

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand:
Prof. Dr. H.-J. Gabius

Angefertigt unter der Leitung von
Priv.-Doz. Dr. Dr. R. G. Erben

**In-vivo-Analyse der knöchernen Integration
laserstrukturierter Titan-Implantate**

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

Von
Heike Götz
aus Nürnberg

München 2004

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
1. Referent:	Priv.-Doz. Dr. Dr. R. G. Erben
2. Referentin:	Univ.-Prof. Dr. U. Matis
1. Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. W. Hermanns
2. Korreferentin:	Priv.-Doz. Dr. B. Wollanke
3. Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. J. Meyer

Tag der Promotion: 13. Februar 2004

Meinem Vater

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 LITERATURÜBERSICHT	1
1.1 Ablauf der Implantateinheilung	1
1.1.1 Osteoinduktion	1
1.1.2 Osteokonduktion	2
1.1.3 Osseointegration	3
1.2 Implantate	4
1.2.1 Materialzusammensetzung	4
1.2.2 Oberflächenrauigkeit	6
1.2.3 Topographie	6
1.3 Tiermodell	8
1.4 Implantationsmodell	9
2 PUBLIKATION „Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants“	11
3 DISKUSSION	27
3.1 Tiermodell	27
3.2 Osseointegration	28
3.3 Möglichkeiten für zukünftige Implantatoberflächen	31
4 ZUSAMMENFASSUNG	32
5 SUMMARY	33
6 LITERATURVERZEICHNIS	34
7 DANKSAGUNG	44
8 LEBENSLAUF	45

1 LITERATURÜBERSICHT

1.1 Ablauf der Implantateinheilung

Verschiedene Definitionen wurden aus den verschiedenen Betrachtungswinkeln für die Osseointegration von Implantaten im Knochen entwickelt.

Klinisch wird Osseointegration als „klinisch asymptotische und starke Fixation, die während funktioneller Belastung erreicht und aufrechterhalten wird“ bezeichnet. Aus *biomechanischer* Sicht bedeutet Osseointegration der effiziente Widerstand gegenüber Scher- und Zugkräften. *Morphologisch* wird erst dann von Osseointegration gesprochen, wenn ein direkter Kontakt von lebensfähigem Knochen mit der Implantatoberfläche ohne eine Zwischenschicht aus Bindegewebe im Lichtmikroskop erkennbar ist (BOSS, 1999). Eine langjährige Erfolgsrate wird bei all diesen Definitionen stillschweigend vorausgesetzt.

Die Integration von implantiertem Material führt zu einer ähnlichen Reaktion wie bei einer Frakturheilung und hat einen Umbau des Knochens, der Remodeling genannt wird, zur Folge.

Die gesamte Integration eines Implantates kann in drei Phasen unterteilt werden (ALBREKTSSON und JOHANSSON, 2001):

- Osteoinduktion
- Osteokonduktion
- Osseointegration

Diese drei Vorgänge sind miteinander verbunden, aber nicht identisch. Osteoinduktion ist Teil der physiologischen Knochenheilung und verantwortlich für den größten Teil an neu gebildetem Knochen bei einer Fraktur oder an einem Implantat. Osteokonduktion umfasst eine kurzwirkende Gewebsantwort auf ein Implantat, Osseointegration hingegen muss, um als erfolgreich bezeichnet werden zu können, einen langen Halt des Implantates bewirken (ALBREKTSSON und JOHANSSON, 2001).

1.1.1 Osteoinduktion

Eine gängige Definition für Osteoinduktion beschreibt diese als „einen Prozess, bei dem die Osteogenese induziert wird“ (ALBREKTSSON und JOHANSSON, 2001). Dies beinhaltet einen Vorgang, bei dem die Mitogenese von undifferenzierten mesenchymalen Zellen unterstützt wird und der zu der Formation von Osteoprogenitorzellen führt. Anschließend kann neuer Knochen gebildet werden (MASUDA et al., 1998). Es handelt sich hierbei um die auch osteophyllisch genannte Phase der Migration und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen, welche durch osteoinduzierende Faktoren dazu angeregt werden (MARX und GARG, 1998). Blut ist, durch den operativen Eingriff, der erste Stoff, mit dem die Implantatoberfläche in Kontakt kommt (DAVIES, 1996). Das darin enthaltene

Fibrinogen wird durch die Wirkung von Thrombin zu Fibrin, welches sich an die Implantatoberfläche anlagert und die Zellwanderung zum Implantat hin ermöglicht (DAVIES, 1998).

Hierbei und auch aus dem verletzten Knochen werden extrazelluläre Flüssigkeit, nichtkollagene Proteine und Wachstumsfaktoren freigesetzt, die die Reparatur des Knochens aktivieren (SCHENK und BUSER, 1998). Über Chemotaxis werden Osteoprogenitorzellen aus dem Knochenmark und von Periost und Endost angelockt, welche proliferieren und sich zu Osteoblastenvorläuferzellen und Osteoblasten differenzieren. Wichtig in diesem Zusammenhang ist, dass Zellen, sobald sie ausdifferenziert sind, die Migration einstellen (DAVIES, 1998).

Eine bedeutsame Rolle spielen bei der Osteoinduktion wahrscheinlich auch die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). Sie gehören zu der Transforming Growth Factor (TGF)- β -Familie und sind lösliche Glykoproteine. Sie werden natürlicherweise als Antwort auf ein Trauma oder beim Remodeling freigesetzt und besitzen induzierende Eigenschaften (ALBREKTSSON und JOHANSSON, 2001).

1.1.2 Osteokonduktion

Osteokonduktion beschreibt die Zellverteilung und das Knochenwachstum auf der Implantatoberfläche (ALBREKTSSON und JOHANSSON, 2001; MARX und GARG, 1998). Hierbei erfolgt das Einwachsen von sprossenden Kapillaren, umliegendem Gewebe und Osteoprogenitorzellen in das und auf dem Implantat (MASUDA et al., 1998). Die Osteokonduktion kann nur nach erfolgreicher Osteoinduktion stattfinden und benötigt eine ausreichende Blutzufuhr. Hierbei helfen wiederum Wachstumsfaktoren (IGF-I und -II, FGF, TGF- β und PDGF), welche die Blutgefäßbildung unterstützen (ALBREKTSSON und JOHANSSON, 2001).

Die Migration der Zellen bewirkt eine Kontraktion des vorher gebildeten Fibringerinnsels und je nach Implantatoberfläche (siehe unten) kann das Gerinnsel haften bleiben (bei rauen Oberflächen) oder aber es löst sich aufgrund dieser Kontraktion vom Implantat ab (DAVIES, 1998).

Weiterhin sind je nach Ort der Ausdifferenzierung der Zellen verschiedene Phänomene zu beobachten. Bei Differenzierung VOR Erreichen des Implantates steht das anschließend produzierte Osteoid nicht im direkten Kontakt mit dem Implantat. Wird das Implantat vor der Ausdifferenzierung erreicht, wird direkt an der Oberfläche Knochen gebildet (siehe unten), und wenn die Zellen bei Erreichen der Implantatoberfläche noch im Wanderstadium sind, werden weitere Gebiete des Implantates mit Knochen umschlossen (DAVIES, 1998). Sobald die Zellen ausdifferenziert sind, beginnen sie, Osteoid zu produzieren. Die Knochenbildung geht dann folgendermaßen vonstatten (DAVIES, 1998):

Zuerst werden die beiden nichtkollagenen Proteine, Osteopontin und Sialoprotein, sezerniert. Kalziumphosphat heftet sich an die Bindungsstellen dieser Proteine an und bildet fächerförmige Kristalle. Anschließend werden Kollagenfasern sezerniert, die an dieser Oberfläche binden, kalzifizieren und den initial produzierten Geflechtknochen bilden. Diese Fasern sind folglich durch die erste kalzifizierte Schicht, welche kollagenfrei, reich an Kalzium, Phosphor, Osteopontin und Sialoprotein des Knochens ist, vom Implantat getrennt. Diese Kittlinien-ähnliche schmale Schicht aus amorphem Gewebe

mit einer Dicke von, abhängig vom Implantatmaterial, 20 bis 5000 nm (ALBREKTSSON und JOHANSSON, 2001; BOSS, 1999; DAVIES, 1996; HANSSON et al., 1983) markiert die Grenzschicht zwischen dem Implantat und neuem Knochen, genauso wie Kittlinien im physiologischen Remodelingzyklus die Grenze zwischen unterschiedlich altem Knochen markieren (DAVIES, 1996).

Der Erfolg der Osteokonduktion ist nicht nur von der Fähigkeit zur Knochenreparatur sondern auch von den Eigenschaften des Implantatmaterials abhängig (ALBREKTSSON und JOHANSSON, 2001).

1.1.3 Osseointegration

Osseointegration benötigt sowohl die Osteoinduktion als auch die Osteokonduktion als Vorbereitung. Zum Beispiel werden Materialien, welche zu giftig sind, um Osteokonduktion zu ermöglichen, auch nicht osseointegriert.

Osseointegration impliziert, egal unter welcher Definition man diesen Begriff betrachtet, eine stabile und langjährig anhaltende Fixation des Implantates im Knochen (ALBREKTSSON und JOHANSSON, 2001).

Unabhängig davon muss Osseointegration als **Prozess** aufgefasst werden anstatt als Ergebnis. Der Begriff „unvollständige“ Osseointegration sollte besser durch „diskontinuierlich“ ersetzt und dies sowohl im zeitlichen als auch im räumlichen Kontext verstanden werden (MASUDA et al., 1998).

Angestrebt wird eine möglichst umfangreiche Integration und Umwachsung des Implantates im Knochen, wobei aber auch nach vielen Jahren nie eine 100%ige Kontaktfläche zwischen Knochengewebe und Implantat beobachtet werden konnte (ALBREKTSSON und JOHANSSON, 2001; SCHENK und BUSER, 1998).

Während der Osseointegration wird der in der Osteokonduktionsphase gebildete Geflechtknochen durch Remodeling in lamellären Knochen umgebaut und somit das Implantat stabil in die mechanischen Belastungsanforderungen des Knochens einbezogen (SCHENK und BUSER, 1998).

Hierbei sind wohl die Fortsätze der Knochenzellen, die in Kontakt mit dem Implantat treten und mechanische Stimuli registrieren und weiterverarbeiten, von entscheidender Bedeutung. Der genaue Mechanismus ist aber noch unklar (STEFLIK et al., 1998).

Der Erfolg der Osseointegration, also die Haltbarkeit des so genannten Interfaces (die Verbindungsstelle zwischen Knochen und Implantat) hängt von verschiedenen Faktoren ab:

Als Grundvoraussetzung muss eine gute Knochenqualität mit ausreichender Vaskularisation vorhanden sein, damit die Regeneration von gesundem neuen Knochengewebe erfolgen kann (DONATH, 1988; FRITZ, 1999). Weiterhin sind die Implantateigenschaften von Bedeutung (siehe unten).

Zusätzliche entscheidende Faktoren für eine gelungene Osseointegration sind von verschiedenen Autoren benannt worden:

So schreibt schon BRANEMARK (1983), dass ein großes Präparationstrauma während der Operation zur Entwicklung der unerwünschten bindegewebigen Schicht führen kann. Weitere Untersucher (KNÖFLER und GRAF, 1989; LINDER, 1989) machten dieselbe Beobachtung.

Auch sollte eine sofortige Stabilisierung des Implantates erreicht werden, am besten durch die Anwendung der press fit-Technik, da eine fehlende Fixation die Ausbildung einer fibrösen Zwischenschicht fördert und somit die Osseointegration stören kann (CAMERON et al., 1973; SOBALLE et al., 1990).

Nach der Operation sollte für eine adäquate Bewegungseinschränkung gesorgt werden (BOSS, 1999; BRUNSKI, 1999; GOLDBERG und JINNO, 1999; HENRY, 1999; KIRSCH und DONATH, 1984; MARTENS et al., 1980; SCHENK und BUSER, 1998), sowie die Belastung des operierten Bereiches auf ein Minimum reduziert werden, da bei sofortiger Belastung oder Überlastung (selbst, wenn diese erst nach einiger Zeit eintritt) die Osseointegration vermindert bis gänzlich verhindert werden kann (BRANEMARK, 1983; BRUNSKI, 1999; FRITZ, 1999; GONDOLPH-ZINK, 1998; HUJA et al., 1999; SCHENK und BUSER, 1998).

1.2 Implantate

1.2.1 Materialzusammensetzung

Um eine ausreichende Stabilisation durch Osseointegration zu erreichen, müssen auch die Implantatmaterialien bestimmte Anforderungen erfüllen. So wirken toxische Materialien kontraproduktiv, auch reizende, entzündungsfördernde Implantate verhindern die Ausbildung eines stabilen Interfaces.

Infolgedessen wurde eine Einteilung biokompatibler Materialien in drei verschiedene Wirkungsrichtungen erstellt (BOSS, 1999):

- Biotolerant
- Bioaktiv
- Bioinert

Biotolerante Materialien werden von einer fibrösen Kapsel umschlossen (so zum Beispiel Edelstahl und Kobalt-Chrom-Legierungen (ESCALAS et al., 1976)), bioaktive Materialien, wie zum Beispiel Hydroxylapatit, verbinden sich mit dem umliegenden Gewebe über chemische Reaktionen und rufen somit eine Osteogenese hervor (BOSS, 1999; SCHENK und BUSER, 1998). Momentan können bioaktive Materialien nur über Beschichtungen mit einem Implantat wirken, da diese Materialarten allein sehr schlechte mechanische Eigenschaften aufweisen.

