

Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. med. vet. habil. Ulrike Matis

Angefertigt in der
Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie,
Klinikum rechts der Isar, Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München
Direktor Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. habil. Rüdiger von Eisenhart-Rothe
(Mentor: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. habil. Rainer Burgkart)

**„Einfluss von Oberflächenstrukturierung und Oberflächenbeschichtung bei neuartigen
Verbund-Keramikimplantaten auf die knöcherne Integration am Schafmodell – eine
histomorphologische Untersuchung“**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Von
Ina Maria Leonore Hipp
aus Leoni

München 2012

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Matis
Korreferent/en:	Priv.-Doz. Dr. Maierl

Tag der Promotion: 21. Juli 2012

In großer Liebe und Dankbarkeit gewidmet:

meiner Mama Hannelore und meinen Großeltern Liesl und Rudolf Rast.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
2. Grundlagen	11
2.1 Grundlagen der Implantologie	11
2.1.1 Indikation zum künstlichen Hüftgelenkersatz.....	11
2.2 Implantatmaterialien	12
2.2.1 Werkstoffe	12
2.2.1.1 Titan/Titanium	12
2.2.1.2 Kobalt	12
2.2.1.3 UHMWPE (Ultrahochmolekulargewicht-Polyethylen)	12
2.2.1.4 Keramik	13
2.2.2 Implantatoberflächen bei zementfreien Endoprothesen-Systemen	13
2.2.2.1 Anforderungen an die Oberfläche	13
2.2.2.2 Strukturierung	14
2.2.2.3 Beschichtung	15
2.3 Grundstruktur des Knochengewebes	16
2.3.1 Osteoprogenitorzellen	16
2.3.2 Osteoblasten	17
2.3.3 „bone lining cells“ – Knochenoberflächenzellen	18
2.3.4 Osteozyten	18
2.3.5 Osteoklasten	19
2.4 Ossifikation	20
2.4.1 Primäre, direkte, desmale Ossifikation	20
2.4.2 Sekundäre, indirekte, chondrale Ossifikation	21
2.4.2.1 Perichondrale Ossifikation	22
2.4.2.2 Enchondrale Ossifikation	22
2.5 Osseointegration	22
2.5.1 Wachstumsfaktoren	23
2.5.2 Osteogene Reparatur	24
2.5.2.1 Osteoinduktion	24
2.5.2.2 Osteokonduktion	24
2.5.2.3 Osseointegration	25
2.5.3 Remodelling und Implantateinheilung	25

2.5.3.1 Distanzosteogenese	26
2.5.3.2 Kontaktosteogenese	26
2.5.3.3 Verbundosteogenese	26
2.5.4 Metaplasien, Gewebetransformationen	26
3. Material und Methoden	28
3.1 Implantatmaterialien	28
3.1.1 Monolithische Keramikimplantate	28
3.1.2 Struktur	29
3.1.3 Beschichtung	30
3.1.3.1 RGD-Peptide	30
3.1.3.2 Hydroxylapatit	31
3.1.3.3 Plasma	31
3.1.4 Überblick über die in der Arbeit verwendeten Testimplantate	32
3.2 Tierexperiment	32
3.2.1 Versuchstiere	32
3.2.2 Tierversuchsgenehmigung	33
3.2.3 Tierhaltung	33
3.2.4 Tiergruppen	33
3.2.5 Tiermodell	34
3.2.6 Operationsmodell	34
3.2.7 Blutabnahmen	38
3.2.8 Sektion der Tiere	38
3.2.9 Einzelschafdokumentation	39
3.3 Auswertung	40
3.3.1 Biomechanische Auswertung	40
3.3.2 μ CT-Untersuchungen	40
3.3.3 Histologische Auswertung	41
3.3.3.1 Präparation der Proben	41
3.3.3.2 Bildbearbeitung	45
3.3.3.3 Score zur histologischen Auswertung	48
3.3.4 Softwaregestützte Auswertung	51
3.3.4.1 Bildbearbeitung und Auswertung	51
4. Ergebnisse	52
4.1 Biomechanische Ergebnisse	52

4.2 Histologische Ergebnisse	55
4.2.1 4-Wochen-Gruppe	64
4.2.1.1 Anzahl der Osteoblasten mit Implantatkontakt und Anzahl der ossären Trabekel, Spongiosa	64
4.2.1.2 Ossäre Nekrosen und Nachbildung der Implantatoberfläche	64
4.2.2 12-Wochen-Gruppe	66
4.2.2.1. Anzahl der Osteoblasten mit Implantatkontakt und Anzahl der ossären Trabekel, Spongiosa	66
4.2.2.2 Ossäre Nekrosen und Nachbildung der Implantatoberfläche	66
4.3 Softwaregestützte Messungen	67
4.3.1 Knochendichte (Bone)	68
4.3.1.1 Unstrukturierte Probekörper	68
4.3.1.2 Strukturierte Probekörper	69
4.3.1.3 Struktur und RGD-Peptide	69
4.3.1.4 Struktur und Hydroxylapatit	70
4.3.1.5 Struktur und Plasma	71
4.3.1.6 Vergleich aller Probekörper in der 4-Wochen-Gruppe	72
4.3.1.7 Vergleich aller Probekörper in der 12-Wochen-Gruppe	73
4.3.2 Knochen-Implantat-Kontakt (BIC)	75
4.3.2.1 Unstrukturierte Probekörper	75
4.3.2.2 Strukturierte Probekörper	76
4.3.2.3 Struktur und RGD-Peptide	76
4.3.2.4 Struktur und Hydroxylapatit	77
4.3.2.5 Struktur und Plasma	78
4.3.2.6 Vergleich aller Probekörper in der 4-Wochen-Gruppe	79
4.3.2.7 Vergleich aller Probekörper in der 12-Wochen-Gruppe	80
5. Diskussion	82
5.1 Versuchsmodell	83
5.2 Histomorphometrische Auswertungen	86
5.2.1 Lichtmikroskopische Auswertung der Probekörper-Präparate	86
5.2.2 Beurteilung der Osseointegration	87
5.2.2.1 4-Wochen-Gruppe: Unstrukturierte und strukturierte Probekörper	87

5.2.2.2 4-Wochen-Gruppe: Strukturierte und beschichtete Probekörper	88
5.2.2.3 4-Wochen-Gruppe: Zusammenfassung	88
5.2.2.4 12-Wochen-Gruppe: Unstrukturierte und strukturierte Probekörper	89
5.2.2.5 12-Wochen-Gruppe: Strukturierte und beschichtete Probekörper	90
5.2.2.6 12-Wochen-Gruppe: Zusammenfassung	90
5.3 Software-gestützte Auswertungen	92
5.3.1 Knochendichte (Bone)	92
5.3.1.1 4-Wochen-Gruppe: Unstrukturierte und strukturierte Probekörper	92
5.3.1.2 4-Wochen-Gruppe: Strukturierte und beschichtete Probekörper	93
5.3.1.3 12-Wochen-Gruppe: Unstrukturierte und strukturierte Probekörper	93
5.3.1.4 12-Wochen-Gruppe: Strukturierte und beschichtete Probekörper	94
5.3.2 Knochen-Implantat-Kontakt (BIC)	94
5.3.2.1 4-Wochen-Gruppe: Unstrukturierte und strukturierte Probekörper	94
5.3.2.2 4-Wochen-Gruppe: Strukturierte und beschichtete Probekörper	94
5.3.2.3 12-Wochen-Gruppe: Unstrukturierte und strukturierte Probekörper	95
5.3.2.4 12-Wochen-Gruppe: Strukturierte und beschichtete Probekörper	95
5.4 Literaturvergleich	96
5.5 Limitationen	101
5.6 Ausblick	101
6. Zusammenfassung	103
7. Summary	105
8. Abkürzungsverzeichnis	107
9. Abbildungsverzeichnis	109

10. Tabellenverzeichnis	114
11. Literaturverzeichnis	115
12. Danksagung	128

1. Einleitung

Ziel des durch EU-Mittel geförderten Projekts, innerhalb dessen die vorliegende Dissertation entstanden ist, ist die Konzeptionierung, Grundlagenentwicklung und Validierung bzw. Prüfung eines neuartigen dünnwandigen, monolithischen Keramikimplantatsystems mit einer innovativen osteoinduktiv beschichtbaren Oberflächenstrukturierung für die Anwendung in der Endoprothetik. Der in dieser Dissertation zur Anzeige gebrachte Tierversuch ist Bestandteil des wissenschaftlichen Verbundprojekts „Direct To Bone“, das vom Bayerischen Staatsministerium für Wirtschaft, Infrastruktur, Verkehr und Technologie im Rahmen des Programms „Neue Werkstoffe“ für insgesamt drei Jahre gefördert wird.

Neben einer Darstellung der technischen Entwicklung von neuen Verfahrensweisen in der medizinischen Keramikherstellung und den damit in Verbindung stehenden biomechanischen Materialprüfungen sollen die Untersuchungen und Auswertungen dieser Promotionsarbeit vor allem die biologische Aktivität bzw. den ossären Effekt von Verbundkeramikimplantaten für die Anwendung in der Humanmedizin am Tiermodell evaluieren. Der Tierversuch verfolgt durch ein In-Vivo-Modell an Schafen die Zielsetzung, die Wirksamkeit und Biokompatibilität einer neu entwickelten Beschichtungstechnologie im zeitlichen Verlauf zu belegen. Er dient damit der Erarbeitung von Zulassungsdokumenten für die Beantragung der industriellen Erzeugung von bioaktiv beschichteten Oberflächenstrukturierungen auf monolithischen Keramikimplantaten für die Anwendung in der modernen Implantologie am Menschen.

Die Versuche erfolgen nach EN 30993/1 entsprechend dem Medizinproduktegesetz. Das im Rahmen dieser Arbeit präferierte Schafmodell erlaubt im Gegensatz zum Rattenmodell eine bessere biomechanische und schließlich genauere histologische Überprüfbarkeit nach Euthanasie der Tiere. Vergleichbare Versuche an Hundepatienten sind im EU-Wissenschaftsraum ethisch nicht vertretbar. Geprüft werden sollen Keramikimplantate aus dem in der Gelenkendoprothetik bisher bewährten Grundmaterial $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-ZrO}_2$, die mit einer neu entwickelten Oberflächenstrukturierung versehen sind. Für die Untersuchungen dieser Arbeit stehen unstrukturierte und strukturierte Keramikprüfkörper zur Verfügung. Des Weiteren soll die Bedeutung einer zur Strukturierung zusätzlich aufgetragenen bioaktiven Oberflächenbeschichtung aus RGD-Peptiden, Hydroxylapatit und Plasma erörtert werden. In der

Evaluierungsphase der vorliegenden Dissertation soll schließlich geklärt werden, ob eine Beschleunigung der gelungenen knöchernen Integration, ein größeres Ausmaß und ein biomechanisch kompetenterer Knochen im Vergleich zwischen unstrukturierten und strukturierten bzw. unbeschichteten und beschichteten Implantaten zu erzielen ist. Das Ausmaß der Beeinflussung der knöchernen Integration des Implantats soll mit den histologisch auszuwertenden Parametern Osteoblastenzahl, Bildung von stabil-ossären Trabekeln, Vorkommen von ossären Nekrosen und Nachbildung der Implantatoberfläche evaluiert und differenziert werden. Die Beurteilung dieser Parameter soll im Rahmen der vorliegenden Dissertation in einer ersten Evaluierungsphase insbesondere histologisch und in einer folgenden zweiten Evaluierungsphase softwaregestützt erfolgen. Abschließend soll geklärt werden, ob und inwieweit Strukturierung und Beschichtung bzw. die Kombination beider Oberflächenmodifikationen eines Keramikimplantats in der ersten Heilphase direkt im Anschluss an die Implantation oder in der Spätheilphase Einfluss auf die ossäre Integration des Implantatkörpers nehmen können.

2. Grundlagen

2.1 Grundlagen der Implantologie

2.1.1 Indikation zum künstlichen Hüftgelenkersatz

Als Indikation für eine Totalplastik des Hüftgelenkes gelten therapieresistente, fortgeschrittene, primäre oder sekundäre Arthrosen des Erwachsenen (Hipp et al. 2003). Diehl et al. (2010) sehen die typische Indikation zum künstlichen Hüftgelenkersatz analog in therapieresistenten, fortgeschrittenen primären oder sekundären Coxarthrosen mit schmerzhafter Funktionseinschränkung und entsprechendem Leidensdruck. Dabei wird beim Menschen die radiologische Stadieneinteilung nach Kellgren und Lawrence (1957) zugrunde gelegt. Des Weiteren stellen fortgeschrittene Nekrosen des Hüftkopfs mit Resistenz gegenüber konservativen Heilmethoden eine Indikation dar. Medizinischen Anlass zur Gelenkendoprothetik geben des Weiteren Schenkelhalsfrakturen, die osteosynthetisch nur mangelhaft versorgt werden konnten, und Schenkelhalsfrakturen in Verbindung mit Osteoporose sowie Tumoren und Metastasierungen im Bereich des Femurs. Die Symptomatik, das Alter, der Gesundheitsstatus des zu behandelnden Patienten und insbesondere der individuelle Leidensdruck müssen bei der Indikationsstellung ebenfalls Beachtung finden.

Der künstliche Hüftgelenkersatz unterliegt aufgrund des großen implantierten Fremdkörpers einem beachtenswerten Infektionsrisiko zwischen 0,5 und 2 % der Fälle (Geipel et al. 2004). Absolute oder relative Kontraindikationen sind deshalb vornehmlich Situationen, in denen von einer zusätzlichen Zunahme des Infektionsrisikos auszugehen ist. Dazu gehören floride Infektionen (auch fernab vom OP-Gebiet), chronische Infektionen im OP-Gebiet, zytostatische Behandlungen oder die hochdosierte Kortikosteroidtherapie als relative Kontraindikationen und ein reduzierter Allgemeinzustand (Diehl et al. 2010). Das größte Augenmerk liegt nach der getroffenen Entscheidung zur Endoprothetik auf der Auswahl des Prothesentyps und der Art der Verankerung. In den letzten Jahren befindet sich der Einsatz von zementlosen Prothesen deutlich auf dem Vormarsch. Relevant für eine erfolgreiche zementlose Implantation sind die biologische und biomechanische Kompetenz des Knochenlagers, das Material der Prothese, das Implantatdesign und die Gestaltung der Implantatoberfläche.

2.2 Implantatmaterialien

2.2.1 Werkstoffe

2.2.1.1 Titan/Titanium

Das Metall Titanium zeigt aufgrund seiner chemisch-katalytisch induzierten selbstbildenden Oxidschicht weitestgehend Korrosionsbeständigkeit (Effenberger 2004). In legierter Form verhält es sich duktil. Im Rahmen der Endoprothetik finden Titan-Aluminium-Vanadium ($TiAl_6V_4$), Titan-Aluminium-Eisen ($TiAl_{1,5}Fe_{2,5}$) und insbesondere die Legierung Titan-Aluminium-Niob ($TiAl_6Nb_7$) Anwendung. Als Gleitpartner an der Gelenkoberfläche ist Titan allerdings weitestgehend ungeeignet und wird in der Regel entsprechend durch Aluminiumoxidkeramik oder Kobalt-Chrom-Molybdän-Legierungen ergänzt. Seine Biokompatibilität macht Titanium sowohl in der allgemeinen Chirurgie als auch in der Zahnmedizin erfolgreich einsetzbar. Jedoch kann es im Fall von Abrieb- und Verschleißvorgängen aufgrund der erhöhten Titan-Konzentration zu Osteolysen und aseptischen Lockerungen kommen (Lichtinger et al. 2000.)

2.2.1.2 Kobalt

Kobalt ist ein Element der Übergangsmetallgruppe und ist verschleiß- und korrosionsbeständig. Es ist um das Zweifache steifer als Titan (Effenberger 2004). In organischer Form kann Kobalt bisher ausschließlich in der Corrinringstruktur des Cobalamin Vitamin B₁₂ nachgewiesen werden. Kobalt in der Implantationschirurgie steht chemisch-organisch abgesättigt in unterschiedlichen Legierungen zur Verfügung.

2.2.1.3 UHMWPE (Ultrahochmolekulargewicht-Polyethylen)

UHMWPE besitzt längere Kettenmoleküle als herkömmliches Polyethylen. Gegenüber dem herkömmlichen Polyethylen zeichnet sich UHMW-Polyethylen durch Zunahme der Steifigkeit, Härte und den verbesserten Abriebwiderstand aus. Dennoch bleibt der Materialabrieb von UHMWPE-Implantaten hoch, der Alterungsgrad des Materials ist ungünstig und im zeitlichen Verlauf zeigt sich eine spröde Materialentwicklung (Effenberger 2004).

2.2.1.4 Keramik

Implantate aus Keramik finden bereits seit den 1970er-Jahren unterschiedliche klinische Anwendung (Heimke und Griss 1980). Keramikimplantate können molekular-chemisch in unterschiedliche Komplexe gegliedert werden. Die einzelnen Vertreter zeigen zum Teil erhebliche Stabilitätsunterschiede, die ihren chirurgischen Gebrauch einerseits indizieren, aber auch ausschließen können. Zirkonoxidkeramik (ZrO_2) wurde als Prothesenmaterial Mitte der 1980er-Jahre eingeführt und in der Folge durch Yttriumoxid ersetzt, welches im Gegensatz zum keramischen Zirkonoxid ein feineres Materialgefüge und größere Bruchzähigkeit aufweist (Effenberger et al. 2004). Allerdings resultiert aus der Anwendung von Yttriumoxid vermehrt eine reibungsbedingte Temperaturerhöhung und somit das Auslösen von Material aus dem Keramikverbund und in der Folge unerwünschtes Bruchgeschehen. Andere metallische Keramikverbindungen wie die aluminiumoxidische Keramik zeigen ebenfalls stabile Materialhärte und chemische Indifferenz. Bei Auftreten von Zug- oder Biegebungsbeanspruchung zusätzlich zu Druckbelastungskräften innerhalb des Implantats neigt diese Keramik aufgrund ihrer Sprödigkeit ungünstigerweise zum Stabilitätsverlust durch Materialfraktur.

Eine Weiterentwicklung der Al_2O_3 - und der Zirkonoxid-Keramik führte zu einer Verbundkeramik, dem sogenannten AMC (Alumina-Matrix-Verbundwerkstoff). Diese bioinerte AMC-Keramik zeichnet sich im Gegensatz zu den beschriebenen Keramiken dadurch aus, dass sie über höhere Bruchfestigkeit, Bruchzähigkeit und Biegefestigkeit verfügt bei ähnlichen tribologischen Eigenschaften (Kaddick und Pfaff 2000 und 2002; Willmann et al. 2000; Pfaff und Rack 2000). Die Alumina-Matrix-Composite-Keramik setzt sich wie folgt zusammen: Al_2O_3 75%, Zr_2O_3 23%, Y_2O_3 1%, Cr_2O_3 0,3%, SrO 0,7% (Schreiner et al. 2009).

2.2.2 Implantatoberflächen bei zementfreien Endoprothesen-Systemen

2.2.2.1 Anforderungen an die Oberfläche

Um eine optimale, erfolgreiche und schließlich dauerhafte Osseointegration in ein Implantat zu gewährleisten, sind unterschiedliche Anforderungen an die Implantatoberfläche zu stellen: Form, Korrosionsbeständigkeit, mechanische Festigkeit, Oberflächendesign, Bioverträglichkeit und schließlich die Beschichtung der Oberfläche (Gradinger und Gollwitzer 2006). Osborne unterteilt 1987 endoprothetische Werkstoffe in drei – zum Teil wenig differenzierte – Werkstofftypen: Biotolerante Werkstoffe: Reaktion des umliegenden Knochengewebes in Form von Distanz-

osteogenese mit Bildung einer kapselartigen Bindegewebsschicht. Bioinerte Werkstoffe: Reaktion des umliegenden Knochengewebes in Form von Kontaktosteogenese, direktes Einheilen des Knochengewebes vom Implantatlager aus in das Implantat. Bioaktive Werkstoffe: Reaktion des umliegenden Knochengewebes in Form von Kontaktosteogenese, implantatnahes, direktes Einheilen des Knochengewebes in das Implantat.

Wintermantel et al. (2008) beschreibt den Einsatz von biokompatiblen Werkstoffen wie folgt: Die Reaktion von biotoleranten Werkstoffen mit dem umliegenden Knochengewebe erfolgt durch Distanzosteogenese, d.h. das Implantat wird mit einer Bindegewebsschicht umkapselt. Bioinerte Werkstoffe rufen eine Kontaktosteogenese hervor, bei der kein Bindegewebe gebildet wird, d.h. das Knochengewebe entsteht in unmittelbarer Umgebung des Implantats. Das Knochenwachstum erfolgt in Richtung Implantatoberfläche. Bei bioaktiven Werkstoffen dagegen erfolgt eine Verbundosteogenese, bei der die Knochenbildung an der Implantatoberfläche beginnt und das Wachstum zum Empfängergewebe gerichtet ist.

2.2.2.2 Strukturierung

Bereits seit den 1960er-Jahren zeigten sich deutliche Tendenzen, im Rahmen der Hüftendoprothetik dazu überzugehen, die Implantatoberflächen von zementfreien Endoprothesen zum Zwecke einer wirkungsvolleren Osseointegration zu gestalten (Gradinger und Gollwitzer 2006; Diehl et al. 2010). McKee beschreibt 1966 zunächst die Anwendung von gewindeähnlichen Strukturen, ebenso Sivash 1969. Judet (1975) nutzte Implantate mit kraterförmigen Vertiefungen und Galante (1971) stellte das Fiber-Mesh-Verfahren – eine Mikro-3D-Raumstruktur – vor. In Deutschland wurde 1974 erstmals das Tragrippen-Design von Mittelmeier vorgestellt. Nachteilig an diesen Designentwicklungen war eine nur bedingt kraftschlüssige Verankerung des Implantats im Knochenlager durch Ausbildung einer bindegewebigen Schicht im Interface. Die Folge waren Implantatlockerung und Instabilität bei hoher Belastung (Gradinger und Gollwitzer 2006). 1978 verwendete Lord erstmals Implantate mit aufgesinterten Kugelelementen, welche sich jedoch bei hoher Belastung wieder vom Untergrund ablösten.

Henßge (1985) und Wetzel (2001) beschrieben die Anwendung von Implantaten mit dreidimensionaler Raumstruktur, dem Spongiosa Metal[®] I, welches in der Folge zum Spongiosa Metal[®] II weiterentwickelt wurde. Dieses bietet dem Knochengewebe die Möglichkeit, in das Implantat „hineinzuwachsen“, und erlaubt ebenso eine ausreichende vaskuläre Versorgung des

Gewebes. Im Rahmen der Herstellung von metallischen Implantaten geht die aktuelle Chirurgie in jüngster Zeit dazu über, die Oberflächen mit Poren zu versehen (Tabelle 1), um eine optimale Osseointegration zu erzielen (Schwarz et al. 2008). Bobyne et al. (1980), Engh et al. (1985) und Harris et al. (1985) schreiben, im Sinne einer tragfähigen Osseointegration, der Porengröße von Implantaten ebenso eine außerordentliche Relevanz zu. Masuda et al. (1998) sehen die Oberflächenstruktur eines Implantates als maßgebend für die Einheilung an. Effenberger et al. (2004) befinden interkonnektierende Oberflächen mit einer Porengröße von 100–500 µm als ideal für die Förderung der knöchernen Integration.

Tabelle 1: Reaktion des Knochenlagers auf Porosität und Porengröße von Implantatoberflächen (modifiziert nach Gradinger und Gollwitzer 2006).

Porengröße µm	Reaktion Knochenlager
< 50	bindegewebige Fixation
50–500	Knochenintegration
250	rechnerisches Optimum für Knochenintegration
Porosität (%)	
40–65	Optimum für Knochenintegration

2.2.2.3 Beschichtung

In der aktuellen Endoprothetik werden heute verschiedene Oberflächenbeschichtungen eingesetzt (Schwarz et al. 2008). Grundsätzlich werden nach Gradinger und Gollwitzer (2006) drei Auftragsverfahren zur Modifikation der Oberflächenbeschichtung unterschieden:

1. Physikalische und chemische Hochvakuum-Beschichtungsverfahren
 - PVD = Physical Vacuum Deposition
 - CVD = Chemical Vacuum Deposition
 - IAD = Ion-Assisted Deposition
 - PECVD = Plasma-Enhanced Chemical Vapour Deposition
2. Nasschemische Auftrags- und Oxidationsverfahren (z.B. elektrochemische Plasmaoxidation, Sol-Gel-Verfahren)
3. Klassische Pulverauftragsverfahren

Eine der Möglichkeiten der Oberflächenbeschichtung ist die Anwendung von bioaktiven Materialien zur lokalen Wirkstoff-Aufbringung wie beispielsweise Hydroxylapatit und Kalziumphosphat. Hydroxylapatit oder Kalziumphosphat sorgen für eine verbesserte Implantateinheilung, d.h. eine beschleunigte Osseointegration mit gesteuerter Resorption (Ducheyne et al. 1980; Soballe et al. 1993; Schmidmaier et al. 2002b). Die Tripeptid-Verbindungen RGD-Peptide (Arg-Gly-Asp) vermitteln eine bessere Zelladhäsion (Shin et al. 2003). Über eine verbesserte Knocheneinheilung bestehen in der Literatur unterschiedlich positive Auffassungen (Kantlehner et al. 2000; Schliephake et al. 2002; Elmengaard et al. 2005). Elmengard et al. (2005) konnten eine deutlich verbesserte Einheilung von mit RGD-Peptiden beschichteten Titaniumimplantaten im Hundemodell nachweisen.

Ebenso wie die erstgenannten Beschichtungen sorgt Kollagen nach dem Prinzip der Osseokonduktion für eine verbesserte Osseointegration, also ein verbessertes Anwachsen von Zellen an die Implantatoberfläche (Rammelt et al. 2004). Santos et al. (2003) beschreibt die Anwendung von Niederdruckplasma als Oberflächenaktivierung, mit der eine bessere Benetzbarkeit und somit ein verbessertes Einwachsverhalten von Osteoblasten erzielt werden konnte. Ferner besteht die Möglichkeit der Applikation von Wachstumsfaktoren, die für eine Beschleunigung des ossären Heilungsprozesses sorgen sollen (Schmidmaier et al. 2001/2002a; Raschke et al. 2002; Schmidmaier et al. 2003).

2.3 Grundstruktur des Knochengewebes

2.3.1 Osteoprogenitorzellen

Mesenchymale Stammzellen differenzieren embryonal und postfetal zu Osteoprogenitorzellen aus (Welsch 2009). Diese teilungsaktiven Vorläuferzellen der Präosteoblasten- und Osteoblastenreihe werden auch bei einem Frakturgeschehen aktiv. Nach Hees und Sinowatz (2000) sind sie von spindelförmiger Gestalt, verfügen über helles Zytoplasma und ovale bis längliche Zellkerne. Im adulten Zustand des Organismus sind sie in Endost und Periost lokalisiert. Nach Welsch (2009) sind Osteoprogenitorzellen auch noch im adulten Organismus aufzufinden.

2.3.2 Osteoblasten

Anatomisch-histologische Vorläuferzellen der Osteoblasten sind im gesunden menschlichen und tierischen Organismus die Osteoprogenitorzellen (Hees und Sinowatz 2000; Welsch 2009). Dieses Vorläuferzellgewebe stammt von mesenchymalen Stammzellen ab, die sich im somitischen Mesoderm durch gewebsinduktive Leistungen ausdifferenzieren. Osteoprogenitorzellen und die daraus gereiften Osteoblasten reagieren beide gleichermaßen histologisch basophil, besitzen glattes und raues endoplasmatisches Retikulum, einen funktionsfähigen Golgi-Apparat und eine Vielzahl von Mitochondrien. Typische Durchmesser der Osteoblasten liegen bei 20–30 μm (Hees und Sinowatz 2000). Osteoblasten besitzen eine epithelähnliche Anordnung und sind untereinander über Nexus-Kontakte verbunden. Osteoblasten sind histologisch die verantwortlichen Zellen für die Bildung der Knochenmatrix in Form von Kollagen Typ I, Proteoglykanen, Osteokalzin, Osteonektin und Osteopontin. Ebenso scheiden sie interstitiell Wachstumsfaktoren, Hormone, Vitamine und Zytokine aus. Die so gebildete Matrix ist noch nicht kalzifiziert und wird als Osteoid bezeichnet. Osteoblasten sind durch eine eigene spezifische Rezeptoroberfläche ansprechbar durch endokrine Signale und Gewebshormone der Zytokin-Reihe. Osteoblasten zeigen Apoptoseaktivität, differenzieren sich zu Osteozyten und sogenannten „bone lining cells“ aus oder wandern ins bereits gebildete Knochengrundgewebe ein (Abbildung 1).

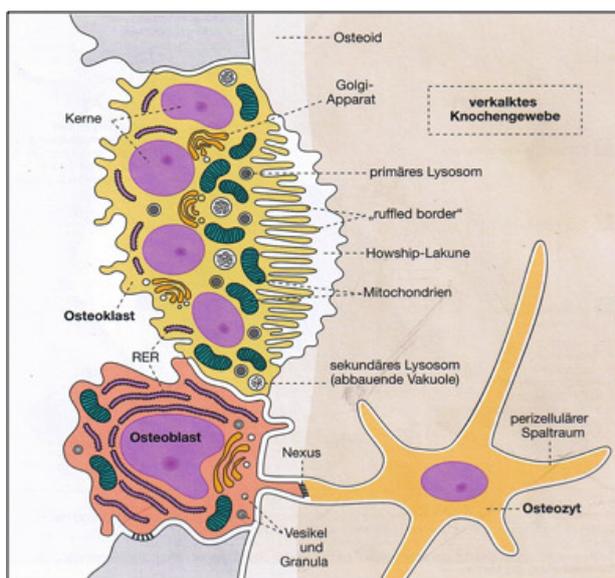


Abbildung 1: Schematische Darstellung von Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten (Welsch 2009).

2.3.3 „bone lining cells“ – Knochenoberflächenzellen

Dieser Zelltyp liegt der Knochenoberfläche auf und findet sich z. B. in den vertikal verlaufenden Havers-Kanälen an der Grenze zu den verkalkten Knochenlamellen (Hees und Sinowatz 2000; Welsch 2009). Die Zellen des „bone lining“-Zelltyps sind langgestreckt, abgeflacht und verfügen über diverse weit ausladende Zytoplasma-Ausläufer. Über diese Ausläufer stehen „bone lining cells“ innerhalb des Osteons mit Osteozyten in direktem Kontakt. Hees und Sinowatz (2000) zufolge übernehmen „bone lining cells“ die Funktion einer Barriere für Ionen zwischen der lakunären und kanalikulären Flüssigkeit, welche die Osteozyten umspült, und der Extrazellulärflüssigkeit außerhalb des Knochens. Ihre Aufgabe darf als Schrankenfunktion verstanden werden: Diese Zellspezies übernimmt vermutlich die Regulation des Kalzium- und Phosphatflusses aus und in die Knochenmatrix. Die „bone lining cells“ sind am Abbau der Knochenmatrix beteiligt – unter Einwirkung von Parathormon exprimieren sie Enzymsysteme, die die Osteoidschicht auflösen und somit Anlagerungsmöglichkeiten für nachfolgende Osteoklasten schaffen (Welsch 2009). Erst nach initialer katabolischer Wirkung der „bone lining cells“ sind Osteoklasten in der Lage, mit dem Abbau von verkalkter Matrix zu beginnen. „bone lining cells“ verfügen über eine Bindungsstelle für Parathormon, das über Enzyymbildung die Osteoklastenaktivität stimuliert (Linß und Fanghänel 1998).

2.3.4 Osteozyten

Hees und Sinowatz (2000) beschreiben diesen Zelltyp als die dominierende Zellart im ausgereiften Lamellenknochen. Welsch (2009) bezeichnet sie als in Lakunen der Matrix eingelagerte, morphologisch veränderte Osteoblasten. Osteozyten sind histologisch innerhalb von Matrixlakunen topografiert und von mandelförmiger Gestalt (Abbildung 2). Sie besitzen zahlreiche Fortsätze, die genutzt werden, um Verbindung mit anderen Osteozyten, Osteoblasten und „bone lining cells“ aufzunehmen. Über diese Verbindungen (Nexus) erfolgt der Austausch von Elektrolyten, Substraten und Metaboliten zwischen der Matrixoberfläche und den Osteonen. Osteozyten wird eine Rolle beim Umbau der Matrix und bei Reparationsarbeiten zugeschrieben. Die Osteozytenpopulation macht Knochengewebe zu einer vitalen und reaktiven Substanz. Osteozyten reagieren durch Umbau- und Adaptationsleistungen auf verschiedene Beanspruchungsgrade, die Wirkung auf den Knochen zeigen.

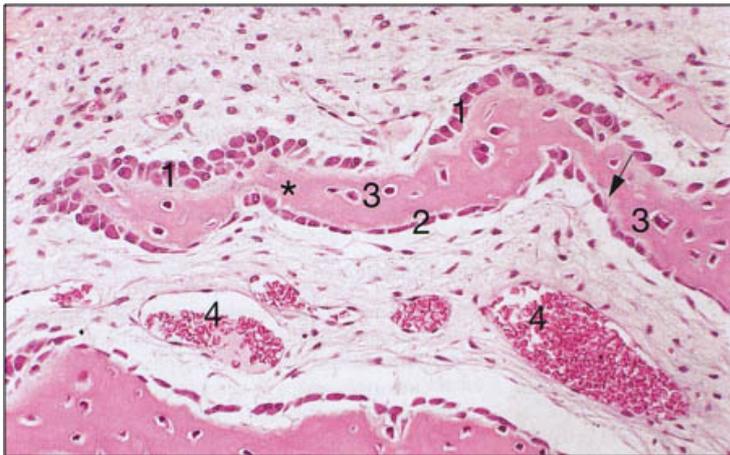


Abbildung 2: Knochenzellen in der frühen Phase der direkten Knochenbildung. (*) Knochenbälkchen, (1) aktive Osteoblasten, (2) wenig aktive Osteoblasten, (3) Osteozyten, (→) Osteoidsaum, (4) dünnwandige venöse Gefäße. Färbung: H.E. Vergrößerung: 250fach (Welsch 2009)

2.3.5 Osteoklasten

Osteoklasten stammen von hämatopoetischen Stammzellen der Granulozyten-Monozyten-Reihe ab (McGavin und Zachery 2009). Hees und Sinowatz (2000) geben ihre Entstehung als eine Fusion aus Monozyten an. Sie sind mit bis zu ca. 150 µm sehr große, mehr- bis vielkernige Zellen: Es können in einzelnen Osteoklasten bis über 100 Kerne gezählt werden (Welsch 2009). Sie verfügen über einen Bürstensaum („ruffled border“), der ihnen die Anlagerung am Knochen ermöglicht (Abbildung 3). Sie liegen in flachen Howship-Lakunen an der Knochenoberfläche, in welchen ein – durch das Einfließen von Protonen – saures Milieu herrscht, wodurch die Knochenresorption erfolgen kann.

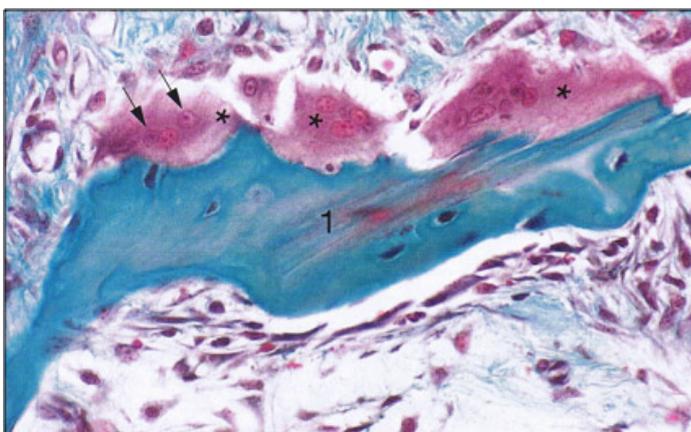


Abbildung 3: Osteoklasten (*) an der Oberfläche eines Knochenbälkchens (1), (→) Osteoklasten mit unterschiedlicher Anzahl an Kernen. An der Grenze zum Knochenbälkchen ist bei den beiden linken Osteoklasten ein Faltensaum („ruffled border“) erkennbar. Färbung: Goldner. Vergrößerung: 460fach (Welsch 2009)

2.4 Ossifikation

2.4.1 Primäre, direkte, desmale Ossifikation

Beim Vorgang der direkten Ossifikation (Abbildung 4) differenzieren sich mesenchymale Vorläuferzellen in sogenannten Ossifikationspunkten direkt zu Osteoblasten (Welsch 2009). Diese konzentrieren sich wiederum zu flächigen Verbänden und sezernieren Osteoid (Glycoproteine, Kollagen Typ I und Proteoglycane) – es entsteht ein feines Netzwerk aus Knochenbälkchen. Durch Einlagerung von anorganischen Knochenbestandteilen wie Kalziumphosphat (85–90%), Kalziumkarbonat (8–10%), Magnesiumphosphat (1,5%) und Kalziumfluorid (0,3%) über das Blutgefäßsystem in das Osteoid wird der Knochen mineralisiert. Aus unverkalktem Osteoid entsteht auf diese Weise das verkalkte Ossein (König und Liebich 2011). Im weiteren Verlauf wird Kalziumphosphat in Form von Hydroxylapatit ausgefällt und es kommt anschließend zur Verknöcherung der Matrix. Der so entstandene – unreife – Knochen wird als Geflechtknochen bezeichnet. Welsch (2009) beschreibt diesen Geflechtknochen als dreidimensionales Netzwerk aus Knochenbälkchen, in dem Kollagen ungeordnet verteilt vorliegt. Im histologischen Schnitt ist dieses Gewebe als Geflecht anastomosierender Knochenbälkchen zu erkennen (Welsch 2009).

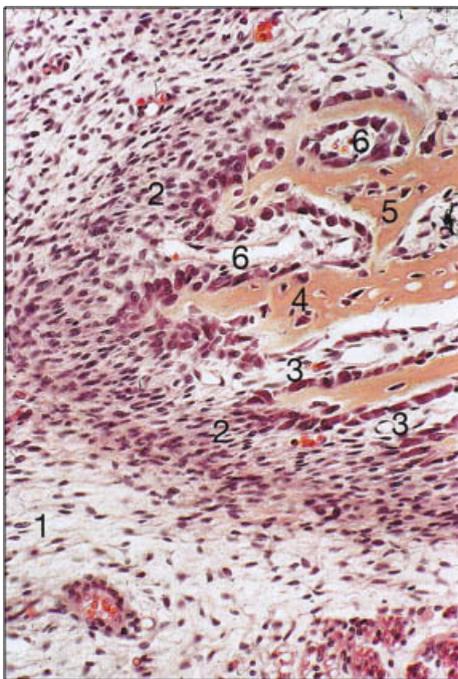


Abbildung 4: Desmale Ossifikation; (1) Mesenchymzellen, (2) Osteoprogenitorzellen, (3) Osteoblasten, (4) Osteozyten, (5) Knochenbälkchen, (6) Blutgefäße. Färbung: H.E. Vergrößerung: 250fach (Welsch 2009).

