Doadrio AL, Sousa EMB, Doadrio JC, Pérez-Pariente J, Izquierdo-Barba I, Vallet-Regí M. Mesoporous SBA-15 HPLC evaluation for controlled gentamicin drug delivery. *J Control Release* 2004;97(1):125-132.
- [16.] Hartmann M, Vinu A, Chandrasekar G. Adsorption of vitamin E on mesoporous carbon molecular sieves. *Chem Mater* 2005; 17(4):829-833.
- [17.] Horcajada P, Rámila A, Boulahya K, González-Calbet J, Vallet-Regí M. Bioactivity in ordered mesoporous materials. *Solid State Sci* 2004;6(11):1295-1300.
- [18.] Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop Rel Res* 1981;157: 259-278.
- [19.] Catledge SA, Fries MD, Vohra YK, Lacefield WR, Lemons JE, Woodard S, Venugopalan R. Nanostructured ceramics for biomedical implants. *J Nanosci Nanotechno* 2002;2(3-4):293-312.
- [20.] Grote JJ. Reconstruction of the ossicular chain with hydroxyapatite implants. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1986;123:10-12.
- [21.] Webster TJ, Smith TA. Increased osteoblast function on PLGA composites containing nanophase titania. *J Biomed Mater Res* 2005;74 A:677-686.
- [22.] Kong L, Gao Y, Cao W, Gong Y, Zhao N, Zhang X. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite / chitosan composite scaffolds. *J Biomed Mater Res* 2005;75A:275-282.
- [23.] Wang X, Ma J, Wang Y, He B. Bone repair in radii and tibias of rabbits with phosphorylated chitosan reinforced calcium phosphate cements. *Biomaterials*

- 2002;23(21):4167-4176.
- [24.] Onishi H, Machida Y. Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials* 1999;20:175-182.
- [25.] Ma J, Wang H, He B, Chen J. A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts. *Biomaterials* 2001;22:331-336.
- [26.] VandeVord PJ, Matthew HWT, DeSilva SP, Mayton L, Wu B, Wooley PH. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *J Biomed Mater Res* 2002;59(3):585-590.
- [27.] Wang X, Yan Y, Zhang R. A comparison of chitosan and collagen sponges as hemostatic dressings. *J Bioact Compatible Pol* 2006;21:39-54.
- [28.] Kim SB, Kim YJ, Yoon TL, Park SA, Cho IH, Kim EJ, Kim IA, Shin JW. The characteristics of a hydroxyapatite-chitosan-PMMA bone cement. *Biomaterials* 2004;25:5715-5723.
- [29.] Kawakami T, Antoh M, Hasegawa H, Yamagishi T, Ito M, Eda S. Subcutaneous tissue response to a chitosan-bonded hydroxyapatite self-hardening paste in rats. *Med Sci Res* 1991;19:725-727.
- [30.] Sabokbar A, Pandey R, Diaz J, Quinn JMW, Murray DW, Athanasou NA. Hydroxyapatite particles are capable of inducing osteoclast formation. *J Mater Sci Mater Med* 2001;12:659-664.
- [31.] Jansen JA, van der Waerden JPCM, van der Lubbe HBM, de Groot K. Tissue response to percutaneous implants in rabbits. *J Biomed Mater Res* 1990;24:296-307.
- [32.] Yuan H, Yang Z, Li Y, Zhang X. Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. *J Mater Sci Mater Med* 1998;9:723-726.

2. Eingereicht in "Journal of Biomaterials Applications"; akzeptiert am 19.06.2008

**Free Bioverit[®] II implants coated with a nanoporous silica layer
in a mouse ear model
A histological study**

Julia C. Vogt^{1,4}, Gudrun Brandes², Nina Ehlert³, Peter Behrens³, Ingo Nolte⁴,
Peter P. Mueller⁵, Thomas Lenarz¹ and Martin Stieve¹

¹Department of Otolaryngology, Medical School Hannover, Germany

²Department of Cell Biology-Center for Anatomy, Medical School Hannover,
Germany

³Institute of Inorganic Chemistry, Leibniz University Hannover, Germany

⁴Small Animal Clinic, University of Veterinary Medicine Hannover, Germany

⁵Helmholtz Center for Infection Research, RDIF, Braunschweig, Germany

1. Abstract

The objective of this study was to evaluate the suitability of a mouse middle ear model for testing ossicular replacement materials.

Twenty-four BALB/c mice were implanted with the bioglass-ceramic Bioverit[®] II which was coated with a silica-nanostructure or with plain Bioverit[®] II as a control. After two, six and twelve weeks, four mice per group were sacrificed and both complete petrous bones were analysed histologically.

All implants revealed *in situ* an incipient growth of thin connective tissue layers over the surface, followed by a spreading of epithelial cells. The osseogenic response which was increasing with time was more intense in the coated Bioverit[®] II specimens. The absence of inflammatory cells suggests an excellent biocompatibility of the silica nanostructure.

As the results are comparable to a study with the same materials in rabbits, the mouse model described is highly suitable for evaluation of new ossicular replacement materials. Additionally, by gene expression analysis a more detailed insight into cellular interactions of the middle ear is offered.

Keywords: Biocompatibility, Bioverit[®] II, Histology, Middle ear, Mouse, Silica-Nanocoating

2. Introduction

The ossicular chain is often destroyed in patients suffering from chronic middle ear diseases like otitis media or cholesteatoma. As middle ear ossicles are the key to a functional ear, their reconstruction poses an important challenge. Implant materials which are employed in reconstructive middle ear surgery have to fulfil some fundamental criteria. They should be light weight [1], biocompatible [2], processible and long term stable [1,2]. The risk of infection has to be excluded [1]. A rapid growth of normal middle ear mucosa around the implant is important to prevent a microbial adhesion [3].

Human autologous and homologous ossicles have been proven to be extremely suitable devices for the reconstruction of the sound conductive system historically. However, their usage is limited by restricted availability and high risk of infection, respectively.

During the last decades, alloplastic ossicular prostheses have become a popular alternative to autografts and homografts. Often used materials are e.g. ionomers, metals and ceramics [4]. Every material combines different advantages and drawbacks with regard to its biocompatibility, integration, plasticity and physical behaviour.

Bioverit[®] is a bioglass ceramic, which exists in four different types (I-IV) [5]. Bioverit[®] II, a glass-mica ceramic, is easily machined, highly biocompatible and shows no signs of biodegradation. It can be implanted even in infected locations [1] since it seems to inhibit the growth of specific bacteria [6].

Additionally, nanostructured materials possess a promising potential to promote a selective interaction between implant material and certain cell species of the surrounding tissue: the adhesion of osteoblasts is supported on nanophase surfaces whereas the adhesion of fibroblasts and endothelial cells is decreased [7]. Observed effects are mainly influenced by the topography of the nanostructures but depend less on the type of material [8]. Cell-culture tests as well as in vivo studies using nanoporous silica coatings with pores of 3-12 nm, indicate a favourable biocompatibility [9,10]. With regard to biomedical applications, a nanostructured material has a further capability as a drug delivery system [11,12].

Turck et al. investigated plain Bioverit[®] II in comparison to Bioverit[®] II which was coated with a nanoporous silica layer as TORPs (total ossicular replacement prostheses) in the middle ear of rabbits [10]. The histological analysis of the samples revealed no significant findings concerning the effect of the nanostructure. As the information of histology is restricted, we have established a middle ear model in mice for ossicular replacement materials.

In the wide field of biomedical research, mice are a popular species for in vivo trials. Even their ears are often used in auditory research, e.g. for the examination of otitis media [13-15]. The well known genome of this species offers substantial benefits including gene arrays and systematic use of mutant and inbred strains [14].

In this study we used BALB/c mice as an immunologically well characterized strain to investigate histologically the reaction of the middle ear to the implanted materials: pure Bioverit[®] II and Bioverit[®] II which was coated by a nanostructured silica layer. To test the feasibility and the viability of this new model, we compared our results with histological findings in a rabbit middle ear study, where the same materials were used as TORPs [10].

3. Materials and Methods

In this animal experiment (AZ 33.42502/07; Bezirksregierung Braunschweig, Dezernat 509, Braunschweig) we implanted bioceramics into the tympanic cavity of mice.