Bioinerte Materialien geben keine schädlichen Substanzen ab und verhalten sich relativ neutral im umgebenden Gewebe. Materialien, die zu 100% inert sind, konnten noch nicht entwickelt werden. Bioinerte Materialien binden weder chemisch noch werden sie von einer fibrösen Kapsel umgeben. Stattdessen werden diese stabil und mit engem Knochen-Implantat-Kontakt osseointegriert (BOSS, 1999; SCHENK und BUSER, 1998).

Titan und seine Legierungen zählen zu den bioinerten Materialien. Sie gehören mit zu den am häufigsten in der Zahnheilkunde und bei orthopädischen Problemen eingesetzten Materialien für enossale Implantate (JOHANSSON et al., 1998).

Bei der Implantation dieses Metalls und seiner üblichen Verbindungen kommt es zu guter knöcherner Einheilung ohne Anzeichen einer Entzündung (ESCALAS et al., 1976; SCHENK und BUSER, 1998). Die Ausbildung eines stabilen Interfaces lässt sich auf die Fähigkeit von Titan (und Titanlegierungen) zurückführen, eine Oxidschicht ausbilden zu können. Innerhalb einer Millisekunde erhält Titan, aufgrund seiner hohen chemischen Reaktionsfähigkeit, eine sehr dünne Oxidschicht (hauptsächlich TiO_2), wenn es mit Luft in Kontakt kommt.

Dieser Vorgang wird „passivieren“ genannt, wenn die Oxidschicht selbständig entwickelt wird und auch unter physiologischen Bedingungen aufrechterhalten werden kann (KIM et al., 1997). Die Oxidschicht ist nach Kontakt mit Luft nie wirklich homogen, es tauchen stets auch weitere Ionen wie Cl, S, Si, P und Na auf (LARSSON et al., 1994).

Die Dicke der gebildeten Oxidschicht bewegt sich im Bereich von 2-20 nm (THULL, 1993) und kann durch Behandlung mit zum Beispiel Salpetersäure (LACEFIELD, 1999) oder Anodisierung (LARSSON et al., 1994) noch verstärkt werden. Durch ein als „Aging“ bezeichnetes Verfahren kann außerdem die ungeordnete Oxidschicht, die sich spontan gebildet hat, in eine geordnetere und damit stabilere Schicht überführt werden. Dazu werden die Implantate mit Salpetersäure behandelt und anschließend in kochendem destillierten Wasser einige Stunden belassen (BROWNE und GREGSON, 1994). Der Vorteil von solchen Behandlungen besteht unter anderem auch in der Verminderung der anfänglichen Freisetzung von Metallionen aus dem Implantat, welche besonders bei vergrößerter Oberfläche (zum Beispiel angeraut oder porös) stattfindet. Die Oxidschicht bildet demnach einen gewissen Schutz für das Gewebe und erhöht die Rostresistenz des Metalls (BROWNE und GREGSON, 1994).

Ti6Al4V (Titan-Legierung mit einem Anteil von ca. 6% Aluminium und 4% Vanadium) ist ein viel verwendetes Material in der Implantattechnologie.

Diese Legierung besteht aus zwei unterschiedlichen Kristallisationsstrukturen, welche die Materialeigenschaften festlegen. Je nach Kristallstruktur bei unterschiedlicher Umgebungstemperatur kann man α -, $\alpha+\beta$ - und β -Legierungen unterscheiden.

Elementares Titan zeigt bei einer Temperatur bis $882,5^\circ\text{C}$ hexagonale α -Kristallformen, bei Temperaturen darüber β -Kristalle, welche kubischer Anordnung sind (der Schmelzpunkt von Titan liegt bei 1678°C).

Titanlegierungen mit hohem α -Anteil haben die Eigenschaft, dass sie eine erhöhte Korrosionsresistenz aber eine geringe Temperaturstabilität aufweisen. Elemente, die diese α -Struktur stabilisieren sind zum Beispiel Aluminium, Sauerstoff, Stickstoff und Kohlenstoff.

Legierungen mit höherem β -Anteil wiederum zeigen eine gute Stabilität und Formbarkeit, außerdem die einzigartige Kombination von niedrigem Elastizitätsmodul mit hoher Korrosionsfestigkeit. Unter anderem stabilisieren Molybdän, Vanadium, Niob, Eisen, Chrom und Kobalt diese Kristallstruktur.

Die Kombination Titan 6-Aluminium 4-Vanadium ist demnach ein Vertreter einer $\alpha+\beta$ -Legierung mit den Vorteilen beider Einzelkristallstrukturen (LONG und RACK, 1998). Die erlaubte Zusammensetzung dieser Legierung sowie die erforderlichen Grundeigenschaften findet man in der ISO 5832-3 (1996) genau aufgeführt.

1.2.2 Oberflächenrauigkeit

Unterschieden werden muss der Begriff Rauigkeit von dem der Topographie eines Implantates, da Implantate die gleiche Rauigkeit mit unterschiedlicher Topographie besitzen können (COOPER, 2000) und dies wiederum Auswirkungen auf die Knochenhaftung an das Implantat hat (SCHWARTZ und BOYAN, 1994). Zahlreiche Untersuchungen über den Einfluss der Rauigkeit von Implantaten auf das Knochenwachstum haben gezeigt, dass mit steigender Rauigkeit die Knochenformationsrate sowie der Anteil an direktem Knochenkontakt am Implantat steigt (BUSER et al., 1991; COOPER, 2000; FEIGHAN et al., 1995; GOLDBERG und JINNO, 1999; GRÖSSNER-SCHREIBER und TUAN, 1991; KELLER et al., 1994; NÖTH et al., 1999).

Verschiedene Parameter geben Aussage über die Rauigkeit der Oberfläche, wobei beachtet werden muss, dass multidimensionale Messungen für eine genaue Wiedergabe der tatsächlichen Oberfläche zu empfehlen sind (COOPER, 2000).

Über den genauen Mechanismus, warum Zellen an einer strukturierten Oberfläche eher haften und eine vermehrte Bindung eingehen, ist noch wenig bekannt. Die durch die Aufrauung vergrößerte Oberfläche liefert wohl eine bessere Angriffsfläche für Proteine und Wachstumsfaktoren (SCHWARTZ und BOYAN, 1994), außerdem werden die Zellmechanismen zur Anheftung begünstigt (COOPER, 2000).

1.2.3 Topographie

Wie oben schon erwähnt hat die Topographie entscheidenden Einfluss auf die Anheftung von Knochen an die Implantatoberfläche.

Verschiedene Methoden wurden entwickelt, um den Effekt der Rauigkeit zu unterstützen (COOPER, 2000), so zum Beispiel:

- Abrasive Methoden
- Laserbehandlung (Strukturierung der Oberfläche in Form von Poren)
- Aufsintern von Metallnetzwerken oder Kugeln
- Beschichtungen, meist mit Kalziumphosphatverbindungen
- Säurebehandlung (Salpetersäure oder Salzsäure)
- Anodisierung

Schwierig ist der direkte Vergleich der verschiedenen Studien, welche zur Entwicklung einer optimalen Struktur von endossalen Implantaten durchgeführt wurden, da Topographie, Liegedauer und Belas-

tungssituation, Tiermodell, Operationstechnik sowie Materialien erheblich variieren (GOTFREDSEN et al., 1991).

Allgemeingültige Aussagen über die „beste“ Oberfläche eines Implantates sind demnach in der Regel nicht möglich. Die Vor- und Nachteile einiger weit verbreiteter Verfahren sollen jedoch kurz erwähnt werden:

So ist das Aufbringen von bioaktiven Beschichtungen mit dem Risiko verbunden, dass sich diese Beschichtung mit der Zeit ablösen kann (GONDOLPH-ZINK, 1998; JINNO et al., 1998). Auch Resorption des Kalziumphosphates wurde beobachtet (BUSER et al., 1991). Die Verbindung zum Metallkern ist ein Schwachpunkt, welcher zwar durch neuere Herstellungsmethoden verbessert werden konnte, aber dennoch nicht ganz von der Hand zu weisen ist (COOPER, 2000). Ein großer Vorteil wiederum ist die schnelle Verbindung, die der Knochen mit den kalziumhaltigen Beschichtungen eingeht und die eine schnelle Stabilisation gewährt (DEAN et al., 1995).

Beim Aufsintern der verschiedenen Strukturen, wie zum Beispiel Kugeln oder aber Fasernetze, werden Möglichkeiten für ein tiefes Einwachsen des Knochens geschaffen (MITTELMEIER et al., 1997). Dies ist ein großer Vorteil dieses Verfahrens. Die Nachteile zeigen sich einmal durch eine hohe Variation der interkonnektierenden Strukturen, so dass eine genaue Definition der erhaltenen Poren/ Netzöffnungen nicht möglich ist (BOBYN et al., 1980; ITÄLÄ et al., 2001), zum Anderen besteht die Möglichkeit, dass sich die Verbindung dieser Beschichtung löst (GOLDBERG und JINNO, 1999). Durch dieses Verfahren kann sich außerdem die Brüchigkeit des Materials erhöhen und daraus eine verminderte Belastungsstärke resultieren (LACEFIELD, 1999).

Die abrasive Methode des Strahlens eines Implantates ergibt eine ungeordnet aufgeraute Oberfläche mit, je nach Größe der Strahl-Partikel, unterschiedlichen Rauigkeitsparametern.

Die Vorteile sind klar aus den positiven Ergebnissen des Knochen-Implantat-Kontaktes in vielen Studien zu sehen (BUSER et al., 1991; D'LIMA et al., 1998; ERICSSON et al., 1994; GOLDBERG und JINNO, 1999; SUZUKI et al., 1997). Als Nachteil muss die, wie bei jeder vergrößerten Oberfläche, erhöhte Freisetzung von Metallionen erwähnt werden (COOPER, 2000; SCHWARTZ und BOYAN, 1994).

Zuletzt sei die Lasertechnik aufgeführt, mit der Poren in das Implantat gepulst werden. Diese Methode weist die Vorteile auf, dass die Poren in ihrer Größe definiert werden können (ITÄLÄ et al., 2001), keine Schwachstellen durch aufgesetzte Schichten entstehen und dennoch dem Knochen eine Verankerungsmöglichkeit mit guter Stabilität geboten wird (KASEMO und GOLD, 1999; LI et al., 1997). Als Nachteil wiederum ist hier eine eventuell erhöhte Freisetzung von Metallionen zu sehen und bei zu geringer Porengröße die Verhinderung von adäquatem Knochenwachstum mit Osteonenausbildung (JINNO et al., 1998; LI et al., 1997; MARTENS et al., 1980; TSURUGA et al., 1997).

1.3 Tiermodell

Über die Eignung der verschiedenen Versuchstierspezies für die Forschung am Knochen gibt es unterschiedliche Ansichten. Um einen Vergleich mit dem Menschen ziehen zu dürfen, muss die Feinstruktur der Knochen von den einzelnen Tierarten betrachtet werden. Der menschliche Knochen besteht in der Kortikalis hauptsächlich aus Sekundärosteonen, welche eine strenge Ordnung und zentrifugale Mineralisation zeigen (EITEL et al., 1981a). Diese Knochenorganisation wird ungefähr im gleichen Umfang bei Nicht-Primaten nur noch beim erwachsenen Hund oder der adulten Katze gezeigt (HÖRNER et al., 1997). Zahlreiche Untersuchungen favorisieren den Hund, das Schwein oder aber das Schaf als geeignete Versuchstierspezies für den osteologischen Fragenkomplex (AERSSSENS et al., 1998; EITEL et al., 1981a; EITEL et al., 1981b; HÖNIG und MERTEN, 1993; HÖRNER et al., 1997; WISSING et al., 1990).

Für den Hund sprechen die, verglichen mit dem Menschen, ähnliche Zusammensetzung und Feinstruktur des Knochens (AERSSSENS et al., 1998; WISSING et al., 1990), wobei aber große Rassenunterschiede und inhomogene Reaktionen mit individuellen Schwankungen beobachtet wurden (EITEL et al., 1981a; HÖNIG und MERTEN, 1993; HÖRNER et al., 1997; WISSING et al., 1990). Bei Schwein und Schaf unterscheiden sich die Strukturen hinsichtlich der Osteone (vermehrt Primärosteone) und der Mikrozirkulation (EITEL et al., 1981b; WISSING et al., 1990). Die Größe und die Regenerationsgeschwindigkeit sind denen des Menschen sehr ähnlich, zusätzlich hat das Schwein eine annähernd gleiche Belastungssituation (zum Beispiel liegt die Tibia in der Tragachse) mit ruhiger Fortbewegung im Gegensatz zu Hund, Schaf und Kaninchen (HÖNIG und MERTEN, 1993; WISSING et al., 1990).