Zwischen den Knochenbälkchen befindet sich primäres Knochenmark, das durch Gefäße versorgt wird und später zu sekundärem, blutzellbildendem Knochenmark ausdifferenziert. Im Geflechtknochen finden andauernde Um- und Abbauprozesse statt – es finden sich Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten – mit dem Ziel der Differenzierung zum reifen und stabilen Lamellenknochen. Primäre Ossifikationsprozesse finden sich in der Klavikula, insbesondere des Menschen, und in den Ossa plana des Schädels von Mensch und Tier.

2.4.2 Sekundäre, indirekte, chondrale Ossifikation

Sekundäre Ossifikationsvorgänge sind typisch für die Verknöcherung von Röhrenknochen (Welsch 2009; König und Liebich 2011). Diese werden embryonal in einem ersten Schritt knorpelig angelegt. In einem darauffolgenden komplexen Vorgang wird der flexible Knorpel abgebaut und durch stabiles Knochengewebe ersetzt (Abbildung 5). Diese Form der Knochenbildung wird in zwei Schritte unterschieden: 1. perichondrale Ossifikation und 2. enchondrale Ossifikation.

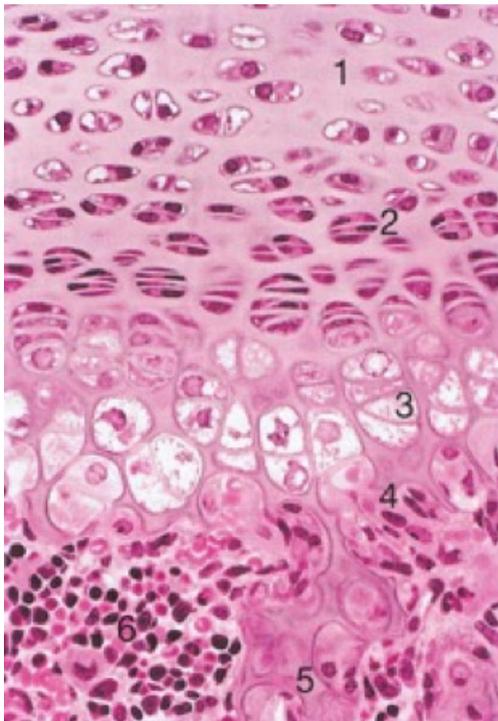


Abbildung 5: Chondrale Ossifikation; (1) fetaler hyaliner Knorpel, (2) Säulenknorpel, (3) Blasenknorpel, (4) Eröffnungszone, (5) Knochenbälkchen mit Kern aus verkalktem Knorpel, (6) blutzellenbildendes Knochenmark. Färbung: H.E. Vergrößerung: 80fach (Welsch 2009).

2.4.2.1 Perichondrale Ossifikation

Um die Diaphyse eines knorpeligen Vorläufers eines Röhrenknochens bildet sich durch direkte Ossifikation zunächst eine Knochenmanschette, die in der Länge zunimmt und dem „Vorläuferknochen“ Halt gibt (Welsch 2009). König und Liebich (2011) bezeichnen diese Manschette als Knochenmantel, der den Stoffwechsel des hyalinen Knorpels hemmt. Die von der Knochenmanschette umgebenen Knorpelzellen hypertrophieren und werden zur Blasenknorpel-/Säulenknorpel-Zone umgesetzt. Das Erscheinen dieser Blasenknorpelzellen initiiert die endgültige Verkalkung der Matrix in ihrer Umgebung, die Blasenknorpelzellen gehen schließlich physiologischerweise unter.

2.4.2.2 Enchondrale Ossifikation

Im weiteren Verlauf sprossen Blutgefäße in die verkalkte Blasenknorpelmatrix ein, die den Chondroklasten (knorpelabbauende Zellen) den Weg bereiten (Welsch 2009; König und Liebich 2011). Diese Chondroklasten lagern sich zusammen, verschmelzen und bilden auf diese Weise Hohlräume, die dann von weiteren Gefäßen durchzogen und von mesenchymalen Zellen besiedelt werden. Durch die Vaskularisation des Gewebes treten auch Osteoprogenitorzellen in die Wachstumszone ein, die im Anschluss wiederum zu Osteoblasten ausdifferenzieren. Die Osteoblasten lagern sich zusammen und scheiden das sogenannte Osteoid ab, das verkalkt und zum unreifen Geflechtknochen wird. Die enchondrale Ossifikation der Epiphysen erfolgt erst zu einem deutlich späteren Zeitpunkt, verläuft aber nach einem ähnlichen Schema wie die Ossifikation der Diaphyse. In der Mitte der Diaphyse entsteht schließlich ein Knochenkern (Ossifikationszentrum), der sich ausdehnt. In Gelenkrichtung bleibt stets ein schmaler Saum, der Gelenkknorpel, bestehen. Ebenso bleibt in der Wachstumsphase zwischen Epi- und Diaphyse eine Knorpelschicht bestehen – die radiologisch darstellbaren Wachstums-/Epiphysenfugen. Mit zunehmendem Alter verknöchern die Wachstumsfugen radiologisch sichtbar, je nach Knochen, zu spezifisch unterschiedlichen Zeitpunkten (Hees und Sinowatz 2000; Welsch 2009; König und Liebich 2011).

2.5 Osseointegration

Unter Osseointegration darf das regulierte Wachstum von Knochenmatrix und daran beteiligten Geweben verstanden werden: Zarb und Albrektson (1991) beschreiben die Osseointegration als

einen Vorgang, bei dem eine klinisch asymptomatisch stabile Fixation eines Fremdmaterials im Knochen erreicht und auch unter funktioneller Belastung beibehalten werden kann. Insbesondere für die postoperative Heilung und die Einheilung von gesetzten Implantaten spielt die Kenntnis der osseointegrativen Faktoren eine beachtenswürdige Rolle.

2.5.1 Wachstumsfaktoren

Verschiedene Wachstumsfaktoren übernehmen eine bedeutende Funktion in den Phasen der Knochenheilung (Solheim 1998; Schmidmaier et al. 2001/2002a/2003). Es handelt sich um zellspezifisch exprimierte Polypeptide, die alters- und lokalisationsabhängig in Form von hochmolekularen Vorstufen und in allgemein niedrigen Konzentrationen im entsprechenden Gewebe gebildet werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Wachstumsfaktoren im zeitlichen Verlauf der Knochenheilung (Gradinger und Gollwitzer 2006, modifiziert nach Solheim 1998).

Heilungsphase	WF	Quelle, Lokalisation und Wirkung
Inflammation und Hämatombildung	BMP-2/4	In mesenchymalen Zellen des Hämatoms und der Kambiumschicht des Periosts im Frakturbereich. BMP-4-mRNA zeigt sich in Osteoprogenitorzellen des proliferierenden Periosts, der Markhöhle und des Muskels.
	TGF-β1	Von Thrombozyten und Entzündungszellen freigesetzt. Stimuliert die Proliferation mesenchymaler Zellen der Kambiumschicht des Periosts.
	PDGF	Von Thrombozyten und Entzündungszellen freigesetzt. Stimuliert die Proliferation mesenchymaler Zellen der Kambiumschicht des Periosts.
	aFGF	In Zellen der Kambiumschicht, assoziiert mit einer Zunahme mesenchymaler Zellen.
Kallusbildung und intramembranöse Knochenbildung	BMP-2/4	In Osteoblasten, die den Geflechtknochen nach Fraktur auskleiden. Nimmt mit zunehmender Knochenreifeung ab.
	TGF-β1	In proliferierenden mesenchymalen Zellen, in Osteoblasten und in der Matrix.
	PDGF	Von Thrombozyten freigesetzt. Stimuliert die intramembranöse Knochenbildung.
Chondrogenese	BMP-2/4	In Vorläuferzellen kurz vor deren Reifung zu Chondrozyten.
	TGF-β1	In mesenchymalen Zellen, jungen und reifen Chondrozyten.
	IGF-I	In jungen Chondroblasten am Rand des durch Knorpel ersetzten fibrösen Gewebes.
	aFGF	Gebildet von Chondrozyten, ihren Vorläufern und Makrophagen. Stimuliert die Chondrozytenproliferation.
Enchondrale Ossifikation	BMP-2/4	Intrazellulär in Osteoblasten der kalzifizierten Knorpelmatrix.
	TGF-β1	In der Umgebung hypertropher Chondrozyten und in Chondrozyten am Rande der Ossifikationszone.
	bFGF	Möglicherweise von Chondrozyten gebildet. Wichtig für die enchondrale Ossifikation.

Die zelluläre Aktivierung der Wachstumsfaktoren zu regulativen Funktionsmolekülen erfolgt durch enzymproteolytische Spaltung (Gradinger und Gollwitzer 2006). Wachstumsfaktoren

beeinflussen Hormonfunktionen, Zelldifferenzierungsvorgänge, Stoffwechselaktivitäten und das Heilungsgeschehen ihrer jeweiligen Zelle.

2.5.2 Osteogene Reparation

Für die Heilung des frakturierten Knochens stehen zwei unterschiedliche Heilungsvorgänge zur biologischen Verfügung: *Sanitatio per primam intentionem* (primäre Knochenheilung) und *Sanitatio per secundam intentionem* (sekundäre Knochenheilung) (Yamagiwa und Endo 2009). Die primäre Heilung von knöchernem Gewebe kann grundsätzlich nur bei direktem Knochenkontakt der Frakturrenden erfolgen. Der Heilvorgang erfolgt vollständig und ohne knöcherne Versatzzone. *Sanitatio per secundam intentionem* bedeutet für die Knochenheilung ein Auffüllen des Frakturspalts durch knorpeliges Gewebe, das in der Folge sekundär verknöchert (Einhorn 1991).

2.5.2.1 Osteoinduktion

Wilson-Hench (1987) sowie Albrektsson und Johansson (2001) beschreiben den Vorgang der Osteoinduktion als Prozess, der die Osteogenese auslöst bzw. als einen grundlegenden biologischen Prozess, der regulär vonstatten geht, beispielsweise im Rahmen der Frakturheilung oder der Inkorporation eines Implantats. Undifferenzierte, pluripotente Stammzellen werden dazu stimuliert, sich in eine knochenbildende Zelllinie auszudifferenzieren (Masuda et al. 1998). Nach Gradinger und Gollwitzer (2006) werden diese pluripotenten Stammzellen u.a. durch im Knochen gespeicherte Wachstumsfaktoren (TGF- β 1, IGF-I, BMP-2), die bei Störung der Knochenkontinuität freigesetzt werden, angeregt. Nach Eppley et al. (2004) bilden auch Thrombozyten und deren myeloische Stammzellen (Megakaryozyten) eine Quelle für Wachstumsfaktoren (PDGF, TGF- β 1, VEGF, EGF).

2.5.2.2 Osteokonduktion

Dieser Begriff bezeichnet die Fähigkeit von Knochen, d.h. knochenbildenden Zellen, in eine osteokonduktive Oberfläche einzuwachsen (Albrektsson und Johansson 2001). Auch Masuda et al. (1998) zufolge wachsen Kapillaren, Osteoprogenitorzellen und umliegendes Gewebe an das Implantat an bzw. in das Implantat ein. Gradinger und Gollwitzer (2006) sehen Osteokonduktion – im Gegensatz zu Osteoinduktion und Osteogenese – als passiven Prozess, der aufgrund von Materialeigenschaften das Adhären und Einwachsen von Zellen in eine Struktur ermöglicht.

Besondere Bedeutung hat hierfür die Materialbeschaffenheit sowie die Anordnung, Größe und Verteilung von Poren, Furchen und Kanälen (Chapekar 2000; Hardouin et al. 2000; Roach et al. 2007).

2.5.2.3 Osseointegration

Beschrieben wurde dieser Prozess erstmals 1977 von Brånemark et al. In der Folge definieren Albrektsson et al. (1981) Osseointegration als direkten Kontakt zwischen lebendem Knochengewebe und einem Implantat. Nach der histologischen Definition in Dorland's Illustrated Medical Dictionary bedeutet Osseointegration die direkte Verankerung eines Implantats durch die Bildung von Knochengewebe und gänzlichem Fehlen von fibrösem Bindegewebe im Interface (Albrektsson und Johansson 2001). Zarb und Albrektsson (1991) definieren Osseointegration als eine starre und unbeugsame Verbindung zwischen alloplastischem Material und Knochen, die auch bei funktioneller Belastung bestehen bleibt.

2.5.3 Remodelling und Implantateinheilung

Knochengewebe wird nach König und Liebich (2011) als spezialisiertes Bindegewebe klassifiziert. Grundlage sämtlicher Bestandteile des Skelettsystems ist das mittlere Keimblatt (Mesoderm). Im menschlichen und tierischen Körper nimmt das Knochengewebe einen gewichtigen Stellenwert ein – als passiver Bewegungsapparat, als schützende Kapsel für Gehirn und Sinnesorgane und als „Organ“ mit metabolisch-speichernder Funktion (Welsch 2009). Knochengewebe unterliegt ständigen Umbauvorgängen. Die Knochenmatrix ist ein dynamisches, vaskulär versorgtes, lebendes Gewebe, das sich lebenslänglich verändert. Knöchernes Parenchymgewebe gehört zu den sogenannten „connective tissues“, die aus Zellen bestehen, die sich in ihre eigene extrazelluläre Matrix einbetten. Makroskopisch-anatomisch werden zwei unterschiedliche Formen von Knochengewebe unterschieden: kompakter und spongioser Knochen. Zudem muss eine Unterscheidung zwischen den natürlich-physiologisch ablaufenden lamellären Knochenumbauvorgängen und osteogenen Reparationsvorgängen nach Frakturgeschehen oder Implantateinheilung getroffen werden. Im letzteren Falle handelt es sich um irregulären Geflechtknochen (Davies 2003). Osborn und Newesley beschreiben 1980 das Phänomen der Distanz- und Kontaktosteogenese.

2.5.3.1 Distanzosteogenese

Im Falle der Distanzosteogenese bildet sich neuer Knochen implantatfern. Auf der Basis der alten Knochenstruktur in der Implantatperipherie bilden osteogene Zellen neue Matrix, die in Richtung Implantat auswächst, kalzifiziert und später das Implantat erreicht. Die neue Knochenmatrix wird somit nicht auf der Implantatoberfläche gebildet, das Implantat wird von dieser Matrix langsam umschlossen (Davies 2003; Kuzyk und Schemitsch 2001).

2.5.3.2 Kontaktosteogenese

Bei der Kontaktosteogenese bildet sich frisches Knochengewebe direkt auf der Implantatoberfläche (Kuzyk und Schemitsch 2001). Osteoprogenitorzellen bzw. Präosteoblasten wandern zur Implantatoberfläche, differenzieren aus und scheiden schließlich als reifer Osteoblast neues Osteoid ab, das in der Folge kalzifiziert und schließlich die neue Knochenstruktur bildet. Die frisch entstandene Knochenmatrix wächst also vom Implantat in Richtung des bestehenden Knochens. Davies (2003) beschreibt sowohl die Distanz- als auch die Kontaktosteogenese als Vorgang während der Knochenheilung – also auch der Implantateinheilung. Des Weiteren schreibt er dem Oberflächendesign von Implantaten eine wichtige Rolle bei der Implantateinheilung zu. Gottlander und Albrektsson beschreiben 1991 einen weiteren Osteogenesetyp – die Verbundosteogenese.

2.5.3.3 Verbundosteogenese

Durch Oberflächenaktivierung mit bioaktiven Materialien wie Hydroxylapatit, Plasma oder RGD-Peptiden kann eine physikochemische Verbindung zwischen der Implantatoberfläche und dem entstehenden Knochen und somit eine Verbesserung der Implantateinheilung erzielt werden (Ducheyne 1980; Soballe 1993; Schmidmaier 2002b; Shin 2003). Diese Oberflächenbeschichtungen werden dabei in den Knochenstoffwechsel miteinbezogen. Sie zeichnen sich durch unterschiedlich starke Resorptionen bzw. Biodegradationen aus (Gottlander und Albrektsson 1991).

2.5.4 Metaplasien, Gewebetransformationen

Metaplastische Veränderungen der patienteneigenen Knochenmatrix haben Einfluss auf die ossäre Stabilität der versorgten Implantatstelle. Kollagenfaserige Metaplasien und dystrophische Kalzifizierungsprozesse verändern die biomechanischen und physikochemischen Eigenschaften

des Knochenmaterials. Druck- und Zugkräfte werden vom metaplastischen Knochenmaterial fehlerhaft absorbiert und führen in der Folge zu weiteren schwerwiegenden Funktionsverlusten. Die metaplastische Veränderung des Knochenparenchyms, die im Rahmen einer fibroplastischen Entzündung abläuft, begünstigt das Einwachsen von Kollagenfasern des Typs I und II. Der bereits ausgereifte lamelläre Knochen wird auf diese Art und Weise umgesetzt zu unreiferem Geflechtknochengewebe, das den Ansprüchen der modernen Implantologie nicht standhalten kann. Ausreichende Stabilitätsgewinnung und gewünschte Osseointegrationsvorgänge können metaplastisch nicht erreicht werden.

Die Ausbildung von nichtfunktionellem Bindegewebe anstelle von parenchymatösem Knochengewebe im Interface hat mehrere auslösende Faktoren: lokale Vorkommnisse, knochen-zelluläre Inaktivität und zytotoxische Faktoren. Des Weiteren haben biomechanische Faktoren und Mikrobewegungen größte Relevanz für die Stabilisierung der gebildeten knöchernen Matrix. Pilliar et al. (1986) konnten in einer Studie am Hundemodell zeigen, dass Relativbewegungen von über 150 µm im Interface, also an der Implantat-Knochen-Grenze, zur Ausbildung von Bindegewebe führen. Bei einer Relativbewegung unter 25 µm konnte in der gleichen Studie eine direkte Osseointegration gezeigt werden. Für eine tragfähige Osseointegration ebenfalls von Bedeutung ist die Porosität eines Implantats von mindesten 20–40% (Gradinger und Gollwitzer, 2006). Sowohl Spongiosa als auch Kompakta erleben nach einer endoprothetischen Versorgung eine Gewebeschädigung, die dem Bild der Knochennekrose ähnelt und so zu einer mangelnden Implantat-Integration führen kann.

3. Material und Methoden

In der klinischen Endoprothetik finden bis heute unterschiedliche Werkstoffe chirurgische Anwendung. Die bisher gängigsten Materialgruppen für Gleitpartner, beispielsweise im Bereich der Hüftendoprothetik, sind Polyethylenverbindungen, Metall und Keramik. Keramik wurde als Werkstoff bereits in den 1970er-Jahren im Rahmen der Dentalchirurgie erfolgreich verwendet. Ziel der vorliegenden Dissertation ist – in Anlehnung an die in diversen vorausgegangenen Studien verschiedener internationaler Arbeitsgruppen ermittelten Implantationserfolge unter Anwendung von Keramikimplantaten – eine Evaluierung von Keramikimplantaten mit neuartiger, optimierter Oberflächenstrukturierung im Tiermodell Schaf. Mit den erreichten Ergebnissen soll im Verbundprojekt „Direct To Bone“ innerhalb des Programms „Neue Werkstoffe“ schließlich dazu beigetragen werden, entsprechende Zulassungsdokumente für die Erzeugung von bioaktiven Keramikendoprothesen für die Anwendung am Menschen zu erarbeiten.

3.1 Implantatmaterialien

3.1.1 Monolithische Keramikimplantate

Der Implantatgrundkörper besteht aus einer klinisch bewährten Hochleistungskeramik (Delta-Keramik[®], Fa. CeramTec), die in bisherigen Untersuchungen nur mit unstrukturierten Oberflächen als Inserts in Kombination mit Metallrückflächen Verwendung fand und in der vorliegenden Arbeit mit einer porösen Oberflächenstrukturierung versehen wurde, um dadurch das gezielte Einwachsen von Knochenmatrix zu ermöglichen (Abbildung 6 und 7). Untersucht werden ausschließlich zylindrische Implantate mit einem Durchmesser von 8 mm und einer Länge von 12 mm. Beim Material der Prüfkörper handelt es sich um eine Mischkeramik – „Alumina Matrix Composite“ –, die sich aus ca. 75% Aluminiumoxid (Al_2O_3) und etwa 24% Y-TZP-Zirkonoxid sowie einer geringen Menge Chromoxid (Cr_2O_3) zusammensetzt. Es wurden sowohl Prüfümplantate mit unstrukturierter Oberfläche als auch Prüfümplantate mit strukturierter Oberfläche zum Einsatz gebracht, um schließlich eine Evaluierung der Bedeutung einer Strukturbehandlung des zukünftigen Prothesenmaterials für die optimale Osseointegration vornehmen zu können. Es wurden insgesamt 144 strukturierte und 48 unstrukturierte Implantate nach der entsprechenden Überlebenszeit der Tiere zur Auswertung gebracht.

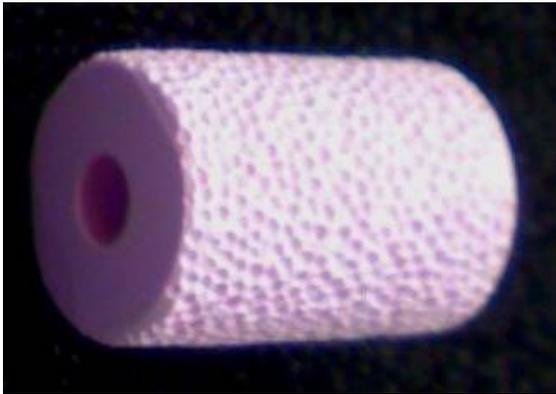


Abbildung 6: Strukturierter Prüfkörper, Werkstoff: Alumina Matrix Composite (AMC)-Keramik (Delta-Keramik® Fa. CeramTec), Porengröße 200–500µm, Porosität 45% (Bild im Rahmen des Projekts „Direct to Bone“).

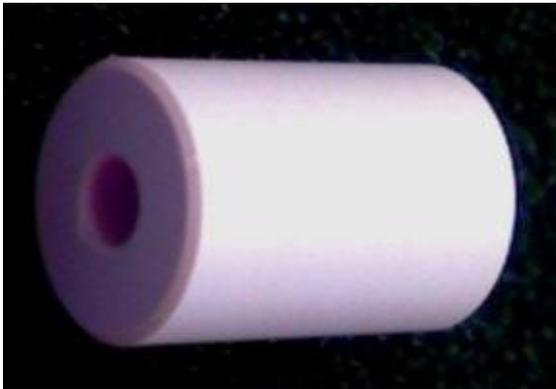


Abbildung 7: Unstrukturierter Prüfkörper, Werkstoff: Alumina Matrix Composite (AMC)-Keramik (Delta-Keramik® Fa. CeramTec), Rauigkeit $R_t = 0,72\text{--}0,86\ \mu\text{m}$ (Bild im Rahmen des Projekts „Direct to Bone“).

3.1.2 Struktur

Um den Unterschied zwischen unbeschichteter, unstrukturierter Oberfläche und neu entwickelter, porös strukturierter Oberfläche mit einer Porengröße von 520–660 µm in vivo evaluieren zu können, sollen in der vorliegenden Dissertation nun diese beiden Parameter direkt miteinander verglichen werden. Beide Oberflächen wurden im Rahmen einer Vorleistung zu dieser Arbeit in In-vitro-Studien an Osteoblastenkulturen untersucht. Dabei wurde jeweils der Einfluss der Porengröße der Struktur auf der Oberfläche der $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-ZrO}_2$ -Verbundkeramik auf das Wachstum von Knochenzellen bestimmt. Als Referenzwert dieser Voruntersuchungen diente das Wachstum von Knochenzellen auf der $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-ZrO}_2$ -Verbundkeramik ohne zusätzliche Strukturierung. Als Ergebnis dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Proliferation der Knochenzellen

auf der strukturierten porösen Oberfläche regelmäßig signifikant höher lag als auf der Al₂O₃-ZrO₂-Verbundkeramik mit unstrukturierter Oberfläche. Des Weiteren konnte mit der Untersuchung gezeigt werden, dass mit der Porengröße von 520–660 µm optimale Osseointegrationsvorgänge zu erwarten sind. Dieser Teilbereich von Untersuchungen des Projekts „Direct To Bone“ (Boxleitner et al. 2008b, c und 2009a, b, c, d) ergab interessante In-vitro-Ergebnisse und diese sollen nun im Rahmen der vorliegenden Dissertation im Tiermodell in-vivo mittels histologischer Auswertungen hinsichtlich der knöchernen Integration, des Umfangs sowie der Qualität des Knochengewebes weiter ergänzt werden.

3.1.3 Beschichtung

Um das Knocheneinwachsen – insbesondere in der Frühphase nach Implantation – zusätzlich zu verbessern, werden heutzutage häufig bioaktive Beschichtungen gewählt wie Hydroxylapatit, die die Implantatoberfläche zusätzlich zur Strukturierung modifizieren. Da die Wirkung dieser bioaktiven Substanzen aber auch abhängig von der Grundsubstanz des Implantatkörpers ist, sollen drei unterschiedliche bioaktive Beschichtungen in vivo evaluiert werden, die in gesonderten Untersuchungen im Vorfeld an Osteoblastenkulturen in vitro einen positiven proliferativen Effekt zeigten. Folgende bioaktive Beschichtungen sollen dabei eingesetzt werden:

- 1) RGD-Peptide
- 2) Hydroxylapatit
- 3) Plasma

3.1.3.1 RGD-Peptide

Unter RGD-Peptiden werden oligomere Kleinsteiweiße verstanden, die mittels einer spezifischen Arg-Gly-Asp-Sequenz den Kontakt zu Oberflächenmolekülen der Integrin-Familie vermitteln und so die Adhäsion von Zellen potenziell fördern können. Chirurgisch von besonderem Interesse ist der Einsatz von RGD-Peptiden als Oberflächenbehandlung von Implantatkörpern, die nach In-vitro-Untersuchungen die Adhäsion von Osteoblasten verbessern kann. Die In-vivo-Überprüfung von neuartigen RGD-Peptid-Beschichtungen erfolgte bisher an verschiedenen Tiermodellen. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die Al₂O₃-ZrO₂-Verbundkeramik mit RGD-Peptiden beschichtet.

3.1.3.2 Hydroxylapatit

Die stabile kovalent erzeugte Kalzium-Phosphor-Verbindung Hydroxylapatit ist der Hauptbestandteil der physiologischen anorganischen Substanz von Knochen und Zähnen. In vitro lassen sich durch den Einsatz von Hydroxylapatitkeramiken dementsprechend positive Effekte auf das Wachstum und den Phänotyp von Knochenzellen erzielen (Cvikl et al. 2004). Synthetisches Hydroxylapatit wird vor allem für die Beschichtung von Titan-Implantaten in der Endoprothetik eingesetzt. Die Hydroxylapatit-Oberflächenbehandlung soll das physiologische Wachstum des umliegenden Knochengewebes anregen. Über einen definierten Zeitraum wird das Hydroxylapatit schließlich vom Patientenkörper abgebaut. Es kommt zu einem direkten Knochen-Implantat-Schluss und somit zur optimalen Kraftübertragung an der Knochen-Implantat-Schnittstelle. Im Zuge des Projekts „Direct To Bone“ wurde die Al_2O_3 - ZrO_2 -Verbundkeramik mit Hydroxylapatitkeramik beschichtet. In verschiedenen ersten In-vitro-Versuchen desselben Projekts konnte keinerlei Zytotoxizität im Zusammenhang mit dieser Oberflächenbehandlung festgestellt werden.

3.1.3.3 Plasma

Als „Plasma“ werden ionisierte Gase bezeichnet, die durch eine elektrische Entladung erzeugt werden. In Industrie und Forschung werden unterschiedliche ionisierte Gase in der Reinigung, Entfettung, Sterilisation und Ätzung von Bauteiloberflächen sowie zum Abscheiden definierter Schichten eingesetzt. Außerdem können die Oberflächeneigenschaften wie Benetzbarkeit und Oberflächenenergie von Polymer-, Metall- und Keramikwerkstoffen durch Plasmen spezifisch beeinflusst werden. Durch den Einsatz von Stickstoff-Plasma sind sowohl Oberflächenenergie als auch Benetzbarkeit (Abnahme des Randwinkels) von TiO_2 - und Al_2O_3 -Keramiken beeinflussbar. Über den Grad der Benetzbarkeit einer Oberfläche wiederum lässt sich direkt die Adhäsion und das Einwachsen von Zellen in vitro an Werkstoffoberflächen einstellen. In gesonderten In-vitro-Versuchen innerhalb des Projekts „Direct To Bone“ (Burgkart et al. 2009a, b) konnte gezeigt werden, dass die Plasmabehandlung einer Al_2O_3 - ZrO_2 -Verbundkeramik eine Verbesserung ihrer Benetzbarkeit erreicht. Einen Effekt zeigte die erhöhte Benetzbarkeit durch die Plasmabehandlung auch auf die Proliferation von humanen knochen-bildenden Zellgeweben, die auf der Oberfläche der Al_2O_3 - ZrO_2 -Verbundkeramik kultiviert wurden. Zytotoxische Effekte konnten bisher im Zusammenhang mit dieser Beschichtung in keiner Studie festgestellt werden.

3.1.4. Überblick über die in der Arbeit verwendeten Testimplantate

Implantate: Keramikimplantate aus Mischkeramik „Alumina Matrix Composite“ (ca. 75% Aluminiumoxid (Al_2O_3), ca. 24% Y-TZP Zirkonoxid und geringe Mengen Chromoxid (Cr_2O_3))

Form: zylindrisch rund mit jeweils zentraler Bohrung

Abmessungen : 8 mm x 12 mm

Lagerung: Klinik für Orthopädie des Klinikums rechts der Isar der TU München

Die Implantate wurden dampfsterilisiert und je nach Versuchsgruppe entsprechend plasmaaktiviert bzw. mit RGD und HA beschichtet. Die Testimplantate bestehen aus Keramik, die als Material für Implantate zugelassen ist. Deshalb wurden keine zusätzlichen Testimplantate verwendet.

3.2 Tierexperiment

3.2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 24 weibliche Schafe (*Ovis aries*) der Rasse Merino (Abbildung 8).



Abbildung 8: *Ovis aries*, Schafe der Rasse Merino (Foto: <http://www.deutsche-schafzucht.de>)

Das Alter der Tiere lag über zwei Jahre, ihr Körpergewicht betrug zwischen 55 und 87 kg. Zur Gewährleistung einer homogenen Tiergruppe mit möglichst gleichen körperlichen Voraus-

setzungen wurden annähernd gleich große Tiere mit jeweils abgeschlossenem Knochenwachstum (über zwei Jahre) ausgewählt. Alle Tiere waren mindestens einmal trächtig, zum Zeitpunkt des Versuchs jedoch nicht tragend.

3.2.2 Tierversuchsgenehmigung

Der Tierversuch wurde durch die Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie des Klinikums rechts der Isar mit einem Schreiben vom 09.05.2008 bei der Regierung von Oberbayern (ROB) angezeigt und mit einem Schreiben vom 28.05.08 durch die Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen 2–14/08 gem. §7 Abs. 2 und 3, des §8b Abs. 1, 2, 4, 5 und 6 und des §9 Abs. 1 und 2 TierSchG genehmigt.

3.2.3 Tierhaltung

Unterbringung der Tiere beim Züchter: halb offener Schafstall (Strohtieflauf; Holzbauweise); Haltung: getrennt von anderen Versuchsschafen; Futter: Mais- und Grassilage aus eigener Herstellung, Heu aus eigener Herstellung, Minerallecksteine (Hersteller: BayWa); Wasser: Leitungswasser ad libitum.

Unterbringung der Tiere im Zentrum für Präklinische Forschung (ZPF): Kunststoffnoppboden mit Stroh- und Holzgranulateinstreu; Temperatur: 18–22 °C; Luftfeuchtigkeit: max. 60 %; Wasser: Leitungswasser ad libitum; Futter: gepresstes Heu, Mais- und Grassilage des Herkunftsbetriebs; Licht: 12/12 Stunden Hell-Dunkel-Automatik mit Dämmerungsphasen; Akklimatisationszeit: Die Schafe wurden 24 Stunden vor der Operation und der Euthanasie ins Zentrum für Präklinische Forschung transportiert. Die Schafe verblieben 48 bis 96 Stunden nach der Operation im ZPF bevor sie zum Züchter zurücktransportiert wurden.

3.2.4 Tiergruppen

Um den zeitlichen Verlauf der Implantat-Integration zu ermitteln, wurden die Tiere zwei verschiedenen Überlebenszeitgruppen zugeteilt:

Kurzzeitüberlebensgruppe: 4 Wochen (4-Wochen-Gruppe, d.h. 28 Tage). Dieser Zeitraum wurde gewählt, um den hypothetischen Effekt der RGD-Beschichtung bezüglich einer schnelleren Implantatfixation und damit eines Zeitvorteils bei der Integration evaluieren zu können. Zwölf Tiere (Schaf #11 und #12 sowie Schaf #15–#24) wurden in dieser Gruppe geführt.

Langzeitüberlebensgruppe: 12 Wochen (12-Wochen-Gruppe, d.h. 84 Tage), da nach diesem Zeitraum die Knochenbruchheilung üblicherweise abgeschlossen ist. In dieser Gruppe wurden ebenfalls zwölf Tiere operiert (Schaf #1–#10 sowie Schaf #13 und #14).

3.2.5 Tiermodell

Die Tiere wurden vom Züchter bereitgestellt und von den Tierärzten des ZPF untersucht. Nur Tiere mit allgemein gutem Gesundheitsstatus wurden angekauft und verblieben bis zum Versuchsbeginn beim Züchter. Am Vortag der Implantation wurden die Tiere durch Tierärzte des ZPF in das ZPF gebracht. Dazu wurde ein institutseigenes spezielles Tiertransportfahrzeug (Schutzeinbauten, Lüftung, Rampe) verwendet. Die Implantation erfolgte im ZPF unter klinisch-sterilen Kautelen. Es erfolgte jeweils eine beidseitige Implantation von insgesamt acht Prüfkörpern pro Schaf (siehe Operationsmodell). Währenddessen wurden ein computergestütztes Operationsprotokoll mit genauer Dokumentation und Listung der Implantate und Implantationsorte sowie ein manuelles Anästhesieprotokoll geführt. Zur Planung einer jeden Operation wurde anhand des Randomisierungsschemas eine Implantationsskizze erstellt. Die Einhaltung der tierschutzrechtlichen Vorschriften wurde am ZPF selbst und beim Schafzüchter wiederholt durch den Tierschutzbeauftragten des ZPF kontrolliert. Mit dem Tag der Implantationsoperation erhielten die Tiere eine Tierkarte, auf der alle tierspezifischen Daten dokumentiert wurden.

Beim Züchter wurden die Schafe während der Versuchsdauer in einem separaten Stallbereich aufgestellt. Während dieser Zeit erfolgten regelmäßig: eine tägliche Kontrolle der Tiere, standardisierte allgemeine und spezielle Untersuchungen sowie weitere labortechnische Blutuntersuchungen.

3.2.6 Operationsmodell

Die Implantate wurden jeweils unter standardisierten Bedingungen beiderseits in die proximale Tibia und das distale Femur (epimetaphysärer Bereich) der Tiere eingebracht. Am Implantationsort wurden je 2 Implantate auf der gleichen Achse mit definiertem Abstand zueinander positioniert, sodass an ein und demselben Ort der Einfluss der jeweiligen Beschichtung ermittelt werden konnte. Pro Tier wurden acht Implantate gesetzt: auf beiden Seiten je zwei in das distale Femur – für die spätere biomechanische Auswertung – und je zwei in die

proximale Tibia – für die histologische Auswertung (Abbildung 9). Um den potenziellen Effekt einer Ortsabhängigkeit zu vermeiden, wurden die Implantationsorte jeweils randomisiert.

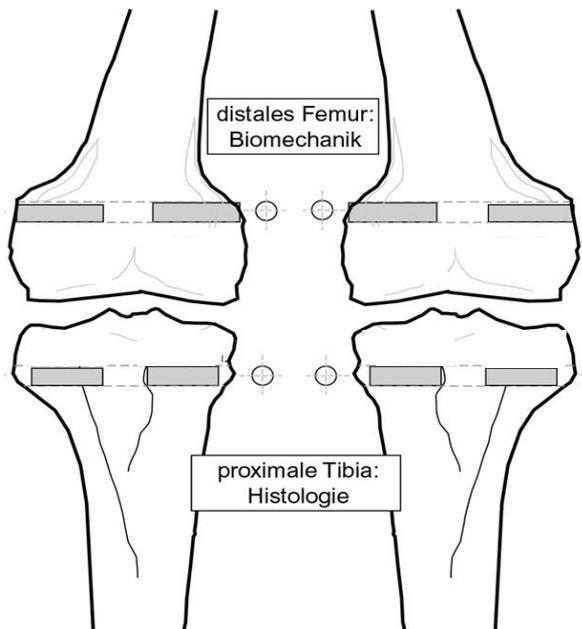


Abbildung 9: Skizze Operationsmodell (Skizze im Rahmen des Projekts „Direct to Bone“).

Die Sedation erfolgte unmittelbar präoperativ i.v. mit Diazepam. Nach Anästhesieeinleitung erfolgte die Narkose mit Propofol (i.v.). Die Tiere wurden gewogen und mit einer Magensonde versehen. Die Aufrechterhaltung der Anästhesie erfolgte mit Isofluran und einem Ketamin-Perfusor i.v. Zusätzlich wurden die Tiere intraoperativ mit Novalgin und Ketoprofen analgetisch abgedeckt und erhielten Infusionen und ggf. Natriumbikarbonat zur Aufrechterhaltung von Flüssigkeits- sowie Säure-Basen-Haushalt. Die antibiotische Abdeckung der Tiere erfolgte intraoperativ mit 750mg Cefuroxim i.v. Eine Röntgenkontrolle erfolgte postoperativ mittels Durchleuchtung im C-Bogen in zwei Ebenen.

Für zwei bis drei Tage postoperativ erhielten die Tiere eine regelmäßige Folgeanalgesie mit Ketoprofen (Ausnahme: zusätzliche Gabe von Ketoprofen über drei Tage bei den Schafen #9 und #10). Freie Bewegung im Stall war jederzeit erlaubt. Die Tiere wurden in der ersten postoperativen Woche täglich, danach zweimal wöchentlich tierärztlich kontrolliert. Die Fädenentfernung erfolgte schließlich am zwölften Tag postoperativ.

Da an der proximalen Tibia bzw. am distalen Femur beidseits je zwei Implantate eingebracht werden mussten, um einen direkten Vergleich zwischen den verschiedenen Implantaten zu erreichen, wurde folgendes allgemeines Prozedere für die Implantation festgelegt: Die Lagerung der Tiere erfolgte in Rückenlage, an der Tibia bzw. dem Femur wurden an einer reproduzierbaren Stelle ca. 3 cm lateral bzw. medial in einer Linie von der Mitte der Patella zur Mitte der Tuberositas tibiae je ein Hautschnitt von ca. 5 cm Länge gesetzt und die definierten Punkte zur Implantation freipräpariert (Abb. 10 und Abb. 11).