We obtained Bioverit[®] II implants from 3di GmbH, Jena, Germany. Each implant consisted of a cylinder with a length of 1 mm and a diameter of 1 mm (+/- 0.1 mm). Nanostructured silica coatings were applied using a spray-coating procedure which was specifically adapted to coat this material. An acidic water-alcohol solution containing tetraethoxysilane as a silicon source and poly(ethylene glycol)-*block*-poly(propylene glycol)-*block*-poly(ethylene glycol) (average $M_n \sim 5.800$, Aldrich) as amphiphilic block copolymer was sprayed onto the implants and dried at 60 °C for at least fifteen minutes before the next spraying step. Implants were coated four to five times, resulting in a layer thickness of some hundred nanometres. After drying, the coated implants were heated to 415 °C in air in order to burn out the organic

amphiphile. The nanostructure then consisted of pores opening to the surface of the coated layer. X-ray diffraction indicated pores with a diameter of approx. 9 nm.

We used 24 healthy female BALB/c mice (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Germany) in the weight range 16-22 g. They were kept in groups of four animals and fed a standard laboratory diet and water ad libitum.

For sedation and anaesthesia mice received an intraperitoneal injection of 10 mg/kg xylazin (Rompun[®] 2%, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Germany) and 100 mg/kg ketamin (Ketamin Gräub[®], Albrecht, Aulendorf, Germany) and a second injection after 15 minutes with a half dose rate. Additionally, they were given 5 mg/kg of analgesic carprofen (Rimadyl[®], Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, Germany) subcutaneously to reduce inflammation and pain.

The surgical site was prepared by shortening the hair of the retroauricular skin as well as possible and the area was disinfected (Fig. 5A). Eyes were protected with dexpanthenol eye ointment (Bepanthen[®] Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Germany). Mice were positioned under a laminar flow hood. The surgical procedure was performed under 1.6- to 4-fold microscopic control (Zeiss Stereoscopic microscope, SV11 STEREOZOOM MICROSCOPE, Objektiv Plan-Apochromat S 1.0x). After the retroauricular skin incision, the auditory canal was bluntly dissected to identify the tympanic cavity (Fig. 5B, C). Next to the insertion line of the tympanic membrane, a hole was made with a hypodermic needle and then drilled with a rosen burr (1.0 and 1.4 mm; Aesculap AG & CO.KG, Tuttlingen, Germany) to open the tympanic cavity for insertion of the materials (Fig. 5D, E). Each left cavity was implanted with one material, which was placed in the bulla away from the ossicular chain (Fig. 5E). The opened bulla was sealed with muscle. The tissue was sutured in two layers (musculature and skin) with a synthetic absorbable sterile surgical suture (Ethicon Vicryl[®] 5-0 or 6-0; Manufacturer Johnson+Johnson Intl, European logistics centre, Belgium).

Trimethoprim/sulphonamide (Cotrim-K-ratiopharm[®] Saft, ratiopharm GmbH Ulm, Germany) was chosen for postsurgical antibiotics and given via drinking water over a period of seven days (0.5%).

Each of the two materials was implanted in twelve mice and after duration of two, six and twelve weeks always four mice per group were sacrificed. Both petrous bones of

each mouse were excised immediately after death (Fig. 5F) and perfused in 2.5 % glutardialdehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.3 (Merck, Darmstadt, Germany) at +4 °C overnight.

Specimens were dehydrated with graded ethanol and dried at 65 °C. Embedding in epoxy resin (SpeciFix 20 Kit[®], Struers A/S, Rodovre, Denmark) was accomplished under vacuum conditions.

Wet-sanded planes demonstrated the implant material in situ with all surrounding tissues (Fig. 5G, H). Silicon carbide grinding paper (SiC Paper; Struers A/S, Rodovre, Denmark) with a grain size from 1200 to 4000 was used in a grinding and polishing machine (LaboPol-5[®]; Struers A/S, Rodovre, Denmark). The polished surfaces of the specimens were stained with a modified staining by Mann-Dominici. It consists of 0.5% Toluidine Blue 0 (Sigma, chemical Company, St. Louis, Montana, USA), 0.1% Eosin G (Certistain[®], Merck) and 0.25% Orange G (Certistain[®], Merck) in 50% ethanol.

The histological documentation of four different planes of the tissue and the materials' surface was done with a stereoscopic microscope (Nikon[®] SMZ 1500, Tokyo, Japan) as well as with a microscope (Axioskop Zeiss, Göttingen, Germany) in 20- to 200-fold magnification illuminated from an external cold light source. The images were produced with a digital camera system (Colorview XS, Soft Imagine Systems GmbH, Münster, Germany) which was attached to the microscopes. They were analysed with Analysis 3.2 (Soft Imaging Systems GmbH) and processed with Adobe Photoshop 8.0.1.

4. Results

All animals passed through anaesthesia and surgery without complication. Severe bleedings did occur neither during surgery nor after awakening. None of the mice showed any indisposition or reduction of alimentation as signs of an infection. Nystagmus or oblique position of the head as a result of a vestibular failure due to surgical irritation could not be observed in any case. The incision always healed by first intention (Fig. 5H). The macroscopic examination of the outer ear at the time of euthanasia revealed a non-irritated and clean external auditory canal, and tympanic membranes were intact in all mice.

In the microscopic evaluation the inner ear (cochlea and vestibular organ) appeared always untouched and not inflamed (Fig. 5G). The bulla tympanica remained free from any visible signs of infection or destruction. In only four of 24 cases a slight defect of the malleus, which did not disturb the stability of the whole ossicular chain, emerged when using the way of surgical entrance described above.

One of the implants was dislocated after two weeks in each group. These two specimens were found in the surrounding tissue of the tympanic cavity and were not evaluated. In all other 22 cases the implants remained in situ lying in contact to the bulla wall close to the cochlea.

Histologically, no signs of degradation or dissolution were observed in any of the implants (Fig. 5H). An infiltration of immune cells or an increased angiogenic activity could be found neither within the connective tissue which was directly attached to the material, nor in the surrounding tissue lying far off. The mucosa of the bulla looked completely regular in all cases (Fig. 7). These findings confirm an absence of inflammatory reaction.

Pure Bioverit® II

At two weeks, all implants showed fibroblasts spreading over the surface. Areas of the material, which interacted with the wall of the bulla tympanica, possessed a continuous connective tissue layer, whereas other areas, which were projected into the free space of the tympanic cavity, were colonized by single cells only (Fig. 7A, 8A).

After six weeks, thin and coherent connective tissue was enlarged over the surface and was sometimes covered by a single layer of epithelial cells (Fig. 7C). The capsule was reduced in thickness on the free edge of the material (Fig. 8C).

After twelve weeks, all implants were completely coated by a continuous connective tissue layer (Fig. 8E). With respect to its thickness, the gradient from the contact zone to the free edge was still demonstrable. The capsule was partly covered by epithelial cells (Fig. 7E). Some isolated connective fibres joined the bulla wall with the material in an increasing frequency over time.

Plain Bioverit® II implants initiated an osseogenic response during the whole implantation period. The frequency of ossification increased with time after

implantation (Tab. 1). After two weeks, only in one out of three cases a small amount of new bone could be observed in the interspace between the material and the bulla wall. The bony tissue was in direct contact to the material.

At six weeks, only one out of four samples showed newly developed bone. The amount was slightly larger than after two weeks and also directly attached to the surface (Fig. 6A). In this case, the new bone environed two edges of the implant at the junctions between material and bulla wall. A defect of the malleus in the vicinity of the material also led to growth of new bone.

After twelve weeks, three out of four specimens revealed an osseogenic response (Fig. 6C). Partly, new bone had completely enclosed the implant whereas it was sometimes separated by cells from the surface of the material. Other samples possessed smaller amounts of new bone in direct contact to the material.

Nanocoated Bioverit® II

After two weeks, a connective tissue layer had almost completely surrounded the material. The thickness was highest at the contact zone with the bulla wall (Fig. 7B). The number of cells decreased with the distance from contact points (Fig. 8B). On the whole, the situation was comparable to pure Bioverit® II at six weeks.

At six weeks, the connective tissue layer was still thin but expanded completely over the whole surface (Fig. 8D). The amount of cells and their distribution was similar to plain Bioverit® II at twelve weeks (Fig. 7D).

After twelve weeks, a slight tendency to a decreased amount of cells on the whole and thus a diminution in the thickness of the connective capsule could be observed (Fig. 7F, 8F). As seen in pure Bioverit® II, bridges consisting of single connective fibres sometimes filled the interspace between material and bulla wall.