Die Haltung dieser großen Tiere wie Hund, Schaf oder Schwein erweist sich aber als aufwändig, weswegen man das Kaninchen auf dessen Eignung untersucht hat. Obwohl gegen das Kaninchen als Versuchstier für osteologische Fragestellungen EITEL et al. (1981a und 1981b) mit der Feinstruktur des Knochens, die hauptsächlich aus Primärosteonen besteht, argumentieren und HÖNIG und MERTEN (1993) sowie WISSING et al. (1990) den Unterschied zum Menschen in der Regenerationsdauer des Knochens (beim Kaninchen sehr schnell) und der biomechanischen Belastung (Lage der Extremitäten zur Tragachse, Unterschied der Fortbewegung im Gegensatz zum Menschen) aufführen, hat sich das Kaninchen trotzdem als geeignetes Tiermodell etabliert (BRUNSKI, 1999; DEAN et al., 1995; D'LIMA et al., 1998; FEIGHAN et al., 1995; GOLDBERG et al., 1995; GOLDBERG und JINNO, 1999; ITÄLÄ et al., 2001; JINNO et al., 1998; JOHANSSON et al., 1998; LARSSON et al., 1994; LI et al., 1997; SUZUKI et al., 1997; TISDEL et al., 1994). Zum einen ist seine Haltung kostengünstig und problemlos (WISSING et al., 1990), die Tiere sind außerdem groß genug für die Implantation (GOLDBERG et al., 1995) und die Knochenstruktur ändert sich bei adulten Tieren dahingehend, dass deutliche Sekundärosteonenentwicklung auftritt und es dabei keine Rassenunterschiede zu beobachten gibt (HÖRNER et al., 1997).

1.4 Implantationsmodell

Jegliche Übertragung von Ergebnissen aus der Forschung mit Tieren darf nur mit äußerster Vorsicht auf den Menschen geschehen (SELVIG, 1994), und das nicht nur aufgrund der Belastungssituation des Skelettes (Menschen haben als einzige Spezies die aufrechte Gangart) (AERSSSENS et al., 1998), sondern auch aufgrund der individuellen Heilungsmöglichkeiten sowie des Unterschiedes der Versuchsbedingungen zur klinischen Realität (DEAN et al., 1995). Hierbei ist bei der Untersuchung von Implantaten für Hüftendoprothesen besonders der Aufbau der unterschiedlichen Modelle hervorzuheben.

In der Forschung gibt es zwei Implantatlager, um in Extremitäten – unabhängig mit welcher Spezies gearbeitet wird – Implantate zu verankern und über eine definierte Liegedauer Untersuchungen anzustellen. Die Vorteile des *intramedullären* Modells mit seiner axialen Belastungssituation liegen klar in der für Hüftprothesen realitätsnahen Gestaltung des Versuches (D'LIMA et al., 1998) und der sich daraus ergebenden genauen Wiedergabe der komplexen Umgebung (FEIGHAN et al., 1995); außerdem kann das intramedulläre Modell zur Isolierung der dynamischen biologischen Aspekte der Osseointegration verwendet werden (GOLDBERG und JINNO, 1999). *Transkortikale* Modelle wiederum bieten die Möglichkeit für eine pressgenaue Einpassung und erleichtern gegenüber intramedullären Modellen die Interpretation von biomechanischen Untersuchungen (Push-/ Pull-Out-Versuche) (FEIGHAN et al., 1995). Es entsteht eine Belastungssituation, in der das Implantat Kompressionsbelastung übernehmen muss. Dieser Aufbau kommt der geplanten klinischen Applikation im Bereich der Hüftendoprothesen-Pfanne am nächsten.

Aufgrund der häufigen Kombination histomorphometrischer sowie biomechanischer Untersuchungen in den gleichen Versuchsgruppen, wird das transkortikale Implantationsmodell von vielen Forschern mit Erfolg verwendet (CHANG et al., 2001; DEAN et al., 1995; HUJA et al., 1999; JOHANSSON et al., 1998; LARSSON et al., 1994; LI et al., 1997; MARTENS et al., 1980; SUZUKI et al., 1997).

Wie beschrieben haben das Implantatmaterial und die Oberflächenbehandlungen einen großen Einfluss auf die Intensität des Knochen-Implantat-Kontaktes. Auch in der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit die unterschiedliche Oberflächenstruktur Einfluss auf die Osseointegration von laserbehandelten Titanimplantaten in einem transkortikalen Kaninchenmodell hat.

Vorläufer dieses Versuchsaufbaus war eine Untersuchung mittels eines intramedullären Modells in Oberarm- und Oberschenkelknochen von Kaninchen (STANGL et al., 2004). Die dort verwendeten laserstrukturierten Implantate wiesen eine poröse Struktur auf mit Porengrößen von 25 µm, 50 µm und 200 µm. Als Vergleich diente ein Implantat mit raugestrahelter Oberfläche. Die Untersuchung zeigte, dass das Implantat mit der rauen Oberfläche beim Knochen-Implantat-Kontakt die besten Werte aufwies. Nur in den Poren der Größe 200 µm konnte lamellärer Knochen, der für die langfristige Stabilität eines Implantates von entscheidender Bedeutung ist, gebildet werden, in die kleineren Poren wuchs zwar Knochen ein, eine lamelläre Struktur blieb jedoch aus.

Die nun folgende Studie wurde mit dem Ziel durchgeführt, eine genauere Bestimmung der optimalen Oberflächenbeschaffenheit von laserstrukturierten Titanimplantaten für eine stabile Osseointegration durchzuführen. Hierzu wurden weitere Porengrößen miteinander verglichen und zusätzlich mit aufgerauter Oberfläche versehene Implantate in die Untersuchung miteinbezogen.

2 PUBLIKATION

Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants

H.E. Götz¹, M. Müller², A. Emmel³, U. Holzwarth⁴, R.G. Erben¹, and R. Stangl²

¹ Institute of Physiology, Physiological Chemistry and Animal Nutrition, Veterinary Faculty, Ludwig Maximilians University, Munich, Germany

² Trauma Surgery Division at the Friedrich Alexander University Hospital Department of Surgery, Erlangen/Nürnberg, Germany

³ University of Applied Sciences, Amberg, Germany

⁴ P. Brehm Co., Weisendorf, Germany

Biomaterials (im Druck)

Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants

H.E. Götz¹, M. Müller², A. Emmel³, U. Holzwarth⁴, R.G. Erben¹, and R. Stangl²

¹ Institute of Physiology, Physiological Chemistry and Animal Nutrition, Veterinary Faculty, Ludwig Maximilians University, Munich, Germany

² Trauma Surgery Division at the Friedrich Alexander University Hospital Department of Surgery, Erlangen/Nürnberg, Germany

³ University of Applied Sciences, Amberg, Germany

⁴ P. Brehm Co., Weisendorf, Germany

Abstract

It was the purpose of this study to examine the osseointegration of laser-textured titanium alloy (Ti6Al4V) implants with pore sizes of 100, 200, and 300 μm , specifically comparing 200- μm implants with polished and corundum-blasted surfaces in a rabbit transcortical model. Using a distal and proximal implantation site in the distal femoral cortex, each animal received all 4 different implants in both femora. The bone-implant interface and the newly formed bone tissue within the pores and in peri-implant bone tissue were examined 3, 6, and 12 weeks post-implantation by static and dynamic histomorphometry. Here we show that additional surface blasting of laser-textured Ti6Al4V implants with 200- μm pores resulted in a profound improvement in osseointegration, 12 weeks post-implantation. Although lamellar bone formation was found in pores of all sizes, the amount of lamellar bone within pores was linearly related to pore size. In 100- μm pores, bone remodeling occurred with a pronounced time lag relative to larger pores. Implants with 300- μm pores showed a delayed osseointegration compared with 200- μm pores. We conclude that 200 μm may be the optimal pore size for laser-textured Ti6Al4V implants, and that laser treatment in combination with surface blasting may be a very interesting technology for the structuring of implant surfaces.

Key words: Titanium alloy – Laser – Porosity – Histomorphometry – Osseointegration

Introduction

A stable anchoring is critical for long-term success of total hip arthroplasties, avoiding pain for the patient, functional impairment, and eventually revision of the implant. To achieve lasting stability of non-cemented implants, osseointegration of the implant is a prerequisite [1]. Osseointegration is defined as the direct connection from implant to living remodeling bone without any soft tissue component between implant and bone on the light microscopic level [2]. A rapid osseointegration is associated with improved secondary stability and, thus, with a favorable prognosis for long-term success of the implant [3, 4]. To allow early fibrin adhesion, blood vessel growth and eventually new bone-formation, initial stability has to be achieved by reduction of micromotion [1,5,6]. If micromotion cannot be reduced to a minimum level, a fibrous tissue instead of a bony interface will result at the implant surface [2,7-9].

In order to reduce micromotion initially, and to improve osseointegration later on, many variants in surface geometry of the implant have been developed [10-12]. It is well known that surface geometry determines the interactions of proteins and cells with the implant surface [13,14], and that increased surface roughness is associated with better cell adherence, higher bone-implant contact (BIC), and improved biomechanical interaction [6,15-19].

It is evident that bone ingrowth into porous implant surfaces may result in improved osseointegration and mechanical stability by interlocking the surrounding bone tissue with the implant [20-22]. Implants with different pore sizes were investigated by Bobyn [23], who reported an optimum pore size of 100 – 400 μm . Several other studies have shown that there appears to be a minimum pore size of about 140 – 200 μm for viable osteons to arise [12,24,25]. Osteons in cortical bone and hemiosteons in cancellous bone are created by bone remodeling activities [26], replacing biomechanically inferior woven bone by lamellar bone, and removing microdamage that may have accumulated at the bone-implant interface [27]. Thus, remodeling of bone within pores is essential for long-term stability of the bone-implant interface.

To achieve a porous surface, implants usually have been manufactured as solid rods, and were then sintered with beads or fiber mesh due to the lack of a technology to homogeneously create open inter-connecting structures in titanium alloys [28]. However, the sintering process can lead to brittleness and reduced fatigue strength [29]. Recent progress in laser technology has made it possible to produce novel implant surfaces by introducing pores of defined geometry into metal implants with high precision and efficiency [30]. In a previous study conducted in our laboratory, we examined the osseointegration of copper vapor laser-textured titanium alloy (Ti6Al4V) implants with pore sizes of 25, 50, and 200 μm in a rabbit intramedullary model [31]. We found that implants with 50- and 200- μm pore sizes had the highest values for BIC among the laser-textured surfaces, and that bone remodeling within pores occurred only in the implants with 200- μm pores. However, all laser-textured implants were inferior to corundum-blasted (CB) control implants in terms of osseointegration, most likely due to the fact that the implant surface between the pores was smoothly polished in our previous investiga-

tion. Therefore, we sought to examine the osseointegration of laser-textured Ti6Al4V implants with pore sizes of 100, 200, and 300 μm in the present investigation, specifically comparing 200- μm implants with polished and CB surfaces. We chose a rabbit transcortical model in this study in order to expand our model to situations with increased compression loading such as those found in noncemented endoprosthetic hip cups. Here we show that surface-blasted implants with 200- μm pores are superior to polished implants with any pore size in terms of osseointegration.

Materials und Methods

Implants

Ti6Al4V cylinders of 5.5 mm length and 3.5 mm diameter were used (Brehm, Weisendorf, Germany). Using a neodyme (Nd):YAG laser, pores of defined geometry were introduced into the surface of the polished, lathed implants by the ATZ-EVUS company (Vilseck, Germany), and by the University of Applied Sciences, Amberg, Germany. The laser generated a maximum power of up to 65 W. Nanosecond timing of each amplifier resonance point permitted firing of a predetermined number of pulses of up to 100 ns duration at high repetition rates (10 kHz). In this study, we used pore diameters of 100, 200, and 300 μm . Pore depth and pore diameter were identical. The pores were conical or cylindrical in shape and the distance between the pores was the same as pore diameter. The sharp edges of the pores were smoothed with fine sandpaper. Half of the implants with 200- μm pores were additionally blasted with 500 – 710 μm Al_2O_3 grit. Surface roughness was measured by non-contact surface profilometry (Mahr, Göttingen, Germany), and a mean inter-pore roughness of 7.25 μm (R_a) was achieved for blasted 200- μm implants. After surface treatment, the implants were cleaned ultrasonically, and sterilized industrially using gamma irradiation (28 kV).

Experimental animals and surgical procedures

All animal experiments were approved by the government authorities. Forty-five adult female New Zealand White rabbits with mature skeletons and an average body weight of 3.2 kg were used for this experiment. The animals were jointly housed in runs. Each animal received two implants in each femur. Thus, each rabbit received all 4 different implants. The implants were randomly assigned to the two different implantation sites.

The animals were anesthetized with an intramuscular injection of 25 mg/kg ketamine (Parke&Davis, Freiburg, Germany) and 5 mg/kg xylazine (Boehringer, Ingelheim, Germany). Anesthesia was maintained with intravenous injections of ketamine/xylazine. Immediately before the operation the rabbits received 0.4 ml benzyl penicillin (Tardomyocel[®], Boehringer, Ingelheim, Germany). After shaving, depilation (Pilca med[®], Schwarzkopf und Henkel, Düsseldorf, Germany), and disinfection (Betaisodona[®], Mundipharma, Limburg, Germany) of the skin, the distal femur was exposed by a lateral incision. The incisions were infiltrated with 2% lidocaine (Hoechst, Frankfurt, Germany). Two holes (proximal and distal, 3.2 mm in diameter) were carefully drilled into the lateral cortical bone of

the distal femur under generous irrigation with saline to reduce the heat generated by drilling. The implants were placed transcortically in the holes by press-fit insertion. Finally, the incision was closed in layers. At the end of the procedure, all animals received a subcutaneous injection of 0.1 mg/kg buprenorphine (Essex, München, Germany) as an analgesic. Subsequent analgesic therapy was performed with metamizole (Hoechst) administered via the drinking water (5 mg/L) over two days postsurgery.