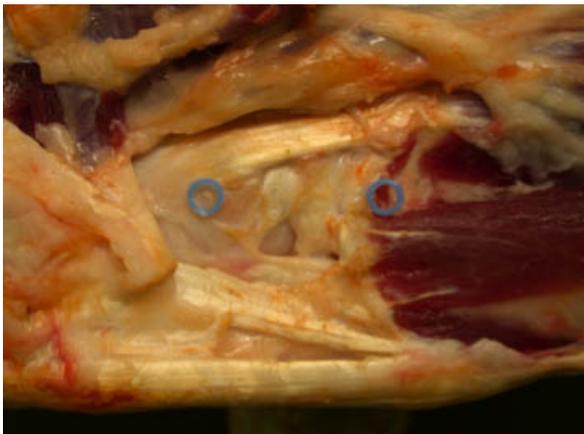


Abbildung 10: Situs Kniegelenk des Schafes: lateraler Aspekt mit markierten Implantationsorten; rechte Bildseite: Tibia (Bild im Rahmen des Projekts „Direct to Bone“).



Abbildung 11: Situs Kniegelenk des Schafes: medialer Aspekt mit markierten Implantationsorten; rechte Bildseite: Tibia (Bild im Rahmen des Projekts „Direct to Bone“).

Von lateral wurde je ein Kirschnerdraht zum entsprechenden medialen Bezugspunkt gebohrt. Entlang des Kirschnerdrahts wurden dann von medial bzw. lateral mittels eines kanülierten Bohrers (Durchmesser 7,5 mm) die Aufbohrungen (Bohrtiefe 20 mm) zur Aufnahme der Implantate gesetzt. Intraoperativ wurden die Implantate mittels präziser Bohrlehren einzeln vor der Implantation vermessen. Das Knochenlager wurde schließlich mittels Handreibahlen exakt mit untermaßigem Durchmesser von 0,1 mm präpariert. So wurde eine reproduzierbare Press-Fit-Situation jeweils gewährleistet. In die proximale Tibia und in das distale Femur wurden anschließend je zwei Implantate eingebracht. Dazu ist ein spezifisch entwickeltes K-Draht-Zielgerät eingesetzt worden. Die femoralen Implantate wurden schließlich über den K-Draht als Führung in den Knochen eingebracht, bis die Stirnfläche des Implantats bündig mit der medialen bzw. lateralen Kortikalis abschloss (Abbildung 12).

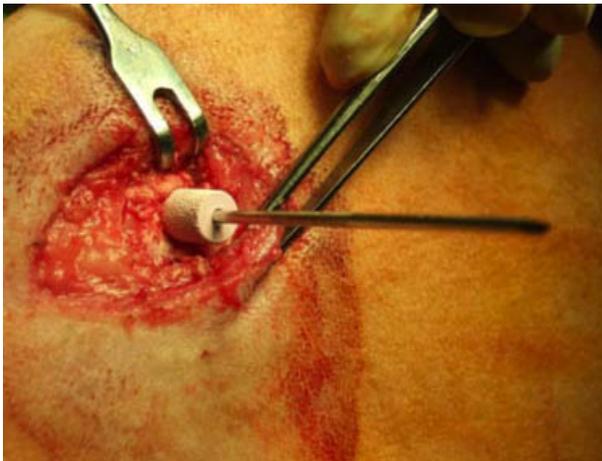


Abbildung 12: Situs Kniegelenk des Schafes: Einbringen des Implantats mittels K-Drahtführhilfe (Bild im Rahmen des Projekts „Direct to Bone“).

Die tibialen Implantate wurden 3 mm unter das Kortikalisniveau versenkt, damit die Implantate zur besseren histologischen Aufarbeitung im Rahmen der vorliegenden Dissertation ganz im Spongiosalager zu liegen kamen. Auf diese Weise kann am besten eine möglichst geringe Variabilität der Implantationsorte erreicht werden. Die Implantationsstellen wurden dreischichtig verschlossen (Verschiebeschicht und Kniegelenksfaszie mit resorbierbarem polyfilem Faden; Haut mit nicht resorbierbarem monofilem Faden). Unmittelbar postoperativ wurden zwei Röntgenaufnahmen mit kaudokranialem bzw. mediolateralem Strahlengang zur Dokumentation der Implantatpositionen angefertigt (Abbildung 13).

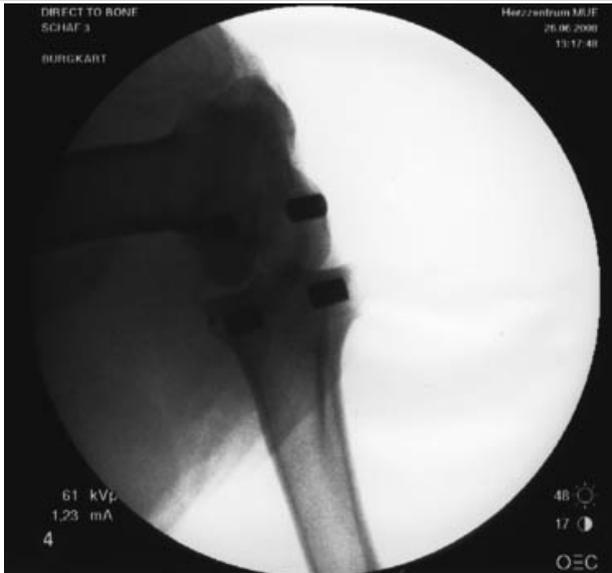


Abbildung 13: Dokumentation der Implantat-Positionierung im Röntgenbild (Bild im Rahmen des Projekts „Direct to Bone“).

3.2.7 Blutabnahmen

Bei den Versuchstieren wurden folgende Blutabnahmen durchgeführt: 1) Vor Beginn der Implantation (alle Tiere, jeweils am Tag der Implantation). 2) In der Mitte der Überlebenszeit (Tag 42 – gilt nur für die 84-Tage-Tiere; diese Blutabnahme entfällt in der 4-Wochen-Gruppe). 3) Am Tag der Sektion (alle Tiere). Es wurde jeweils das Differenzialblutbild sowie die Anzahl der Lymphozyten, Erythrozyten und Thrombozyten bestimmt. Dazu wurde ein Blutausschrieb angefertigt und eine mit EDTA ungerinnbar gemachte Probe gezogen. Außerdem wurde zu jeder Blutabnahme eine Serumprobe gewonnen und bei -70 °C eingefroren. Die frisch zu bestimmenden Blutproben wurden vom Kurier zum Veterinärmedizinischen Labor (Ludwigsburg) gebracht. Die Befunde wurden dem ZPF per E-Mail übermittelt. Die Serumproben wurden nach Beendigung des Versuchs an die Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie übersandt.

3.2.8 Sektion der Tiere

Am Ende der Beobachtungszeit wurden die Tiere durch eine Überdosis Pentobarbital und Kaliumchlorid (nach FELASA, Federation of European Laboratory Animal Science Associations, empfohlene Methode) euthanasiert. Es wurde eine makroskopisch-pathologische Untersuchung durchgeführt, die die Untersuchung der Körperoberfläche, der Körperöffnungen, der Körperhöhlen und der Organe umfasst. Die Implantate wurden im Knochenlager belassen.

Lediglich das die Knochen umgebende Weichteilgewebe wurde grob – ohne Insult des Knochengewebes – entfernt. Am distalen Femur wurde ein mindestens 15 cm langer Knochen teil belassen, damit das distale Femur zur biomechanischen Testung gut in die Prüfmaschine eingespannt werden konnte. Die Überstellung der entnommenen implantattragenden Femurteile an die Abteilung für Biomechanik erfolgte unmittelbar anschließend an die Sektion ohne Zwischenfixation der Knochen (Zeitfenster: 60 bis 90 Minuten; Transportbedingungen: trocken auf Eis, d.h. 0 bis 4 °C). Die proximale Tibia wurde reseziert (Absetzentfernung von der Implantatebene: 2,5 cm), sofort in 4%iges Formalin eingelegt und nach 48-stündiger Durchfixation zur histologischen Aufarbeitung gebracht. Des Weiteren wurden Proben der Leber und der Nieren, der Lunge sowie des regionären Lymphknotens (Beckenlymphknoten) zur histologischen Aufarbeitung fixiert. Die implantattragenden Knochen teile wurden zur Weitergabe an die histologische bzw. biomechanische Aufarbeitung nur mit der anatomischen Lokalisation beschriftet – die eindeutige Kennzeichnung erfolgte durch makroskopisch auszuwertende Einritzung der Schafsnummer sowie der Seite in den Gelenksknorpel des entsprechenden Knochens. Bei der Sektion wurden die wichtigen Organe beurteilt und jeweils Proben von Leber, Lunge, Niere und beiden Beckenlymphknoten asserviert, die implantattragenden Tibiae sowie die regionären Lymphknoten wurden entnommen und für eine histologische Untersuchung aufbewahrt. Die ebenfalls implantattragenden Femora wurden frisch (innerhalb von 90 Minuten) für den Push-out-Versuch vorbereitet.

3.2.9 Einzelschafdokumentation

Die Einzelschafdokumentation enthält einen zusammenfassenden Bericht der Befunde, die während des Versuchs bei dem betreffenden Einzeltier erhoben wurden.

- Schafkarte des ZPF: enthält die Ohrmarkennummer, Nummer des Tieres im hier beschriebenen Implantationsversuch (#1–#24), laufende Nummer (Schafe in 2008) des ZPF, Aufenthaltszeiten an den verschiedenen Orten, Operationszeiten, Dokumentation tierärztlicher Untersuchungen, Dokumentation der Analgetikagabe, Gewicht, Sektionstermin
- Narkoseprotokoll: enthält die während der Narkose protokollierten Daten (Zeitangaben, applizierte Wirkstoffe, Blutdruck, Herzfrequenz, Sauerstoffsättigung, CO₂, Blutgase, Atemfrequenz, Inspirationsdruck, Narkosegaskonzentration)
- Operationsplanungsskizze: verzeichnet die Implantationsorte und den Implantattyp am jeweiligen Ort

- Durchleuchtungsbilder: dokumentierten die unmittelbar postoperative Lage der Implantate an den jeweiligen Implantationsorten (beide Kniegelenke in zwei Ebenen)

- Blutuntersuchungen: enthalten Angaben zum roten und weißen Blutbild sowie zum Differenzialblutbild

Insgesamt haben alle Schafe sowohl die Operation als auch die jeweilige Überlebenszeit gut überstanden. Es traten keine größeren gesundheitlichen Beeinträchtigungen (wie bleibende Lahmheit, Festliegen, klinisch manifeste Lungenentzündungen, Mastitiden o. ä.) auf – kein Tier musste vorzeitig aus dem Versuch genommen werden. Die Blutuntersuchungen zeigten Ergebnisse, die zumeist um den vom Labor angegebenen Referenzbereich schwankten.

3.3 Auswertung

3.3.1 Biomechanische Auswertung

Nach Euthanasie der Tiere wurden die Proben in frischem Zustand direkt mittels einer Push-out-Testanordnung untersucht. Dazu wurden die Proben mithilfe einer eigens entwickelten Justiervorrichtung orthograd exakt präpariert und dadurch winkeltreu in der Aufspannvorrichtung positioniert. Mit einer Universalprüfmaschine (Fa. Wolpert, TZZ 707) wurden schließlich die Ausdrücktests standardisiert durchgeführt und die entsprechenden Kraftwerte dokumentiert. Es wurden 48 Proben von zwölf Schafen nach vier Wochen (28 Tagen) und weitere 48 Proben von zwölf Schafen nach zwölf Wochen (84 Tagen) untersucht. Alle Proben konnten biomechanisch ausgewertet werden.

3.3.2 μ CT-Untersuchungen

Vor den Push-out-Versuchen waren ursprünglich μ CT-Untersuchungen der Proben geplant. Aufgrund der ersten klinischen Erfahrungen mit dem Werkstoff hatte man den Eindruck, dass bei herkömmlich durchgeführten CT-Untersuchungen von Patienten im Zusammenhang mit der Deltakeramik keine bildgebenden Artefakte aufgetreten sind. Deshalb wurden die μ CT-Untersuchungen im Projektprotokoll eingeplant. Bei der Durchführung der ersten entsprechenden μ CT-Scans an den frisch präparierten Proben zeigte sich allerdings, dass es nahe dem Implantat regelmäßig zur Ausbildung von Artefakten kommen kann, die keine aussagekräftige Auswertung dieses primär interessanten Bereiches zulassen. In Abbildung 15 ist ein sagittaler μ CT-Schnitt durch ein strukturiertes Keramikimplantat zwölf Wochen nach Implantation dargestellt.

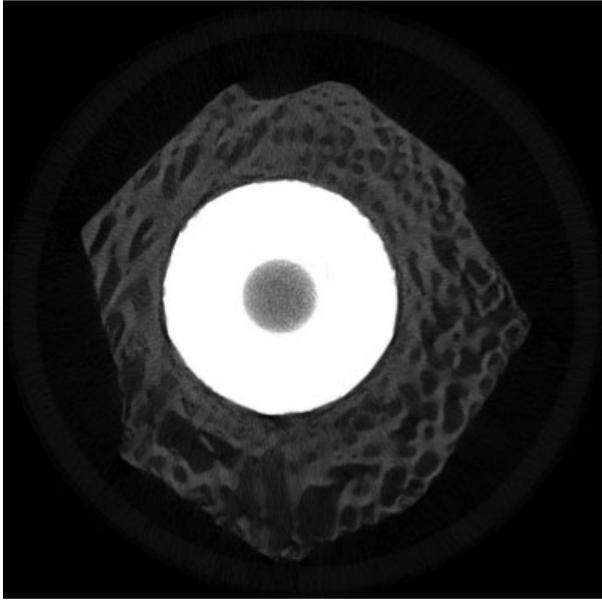


Abbildung 14: Sagittaler μ CT-Schnitt durch ein strukturiertes Keramikimplantat zwölf Wochen nach Implantation (Bild im Rahmen des Projekts „Direct to Bone“).

Bei exakter Bildanalyse erkennt man allgemein zentrifugal ausgerichtete strähnchenförmige Artefakte, die die Kontaktzone von Knochen und Implantat unscharf erscheinen lassen und damit eine sichere wissenschaftliche Beurteilung erheblich einschränken. Die angeschnittenen keramischen Poren können noch detektiert werden. Die relevante Frage, wie groß die festen Kontaktzonen zwischen Knochen und Implantat sind, lässt sich allerdings mit diesem Verfahren nicht sicher beantworten. Deshalb wird in der vorliegenden Arbeit diese Fragestellung mittels histologischer Schnitte evaluiert. Dieser Teilaspekt der Probenuntersuchungen wurde im Anschluss an erste Scans und nachfolgende konsequente, aber leider erfolglos bleibende Optimierungsversuche eingestellt.

3.3.3 Histologische Auswertung

3.3.3.1 Präparation der Proben

Sämtliche 96 Proben der Tibiae der 4- und 12-Wochen-Gruppe wurden für die histologische Aufarbeitung asserviert. Dazu wurden die Proben frisch nach der Entnahme in gepufferte Formalinlösung überbracht. Bei der sich anschließenden weiteren Probenbearbeitung ergaben sich einige Probleme: Die Polymerisation bei der Einbettung in PMMA verlief aufgrund des hohen Fettgehalts der Proben deutlich verzögert. In der Folge wurden nach den ersten

Einbettungsschritten für die weiteren Proben die präparativen Schritte deutlich verlängert, die die Probenentfettung zum Ziel hatten. In diesem Zusammenhang verlängerte sich die gesamte Einbettungszeit. Nach schließlich schonender Entfettung und Entwässerung erfolgten die Infiltration und Einbettung in MMA (Methylmetacrylat). Die eingebetteten Proben wurden sagittal getrennt und die Implantate bei der Firma CeramTec AG streng koronar „mittig“ gesägt, auf Objektträger aufgeklebt und schließlich mit Diamantschleifgeräten zu ca. 140–80 µm dicken Dünnschliffpräparaten weiter verarbeitet. Die Oberfläche wurde mit Korundschleifpapieren (1200, 2400 und 4000) nachpoliert. Die Färbung erfolgte mit der Oberflächenfärbemethode K2, die eine moderne Modifikation der Grünwald-Giemsa-Färbung darstellt. Die Oberflächenfärbung K2 dient der besonderen spezifischen Darstellung der bindegewebigen und zellulären Bestandteile und Differenzierung der einzelnen Zellen im Gewebeverband. Auf diese Weise kann eine besonders klare Darstellung und Beurteilung der knöchernen Matrix, der Knochenqualität (primärer und sekundärer Knochen, Lamellenknochen – Geflechtknochen) sowie der Knochenaktivität und der Vitalität des gebildeten Knochengewebes erreicht werden (Abbildung 16a–16c und 17a–17c). Die Oberflächenfärbung K2 erlaubt ferner eine selektive Anfärbung von mineralisierter Matrix und Mineralisationsprodukten (vgl. Tabelle 5).

Tabelle 3: Färbung K2; Farbliche Zuordnung der K2-Färbung zu den verschiedenen Zellstrukturen (Kerschbaumer 2008, Projektbezogener Endbericht, Persönliche Mitteilungen).

Färbeergebnis	Histologische Bedeutung
orange/rot	Bindegewebe, Zellkerne
braun	Kollagen, Kollagenfibrillen
braun/rot /gelb	Knorpel, Osteoid
grün (satt)	mineralisierter Knochen, Mineralisationskerne (punktförmig), abgelagerte Kalksalze (strukturlos)
hellgrün	alter Knochen
blassgrün oder schwarz	je nach Einbettmedium – avitaler Knochen, nekrotischer Knochen (verwaschen mit schwarzen, kondensierten Osteozyten)

Farbabweichungen von Grün nach Blau innerhalb der histologischen Dünnschliffpräparate sind fotografisch bedingt. Unschärfen innerhalb der Aufnahmen lassen sich aufgrund des unterschiedlichen Schrumpfverhaltens der einzelnen Präparat-Komponenten (Knochen, Bindegewebe, Implantatmaterial) nicht vermeiden. Da der Schafsknochen physiologisch über

eine hohe Lipiddichte verfügt, können bei der Polymerisation Störungen in Form von Blasenbildungen und Lufteinschlüssen auftreten. Aufgrund der Hitzeentwicklung beim Sägen sind Artefakte in den Schliffen und lokale Gewebsveränderungen nicht auszuschließen, sie sind jedoch von vitalen Befunden während der Implantationszeit im Allgemeinen gut zu unterscheiden.



Abbildung 15a: Übersicht über ein koronares Dünnschliffpräparat eines keramischen Probekörpers mit strukturierter Oberfläche und zusätzlicher Plasmabeschichtung nach vier Wochen (Kerschbaumer, Endbericht „Direct to Bone“).

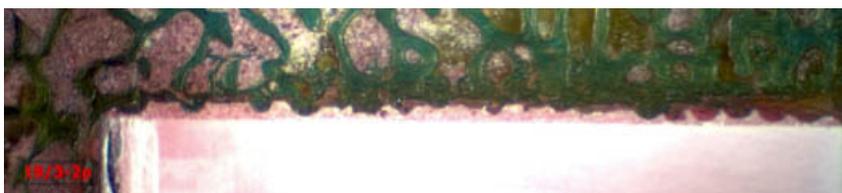


Abbildung 15b: Vergrößerung der proximalen Knochen-Implantat-Kontaktzone aus Abbildung 15a (Kerschbaumer, Endbericht „Direct to Bone“).



Abbildung 15c: Vergrößerung der distalen Knochen-Implantat-Kontaktzone aus Abbildung 15a (Kerschbaumer, Endbericht „Direct to Bone“).



Abbildung 16a: Übersicht über ein koronares Dünnschliffpräparat eines keramischen Probekörpers mit strukturierter Oberfläche und zusätzlicher Hydroxylapatit-Beschichtung nach vier Wochen (Kerschbaumer, Endbericht „Direct to Bone“).

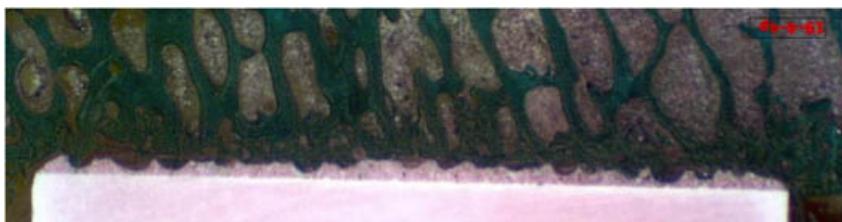


Abbildung 16b: Vergrößerung der proximalen Knochen-Implantat-Kontaktzone aus Abbildung 16a (Kerschbaumer, Endbericht „Direct to Bone“).



Abbildung 16c: Vergrößerung der distalen Knochen-Implantat-Kontaktzone aus Abbildung 16a (Kerschbaumer, Endbericht „Direct to Bone“).

Eine erste histologische Übersicht über die Präparate erfolgte an einem Lichtmikroskop der Art LEICA DMRB. An den fertigen Probepräparaten zeigte sich schließlich bei der Herstellung von Sägeschnitten, dass sie die erwartete Härte von Standard-Keramik bei Weitem übertrafen. Trotz des Einsatzes von Diamantsägebändern betrug die Sägezeit für eine einzige Probe mehrere Tage. Um die sägetechnische Aufarbeitung der Proben zeitlich überschaubar machen zu können, wurde in engster Kooperation mit CeramTec gearbeitet. Die schließlich fertiggestellten histologischen Schnittpräparate wurden mit dem Mikroskop Axiovert 200 und einer ZEISS AxioCam HRC (Software-Versionen ZEISS Axiovision und ZEISS KS 400) dokumentiert. Von jedem einzelnen Schnittpräparat wurde jeweils eine proximale und eine distale Sektion als ZVI-Bild erstellt. Diese – dann jeweils zweifach gegliederten – Schnittbilder wurden schließlich als tiff-Datei einzeln geführt archiviert.

3.3.3.2 Bildbearbeitung

In der Folge wurden die erstellten tiff-Dateien in ein psd-Format transformiert, um nachfolgend histologische und softwaregestützte Bildbearbeitungen durchführen zu können. Damit in der rein histologischen und der nachfolgenden softwaregestützten Evaluierung der Schnittpräparate exakt vergleichbare Ergebnisse erzielt werden können, wurde im ADOBE Photoshop mithilfe eines Rasters die Region of Interest (ROI) definiert: Alle Implantate wurden gleich lang gewählt. Im Bildbearbeitungsprogramm wurde zunächst in einem ersten Layer im Bereich der seitlichen Knochen-Implantat-Grenze an der linken wie auch an der rechten Marginalzone eine vier Pixel starke rote 500µm-Randmarke gesetzt (Abbildung 17a).

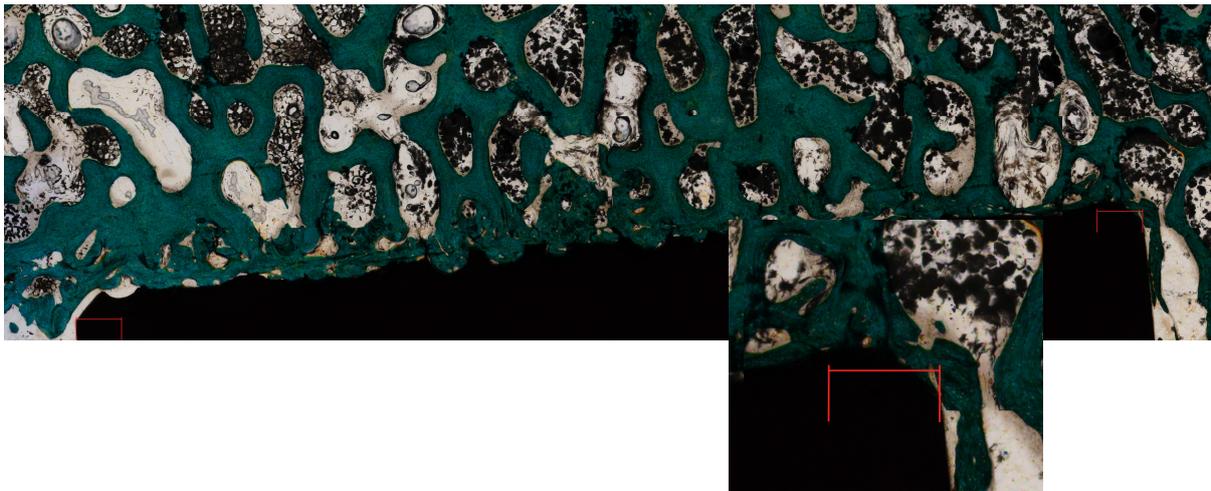


Abbildung 17a: Präparat 8-8, Bildbearbeitung Schritt 1; mit Ausschnittvergrößerung des rechten Bildteils.

Die Knochen-Implantat-Grenze (Interface) wurde anschließend in einem weiteren Layer mithilfe einer vier Pixel starken gelben Linienmarke exakt nachgezogen (Abbildung 17b).

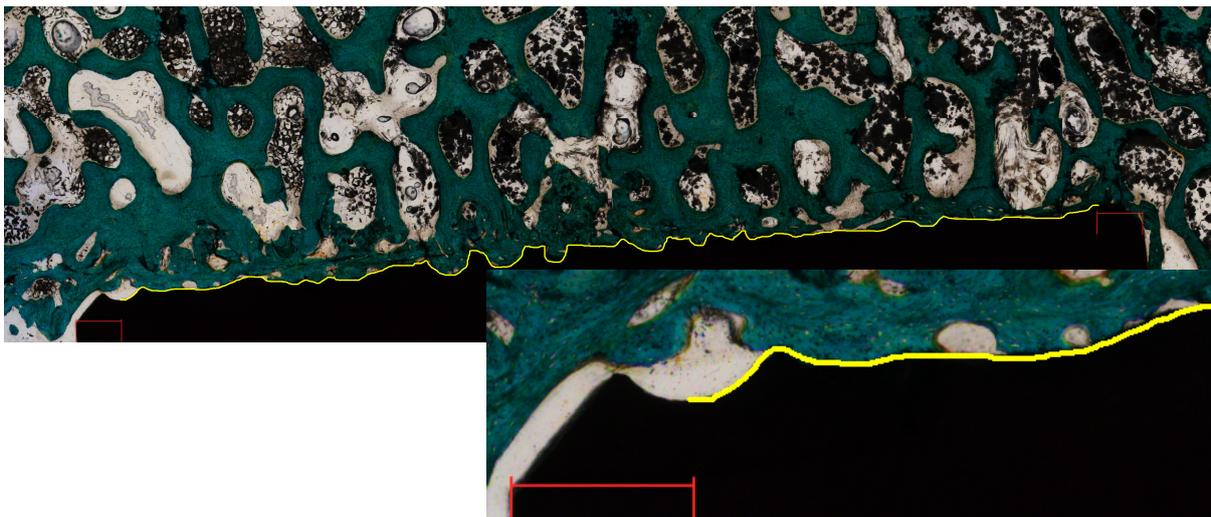


Abbildung 17b: Präparat 8-8, Bildbearbeitung Schritt 2; mit Ausschnittvergrößerung des linken Bildteils.

Vom inneren Rand der 500 μ m-Marke wurde beidseitig eine auf der gelben Linie fußende 1000 μ m lange Gerade in Richtung Knochengewebe positioniert, die dann im Anschluss durch eine weitere – horizontal gesetzte – rote Markierungslinie miteinander verbunden wurden. Aus dieser roten U-Form und der gelben Linie ergab sich durch die genannten Bearbeitungsschritte eine geschlossene Form – die ROI (Abbildung 17c).

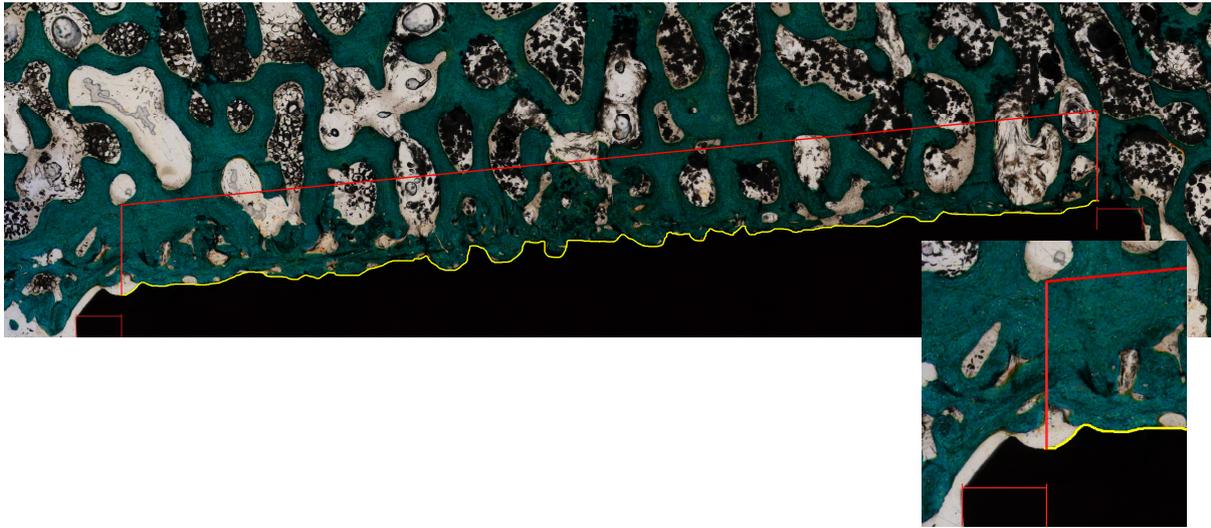


Abbildung 17c: Präparat 8-8, Bildbearbeitung Schritt 3 und 4; mit Ausschnittvergrößerung des linken Bildteils.

Die während der Einbettung entstandenen schwarzen Artefaktzonen (Lufteneinschlüsse etc.) wurden in einem dritten Layer mittels manuellem Einzug weißer Flächenzonen im Nachhinein kaschiert (Abbildung 17d).

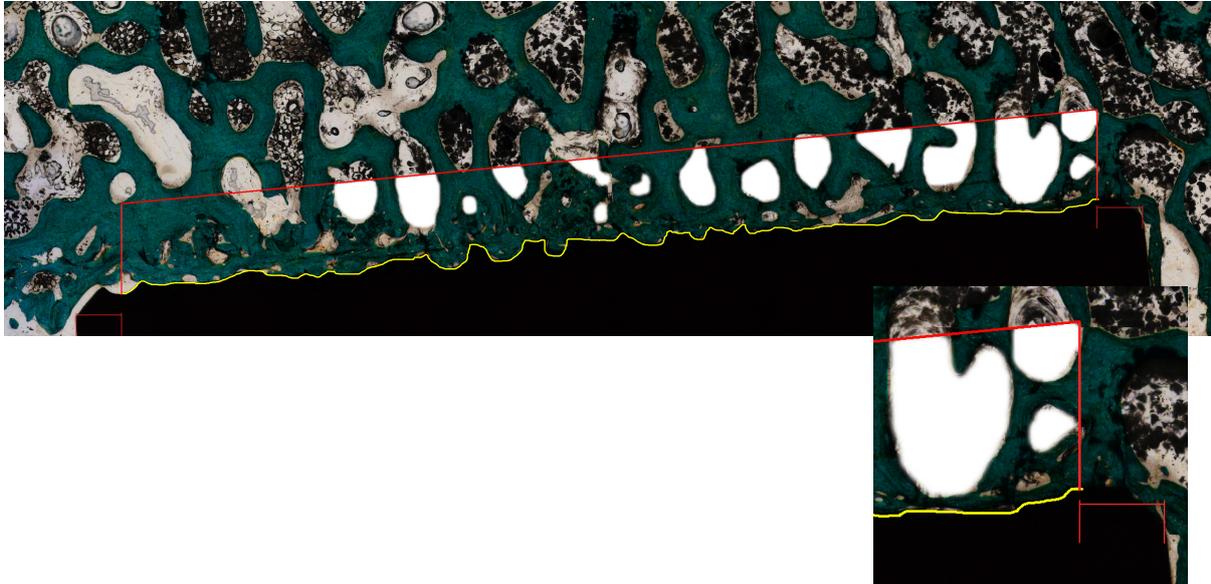


Abbildung 17d: Präparat 8-8, Bildbearbeitung Schritt 5; mit Ausschnittvergrößerung des rechten Bildteils.

Diese Vorarbeiten erlaubten ein weitgehend fehlerfreies Arbeiten der verwendeten Evaluierungs-Software. Des Weiteren gewährleisteten diese Vorarbeiten eine genauere Vergleichbarkeit der histologisch und softwaregestützt auszuwertenden Daten.

3.3.3.3 Score zur histologischen Auswertung

Die auf diese Art und Weise vorbearbeiteten Dateien bzw. ihre Einzelausschnitt-Sektionen wurden durch Direktaufruf am Computerbildschirm anhand verschiedener spezifischer histologischer Bildmerkmale via Bildschirm eindeutig wieder miteinander „verbunden“ und schließlich evaluiert. Da für die Zwecke dieser Dissertation auf keinen verfügbaren international verifizierten Score zurückgegriffen werden konnte, musste ein solcher entsprechender individuell gültiger Score entwickelt werden: Die bereits im Tiermodell installierte Gruppenzuordnung zu einer 4-Wochen- und einer 12-Wochen-Gruppe und die etablierte Zahlen-Nomenklatur der einzelnen Präparate fanden schließlich auch im Score Anwendung. Dabei erfolgte die Zuordnung und Auswertung eines jeden Präparats durch die Untergliederung in einen proximalen und einen distalen Teil nach folgendem Schema: „Präparat/Schaf 11-8“ → „Bild 644“ und „Bild 645“. Des Weiteren wurden die einzelnen Bilddateien ihrer Zugehörigkeit nach in die Gruppen „Unstrukturierter Probekörper“, „Strukturierter Probekörper“, „Struktur + RGD-Peptide“, „Struktur + Hydroxylapatit“ und „Struktur + Plasma“ gegliedert. Alle diese Gruppen wurden hinsichtlich der folgenden histologischen Parameter untersucht: Anzahl der Osteoblasten mit Implantatkontakt, Anzahl der ossären Trabekel, Spongiosa, ossäre Nekrosen und Nachbildung der Implantatoberfläche. Die histologische Auswertung einzelner Osteoblasten erfolgte aufgrund ausgedehnter Zytoplasmaräume und eines gut sichtbaren Nukleus. Angeschnittene oder unklare zelluläre Strukturen blieben konsequent ungezählt (Abbildung 18).

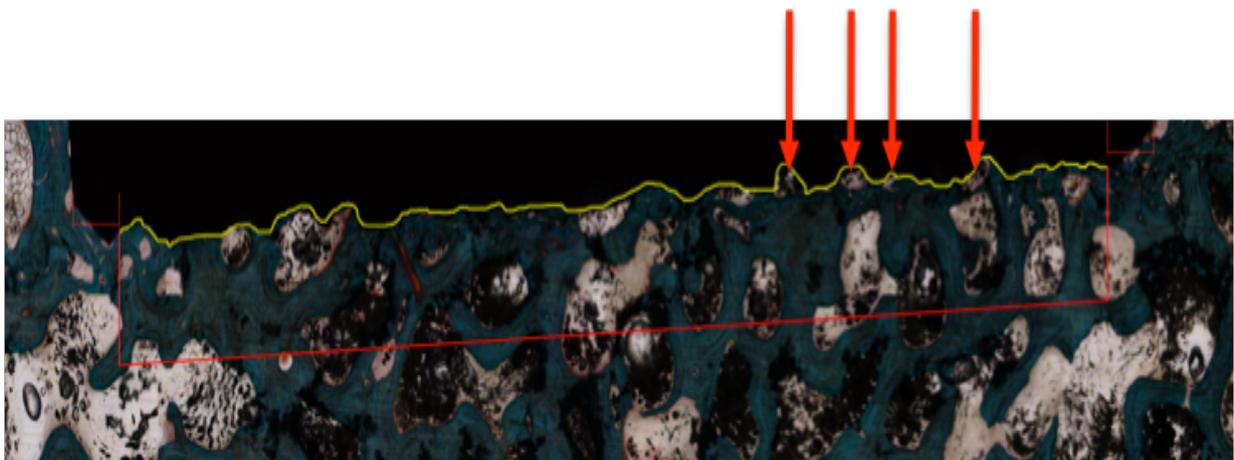


Abbildung 18: Histomorphologisch auszählbare vitale Osteoblasten im Bereich des direkten Knochen-Implantat-Überganges (rote Pfeile) innerhalb des gesetzten Rasters.

Homogene Matrizes, einheitliche und flächenhafte K2-gefärbte Areale wurden als stabile ossäre Trabekel bzw. Spongiosa ausgezählt (Abbildung 19).

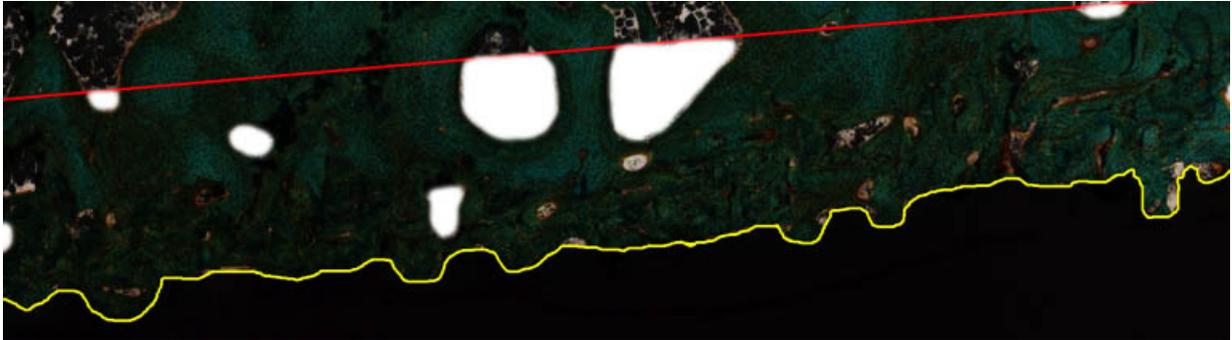


Abbildung 19: Exemplarischer Präparateausschnitt: dicht angeordnete stabil-ossäre Trabekel in direktem Kontakt mit der schwarzen Implantatoberfläche.