The nanocoated Bioverit® II implants revealed an increasing osseogenic response during the whole implantation period which was generally more distinct than in plain Bioverit® II (Tab. 1).

After two weeks, the findings were similar to plain Bioverit® II. Only one out of three specimens showed some new bone which had developed between bulla wall and the material. Actually, a few osteoclasts were visible between implant and bone.

All four implants of the six-week group exhibited new bone formation. The ossification always started from the bulla wall and surrounded adjacent parts of the implant (Fig. 6B). In some areas the new bone was directly attached to the material whereas other parts revealed separation by intermediate connective tissue. In comparison to plain Bioverit[®] II, the ossification was more expanded.

In the twelve-week group again, the material of each sample showed a considerable formation of new bone which started in contact zones with the bulla wall and mantled big parts of the implant (Fig. 6D). Usually it was attached so closely to the material that no clear borderline remained. Some smaller parts revealed intermediate connective tissue. Compared with the six-week group of coated implants and with the twelve-week group of plain Bioverit[®] II, the amount of new bone was obviously extended.

5. Discussion

Animal model

There has been extensive research investigating ossicular chain replacements in rabbits and guinea pigs [10,16-19]. Mouse middle ear models have often been used for otitis media research. However, only one research group has dealt with a middle ear model of mice for ossicular chain replacements so far [20-22].

Dost et al. found new bone formation surrounding Bioverit[®] I+II, hydroxyapatite and Ceravital[®] implants, and also in contact with the middle ear wall in guinea pigs [18,19,23]. Additionally, a significant amount of new bone around the ossicle was observed in a reconstruction with hydroxyapatite cement and dahllite cement [24]. This fact leads to the conclusion that the extensive ossification limits the use of guinea pigs for research about ossicular chain replacements [18].

Rabbits are well established in middle ear studies [10,16]. Their advantage is the size of the middle ear which makes an implantation of real ossicular replacement prostheses possible. Additionally, the rabbit model offers the chance of functional studies [17,25,26]. Unfortunately, their genome is not completely known so far which makes a genetic evaluation impossible.

Mice were often used for otitis media research [13,14,27]. Their advantages are low cost, ease of handling and applicability to human disease [14]. Furthermore, the

knowledge of their complete genome and the existence of a multitude of transgenic strains offer plenty of possibilities. Tissue and temporal specific control of gene function provides an insight into the cell biological processes [27]. The only drawback of mice is their small size which makes accurate surgery with the aid of microscope absolutely essential and functional studies extremely difficult.

We decided to use BALB/c mice for our mouse model, which is one of the best characterized mouse strains in immunology [28]. One study has revealed that – in comparison to other mice strains - BALB/c mice were more prone for developing systemic diseases after inoculating the middle ear with a bacterial suspension. Symptoms like lethargy, ruffled fur, conjunctivitis, and balance problems occurred. These were followed by a poor prognosis [27].

In our study, mice did not encounter any infective material. However, the complete lack of any signs of restriction in their behaviour, of local or systemic diseases after surgery, leads to the conclusion of a very clean procedure during implantation. In addition, the material used has a very good biocompatibility.

Biocompatibility

In another middle ear study in mice, different materials (bioglass, silastic, and plasti-pore) displayed inflammatory reactions signified by the presence of some macrophages, giant cells and sometimes fibrous scar tissue whereas proplast did not show any inflammation [20]. Guinea pigs did not show a foreign body reaction to Bioverit[®] I+II implants in the middle ear [18].

In our study, no sign of any inflammatory or foreign body reaction could be found in any of the uncoated and coated Bioverit[®] II implants. However, around the same material in the middle ear of rabbits, some foreign body giant cells were found [10].

Material conditions

In rabbits, uncoated and coated Bioverit[®] II TORPs showed small aggregates of isolated material within the tympanic cavity after 84 days [10]. In our mouse model, where the implants did not suffer any mechanical stress we did not find any alterations even after three months.

Capsule formation

The rapid growth of local middle ear mucosa around the implant material is an essential process for the successful integration of ossicular replacements.

Free titanium implants in the middle ear of rabbits showed less mucosal growth even after 504 days of implantation than implants which were fixed as TORPs [29]. In another study, most free titanium implants were covered by epithelium after 168 days [30]. In a third study, the majority of free implants were completely covered with epithelium after 336 days whereas some implants were not epithelialized even after 504 days [31].

In rabbits, free glass ionomer cement implants exhibited a complete mucosal coverage after 84 days in the middle ear and at 168 days some osteoid had developed [30]. If placed on unwounded mucosa, ionomer cement implants were partly covered by a mucous layer after 28 days. After 56 days, the free implants exhibited an entirely coated surface. In contrast, columellas with contact to injured mucosa were completely surrounded by middle ear mucosa already after 28 days [32].

In a rabbits' study with uncoated and coated Bioverit[®] II, all implants which were interposed between the footplate of the stapes and the manubrium (TORPs) showed epithelial coverage after 28 days. In comparison, the coated implants displayed a coverage which was more spread out [10].

In middle ears of mice, Merwin et al. found bioglass implants surrounded by a thin collagenous capsule. Moreover, a respiratory epithelium had grown over this surface after one and two months. In contrast, plasti-pore induced an inflammatory reaction and revealed a thick connective tissue capsule after one month [20]. In our study, within two weeks, all uncoated and coated Bioverit[®] II implants had a thin coverage of connective tissue which was always beginning from a contact point between prosthesis and surrounding tissue. In contrast to a cell culture study [7], the nanostructure seems to support the growth of cells on its surface.

New bone formation

A bony fixation between material and the footplate of the stapes is usually desired to prevent a dislocation of ossicular replacements.

An enhanced osteoblast proliferation on nanophase ceramics (alumina, titania, hydroxyapatite) was verified as compared to the conventional formulations in cell culture studies. However, this increased adhesion came along with a decreased surface occupancy [7,33]. The presence of proteins promotes the attachment of osteoblasts [7].

Furthermore, an osteoblast adhesion appears to be independent of material type and surface chemistry, but depends on the surface topography [7]. Other researchers also found a nanostructured coating having a positive effect to the osseointegration rate [34] as well as to adhesion and spreading of mesenchymal stem cells [35].

In the middle ear of mice, the replacement material proplast led to the growth of some new bone into its pores [20].

The results of the present study exhibited an augmented bone formation in case of the nanocoated Bioverit[®] II implants as compared to plain Bioverit[®] II implants after 6 and 12 weeks. The bone formation on these free implants always started from the contact zones with the bulla wall. Both materials revealed an increasing ossification over time and a higher frequency of cases with newly formed bone. These findings were in agreement with the in vitro data.

In contrast, in the middle ear of rabbits, a minor osseogenic response without time-related differences was observed on the surface of plain Bioverit[®] II and nanostructured Bioverit[®] II TORPs [10]. The coated implants as well as microporous TiO₂ TORPs revealed a slight tendency to a decreased bone formation in investigation periods up to 43 weeks [10,16].

It was not possible to rule out differences depending on the species. However, dimensions of contact zones with the osseogenic tissue were smaller when using TORPs in rabbits than inserting free implants in mice. Therefore, the extent of ossification seems to be regulated by the size of the contact point and also by the implantation period.

6. Conclusions

The BALB/c mouse model is highly suitable for the evaluation of new ossicular replacement materials in the middle ear. The next important step will be to analyse the specimens with gene array techniques which provide an insight into molecular responses to implant materials [36].