Normal weight-bearing was permitted after the implantation. Most of the wounds healed without complications. Two animals died under anesthesia, and 4 rabbits had to be killed a few days after the operation because of patella luxation or weight loss. As markers for bone formation dynamics, 4 different fluorochromes (alizarine complexone 20 mg/kg body weight, xylenol orange 90 mg/kg, calcein green 10 mg/kg, oxytetracycline 30 mg/kg; ICN, Ohio, USA) were injected subcutaneously according to the regimen shown in Table 1. Groups of 11 - 15 animals each were killed by an intraperitoneal pentobarbital overdose 3, 6, and 12 weeks postsurgery.

TABLE 1: Fluorochrome Labeling Regimen

Time point	Postoperative day	Substance
3 weeks	10	Alizarine complexone
	15	Calcein green
	19	Xylenol orange
6 weeks	10	Alizarine complexone
	20	Calcein green
	30	Xylenol orange
	40	Oxytetracycline
12 weeks	15	Alizarine complexone
	31	Calcein green
	47	Xylenol orange
	63	Oxytetracycline

Histology

At necropsy, the femora were removed, and trimmed with a saw under fluoroscopic control. With the implants in-situ, these bone cylinders were then dehydrated in ascending alcohol solutions and embedded undecalcified in methylmethacrylate in cylindrical glass vials as described [32]. Proceeding from periosteal to endocortical, at least 6 consecutive sections of approximately 200 μ m thickness were made with a precision band saw (Exakt, Norderstedt, Germany) from each specimen. Subsequently, the sections were ground to a final thickness of 20 μ m with the help of the micro-grinding system (Exakt) as described [33]. The sections were initially left unstained for fluorochrome-based measurements. Thereafter, the sections were stained with toluidine blue for subsequent measurements of bone-implant contact.

Histomorphometry

Bone growth within pores and in peri-implant tissue. Measurements of fluorochrome-based histomorphometric parameters of bone formation within the pores and in the area within 0.5 mm from the implant surface were made using a Videoplan semiautomatic system (C. Zeiss, Jena, Germany) and a Zeiss Axioskop microscope with a drawing attachment in unstained sections. Measurements of peri-implant bone growth were performed only in the 12-week group. One section was analyzed per implant. The labeled perimeter (L.Pm/B.Pm) was defined as the percentage of fluorochrome-labeled bone perimeter for each fluorochrome label, and was measured at x200. The mineral apposition rate (MAR) between 2 adjacent fluorochrome labels was measured at x200, sampling each site showing both labels every 50 μm . Values for MAR were not corrected for obliquity of the plane of section. The bone formation rate (BFR/T.Ar) for the time interval between two fluorochrome labels was calculated by multiplying the arithmetic mean of the two individual values for labeled perimeter with the respective MAR. All bone formation rates were normalized to the pore area or to the peri-implant measuring area in order to account for differences in total area available for these measurements.

Bone-implant interface. Measurements of BIC were made with a semiautomatic system (Videoplan, C. Zeiss) and a Zeiss Axioskop microscope with a drawing attachment on 1 section stained with toluidine blue at x100. BIC was measured separately within the pores, and on the outer surface of the implant. Total BIC was calculated as the sum of within-pore BIC and surface BIC.

Bone quality within pores. Using the Videoplan semiautomatic system (C. Zeiss), the pore area, and the total and lamellar bone area within the pores were measured under polarized light on sections stained with toluidine blue at x100. From these primary data, the percentages of pore filling, and of lamellar and woven bone were calculated.

Statistical analysis

Statistical data analysis was performed using SPSS 11.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Initially, the data from all time points (3, 6, and 12 weeks) were analyzed using a 3-way factorial analysis of variance (ANOVA) with the factors *implant surface* (100-, 200-, 300- μm pores, and blasted 200- μm pores), *implantation site* (distal, proximal), and *time postsurgery* (3, 6, 12 weeks). Three-way factorial ANOVA evaluated whether the abovementioned factors had a statistically significant effect, and also determined whether there was a two-way interaction between the individual factors. Thus, this statistical technique allows to tell whether two different factors mutually influence each other in a non-additive way.

Subsequently, using only *implant surface* as variable, the combined data from each time point were analyzed by 1-way ANOVA followed by Student-Neumann-Keuls multiple comparison test.

P values of less than 0.05 were considered significant for all statistical analyses. The data are presented as the mean \pm SEM.

Results

Factorial ANOVA

Factorial ANOVA showed that the variables *implant surface* and *time post-implantation* had a significant effect on total and surface BIC, on pore filling, and on the amount of lamellar bone within pores (Table 2).

TABLE 2: Three-Way ANOVA Analysis of Selected Parameters of Osseointegration of Polished and Corundum-Blasted, Laser-textured Implants.

Parameter	Implant surface	Implantation site	Time	2-way interactions		
				Surface/Time	Surface/Site	Site/Time
Total BIC	P<0.001	NS	P<0.001	P=0.005	NS	NS
Surface BIC	P<0.001	NS	P<0.001	P=0.002	NS	NS
Within-pore BIC	NS	NS	P<0.001	NS	NS	NS
%Pore filling	P<0.001	NS	P<0.001	P=0.020	NS	NS
%Lamellar bone	P<0.001	NS	P=0.007	NS	NS	NS

BIC = bone-implant contact; NS = not significant; The percentage of lamellar bone was quantified within the pores of the implants.

The within-pore BIC was not influenced by the type of implant surface, but increased significantly with time (see below). The *implantation site* (proximal or distal) did not show a significant effect on any parameter. For most parameters measured, there was a significant 2-way interaction between *implant surface* and *time post-implantation*, but not for the combinations of *implant surface* or *time post-implantation* with *implantation site*. The presence of these significant 2-way interactions between *implant surface* and *time* showed that it was not legitimate to combine the data from different time points for subsequent data analysis. Therefore, the data from each time point were subsequently analyzed separately, using implant surface as sole variable.

Bone-implant interface

Total, surface, and within-pore BIC increased with time for all implant surfaces (Fig. 1a-c). After 3 and 6 weeks, the implants with 200- μm pores showed the highest percentage of total BIC (Fig. 1a, P<0.05 at 3 weeks vs. 100- and-300 μm pores). However, after 12 weeks postsurgery, total BIC did not differ between all 3 implants with polished surfaces, independent of pore size. The blasted 200- μm implants exhibited the highest values for total BIC compared with all other surfaces at 12 weeks post-implantation (P<0.05).

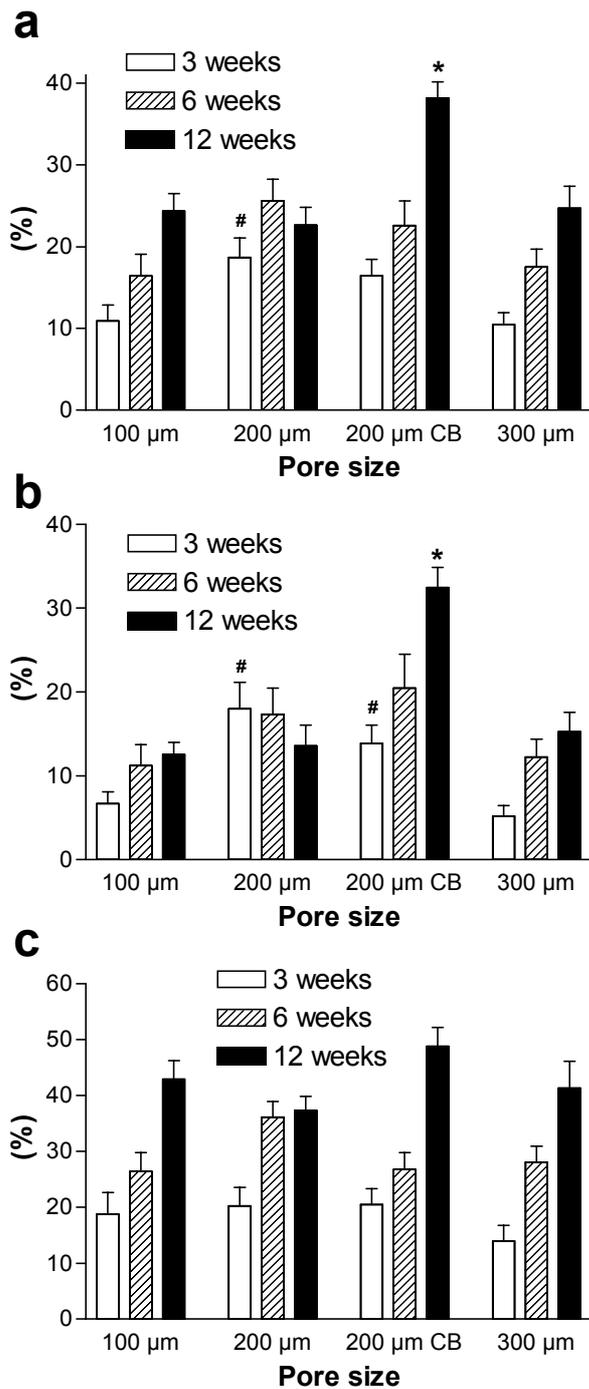


Figure 1. Total (a), surface (b), and within-pore (c) bone-implant contact (BIC) in polished and corundum-blasted (CB), laser-textured implants at 3, 6, and 12 weeks post-implantation. Data represent mean \pm SEM (n = 11 – 15 per group). * P<0.05 vs. all other groups, # P<0.05 vs. 100- and 300- μ m pores at the same time point by 1-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test.

The increase in total BIC for blasted 200- μ m pores was almost entirely due to a higher surface BIC, which was about twice as high relative to all other implants (Figs. 1b and 2, P<0.05). Within-pore BIC was not influenced by pore geometry or surface blasting (Fig. 1c).

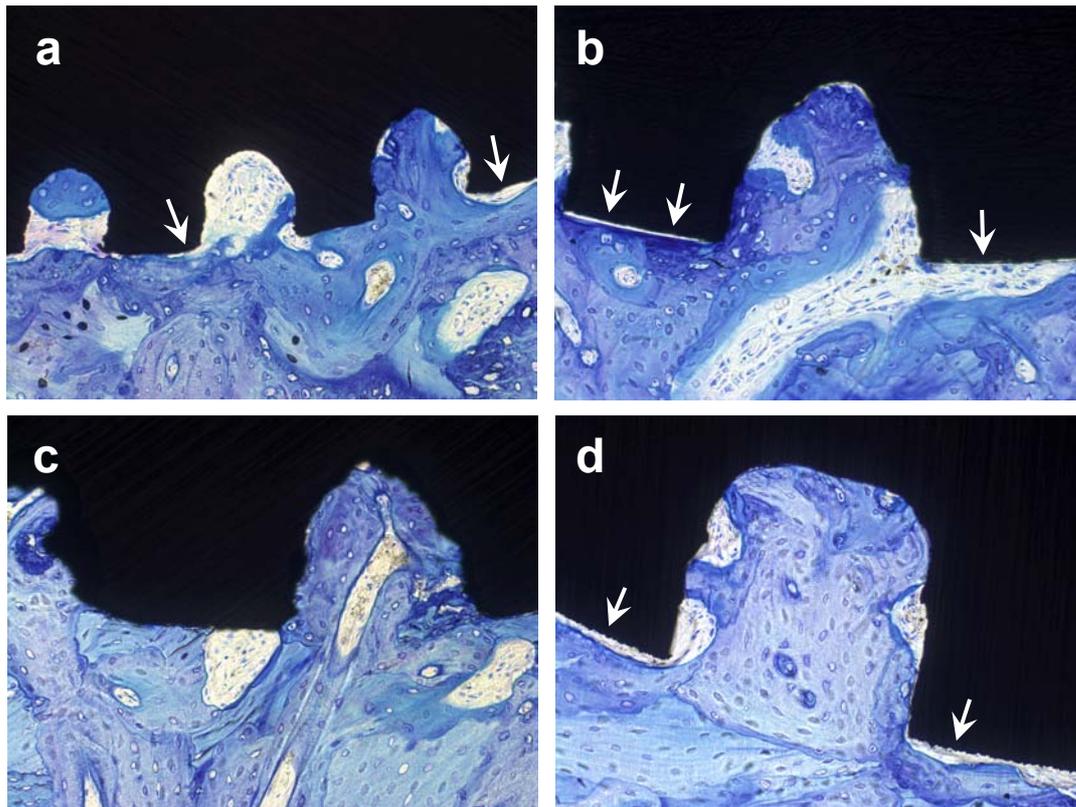


Figure 2. Photomicrographs of laser-textured TiAlV implants with 100- (a), 200- (b), surface-blasted 200- (c), and 300-µm pores (d), 12 weeks post-implantation. Note that pore filling is lower for the 100-µm pores (a), and that bone tends to avoid the polished surfaces of the implants that were not surface-blasted (a,b,d), leaving a visible gap between the implant and the surrounding bone tissue (arrows). The corundum-blasted implant with 200-µm pores (c) shows ample bone-implant contact at the inter-pore surface. Sections were stained with toluidine blue, original magnification x 200.