Bei den Parametern ossäre Nekrosen (Abbildung 20) und Nachbildung der Implantatoberfläche (Abbildung 21) erfolgte zusätzlich eine Einstufung der ausgewerteten Ergebnisse hinsichtlich ihrer augenscheinlichen Ausprägung:

Ossäre Nekrosen	++	=	hochgradig bis mittelgradig eingestufte Nekrose
Ossäre Nekrosen	+	=	geringgradig eingestufte Nekrose
Ossäre Nekrosen	-	=	keine Nekrose

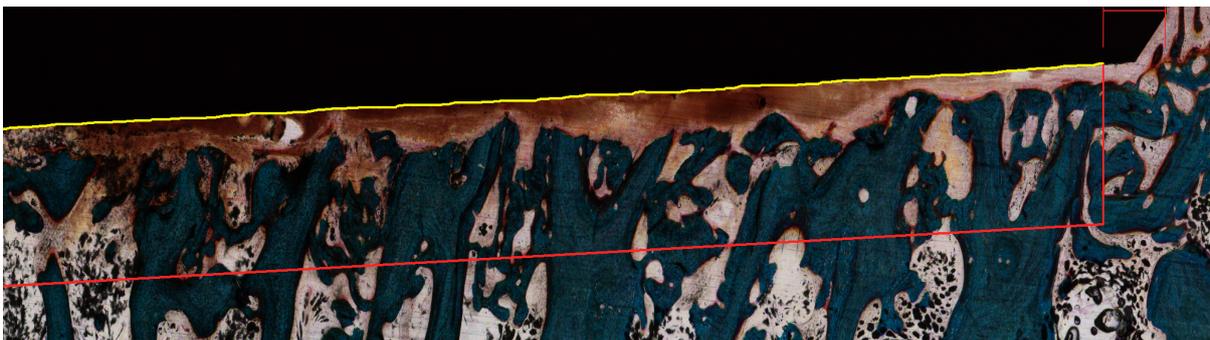


Abbildung 20: Exemplarischer Präparateausschnitt: Ossäre Nekrosen; ++ hochgradig ossäre Nekrosen

Nachbildung der Implantatoberfläche	-	=	keine Nachbildung
Nachbildung der Implantatoberfläche	±	=	ungleichmäßige Nachbildung
Nachbildung der Implantatoberfläche	+	=	gleichmäßige Nachbildung

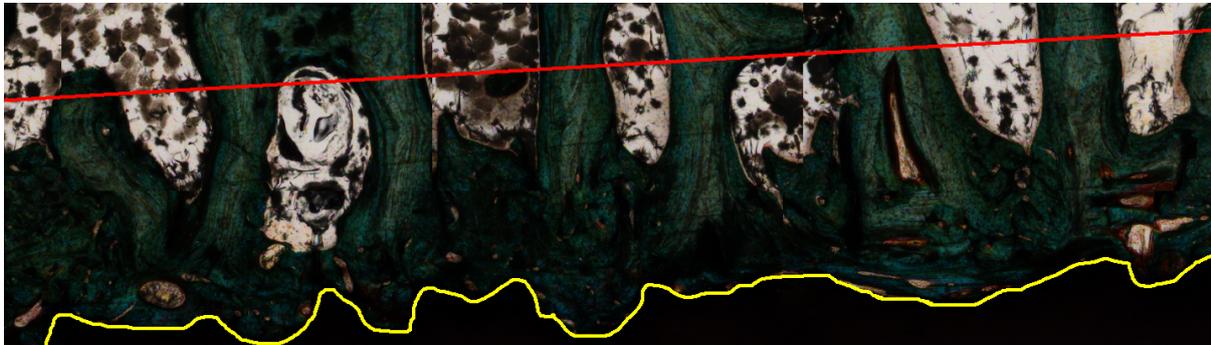


Abbildung 21: Exemplarischer Präparatausschnitt: Nachbildung der Implantatoberfläche; + = gleichmäßige Nachbildung.

An dieser Stelle sei erneut ausdrücklich darauf hingewiesen, dass jeweils ein proximaler und ein distaler Bildausschnitt innerhalb der Evaluierung zu berücksichtigen sind und sich die Scores damit aus jeweils zwei Teilen zusammenfügen.

Beispiel:

„Präparat/Schaf 11-8“

„Ossäre Nekrosen: proximal -/distal -“

„Nachbildung der Implantatoberfläche: proximal ±/distal +“.

In der endgültigen Auswertung dieser Score-Ergebnisse erfolgt die Auswertung der ossären Nekrosen – in Kombination beider Bildteile – jeweils nach dem Schema: ++/++ (bedeutet: „proximaler Bildteil ++“ und „distaler Bildteil ++“) hochgradig; +/++ (bedeutet: „proximaler Bildteil +“ und „distaler Bildteil ++“) stark; +/+ mittelgradig; ++/- mittelgradig partiell; +/- partiell; -/- keine Nekrose (vgl. Tabelle 6 und 7). Die Auswertung der Nachbildung der Implantatoberfläche erfolgt jeweils nach dem Schema: +/+ sehr gut; +/- gut; ±/± mittelgradig; +/- geringgradig; ±/- mangelhaft; -/- fehlt, keine Nachbildung der Oberfläche (vgl. Tabelle 6 und 7).

3.3.4 Softwaregestützte Auswertung

3.3.4.1 Bildbearbeitung und Auswertung

Die in der Vorbearbeitung (in Punkt 3.3.3.2. definierte Bildbearbeitungsschritte) erzeugten psd-Dateien wurden des Weiteren in einem vierten Layer mit einer zusätzlichen schwarzen Hintergrundebene versehen, um den Bildhintergrund der Präparate auszublenden. Die 500µm-Marken wurden ebenfalls ausgeblendet, sodass in diesen Dateien nur der geschlossene rot-gelbe Raster-Rahmen, also die Layer-Information, sichtbar war. Anschließend wurden die psd-Dateien in tiff-Dateien transformiert.

Die Evaluierung der so erzeugten Bilddateien erfolgte mithilfe eines Software-Macros KS 400 der Firma ZEISS. In einem ersten Schritt wurden jeweils das ZVI-Originalbild und die dazugehörige, mittels Photoshop erzeugte tiff-Datei aufgerufen und eingelesen. Aus dem jeweiligen ZVI-Bild wurden Bildinformation und Metadaten (z.B. Pixelgröße, Pixelanzahl) übernommen. Das jeweilige tiff-Bild lieferte die ROI und die Artefakt-Zonen. Mittels Setzen von zwei Schwellenwerten (Thresholds) wurde jeweils die Knochen- und Implantatfläche bestimmt. Dies geschah mittels manueller Einstellung von RGB-Farbwerten (Rot, Grün, Blau), um Knochen bzw. Nichtknochen und Implantat bzw. Nichtimplantat zu kennzeichnen. Auf diese Weise konnten die zuvor definierten Parameter, die relative Knochendichte (Bone) in Prozent innerhalb der ROI und der relative Knochen-Implantat-Kontakt (BIC) in Prozent an der Implantatoberfläche berechnet und ausgewertet werden.

Die so generierten Ergebnisse wurden für jede Schnitthälfte in Excel gelistet. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem t-Test, wenn die Werte den Test auf Normalverteilung bestanden. Wenn die Werte nicht normal verteilt waren oder der Test auf gleiche Varianz fehlschlug, wurde der Mann-Whitney-Rangsummentest verwendet. P-Werte $< 0,05$ galten als signifikant. Die ermittelten Daten wurden statistisch evaluiert und in passende Box-Plot-Diagramme transformiert.

4. Ergebnisse

4.1 Biomechanische Ergebnisse

Die gesamten Ergebnisse der – in der Vorarbeit zu dieser Dissertation durchgeführten – Push-out-Tests der 4-Wochen-Gruppe und der 12-Wochen-Gruppe sind in Tabelle 4 und 5 dargestellt. In keiner der Proben konnten makroskopisch Anzeichen einer Fraktur, Deformation oder Infektion festgestellt werden.

Tabelle 4: Ergebnisse der Push-out-Tests der 4-Wochen-Gruppe (n= 48) in Newton [N] (RGD = Peptide aus der L-Aminosäuresequenz Arginin, Glyzin und Aspartat, (internationaler Einbuchstaben-Nomenklatur-Code RGD); HA = Hydroxylapatit).

	Oberflächentyp				
	unstrukturiert	strukturiert	Struktur + RGD	Struktur + HA	Struktur + Plasma
Schaf Nr.					
11	327	3400	-	2329	3250
12	575	2850	-	1446	1345
15	352	1408	-	657	1277
16	247	1105	-	1782	1566
17	20	2048	1694	-	-
17	-	-	1919	-	-
18	40	1839	2201	-	-
18	-	-	2286	-	-
19	242	1571	-	2220	863
20	17	771	-	2028	536
21	161	2114	-	1360	1524
22	502	594	-	1035	2216
23	59	1112	268	-	-
23	-	-	1062	-	-
24	312	683	885	-	-
24	-	-	1491	-	-
gesamt	2854	19495	11806	12857	12577
mean	237,83	1624,58	1475,75	1607,13	1572,13
SD +/-	186,67	872,73	697,51	588,16	840,69
max.	575	3400	2286	2329	3250
min.	17	594	268	657	536

Tabelle 5: Ergebnisse der Push-out-Tests der 12-Wochen-Gruppe (n= 48) in Newton [N] (RGD = Peptide aus der L-Aminosäuresequenz Arginin, Glyzin und Aspartat, (internationaler Einbuchstaben-Nomenklatur-Code RGD); HA = Hydroxylapatit)

	Oberflächentyp				
	unstrukturiert	strukturiert	Struktur + RGD	Struktur + HA	Struktur + Plasma
Schaf Nr.					
1	579	3351	-	2841	3042
2	225	4170	-	1611	3322
3	451	2803	-	1862	2561
4	296	3602	-	2320	2588
5	360	2330	-	1649	3038
6	589	3504	-	3691	4409
7	480	4261	3343	-	-
7	-	-	3149	-	-
8	573	3558	559	-	-
8	-	-	4744	-	-
9	204	2413	-	1282	1703
10	368	1770	-	3097	4890
13	366	1998	3368	-	-
13	-	-	3616	-	-
14	547	3584	3644	-	-
14	-	-	3146	-	-
gesamt	5038	37344	25569	18353	25553
mean	419,83	3112	3196,13	2294,13	3194,13
SD +/-	137,25	828,46	1182,19	844,27	1028,69
max.	589	4261	4744	3691	4890
min.	204	1770	559	1282	1703

Bei der Detailanalyse der Ergebnisse ergaben sich folgende Schlussfolgerungen: Bei dem Vergleich der Ausdruckkräfte der vier strukturierten Oberflächenkonfigurationen (strukturiert mit Porendurchmesser = 520–660 µm; strukturiert mit RGD-Peptid beschichtet; strukturiert mit Hydroxylapatit beschichtet; strukturiert mit Plasma-Aktivierung beschichtet) zeigten sich nach einer Implantationszeit von vier Wochen sehr einheitliche Werte ohne statistisch signifikante Unterschiede für alle strukturierten Oberflächen unabhängig davon ob zusätzliche bioaktive Oberflächenmodifikationen vorgenommen wurden (Tabelle 4).

Ein analoges Ergebnis ohne statistisch signifikante Unterschiede zeigte sich ebenfalls für alle strukturierten Proben nach einer Implantationszeit von zwölf Wochen (Tabelle 5). Daraus ergibt

sich, dass in der vorliegenden Untersuchung kein signifikanter Einfluss der bioaktiven Beschichtungen auf die ossäre Integration der Implantate – zumindest nach einem Zeitraum von vier Wochen – feststellbar ist. Werden andererseits die Proben ohne zusätzliche bioaktive Beschichtungen nur mit dem Unterschied „strukturiert“ (mit Porendurchmesser = 520–660 μm) und „unstrukturiert“ (= glatte Keramikoberfläche) verglichen, ergeben sich hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,00002$) sowohl in der 4-Wochen- als auch der 12-Wochen-Gruppe (Tabelle 4 und 5). Daraus ergibt sich die überragende biologische Bedeutung der geometrischen Oberflächenstruktur, die die potenziellen zusätzlichen Vorteile einer bioaktiven Beschichtung überdeckt (Burgkart et al. 2009a, b).

Push-out-Analyse

[N]

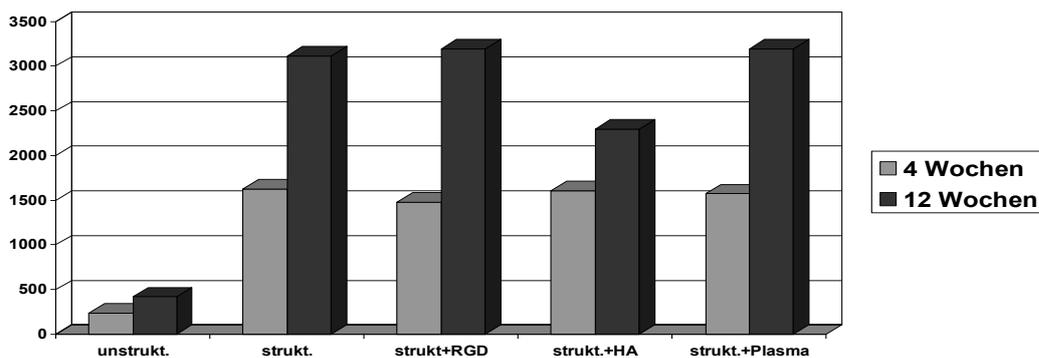


Abbildung 22: Ergebnisse der Push-out-Tests der 4- und der 12-Wochen-Gruppe (je $n = 48$) in Newton [N] (Bild im Rahmen des Projekts „Direct to Bone“).

Ein weiteres relevantes Ergebnis ist die Tatsache, dass sich bei allen fünf Oberflächenvarianten ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem jeweiligen 4-Wochen- und dem 12-Wochen-Wert innerhalb der gleichen Oberfläche zeigte (Abbildung 22). Dabei waren die Werte nach zwölf Wochen regelhaft doppelt so hoch wie die Werte nach vier Wochen mit Ausnahme der strukturierten Probekörper mit Hydroxylapatitbeschichtung, die „nur“ um den Faktor 1,4 höhere Werte aufwiesen. Dieses Ergebnis ist besonders bemerkenswert für die unstrukturierten Keramikkörper, da dies bedeutet, dass dennoch eine biomechanisch relevante, engere Kontaktaufnahme zwischen dem umgebenden Knochen und dem Implantat auch bei relativ glatten Oberflächen erfolgt.

4.2 Histologische Ergebnisse

Die histologische Auswertung wurde konsequent nach den im Score definierten Parametern (vgl. Kapitel 3.3.3.3 Score zur histologischen Auswertung) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte in der Reihenfolge: Anzahl der Osteoblasten mit Implantatkontakt, Anzahl der ossären Trabekel, Spongiosa, ossäre Nekrosen, Nachbildung der Implantatoberfläche. Die Listung der Ergebnisse erfolgte in tabellarischer Form (Tabellen 6 und 7).

Tabelle 6: Ergebnisse der histologischen Auswertung der 4-Wochen-Gruppe.

Histologie	Anzahl der Osteoblasten mit Implantatkontakt		Anzahl der ossären Trabekel, Spongiosa		Ossäre Nekrosen		Nachbildung der Implantatoberfläche	
	proximal	distal	proximal	distal	proximal	distal	proximal	distal
4-Wochen-Gruppe								
Unstrukturierter Probekörper								
11-8 (644/645)	0	0	8	13	-	-	±	+
12-8 (630/631)	1	0	3	3	-	-	±	±
15-4 (655/657)	0	0	0	0	-	+	-	-
16-4 (666/667)	2	0	8	0	-	+	±	-
17-8 (679/681)	1	0	4	0	-	++	-	-
18-7 (685/686)	0	0	0	0	-	-	-	-
19-7	Präparat zerstört							
20-7 (730/733)	0	0	4	1	+	++	±	-
21-3 (738/739)	3	1	10	6	-	-	±	±
22-3 (748/749)	1	0	6	0	-	+	-	-
23-4 (756/757)	0	0	5	3	-	++	±	-
24-3 (767/768)	1	0	8	2	-	+	+	-
Summe	9	1	56	28				

Fortsetzung Tabelle 6: Ergebnisse der histologischen Auswertung der 4-Wochen-Gruppe.

Histologie	Anzahl der Osteoblasten mit Implantatkontakt		Anzahl der ossären Trabekel, Spongiosa		Ossäre Nekrosen		Nachbildung der Implantatoberfläche	
	proximal	distal	proximal	distal	proximal	distal	proximal	distal
4-Wochen-Gruppe								
Strukturierter Probekörper								
11-7 (642/643)	0	0	8	5	-	-	±	±
12-7 (632/633)	1	0	12	5	-	-	+	-
15-3 (652/653)	6	5	6	9	-	+	±	±
16-3 (663/664)	2	1	5	6	+	+	±	±
17-7 (683/684)	3	2	11	6	+	-	±	-
18-8 (688/689)	3	1	16	18	-	-	+	+
19-8	Präparat zerstört							
20-8 (734/737)	3	3	5	9	+	+	±	+
21-4 (741/743)	1	0	15	6	-	-	+	±
22-4 (750/751)	1	3	12	4	-	++	+	±
23-3 (758/760)	3	0	4	2	-	-	±	±
24-4 (765/766)	2	0	2	1	+	++	±	±
Summe	25	15	106	71				
Struktur + RGD-Peptide								
17-3 (676/678)	1	1	12	12	-	-	+	+
17-4 (674/675)	2	1	6	13	-	-	-	±
18-3 (693/694)	1	2	2	6	-	-	±	±
18-4 (695/696)	2	1	6	3	-	+	+	±
23-7 (763/764)	0	0	13	5	-	-	+	±
23-8 (761/762)	1	1	8	7	-	-	+	+
24-7 (769/770)	3	0	4	0	-	-	+	-
24-8 (771/772)	2	2	9	7	-	-	±	±
Summe	12	8	60	53				
Struktur + Hydroxylapatit								
11-3 (639/638)	3	3	10	5	+	+	+	±
12-3 (650/651)	0	0	7	0	-	-	±	-
15-7 (658/659)	0	0	9	6	-	-	+	±
16-7 (671/773)	2	0	9	6	-	-	+	±
19-4 (697/699)	5	0	8	5	+	+	±	-
20-4 (725/727)	3	1	3	0	+	+	-	-
21-8 (744/745)	4	3	12	15	-	-	+	+
22-8 (754/755)	0	0	9	10	-	-	+	+
Summe	17	7	67	47				

Fortsetzung Tabelle 6: Ergebnisse der histologischen Auswertung der 4-Wochen-Gruppe.

Histologie	Anzahl der Osteoblasten mit Implantatkontakt		Anzahl der ossären Trabekel, Spongiosa		Ossäre Nekrosen		Nachbildung der Implantatoberfläche	
	proximal	distal	proximal	distal	proximal	distal	proximal	distal
4-Wochen-Gruppe								
Struktur + Plasma								
11-4 (636-641)	1	1	10	6	+	+	±	±
12-4 (646/648)	0	0	15	7	-	-	+	-
15-8 (661/662)	4	0	7	2	+	-	±	±
16-8 (668/670)	4	1	7	9	-	-	±	±
19-3 (713/715)	2	1	7	9	-	-	±	+
20-3 (728/729)	5	1	0	1	-	-	-	-
21-7 (746/747)	1	1	12	10	-	-	±	±
22-7 (752/753)	0	0	9	2	-	-	±	-
Summe	17	5	67	46				

Tabelle 7: Ergebnisse der histologischen Auswertung der 12-Wochen-Gruppe.

Histologie	Anzahl der Osteoblasten mit Implantatkontakt		Anzahl der ossären Trabekel, Spongiosa		Ossäre Nekrosen		Nachbildung der Implantatoberfläche	
	proximal	distal	proximal	distal	proximal	distal	proximal	distal
12-Wochen-Gruppe								
Unstrukturierter Probekörper								
1-8 (442/443)	0	1	2	12	-	-	±	+
2-8 (478/479)	1	2	5	12	+	-	±	+
3-4 (474/475)	0	0	4	12	-	-	±	+
4-4 (490/491)	0	0	2	0	-	++	-	-
5-7 (458/460)	0	0	10	10	-	-	+	+
6-7 (461/462)	1	1	8	11	-	-	+	+
7-8 (454/455)	0	0	3	2	-	-	-	-
8-7 (504/505)	0	0	10	5	-	++	±	-
9-3 (508/510)	0	0	2	0	+	++	-	-
10-3 (517/518)	0	0	11	12	-	-	+	+
13-4 (527/528)	0	0	12	6	-	-	+	+
14-3 (533/534)	0	0	11	13	-	-	+	±
Summe	2	4	80	95				

Fortsetzung Tabelle 7: Ergebnisse der histologischen Auswertung der 12-Wochen-Gruppe.

Histologie	Anzahl der Osteoblasten mit Implantatkontakt		Anzahl der ossären Trabekel, Spongiosa		Ossäre Nekrosen		Nachbildung der Implantatoberfläche	
	proximal	distal	proximal	distal	proximal	distal	proximal	distal
12-Wochen-Gruppe								
Strukturierter Probekörper								
1-7 (440/441)	2	0	14	8	-	+	+	-
2-7 (476/477)	1	0	13	5	-	-	+	-
3-3 (472/473)	0	0	10	6	-	-	±	-
4-3 (488/489)	1	0	14	7	-	+	+	±
5-8 (456/457)	0	0	2	6	-	-	-	±
6-8 (464/465)	0	0	11	9	+	+	±	±
7-7 (452/453)	1	0	11	3	-	-	±	-
8-8 (506/507)	0	0	14	13	-	-	+	+
9-4 (511/512)	0	0	0	1	++	+	-	-
10-4 (519/520)	0	0	7	6	-	-	-	-
13-3 (525/526)	0	0	12	4	-	-	-	-
14-4 (535/536)	0	0	5	7	-	-	±	-
Summe	5	0	113	75				
Struktur + RGD-Peptide								
7-3 (448/449)	1	0	6	8	-	-	-	±
7-4 (450/451)	1	0	15	7	-	-	+	-
8-3 (500/501)	0	0	14	15	-	-	+	+
8-4 (502/503)	1	0	13	13	-	-	±	±
13-7 (529/530)	0	1	13	10	-	-	±	±
13-8 (531/532)	1	1	8	16	+	-	±	+
14-7 (537/538)	1	1	12	11	-	-	±	±
14-8 (539/540)	1	1	9	9	-	-	±	±
Summe	6	4	90	89				
Struktur + Hydroxylapatit								
1-3 (436/437)	1	1	0	4	+	+	-	±
2-3 (468/469)	2	1	18	16	-	-	+	+
3-7 (480/481)	1	1	9	7	-	-	±	±
4-7 (492/493)	4	3	11	6	-	+	±	±
5-4 (498/499)	1	0	5	9	+	-	±	±
6-4 (446/447)	2	1	14	12	-	-	+	+
9-8 (515/516)	2	4	7	11	-	-	-	±
10-8 (523/524)	2	0	13	7	-	-	+	±
Summe	15	11	77	72				

Fortsetzung Tabelle 7: Ergebnisse der histologischen Auswertung der 12-Wochen-Gruppe.

Histologie	Anzahl der Osteoblasten mit Implantatkontakt		Anzahl der ossären Trabekel, Spongiosa		Ossäre Nekrosen		Nachbildung der Implantatoberfläche	
	proximal	distal	proximal	distal	proximal	distal	proximal	distal
12-Wochen-Gruppe								
Struktur + Plasma								
1-4 (438/439)	1	0	11	7	-	-	+	-
2-4 (470/471)	4	1	8	6	-	-	±	-
3-8 (482/483)	1	2	8	9	-	-	±	±
4-8 (494/495)	2	2	9	8	-	-	±	±
5-3 (496/497)	5	2	13	10	-	-	+	+
6-3 (444/445)	2	0	12	14	-	-	+	+
9-7 (513/514)	2	0	8	4	-	-	-	-
10-7 (521/522)	5	2	15	11	-	-	+	+
Summe	22	9	84	69				

Bildtafeln zur Übersicht über verschiedene histomorphologische Ergebnisse nach jeweils vier Wochen Versuchsablauf und bereits erfolgter Bildbearbeitung.

4-Wochen-Gruppe:

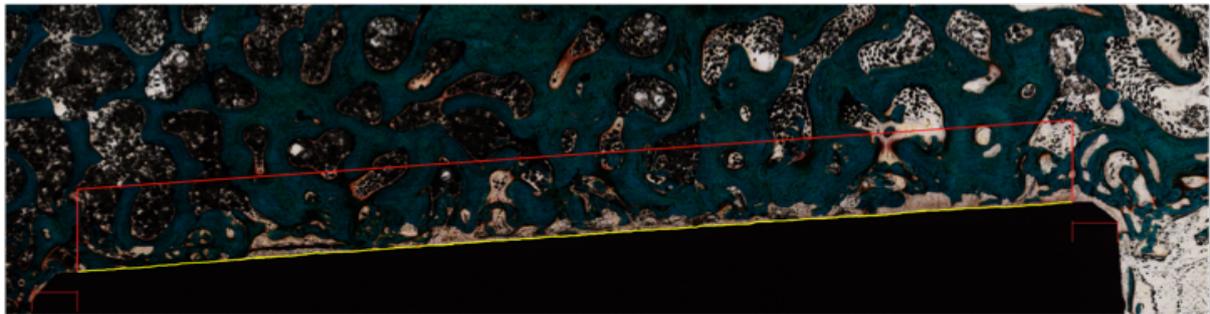


Abbildung 23: Unstrukturierter Probekörper – Drei Osteoblasten berühren die Implantatoberfläche; Bild 738.

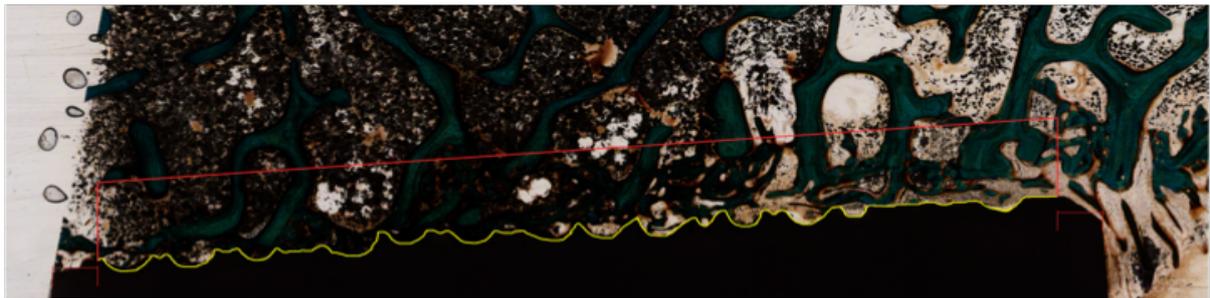


Abbildung 24: Strukturierter Probekörper – sechs Osteoblasten mit Implantatoberflächenkontakt und eine Vielzahl von ossären Trabekeln; Bild 652.

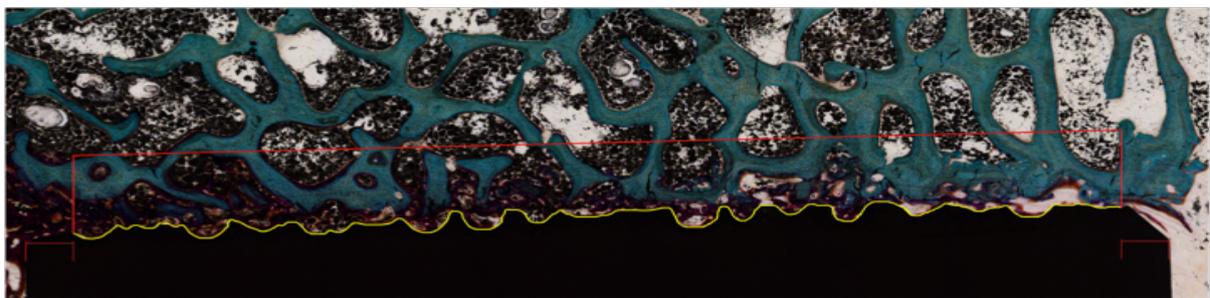


Abbildung 25: Strukturierter Probekörper + RGD-Peptide – Gelungene ossäre Nachbildung des Interface durch eine Vielzahl von Trabekeln; Bild 769.

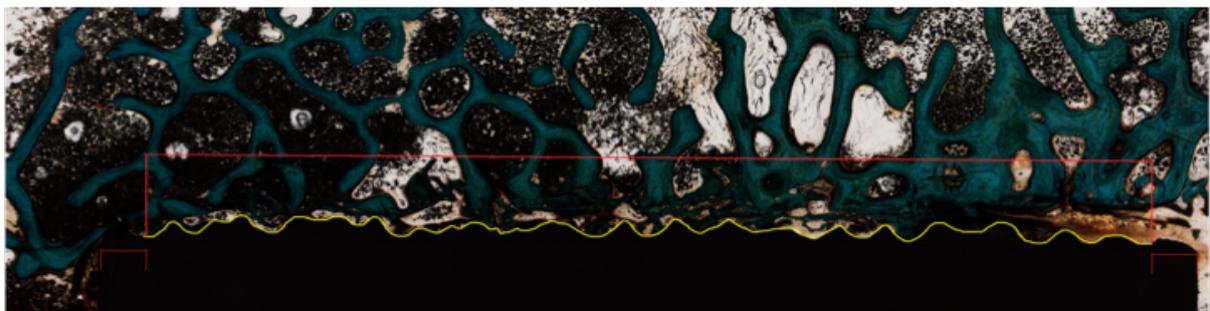


Abbildung 26: Strukturierter Probekörper + HA – Partielle ossäre Nekrosezone an der marginalen Knochen-Implantat-Grenze; Bild 697.

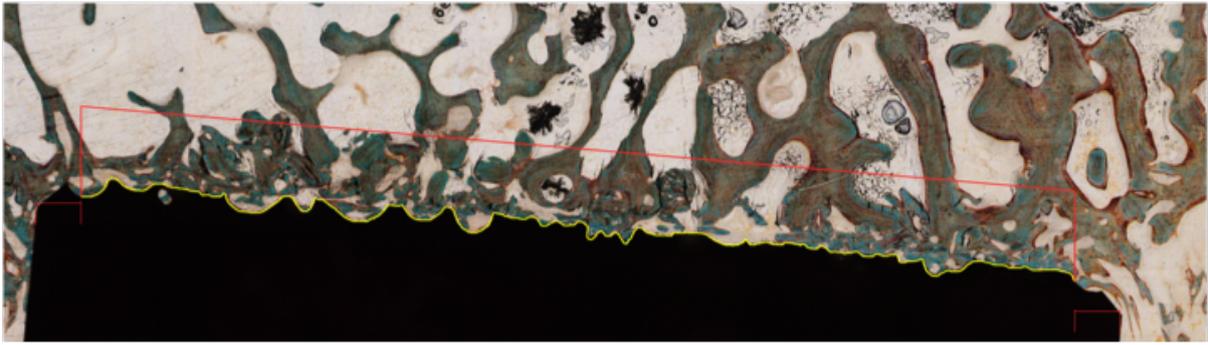


Abbildung 27: Strukturierter Probekörper + Plasma – Kleine und große stabil-ossäre Trabekel mit direktem Interface-Kontakt; Bild 636.

Die Abbildungen 23 bis 27 zeigen, dass in der 4-Wochen-Gruppe beste Einheilergebnisse der Implantate im Bereich der strukturierten Probekörper gefunden werden. Insbesondere die Zahl der mit dem Implantat in direktem Kontakt stehenden Osteoblasten kann durch Strukturgebung der Implantatoberfläche deutlich erhöht und aktiviert werden. Die damit verbundene stabilere Genese von dicht zum Implantat-Interface stehenden ossären Trabekeln ist eine der gewünschten Konsequenzen und Postulate der Strukturierung der Implantatkörperoberflächen. Die zusätzlich angebrachte Beschichtung aus RGD-Peptiden, Hydroxylapatit und Plasma scheint eine nur untergeordnete Rolle zu spielen – deutliche Verbesserungen des Implantationsergebnisses können nicht erzielt werden.

Bildtafeln zur Übersicht über verschiedene histomorphologische Ergebnisse nach jeweils zwölf Wochen Versuchsablauf und bereits erfolgter Bildbearbeitung.

12-Wochen-Gruppe:

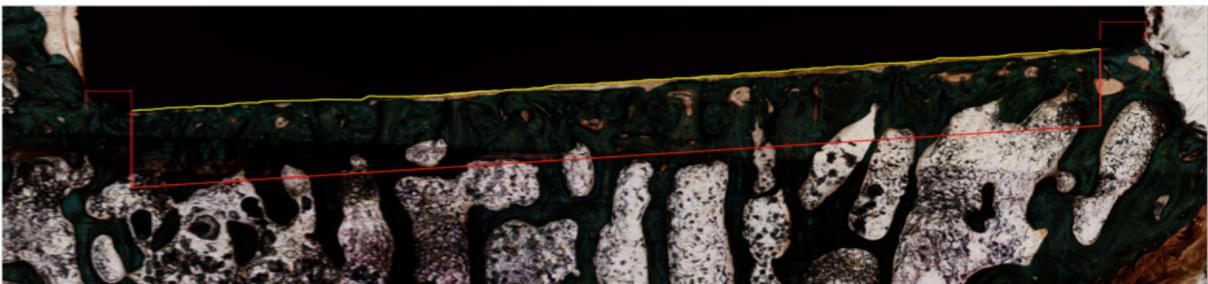


Abbildung 28: Unstrukturierter Probekörper – Deutliche ossär-verdichtete Nachbildung der Knochen-Implantat-Grenze; Bild 534.

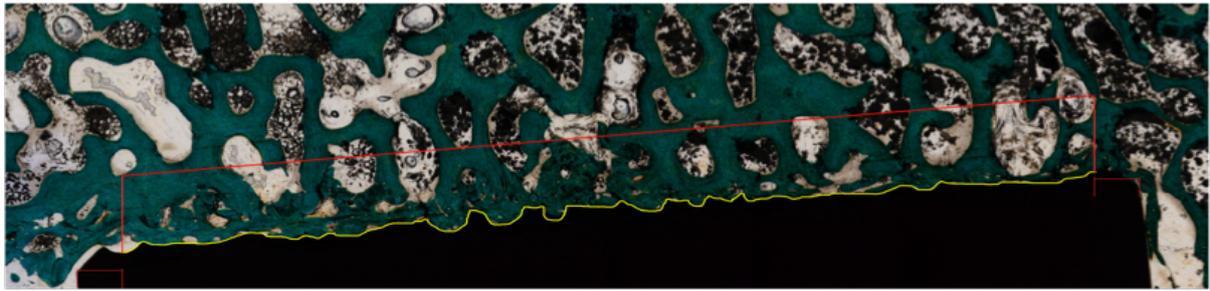


Abbildung 29: Strukturierter Probekörper – Besonders gleichmäßige Nachbildung der Implantatoberfläche in die Marginalzone hinein; Bild 506.

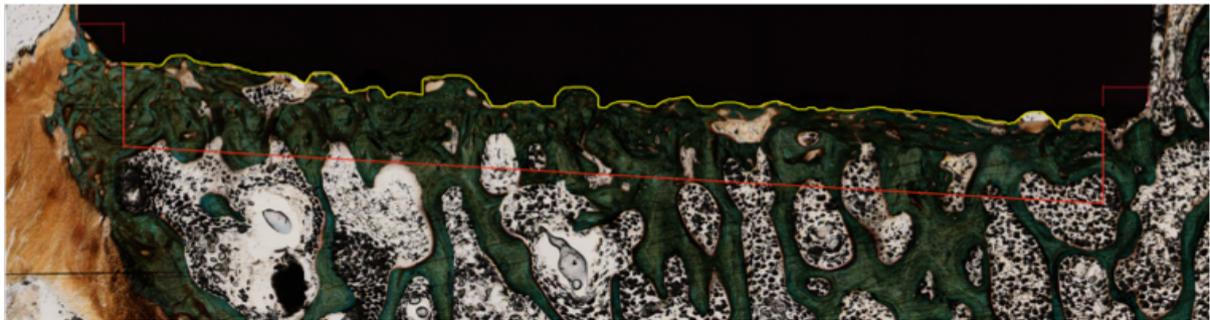


Abbildung 30: Strukturierter Probekörper + RGD-Peptide – 16 dicht ausgebildete ossäre Trabekel stellen einen stabilen Kontakt zum Interface her; Bild 532.

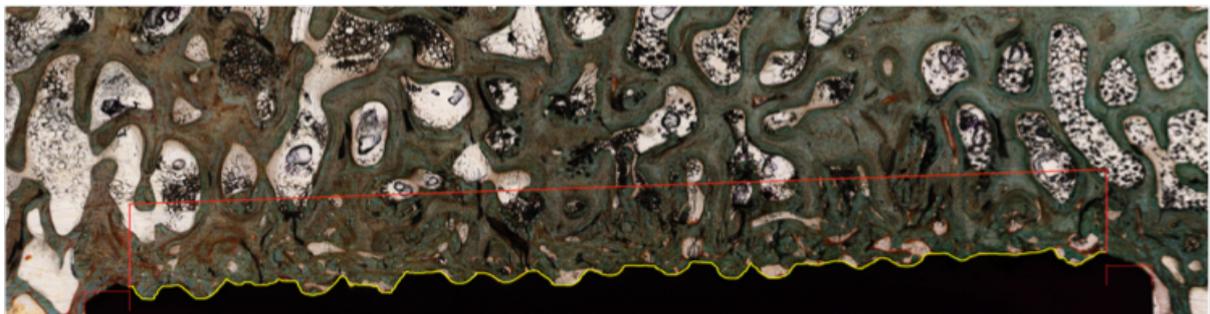


Abbildung 31: Strukturierter Probekörper + HA – 18 ossäre Trabekel berühren hier die Implantatoberfläche mit engstem Kontakt; Bild 468.

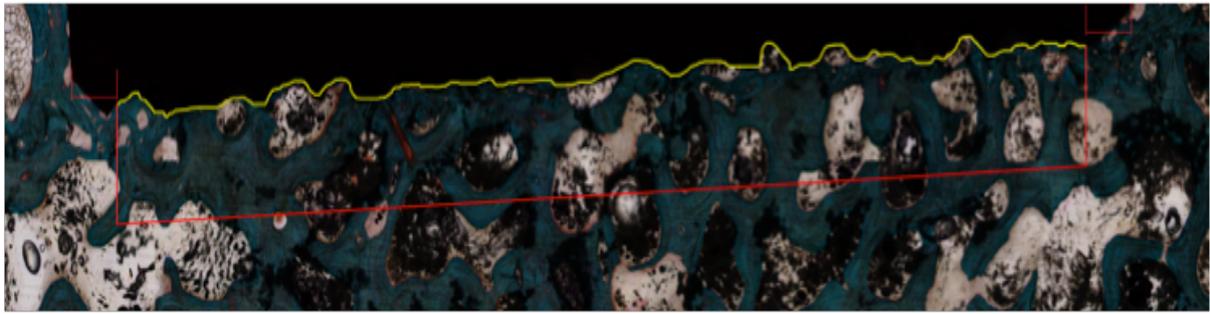


Abbildung 32: Strukturierter Probekörper + Plasma – fünf vitale Osteoblasten haben direkten Kontakt zur Implantatoberfläche und sind umgeben von einer Vielzahl ossärer Trabekel; Bild 496.

In der 12-Wochen-Gruppe sind die Verbesserungen der Ergebnisse der Implantateinheilung im direkten Vergleich zwischen unstrukturierten und strukturierten Implantat-Probekörpern nicht mehr signifikant höher als die Verbesserungen der Einheilungsergebnisse durch zusätzlich zur Struktur angebrachte Oberflächenbeschichtungen aus RGD-Peptiden, Hydroxylapatit und Plasma (Abbildung 28 bis 32). Insbesondere das Auftreten von ossären Marginal- bzw. Zentralnekrosen im direkten Interface kann durch Oberflächenaktivierung des Implantatkörpers deutlich verringert werden. Besonders eindrucksvolle Einheilungsergebnisse wurden u.a. in den Gruppen Hydroxylapatit und Plasma erwirkt.

4.2.1 4-Wochen-Gruppe

4.2.1.1 Anzahl der Osteoblasten mit Implantatkontakt und Anzahl der ossären Trabekel, Spongiosa

Die Auswertung der Osteoblasten- und Trabekelkontakte in den zu bewertenden Präparaten erfolgt in der 4- und der 12-Wochen-Gruppe jeweils nach genormten Zahlenwerten (vgl. Tabelle 6 und 7).

Unstrukturierte Probekörper

In 11 beurteilten unstrukturierten Präparaten haben 10 Osteoblasten und 84 stabil-ossäre Trabekel direkten Implantatkontakt.