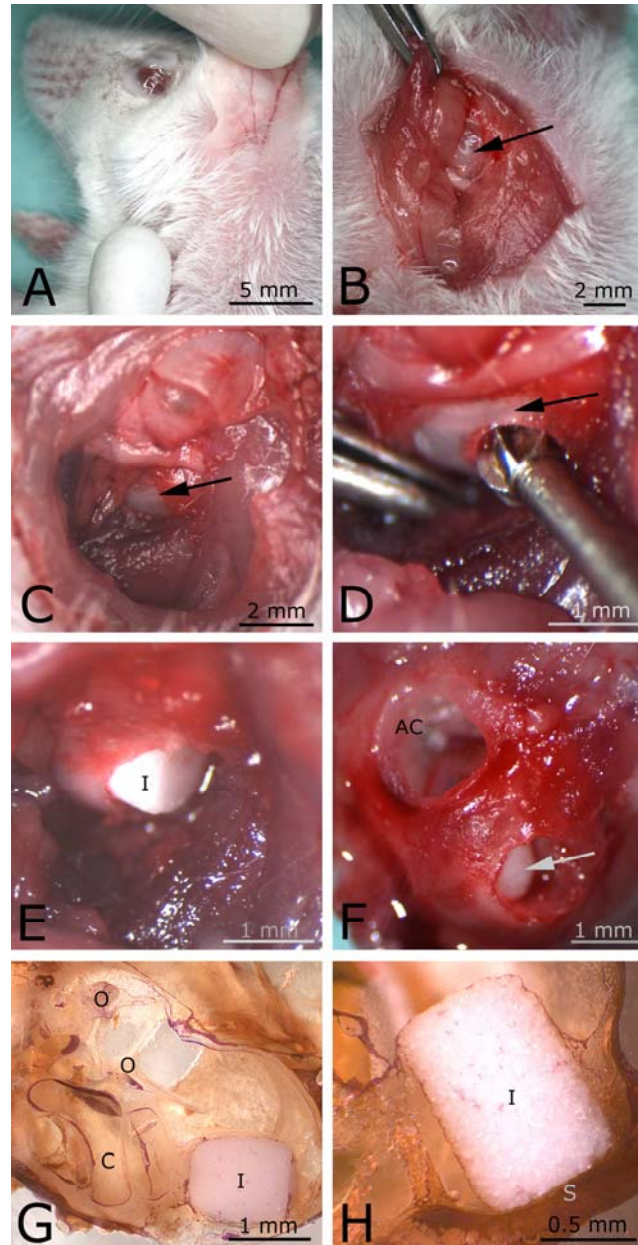
The silica nanocoating revealed a favourable biocompatibility as no signs of inflammation were found. Additionally, the adhesion of osteoblasts and fibroblasts has been promoted. In the ossicular replacement surgery a localized osseointegration should be supported in direction of the stapes footplate to stabilize the prosthesis in situ. Therefore, a local nanostructured coating may be helpful for this purpose on any favoured implant material.

7. Acknowledgements

This work was supported by the German Research Foundation (DFG-SFB Collaborative Research Center 599). The authors would like to thank Gentiana Wenzel and Peter Erfurt from Department of Otolaryngology, Medical School Hannover, Hannover (MHH, Department of ENT), for valuable contributions for surgical performance and technical support, respectively.

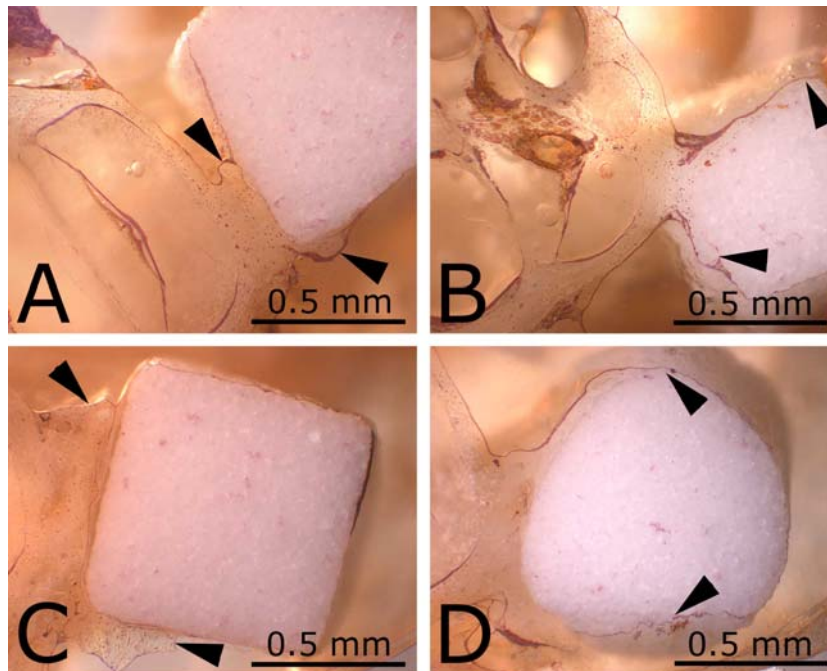
8. Figures

Figure 5: From surgical access to histological evaluation



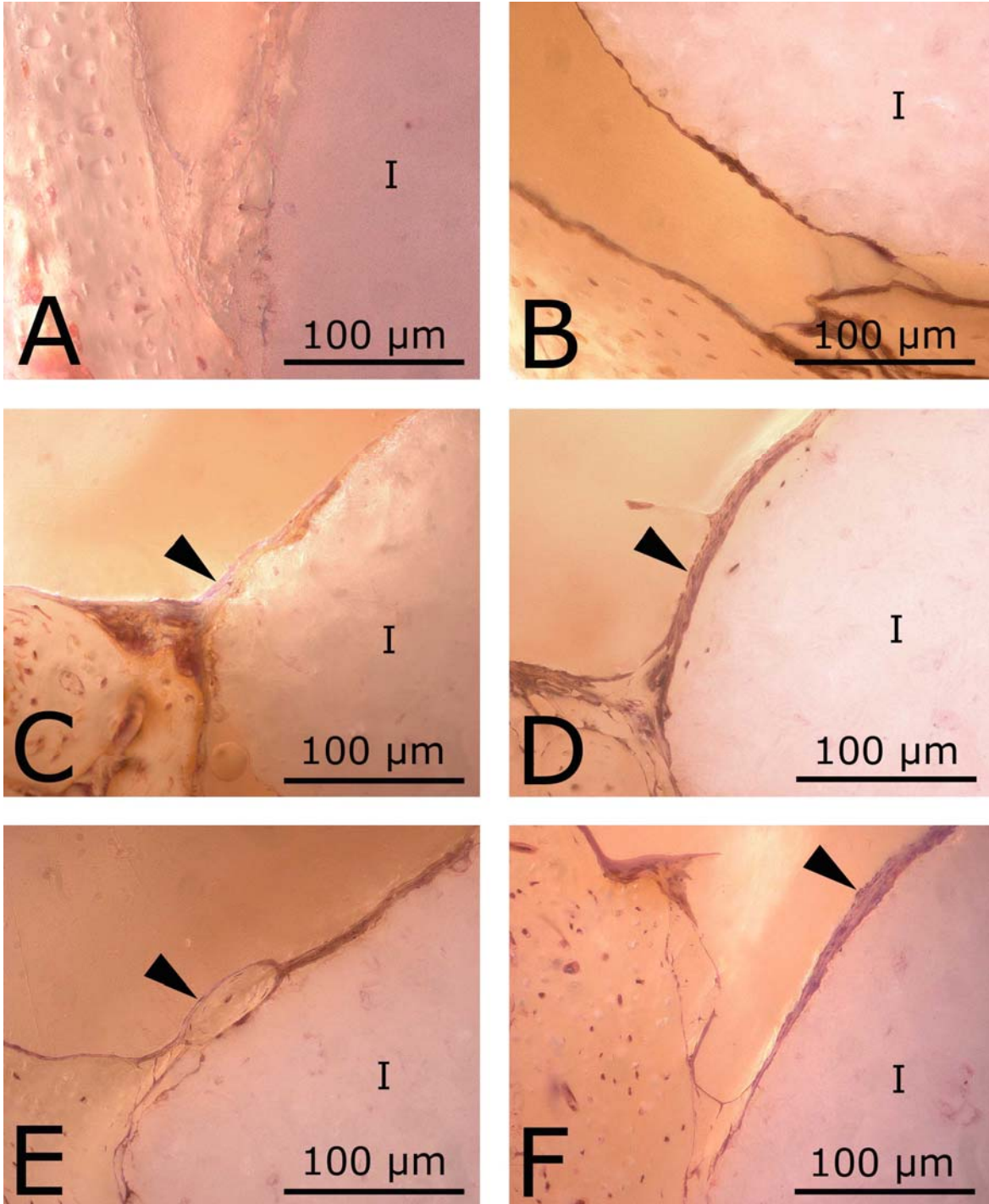
Retroauricularly (**A**) the auditory canal is exposed (arrow in **B**). Next to the insertion line of the tympanic membrane (arrows in **C** and **D**) a hole is drilled into the wall of the bulla tympanica. During insertion of the implant (**I**) in situ (**E**) only an additional push is necessary to achieve the desired position (arrow in **F**) next to the auditory canal (**AC**) as seen in the already removed petrous bone (**F**).