Pore filling and bone quality inside pores

Pore filling increased with time for all implant surfaces (Fig. 3a). At 6 and 12 weeks postsurgery, pore filling was lowest for the 100-µm pores (Figs. 2 and 3a, $P < 0.05$). A similar trend was seen for the 3-week time point. Also, the amount of lamellar bone found within pores increased with time for all implants (Fig. 3b). Pore size was a major determinant of the percentage of within-pore lamellar bone. At all time points, implants with bigger pores showed more lamellar bone within pores, independent of surface blasting. Only very little lamellar bone was found in 100-µm pores at the end of the study period.

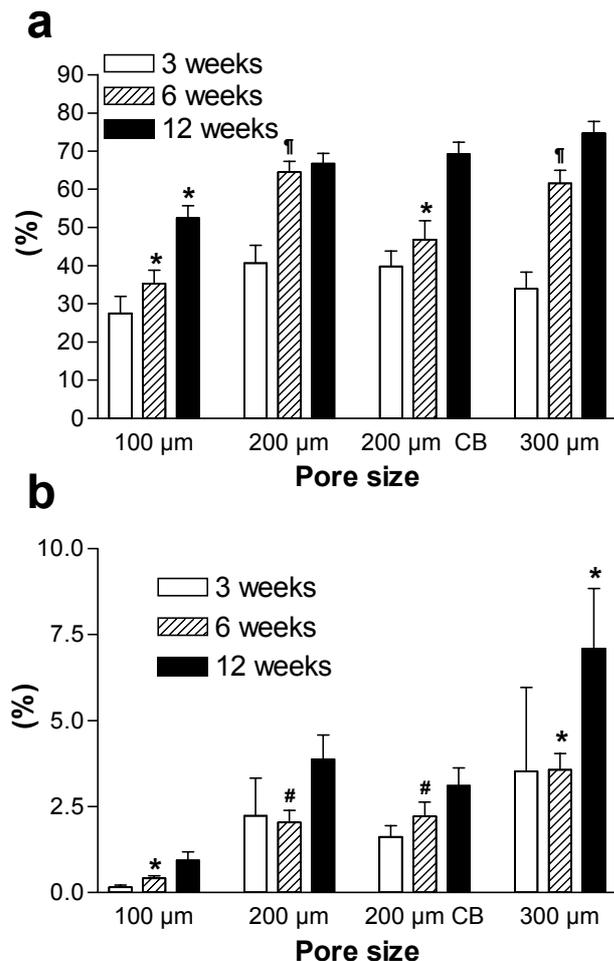


Figure 3. Percent pore filling (a) and percent lamellar bone present within pores (b) in polished and corundum-blasted (CB), laser-textured implants at 3, 6, and 12 weeks post-implantation. Data represent mean \pm SEM (n = 11 – 15 per group). * P<0.05 vs. all other groups, # P<0.05 vs. 100- and 300- μ m pores, ¶ P<0.05 vs. 100- and 200- μ m CB pores at the same time point by 1-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test.

Bone formation within pores and in peri-implant bone

To examine the dynamics of bone growth within the pores and in peri-implant bone, we performed multiple fluorochrome labeling. Data are shown for the 6-week and 12-week time point only. Generally, the bone formation rates per mm² pore area reached higher values in the 6-week compared with the 12-week group, showing that bone remodeling in this model was most intense 4 – 6 weeks post-implantation (Fig. 4a-b). In the group of animals killed at 6 weeks post-implantation, the bone formation rate in the 100- μ m pores was lower compared with all other implant surfaces for the time interval between days 30 and 40 of the study (Fig. 4a). A similar trend was seen for the earlier labeling intervals (Fig. 4a). However, at the later time points, lamellar bone formation in the 100- μ m pores increased, and for the time interval between days 47 and 63 of the study there were no significant differences in bone formation rates between the different surfaces any more (Fig. 4b). In peri-implant bone tissue, we did not observe any differences in bone formation rates between the different implant surfaces in the 12-week group (data not shown). In agreement with the abovementioned measurements of lamellar/woven bone made under polarized light, fluorochrome labeling showed the presence of well-defined, linear labels also in 100- μ m pores, 12 weeks postsurgery (Fig. 5a-d).

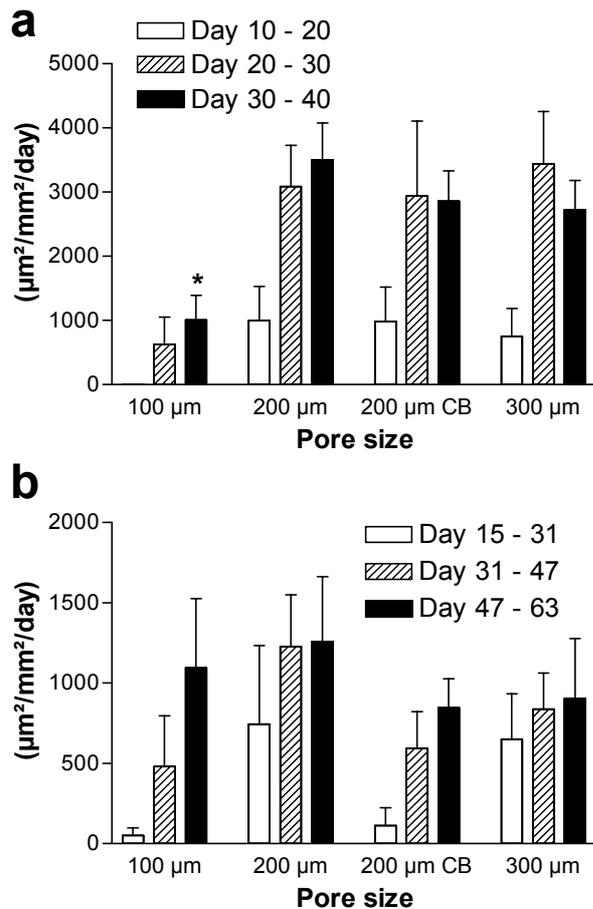


Figure 4. Bone formation rate within pores in polished and corundum-blasted (CB), laser-textured implants at 6 (a), and 12 weeks (b) post-implantation. The bone formation rate was normalized to the pore area. Data represent mean \pm SEM ($n = 11 - 15$ per group). * $P < 0.05$ vs. all other groups at the same time point by 1-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test.

Discussion

In the current study we have demonstrated that surface blasting significantly enhances the osseointegration of laser-textured Ti6Al4V implants in a rabbit transcortical implantation model. The increased total BIC in blasted 200- μ m implants was almost entirely due to increased BIC at the implant surface. Compared with polished 200- μ m implants the higher surface BIC in blasted 200- μ m implants was not observed at 3 weeks post-implantation, but developed mainly between 6 and 12 weeks postsurgery, suggesting that the biological mechanisms involved in bone ingrowth preferentially used the pores to initially anchor the implant within newly formed bone. At the later stages of osseointegration, bone growth spread onto the implant surface, depending on the structure of this surface. In agreement with this notion, within-pore BIC was always higher than surface BIC for all implants at all time points. Interestingly, surface blasting after the introduction of pores with defined geometry by Nd:YAG laser technique did not enhance BIC within the pores. Obviously, the local evaporation of the titanium alloy induced by the pulsed laser beam left a surface of sufficient roughness for optimal bone ingrowth within the pores.

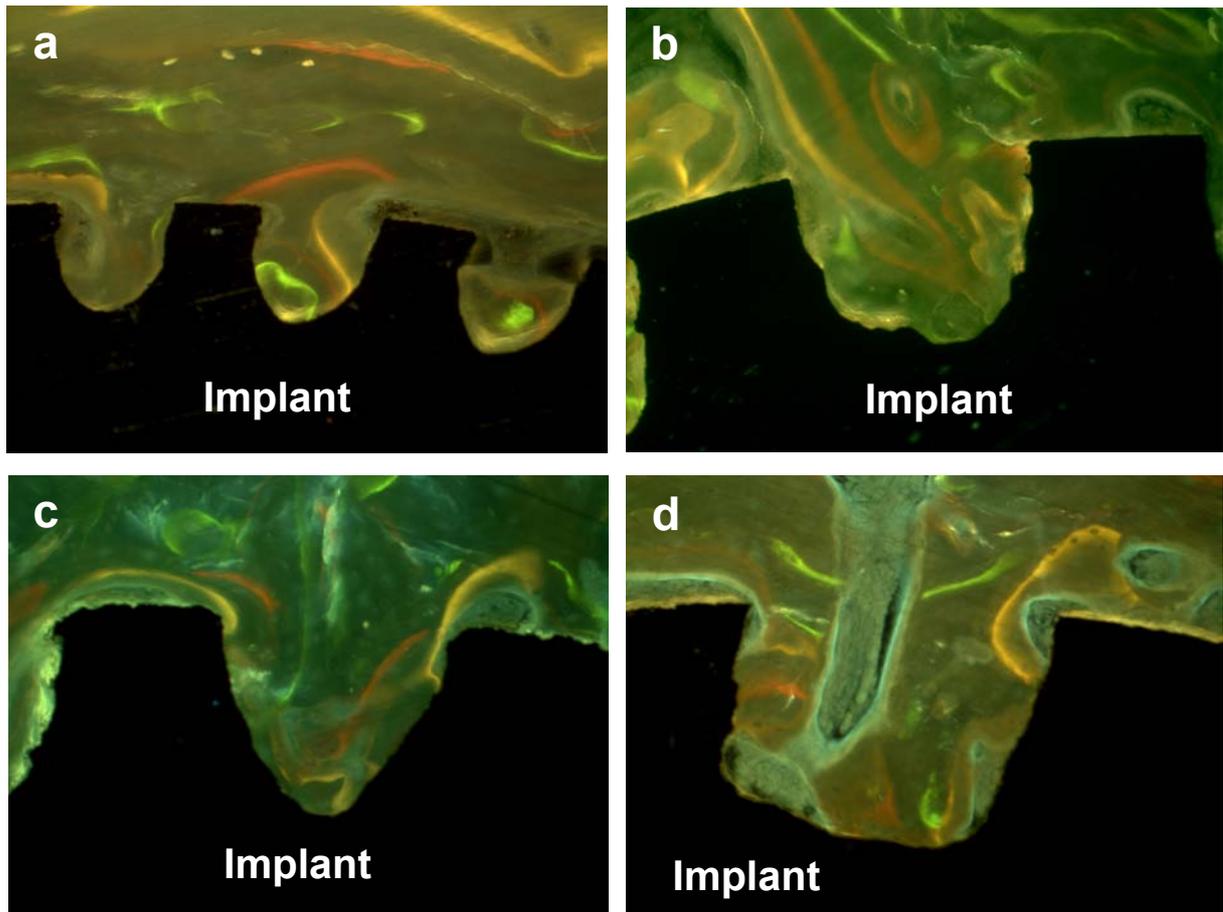


Figure 5. Photomicrographs of laser-textured TiAlV implants with 100- (a), 200- (b), surface-blasted 200- (c), and 300- μm pores (d), viewed under epifluorescent light, 12 weeks post-implantation. The animals were labeled with 4 different fluorochromes according to the regimen shown in Table 1. Fluorochrome labels in bone tissue are visualized by blue-violet excitation. It is evident that distinct fluorochrome labels indicative of lamellar bone formation are present in all pores, independent of their size (a-d). Unstained sections, original magnification $\times 200$.

For long-term biomechanical integrity of the bone-implant interface, remodeling of the initially formed woven bone and of microdamage [27] generated by mechanical loading is a crucial process. In our previous study [31] using a rabbit intramedullary implantation model we found lamellar bone and bone remodeling in 200- μm , but not in 25- or 50- μm pores created by laser texturing. Many years ago, Hulbert et al. [24] had demonstrated that the development of osteons requires minimum pore diameters between 150 and 200 μm in ceramic implants. In agreement with these findings, Li et al. [12] reported that laser-textured titanium surfaces require pores of at least 140 μm diameter for osteon formation in a rabbit transcortical model. However, the present study has clearly shown that bone remodeling does occur in pores with 100 μm diameter, albeit with a pronounced time lag relative to larger pores.

The delayed onset of bone remodeling in 100- μm pores may be an important argument against the use of such small pore sizes, because it can be assumed that the delayed bone remodeling within the pores is associated with decreased mechanical stability within the first weeks after implantation compared to implants with larger pores. Three-hundred- μm pores had the highest percentage of lamellar bone at the end of the study. However, the 300- μm pores were inferior to 200- μm pores in terms of total, surface, and within-pore BIC at 3 weeks post-implantation, suggesting that osseointegration of the implants with larger pores was slower. Thus, it remains to be shown in a long-term study whether the potential advantage of an improved mechanical stability due to a higher extent of bone remodeling within the pores could outweigh the initially slower osseointegration of laser-textured implants with 300- μm pores.

Laser texturing of metal implants may be a very interesting technology for the structuring of implant surfaces. Bone ingrowth into pores causes interlocking of the surrounding bone tissue with the implant, and may result in improved biomechanical stability and higher resistance to fatigue loading [20-22]. In this context, our finding that initial bone ingrowth is preferentially directed toward the pores of the implant may indicate further advantages of laser-textured implants with open pores due to an improved stability during the early stages of osseointegration. This hypothesis needs to be tested in future experiments.