Strukturierte Probekörper

In 11 beurteilten strukturierten Präparaten haben 40 Osteoblasten und 177 stabil-ossäre Trabekel direkten Implantatkontakt.

Strukturierte und beschichtete Probekörper (RGD-Peptide, HA, Plasma)

In 8 beurteilten Präparaten mit **RGD-Peptid**-Beschichtung haben 20 Osteoblasten und 113 stabil-ossäre Trabekel direkten Implantatkontakt. In 8 beurteilten Präparaten mit **HA**-Beschichtung haben 24 Osteoblasten und 114 stabil-ossäre Trabekel direkten Implantatkontakt. In schließlich 8 beurteilten **Plasma**-beschichteten Präparaten haben 22 Osteoblasten und 113 Trabekel bzw. Spongiosa-Pfeiler direkten Kontakt zur Implantatoberfläche.

4.2.1.2 Ossäre Nekrosen und Nachbildung der Implantatoberfläche

Die Auswertung der ossären Nekrosen erfolgte in der 4- und der 12-Wochen-Gruppe jeweils nach dem Schema: ++/++ hochgradig; +/++ stark; +/+ mittelgradig; ++/- mittelgradig partiell; +/- partiell; -/- keine Nekrose (vgl. Tabelle 6 und 7).

Die Auswertung der Nachbildung der Implantatoberfläche erfolgte in der 4- und der 12-Wochen-Gruppe jeweils nach dem Schema: ++ sehr gut; +/- gut; +/- mittelgradig; +/- geringgradig; +/- mangelhaft; -/- fehlt, keine Nachbildung der Oberfläche (vgl. Tabelle 6 und 7).

Unstrukturierte Probekörper

Von 11 beurteilten unstrukturierten Präparaten weisen 7 nekrotisch gewordene Knochen-Implantat-Areale auf. In einem der 7 nekrotischen Präparate ist außerdem eine stark nekrotische Zone auszuwerten, in 2 mittelgradig partielle Nekrosen, in 4 eine partielle Nekrosezone. In einem von 11 beurteilten Präparaten erweist sich die Nachbildung der Implantatoberfläche als gut, in 2 der 11 als mittelgradig. Ein Präparat zeigt eine geringgradige Nachbildung der Implantatoberfläche, 3 weisen jeweils eine mangelhafte ossäre Nachbildung der Implantatoberfläche auf. Bei 4 der beurteilten 11 Präparate fehlt jegliche Oberflächennachbildung.

Strukturierte Probekörper

Von 11 beurteilten strukturierten Präparaten weisen 6 nekrotisch gewordene Knochen-Implantat-Areale auf. In einem der 6 nekrotischen Präparate sind die nekrotischen Vorgänge als stark einzustufen, in 2 der 6 ausgewerteten Präparate finden sich mittelgradig nekrotische Gewebeareale. In einem Präparat können mittelgradig partielle nekrotische Veränderungen und in 2 partielle Nekrosen ausgewertet werden. Bei einem von 11 beurteilten Präparaten erweist sich die Nachbildung der Implantatoberfläche als sehr gut, bei 3 als gut, bei 5 als mittelgradig. Ein Präparat weist eine nur geringgradige Oberflächennachbildung auf, ein weiteres Präparat zeigt eine mangelhafte Oberflächennachbildung.

Strukturierte und beschichtete Probekörper (RGD-Peptide, HA, Plasma)

Von 8 beurteilten Präparaten mit **RGD-Peptid**-Beschichtung weist ein Präparat eine partielle nekrotische Knochen-Implantat-Grenze auf. Bei 2 von 8 beurteilten Präparaten erweist sich die Nachbildung der Oberfläche als sehr gut, in 2 Präparaten ist die Oberflächennachbildung als gut zu bewerten, in weiteren 2 Präparaten erfolgte die Nachbildung der Oberfläche mittelgradig, in einem Präparat geringgradig und einem weiteren Präparat mangelhaft. Von 8 beurteilten Präparaten mit **HA**-Beschichtung weisen 3 mittelgradig nekrotisch gewordene Knochen-Implantat-Areale auf. Bei 2 von 8 beurteilten Präparaten erweist sich die Nachbildung der Oberfläche als sehr gut, bei 3 als gut, bei 2 als mangelhaft. Bei einem der ausgewerteten Präparate fehlt die Nachbildung der Implantatoberfläche vollständig. Von 8 beurteilten **Plasma**-beschichteten Präparaten weisen 2 nekrotisch gewordene Knochen-Implantat-Areale auf. Bei einem Präparat kann die nekrotisch gewordene Knochen-Implantat-Grenze als mittelgradig, bei einem weiteren als partiell gewertet werden. Die Nachbildung der Knochen-Implantat-Grenze

erweist sich in 2 Präparaten als gut, in 3 als mittelgradig, in einem als geringgradig, in einem als mangelhaft und in einem weiteren fehlt die Nachbildung der Knochen-Implantat-Grenze vollständig.

4.2.2 12-Wochen-Gruppe

4.2.2.1 Anzahl der Osteoblasten mit Implantatkontakt und Anzahl der ossären Trabekel, Spongiosa

Unstrukturierte Probekörper

In 12 beurteilten unstrukturierten Präparaten haben 6 Osteoblasten und 175 stabil-ossäre Trabekel direkten Implantatkontakt.

Strukturierte Probekörper

In 12 beurteilten strukturierten Präparaten haben 5 Osteoblasten und 188 stabil-ossäre Trabekel direkten Implantatkontakt.

Strukturierte und beschichtete Probekörper (RGD-Peptide, HA, Plasma)

In 8 beurteilten Präparaten mit **RGD-Peptid**-Beschichtung haben 10 Osteoblasten und 179 stabil-ossäre Trabekel direkten Implantatkontakt. In 8 beurteilten Präparaten mit **HA**-Beschichtung haben 26 Osteoblasten und 149 stabil-ossäre Trabekel direkten Implantatkontakt. In schließlich 8 beurteilten **Plasma**-beschichteten Präparaten haben 31 Osteoblasten und 153 Trabekel bzw. Spongiosa-Pfeiler direkten Kontakt zur Implantatoberfläche.

4.2.2.2 Ossäre Nekrosen und Nachbildung der Implantatoberfläche

Unstrukturierter Probekörper

Von 12 beurteilten unstrukturierten Präparaten weisen 4 nekrotisch gewordene Knochen-Implantat-Areale auf. In einem der 4 nekrotischen Präparate sind die nekrotischen Anteile als stark zu bewerten, in 2 als mittelgradig partiell und in einem partiell. Von 12 beurteilten Präparaten erweist sich die Nachbildung der Implantatoberfläche in 4 als sehr gut, in 4 als gut, in einem als mangelhaft und in 3 ausgewerteten Präparaten fehlt jegliche Nachbildung der Implantatoberfläche.

Strukturierte Probekörper

Von 12 beurteilten strukturierten Präparaten weisen 4 nekrotisch gewordene Knochen-Implantat-Areale auf. In einem der 4 nekrotischen Präparate sind des Weiteren partiell stark nekrotische Zonen auszuwerten. Bei einem liegt eine mittelgradige Nekrose der Knochen-Implantat-Grenze vor, bei 2 eine partielle. Die Nachbildung der Implantatoberfläche erweist sich in einem Präparat als sehr gut, in einem als gut, in einem als mittelgradig, in 2 geringgradig, in 4 als mangelhaft. In 3 Präparaten fehlt die Nachbildung der Knochen-Implantat-Grenze vollständig.

Strukturierte und beschichtete Probekörper (RGD-Peptide, HA, Plasma)

Von 8 beurteilten Präparaten mit **RGD-Peptid**-Beschichtung weist ein Präparat eine partiell nekrotisch gewordene Knochen-Implantat-Grenze auf. Bei einem von 8 beurteilten Präparaten erweist sich die Nachbildung der Oberfläche als sehr gut, in einem kann die Nachbildung als gut bewertet werden, in 4 als mittelgradig, in einem als geringgradig und in einem als mangelhaft. Von 8 beurteilten Präparaten mit **HA**-Beschichtung weisen 3 nekrotisch gewordene Knochen-Implantat-Areale auf. Die Nekrose kann in einem Fall als mittelgradig und in zwei weiteren Fällen als partiell eingestuft werden. Bei 2 von 8 beurteilten Präparaten erweist sich die Nachbildung der Oberfläche als sehr gut, in einem als gut, in 3 als mittelgradig, in 2 als mangelhaft. Bei allen 8 beurteilten **Plasma**-beschichteten Präparaten sind keine nekrotischen Knochen-Implantat-Areale nachweisbar. Bei 3 von 8 beurteilten Präparaten erweist sich die Nachbildung der Oberfläche als sehr gut, in 2 als mittelgradig, in einem als geringgradig, in einem weiteren Präparat als mangelhaft. In einem Präparat fehlt jegliche Knochen-Implantat-Grenzen-Nachbildung.

4.3 Software-gestützte Messungen

Die Knochendichte (Bone)- und Knochen-Implantat-Kontakt (BIC)-Messung erfolgte unter Zuhilfenahme der in Kapitel 3.3.4. beschriebenen Software. Alle Probekörpergruppen wurden dabei jeweils in der 4-Wochen- und der 12-Wochen-Gruppe einander direkt gegenübergestellt. In einer zweiten Bewertungsrunde wurden alle Probekörpergruppen einer Zeitgruppe (4-Wochen-Gruppe/12-Wochen-Gruppe) miteinander verglichen. Die Auswertung erfolgte für alle Messungen in Prozent Knochendichte bzw. Prozent Knochen-Implantat-Kontakt.

4.3.1 Knochendichte (Bone)

4.3.1.1 Unstrukturierte Probekörper

Die Knochendichte (Bone) beträgt in der 4-Wochen-Gruppe im Mittelwert 41,23 % mit einer Standardabweichung (SD) von $\pm 14,12$ %. Der geringste Knochendichtewert liegt in dieser Zeitgruppe bei 21,40 %, der Maximalwert bei 66,40 %.

Die prozentuale Knochendichte der 12-Wochen-Gruppe liegt bei 53,75 %. Die Standardabweichung beträgt $\pm 19,00$ %. Der geringste Knochendichtewert dieser Zeitgruppe befindet sich bei 22,40 %, der höchste Wert bei 77,00 % (Abbildung 33). Der Mittelwert der 12-Wochen-Gruppe hat im Vergleich zur 4-Wochen-Gruppe zugenommen, zeigt aber keine Signifikanz.

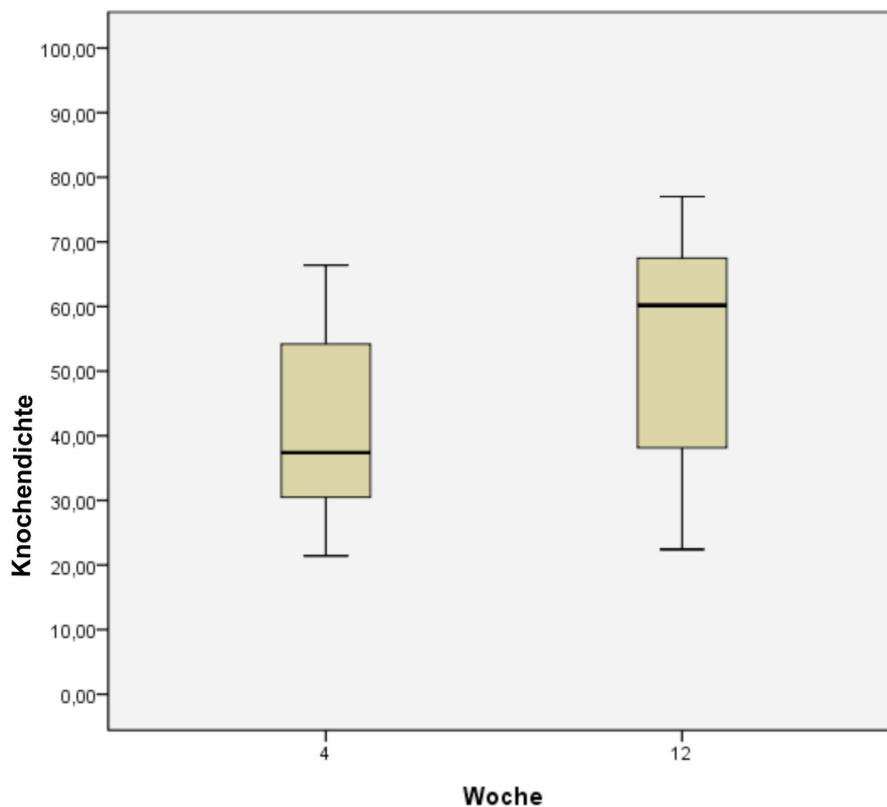


Abbildung 33: Box-Plot des Ergebnisses der Knochendichte-Messung in der ROI der Implantat-Peripherie der unstrukturierten Probekörper (4-Wochen-Gruppe (n = 10) und 12-Wochen-Gruppe (n = 12); (p = 0,129).

4.3.1.2 Strukturierte Probekörper

In der 4-Wochen-Gruppe beträgt die Knochendichte im Mittelwert 43,66 %. Die Standardabweichung beträgt $\pm 8,82$ %. Die geringsten Knochendichtewerte liegen in dieser Zeitgruppe bei 23,10 %, die Maximalwerte liegen bei 56,10 %.

In der 12-Wochen-Gruppe liegt der Mittelwert der prozentualen Knochendichte bei 53,38 %. Die Standardabweichung beträgt $\pm 14,08$ %. Der geringste Knochendichtewert dieser Zeitgruppe befindet sich bei 21,70 %, der höchste bei 69,60 %. Der Mittelwert der 12-Wochen-Gruppe hat im Vergleich zur 4-Wochen-Gruppe zugenommen, zeigt aber keine Signifikanz (Abbildung 34).

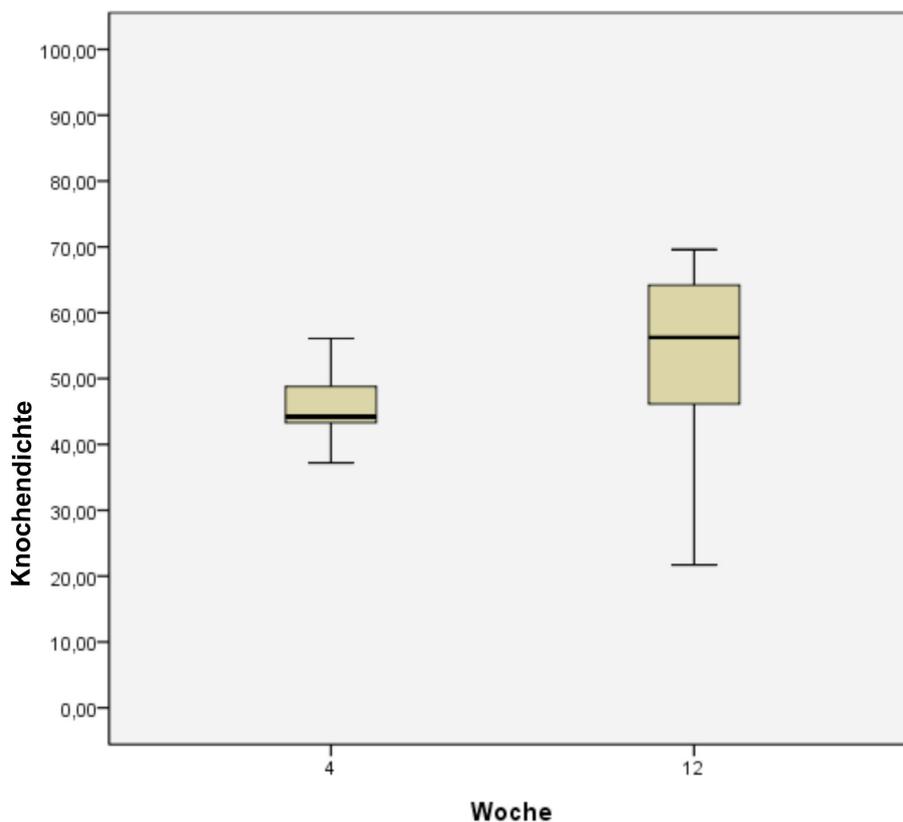


Abbildung 34: Box-Plot des Ergebnisses der Knochendichte-Messung in der ROI der Implantat-Peripherie der strukturierten Probekörper (4-Wochen-Gruppe (n = 10) und 12-Wochen-Gruppe (n = 12); (p = 0,056).

4.3.1.3 Struktur und RGD-Peptide

Die Knochendichte beträgt in der 4-Wochen-Gruppe im Mittelwert 46,70 %. Der Wert der Standardabweichung beträgt $\pm 15,40$ %. Der geringste Knochendichtewert liegt in dieser Zeitgruppe bei 16,60 %, der Maximalwert liegt bei 65,80 %.

Der Mittelwert der prozentualen Knochendichte der 12-Wochen-Gruppe liegt bei 54,83 %. Der Wert der Standardabweichungen beträgt $\pm 11,20$ %. Der geringste Knochendichtewert dieser Zeitgruppe befindet sich bei 36,10 %, der höchste Wert bei 69,00 %. Der Unterschied der Mittelwerte ist nicht signifikant (Abbildung 35).

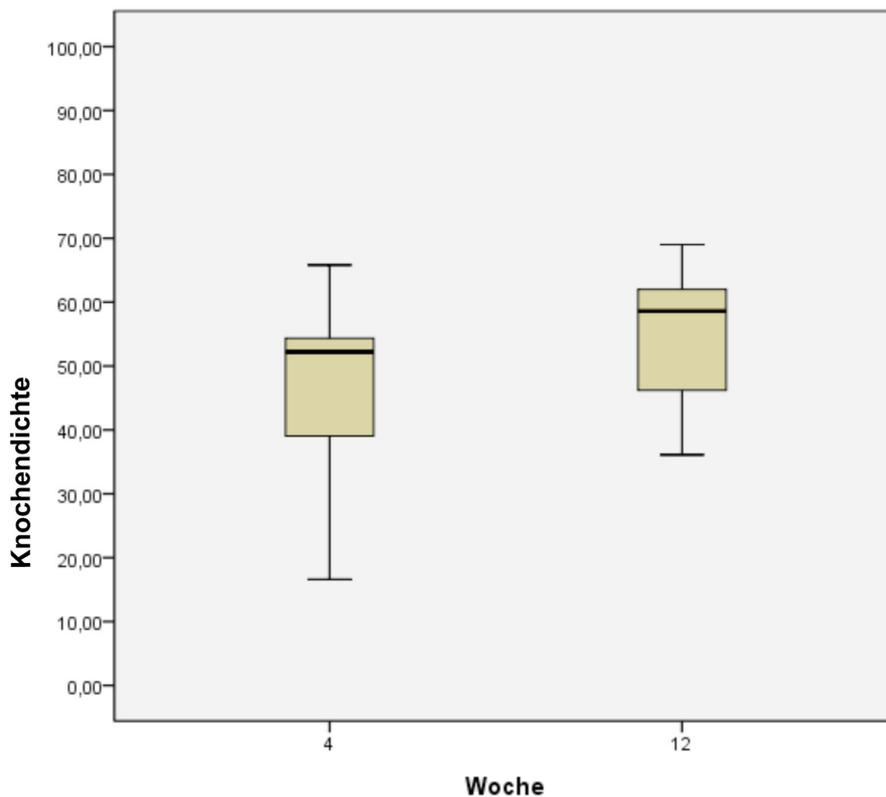


Abbildung 35: Box-Plot des Ergebnisses der Knochendichte-Messung in der ROI der Implantat-Peripherie der Probestkörper mit Struktur und RGD-Peptid-Beschichtung (4-Wochen-Gruppe (n = 8) und 12-Wochen-Gruppe (n = 8); (p = 0,248).

4.3.1.4 Struktur und Hydroxylapatit

In der 4-Wochen-Gruppe beträgt der Mittelwert der Knochendichte 37,86 % mit einer Standardabweichung von $\pm 11,68$ %. Die geringsten Knochendichtewerte liegen in dieser Zeitgruppe bei 22,30%, die Maximalwerte liegen bei 57,50%.

Die prozentuale Knochendichte der 12-Wochen-Gruppe beträgt im Mittelwert 52,56 %. Die Standardabweichung liegt bei $\pm 17,55$ %. In dieser Zeitgruppe liegen die geringsten Knochendichtewerte bei 30,80 %, die höchsten Werte bei 77,80 %. Der Mittelwert der 12-Wochen-Gruppe

hat im Vergleich zur 4-Wochen-Gruppe deutlich zugenommen, zeigt aber keine Signifikanz (Abbildung 36).

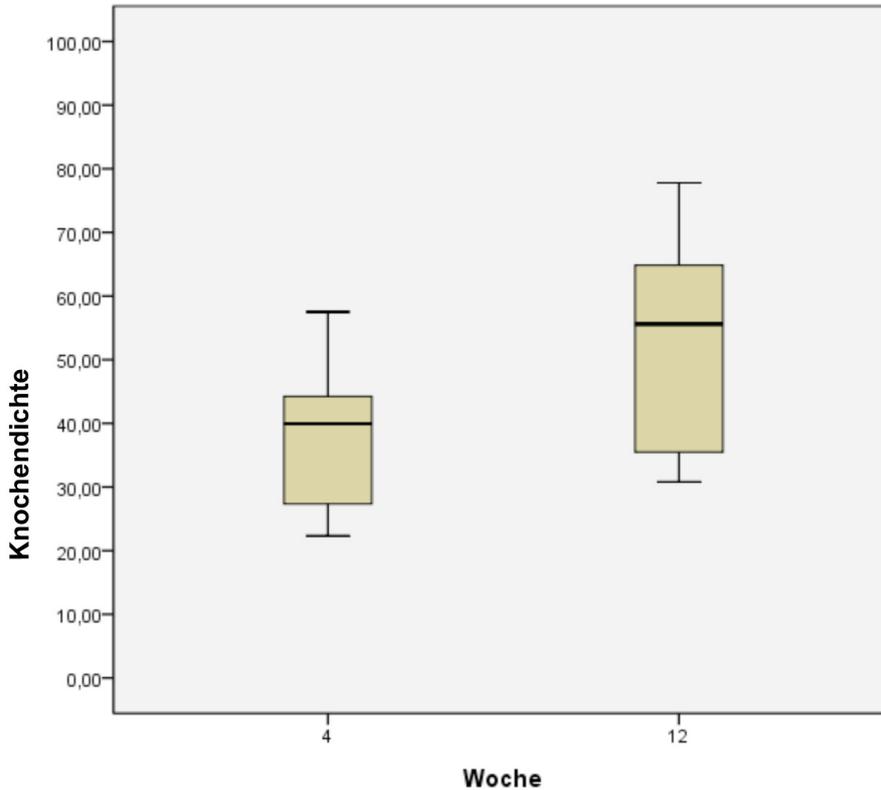


Abbildung 36: Box-Plot des Ergebnisses der Knochendichte-Messung in der ROI der Implantat-Peripherie der Probekörper mit Struktur und HA-Beschichtung (4-Wochen-Gruppe (n = 8) und 12-Wochen-Gruppe (n = 8); (p = 0,074).

4.3.1.5 Struktur und Plasma

Die Knochendichte beträgt in der 4-Wochen-Gruppe im Mittelwert 37,52 % mit einer Standardabweichung von $\pm 10,00$ %. In dieser Zeitgruppe liegt der geringste Knochendichtewert bei 22,20 %, der Maximalwert bei 53,50 %.

Die prozentuale Knochendichte der 12-Wochen-Gruppe liegt im Mittelwert bei 53,92 %. Die Standardabweichung liegt bei $\pm 16,31$ %. Der geringste Knochendichtewert dieser Zeitgruppe befindet sich bei 23,30 %, der höchste Wert bei 73,20 %. Der Mittelwert zeigt eine deutliche Zunahme und der Unterschied gegenüber der 4-Wochen-Gruppe ist signifikant (Abbildung 37).

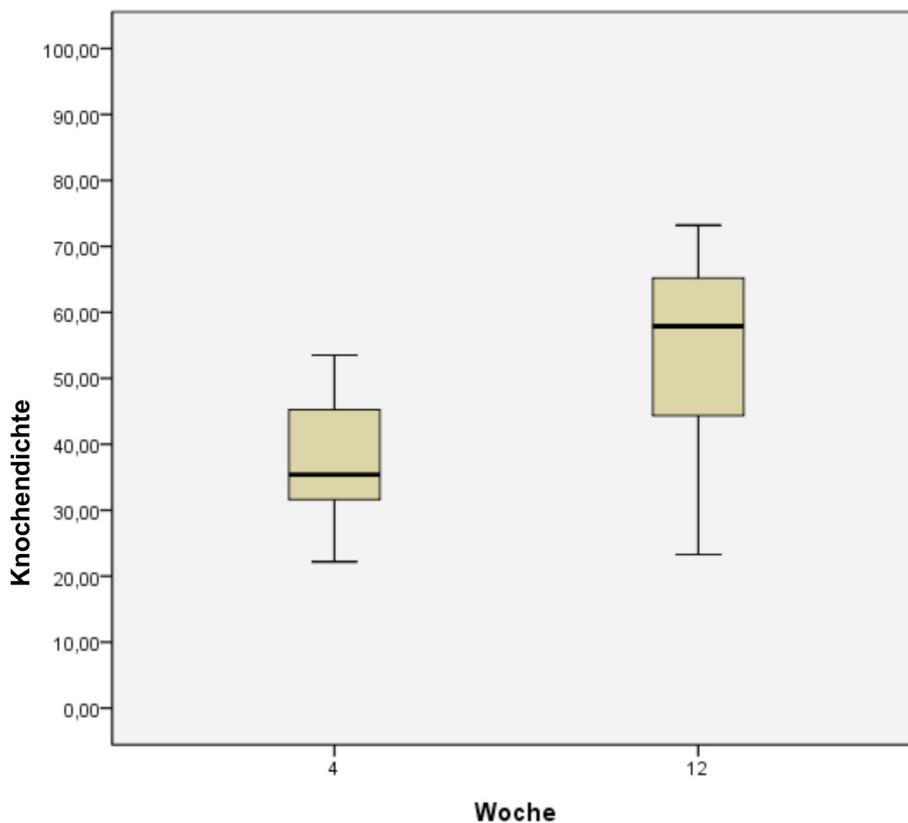


Abbildung 37: Box-Plot des Ergebnisses der Knochendichte-Messung in der ROI der Implantat-Peripherie der Probekörper mit Struktur und Plasmabeschichtung (4-Wochen-Gruppe (n = 8) und 12-Wochen-Gruppe (n = 8); (p = 0,036).

4.3.1.6 Vergleich aller Probekörper in der 4-Wochen-Gruppe

Die Knochendichte beträgt in der 4-Wochen-Gruppe unter Nutzung des unstrukturierten Probekörpers im Mittelwert 41,23 % mit einer Standardabweichung von $\pm 14,12$ %. Die geringsten Knochendichtewerte liegen in dieser Probekörpergruppe bei 21,40 %, die Maximalwerte bei 66,40 %. Unter Verwendung des strukturierten Probekörpers beträgt der Mittelwert der Knochendichte 43,66 %. Die Standardabweichung beträgt $\pm 8,82$ %. Die geringsten Knochendichtewerte liegen in dieser Probekörpergruppe bei 23,10 %, die Maximalwerte bei 56,10 %. In der Gruppe der RGD-beschichteten strukturierten Probekörper liegt der Mittelwert der Knochendichte bei 46,70 %. Die Standardabweichung dieser Probekörpergruppe beträgt $\pm 15,40$ %. Die geringsten Knochendichtewerte liegen hier bei 16,60 %, die höchsten Werte bei 65,80 %. Die Gruppe der hydroxylapatitbeschichteten und strukturierten Probekörper erreicht einen Mittelwert der Knochendichte von 37,86 %. Die Standardabweichung liegt bei $\pm 11,68$ %. Das Minimum der Knochendichtewerte liegt bei

22,30 %, das Maximum bei 57,50 %. In der Gruppe der plasma-beschichteten strukturierten Probekörper liegt der Mittelwert der Knochendichte bei 37,52 %, mit einer Standardabweichung von $\pm 10,00$ %. Die geringsten Knochendichtewerte liegen hier bei 22,20%, die höchsten Werte bei 53,50 %. Die Unterschiede innerhalb aller Werte der 4-Wochen-Gruppe zeigen keine Signifikanz (Abbildung 38).

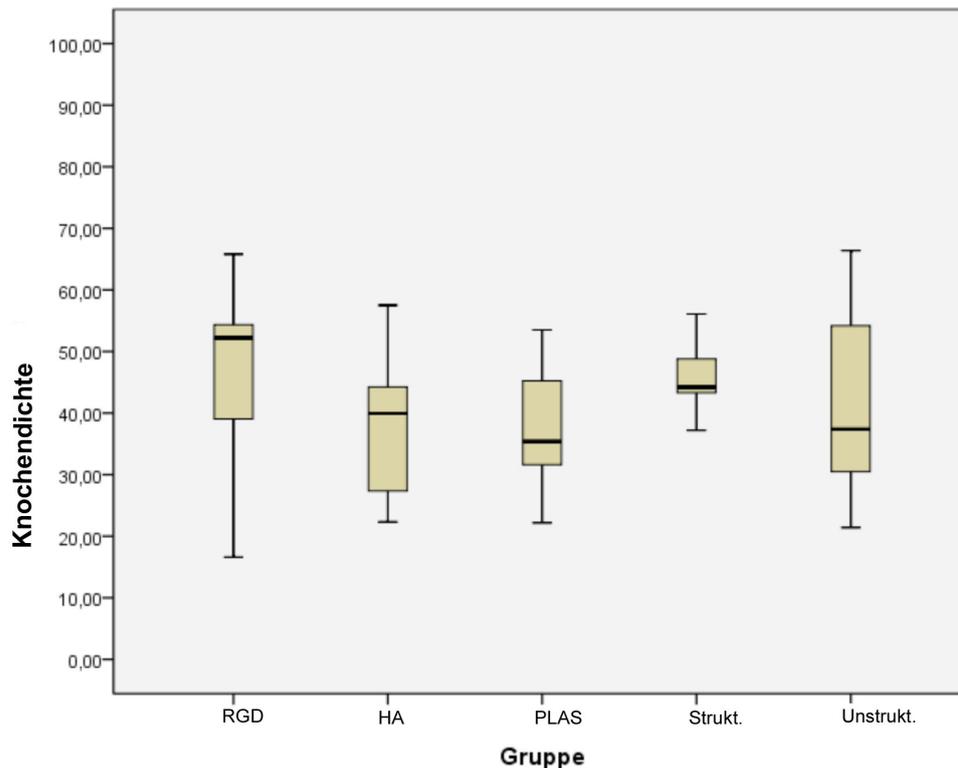


Abbildung 38: Box-Plot des Ergebnisses der Knochendichte-Messung in der ROI der Implantat-Peripherie aller Probekörper der 4-Wochen-Gruppe im Vergleich (RGD (n = 8); HA (n = 8); PLAS (n = 8); Strukt. (n = 10); Unstrukt. (n = 10)).

4.3.1.7 Vergleich aller Probekörper in der 12-Wochen-Gruppe

In der 12-Wochen-Gruppe beträgt der Mittelwert der Knochendichte unter Nutzung des unstrukturierten Probekörpers 53,75 %. Die Standardabweichung beträgt $\pm 19,00$ %. Die geringsten Knochendichtewerte liegen in dieser Probekörpergruppe bei 22,40 %, die Maximalwerte bei 77,00 %. Unter Verwendung des strukturierten Probekörpers wird ein Mittelwert von 53,38 % Knochendichte erreicht. Die Standardabweichung beträgt $\pm 14,08$ %. Die geringsten Knochendichtewerte liegen in dieser Probekörpergruppe bei 21,70 %, die Maximalwerte liegen bei 69,60 %. In der Gruppe der

RGD-beschichteten strukturierten Probekörper liegt der Mittelwert der Knochendichte bei 54,83 %. Die Standardabweichung dieser Probekörpergruppe liegt bei $\pm 11,20$ %. Die geringsten Knochendichtewerte betragen hier 36,10 %, die höchsten Werte 69,00 %. Die Gruppe der hydroxylapatitbeschichteten und strukturierten Probekörper erreicht im Mittelwert 52,56 % Knochendichte mit einer Standardabweichung von $\pm 17,55$ %. Die geringsten Knochendichtewerte liegen bei 30,80%, die höchsten Werte bei 77,80 %. In der Gruppe der plasmabeschichteten strukturierten Probekörper liegt der Mittelwert der Knochendichte bei 53,92 %. Die Standardabweichung beträgt $\pm 16,31$ %. Die geringsten Knochendichtewerte liegen hier bei 23,30 %, die höchsten Werte bei 73,20 %. Die Unterschiede innerhalb aller Werte der 4-Wochen-Gruppe zeigen keine Signifikanz (Abbildung 39).

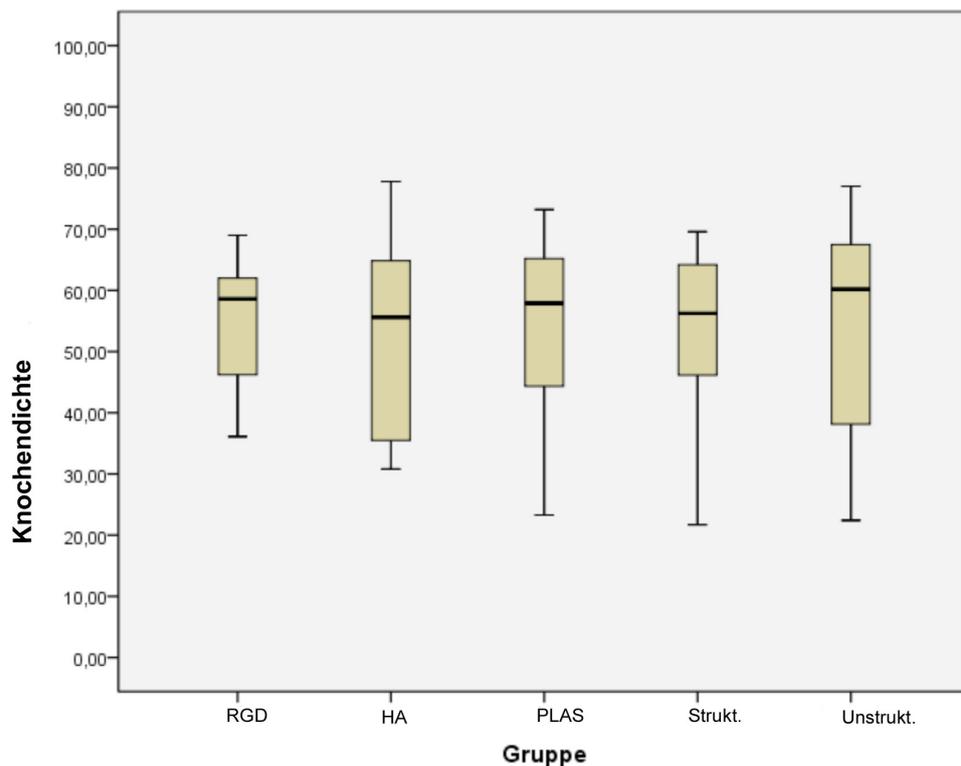


Abbildung 39: Box-Plot des Ergebnisses der Knochendichte-Messung in der ROI der Implantat-Peripherie aller Probekörper der 12-Wochen-Gruppe im Vergleich (RGD (n = 8); HA (n = 8); PLAS (n = 8); Strukt. (n = 12); Unstrukt. (n = 12)).

4.3.2 Knochen-Implantat-Kontakt (BIC)

4.3.2.1 Unstrukturierte Probekörper

Der Knochen-Implantat-Kontakt (BIC) beträgt in der 4-Wochen-Gruppe im Mittelwert 11,72 %. Die Standardabweichung beträgt $\pm 9,53$ %. Der geringste BIC-Wert liegt in dieser Zeitgruppe bei 1,10 %, der Maximalwert bei 32,90 %.

Der BIC der 12-Wochen-Gruppe beträgt im Mittelwert 35,35 % mit einer Standardabweichung von $\pm 17,48$ %. Der geringste BIC dieser Zeitgruppe befindet sich bei 0,80 %, die höchsten Werte bei 60,50%. Die Zunahme des Mittelwerts gegenüber dem 4-Wochen-Wert ist hochsignifikant mit einem $p = 0,004$ (Abbildung 40).

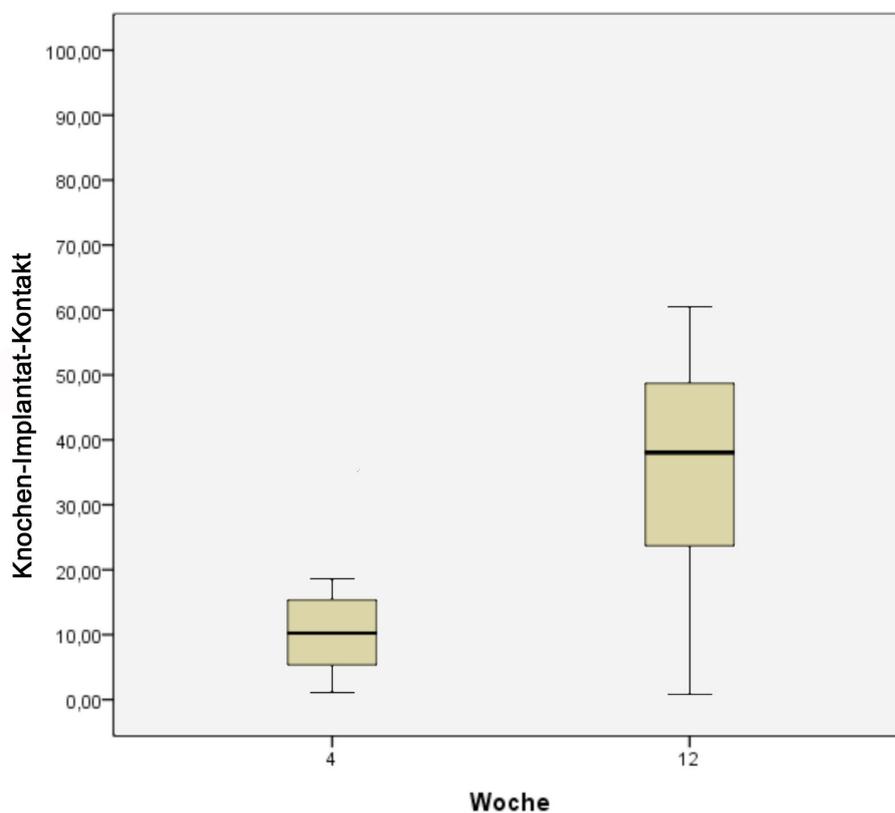


Abbildung 40: Box-Plot des Ergebnisses des Knochen-Implantat-Kontakts der unstrukturierten Probekörper (4-Wochen-Gruppe (n = 10) und 12-Wochen-Gruppe (n = 12)); ($p = 0,004$).

4.3.2.2 Strukturierte Probekörper

In der 4-Wochen-Gruppe beträgt der BIC im Mittelwert 21,80 %. Die Standardabweichung liegt bei $\pm 8,58$ %. Der geringste BIC dieser Zeitgruppe liegt bei 8,60 %, der Maximalwert bei 36,90 %. Der BIC der 12-Wochen-Gruppe liegt im Mittelwert bei 37,64 %. Die Standardabweichung beträgt hier $\pm 15,56$ %. Der geringste BIC dieser Zeitgruppe findet sich bei 21,70 %, der höchste Wert liegt bei 72,80 %. Die Zunahme des Mittelwerts ist gegenüber dem 4-Wochen-Wert signifikant (Abbildung 41).