The grinded plane (**G**) illustrates the petrous bone with implant (**I**) and ossicles (**O**) inside the bulla and the cochlea (**C**). The wound healing is characterized by thin scar tissue (**S**) at the place of insertion after twelve weeks (**H**). (modified Mann-Dominici staining in **G** and **H**)

Figure 6: Development of new bone

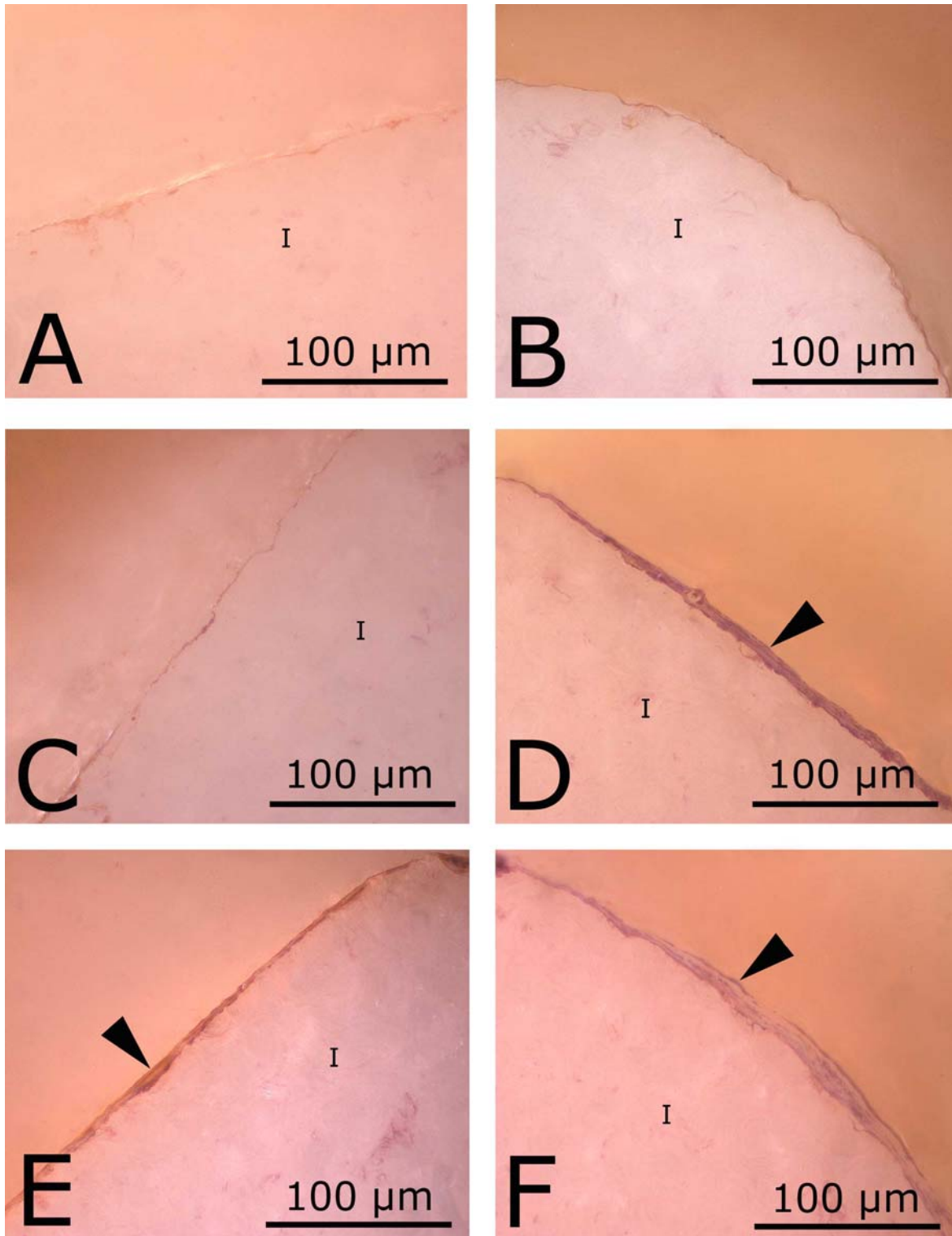
New bone formation (between the arrowheads) is limited in plain Bioverit[®] II at six (A) and twelve weeks (C) in comparison to coated Bioverit[®] II at six (B) and twelve weeks (D). (modified Mann-Dominici staining)

Figure 7: Continuation of the mucosal coverage of the bulla to the implants' surface



Comparison of plain Bioverit® II implants (I) at two (A), six (C) and twelve weeks (E) and coated Bioverit® II implants (I) at two (B), six (D) and twelve weeks (F). After two weeks only fibroblasts are connected; epithelial coverage is present after six and twelve weeks (arrowheads). (modified Mann-Dominici staining)

Figure 8: Capsule on the free surface of the implant



Fibrous tissue capsule and epithelial coverage (arrowheads) on the free implants' (I) surface directed to the tympanic cavity – comparison of plain Bioverit® II at two (A), six (C) and twelve weeks (E) and coated Bioverit® II at two (B), six (D) and twelve weeks (F). (modified Mann-Dominici staining)

Table 1: Extent of new bone formation in every animal of the study

Time	Plain Bioverit® II	Coated Bioverit® II
2 weeks	-	-
	-	-
	+	+
6 weeks	-	+
	-	+
	-	+
	+	++
12 weeks	-	++
	+	++
	+	++
	++	++

- **no bone formation**
- + **little amount of new bone**
- ++ **extensive amount of new bone**

9. References

- [1.] Geyer G. Materialien zur Rekonstruktion des Schalleitungsapparats. *HNO* 1999;47:77-91.
- [2.] Lehner R. Implantatmaterialien für Mittelohr und Mastoid. *HNO* 1997;10:745-8.
- [3.] Gristina AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 1987;237:1588-95.
- [4.] Geyer G. Die Wiederherstellung der Mittelohrfunktion. *Biomaterialien* 2000;1:54-60.
- [5.] Geyer G. Implantate in der Mittelohrchirurgie. *Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl* 1992; 1:185-221.
- [6.] Koscielny S, Beleites E. Untersuchungen zum Einfluss von Biokeramiken auf biologische Leistungen von Mikroorganismen. *HNO* 2001;49:367-71.
- [7.] Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J Biomed Mater Res* 2000;51:475-83.
- [8.] Webster TJ, Siegel RW, Bizios R. Osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Biomaterials* 1999;20:1221-7.
- [9.] Cousins BG, Doherty PJ, Williams RL, Fink J, Garvey MJ. The effect of silica nanoparticulate coatings on cellular response. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15:355-9.
- [10.] Turck C, Brandes G, Krueger I, Behrens P, Mojallal H, Lenarz T, Siteve M. Histological evaluation of novel ossicular chain replacement prostheses: an animal study in rabbits. *Acta Otolaryngol* 2007;127:801-8.
- [11.] Vallet-Regí M, Ruiz-González L, Izquierdo-Barba I, González-Calbet JM. Revisiting silica based ordered mesoporous materials: medical applications. *Journal of Materials Chemistry* 2006;16:26-31.
- [12.] Liu-Snyder P, Webster TJ. Designing drug-delivery systems for the nervous system using nanotechnology: opportunities and challenges. *Expert Rev. Med. Devices* 2006;3:683-7.
- [13.] Ryan AF, Ebmeyer J, Furukawa M, Pak K, Melhus A, Wassermann SI, Chung WH. Mouse models of induced otitis media. *Brain Res* 2006;1091:3-8.