Taken together, our study has clearly shown that additional surface blasting of laser-textured Ti6Al4V implants with 200- μm pores results in a profound improvement in osseointegration, 12 weeks post-implantation. Furthermore, the available data suggest that a diameter of around 200 μm may be the optimal size of pores in laser-textured Ti6Al4V implants. At present, larger pore sizes do not seem to offer major advantages. Clearly, more experimentation is required to demonstrate that surface-blasted, laser-textured implants are superior to standard surface-blasted implants in terms of osseointegration and mechanical stability in different models.

Acknowledgements

We would like to thank the AZT-EVUS Co., Vilseck, the P. Brehm Co., Weisendorf, and Dr. M. Hartmann from the Arges Co., Nabburg, for their assistance in providing the laser-textured implants. We also thank Prof. Dr. Thiede and Prof. Dr. Ulrichs, Department of Surgery, University of Würzburg, for their generous permission to use their animal facilities. This study was supported by a research grant from the Bavarian Ministry for Culture (High Tech Offensive Bayern).

References

1. Schenk RK, Buser D. Osseointegration: a reality. *Periodontol 2000* 1998;17:22-35
2. Branemark PI. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent* 1983;50:399-410
3. Szmukler-Moncler S, Salama H, Reingewirtz Y, Dubruille JH. Timing of loading and effect of micromotion on bone-dental implant interface: review of experimental literature. *J Biomed Mater Res* 1998;43:192-203
4. Spears IR, Pfleiderer M, Schneider E, Hille E, Morlock MM. The effect of interfacial parameters on cup-bone relative micromotions. A finite element investigation. *J Biomech* 2001;34:113-120
5. Donath K. Vergleichende histologische Untersuchung verschiedener enossaler Implantattypen. *Z Zahnaerztl Implantol* 1988;4:106-108
6. Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont* 1998;11:391-401
7. Aspenberg P, Goodman S, Toksvig-Larsen S, Ryd L, Albrektsson T. Intermittent micromotion inhibits bone ingrowth. Titanium implants in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1992;63:141-145
8. Gondolph-Zink B. [Effect of hydroxyapatite layering on the osteo-integration of weightbearing and non-weightbearing implants. Comparison to other microporous surfaces in animal experiments]. *Orthopade* 1998;27:96-104
9. Brunski JB. In vivo bone response to biomechanical loading at the bone/dental-implant interface. *Adv Dent Res* 1999;13:99-119
10. Chang YS, Gu HO, Kobayashi M, Oka M. Influence of various structure treatments on histological fixation of titanium implants. *J Arthroplasty* 1998;13:816-825
11. D'Lima DD, Lemperle SM, Chen PC, Holmes RE, Colwell CW, Jr. Bone response to implant surface morphology. *J Arthroplasty* 1998;13:928-934
12. Li J, Liao H, Fartash B, Hermansson L, Johnsson T. Surface-dimpled commercially pure titanium implant and bone ingrowth. *Biomaterials* 1997;18:691-696
13. Schwartz Z, Boyan BD. Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. *J Cell Biochem* 1994;56:340-347

14. Kasemo B, Gold J. Implant surfaces and interface processes. *Adv Dent Res* 1999;13:8-20
15. Thomas KA, Kay JF, Cook SD, Jarcho M. The effect of surface macrotexture and hydroxylapatite coating on the mechanical strengths and histologic profiles of titanium implant materials. *J Biomed Mater Res* 1987;21:1395-1414
16. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 1991;25:889-902
17. Thomas KA, Cook SD. Relationship between surface characteristics and the degree of bone-implant integration. *J Biomed Mater Res* 1992;26:831-833
18. Feighan JE, Goldberg VM, Davy D, Parr JA, Stevenson S. The influence of surface-blasting on the incorporation of titanium-alloy implants in a rabbit intramedullary model. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77:1380-1395
19. Cooper LF. A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. *J Prosthet Dent* 2000;84:522-534
20. Hulbert SF, Cooke FW, Klawitter JJ, Leonard RB, Sauer BW, Moyle DD, Skinner HB. Attachment of prostheses to the musculoskeletal system by tissue ingrowth and mechanical interlocking. *J Biomed Mater Res* 1973;7:1-23
21. Sauer BW, Weinstein AM, Klawitter JJ, Hulbert SF, Leonard RB, Bagwell JG. The role of porous polymeric materials in prosthesis attachment. *J Biomed Mater Res* 1974;8:145-153
22. Roderic L. Composite biomaterials. In: Bronzino JD, editor. *The Biomedical Engineering Handbook*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1995. p. 309-314.
23. Bobyn JD, Pilliar RM, Cameron HU, Weatherly GC. The optimum pore size for the fixation of porous-surfaced metal implants by the ingrowth of bone. *Clin Orthop* 1980;263-270
24. Hulbert SF, Young FA, Mathews RS, Klawitter JJ, Talbert CD, Stelling FH. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J Biomed Mater Res* 1970;4:433-456
25. Klawitter JJ, Weinstein AM. The status of porous materials to obtain direct skeletal attachment by tissue ingrowth. *Acta Orthop Belg* 1974;40:755-765

26. Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: The spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 1994;55:273-286
27. Frost HM. Some ABC's of skeletal pathophysiology. 5. Microdamage physiology. *Calcif Tissue Int* 1991;49:229-231
28. Mittelmeier W, Grunwald I, Schafer R, Grundei H, Gradinger R. [Cementless fixation of the endoprosthesis using trabecular, 3-dimensional interconnected surface structures] *Orthopade* 1997;26:117-124
29. Lacefield WR. Materials characteristics of uncoated/ceramic-coated implant materials. *Adv Dent Res* 1999;13:21-26
30. Bergmann HW, Hartmann M. Drilling of metals with copper vapour lasers. In: Mazumder J, Mukherjee K, editors. *Laser Materials Processing IV*. Warrendale, PA: The Minerals, Metals & Materials Society, 1994. p. 33-44.
31. Stangl R, Pries A, Loos B, Müller M, Erben RG. Influence of pores created by laser superfinishing on osseointegration of titanium alloy implants. *J Biomed Mater Res* (submitted).
32. Schenk RK, Olah AJ, Herrmann W. Preparation of calcified tissues for light microscopy. In: Dickson GR, editor. *Methods of calcified tissue preparation*. Amsterdam: Elsevier, 1984. p. 1-56.
33. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 1982;11:318-326

3 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Implantaten mit verschieden strukturierter Oberfläche auf die Osseointegration über definierte Zeiträume zu untersuchen und zu quantifizieren.

3.1 Tiermodell

Wie oben schon ausführlich dargelegt, ist das Kaninchen ein etabliertes Modell bei Fragen zum osteologischen Themenkomplex. Auch die Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Traumatologie (DGOT) empfiehlt das Kaninchen als Tiermodell. Das Knochenremodeling des Kaninchens durchläuft innerhalb von 6 Wochen einen gesamten Zyklus. Diese Tatsache ist ein häufiges Argument gegen den Vergleich von Ergebnissen aus diesem Modell mit dem Menschen, da ein Remodelingzyklus beim Menschen innerhalb etwa 4 bis 5 Monaten abläuft (RIESS, 1984). Da sich aber die Unterschiede in der Knochenbildung relativ gering halten (HÖRNER et al., 1997), und beim Kaninchen nur der zeitliche Ablauf verkürzt ist, kann, unter Berücksichtigung der weiter oben ausgeführten Vor- und Nachteile, dieses Tiermodell sehr wohl als Forschungsobjekt für die Humanmedizin verwendet werden.

BRUNSKI (1999) beschreibt einen Unterschied im Beginn des Remodelings bei Kaninchen je nach Implantatsituation. So führt er auf, dass der Knochenumbau von schon bestehendem, durch die Operation verletztem Knochen, sehr bald nach der Implantation beginnt und ein Zyklus nach den ersten 6 Wochen bereits abgelaufen sein kann. Länger braucht hingegen die Entwicklung, wenn, durch eine Lücke zwischen Implantat und altem Knochen zum Beispiel, erst noch Geflechtknochen gebildet werden muss und dieser dann allmählich umgebaut wird. Dieser gesamte Vorgang dauert circa doppelt so lange, da 6 Wochen für die Bildung des Geflechtknochens veranschlagt werden müssen. Nach weiteren 6 Wochen ist bei diesem neuen Knochenanteil das Remodeling dann weitgehend abgeschlossen.

Interessant bei unserer Untersuchung ist das Vorliegen von, wenn auch in geringen Mengen, lamellären Knochenanteilen bereits nach 3 Wochen. Zu erwarten wäre, nach obigen Feststellungen, dass erst ab dem 6-Wochen-Zeitpunkt lamellärer Knochen auftaucht.

Geringe Anteile an frühem und unreifem lamellären Knochen scheinen sich bei schnellem Ablauf schon früher ausbilden zu können. Dies berichten auch GOLDBERG und JINNO (1999), die nach 22 und 32 Tagen durch Fluoreszenzmarkierung lamellären Knochen beobachteten.

Auch bei der Beschreibung der Knochenentwicklung bei Kaninchen in der Veröffentlichung von DEAN et al. (1995) ist ab der vierten Woche der Umbau von Geflechtknochen in lamellären Knochen dominierend. Somit ist das Vorkommen von lamellärem Knochen zu diesem frühen Zeitpunkt ein nicht ungewöhnlicher Vorgang.

3.2 Osseointegration

Dass die Zeit einen positiven Einfluss auf die Menge des Knochen-Implantat-Kontaktes hat, wird bereits von mehreren Autoren berichtet (CHANG et al., 1998; FEIGHAN et al., 1995; GOLDBERG und JINNO, 1999; SUZUKI et al., 1997). Auch bei dieser Studie konnte die Zunahme des Knochenkontaktes am Implantat im Verlauf des Beobachtungszeitraumes festgestellt werden. Mit zunehmendem Zeitablauf ist eine stete Vergrößerung der lamellären Anteile zu messen, die auch über den hier festgesetzten experimentellen Zeitraum hinaus weiterläuft (HUJA et al., 1999; SUZUKI et al., 1997). Andere Untersucher kamen zu dem gleichen Schluss (CHANG et al., 1994; GOLDBERG et al., 1995; KIRSCH und DONATH, 1984; TISDEL et al., 1994).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aufrauung der Oberfläche zusätzlich zu den Poren das Ausmaß der Osseointegration gegenüber den glatten Implantaten, welche nur mit Poren versehen waren, steigert. Verschiedene Untersucher kamen bereits zu dem Ergebnis, dass die Strukturierung von Implantatoberflächen einen positiven Effekt auf die Knochenbildung am Implantat hat (BUSER et al., 1991; COOPER, 2000; FEIGHAN et al., 1995; GOLDBERG und JINNO, 1999; GRÖSSNER-SCHREIBER und TUAN, 1991; LI et al., 1997; NÖTH et al., 1999). Diese Daten decken sich mit den unseren, denn auch in der vorliegenden Arbeit zeigt sich, dass die Implantate (Porengröße 200 μm) mit zusätzlich raugestrahlter Oberfläche zwar nicht anfänglich, aber nach 6 und 12 Wochen einen höheren Knochen-Implantat-Kontakt an der Oberfläche aufweisen als alle glatten Implantate der anderen Porengrößen.

Der Gesamtkontakt entwickelt sich bei den 100- μm - und 300- μm -Poren anfänglich langsamer und liegt auch später hinter dem Wert der gestrahlten 200- μm -Poren-Implantate zurück. Interessanterweise lassen sich die Unterschiede im Gesamtkontakt durch den unterschiedlichen Kontakt an der Porenzwischenfläche erklären, nicht aber durch den Kontakt in den Poren, der sich bei allen Porengrößen nicht signifikant unterscheidet.

Dass die rauen 200- μm -Poren demnach bei den Parametern Gesamtkontakt und Kontakt an der Porenzwischenfläche den restlichen Implantaten überlegen sind, deckt sich mit den Ergebnissen oben genannter Autoren, die auch eine Erhöhung des Knochen-Implantat-Kontaktes durch Aufrauung der Implantatoberfläche beobachten konnten.

Die anfänglich gleich große Kontaktfläche der beiden 200- μm -Poren-Implantate, unabhängig von der Oberfläche zwischen den Poren, bestärkt das Argument, dass anscheinend im ersten Stadium der Osseointegration der Knochen zuerst in die Poren einwächst, um das Implantat im Knochen zu verankern. Erst nachträglich breitet sich der Knochen an der weiteren Oberfläche aus, hier mit einer Präferenz für die angerauten Implantate. Für diese Theorie spricht auch, dass die Werte des Porenkontaktes zu jeder Zeit und für jedes Implantat höher waren als die des Oberflächenkontaktes.