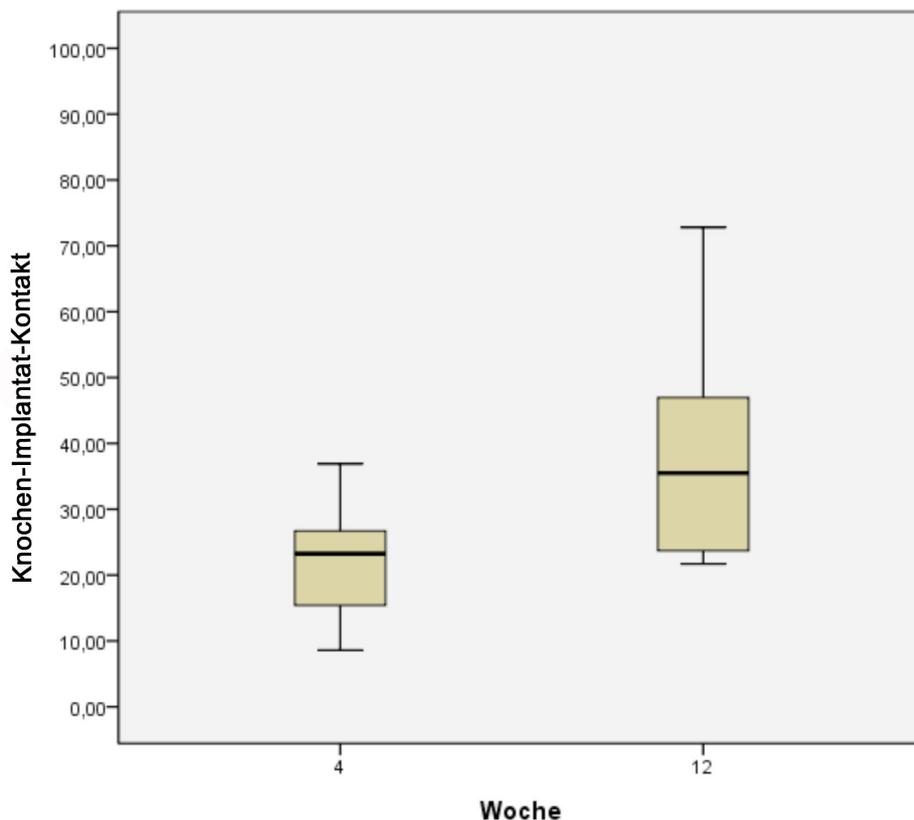


Abbildung 41: Box-Plot des Ergebnisses des Knochen-Implantat-Kontakts der strukturierten Probekörper (4-Wochen-Gruppe (n = 10) und 12-Wochen-Gruppe (n = 12); (p = 0,021).

4.3.2.3 Struktur und RGD-Peptide

Der BIC beträgt in der 4-Wochen-Gruppe im Mittelwert 25,16 % mit einer Standardabweichung von $\pm 11,28$ %. Der geringste BIC liegt in dieser Zeitgruppe bei 12,30 %, der Maximalwert bei 44,50 %. Der BIC der 12-Wochen-Gruppe beträgt im Mittelwert 45,07 %. Die Standardabweichung beträgt hier $\pm 14,22$ %. In dieser Zeitgruppe findet sich der geringste BIC-Wert bei 20,40 %, der höchste

Wert bei 63,60 %. Der Mittelwert der 12-Wochen-Gruppe hat gegenüber der 4-Wochen-Gruppe zugenommen und ist signifikant (Abbildung 42).

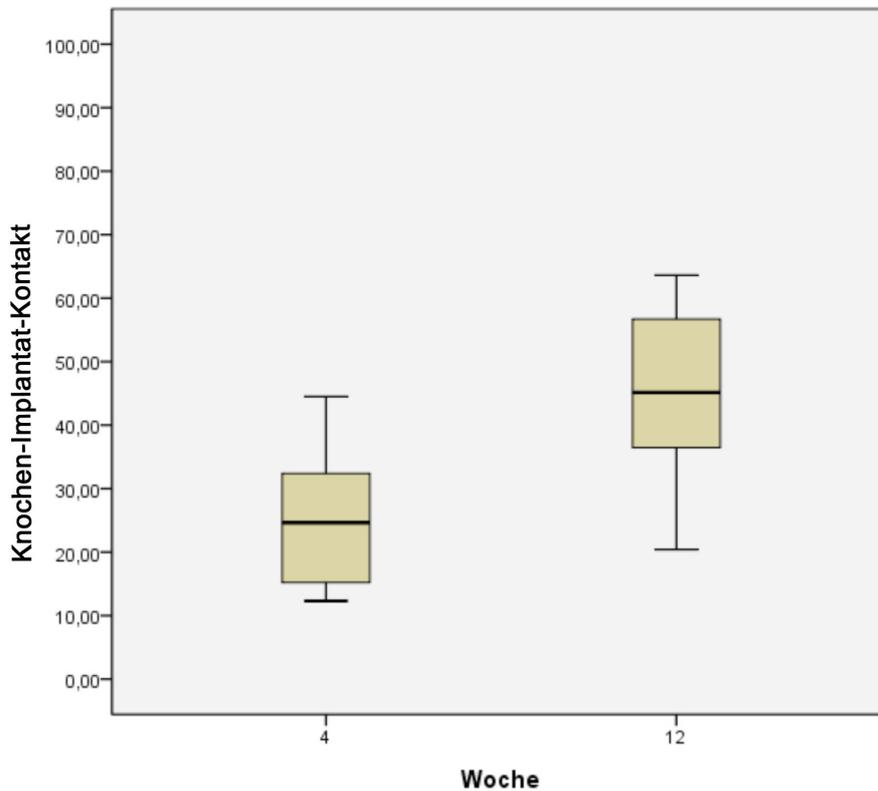


Abbildung 42: Box-Plot des Ergebnisses des Knochen-Implantat-Kontakts der Probekörper mit Struktur und RGD-Peptid-Beschichtung (4-Wochen-Gruppe (n = 8) und 12-Wochen-Gruppe (n = 8); (p = 0,012).

4.3.2.4 Struktur und Hydroxylapatit

Der BIC der 4-Wochen-Gruppe liegt im Mittelwert bei 15,35 %. Die Standardabweichung beträgt $\pm 12,72$ %. In dieser Zeitgruppe liegt der geringste BIC bei 1,70 %, der Maximalwert bei 42,10 %. In der 12-Wochen-Gruppe liegt der BIC im Mittelwert bei 42,52 % mit einer Standardabweichung von $\pm 23,43$ %. Das Minimum dieser Zeitgruppe befindet sich bei 12,90 %, der Maximalwert bei 73,80 %. Der Mittelwert zeigt eine Zunahme und der Unterschied gegenüber der 4-Wochen-Gruppe ist signifikant (siehe Abbildung 43).

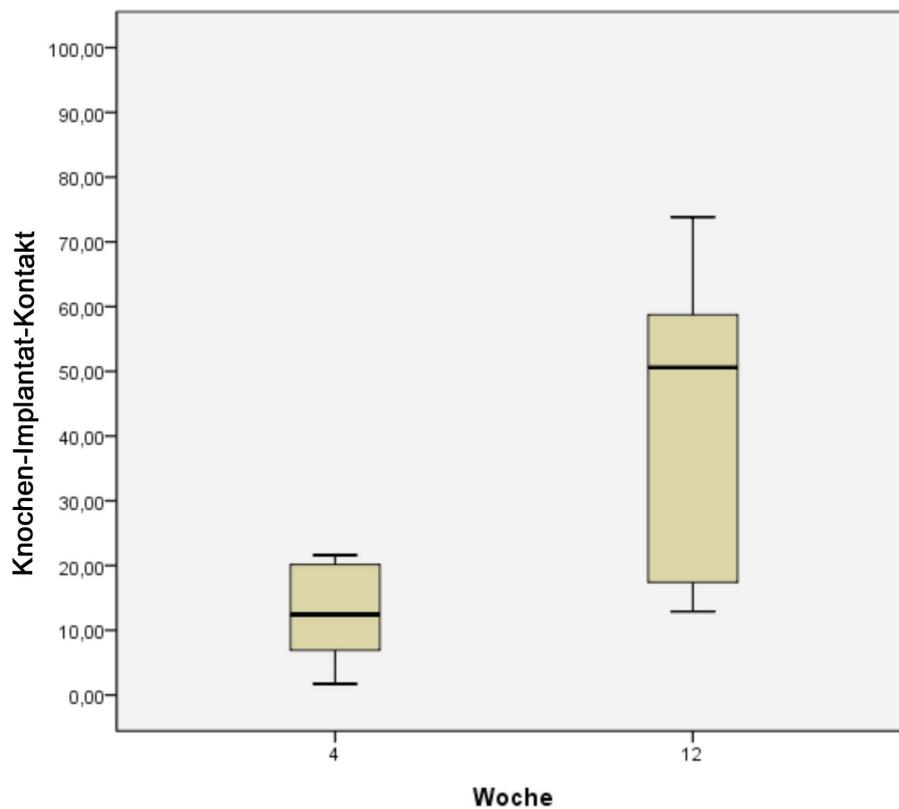


Abbildung 43: Box-Plot des Ergebnisses des Knochen-Implantat-Kontakts der Probekörper mit Struktur und HA-Beschichtung (4-Wochen-Gruppe (n = 8) und 12-Wochen-Gruppe (n = 8); (p = 0,016).

4.3.2.5 Struktur und Plasma

Der BIC der 4-Wochen-Gruppe beträgt im Mittelwert 16,82 % mit einer Standardabweichung von $\pm 12,01$ %. Der geringste BIC liegt in dieser Zeitgruppe bei 5,10 %, der Maximalwert bei 34,00 %. In der 12-Wochen-Gruppe liegt der Mittelwert des BIC bei 40,53 %. Die Standardabweichung liegt hier bei $\pm 19,19$ %. In dieser Zeitgruppe findet sich der geringste BIC bei 17,00 %, der höchste Wert liegt bei 75,20 %. Die Zunahme des Mittelwerts gegenüber den 4-Wochen-Werten ist signifikant (Abbildung 44).

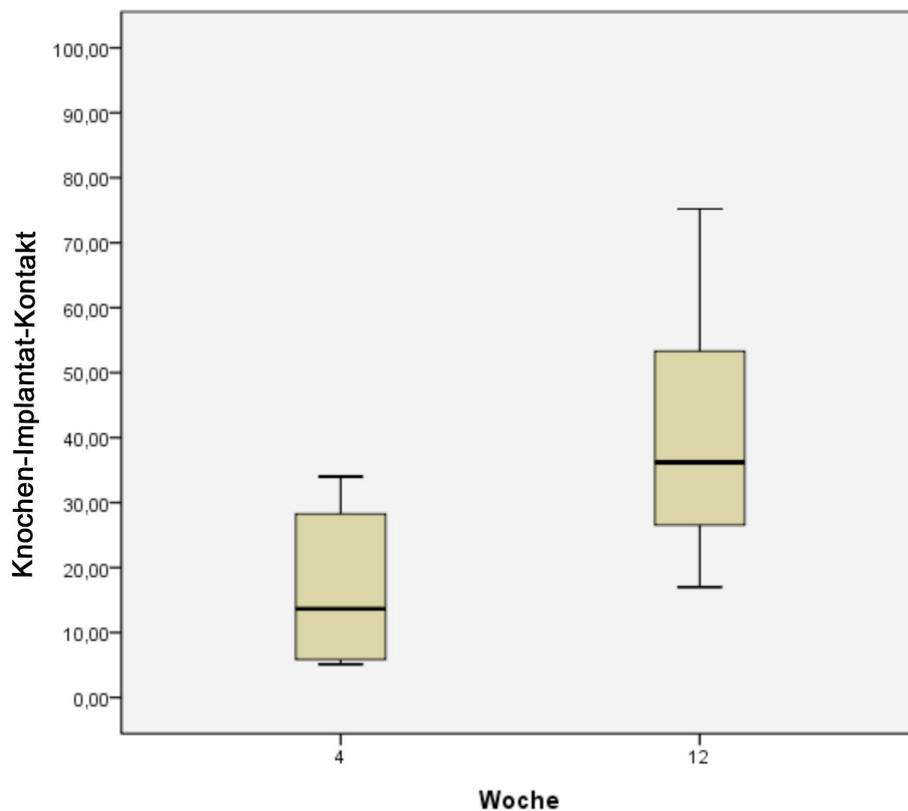


Abbildung 44: Box-Plot des Ergebnisses des Knochen-Implantat-Kontakts der Probekörper mit Struktur und Plasmabeschichtung (4-Wochen-Gruppe (n = 8) und 12-Wochen-Gruppe (n = 8); (p = 0,021).

4.3.2.6 Vergleich aller Probekörper in der 4-Wochen-Gruppe

Der BIC beträgt in der Gesamtübersicht über die 4-Wochen-Gruppe unter Nutzung des unstrukturierten Probekörpers im Mittelwert 11,72 %. Die Standardabweichung liegt bei $\pm 9,53$ %. Der geringste BIC liegt in dieser Probekörpergruppe bei 1,10 %, der Maximalwert wird mit 32,90 % erreicht. Unter Verwendung des strukturierten Probekörpers werden im Mittelwert 21,80 % BIC erreicht. Die Standardabweichung beträgt $\pm 8,58$ %. Die geringsten BIC-Werte liegen in dieser Probekörpergruppe bei 8,60 %, die Maximalwerte bei 36,90 %. In der Gruppe der RGD-beschichteten strukturierten Probekörper liegt der BIC-Mittelwert bei 25,16 % mit einer Standardabweichung von $\pm 11,28$ %. Der geringste BIC liegt hier bei 12,30 %, der höchste Wert bei 44,50 %. Die Gruppe der hydroxylapatitbeschichteten und strukturierten Probekörper erreicht einen BIC-Mittelwert von 15,35 % mit einer Standardabweichung von $\pm 12,72$ %. Die geringsten BIC-

Werte liegen bei 1,70 %, die höchsten bei 42,10 %. Der BIC-Mittelwert liegt in der Gruppe der plasmabeschichteten strukturierten Probekörper bei 16,82 %. Die Standardabweichung beträgt $\pm 12,01$ %. Die geringsten BIC-Werte liegen hier bei 5,10 %, der Maximalwert liegt bei 34,00 % (Abbildung 45). Die Mittelwerte der strukturierten und der strukturierten und mit RGD-Peptid-beschichteten Probekörper zeigen im Vergleich zu den unstrukturierten Probekörpern eine deutliche Signifikanz.

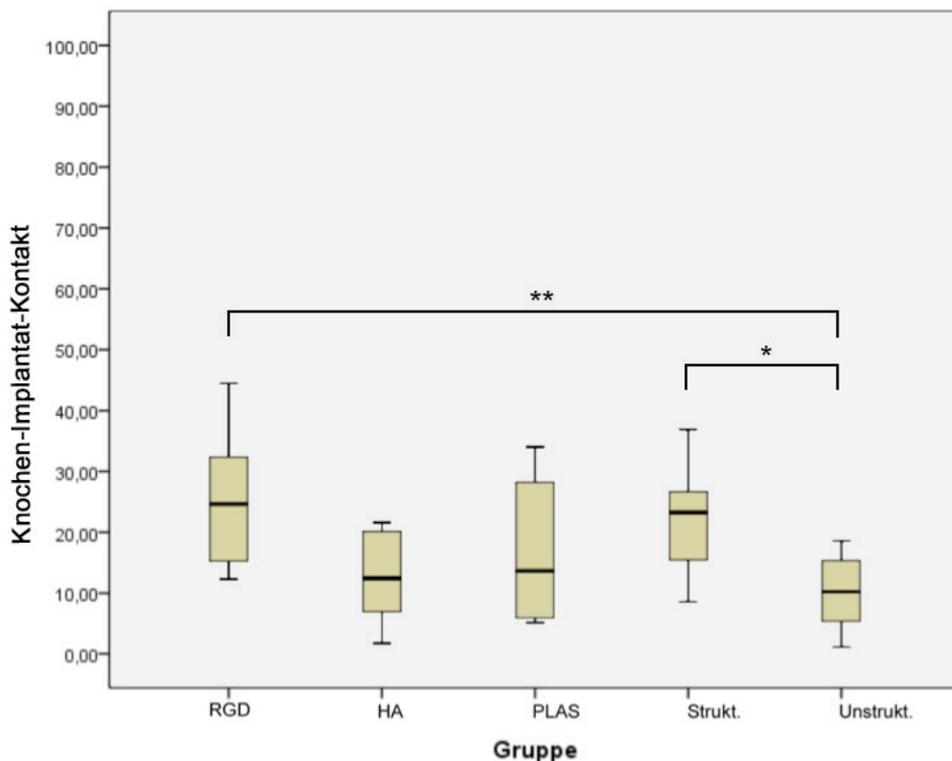


Abbildung 45: Box-Plot der Ergebnisse des Knochen-Implantat-Kontakts aller Probekörper der 4-Wochen-Gruppe im Vergleich (RGD (n = 8); HA (n = 8); PLAS (n = 8); Strukt. (n = 10); Unstrukt. (n = 10)). * p = 0,023 (strukturierte Probekörper mit signifikantem Unterschied im Vergleich zu unstrukturierten Probekörpern); ** p = 0,014 (RGD-beschichtete Probekörper mit signifikantem Unterschied im Vergleich zu unstrukturierten Probekörpern).

4.3.2.7 Vergleich aller Probekörper in der 12-Wochen-Gruppe

In der Gesamtübersicht über die 12-Wochen-Gruppe beträgt der Mittelwert des BIC unter Nutzung des unstrukturierten Probekörpers 35,35 %. Die Standardabweichung liegt bei $\pm 17,48$ %. In dieser Probekörpergruppe liegt der geringste BIC bei 0,80 %, der Maximalwert wird mit 60,50 % erreicht.

Unter Verwendung des strukturierten Probekörpers wird ein Mittelwert von 37,64 % BIC erreicht. Die Standardabweichung beträgt $\pm 15,56$ %. Die geringsten BIC-Werte liegen in dieser Probekörpergruppe bei 21,70 %, die Maximalwerte bei 72,80 %. In der Gruppe der RGD-beschichteten strukturierten Probekörper liegt der BIC-Mittelwert bei 45,07 % mit einer Standardabweichung dieser Probekörpergruppe von $\pm 14,22$ %. Der geringste BIC liegt hier bei 20,40 %, der höchste Wert bei 63,60 %. Die Gruppe der hydroxylapatitbeschichteten und strukturierten Probekörper erreicht einen BIC-Mittelwert von 42,52 %. Die Standardabweichung liegt bei $\pm 23,43$ %. Die geringsten BIC-Werte liegen bei 12,90 %, die höchsten bei 73,80 %. Der BIC-Mittelwert in der Gruppe der plasmabeschichteten strukturierten Probekörper liegt bei 40,53 % mit einer Standardabweichung von $\pm 19,19$ %. Die geringsten BIC-Werte betragen 17,00 %, die höchsten Werte 75,20 % (Abbildung 46). Die Unterschiede innerhalb aller Werte der 12-Wochen-Gruppe zeigen keine Signifikanz.

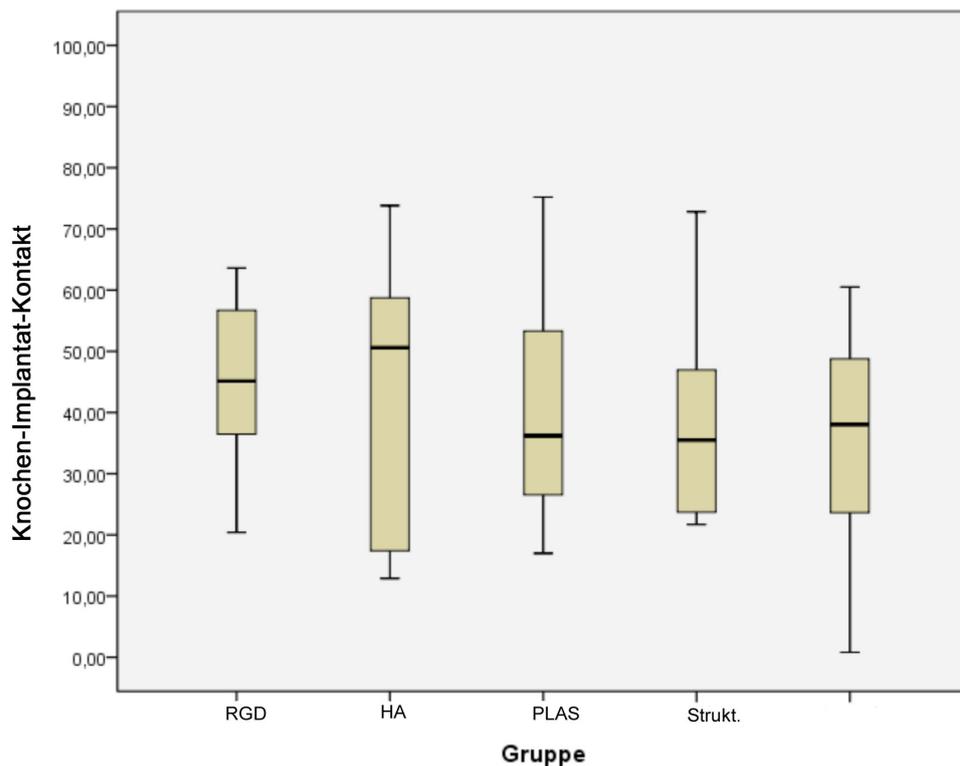


Abbildung 46: Box-Plot der Ergebnisse des Knochen-Implantat-Kontakts aller Probekörper der 12-Wochen-Gruppe im Vergleich (RGD n = 8; HA n = 8; PLAS n = 8; Strukt. n = 10; Unstrukt. n = 10).

5. Diskussion

Seit den 1990er-Jahren wurde fortlaufend an der Optimierung der Technik der Keramikherstellung gearbeitet (Schreiner et al. 2009), und Keramikimplantate wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen in unstrukturierter, strukturierter und beschichteter Form in jeweils unterschiedlichen Tiermodellen implantiert und in der Folge evaluiert (Tabelle 8). Dabei wurden die durchgeführten Untersuchungen in der Regel untergliedert in einen mechanisch-technischen Push-out-Teil, in dem auch Scherspannungsergebnisse ermittelt wurden, und einen histomorphometrischen Teil, der osseointegrative und biologische Ergebnisse liefern sollte. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf histomorphometrische und softwaregestützte Auswertungen im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“.

Tabelle 8: Übersicht über den Einsatz von verschiedenen Werkstoffen und Oberflächen in der Literatur, modifiziert nach Schreiner et al. (2009).

Autor	Material der Oberfläche	Lokalisation	Tiermodell	Standzeit in Wochen	Scherspannung (MPa)
Weinstein et al., 1976	Al ₂ O ₃	Femur	Hund	1, 2, 4, 8	-
Kakutani et al., 1989	Al ₂ O ₃ , HA-beschichtet	Tibia	Kaninchen	8, 25	-
Ukegawa et al., 1990	HAK/Titan	Femur	Hund	12	6,39
Macedo-Werlich et al., 1993	Al ₂ O ₃ (glatt)	Femur	Göttinger Minipig	12	5,88
Hartwig et al., 1995	Reintitan, korundgestrahlt	Femur	Hund	12	3,6
Hartwig et al., 1995	Titan mit HA-Beschichtung, porös	Femur	Hund	12	6,6
Müller, 2001	TiAl ₆ V ₄ , korundgestrahlt	Femur	Kaninchen	12	4,05
Ziegler, 2001	CoCrMo, feingekörnt	Femur	Kaninchen	12	4,76
Schwarz et al., 2005	TPS, porös	Femur	Göttinger Minipig	12	6,5
Schwarz et al., 2005	TiAl ₆ V ₄ , TPS + Bonit®, porös	Femur	Göttinger Minipig	12	7,3
Steinhauser, 2005	TiAl ₆ V ₄ , korundgestrahlt	Femur	Schaf	12	1,5
Burgkart et al., 2008	Aluminiumoxid-Zirkoniumoxid-Composite-Keramik (BIOLOX® delta)	Femur	Schaf	8, 12	11,5
Schreiner et al., 2009	AMC-Keramik, porös	Femur	Göttinger Minipig	12	7,59

Tabelle 8 bietet eine Übersicht über die in der Literatur veröffentlichten Versuchsabläufe der verschiedenen Arbeitsgruppen sowie die unterschiedlichen Implantationsmaterialien, Tiermodelle und den erzielten Erfolg in Form von Scherspannung in MPa. In der folgenden Diskussion sollen nachfolgende gesammelte Informationen in verschiedenen Abschnitten als Bezugsquellen dienen. Dabei stehen sowohl das gesamte Versuchsmodell, die mikroskopische histomorphologische Auswertung und die softwaregestützte Auswertung als auch Material und Oberfläche des Werkstoffs, das Tiermodell und die gewählte Standzeit zur Diskussion.

5.1 Versuchsmodell

Die vorliegende Dissertation ist im Zusammenhang mit einem Versuch an Tieren entstanden. Dabei sollten Ergebnisse erzielt werden, die mit der vitalen humanen Osteophysiologie vergleichbar sind. Um grundlegende Parameter zur Evaluation einer neu entwickelten Oberflächenstrukturierung einer modernen Hochleistungskeramik bezüglich der Osseointegration zu generieren, müssen Untersuchungen an einem Gewebe durchgeführt werden, das dem menschlichen möglichst nahekommt. In der Vorarbeit zur vorliegenden Studie durch Boxleitner et al. (2008a, b, c und 2009a, b, c, d) vorgenommene In-vitro-Versuche an humanen Osteoblasten-Zellkulturgeweben dienten der Beurteilung und Bewertung der Wachstumseigenschaften der In-vitro-Zellen im direkten Kontakt mit dem präferierten Probekörpermaterial. Sich anschließende Zytotoxizitätsuntersuchungen sollten ferner beurteilen, inwieweit das Implantatmaterial ein Wachsen von Kulturzellen stimuliert, hemmt oder vollständig unterbindet. Weiteres Augenmerk erhielt die Auswahl der Beschichtung der Implantatmaterialien. Aus der Literatur ist allgemein bekannt, dass Zellen an stark hydrophilen Flächen besser wachsen als an weniger polaren (Kakutani et al. 1989, Hartwig et al. 1995, Ferris et al. 1999). Daher stand insbesondere der Effekt der Erhöhung der Hydrophilie, d.h. der Verminderung des Kontaktwinkels von Flüssigkeit gegenüber dem Werkstück mittels plasma-bedingter Oberflächenaktivierung, im Vordergrund der Betrachtung. Nur die Untersuchung am lebenden Tiermodell und am daraus gewonnenen Gewebe kann schließlich exakte und erfolgreich belastbare anatomisch-physiologische Daten erheben und eine sinnvolle Übertragung dieser Daten auf das menschliche Gewebe ermöglichen. Die Verwendung eines Tiermodells im Rahmen dieser Dissertation erschien daher unumgänglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gleich zu Beginn der Untersuchungen das Schafmodell präferiert. In anderen Studien ähnlicher Auslegung wurden bisher für die Verwendung von Titanium-Implantatkörpern die Spezies Kaninchen und bis 1996 auch Hund (Hartwig et al. 1995, Müller 2001) bevorzugt. In Untersuchungen mit den Werkstoffen Titan und Keramik wurde in Arbeitsgruppen von Schwarz (2008) und Schreiner (2009) das Tiermodell Göttinger Minipig präferiert (vgl. Tabelle 8). Das Tiermodell Schaf erlaubt aufgrund dem Menschen ähnlicher Regenerationsprozesse eine bessere Auswertbarkeit im Implantationsversuch (Wissing und Stürmer 1986, Lippuner et al. 1992). Wissing et al. konnten nachweisen, dass Oviden eine wesentlich homogenere Reaktion auf experimentell erzeugte Knochendefekte zeigen als im direkten Vergleich Vertreter der Gruppe der Caniden. Das erleichtert in der wissenschaftlichen Auswertung die Interpretationen der Ergebnisse in Bezugnahme auf den menschlichen Knochenapparat. Trotz differenter Knochenfeinstruktur und der daran gebundenen Unterschiede in der Gefäßversorgung zeigen Mensch und Schaf ein grundsätzlich ähnliches Regenerationsverhalten (Wissing et al. 1990). Im Vergleich zu anderen in der experimentellen Knochenchirurgie verwendeten Tiermodellen – wie den bereits beschriebenen Ratten-, Schweine- und Kaninchenmodellen – liegt die Knochenbildungsrate bei den Oviden deutlich niedriger und ist daher besser vergleichbar mit der des menschlichen Patienten (Wissing und Stürmer 1986). Das in Wissenschaftsstudien regelmäßig verwendete Kaninchenmodell (Kakutani et al. 1989, Müller 2001, Ziegler 2001) erweist sich aufgrund der sehr unterschiedlichen Größenverhältnisse und der sehr zügig ablaufenden Heilungsvorgänge im direkten Vergleich zum Menschen als eher ungeeignet. Allerdings stellt auch das Schaf ein Modell dar, welches die anatomischen und physiologischen Gegebenheiten des gesunden menschlichen Patienten nicht uneingeschränkt widerspiegelt. Gegenüber dem Menschen zeigt das Schaf nämlich eine höhere Stoffwechselaktivität und Heilungskapazität (Stürmer und Schuchardt 1980). Ein vergleichbares Tiermodell Hund wurde zu Beginn der Arbeit unter ethischen Gesichtspunkten im EU-Wissenschaftsraum als nicht vertretbar eingestuft. Die unterschiedlich gewählten Implantationsorte im Knochen des Patienten Schaf wurden gewählt, um den potenziellen Effekt einer möglichen Ortsabhängigkeit zu vermeiden und die Grade der Osseointegration im direkten Vergleich innerhalb eines Tieres untersuchen zu können.

In der Literatur finden sich zudem Hinweise, dass Unverträglichkeitsreaktionen vermehrt an Lokalisationen auftreten, die eine Malvaskularisation aufweisen, da Stoffwechsel- und

Endprodukte am Implantationsort kumulieren können (Böstman et al. 1990). Ein Hinweis auf die grundsätzlich bessere Durchblutung des spongiösen Knochens ist die Anzahl der an Ort und Stelle proliferierten Blutgefäße. Die grundsätzliche Evaluierung der Probekörper-Implantationsergebnisse und die Abhängigkeit von Strukturgebung bzw. Ausstattung mit einer bioaktiven Beschichtung erfolgte im Rahmen dieser Dissertation durch die Implantation von zwei unterschiedlichen Implantaten an lokal vergleichbarer Implantationsstelle auf gleicher Achse mit definiertem Abstand. So wurde die Auswertung zweier unterschiedlicher Probekörper an direkt miteinander vergleichbaren Implantationsstellen möglich. Es können auf diese Weise anatomisch-physiologische Gewebereaktionen fokussiert und unabhängig ausgewertet werden. Ergebnisfehler, die sich aus unterschiedlichem Gewebeverhalten ergeben, können so nahezu ausgeschlossen werden. Integrationsergebnisse beruhen daher auf dem Vorhandensein einer Oberflächenstruktur des Probekörpers oder/und seiner bioaktiven Beschichtung mit Minimierung der interindividuellen Fehlerquellen. Die im laufenden Versuch differierende Präparateanzahl in den Gruppen der unstrukturierten, strukturierten unbeschichteten und strukturierten beschichteten Probekörper ergab sich aus der in der Literatur bekannt gewordenen und in Vorversuchen zu dieser Arbeit erworbenen Idee, dass zur Osseointegration insbesondere die Strukturierung des Implantatkörpers beiträgt. Eine dann zusätzlich zur Oberflächenstrukturierung angebrachte Oberflächenaktivierung mittels RGD-Peptiden, Hydroxylapatit und Plasma wurde daher in kleineren Präparategruppen getestet. Die Unterteilung in die 4-Wochen- und die 12-Wochen-Gruppe wurde gewählt, um den – im Rahmen dieser Studie postulierten – hypothetischen Effekt der Strukturierung der untersuchten Implantatkörperoberflächen bezüglich einer besonders schnell initialisierten Implantatfixation und damit einen Zeitvorteil einer etwaigen Osseointegration besser evaluieren zu können. Fortlaufende Reihenuntersuchungen im Tiermodell mit kontinuierlicher Auswertung sind in vivo nur schwer zu realisieren. Entsprechend wurden zwei Zeitpunkte festgelegt, an denen die histomorphologischen Messungen ablaufen sollten. In Anbetracht der anatomisch-physiologischen Osteogenesezeit des Wirbeltierorganismus erschienen 4- und 12-Wochen-Abstände im Zusammenhang mit den Fragestellungen der vorliegenden Dissertation als am sinnvollsten.

5.2 Histomorphometrische Auswertungen

5.2.1 Lichtmikroskopische Auswertung der Probekörper-Präparate

In der lichtmikroskopischen Auswertung erfolgte die Beurteilung der Anzahl der Osteoblasten mit direktem Kontakt zur Implantatoberfläche, der stabil-ossären Trabekelzahl und Spongiosa, des Vorkommens von ossären Nekrosen und der Nachbildung der Implantatoberfläche. Die Auswertung erfolgte nicht direkt am lichtmikroskopischen Okular, sondern an – mithilfe einer digitalen Fotokamera erstellten – psd-Bilddateien im Dateiaufruf am Computer. In den psd-Bilddateien wurden die Präparate in zwei Ausschnittdateien untergliedert. Dies erfolgte zur besseren und genaueren Beurteilung der Knochen-Implantat-Grenze durch das Erreichen höherer Auflösungsgrade. Zur Beurteilung der Gewebemuster der einzelnen Präparate wurden beide Bildanteile anhand verschiedener spezifischer histologischer Bildmerkmale via Bildschirm eindeutig wieder miteinander „verbunden“. Die histologische Datenerhebung erfolgte dabei stets durch Kenntnisse und Beurteilung der Gewebe durch die Autorin. Dabei wurden Osteoblasten, Trabekel und ossäre Nekrosen durch zuvor erlernte Identifikation, Auszählung und konsequente Bezugnahme auf den im Rahmen dieser Dissertation erstellten eigenen Score bestimmt. Die ossäre Nachbildung der Implantatoberfläche erfolgte durch vergleichende Auswertung in einer Gesamtübersicht über die Präparategruppen.

Wissenschaftlich-histologische Beurteilungen sind immer an die Fachkenntnis der begutachtenden Personengruppen gebunden. Derartige Auswertungsstrategien sind semiquantitativ und repräsentieren subjektive Einschätzungen. Zur Ergänzung der erhobenen lichtmikroskopischen Daten erfolgte daher ein Abgleich der erzielten histomorphologischen Ergebnisse mit einer Wissenschafts-Software in einem weiteren Abschnitt der vorliegenden Dissertation. Dabei können gewonnene Daten zum ossären Dichtegrad in der softwaregestützten Auswertung die durch reine Auszählung von stabil-ossären Trabekeln bzw. Osteoblasten in der lichtmikroskopischen Evaluierung gewonnenen Daten grundsätzlich ergänzen und stellen ein zusätzliches objektives Auswertungsverfahren dar. Die in der histomorphologischen Auswertung mit dem bloßen Auge der Untersucherin beurteilte Nachbildung der Knochen-Implantat-Grenze und die daraus gewonnenen Daten können durch die angewendete BIC-Messung („Knochen-Implantat-Kontakt-Messung“) ergänzt werden.

5.2.2 Beurteilung der Osseointegration

Optimale osseointegrative Effekte werden in der modernen Implantologie heute insbesondere durch Strukturgebung des Implantatkörpers erzielt. Eine zusätzliche Oberflächenbeschichtung kann dagegen nach Auffassung der vorliegenden Dissertation sekundäre Effekte erzielen. Die Modifikation der Implantatkörper-Oberfläche sowohl durch Strukturgebung als auch durch eine zusätzlich erfolgte bioaktive Beschichtung erreicht in allen bisherigen Studien, die als Grundlage dieser Arbeit dienten, deutlich verbesserte knöcherne Verankerungen des Implantats im Patientenkörper post operationem. In Vorstudien zur vorliegenden Dissertation wurden insgesamt drei unterschiedliche bioaktive Beschichtungen positiv evaluiert: RGD-Peptide, Hydroxylapatit, Plasma. Das Tiermodell, das im Rahmen des chirurgisch-klinischen Verbundprojekts „Direct To Bone“ – dem auch die histomorphometrischen Untersuchungen dieser vorliegenden Dissertation zuzurechnen sind – Verwendung fand, konnte in parallel zur histologischen Auswertung geführten Push-out-Versuchen an den Femora der gleichen Tiere des Tiermodells grundsätzlich analoge Ergebnisse liefern. Es ergibt sich in der Evaluierung aller Studien des Projekts die überragende biologische Bedeutung der geometrischen Oberflächenstruktur, die die potenziellen zusätzlichen Vorteile einer bioaktiven Beschichtung überwiegt. Die im Score gewählte Gliederung der Präparate wird in der nun folgenden Diskussion der beobachteten Osseointegration beibehalten.

5.2.2.1 4-Wochen-Gruppe: Unstrukturierte und strukturierte Probekörper

In den ausgewerteten Präparaten der 4-Wochen-Gruppe können zwischen der unstrukturierten Probekörpergruppe und der strukturierten Probekörpergruppe deutlich auswertbare Unterschiede bereits im Auftreten der Osteoblasten-Kontakte gesehen werden. Dabei kommen in der Gruppe der strukturierten Probekörper in der Summe viermal höhere Osteoblasten-Werte mit einem direkten Implantatkontakt als in der Gruppe der unstrukturierten Probekörper vor. Ähnliche Ergebnisse erzielen die Auswertungen der Trabekelzahl und der Spongiosamasse zwischen unstrukturierten und strukturierten Probekörpern: Bei den strukturierten Probekörpern verdoppelt sich bereits in der 4-Wochen-Gruppe die Zahl der Osteotrabekel. Beide Phänomene summiert sind als histologisches Merkmal einer chirurgisch-klinisch deutlich verbesserten Osseointegration zu werten. Sie dürfen ferner als Zeichen einer verbesserten Stabilität der Knochen-Implantat-Grenze verstanden werden. Es darf also davon ausgegangen werden, dass strukturierte Probekörper eine wesentlich bessere Gewebeverankerung ermöglichen und ein Lösen des

gesetzten Implantats im direkten Vergleich mit unstrukturierten Probekörpern dadurch sehr viel unwahrscheinlicher wird. Außerdem tragen osteostabile Knochen-Implantat-Grenzen zu einer Verbesserung der primären und sekundären Osteogenese bei. Dagegen sind ossäre Nekrosen in beiden Probekörpergruppen in nahezu gleichem Maße zu finden. In der Probekörpergruppe mit Struktur zeigen beinahe doppelt so viele Präparate eine Nachbildung der Implantatoberfläche wie in der Probekörpergruppe ohne Struktur. Ossäre Nekrosen sind im Rahmen der physiologischen Umbauvorgänge des gesunden Knochens zu finden – die deutlich besseren Ergebnisse der strukturierten Probekörpergruppe sprechen allerdings für eine verbesserte zellulär-knöchernen Einheilung.