- [14.] MacArthur CJ, Trune DR. Mouse models of otitis media. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;14:341-6.
- [15.] Ghaheri BA, Kempton JB, Pillers DA, Trune DR. Cochlear cytokine gene expression in murine acute otitis media. *Laryngoscope* 2007;117:22-9.
- [16.] Trabandt N, Brandes G, Wintermantel E, Lenarz T, Stieve M. Limitations of titanium dioxide and aluminum oxide as ossicular replacement materials: an evaluation of the effects of porosity on ceramic prostheses. *Otol Neurotol* 2004;25:682-93.
- [17.] Stieve M, Mojallal H, Battmer RD, Winter M, Lenarz T. Multifrequency tympanometry: experimental application after implantation of ossicular replacement prosthesis in rabbits. *Otol Neurotol* 2007;28:875-7.
- [18.] Dost P, Ellermann S, Missfeldt NN, Leyden PJ, Jahnke K. Reconstruction of the stapes superstructure with a combined glass-ceramic (Bioverit®) implant in guinea pigs. *ORL* 2002;64:429- 32.
- [19.] Dost P, Ellermann S, Missfeldt NN, Jahnke K. Rekonstruktion des Steigbügeloberbaus beim Meerschweinchen mit einer Biovitrokeramik und Silikonfolie. *HNO* 2002;50:1053-6.
- [20.] Merwin GE, Atkins JS, Wilson J, Hench LL. Comparison of ossicular replacement materials in a mouse ear model. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1982;90:461-9.
- [21.] Wilson J, Atkins JS, Merwin GE, Hench LL. Histopathological evaluation of the interaction between tympanic membrane and implant materials in a mouse ear model. *Transaction of the Annual Meeting of the Society for Biomaterials in conjunction with the Interna* 1985;8:195.
- [22.] Merwin GE, Wilson J, Hench LL. Comparison of homograft and bioglass implants in a mouse ear model. *Transaction of the Annual Meeting of the Society for Biomaterials in conjunction with the International Biomaterials Symposium* 1984;7:284.
- [23.] Dost P. Tierexperimente und Zellkultur-Untersuchungen zur Stapes-Rekonstruktion mit unterschiedlichen Biomaterialien. *Laryngorhinootologie* 2000;79:193.

- [24.] Hoffmann KK, Kuhn JJ, Strasnick B. Bone cements as adjuvant techniques for ossicular chain reconstruction. *Otol Neurotol* 2003;24:24-8.
- [25.] Stieve M, Schwab B, Winter M, Lenarz T. Titanoxidkeramik als Implantationsmaterial in der Ohrchirurgie: Tierexperimentelle Ergebnisse zur Operationstechnik. *Laryngorhinootologie* 2006;85:635-9.
- [26.] Stieve M, Mojallal H, Winter M, Battmer RD, Lenarz T. Norminative auditory brainstem response - data for hearing threshold in the rabbit. *Audiol Neurotol* 2006;11:310-7.
- [27.] Melhus A, Ryan AF. A mouse model for acute otitis media. *APMIS* 2003;111:989-94.
- [28.] Dinkel A, Aicher WK, Warnatz K, Bürki K, Eibel H, Ledermann B. Efficient generation of transgenic BALB/c mice using BALB/c embryonic stem cells. *J Immunol Methods* 1999;223:255-60.
- [29.] Schwager K. Epithelisierung von Titanprothesen im Mittelohr des Kaninchens. Modellvorstellung zur Mukosaentwicklung. *Laryngorhinootologie* 1998;77:38-42.
- [30.] Schwager K. Titanium and glass-ionomer cement as ossicular replacement materials: biocompatibility results after implantation in the rabbit. *ORL* 1998;60:322-8.
- [31.] Schwager K. Titanium as a biomaterial for ossicular replacement: results after implantation in the middle ear of the rabbit. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1998;255:396-401.
- [32.] Geyer G. Ionmerzement als Knochenersatzmaterial im Mittelohr des Kaninchens. *HNO* 1997;45:222-6.
- [33.] Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials* 2000;21:1803-10.
- [34.] Giavaresi G, Ambosio L, Battiston GA, Casellato U, Gerbasi R, Finia M, Aldini NN, Martini L, Rimondini L, Giardino R. Histomorphometric, ultrastructural and microhardness evaluation of the osseointegration of a nanostructured titanium oxide coating by metal-organic chemical vapour deposition: an in vivo study. *Biomaterials* 2004;25:5583-91.

- [35.] Catledge SA, Vohra YK, Bellis SL, Sawyer AA. Mesenchymal stem cell adhesion and spreading on nanostructured biomaterials. *J Nanosci Nanotechnol* 2004;4:986-9.
- [36.] Vogt JC, Stieve M, Ehlert N, Lindemeier D, Brandes G, Mojallal H, Lenarz T, Behrens P, Mueller PP. Murine model for the evaluation of novel ossicular replacement materials. *Biomaterialien* 2007;8:221.

V. Zusammenfassung (englisch)

Julia Charlotte Vogt (2008): Nanostructured biomaterials as ossicular replacement: evaluation of the biocompatibility in vivo

In the reconstructive middle ear surgery there is a general need of biocompatible materials which are processible, long term stable and provide the sound transmission.

In this study we tested new materials for the reconstruction of the ossicular chain in two different animal models.

In the first model we compared the reaction to platelets of Bioverit[®] II which was coated with a silica-nanostructure (Bioverit[®] II + SiO₂) and chitosan-hydroxyapatite composites (Chi-HA) in subcutaneous tissue in the neck of rabbits. Pure Bioverit[®] II served as a control. After periods of 28, 85 and 300 days the animals were sacrificed and the specimens were excised. Further on, they were fixed, embedded in epoxy resin and analyzed histologically. All coated Bioverit[®] II implants showed a thin capsule of connective tissue. After 300 days, these capsules tended to be thicker than in pure Bioverit[®] II. No signs of inflammation were observed and the materials appeared unaltered by visual inspection. In case of chitosan-hydroxyapatite composites, massive capsules consisting of dense connective tissue were found, and the material showed signs of biodegradation in form of fissures and cavities which were partly populated with cells. However, even in this material we could not find any inflammatory cells.

None of the materials in subcutaneous tissue revealed signs of a development of new bone.

In the second part of this study, we determined the suitability of a mouse middle ear model by using the already tested materials Bioverit[®] II + SiO₂ and pure Bioverit[®] II. We could compare the results with a previous study in rabbits.

BALB/c mice were implanted in groups of twelve per material. After two, six and twelve weeks, four mice per group were sacrificed and both petrous bones were removed. They were fixed, embedded in epoxy resin, and analyzed histologically.

Already after two weeks, all implants revealed an incipient growth of thin connective tissue layers over the surface, followed by a spreading of epithelial cells. Both materials induced an osseogenic response which was increasing with time after implantation. However, we could find that the tissue reaction was more intense in the coated Bioverit® II specimens. Signs of inflammation or foreign body reaction were not observed.

In conclusion, all tested materials were highly biocompatible. Due to its lack of integrity, Chi-HA composites are not appropriable for reconstructive middle ear surgery. However, it could be successfully used in tissue engineering as the connective tissue cells interact strongly not only with the surface of the material, but also with all internal disruptions.

In contrast, the Bioverit® II implants are characterized by a good stability. As the nanostructure enhanced the formation of new bone in the middle ear of mice, it could be useful to coat TORPs just in the direction of the stapes footplate. In this location a bony fixation of the implant is desired to provide a dislocation.

At least we found out that the mouse model described is highly suitable for evaluation of new materials in the middle ear. The animals reacted tolerantly to all manipulative treatment and their tissue responses to the implants were comparable to the results in rabbits. Furthermore, the possibility of a gen-array-analysis is an important advantage.

Hearing impairment is a serious problem in veterinary patients as well. Therefore, the experiences gained in numerous experimental evaluations about hearing aids in vivo would be useful for practical applications in animals.

VI. Zusammenfassung (deutsch)

Julia Charlotte Vogt (2008): Nanostrukturiertes Biomaterial als Gehörknöchelchenersatz: tierexperimentelle Untersuchungen zur Biokompatibilität

In der rekonstruktiven Mittelohrchirurgie besteht ein hoher Bedarf an biokompatiblen, stabilen, schallübertragenden Materialien. In der vorliegenden Studie wurden neue Materialien für den Gehörknöchelchenersatz in zwei verschiedenen Tiermodellen auf ihre Biokompatibilität getestet.

Im ersten Tiermodell wurden dabei Bioverit[®] II mit einer Siliziumdioxid-Nanobeschichtung (Bioverit[®] II + SiO₂), Chitosan-Hydroxylapatit (Chi-HA) und reines Bioverit[®] II als Kontrolle in Form von Tablettenförmigen Probekörpern in das Unterhautgewebe im Nacken von 38 Kaninchen eingesetzt. Nach Implantationszeiten von 28, 85 und 300 Tagen wurden die Tiere euthanasiert und die Probekörper mit dem anhaftenden Gewebe entnommen. Sie wurden in Glutardialdehyd fixiert, mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und nach abschließender Trocknung im Wärmeschrank in Epoxidharz eingebettet. Nach Schleifen, Polieren und Färben der Oberfläche erfolgte die Untersuchung mittels Auflichtmikroskopie.