Zu beobachten war bei dieser Untersuchung, dass die Implantate mit 300- μm -Poren, im Vergleich zu den 200- μm -Poren, in der ersten Zeit einen geringeren Knochen-Implantat-Kontakt sowohl am gesamten Implantat, als auch an der Oberfläche sowie in den Poren aufwiesen. Erst gegen Ende des Untersu-

chungszeitraumes war eine Angleichung der Werte an die der 200- μm -Poren zu erkennen. Dies deckt sich mit dem Ergebnis von BOBYN et al. (1980), die herausfanden, dass die größten Poren ihrer Untersuchung mit 400 bis 800 μm wohl zu groß waren, um eine beständige und einheitliche Porenfüllung mit Knochen zu zeigen. Sie vermuteten, dass sich diese Füllung wahrscheinlich erst nach einem längeren Zeitraum entwickeln wird, also auch hier der Knochenkontakt bei sehr großen Poren verzögert abläuft. Somit ist die Porengröße mit 200 μm in diesem Vergleich für die initiale Stabilität wohl die optimale, da sich hier gegenüber 100- μm - und 300- μm -Poren fast doppelt so schnell ein vergleichbarer Knochen-Implantat-Kontakt entwickelt.

Diese Untersuchung hat weiter gezeigt, dass die Knochenfüllung in allen Porengrößen stattfindet. Anfänglich ohne signifikanten Unterschied, lässt sich jedoch nach einiger Zeit eine bessere Porenfüllung der 200- μm - und 300- μm -Poren feststellen. Gegen Ende der Untersuchung weisen die 100- μm -Poren die signifikant niedrigsten Werte im Vergleich auf.

Bei einer Diskussion über eine optimale Porengröße bei Knochenimplantaten muss zwischen Knochenumbau im kortikalen und im trabekulären Knochen unterschieden werden. Während des Remodelings kommt es zur Ausbildung des so genannten BMU (Basic Multicellular Unit). Im kortikalen Knochen beginnt der Umbau an der Wand eines schon vorhandenen Haversschen Kanals, auch Osteon genannt. Nachdem das Remodeling abgeschlossen ist, findet sich daraufhin ein neues Osteon parallel zu dem alten. Im trabekulären Knochen jedoch ist die Struktur des BMUs komplexer und kann am ehesten mit einer Hälfte eines kortikalen BMUs verglichen werden. Der sonstige Vorgang ist wahrscheinlich identisch mit dem in der Kortikalis. Durch den spongiösen Aufbau wird der Knochen aber hier nur an der Oberfläche umgebaut. Man spricht auch von der Ausbildung von Hemi-Osteonen (PARFITT, 1994).

Zahlreiche verschiedene Porengrößen wurden auf deren Eignung bei Implantaten untersucht. Dabei zeigte sich, dass schon in kleinen Poren mit einer Größe von circa 75 μm Knochen einwächst (HULBERT et al., 1970; MARTENS et al., 1980). Andere Forscher sind jedoch der Ansicht, dass es einer Mindestporengröße von 150 bis 200 μm bedarf, um eine Ausbildung von Sekundärosteonen in den Poren zu ermöglichen (BOBYN et al., 1980; LI et al., 1997; TSURUGA et al., 1997). Es ist jedoch so, dass sich innerhalb von Poren in einem Implantat nur Hemi-Osteone bilden können, welche ein Ausdruck für das stattfindende Remodeling sind. Für die Ausbildung von Osteonen, wie sie in der gesunden Kortikalis zu finden sind, ist die Struktur der Poren nicht geeignet. Die vorangehende Studie von STANGL et al. (2004) zeigte, dass es nicht möglich war, in Poren der Größen 25 und 50 μm lamellären Knochen und demnach Remodeling vorzufinden. Bei der vorliegenden Arbeit konnte nun aber nachgewiesen werden, dass die 100- μm -Poren für das Einwachsen von Hemi-Osteonen ausreichend sind.

Knochenremodeling findet demnach in 100- μ m-Poren statt, wenn auch mit einer zeitlichen Verzögerung im Gegensatz zu den Implantaten mit den größeren Poren. Diese Zeitverzögerung im Knochenwachstum und Remodeling spricht gegen den klinischen Einsatz dieser kleinen Poren, da die initiale Stabilität von entscheidender Bedeutung für die erfolgreiche Osseointegration ist (DAVIES, 1998; ESCHENRÖDER et al., 1987; SOBALLE et al., 1990). Die in der vorliegenden Untersuchung größten Poren mit 300 μ m liefern nach längerem Beobachtungszeitraum ein besseres Remodeling mit höherem Anteil an lamellärem Knochen. Es bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten, welche Implantate langfristig gesehen die bessere Osseointegration erfahren, was also wichtiger für eine optimale Einheilung erscheint: ein anfänglich schneller Kontakt, wie er bei den 200- μ m-Poren entsteht, oder aber ein später größerer Anteil an lamellärem Knochen, wie er sich in den 300- μ m-Poren besser entwickeln kann.

Es zeigt sich, dass die Knochenformationsrate (Bone Formation Rate, BFR) in den Poren zwar nach 6 Wochen für die 100- μ m-Poren die niedrigsten Werte aufweist, sich aber nach 12 Wochen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Porengrößen und Oberflächen mehr ergeben. Die Messung der Implantatumgebung nach 12 Wochen Beobachtungszeit zeigte das gleiche Ergebnis wie in den Poren, das heißt keine signifikanten Unterschiede der einzelnen Implantate. Diese Beobachtung, dass die Oberflächenbeschaffenheit keinen signifikanten Einfluss auf die dynamischen Parameter des Knochenwachstums hat, machten in ähnlicher Weise schon andere Autoren. SUZUKI et al. (1997) untersuchten zum Beispiel die MAR (Mineral Apposition Rate) und konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen glatten und rauen Titanimplantaten im Verlauf des Beobachtungszeitraumes finden. GONDOLPH-ZINK (1998) wies nur einen Unterschied der Knochenformationsrate zwischen den von ihm untersuchten Implantationsmodellen auf. Bei dem transkortikalen Versuchsaufbau war eine hohe BFR bis zur 4. Woche zu beobachten, welche dann bis zur 12. Woche wieder abnahm. Die BFR im intramedullären Modell zeigte dagegen eine stetig zunehmende Tendenz. Die BFR ist somit wohl eher von der Lokalisation als von der entsprechenden Oberfläche der Implantate abhängig.

Dass die Werte der dynamischen Knochenwachstumsparameter nach 12 Wochen niedriger sind als die nach 6 Wochen, lässt sich einmal durch eine sinkende Knochenaktivität im Laufe der Zeit erklären, wie sie auch WISSING et al. (1990) beim Kaninchenknochen beobachten. Bei deren Untersuchung erfolgt die Knochenapposition ab der 2. Woche auf hohem Niveau und wird im Laufe der folgenden 4 Wochen deutlich (um mehr als die Hälfte) weniger. Die andere Erklärung liegt in dem Vorgang des Remodelings, bei dem die eingelagerten Fluorochrom-Farbstoffe wieder mit abgebaut werden (KNÖFLER et al., 1990).

Verschiedene Autoren untersuchten in ihren Studien auch den Einfluss der unterschiedlichen Lage der Implantate im Knochen auf die Osseointegration. FEIGHAN et al. (1995) sowie JINNO et al. (1998)

fanden dabei bei einem unbelasteten intramedullären Modell eine teilweise sogar signifikant bessere Osseointegration in der Diaphyse als in der proximalen oder distalen Metaphyse. Dies hängt wohl mit dem engen Kontakt zum Endost des Implantates in dem schmalen Abschnitt der Diaphyse zusammen, da diese Nähe das Knochenwachstum an das Implantat beschleunigt (ESCHENRÖDER et al., 1987).

Auch CHANG et al. (1994) erkannten den Zusammenhang zwischen der Lage des Implantates und der Knochenformation. Sie verglichen die osteogene Kapazität des Knochenmarkes mit der von Endost und Periost und zeigten auf, dass das Knochenmark eine initial weitaus geringere osteogene Aktivität aufweist und sich demnach der Knochen-Implantat-Kontakt bei einer Position in unmittelbarer Nähe zum Endost/Periost schneller entwickelt.

Die in unserer Untersuchung sich nicht signifikant unterscheidenden Werte zwischen der mehr distalen oder mehr proximalen Lage der transkortikalen Implantate lässt sich demnach mit der großen Nähe beider sowohl zum Endost als auch zum Periost erklären.

Eine Unterscheidung der Osseointegrationsrate je nach Lage ist demnach nur sinnvoll bei einem intramedullären Modell, da hier wirkliche Unterschiede in der Entfernung zwischen osteogen aktivem Knochengewebe (Endost/Periost) und Implantat zu erwarten ist.

3.3 Möglichkeiten für zukünftige Implantatoberflächen

Diese Studie zeigt, dass die verwendeten laserstrukturierten Implantate gute Alternativen zu anderweitig hergestellten Implantaten mit poröser Oberfläche bieten. Dabei sollte eine Mindestporengröße von 200 µm aber nicht unterschritten werden. Die zusätzliche Aufrauung der Oberfläche zwischen den Poren erweist sich als sehr positiv für eine initial schnellere Stabilität gegenüber den Implantaten mit der glatten Oberfläche.

Die spätere Überlegenheit bezüglich der Menge an lamellärem Knochen der hier größten Poren mit 300 µm lässt die Möglichkeit für weitere Forschungen offen und sollte in einer Langzeitstudie genauer untersucht werden.

Der Einfluss von Implantaten mit unterschiedlichen Porengrößen, die alle mit der kombinierten Oberflächenbehandlung angefertigt wurden, sollte hierbei ebenfalls untersucht werden. Weiterhin ist die Fragestellung interessant, inwieweit die Laser-Implantatbearbeitung im direkten Vergleich zu raugestrahlenen Implantaten ohne Poren Vorteile zeigt.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Für die orthopädische und zahnmedizinische Prothetik ist die Osseointegration von Knochenimplantaten unersetzlich, um eine langfristige Stabilität gewährleisten zu können. Um diese zu erreichen, wird eine Optimierung der Implantatoberflächen angestrebt. Hierbei kommen verschiedene Bearbeitungsmethoden zur Anwendung. Mit Hilfe der Lasertechnologie können offenporige Implantate gefertigt werden, die es dem Knochen durch Einwachsen ermöglichen, eine stabile Verbindung mit dem Implantat einzugehen.

In einem Tiermodell wurden hierzu Implantate aus Ti6Al4V mit unterschiedlichen Oberflächen untersucht. Bei 45 New-Zealand-White-Kaninchen wurden in beide Femora Titanimplantate mit vier verschiedenen Oberflächen eingesetzt. Die Poren der Implantate hatten die Größe 100, 200 und 300 μm , die Oberfläche zwischen diesen Poren war glatt poliert. Zusätzlich wurden Implantate mit 200- μm -Poren und korundgestrahlter Oberfläche verwendet.

Die Implantate wurden transkortikal in distaler und proximaler Lage im distalen Drittel der Oberschenkelknochen positioniert. Eine polychrome Fluoreszenzmarkierung wurde durchgeführt. Der Knochen-Implantat-Kontakt sowie der Anteil an neu gebildetem Knochen innerhalb der Poren wurden 3, 6 und 12 Wochen nach der Operation mittels statischer und dynamischer Histomorphometrie untersucht.

Es zeigte sich, dass das zusätzliche Aufräumen der laserbehandelten Implantate mit den 200- μm -Poren in einer starken Verbesserung der Osseointegration 12 Wochen nach Implantation resultierte. Das Einwachsen von Knochen konnte in allen Porengrößen erreicht werden. Im Vergleich zu den Implantaten mit einer Porengröße von 200 μm zeigte sich bei den Implantaten mit 300- μm -Poren eine verzögerte Osseointegration.

Auch lamellärer Knochen wurde bei jeder Implantatoberfläche gefunden, wobei das Knochenremodelling in den 100- μm -Poren, verglichen mit den größeren Poren, verzögert eintrat. Die Menge an lamellärem Knochen innerhalb der Poren war direkt proportional mit der Porengröße, die 100- μm -Poren schnitten hier demnach am schlechtesten ab.

Aus dieser Untersuchung lässt sich schließen, dass 200 μm wohl die optimale Porengröße für Ti6Al4V-Implantate mit laserstrukturierter Oberfläche ist. Weiterhin zeigt sich die Kombination von Laserstrukturierung und Raustrahlung der Oberfläche als richtungweisend für die Herstellung zukünftiger Knochenimplantate.

5 SUMMARY

***IN VIVO* ANALYSIS OF THE OSSEOINTEGRATION OF LASER-TEXTURED TITANIUM IMPLANTS**

It was the purpose of this study to examine the osseointegration of laser-textured titanium alloy (Ti6Al4V) implants with pore sizes of 100, 200, and 300 μm , specifically comparing 200- μm implants with polished and corundum-blasted surfaces in a rabbit transcortical model. Using a distal and proximal implantation site in the distal femoral cortex, each animal received all 4 different implants in both femora. The bone-implant interface and the newly formed bone tissue within the pores and in peri-implant bone tissue were examined 3, 6, and 12 weeks post-implantation by static and dynamic histomorphometry. Here we show that additional surface blasting of laser-textured Ti6Al4V implants with 200- μm pores resulted in a profound improvement in osseointegration, 12 weeks post-implantation. Although lamellar bone formation was found in pores of all sizes, the amount of lamellar bone within pores was linearly related to pore size. In 100- μm pores, bone remodeling occurred with a pronounced time lag relative to larger pores. Implants with 300- μm pores showed a delayed osseointegration compared with 200- μm pores. We conclude that 200 μm may be the optimal pore size for laser-textured Ti6Al4V implants, and that laser treatment in combination with surface blasting may be a very interesting technology for the structuring of implant surfaces.