5.2.2.2 4-Wochen-Gruppe: Strukturierte und beschichtete Probekörper

In der Beurteilung der strukturierten und beschichteten Probekörper zeichnen sich die Präparate mit RGD-Peptid-Beschichtung, mit Hydroxylapatit-Beschichtung (HA) und schließlich mit Plasmabeschichtung durch eine annähernd gleiche Aktivität von Osteoblasten und stabil-ossären Trabekeln aus, die in direktem Implantatkontakt stehen. In der 4-Wochen-Gruppe kann also durch Beschichtung des strukturierten Implantatkörpers eine allgemein immerhin schwache Verbesserung der Osseointegration in allen drei Beschichtungsgruppen gleichermaßen veranschlagt werden.

Ossäre Nekrosen kommen in der RGD-Gruppe mit einer Zahl von 1, in der HA-Gruppe mit einer Zahl von 3 und in der Plasma-Gruppe mit einer Zahl von 2 vor. Die Nachbildung der Implantatoberfläche wird in der RGD-Gruppe wirkungsvoll erreicht – die HA-Gruppe und die Plasma-Gruppe liegen dicht hinter der RGD-Gruppe.

5.2.2.3 4-Wochen-Gruppe: Zusammenfassung

Es ergibt sich ein wahrnehmbarer Unterschied bei der erfolgten Osseointegration im Vergleich zwischen den unstrukturierten und den strukturierten Probekörpern: Die Gruppe der strukturierten Probekörper liegt bei einer viermal höheren Osteoblastendichte im direkten Vergleich zur unstrukturierten Probekörpergruppe. Mit 40 Osteoblasten zeigt die strukturierte Probekörpergruppe aufgerundet einen 17%igen Zuwachs der Osteoblastenzahl im direkten Vergleich zur Gesamtgruppe der strukturierten und beschichteten Probekörper mit 22 Osteoblasten nach Ablauf von vier Wochen post implantationem. Ein ähnliches Ergebnis erzielt die Beurteilung der Anzahl der ossären Trabekel/Spongiosa: In der strukturierten Probekörpergruppe können gut

doppelt so viele Osteotrabekel gezählt werden wie in der unstrukturierten Probekörpergruppe. Im direkten Vergleich zwischen der strukturierten unbeschichteten Probekörpergruppe und den strukturierten RGD-, HA- und Plasma-Präparaten ergibt sich auch hier noch immer eine um 10% erhöhte Osteotrabekelzahl. In der Zahl des Vorkommens von ossären Nekrosen im Bereich der direkten Knochen-Implantat-Grenze liegt die Gruppe der strukturiert-beschichteten Probekörper etwas höher im Vergleich zu den Gruppen der unstrukturierten und strukturierten unbeschichteten Probekörper. Das beste Ergebnis in der Bewertung des Vorkommens von ossären Nekrosen erzielte die Gruppe der RGD-Peptid-Probekörper. Entsprechend der Osteoblastenaktivität erzielte in der Beurteilung der Neubildung der Implantatoberfläche ebenfalls die Gruppe der strukturierten, aber unbeschichteten Probekörper die besten Ergebnisse – direkt gefolgt von der Gruppe der RGD-Peptide. Abschließend ergibt sich in der gesamten 4-Wochen-Gruppe der strukturierten unbeschichteten Probekörpergruppe das insgesamt beste Osseointegrationsergebnis. Dabei sind die Zunahmen der Knochenaktivität von der unstrukturierten zur strukturierten, aber unbeschichteten Probekörpergruppe am deutlichsten. Eine allgemein verbesserte Osseointegration erreicht im direkten Vergleich zur unstrukturierten Gruppe aber auch die strukturiert-beschichtete Probekörpergruppe.

Praktisch-chirurgisch ergibt sich aus diesen Ergebnissen die Präferenz von grundsätzlich strukturierten Implantatmaterialien. Die Beschichtung eines gewählten strukturierten Implantatmaterials scheint dagegen in der ersten Zeit post operationem untergeordnet zu sein. Lediglich die Vermeidung von ossären Nekrosen kann durch die Verwendung von beschichtetem Implantatmaterial offensichtlich erreicht werden – eine Verbesserung der primären bzw. sekundären Ossifikationsvorgänge an den direkten Knochen-Implantat-Grenzen erzielt eine Beschichtung des Implantatmaterials jedoch nicht sehr deutlich. Beste Ergebnisse erzielen dabei abschließend im Vergleich RGD-beschichtete Materialien.

5.2.2.4 12-Wochen Gruppe: Unstrukturierte und strukturierte Probekörper

In den ausgewerteten Präparaten der 12-Wochen-Gruppe können im direkten Vergleich zur 4-Wochen-Gruppe zwischen der unstrukturierten und der strukturierten Probekörperoberfläche keine sehr deutlichen Unterschiede ermittelt werden. Stabil-ossäre Trabekel kommen in der unstrukturierten Probekörpergruppe mit einer Zahl von 175, in der strukturierten

Probekörpergruppe mit einer Zahl von 188 vor. Ossäre Nekrosen finden sich in beiden Probekörpergruppen gleichermaßen. Ebenso gleichartig verläuft die Nachbildung der Implantatoberfläche in beiden ausgewerteten Probekörpergruppen. Die ossäre Einheilung bzw. der Ablauf der Osseointegration findet daher in beiden Probekörpergruppen in annähernd gleichem Maße statt.

5.2.2.5 12-Wochen-Gruppe: Strukturierte und beschichtete Probekörper

In der Beurteilung der strukturierten und beschichteten Probekörper erzielen die Präparate der Plasma- und der HA-Gruppe die höchsten Osteoblastenaktivitäten, gefolgt von der Gruppe der RGD-Peptide. Die Zahl der histologisch gezählten Osteotrabel liegt in der RGD-Gruppe bei 179, in der HA-Gruppe bei 149 und in der Plasma-Gruppe bei 153. Im direkten Vergleich finden sich in der Plasma- und der HA-Gruppe zusammenfassend knapp dreimal so viele Osteoblasten wie in der RGD-beschichteten Probekörpergruppe. Im direkten Vergleich zur 4-Wochen-Gruppe wachsen damit rund sechsmal mehr Osteoblasten an die Implantatgrenze an.

In der Zahl der stabil-ossären Trabekel führen die RGD-Peptid-beschichteten Probekörper gefolgt von den unbeschichteten, aber strukturierten Probekörpern. In der Beurteilung des Vorkommens von ossären Nekrosen im Knochen-Implantat-Bereich ergibt sich zwischen den verglichenen RGD-Peptid- und den HA-beschichteten Probekörpern kein bedeutsamer Unterschied; die Plasma-aktivierte Probekörpergruppe zeigte dagegen keinerlei Nekrosen. Die gelungene Nachbildung der Implantatoberfläche erreichten in der RGD- und der HA-Gruppe 8 von 8, in der Plasma-Gruppe nur 7 von 8 ausgewerteten Präparaten.

5.2.2.6 12-Wochen-Gruppe: Zusammenfassung

In der späteren Heilphase der 12-Wochen-Gruppe ergibt sich die deutlich beste Osseointegration – bezogen auf die Osteoblastenaktivität – in der plasmabeschichteten Probekörpergruppe. Im direkten Vergleich zur 4-Wochen-Gruppe scheint hier die Beschichtung des Implantatmaterials im fortlaufenden Heilungsprozess eine wesentlich wichtigere Rolle zu spielen. Eine Tatsache, die sich im dichten Vorkommen von Osteoblasten mit direktem Implantatoberflächenkontakt widerspiegelt: Eine ähnlich hohe Zahl von die Implantatoberfläche direkt berührenden Osteoblasten der 4-Wochen-Gruppe innerhalb der strukturierten, aber unbeschichteten Probekörper-Präparate wird in der 12-Wochen-Gruppe bei den strukturierten mit Plasma

beschichteten Probekörpern gefunden. Die wesentliche Bedeutung einer strukturierten Implantatoberfläche, die bereits in der 4-Wochen-Gruppe durch das dichte Vorkommen vitaler Osteoblasten verifiziert werden konnte, wird in der 12-Wochen-Gruppe durch die hohe Zahl der eingewachsenen stabil-ossären Trabekel bestätigt, die sich durch eine zusätzliche Beschichtung des bereits strukturierten Probekörpers auch in dieser Altersgruppe nicht eindeutig verbessern lässt. Im Gegensatz zur 4-Wochen-Gruppe, in der insbesondere die Strukturgebung des Probekörpers verbesserte Einwachsraten verantwortet, hat eine zusätzlich angebrachte Beschichtung der Implantatoberfläche in der 12-Wochen-Gruppe eine insgesamt höhere Bedeutung. Diese zeigt sich insbesondere in der Reduktion bzw. Vermeidung von nekrotischen Vorgängen an der Knochen-Implantat-Grenze. In der Gruppe der plasmabeschichteten Probekörper konnte das Vorkommen von ossären Nekrosen nicht beobachtet werden – womöglich haben einsetzende Remodelling-Prozesse zunächst vorhandene Nekrosen repariert. Die klinische Relevanz solcher Vorgänge bleibt schließlich zu prüfen.

In beiden Probekörpergruppen (4 Wochen/12 Wochen) konnte somit gezeigt werden, dass insbesondere die Strukturgebung der Oberfläche des Implantatmaterials optimale osseointegrative Ergebnisse zu erzielen vermag. In der ersten und auch in der zweiten Heilungsphase bzw. für den Ablauf der gestützten primären und sekundären Ossifikation kann die Struktur der Implantatoberfläche eine herausragende Bedeutung gewinnen. Für das Erzielen einer erhöhten Osteoblastenaktivität in der zweiten Heilungsphase (zwölf Wochen) und das Vermeiden von ossären Nekrosen kann eine zusätzliche Beschichtung der bereits strukturierten Implantatoberfläche – bezüglich der Osteoblastenaktivität und des Vorkommens ossärer Nekrosen – grundsätzlich empfohlen werden. In beiden Zeitgruppen kann die Beschichtung der Implantatoberfläche mit RGD-Peptiden und Plasma besonders empfohlen werden: RGD-Peptide scheinen dabei den ersten Teil des Heilungsverlaufs post operationem grundsätzlich zu unterstützen, im zweiten Teil des Heilungsverlaufs insbesondere die ossäre Trabekelbildung. Plasmabeschichtungen dagegen erhöhen im zweiten Abschnitt der Einheilungsphase insbesondere die Osteoblastenaktivität. Hydroxylapatit-Beschichtungen erreichen sowohl im ersten als auch im zweiten Heilphasenverlauf im Vergleich zu RGD- und Plasmabeschichtungen grundsätzlich weniger optimale Werte. Abschließend kann im Rahmen der vorliegenden Dissertation für eine optimal verlaufende Osseointegration an der Knochen-Implantat-Grenze bezüglich einer Materialbeschichtung bereits in der ersten Heilphase post operationem eine RGD-

Peptid- und in der zweiten Heilphase eine RGD-Peptid- bzw. Plasmabeschichtung des bereits strukturierten Implantatmaterials empfohlen werden.

5.3 Softwaregestützte Auswertungen

Die softwaregestützte Knochendichtemessung (Bone) in der Peripherie des Implantats und die Knochen-Implantat-Kontakt-Messung (BIC) erlauben eine objektive Ergänzung der subjektiven, semiquantitativen histomorphometrischen Datenerhebung. Insbesondere das exakte Nachvollziehen der im Mikrometerbereich liegenden feinen Knochengewebe-Implantationskörper-Grenze kann durch diese zusätzliche Maßnahme deutlich verbessert werden. Im Gegensatz dazu kann die in der vorliegenden Dissertation verwendete Software nicht zwischen feinen histologisch unterschiedlichen Strukturen wie Osteoblast, Trabekel oder nekrobiolytischem Knochenmatrixgewebe differenzieren. Um die in der Histomorphometrie generierten Ergebnisse der vorliegenden Dissertation zu ergänzen, werden die Auswertungen um das Verfahren der softwaregestützten Auswertung erweitert.

5.3.1 Knochendichte (Bone)

5.3.1.1 4-Wochen-Gruppe: Unstrukturierte und strukturierte Probekörper

In der softwaregestützten Knochendichtemessung wird in der Gruppe der unstrukturierten Probekörper ein Mittelwert von 41,23 % Knochendichte erreicht – in der strukturierten Probekörpergruppe ist es ein Mittelwert von 43,66 %. Die softwaregestützte Erfassung bestätigt damit die Ergebnisse der histomorphometrischen Ermittlung. In der vorliegenden softwaregestützten Knochendichtemessung kann dazu im direkten Vergleich eine leichte Zunahme der knöchernen Dichte zwischen unstrukturierten und strukturierten Probekörpern ermittelt werden. Diese Zunahme ist allerdings nicht signifikant. Für die ossäre Integration eines Implantatkörpers, insbesondere in der ersten Heilphase (vier Wochen), hat die Strukturgebung der Oberfläche des Implantats folglich beachtenswerte Relevanz. Zukünftige Implantatkörper sollten daher über eine entsprechende Oberflächenmodifikation im Sinne einer Strukturgebung verfügen, um optimale initiale Einheilergebnisse erzielen zu können.

5.3.1.2 4-Wochen-Gruppe: Strukturierte und beschichtete Probekörper

In der Gruppe der strukturierten Probekörper wird eine Knochendichte mit einem Mittelwert von insgesamt 43,66 % erreicht, in der Gruppe der strukturiert beschichteten Probekörper im arithmetischen Mittel eine 40,69 %ige Knochendichte. In der Gruppe der RGD-beschichteten Probekörper wird eine Knochendichte mit einem Mittelwert von 46,70 % erreicht, in der Gruppe der HA-beschichteten Probekörper 37,86 %, in der Gruppe der Plasma-beschichteten schließlich 37,52 %. Sowohl die Beschichtungen des Implantatkörpers mit Hydroxylapatit als auch mit Plasma zeigen Ergebnisse der Knochendichte, die zum Teil sogar deutlich hinter den Ergebnissen des rein strukturierten Implantatkörpers liegen. In der Zunahme der ossären Dichte erscheint die Beschichtung des Implantatkörpers als grundsätzlich sekundär, verbessert sich dagegen aber unter Nutzung der RGD-Beschichtung recht deutlich. Diese Ergebnisse untermauern die in der Histomorphometrie dieser Dissertation gewonnenen Daten eindeutig: Sollen beschichtete Implantationskörper in der initialen Heilphase einer chirurgischen Implantation zum Einsatz kommen, darf die RGD-Beschichtung im Sinne einer verbesserten Zellvitalität grundsätzlich in Betracht gezogen werden.

5.3.1.3 12-Wochen-Gruppe: Unstrukturierte und strukturierte Probekörper

In der softwaregestützten Knochendichtemessung wird in der Gruppe der unstrukturierten Probekörper ein Mittelwert von 53,75 % Knochendichte erreicht – in der strukturierten Probekörpergruppe sind es 53,38 %. Die ermittelten Daten belegen damit die histomorphometrisch gewonnenen Analyseergebnisse: Für die weitere ossäre Integration im Anschluss an die frühe Einheilphase dominiert die Strukturgebung des Implantatkörpers nicht mehr – die Einwachsrate der strukturierten Probekörper liegt sogar leicht unterhalb der ermittelten Einwachsrate der unstrukturierten Probekörper. In der 12-Wochen-Gruppe ist ferner zu beachten, dass der bereits initial erfolgte Knochen-Implantat-Kontakt bestenfalls in vollem Umfang bestehen bleibt. Von gesteigertem Interesse – und das gilt in gleichem Maße für die histomorphometrischen Daten – sind zu diesem Untersuchungszeitpunkt daher die Vitalitätskennzeichen der bereits angelegten Knochenmatrix und der Zugewinn an knöcherner Dichte.

5.3.1.4 12-Wochen-Gruppe: Strukturierte und beschichtete Probekörper

In der Gruppe der strukturierten Probekörper wird eine Knochendichte mit einem Mittelwert von insgesamt 53,38 % erreicht, in der Gruppe der strukturiert beschichteten Probekörper im arithmetischen Mittel eine 53,77 %ige Knochendichte. Unter der Verwendung der RGD-Beschichtung werden 54,83 % Knochendichte erreicht, unter der Anwendung von Hydroxylapatit 52,56 % und unter Beschichtung der Implantatkörper mit Plasma 53,92 %. Zusammenfassend fallen die softwareermittelten Daten nicht exakt so scharf aus wie die Ergebnisse der vorab histomorphometrisch durchgeführten Ermittlung: Sowohl der Unterschied in der Datenerhebung zwischen unstrukturierten und strukturierten Probekörper-Materialien als auch die Unterscheidung zwischen strukturierten unbeschichteten und strukturierten beschichteten Materialien fällt nicht so deutlich aus wie in der mikroskopischen Analyse. Durch die ungenaue Differenzierung zwischen vitalem Gewebe und womöglichen nekrotisch gewordenen Arealen verwaschen sich die histometrisch ermittelten Daten in der Software-Statistik. Dennoch ergeben sich mit der Histomorphometrie vergleichbare Ergebnisse: In der 12-Wochen-Gruppe ist die Verwendung von RGD- bzw. plasmabeschichteten strukturierten Implantatkörpern am vielversprechendsten.

5.3.2 Knochen-Implantat-Kontakt (BIC)

5.3.2.1 4-Wochen-Gruppe: Unstrukturierte und strukturierte Probekörper

In der softwaregestützten BIC-Messung wird in der Gruppe der unstrukturierten Probekörper ein Mittelwert von 11,72 % Knochen-Implantat-Kontakt erreicht – in der strukturierten Probekörpergruppe sind es 21,80 %. Der deutliche Unterschied zwischen den BIC-Ergebnissen der unstrukturierten Probekörper und den strukturierten Implantaten untermauert erneut die große Relevanz von Strukturgebung in der ersten Heilphase.

5.3.2.2 4-Wochen-Gruppe: Strukturierte und beschichtete Probekörper

In der Gruppe der strukturierten Probekörper wird ein BIC mit einem Mittelwert von 21,80 % erreicht, in der Gruppe der strukturierten und beschichteten Probekörper wird im arithmetischen Mittel ein 19,11 %iger BIC erreicht. Unter der Verwendung der RGD-Beschichtung werden 25,16 % BIC erreicht, unter der Anwendung von Hydroxylapatit 15,35 % und unter Beschichtung der Implantatkörper mit Plasma 16,82 %. Die Mittelwerte der strukturierten und der strukturierten und mit RGD-Peptiden beschichteten Probekörper zeigen im Vergleich zu den unstrukturierten

Probekörpern eine deutliche Signifikanz. Die reine Strukturgebung des Probekörpers generiert beinahe ähnliche Ergebnisse wie die RGD-Beschichtung zusätzlich zur Struktur des Implantatkörpers. Es wiederholt sich die Aussage zur Bedeutung der Struktur des Implantats zum Beginn der Einheilphase. Beschichtungen bleiben in dieser ersten Einheilphase nachweislich sekundär. Die softwareunterstützte BIC-Messung erlaubt die Feststellung, dass Strukturgebung und Strukturgebung mit RGD-Beschichtung gleichartige Einheilergebnisse ermöglichen.

5.3.2.3 12-Wochen-Gruppe: Unstrukturierte und strukturierte Probekörper

In der softwaregestützten BIC-Messung wird in der Gruppe der unstrukturierten Probekörper ein Mittelwert von 35,35 % Knochen-Implantat-Kontakt erreicht – in der strukturierten Probekörpergruppe sind es 37,64 %. Die Zunahme der Mittelwerte gegenüber den 4-Wochen-Werten ist in beiden Probekörpergruppen hochsignifikant bzw. signifikant. Die an dieser Stelle erfassten Daten belegen: Wie in allen zuvor evaluierten Untersuchungsdaten scheint eine Strukturgebung des Probekörpers in der 12-Wochen-Gruppe von grundsätzlich untergeordneter Bedeutung zu sein.

5.3.2.4 12-Wochen-Gruppe: Strukturierte und beschichtete Probekörper

In der Gruppe der strukturierten Probekörper wird ein Knochen-Implantat-Kontakt mit einem Mittelwert von insgesamt 37,64 % erreicht, in der Gruppe der strukturierten beschichteten Probekörper im arithmetischen Mittel ein 42,70 %iger BIC. Unter der Verwendung der RGD-Beschichtung werden 45,07 % BIC erreicht, unter der Anwendung von Hydroxylapatit 42,52 % und unter Beschichtung der Implantatkörper mit Plasma 40,53%. Die Zunahme der Mittelwerte gegenüber den 4-Wochen-Werten ist in allen genannten Probekörper-Gruppen signifikant. In der 12-Wochen-Heilphase ist die Kontaktbildung zwischen Implantat und Patienten-Knochengewebe bereits vorangeschritten. Das direkte Anwachsen von Patientengewebe an das Implantatmaterial ist vollzogen. Ein bereits bestehender Gewebesaum um das gesetzte Implantat wird von heranwachsenden Zellen zunehmend verdichtet. Nachfolgende zelluläre Prozesse unterliegen allenfalls nekrotischen Vorgängen. Während die Strukturgebung des Implantats in der 12-Wochen-Gruppe in zunehmendem Maße bedeutungslos zu sein scheint, vermindern Beschichtungen potenziell Nekroseprozesse und verbessern auf diese Weise die ossäre Integration des Implantats im zellulären Patienten-Gewebeverband. Es handelt sich um Ergebnisse, die ebenso in der histomorphometrischen Auswertung gewonnen werden konnten. Entgegen den in der histomorphometrischen Datenerhebung gewonnenen Ergebnissen zeigt die

softwaregestützte BIC-Messung Beschichtungspräferenzen in den Gruppen der HA- und RGD-beschichteten Probekörper. Die an dieser Stelle gewonnenen tendenziell etwas höheren HA-Ergebnisse und die etwas niedrigeren Plasma-Ergebnisse traten lediglich bei den BIC-Untersuchungen auf. Für eine detaillierte Klärung dieser Befunde könnten in Folgestudien RGD-, HA- und Plasmabeschichtungen beispielsweise in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht werden. Die dabei auftretenden Daten zur Verbesserung oder Verschlechterung der Osseointegration müssten dann stark differenziert und in direktem Vergleich noch einmal neu gewonnen und evaluiert werden.

5.4 Literaturvergleich

Schreiner et al. (2002) beschreiben, dass Modifikationen der Oberfläche – Rauigkeit und Porosität – von Keramikimplantaten grundsätzlich das osseointegrative Verhalten des Patientengewebes verbessern und eine knöcherne Integration erlauben. In Schreiners Arbeit kamen 20 zylindrische Aluminiumoxid- und Zirkoniumoxid-Keramiken zum Einsatz. Die Implantate dieser Arbeit waren glatt, makrostrukturiert, korundgestrahlt und porös. Die Probekörper wurden beidseits suprakondylär und intertrochantär in die Femora von Göttinger Minipigs implantiert und verblieben dort zwölf Wochen. In der vorliegenden Dissertation erhobene Daten zeigen grundsätzlich ebenfalls eine Präferenz der strukturierten Implantatoberflächen gegenüber den unstrukturierten Materialien. Das Osseointegrationsverhalten konnte durch Anwendung von strukturierten Probekörpern insbesondere im ersten Teil der Heilphase verbessert werden. In einer Studie von Bieniek und Swiecki konnten bereits 1991 ähnlich verbesserte Osseointegrationen innerhalb von wenigen Monaten in der Anwendung eines porösen Aluminiumkeramik-Implantats bei einer Vielzahl von Patienten gezeigt werden. Weinstein et al. (1976) und Kakutani et al. (1989) evaluierten die Osseointegration von porösen Aluminiumoxid-Keramikzylindern in Hundefemora und Kaninchen-Tibiae jeweils im Push-out-Test. Die Implantatkörper verblieben dabei in der Untersuchung von Weinstein et al. (1976) ein, zwei, vier bzw. acht Wochen. In der Arbeit von Kakutani et al. (1989) fanden unbeschichtete Aluminiumoxid-Implantatkörper, granuliert beschichtete, granuliert hydroxylapatitbeschichtete, polierte, granuliert hydroxylapatitbeschichtete und hydroxylapatitverdichtete Probekörper Verwendung. Die Standzeit der Probekörper in den Untersuchungen von Kakutani et al. (1989) betrug acht und 25 Wochen. Beide Untersuchungen konnten bereits damals – sowohl

biomechanisch als auch histologisch – eine verbesserte Osseointegration durch Strukturierung des Implantatkörpers, aber auch durch Beschichtung mit bioaktiven Oberflächenagencien belegen. Dabei verstärkt sich der Verbund zwischen Implantat und Patientenknochen durch Strukturgebung und bioaktive Beschichtung signifikant. In der vorliegenden Studie konnte die positive Wirkung einer Beschichtung mit Hydroxylapatit lediglich im Rahmen der BIC-Messung gesehen werden. Weder die Werte der Knochendichtemessung noch die Ergebnisse der histomorphometrischen Auswertung unterstützen diese im Vergleich zu der RGD- bzw. Plasma-beschichtung etwas höheren BIC-Ergebnisse. Cornell und Lane (1998) zeigten darüber hinaus, dass die dreidimensionale Strukturgebung des Implantatkörpers bedeutende Voraussetzung für das schnelle integrative Verhalten von Osteoblasten im Patientenkörper ist. Sowohl die histomorphometrische als auch die softwaregestützte Datenerhebung der vorliegenden Dissertation erlaubt die Aussage, dass insbesondere in den ersten Wochen der Heilphase dreidimensionale und strukturierte Probekörper die besseren Osseointegrationsergebnisse erzielen können.

Bioaktive Beschichtungen, v.a. RGD-Peptid- und Plasma-Aktivierungen, können in den späteren Heilphasenabschnitten das Vorkommen von ossären Nekrosen verhindern. Analog dazu erscheint das Ergebnis einer In-vitro- und In-vivo-Studie von Schliephake et al. im Jahre 2005, die eine gewisse Verbesserung der periimplantären Osseointegration und des BIC für strukturierte und hoch konzentriert RGD-beschichtete Implantatkörper bereits im ersten Monat post operationem belegen konnte. Bei den im Rahmen der vorliegenden Studie ermittelten BIC-Werten der 4-Wochen-Gruppe zeigten die Mittelwerte der strukturierten und der strukturierten und mit RGD-Peptiden beschichteten Probekörper im Vergleich zu den unstrukturierten Probekörpern eine deutliche Signifikanz. Ziel einer Studie von Steinhauser et al. (2005) war es herauszufinden, ob – analog zu vorab vorgenommenen Zellversuchen mit Osteoblasten – eine RGD-Peptid-Beschichtung die Osseointegration von metallischen Implantaten verbessert. Für das Tiermodell dieser Studie wurden 22 Merino-Schafe gewählt, die randomisiert in zwei Überlebenszeitgruppen (4- und 12-Wochen) und des Weiteren in zwei Fixationsgruppen (Pressfit vs. Spaltmodell) aufgeteilt wurden. Als Prüfkörper wurden Pressfit- und Spaltmodell-Titanimplantate aus der Titanbasislegierung TiAl6V4 gewählt, die üblicherweise für eine zementfreie Fixierung von Implantaten Anwendung findet. Innerhalb der Fixationsgruppen wurde eine Hälfte der Implantate mit RGD-Peptiden beschichtet, die andere Hälfte blieb unbeschichtet und diente als Kontrollgruppe. Die zylinderförmigen Implantate hatten einen Durchmesser von 7 mm und eine

Länge von 12 mm, wobei die Spaltmodell-Implantate bei gleicher Länge und Durchmesser zusätzlich an drei um jeweils 120° zueinander versetzten Stellen des Umfangs um 1,0 mm überfräst waren. Jedem Tier wurden acht Implantate jeweils bilateral in das distale Femur und die proximale Tibia implantiert, wobei die Pressfit-Implantate im medialen femoralen bzw. tibialen Knochenlager und die Spaltmodell-Prüfkörper auf der lateralen Seite platziert wurden. Nach Ende der Standzeit und Euthanasie der Tiere wurden die femoralen Proben für die biomechanischen Analysen verwendet, die tibialen Proben wurden zu einem späteren Zeitpunkt histologisch ausgewertet. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass in der Frühphase der Implantation (vier Wochen) tendenziell eine verbesserte knöcherne Integration von mit RGD-Peptiden beschichteten metallischen Implantaten erzielt werden kann und dass eine RGD-Beschichtung das Potenzial zu einer verbesserten knöchernen Implantat-Integration besitzt. Im Gegensatz zur Studie von Steinhauser kann in der vorliegenden Studie biomechanisch und histomorphometrisch kein signifikanter Einfluss der bioaktiven Beschichtungen innerhalb der 4-Wochen-Gruppe auf die ossäre Integration der Implantate festgestellt werden. Jedoch ergaben sich biomechanisch hochsignifikante Unterschiede sowohl in der 4- als auch in der 12-Wochen-Gruppe im Vergleich zwischen unstrukturierten und strukturierten Probekörpern. Dies lässt auf eine herausragende Bedeutung der Oberflächenstruktur von Implantaten für die Osseointegration schließen, wobei die potenziellen Vorteile einer Oberflächenbeschichtung in den Hintergrund treten. Die Ergebnisse der Scherspannung liegen in der Studie von Steinhauser bei 1,5 MPa. Die biomechanische Auswertung der femoralen Proben lieferte in der vorliegenden Studie eine Scherspannung von 11,5 MPa. Da Design und Tiermodell beider Studien ähnlich, jedoch die angewendeten Werkstoffe unterschiedlich sind, ist ein direkter Vergleich nicht angebracht. Jedoch kann festgestellt werden, dass der Werkstoff Keramik keine schlechteren Scherspannungsergebnisse liefert als Titan. Ferris et al. legten bereits 1999 in ihren Studien vergleichbare Ergebnisse für RGD-beschichtete Titanium-Femurimplantate am Rattenmodell vor. Keine Aussagen konnten allerdings die aufgeführten Studien im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit zum Vorkommen von ossären Nekrosen in der Spätheilphase erzielen: Die Datenerhebung der vorliegenden Dissertation belegt sowohl in der histomorphometrischen wie auch in der Software-Auswertung verbesserte Nekroseraten und somit eine Verbesserung der ossären Integration des Implantats durch RGD-Beschichtung in der Spätheilphase. Aussagen zur Konzentration und zu einer womöglichen Präferenz von hoch oder niedrig konzentrierten RGD-Beschichtungen waren im Rahmen dieser Arbeit im Gegensatz zu Schliephake et al. (2005) nicht

Teil der Fragestellung. Bioaktive Beschichtungen der Probekörper in den ersten vier Wochen der Integrationsphase post operationem scheinen dagegen im direkten Vergleich mit den strukturierten Probekörpern eher von sekundärer Bedeutung zu sein. Die Nachbildung der Implantatoberfläche wird durch Strukturgebung des Probekörpers in der vorliegenden Dissertation innerhalb der ersten Heilphase nur bedingt unterstützt oder begünstigt, scheint ansonsten dagegen von Struktur und bioaktiver Oberflächenbeschichtung aber weitestgehend unabhängig zu sein. Schwarz et al. präsentierten 2005 eine Studie, mittels der die Osseointegration von vier verschiedenen Implantat-Oberflächen verglichen werden sollte. Als Studien-Modell wurde das Göttinger Minipig gewählt. Im Mittelpunkt der Untersuchung standen zylindrische Probekörper mit einer Länge von 30 mm und einem Durchmesser von 8 mm mit vier unterschiedlichen Implantatoberflächen: glasperlengestrahlt, sandgestrahlt, Titan-Plasma-beschichtet und Titan-Plasma-beschichtet mit einer zusätzlichen Kalziumphosphat-Schicht. Pro Implantatoberflächen-Gruppe wurden 20 Prüfkörper beidseits in die Femora der Tiere implantiert. Nach zwölf Wochen Standzeit wurde die Osseointegration der Prüfkörper durch Push-out-Versuche und histomorphometrische Untersuchungen validiert. Die durchschnittliche Scherspannung lag bei 6,5 MPa bzw. 7,3 MPa. Schwarz et al. konnten zeigen, dass angeraute und poröse Implantatoberflächen sowohl biomechanisch als auch histologisch bessere osseointegrative Ergebnisse erzielten. Schreiner et al. (2009) veröffentlichten eine Studie, in der die Osseointegration von Probekörpern aus AMC-Keramik mechanisch und histologisch nachgewiesen werden sollte. Im Rahmen dieser Studie fanden 24 hohl gebohrte Probekörper aus Alumina-Matrix-Composite-Keramik mit einer Länge von 30 mm und einem durchschnittlichen Durchmesser von 9 mm Anwendung. Die Porengröße der Probekörper betrug 150-300 µm, die Porosität betrug 40%, die mittlere Rauigkeit lag bei 16,5 µm. Als Tiermodell wurden sechs Göttinger Minipigs gewählt. Bei jedem Tier wurde je ein Probekörper intrakondylär und intratrochantär in beide Femora implantiert. Die Standzeit der Tiere betrug zwölf Wochen. Zwölf der 24 Probekörper wurden mechanisch ausgewertet, die zwölf weiteren histomorphometrisch. Die mechanische Untersuchung ergab eine durchschnittliche, maximale Scherspannung von 7,7 MPa. Die Ergebnisse der histomorphometrischen Untersuchung zeigten, dass sowohl in spongiösen als auch in kortikalen Bereichen ein direktes Einwachsen des Knochens in die Implantat-Oberfläche und die Poren stattgefunden hatte. Jedoch wurde bei der Sichtung in einem Teil der Präparate ein schmaler, ca. 1 µm großer Spalt im Interface detektiert, der keine Zellstrukturen zeigte. Das durchschnittlich positive Scherspannungs-Ergebnis aus der Studie von

Schreiner et al. wird durch Ergebnisse der biomechanischen Untersuchung der vorliegenden Arbeit mit einer durchschnittlichen Scherspannung von 11,5 MPa verstärkt und unterstützt die Beobachtung, dass strukturierte Implantat-Oberflächen die Osseointegration entscheidend begünstigen. Allerdings handelt es sich bei beiden Studien um unterschiedliche Tiermodelle, Probekörper und Implantationsorte, sodass ein Vergleich nur mit deutlichen Einschränkungen vorgenommen werden kann. Die Knochenstabilität des Implantat-Patientenknochen-Verbunds ergibt sich aus der Integration von ossärem Gewebe in die strukturierten bzw. porösen Implantatoberflächen. Gahlert et al. (2009) konnten in einer Studie mit Säure behandelten, rauen Titaniumimplantaten bessere Einwachsraten von Probekörpern in die Maxilla von Schweinen nachweisen. Henßge (1985) und Wetzal (2001) beschreiben erneut die Anwendung von Femurimplantaten mit dreidimensionaler spongiös-metallischer Strukturgebung. Diese Strukturgebung bietet ossärem Gewebe die Möglichkeit, sich in das Implantat zu integrieren, und erlaubt ebenso eine physiologische vaskuläre Versorgung des Gewebes.

Im Rahmen der Herstellung von metallischen Implantaten tendiert daher die Chirurgie in jüngster Zeit grundsätzlich dazu, die Oberflächen mit Poren zu versehen, um eine optimale Osseointegration zu erzielen (Schwarz et al. 2008). Bobyne et al. (1980), Engh et al. (1985) und Harris et al. (1985) sowie Boxleitner et al. (2008c) schreiben im Sinne einer tragfähigen Osseointegration der Porengröße des Implantatkörpers ebenso eine außerordentliche Relevanz zu. In der Studie von Boxleitner wurden Proliferation und Osteoblastenwachstum auf keramischen Prüfkörpern mit vier unterschiedlichen Porengrößen sowie auf einer glatten Keramik untersucht und ausgewertet. Es konnte gezeigt werden, dass Poren mit einem Durchmesser von 520-660 µm höhere Proliferationswerte von primären humanen Osteoblasten erwirken als Poren mit geringerem oder größerem Durchmesser. Zur Strukturierung der Implantatoberfläche der im Rahmen dieser Studie verwendeten Probekörper wurde deshalb eine Porengröße von 520-660 µm favorisiert. Sowohl die histomorphometrische als auch die softwaregestützte Auswertung dieser Arbeit erlauben die Aussage, dass die gewählte Porengröße im Literaturvergleich sehr stabile Osseointegrationsvorgänge ermöglicht und unterstützt. Grundsätzlich bestätigen die Ergebnisse dieser Dissertation die wesentliche Bedeutung einer strukturierten Implantatoberfläche für eine optimale Osseointegration in der ersten Heilungsphase (vier Wochen) auch für keramische Implantate. Auch für die zweiten Heilungsphase (zwölf Wochen) sprechen die erhobenen Daten für die Empfehlung einer Strukturierung von Implantatoberflächen.

5.5 Limitationen

Die durchgeführte histomorphologische Auswertung und Datenerhebung stellt bekanntermaßen eine qualitative bzw. semiquantitative Erhebung dar. Ebenso wurde die Segmentierung – das Setzen von Thresholds – manuell durchgeführt. Beides ist als semiquantitativ zu werten, da sie eine subjektive Einschätzung repräsentieren.

Softwaregestützte Auswertungen wurden bisher nur vereinzelt durchgeführt. Die Datenerhebung in der softwaregestützten Auswertung erfolgte nachvollziehbar nach Normen der vorliegenden Software-Version. Die Datenberechnung und Zusammenfassung der erhobenen Werte und Skalen erfolgten mit arithmetischen Mitteln und Methoden des verwendeten Computerprogramms.

Inwieweit die Ergebnisse des Tiermodells Schaf auf die humanen Gegebenheiten übertragen werden können, ist die Frage, da das Schaf die anatomischen und physiologischen Gegebenheiten des menschlichen Patienten nicht uneingeschränkt widerspiegelt.

5.6 Ausblick

Für die Produktion zukünftiger Implantatkörper bedarf es industriell realisierbarer materialtechnischer Anpassungen, die insbesondere die Oberflächenmodifikation des implantierten Körpers berücksichtigen sollten. Für eine optimale Osseointegration erscheint die grundsätzliche Strukturgebung des implantierten Materials von herausragender Bedeutung. Dabei sind poröse Oberflächen von konsequent gleichartig positiver Wirkung für das Einheilen des Implantatkörpers.

Insbesondere die Präparate der 4-Wochen-Gruppe schneiden bezüglich der Kontaktherstellung zwischen Implantatmaterial und Patientenkörper durch strukturierte Implantatoberflächen deutlich positiv ab. Im direkten Datenvergleich zu unstrukturierten Probekörpern trägt die Strukturierung der Implantatoberfläche besonders wirkungsvoll zur gelungenen Frühosseointegration bei. Die bioaktive Beschichtung des zuvor strukturierten Implantatkörpers kann in der weiteren Heilphase von besonderer Bedeutung für die Stabilität einer Implantation sein: Unter den bioaktiven Beschichtungen ergaben sich in der histomorphometrischen Auswertung für RGD-Peptid- und Plasma-behandelte Oberflächen tendenziell verbesserte Ergebnisse. Um die genauen konzentrationsabhängigen Wirkungsunterschiede der RGD-Beschichtung der Implantatoberfläche im Detail erfassen zu können, sind weiterführende Untersuchungen notwendig. Inwieweit sich Unterschiede zwischen verschiedenen RGD-Konzentrationen in der

Einheilungsphase ergeben und welche Bedeutung ein womöglich anders gewählter Konzentrationsbereich für die Entwicklung von ossären Nekrosen in der Spätheilphase haben kann, lässt sich im Rahmen der vorliegenden Dissertation nicht endgültig klären. Einen weiteren Ausblick bietet die zukünftige Kombination der, zumindest in dieser vorliegenden Studienarbeit, präferierten Beschichtungsmaterialien RGD-Peptide und Plasma. Es stellt sich nach Abschluss der vorliegenden Dissertation ferner die Frage, inwieweit sich erarbeitete Ergebnisse am Tiermodell Schaf grundsätzlich und uneingeschränkt auf die humanmedizinische Knochenarchitektur übertragen lassen. Abschließend kann festgestellt werden, dass keine der verwendeten Beschichtungen eine deutliche Überlegenheit zeigt. Sowohl nach biomechanischer als auch histologischer Auswertung ist die Oberflächengeometrie von Implantaten von außerordentlicher Bedeutung für eine möglichst optimale Osseointegration.