Alle Implantate zeigten keinerlei Hinweise auf Entzündungs- oder Abstoßungsreaktionen.

In der Unterhaut konnte kein neu gebildeter Knochen gefunden werden.

Alle auf Bioverit[®] II basierenden Implantate wurden bereits nach 28 Tagen von einer dünnen Bindegewebskapsel umgeben. Lediglich nach 300 Tagen schien diese bei den beschichteten Implantaten etwas dicker zu sein. Das Material war in fast allen Fällen völlig unverändert.

Die Chi-HA Implantate besaßen im Gegensatz dazu zu allen Zeitpunkten wesentlich dickere Bindegewebskapseln und das Material selbst zeigte in allen Fällen deutliche Anzeichen eines Abbaus. Diese fielen in Form von Fissuren und Löchern auf, die zum Teil mit Zellen besiedelt waren.

Im zweiten Tiermodell wurden Bioverit® II + SiO₂ und reines Bioverit® II in Form von 1 mm großen, zylindrischen Probekörpern in die Mittelohren von BALB/c Mäusen eingesetzt.

Hier sollte der Vorteil der genetisch völlig erschlossenen Maus genutzt werden, um neben der Histologie auch die Möglichkeit einer späteren Genanalyse zu haben.

Nach Implantationszeiten von 2, 6 und 12 Wochen wurden für die Histologie jeweils 4 Mäuse pro Material euthanasiert und beide Felsenbeine entnommen. Wie schon im ersten Teil der Studie erfolgte die Fixation in Glutardialdehyd, Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und abschließende Trocknung im Wärmeschrank. Die Proben wurden in Epoxidharz eingebettet, geschliffen, gefärbt und unter Nutzung der Auflichtmikroskopie dokumentiert.

Bereits nach zwei Wochen war bei beiden Materialien ein an Kontaktstellen mit dem umliegenden Gewebe beginnender, dünner Bindegewebsüberzug zu erkennen. Die Ausbreitung dieses Überzugs war beim beschichteten Material minimal stärker ausgeprägt und nahm bei beiden Materialien mit der Zeit zu. Außerdem traten schon nach zwei Wochen die ersten Epithelzellen auf, die sich über die Bindegewebszellen breiteten.

Gleichzeitig zeigte sich bei beiden Materialien eine Neubildung von Knochen. Dieser begann ebenfalls, sich an Kontaktstellen mit umliegendem Knochen zu bilden und breitete sich von hier weiter über die Implantatoberfläche aus. Mit zunehmender Implantationszeit nahmen die Anzahl der Proben mit neuem Knochen und auch die Menge zu. Die beschichteten Proben zeigten eine stärkere Knochenbildung.

Auch im Mausmodell konnten keinerlei Entzündungsreaktionen festgestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Chi-HA aufgrund seiner mangelnden Integrität für den Einsatz als Gehörknöchelchenerersatz nicht geeignet ist. Da es sich aber als biokompatibel erwiesen hat und ein sehr enger Kontakt zwischen Material und umgebenden sowie einwandernden Zellen zu erkennen war, wäre ein Einsatz im Tissue engineering durchaus denkbar.

Die beiden auf Bioverit® II basierenden Materialien zeigten in beiden Tiermodellen sowohl eine hohe Stabilität als auch eine sehr gute Biokompatibilität. Da die Nanostruktur die Bildung neuen Knochens förderte, kann man sie in Zukunft

einsetzen, um die knöchernen Anbindung von Gehörknöchelchenprothesen an die Stapesfußplatte zu unterstützen.

Das neu etablierte Mausmodell ist aufgrund der hohen Manipulationstoleranz der Tiere und den zum Kaninchen vergleichbaren Gewebsreaktionen sehr gut für die Testung neuer Materialien für den Gehörknöchelchenerersatz geeignet.

Auch in der Tiermedizin tritt das Problem der Schwerhörigkeit bei Patienten auf. In experimentellen Ansätzen werden Tiere bereits erfolgreich mit Hörhilfen versorgt, die sich auch in der Praxis einsetzen ließen.

VII. Schrifttumsverzeichnis

- (1.) Boenninghaus, Lenarz. HNO. Springerverlag 2007, 13. Auflage
- (2.) Trabandt N, Brandes G, Wintermantel E, Lenarz T, Stieve M. Limitations of titanium dioxide and aluminum oxide as ossicular replacement materials: an evaluation of the effects of porosity on ceramic prostheses. *Otol Neurotol* 2004; 25: 682-693.
- (3.) Stupp CH, Stupp HF, Grün D. Gehörknöchelchenersatz mit Titan-Prothesen. *Laryngo-Rhino-Otol.* 75 (1996) 335-337.
- (4.) Neumann A, Jahnke K. Biomaterials for ossicular chain reconstruction. A review. *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* 2003; 34(12): 1052-1057
- (5.) Webster TJ, Siegel RW, Bizios R. Osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Biomaterials* 1999;20:1221-1227.
- (6.) Vallet-Regí M, Ruiz-González L, Izquierdo-Barba I, González-Calbet JM. Revisiting silica based ordered mesoporous materials: medical applications. *Journal of Materials Chemistry* 2006;16:26-31.
- (7.) Liu-Snyder P, Webster TJ. Designing drug-delivery systems for the nervous system using nanotechnology: opportunities and challenges. *Expert Rev. Med. Devices* 2006;3:683-687.
- (8.) Cousins BG, Doherty PJ, Williams RL, Fink J, Garvey MJ. The effect of silica nanoparticulate coatings on cellular response. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15:355-359.
- (9.) Turck C, Brandes G, Krueger I, Behrens P, Mojallal H, Lenarz T, Stieve M. Histological evaluation of novel ossicular chain replacement prostheses: an animal study in rabbits. *Acta Otolaryngol* 2007;127:801-808.
- (10.) Dost P, Ellermann S, Missfeldt NN, Leyden PJ, Jahnke K. Reconstruction of the stapes superstructure with a combined glass-ceramic (Bioverit®) implant in guinea pigs. *ORL* 2002;64:429- 432.
- (11.) Kawakami T, Antoh M, Hasegawa H, Yamagishi T, Ito M, Eda S. Subcutaneous tissue response to a chitosan-bonded hydroxyapatite self-hardening paste in rats. *Med Sci Res* 1991;19:725-727.

- (12.) Wang X, Yan Y, Zhang R. A comparison of chitosan and collagen sponges as hemostatic dressings. *J Bioact Compatible Pol* 2006;21:39-54.
- (13.) Dost P, Ellermann S, Missfeldt NN, Jahnke K. Rekonstruktion des Steigbügeloberbaus beim Meerschweinchen mit einer Biovitrokeramik und Silikonfolie. *HNO* 2002;50:1053-1056.
- (14.) Dost P. Tierexperimente und Zellkultur-Untersuchungen zur Stapes-Rekonstruktion mit unterschiedlichen Biomaterialien. *Laryngorhinootologie* 2000;79:193.
- (15.) Stieve M, Mojallal H, Battmer RD, Winter M, Lenarz T. Multifrequency tympanometry: experimental application after implantation of ossicular replacement prosthesis in rabbits. *Otol Neurotol* 2007;28:875-877.
- (16.) Stieve M, Schwab B, Winter M, Lenarz T. Titanoxidkeramik als Implantationsmaterial in der Ohrchirurgie: Tierexperimentelle Ergebnisse zur Operationstechnik. *Laryngorhinootologie* 2006;85:635-639.
- (17.) Stieve M, Mojallal H, Winter M, Battmer RD, Lenarz T. Norminative auditory brainstem response - data for hearing threshold in the rabbit. *Audiol Neurotol* 2006;11:310-317.
- (18.) Ryan AF, Ebmeyer J, Furukawa M, Pak K, Melhus A, Wassermann SI, Chung WH. Mouse models of induced otitis media. *Brain Res* 2006;1091:3-8.
- (19.) MacArthur CJ, Trune DR. Mouse models of otitis media. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;14:341-346.
- (20.) Melhus A, Ryan AF. A mouse model for acute otitis media. *APMIS* 2003;111:989-994.
- (21.) Merwin GE, Atkins JS, Wilson J, Hench LL. Comparison of ossicular replacement materials in a mouse ear model. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1982;90:461-469.
- (22.) Wilson J, Atkins JS, Merwin GE, Hench LL. Histopathological evaluation of the interaction between tympanic membrane and implant materials in a mouse ear model. *Transaction of the Annual Meeting of the Society for Biomaterials in conjunction with the Interna* 1985;8:195.
- (23.) Merwin GE, Wilson J, Hench LL. Comparison of homograft and bioglass implants in a mouse ear model. *Transaction of the Annual Meeting of the*

Society for Biomaterials in conjunction with the International Biomaterials Symposium 1984;7:284.