6. Zusammenfassung

Ziel der Studie war es, im Rahmen des aus EU-Mitteln geförderten Verbundprojektes „Direct to Bone“ Keramikimplantate aus dem in der Gelenkendoprothetik bewährten Grundmaterial Al_2O_3 - ZrO_2 die mit einer neuartigen Oberflächenstrukturierung versehen waren, zu prüfen.

Bei den Keramikprüfkörpern handelte es sich um zylindrische Delta-Keramik®-Implantate der Fa. CeramTec mit einem Durchmesser von 8 mm und einer Länge von 12 mm. Die Prüfkörper standen unstrukturiert und strukturiert zur Verfügung. Die Porengröße der porösen Oberfläche betrug 520–660 μm . Zusätzlich zur Strukturierung sollte die Bedeutung von drei bioaktiven Oberflächenbeschichtungen aus RGD-Peptiden, Hydroxylapatit und Plasma erörtert werden. Histologisch und softwaregestützt sollte, im Vergleich zwischen unstrukturierten, strukturierten und strukturierten beschichteten Implantaten evaluiert werden, ob und mit welchen Implantaten eine Beschleunigung der Osseointegration, ein größeres Ausmaß an Knochen und ein kompetenterer Knochen zu erzielen sind.

Als Tiermodell wurden 24 Schafe gewählt, die in zwei Überlebenszeitgruppen – eine 4- und eine 12-Wochen-Gruppe – eingeteilt wurden. Jeweils acht Implantate pro Tier wurden unter standardisierten Bedingungen randomisiert beidseits in die proximale Tibia und das distale Femur der Tiere eingebracht. Die tibialen Implantate wurden im Sinne der histologischen Aufarbeitung 3 mm unter das Kortikalisniveau versenkt und kamen somit gänzlich im Spongiosalager zu liegen. Final wurden 96 der insgesamt 192 Proben für einen biomechanischen Push-out Test verwendet, 96 tibiale Proben wurden der histomorphologischen und der softwaregestützten histomorphometrischen Auswertung zugeführt.

Die histologische Auswertung erfolgte nach den Parametern: Anzahl der Osteoblasten mit direktem Kontakt zur Implantat-Oberfläche, stabil-ossäre Trabekelzahl und Spongiosa, Vorkommen von ossären Nekrosen und Nachbildung der Implantatoberfläche. Innerhalb der 4-Wochen-Gruppe zeigte die strukturierte Probekörpergruppe das insgesamt optimalste Osseointegrationsergebnis, innerhalb der 12-Wochen-Gruppe konnte die Relevanz einer Oberflächenstruktur ebenfalls bestätigt werden. In der ersten und zweiten Heilungsphase bzw. für den Ablauf einer gestützten primären und sekundären Ossifikation kann eine Strukturierung herausragende Bedeutung gewinnen.

Im Rahmen der softwaregestützten Auswertung erfolgte eine Messung der Knochendichte (Bone) und des Knochen-Implantat-Kontaktes (BIC) im Sinne einer objektiven Ergänzung zur

histomorphometrischen Auswertung. Die Knochendichte-Messung der 4-Wochen-Gruppe ergab die höchsten, jedoch nicht signifikanten Ergebnisse für die Gruppe der strukturierten Probekörper mit einem Mittelwert von 43,66 % im Gegensatz zu den unstrukturierten mit 41,23 %, in der 12-Wochen-Gruppe konnten die RGD- bzw. Plasma-beschichteten Probekörper die höchsten Werte erreichen. Jedoch waren auch diese Unterschiede nicht signifikant. Die BIC-Messung der unstrukturierten Probekörper der 4-Wochen-Gruppe zeigte einen Mittelwert von 11,72 %, die strukturierten Probekörper erzielten einen Wert von 21,80 %. Die strukturierten beschichteten Probekörper erreichten 19,11 % im arithmetischen Mittel, die mit RGD-Peptiden beschichteten Probekörper 25,16 %. Sowohl die Mittelwerte der strukturierten Probekörper als auch der strukturierten und mit RGD-Peptiden beschichteten Probekörper zeigten im Vergleich zu den unstrukturierten Probekörpern eine deutliche Signifikanz. In der 12-Wochen-Gruppe erzielten die unstrukturierten Probekörper einen BIC mit einem Mittelwert von 35,35 % im Gegensatz zu den strukturierten Probekörpern mit 37,64 %. Die strukturierten, beschichteten Probekörper konnten mit 45,07 % bei den RGD-beschichteten und 42,52 % bei den mit Hydroxylapatit beschichteten Probekörpern die höchsten Werte erzielen, die aber nicht signifikant waren. Zusammenfassend zeigte sich zwischen der 4-Wochen-Gruppe und der 12-Wochen-Gruppe eine deutliche Signifikanz bei allen BIC-Werten.

In der vorliegenden histologischen Studie konnte gezeigt werden, dass die neuartige Verbundkeramik mit entsprechender Oberflächenstrukturierung – analog zu den biomechanischen Vorergebnissen – bereits nach vier Wochen ossär integriert wird und dass sich die Integration nach zwölf Wochen sogar verdoppelt hat. Somit konnte gezeigt werden, dass dieser neuartige monolithische Ansatz mit Hochleistungskeramikimplantaten im Großtiermodell die essenziellen Grundvoraussetzungen für einen zukünftigen klinischen Einsatz erfüllt.

7. Summary

The objective of the study was to investigate ceramic implants made of $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-ZrO}_2$ (a proven base material in joint arthroplasty) with a novel type of surface texturing within the EU-funded “Direct to Bone” German cooperative project. The ceramic test specimens were cylinder-shaped Delta-Keramik® implants manufactured by CeramTec measuring 8mm in diameter and 12mm in length. The specimens were available as untextured and textured versions. Pore size of the porous surface was 520–660 μm . In addition to investigating the impact of texturing, the study’s objectives also included assessing the implications of three bioactive surface coatings consisting of RGD peptides, hydroxylapatite and plasma. We conducted histological and software-based evaluations comparing untextured, textured, and textured coated implants to determine if, and with what type of implant, an acceleration of osseointegration, a larger extent of bone formation and greater bone stability could be achieved.

Twenty-four sheep were selected as an animal model and then divided into two survival time groups, one 4-week group and one 12-week group. Randomized and under standardized conditions, eight implants per animal were introduced into the animals’ left/right proximal tibia or distal femur. For the purpose of histological examination, the tibial implants were implanted 3mm beneath the compact bone layer and were thus fully resting in the spongy bone region. Ultimately, 96 out of 192 total samples were used for biomechanical push-out testing, while 96 tibial samples were subjected to histomorphological and software-based histomorphometric analyses.

The parameters employed for histological evaluation were: count of osteoblasts in direct contact with implant surface, count of stable osseous trabeculae in vital spongy bone, incidence of osseous necrosis and bone growth into implant surface. In the 4-week group, the best overall osseointegration result was observed in the textured specimens group, and the relevance of surface texturing could also be confirmed within the 12-week group. During the first or second recovery period, or in the progress of supported primary and secondary ossification, texturing may become a factor of paramount importance.

The software-based evaluation included the measurement of bone density (Bone) and bone-implant contact (BIC) as a means to objectively complement the histomorphometric analysis. Bone density measurements in the 4-week group showed the highest, yet not significantly different, results for the textured specimens group with a mean of 43.66 % as opposed to 41.23 %

for the untextured specimens. In the 12-week group the highest values were recorded for the RGD- and plasma-coated specimens, although again these deviations were not significant. BIC measurements of the untextured specimens in the 4-week group gave a mean of 11.72 % while the textured specimens achieved a value of 21.80%. The mean BIC for textured coated specimens was 19.11 % and 25.16 % for specimens with RGD peptide coating. The mean values of textured specimens and textured specimens with RGD peptide coating both exhibited significant differences when compared to the untextured specimens. In the 12-week group the untextured specimens had a mean BIC of 35.35 % versus 37.64 % for the textured specimens. The highest, though not significantly different values were seen in the textured coated specimens, with the RGD-coated and hydroxylapatite-coated specimens recording 45.07 % and 42.52 % respectively. In conclusion, we found variations of clear significance in all BIC values between the 4-week group and the 12-week group.

The presenting histological study demonstrated that the novel composite ceramics material with appropriate surface texturing—as had been concluded in preliminary biomechanical testing—shows osseointegration after four weeks already and that the extent of integration had even doubled after twelve weeks. We could thus establish that this novel monolithic approach using high-performance ceramic implants, as seen in the large animal model, meets the essential prerequisites to be considered for future clinical use.

8. Abkürzungsverzeichnis

aFGF	Acidic fibroblast growth factor
Al ₂ O ₃	Aluminiumoxid
AMC	Alumina Matrix Composite-Keramik (Verbundwerkstoff)
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BIC	Knochen-Implantat-Kontakt
BMP-2	Bone morphogenetic protein 2
BMP-4	Bone morphogenetic protein 4
Bone	Knochendichte
CrCoMo	Vitallium
Cr ₂ O ₃	Chromoxid
CVD	Chemical Vacuum Deposition
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
HP	Hydroxylapatit
IAD	Ion Assisted Deposition
IGF-I	Insulin-like growth factor 1
K2-Färbung	Modifizierte Giemsa-Grünwald-Färbung nach Kerschbaumer
MMA	Methylmethacrylat
MPa	Megapascal
PDGF	Platelet derived growth factor
PECVD	Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition
PMMA	Polymethylmethacrylat
PVD	Physical Vacuum Deposition
RGD-Peptide	Oligomere Peptide mit spezifischer Arginin-Glycin-Aspartat-Sequenz
ROB	Regierung von Oberbayern
ROI	Region of Interest
Rt	Rauigkeit
SD	Standardabweichung
TGF-β1	Transforming growth factor β1

TiAl ₁₅ Fe _{2,5}	Titanium-Aluminum-Eisen
TiAl ₆ Nb ₇	Titanium-Aluminium-Niob
TiAl ₆ V ₄	Titanium-Aluminium-Vanadium
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Y-TZP	Yttrium-stabilisiertes Zirkonoxid
ZPF	Zentrum für Präklinische Forschung
ZrO ₂	Zirkonoxid

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung von Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten (Welsch 2009).

Abbildung 2: Knochenzellen in der frühen Phase der direkten Knochenbildung (Welsch 2009).

Abbildung 3: Osteoklasten an der Oberfläche eines Knochenbälkchens (Welsch 2009).

Abbildung 4: Desmale Ossifikation (Welsch 2009).

Abbildung 5: Chondrale Ossifikation (Welsch 2009).

Abbildung 6: Strukturierter Prüfkörper (Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 7: Unstrukturierter Prüfkörper (Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 8: Ovis aries, Schafe der Rasse Merino (<http://www.deutsche-schafzucht.de>)

Abbildung 9: Skizze Operationsmodell (Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 10: Situs Kniegelenk des Schafes: lateraler Aspekt mit markierten Implantationsorten; rechte Bildseite: Tibia (Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 11: Situs Kniegelenk des Schafes: medialer Aspekt mit markierten Implantationsorten; rechte Bildseite: Tibia (Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 12: Situs Kniegelenk des Schafes: Einbringen des Implantats mittels K-Drahtführhilfe (Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 13: Dokumentation der Implantat-Positionierung im Röntgenbild (Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 14: Sagittaler μ -CT-Schnitt durch ein strukturiertes Keramikimplantat zwölf Wochen nach Implantation (Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 15a: Übersicht über ein koronares Dünnschliffpräparat eines keramischen Probekörpers mit strukturierter Oberfläche und zusätzlicher Plasmabeschichtung nach vier Wochen (Kerschbaumer, Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 15b: Vergrößerung der proximalen Knochen-Implantat-Kontaktzone aus Abb. 15a (Kerschbaumer, Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 15c: Vergrößerung der distalen Knochen-Implantat-Kontaktzone aus Abb. 15a (Kerschbaumer, Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 16a: Übersicht über ein koronares Dünnschliffpräparat eines keramischen Probekörpers mit strukturierter Oberfläche und zusätzlicher Hydroxylapatit-Beschichtung nach vier Wochen (Kerschbaumer, Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 16b: Vergrößerung der proximalen Knochen-Implantat-Kontaktzone aus Abb. 16a (Kerschbaumer, Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 16c: Vergrößerung der distalen Knochen-Implantat-Kontaktzone aus Abb. 16a (Kerschbaumer, Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 17a: Präparat 8-8, Bildbearbeitung Schritt 1 mit Ausschnitt (Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 17b: Präparat 8-8, Bildbearbeitung Schritt 2 mit Ausschnitt (Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 17c: Präparat 8-8, Bildbearbeitung Schritt 3 und 4 mit Ausschnitt (Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 17d: Präparat 8-8, Bildbearbeitung Schritt 5 mit Ausschnitt (Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 18: Histomorphologisch auszählbare vitale Osteoblasten im Bereich des direkten Knochen-Implantat-Übergangs (Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 19: Exemplarischer Präparatausschnitt: dicht angeordneter stabil-ossärer Trabekel in direktem Kontakt mit der Implantatoberfläche (Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 20: Exemplarischer Präparatausschnitt: Nekrosezone (Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 21: Exemplarischer Präparatausschnitt. Nachbildung der Implantatoberfläche (Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 22: Ergebnisse der Push-out-Tests der 4- und 12-Wochen-Gruppe (Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 23: Drei Osteoblasten berühren die Implantatoberfläche, Bild 738 (Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 24: Sechs Osteoblasten mit Implantatoberflächenkontakt und eine Vielzahl von ossären Trabekeln, Bild 652 (Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 25: Gelungene ossäre Nachbildung des Interface durch eine Vielzahl von Trabekeln, Bild 769 (Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 26: Partielle ossäre Nekrosezone an der marginalen Knochen-Implantat-Grenze, Bild 697 (Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 27: Kleine und große stabil-ossäre Trabekel mit direktem Interface-Kontakt, Bild 636 (Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 28: Deutliche ossär-verdichtete Nachbildung der Knochen-Implantat-Grenze, Bild 534 (Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 29: Besonders gleichmäßige Nachbildung der Implantatoberfläche in die Marginalzone hinein, Bild 506 (Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 30: 16 dicht ausgebildete ossäre Trabekel stellen einen stabilen Kontakt zum Interface her, Bild 532 (Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 31: 18 ossäre Trabekel berühren hier die Implantatoberfläche mit engstem Kontakt, Bild 468 (Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 32: fünf vitale Osteoblasten haben direkten Kontakt zur Implantatoberfläche und sind umgeben von einer Vielzahl ossärer Trabekel, Bild 496 (Bild im Rahmen des Projekts „Direct To Bone“).

Abbildung 33: Box-Plot des Ergebnisses der Knochendichte-Messung in der ROI der Implantat-Peripherie der unstrukturierten Probekörper.

Abbildung 34: Box-Plot des Ergebnisses der Knochendichte-Messung in der ROI der Implantat-Peripherie der strukturierten Probekörper.

Abbildung 35: Box-Plot des Ergebnisses der Knochendichte-Messung in der ROI der Implantat-Peripherie der Probekörper mit Struktur und RGD-Peptid-Beschichtung.

Abbildung 36: Box-Plot des Ergebnisses der Knochendichte-Messung in der ROI der Implantat-Peripherie der Probekörper mit Struktur und HA-Beschichtung.

Abbildung 37: Box-Plot des Ergebnisses der Knochendichte-Messung in der ROI der Implantat-Peripherie der Probekörper mit Struktur und Plasmabeschichtung.

Abbildung 38: Box-Plot des Ergebnisses der Knochendichte-Messung in der ROI der Implantat-Peripherie aller Probekörper der 4-Wochen-Gruppe im Vergleich.

Abbildung 39: Box-Plot des Ergebnisses der Knochendichte-Messung in der ROI der Implantat-Peripherie aller Probekörper der 12-Wochen-Gruppe im Vergleich.

Abbildung 40: Box-Plot des Ergebnisses des Knochen-Implantat-Kontakts der unstrukturierten Probekörper.

Abbildung 41: Box-Plot des Ergebnisses des Knochen-Implantat-Kontakts der strukturierten Probekörper.

Abbildung 42: Box-Plot des Ergebnisses des Knochen-Implantat-Kontakts der Probekörper mit Struktur und RGD-Peptid-Beschichtung.

Abbildung 43: Box-Plot des Ergebnisses des Knochen-Implantat-Kontakts der Probekörper mit Struktur und HA-Beschichtung.

Abbildung 44: Box-Plot des Ergebnisses des Knochen-Implantat-Kontakts der Probekörper mit Struktur und Plasmabeschichtung.

Abbildung 45: Box-Plot der Ergebnisse des Knochen-Implantat-Kontakts aller Probekörper der 4-Wochen-Gruppe im Vergleich.

Abbildung 46: Box-Plot der Ergebnisse des Knochen-Implantat-Kontakts aller Probekörper der 12-Wochen-Gruppe im Vergleich.

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reaktion des Knochenlagers auf Porosität und Porengröße von Implantat-Oberflächen (modifiziert nach Gradinger und Gollwitzer, 2006).

Tabelle 2: Wachstumsfaktoren im zeitlichen Verlauf der Knochenheilung (Gradinger und Gollwitzer, modifiziert nach Solheim).

Tabelle 3: Färbung K2; Farbliche Zuordnung der K2-Färbung zu den verschiedenen Zellstrukturen (Kerschbaumer 2008, Projektbezogener Endbericht, Persönliche Mitteilungen).

Tabelle 4: Ergebnisse der Push-out-Tests der 4-Wochen-Gruppe.

Tabelle 5: Ergebnisse der Push-out-Tests der 12-Wochen-Gruppe.

Tabelle 6: Ergebnisse der histologischen Auswertung der 4-Wochen-Gruppe.

Tabelle 7: Ergebnisse der histologischen Auswertung der 12-Wochen-Gruppe.

Tabelle 8: Übersicht über den Einsatz von verschiedenen Werkstoffen und Oberflächen in der Literatur, modifiziert nach Schreiner et al. (2009).

11. Literaturverzeichnis

Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J.

Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone anchorage in man.

Acta Orthop Scand 1981; 52: 155–170

Albrektsson T, Johansson C.

Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration.

Eur Spine J 2001; 10: 96–101

Bieniek J, Swiecki Z.

Porous and porous-compact ceramics in orthopedics.

Clin Orthop Relat Res 1991; 272, 88–94

Bobyn JD, Pillar RM, Cameron HU, Weatherly GC, Kent GM.

The effect of porous surface configuration on the tensile strength of fixation of implants by bone ingrowth.

Clin Orthop 1980; 149: 291–298

Böstman O, Hirvensalo E, Mäkinen J, Rokkanen P.

Foreign-body reactions to fracture fixation implants of biodegradable synthetic polymers.

J Bone Joint Surg Br 1990; 72-B: 592–596

Boxleitner J, Tübel J, Obst T, Gradinger R, Grässel M, Burgkart R.

Testing potentially cytotoxic effects of a new, porous surface of an aluminium-oxide ceramic combination for bone replacement.

BIOMaterialien 2008a; 9: 30

Boxleitner J, Tübel J, Obst T, Gradinger R, Grässel M, Burgkart R.

Effect of different pore sizes at a new, porous surface of an aluminium-oxide-zirconium-oxide

ceramic combination on proliferation of primary human osteoblasts.

BIOMaterialien 2008b; 9: 31

Boxleitner J, Tübel J, Obst T, Gradinger R, Grässel M, Burgkart R.

Einfluss der Porengröße auf einer neuen, porösen Oberfläche aus Aluminiumoxid-Matrix-Verbundkeramik (BIOLOX®delta) auf die Proliferation von primären humanen Osteoblasten. Abstraktband Dt. Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2008c; Berlin.

<http://www.egms.de/static/de/meetings/dkou2008/08dkou092.shtml>

Boxleitner J, Tübel J, Obst T, Gradinger R, Grässel M, Burgkart R.

Proliferation of primary human osteoblasts at a new aluminium-oxide-zirconium-oxide ceramic combination compared to proliferation at a default aluminium-oxide ceramic and at a titan alloy (Ti6Al4V).

BIOMaterialien 2009a; 10: 38

Boxleitner J, Tübel J, Obst T, Gradinger R, Grässel M, Burgkart R.

Effect of a H₂O-Plasma-Surface-Treatment of an aluminium-oxide-zirconium-oxide ceramic combination on proliferation of primary human osteoblasts.

BIOMaterialien 2009b; 10: 37

Boxleitner J, Tübel J, Obst T, Gradinger R, Grässel M, Burgkart R.

Einfluss einer H₂O-Plasmaoberflächenbehandlung einer Aluminiumoxid-Zirkoniumoxid-Verbundkeramik (BIOLOXdelta) auf die Proliferation von primären humanen Osteoblasten. Abstraktband Dt. Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2009c; Berlin.

<http://www.egms.de/static/en/meetings/dkou2009/09dkou003.shtml>

Boxleitner J, Tübel J, Obst T, Gradinger R, Grässel M, Burgkart R.

Vergleich der Proliferation von primären humanen Osteoblasten auf einer neuartigen Aluminiumoxid-Zirkoniumoxid-Verbundkeramik (BIOLOXdelta) vs. einer „Standard“-Aluminiumoxid-Keramik (BIOLOXforte) und einer Titanlegierung (Ti6Al4V). Abstraktband Dt. Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2009d; Berlin.

<http://www.egms.de/static/en/meetings/dkou2009/09dkou007.shtml>

Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, Ohman A.
Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period.

Scand J Plast Reconstr Surg 11 1977; Suppl 16: 1–132

Burgkart R, Eichhorn S, Elias Z, Theelke B, Pandorf T, Obst T.

Influence of a new surface structure of monolithical ceramic implants in respect to bone ingrowth in vivo.

BIOmaterialien 2009a; 10: 40

Burgkart R, Eichhorn S, Elias Z, Theelke B, Pandorf T, Obst T.

Tierexperimentelle Untersuchung zum Einfluss einer neuartigen Oberflächenstrukturierung von monolithischen Keramikimplantaten auf das Knocheneinwachsverhalten in vivo.

Abstraktband Dt. Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2009b.

<http://www.emgs.de/static/en/meetings/dkou2009/09dkou037.shtml>

Burgkart R, Eichhorn S, Kerschbaumer S, Theelke B, Pandorf T, Boxleitner J, Obst T, Gradinger R.

Mechanical and histological results of a porous ceramics coating based on an alumina composite.

14th BIOLOX Symposium Proceedings 2009c; 261–266

Chapekar MS.

Tissue engineering: challenges and opportunities.

J Biomed Mater Res 2000; 53 (6): 617–620

Cornell NC, Lane, JM.

Current understanding of osteoconduction in bone regeneration.

Clin Orthop Relat Res 1998; 355, S. 267–273

Cvikl B, Turhani D, Kapral D, Weißenböck M, Thumher D, Itern C, Raabe M, Lauer G, Ewers R.

In-vitro-Untersuchungen an osteoblastären Zellen kultiviert auf phykogener Hydroxylapatitkeramik.

Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift 2004; 59: 567–571

Davies JE.

Understanding Peri-Implant Endosseous Healing

J Dent Educ 2003; 67 (8): 932–949

Diehl P, Haenle M, Bergschmidt P, Gollwitzer H, Schauwecker J, Bader R, Mittelmeier W.

Cementless total hip arthroplasty: a review.

Biomed Tech 2010; 55: 251–264

Ducheyne P, Hench LL, Kagan A 2nd, Martens M, Bursens A, Mulier JC.

Effect of hydroxyapatite impregnation on skeletal bonding of porous coated implants.

J Biomed Mater Res 1980; 14 (3): 225–237

Effenberger H.

Schraubenpfannen. State of the Art.

Grieskirchen: MCU; 2004

Effenberger H, Imhof M, Richelt J, Rehart S.

Cement-free hip cups. Current status.

Orthopäde 2004; 33: 733–750

Effenberger H, Zichner L, Richolt J.

Pressfitpfannen. Grundlagen, Konzepte, Ergebnisse, Qualitätssicherung.

Grieskirchen: MCU; 2004

Einhorn T.

Mechanisms of fracture healing

Hosp Pract Off Ed 1991; 26 (1): 41–45

Elmengaard B, Berchtold JE, Soballe K.

In vivo study of the effect of RGD treatment on bone ongrowth on press-fit titanium alloy implants.

Biomaterials 2005; 26/17: 3521–3526

Engh CA, Gloss FE, Bobyn JD.

Biologic fixation arthroplasty in the treatment of osteonecrosis.

Orthop Clin North Am 1985; 16(4): 771–787

Eppley BL et al.

Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing.

Plast Reconstr Surg 2004; 114 (6): 1502–1508

Ferris MD, Moodie GD, Diamond PM, Gioranni CWD, Ehrlich MG, Valentini GF.

RGD-coated titanium implants stimulate increased bone formation in vivo.

Biomaterials 1999; 20: 2323–2331

Gahlert M, Röhling S, Wieland M, Sprecher CM, Kniha H, Milz S.

Osseointegration of zirconia and titanium dental implants: a histological and histomorphometrical study in the maxilla of pigs.

Clin Oral Implants Res 2009; 20: 1247–1253

Galante J, Rostoker W, Lueck R, Ray RD.

Sintered fiber metal composites as a basis for attachment of implants to bone.

J Bone Joint Surg 1971; 53: 101–114

Geipel U, Herrmann M.

The infected implant. Part 1: bacteriology.

Orthopäde 2004; 33 (12): 1411–1427

Gottlander M, Albrektsson T.

Histomorphometric studies of hydroxylapatite-coated and uncoated CP titanium threaded implants in bone.

Int J Oral Maxillofac Implants 1991; 6: 399–404

Grading R, Gollwitzer H.

Ossäre Integration.

Berlin: Springer; 2006

Hardouin P, Anselme K, Flautre B, Bianchi F, Bascouleguet G, Bouxin B.

Tissue engineering and skeletal diseases.

Joint Bone Spine 2000; 67 (5): 419–424

Harris W, Jasty M.

Bone ingrowth into porous coated canine acetabular replacements: the effect of pore size, apposition and dislocation.

Hip 1985; 214–234

Hees H, Sinowatz, F.

Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie.

Köln: Deutscher Ärzte-Verlag; 2000

Heimke G, Griss P.

Ceramic implant materials.

Med & Biol Eng & Comput 1980; 18: 503–510

Henßge EJ, Grundei H, Etspüler R, Koelier W, Fink R.

Die anatomisch angepasste Endoprothese des proximalen Femurendes.

Z Orthop 1985; 123: 821–828

Henßge EJ.

Gegossene spongiös-metallische Implantate.

Focus MHL 1985; 4: 1–8

Hipp EG, Plötz W, Thiemel G.

Orthopädie und Traumatologie.

Stuttgart, New York: Thieme Verlag; 2003

Judet R.

Total-Hüftendoprothesen aus Porometall ohne Zementverankerung.

Z Orthop Ihre Grenzgeb 1975; 113: 828–829

Kaddick C, Pfaff H-G.

Wear study in the Alumina-Zirconia-System. In: Willmann G, Zweymüller K. Bioceramics in Hip Joint Replacement: Proceedings 5th International CeramTec Symposium. Stuttgart, New York: Thieme Verlag; 2000

Kaddick C., Pfaff H-G.

Results of hip simulator testing with various wear couples. In: Willmann G, Garino JP. Bioceramics in Joint Arthroplasty. Proceedings 7th BIOLOX Symposium. Stuttgart, New York: Thieme Verlag; 2002

Kakutani Y, Yamamuro T, Nakamura T, Kotoura Y.

Strengthening of bone-implant interface by the use of granule coatings on alumina ceramics.

J Biomed Mater Res 1989; 23: 781–808

Kantlehner M, Schaffner P, Finsinger D, Meyer J, Jonczyk A, Diefenbach B, Nies B, Hölzemann G, Godmann SL, Kessler H.

Surface Coating with Cyclic RGD Peptides Stimulates Osteoblast Adhesion and Proliferation as well as Bone Formation.

Chembiochem 2000; 1: 107–114

Kellgren JH, Lawrence JS.

Radiological assessment of osteoarthritis.

Ann Rheum Dis 1957; 16 (4): 494–502

Kerschbaumer S.

Projektbezogener Endbericht „Direct to Bone“, Persönliche Mitteilungen, 2008.

König HE, Liebich H-G.

Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis.
Stuttgart, New York: Schattauer; 2011

Kuzyk PRT, Schemitsch EH.

The basic science of peri-implant bone healing.

Indian J Orthop 2001; 45 (2): 108–115

Lichtinger TK, Schürmann N, Müller RT.

Early loosening of a cemented hip endoprosthesis stem of titanium.

Unfallchirurg 2000; 103 (11): 956–960

Linß W, Fanghänel J.

Histologie, Zytologie, Allgemeine Histologie, Mikroskopische Anatomie.

Berlin, New York: de Gruyter; 1998

Lippuner K, Vogel R, Tepic S, Rahn BA, Cordey J, Perren SM.

Effect of animal species and age on plate-induced vascular damage in cortical bone.

Arch Orthop Trauma Surg 111 (2) 1992: 78–84.

Lord G, Marotte JH, Blanchard JP, Guillaumon JL, Gory M.

Étude expérimentale de l'ancrage des arthroplasties totales madrèporiques de hanche.

Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot 1978; 64 (6): 459–470

Masuda T, Yliheikkilä PK, Felton DA, Cooper LF.

Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part I. In vivo studies.

Int J Oral Maxillofac Implants 1998; 13 (1): 17–29

McGavin MD, Zachary JF.

Pathologie der Haustiere.

München: Elsevier; 2009

McKee GK, Watson-Farrar J.

Replacement of arthritic hips by the McKee-Farrar prosthesis.

J Bone Joint Surg Br 1966; 48-B: 245–259

Osborn JF, Newesley H.

Dynamic aspects of the implant-bone interface. In: Heimke G. Dental implants: materials and systems.

München: Carl Hanser Verlag; 1980

Osborn JF.

Biological behavior of the hydroxyapatite ceramic coating on the femur shaft of a titanium endoprosthesis – initial histologic evaluation of a human explant.

Biomed Tech (Berl) 1987; 32 (7-8): 177–183

Pfaff H-G, Rack R. A new ceramic material in orthopedics. In: Zweymüller K, Willmann G. Bioceramics in Hip Joint Replacement. Proceedings 5th International CeramTec Symposium. Stuttgart, New York: Thieme Verlag; 2000

Pilliar RM, Lee JM, Maniopoulos C.

Observations on the effect of movement on bone ingrowth into porous-surfaced implants.

Clin Orthop Relat Res 1986; 208: 108–113

Rammelt S, Schulze E, Bernhardt R, Hanisch U, Scharnweber D, Worch H, Zwipp H, Biewener A.

Coating of titanium implants with type-I collagen.

J Orthop Res 2004; 22 (5): 1025–1034

Raschke M, Wildemann B, Inden P, Bail H, Flyvbjerg A, Hoffmann J, Haas NP, Schmidmaier G. Insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 accelerates osteotomy healing using polylactide-coated implants as a delivery system: a biomechanical and histological study in minipigs.

Bone 2002; 30 (1): 144–151

Roach P, Eglin D, Rohde K, Perry CC.

Modern biomaterials: a review – bulk properties and implications of surface modifications.
J Mater Sci Mater Med 2007; 18 (7): 1263–1277

Santos FP, Campos E, Costa M, Melo FCM, Honda RY, Mota RP.

Superficial modifications in TiO₂ and Al₂O₃ Ceramics.
Material Research 2003; 6 (3): 353–367

Schliephake H, Scharnweber D, Dard M, Rössler S, Sewing A, Meyer J, Hoogestraat D.

Effect of RGD peptide coating of titanium implants on periimplant bone formation in the alveolar crest. An experimental pilot study in dogs.
Clin Oral Implants Res 2002; 13 (3): 312–319

Schliephake H, Scharnweber D, Dard M, Sewing A, Aref A, Roessler S.

Functionalization of dental implant surfaces using adhesion molecules.
J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2005; 73 (1): 88–96

Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H, Lucke M, Fuchs T, Stemberger A, Flyvbjerg A, Haas NP, Raschke M.

Local application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor- β 1) from a biodegradable poly (D, L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats.
Bone 2001; 28 (4): 341–350

Schmidmaier G, Wildemann B, Cromme F, Kandziora F, Haas NP, Raschke M.

Bone morphogenetic protein-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodelling in fracture treatment: a biochemical and histological study in rats.
Bone 2002a; 30 (6): 816–822

Schmidmaier G, Wildemann B, Schwabe B, Stange R, Hoffmann J, Südkamp NP, Haas NP, Raschke M.

A new electrochemically graded hydroxylapatite coating for osteosynthetic implants promotes

implant osteointegration in a rat model.

J Biomed Mater Res 2002b; 63 (2): 168–172

Schmidmaier G, Wildemann B, Gäbelein T, Heeger J, Kandziora F, Haas NP, Raschke M.

Synergistic effect of IGF-I and TGF- β 1 on fracture healing in rats: single versus combined application of IGF-I und TGF- β 1.

Acta Orthop Scand 2003; 74: 604–610

Schreiner U, Schroeder-Boersch H, Schwarz M, Scheller G.

Verbesserung der knöchernen Integration bioinertter Keramiken durch Modifikation der Oberfläche – Ergebnisse eines Tierversuchs.

Biomedizinische Technik 2002; Band 47, Heft 6/202, 164–168

Schreiner U, Koester H, Pott P, Scheller G, Schwarz M.

Osteointegration einer Alumina-Matrix-Composite-Keramik mit poröser Oberfläche: Eine mechanische und histologische Untersuchung im Tierversuch.

Z Orthop Unfall 2009; 147 (5): 603–609

Schwarz M, Kowarsch M, Rose S, Becker K, Lenz T, Lutz J.

Effect of surface roughness, porosity, and a resorbable calcium phosphate coating on osseointegration of titanium in a minipig model.

J Biomed Mater Res A 2005 und 2008; 89 (3): 667–678

Shin H, Jo S, Mikos AG.

Biomimetic materials for tissue engineering.

Biomaterials 2003; 24 (24): 4353–4364

Sivash KM.

The development of total metal prosthesis for the hip joint from a partial joint replacement.

Reconstr Surg Traumatol 1969; 11: 53–62

Soballe K, Hansen ES, Brockstedt-Rasmussen H, Bünger C.

Hydroxyapatite coating converts fibrous tissue to bone around loaded implants.

J Bone Joint Surg Br 1993; 75 (2): 270–278

Solheim, E.

Growth factors in bone.

Int Orthop 1998; 22 (6): 410–416

Steinhauser E, Liebendörfer A, Enderle A, Bader R, Kerschbaumer S, Brill T, Busch R, Gradinger R.

In vivo-Studie zur knöchernen Integration von RGD-Peptid-beschichteten und unbeschichteten metallischen Implantaten.

Materialprüfung 2005; 47 (4): 197–202

Stürmer KM, Schuchardt W.

New aspects of closed intramedullary nailing and marrow cavity reaming in animal experiments.

I. The tibia of the sheep, as a model for intramedullar nailing (author's transl.).

Unfallheilkunde 1980; 83 (7): 341–345

Weinstein AM, Klawitter JJ, Cleveland TW.

Electrical stimulation of bone growth into porous Al₂O₃.

J Biomed Mater Res 1976; 10, 231–247

Welsch U.

Sobotta. Lehrbuch Histologie.

München: Urban & Fischer; 2009

Wetzel R.

Verankerungsprinzipien in der Hüftendoprothetik.

Darmstadt: Steinkopf; 2001

Willmann G, v Chamier W, Pfaff HG, Rack R.

Biocompatibility of a new alumina matrix biocomposite AMC.

Bioceramics 2000; 13: 569–572

Wilson-Hench J.

Osteoinduction. In: Williams DF, Ed. Progress in Biomedical Engineering. Definitions in biomaterials, Vol. 4.

Amsterdam: Elsevier; 1987

Wintermantel E, Ha S-W.

Medizintechnik – Life Science Engineering.

Berlin: Springer; 2008

Wissing H, Stürmer KM.

Untersuchungen zur Knochenregeneration nach Unterbrechung der medullären oder periostalen Strombahn bei verschiedenen Versuchstier-Species.

Unfallheilkunde 1986; 181: 225–228

Wissing H, Stürmer KM, Breidenstein G.

Wertigkeit verschiedener Versuchstierspezies für experimentelle Untersuchungen am Knochen.

Unfallheilkunde 1990; 479–488

Yamagiwa H, Endo N.

Bone fracture and the healing mechanisms. Histological aspect of fracture healing. Primary and secondary healing.

Clin Calcium 2009; 19 (5): 627–633

Zarb G, Albrektsson T.

Osseointegration – a requiem for the periodontal ligament? – An editorial.

Int J Periodont Rest Dentistry 1991; 11: 88–91

12. Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. habil. Reiner Gradinger und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. habil. Rüdiger von Eisenhart-Rothe danke ich für die Möglichkeit der Promotion an der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie, Klinikum rechts der Isar, Fakultät für Medizin der Technischen Universität München.

Frau Prof. Dr. med. vet. Dr. med. vet. habil. Ulrike Matis gilt mein ganz besonders herzlicher Dank für die Übernahme meiner Dissertation an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

Meinem Betreuer Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. habil. Rainer Burgkart danke ich außerordentlich für die Überlassung des Themas, die wiederholte Begutachtung meiner Arbeit und die stets hervorragende Betreuung und Unterstützung.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. habil. Stefan Milz, Lehrstuhl Anatomie II, Ludwig-Maximilians-Universität München, und Herrn Christoph Sprecher, AO Foundation, Davos, gilt mein ganz besonderer Dank für die außerordentliche Unterstützung und Hilfe bei der Durchführung der Vorarbeiten zur histomorphologischen Auswertung und bei der Realisierung der softwaregestützten Auswertung.

Frau Dr. med. vet. Susanne Kerschbaumer danke ich für die Erstellung der histologischen Schnitte.

Beim gesamten "Direct to Bone"-Team möchte ich mich ganz herzlich für die fruchtbare Kooperation bedanken.

Für das Lektorat dieser Dissertation danke ich Frau Dr. med. vet. Jennifer Nehls und Antje Schütze.

Meinem Lehrer Christoph danke ich für all die Unterstützung und Hilfe, die er mir seit Jahren zuteil werden lässt und für sein stets positives "Alles wird gut".

Meinem Vater Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. habil. Erwin G. Hipp danke ich für die außerordentlich wohlwollende Unterstützung zeit meines Lebens, seine stets gut gemeinten Ratschläge und das große Interesse und die Freude an meinem Studium und der Dissertation.

Zum Abschluss geht ohne viele Worte mein innigster Dank an meinen Gefährten Christian und alle Mitglieder meiner zwei-, drei- und vierbeinigen Familie.