- (24.) Dinkel A, Aicher WK, Warnatz K, Bürki K, Eibel H, Ledermann B. Efficient generation of transgenic BALB/c mice using BALB/c embryonic stem cells. *J Immunol Methods* 1999;223:255-260.
- (25.) Kong L, Gao Y, Cao W, Gong Y, Zhao N, Zhang X. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite / chitosan composite scaffolds. *J Biomed Mater Res* 2005;75A:275-282.
- (26.) Wang X, Ma J, Wang Y, He B. Bone repair in radii and tibias of rabbits with phosphorylated chitosan reinforced calcium phosphate cements. *Biomaterials* 2002;23(21):4167-4176.
- (27.) Kim SB, Kim YJ, Yoon TL, Park SA, Cho IH, Kim EJ, Kim IA, Shin JW. The characteristics of a hydroxyapatite-chitosan-PMMA bone cement. *Biomaterials* 2004;25:5715-5723.
- (28.) Jansen JA, van der Waerden JPCM, van der Lubbe HBM, de Groot K. Tissue response to percutaneous implants in rabbits. *J Biomed Mater Res* 1990;24:296-307.
- (29.) van Blitterswijk CA, Hesselink SC, Grote JJ. The biocompatibility of hydroxyapatite ceramic: A study of retrieved human middle ear implants. *J Biomed Mater Res* 1990;24(4):433-453.
- (30.) Sabokbar A, Pandey R, Diaz J, Quinn JMW, Murray DW, Athanasou NA. Hydroxyapatite particles are capable of inducing osteoclast formation. *J Mater Sci Mater Med* 2001;12:659-664.
- (31.) VandeVord PJ, Matthew HWT, DeSilva SP, Mayton L, Wu B, Wooley PH. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *J Biomed Mater Res* 2002;59(3):585-590.
- (32.) Onishi H, Machida Y. Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials* 1999;20:175-182.
- (33.) Ma J, Wang H, He B, Chen J. A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts. *Biomaterials* 2001;22:331-336.

- (34.) Gristina AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 1987; 237:1588-1595
- (35.) Schwager K. Epithelisierung von Titanprothesen im Mittelohr des Kaninchens. Modellvorstellung zur Mukosaentwicklung. *Laryngorhinootologie* 1998;77:38-42.
- (36.) Schwager K. Titanium and glass-ionomer cement as ossicular replacement materials: biocompatibility results after implantation in the rabbit. *ORL* 1998;60:322-328.
- (37.) Schwager K. Titanium as a biomaterial for ossicular replacement: results after implantation in the middle ear of the rabbit. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1998;255:396-401.
- (38.) Geyer G. Ionomerzement als Knochenersatzmaterial im Mittelohr des Kaninchens. *HNO* 1997;45:222-226.
- (39.) van Blitterswijk CA, Grote JJ. Biocompatibility of clinically applied hydroxylapatite ceramic. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1990;144:3-11.
- (40.) Chung TW, Wang YZ, Huang YY, Pan CI, Wang SS. Poly (ϵ -caprolactone) grafted with nano-structured chitosan enhances growth of human dermal fibroblasts. *Artif Organs* 2006;30(1):35-41.
- (41.) Yuan H, Yang Z, Li Y, Zhang X. Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. *J Mater Sci Mater Med* 1998;9:723-726.
- (42.) Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J Biomed Mater Res* 2000;51:475-483.
- (43.) Giavaresi G, Ambosio L, Battiston GA, Casellato U, Gerbasi R, Finia M, Aldini NN, Martini L, Rimondini L, Giardino R. Histomorphometric, ultrastructural and microhardness evaluation of the osseointegration of a nanostructured titanium oxide coating by metal-organic chemical vapour deposition: an in vivo study. *Biomaterials* 2004;25:5583-5591.
- (44.) Catledge SA, Vohra YK, Bellis SL, Sawyer AA. Mesenchymal stem cell adhesion and spreading on nanostructured biomaterials. *J Nanosci Nanotechnol* 2004;4:986-989.

VIII. Abkürzungen

Al_2O_3	Aluminiumoxid
approx.	approximately
AZ	Aktenzeichen
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
Ca	Calcium
CaO	Calciumoxid
Chi-HA	Chitosan-Hydroxylapatit
D	Dauerimplantate
e.g.	exempli gratia
et al.	et alii
F	Fluor
Fig.	Figure
g	Gramm
h	Stunde
i.e.	id est
kg	Kilogramm
K_2O	Kaliumoxid
μg	Mikrogramm
M	mol
mg	Milligramm
MgO	Magnesiumoxid
ml	Milliliter
mm	Millimeter
M_n	Molmasse
N	Stickstoff
n	Anzahl
Na_2O	Natriumoxid
nm	Nanometer
pH	pondus hydrogenii
PMMA	Polymethylmethacrylat

P_2O_5	Di-Phosphorpentoxid
PORP	partial ossicular replacement prothesis
SiO_2	Siliziumdioxid
TORP	total ossicular replacement prosthesis
wt%	weight percent

IX. Weitere Publikationen im Rahmen dieser Arbeit

1. Poster

Vogt JC, Stieve M, Ehlert N, Lindemeier D, Brandes G, Mojallal H, Lenarz T, Behrens P, Mueller PP. *Murine model for the evaluation of novel ossicular replacement materials*. Jahrestagung 2007 der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V. (DGBM), 22.-24. November 2007 (Biomaterialien 2007; 8: 221)

Vogt JC, Brandes G, Mueller PP, Behrens P, Ehlert N, Nolte I, Lenarz T, Stieve M. *Nanostrukturiertes Bioverit® II als Gehörknöchelchenimplantat - Einsatz im Mausmodell*.

79. Jahresversammlung 2008 der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, 30. April – 4. Mai 2008, Bonn

Ausgezeichnet mit dem 1. Broicher Posterpreis 2008

2. Vortrag

Stieve M, Vogt JC, Brandes G, Nolte I, Lenarz T. *Nanostrukturiertes Bioverit und Chitosan-Hydroxylapatit als Materialien zum Gehörknöchelchenerersatz – Untersuchung der Bioverträglichkeit in der Unterhaut des Kaninchens*.

78. Jahresversammlung 2007 der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, 16.-20. Mai 2007, München

X. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Klinikdirektor Prof. Dr. Thomas Lenarz und besonders bei Herrn Oberarzt Dr. Martin Stieve von der HNO-Klinik an der Medizinischen Hochschule Hannover für die Bereitstellung des interessanten und anspruchsvollen Themas und die Betreuung dieser Dissertation bedanken.

Herrn Direktor der Kleintierklinik an der Tierärztlichen Hochschule Hannover Prof. Dr. Ingo Nolte danke ich für seine engagierte und unkomplizierte Betreuung und Unterstützung.

Frau Dr. Gudrun Brandes aus dem Institut für Zellbiologie im Zentrum Anatomie der Medizinischen Hochschule Hannover danke ich ganz besonders für ihre unermüdliche Unterstützung, denn ohne sie wäre alles sehr viel schwieriger gewesen.

Der gesamten Projektgruppe D1 des Sonderforschungsbereichs 599 danke ich für konstruktive Diskussionen und spannende Zusammenarbeit.

Herrn Peter Erfurt danke ich für hilfreiche Unterstützung im Labor, Beantwortung aller Fragen und geduldiges Ertragen aller meiner „Abers“.

Frau Dr. Gentiana Wenzel danke ich, dass sie sich trotz nicht vorhandener Zeit dennoch Zeit für mich nahm.

Dem ganzen Laborteam danke ich für kollegialen Zusammenhalt und für nützliche Tipps.

Meiner Freundin Amelie Hartrumpf gilt mein Dank insbesondere für das Korrekturlesen der beiden Manuskripte.

Meiner Familie und meinem Freund Carsten Butz danke ich sehr für Unterstützung und Rückhalt in jeglicher Hinsicht.