6 LITERATURVERZEICHNIS

AERSSSENS, J., S. BOONEN, G. LOWET and J. DEQUEKER, 1998

Interspecies Differences in Bone Composition, Density and Quality: Potential Implications for in vivo Bone Research.

Endocrinology 139, No.2, 663-670

ALBREKTSSON, T. and C. JOHANSSON, 2001

Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration.

Eur Spine J 10, Suppl. 2, 96-101

BOBYN, J.D., R.M. PILLIAR, H.U. CAMERON and G.C. WEATHERLY, 1980

The Optimum Pore Size for the Fixation of Porous-Surfaced Metal Implants by the Ingrowth of Bone.

Clin Orthop 150, 263-270

BOSS, J.H., 1999

Osseointegration.

J Long Term Eff Med Implants 9 (1&2), 1-10

BRANEMARK, P.-I., 1983

Osseointegration and its experimental background.

J Prosthet Dent 50, No.3, 399-410

BROWNE, M. and P.J. GREGSON, 1994

Surface modification of titanium alloy implants.

Biomaterials 15, No.11, 894-898

BRUNSKI, J.B., 1999

In vivo bone response to biomechanical loading at the bone/dental-implant interface.

Adv Dent Res 13, 99-119

BUSER, D., R.K. SCHENK, S. STEINEMANN, J.P. FIORELLINI, C.H. FOX and H.STICH, 1991

Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants.
A histomorphometric study in miniature pigs.

J Biomed Mater Res 25, 889-902

CAMERON, H.U., R.M. PILLIAR and I. MACNAB, 1973

The effect of movement on the bonding of porous metal to bone.

J Biomed Mater Res 7, 301-311

CHANG, C.K., J.S. WU, D.L. MAO and C.X. DING, 2001

Mechanical and histological evaluations of hydroxyapatite-coated and noncoated Ti6Al4V implants in tibia bone.

J Biomed Mater Res 56, 17-23

CHANG, Y.-S., M. OKA, T. NAKAMURA and H.-O. GU, 1994

Bone remodeling around implanted ceramics.

J Biomed Mater Res 30, 117-124

CHANG, Y.-S., H.-O. GU, M. KOBAYASHI and M. OKA, 1998

Influence of Various Structure Treatments on Histological Fixation of Titanium Implants.

J Arthroplasty Vol. 13, No.7, 816-825

COOPER, L.F., 2000

A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium Endosseous implants.

J Prosthet Dent 84, No.5, 522-534

DAVIES, J.E., 1996

In Vitro Modeling of the Bone/Implant Interface.

Anat Rec 245, 426-445

DAVIES, J.E., 1998

Mechanisms of Endosseous Integration.

Int J Prosthodont 11, No.5, 391-401

DEAN, J.C., C.L. TISDEL, V.M. GOLDBERG, J. PARR, D. DAVY and S. STEVENSON, 1995

Effects of Hydroxyapatite Tricalcium Phosphate Coating and Intracancellous Placement on Bone Ingrowth in Titanium Fibermetal Implants.

J Arthroplasty 10, No.6, 830-838

D'LIMA, D.D., S.M. LEMPERLE, P.C. CHEN, R.E. HOLMES and C.W. COLWELL, 1998

Bone Response to Implant Surface Morphology.

J Arthroplasty 13, No.8, 928-934

DONATH, K., 1988

Vergleichende histologische Untersuchung verschiedener enossaler Implantattypen.

Z Zahnärztl Implantol IV, 106-108

EITEL, F., H. SEILER und L. SCHWEIBERER, 1981

Vergleichende morphologische Untersuchungen zur Übertragbarkeit
Tierexperimenteller Ergebnisse auf den Regenerationsprozeß des menschlichen
Röhrenknochens
II. Untersuchungsergebnisse

Unfallheilkunde 84, 255-264

EITEL, F., F. KLAPP, W. JACOBSON and L. SCHWEIBERER, 1981

Bone Regeneration in Animals and in Man.

Arch Orthop Traumat Surg 99, 59-64

ERICSSON, I., C.B. JOHANSSON, H. BYSTEDT and M.R. NORTON, 1994

A histomorphometric evaluation of bone-to-implant contact on machine-prepared and roughened titanium dental implants.

Clin Oral Impl Res 5, 202-206

ESCALAS, F., J. GALANTE, W. ROSTOKER and P. COOGAN, 1976

Biocompatibility of Materials for Total Joint Replacement.

J Biomed Mater Res 10, 175-195

ESCHENRÖDER, H.C., R.E. MCLAUGHLIN and S.I. REGER, 1987

Enhanced Stabilization of Porous-coated Metal Implants with Tricalcium Phosphate Granules.

Clin Orthop 216, 234-246

FEIGHAN, J.E., V.M. GOLDBERG, D.DAVY, J.A. PARR and S. STEVENSON, 1995

The Influence of Surface-Blasting on the Incorporation of Titanium-Alloy Implants in a Rabbit Intramedullary Model.

J Bone Joint Surg 77-A, No.9, 1380-1395

FRITZ, M.E., 1999

Two-stage implant systems.

Adv Dent Res 13, 162-169

GOLDBERG, V.M, S. STEVENSON, J. FEIGHAN and D. DAVY, 1995

Biology of Grit-Blasted Titanium Alloy Implants.

Clin Orthop 319, 122-129

GOLDBERG, V.M. and T. JINNO, 1999

The Bone-Implant Interface: A Dynamic Surface.

J Long Term Eff Med Implants 9 (1&2), 11-21

GONDOLPH-ZINK, B., 1998

Der Einfluß der Hydroxylapatitbeschichtung auf die Osteointegration belasteter und Unbelasteter Implantate.

Orthopäde 27, 96-104

GOTFREDSEN, K., E. ROSTRUP, E. HJÖRTING-HANSEN, K. STOLTZE and E. BUDTZ-JÖRGENSEN, 1991

Histological and histomorphometrical evaluation of tissue reactions adjacent to endosteal implants in monkeys.

Clin Oral Impl Res 2, 30-37

GRÖSSNER-SCHREIBER, B. und R.S. TUAN, 1991

Die Bedeutung der Oberfläche von Titanimplantaten im Osteointegrationsvorgang.

Dtsch Zahnärztl Z 46, 691-693

HANSSON, H.-A., T. ALBREKTSSON and P.-I. BRANEMARK, 1983

Structural aspects of the interface between tissue and titanium implants.

J Prosthet Dent 50, No.1, 108-113

HENRY, P.J., 1999

Clinical experiences with dental implants.

Adv Dent Res 13, 147-152

HÖNIG, J.F. und H.A. MERTEN, 1993

Das Göttinger Miniaturschwein (GMS) als Versuchstier in der human-medizinischen osteologischen Grundlagenforschung.

Z Zahnärztl Implantol IX, 244-254

HÖRNER, K., K. LÖFFLER und M. HOLTZMANN, 1997

Vergleich der histologischen Struktur der Kompakta der langen Röhrenknochen bei Maus, Hamster, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Katze und Hund während der Altersentwicklung.

Anat Histol Embryol 26, 289-295

HUJA, S.S., T.R. KATONA, D.B. BURR, L.P. GARETTO and W.E. ROBERTS, 1999

Microdamage Adjacent to Endosseous Implants.

Bone 25, 217-222

HULBERT, S.F., F.A. YOUNG, R.S. MATHEWS, J.J. KLAWITTER, C.D. TALBERT and F.H. STELLING, 1970

Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses.

J Biomed Mater Res 4, 433-453

INTERNATIONAL ORGANISATION FOR STANDARDISATION, 1996

Implants for surgery – Metallic materials.

Part 3: Wrought titanium 6-aluminium 4-vanadium alloy

ISO 5832-3:1996(E)

ITÄLÄ, A.I., H.O. YLÄNEN, C. EKHOLM, K.H. KARLSSON and H.T. ARO, 2001

Pore Diameter of More Than 100 µm Is Not Requisite for Bone Ingrowth in Rabbits.

J Biomed Mater Res (Appl Biomater) 58, 679-683

JINNO, T., V.M. GOLDBERG, D. DAVY and S. STEVENSON, 1998

Osseointegration of surface-blasted implants made of titanium alloy and cobalt-Chromium alloy in a rabbit intramedullary model.

J Biomed Mater Res 42, 20-29

JOHANSSON, C.B., C.H. HAN, A. WENNERBERG and T. ALBREKTSSON, 1998

A Quantitative Comparison of Machined Commercially Pure Titanium and Titanium-Aluminium-Vanadium Implants in Rabbit Bone.

Int J Oral Maxillofac Implants 13, No.3, 315-321

KASEMO, B. and J. GOLD, 1999

Implant Surfaces and Interface Processes.

Adv Dent Res 13, 8-20

KELLER, J.C., C.M. STANFORD, J.P. WIGHTMAN, R.A. DRAUGHN and R. ZAHARIAS, 1994

Characterizations of titanium implant surfaces. III.

J Biomed Mater Res 28, 939-946

KIM, T.-I., J.-H. HAN, I.-S. LEE, K.-H. LEE, M.-C. SHIN and B.-B. CHOI, 1997

New titanium alloys for biomaterials: A study of mechanical and corrosion properties and cytotoxicity.

Biomed Mater Eng 7, 253-263

KIRSCH, A. und K. DONATH, 1984

Tierexperimentelle Untersuchungen zur Bedeutung der Mikromorphologie von Titanimplantatoberflächen.

Fortschr Zahnärztl Implantol I, 35-40

KNÖFLER, W. and H.-L. GRAF, 1989

Zur Knochenreaktion auf Biomaterialien.
Komplexes Versuchsmodell zur Beschreibung der Knochenumbauvorgänge und Interfacereaktionen unter Biomaterialeinfluß.

Z Zahnärztl Implantol V, 256-262

KNÖFLER, W., H.-L. GRAF, T. GRÖSCHEL und G. LÖWICKE, 1990

Zur Knochenreaktion auf Biomaterialien.
II. Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung zur Beobachtung der initialen Knochenbildung.

Z Zahnärztl Implantol VI, 145-152

LACEFIELD, W.R., 1999

Materials characteristics of uncoated/ceramic-coated implant materials.

Adv Dent Res 13, 21-26

LARSSON, C., P. THOMSEN, J. LAUSMAA, M. RODAHL, B. KASEMO and L.E. ERICSON, 1994

Bone response to surface modified titanium implants: studies on electropolished implants with different oxide thicknesses and morphology.

Biomaterials 15, No.13, 1062-1074

LI, J., H. LIAO, B. FARTASH, L. HERMANSSON and T. JOHNSON, 1997

Surface-dimpled commercially pure titanium implant and bone ingrowth.

Biomaterials 18, No.9, 691-696

LINDER, L., 1989

Osseointegration of metallic implants.
I. Light microscopy in the rabbit.

Acta Orthop Scand 60, No.2, 129-134

LONG, M. and H.J. RACK, 1998

Titanium alloys in total joint replacement – a materials science perspective

Biomaterials 19, 1621-1639

MARTENS, M., P. DUCHEYNE, P. DE MEESTER and J.C. MULIER, 1980

Skeletal Fixation of Implants by Bone Ingrowth into Surface Pores.

Arch Orthop Traumat Surg 97, 111-116

MARX, R.E. and A.K. GARG, 1998

Bone Structure, Metabolism, and Physiology: Its Impact on Dental Implantology.

Implant Dent 7, No.4, 267-275

MASUDA, T., P.K. YLIHEIKKILÄ, D.A. FELTON and L.F. COOPER, 1998

Generalizations Regarding the Process and Phenomenon of Osseointegration.
Part I. In Vivo Studies

Int J Oral Maxillofac Implants 13, 17-29

MITTELMEIER, W., I. GRUNWALD, R. SCHÄFER, H. GRUNDEI und R. GRADINGER, 1997

Zementlose Endoprothesenverankerung mittels trabekulären, dreidimensional interkonnektierenden Oberflächenstrukturen.

Orthopäde 26, 117-124

NÖTH, U., C. HENDRICH, F. MERKLEIN, T. ALTVATER, C.P. RADER, N. SCHÜTZE, J. EULERT und R. THULL, 1999

Standardisiertes Testen von Skelett-Implantatoberflächen mit einem Osteoblasten-Zellkultursystem.

II. Titanoberflächen unterschiedlicher Rauigkeit.

Biomed Tech 44 (1-2), 6-11

PARFITT, A.M., 1994

Osteonal and Hemi-Osteonal Remodeling: The Spatial and Temporal Framework for Signal Traffic in Adult Human Bone.

J Cell Biochem 55, 273-286

RIESS, G., 1984

Osteoklastisch-osteogene Reaktionen und deren Darstellung an der Implantat-Knochengrenze.

Fortschr Zahnärztl Implantol I, 28-34

SCHENK, R.K. and D. BUSER, 1998

Osseointegration: a reality.

Periodontol 2000 17, 22-35

SCHWARTZ, Z. and B.D. BOYAN, 1994

Underlying Mechanisms at the Bone-Biomaterial Interface.

J Cell Biochem 56, 340-347

SELVIG, K.A., 1994

Discussion: Animal Models in Reconstructive Therapy.

J Periodontol 65, 1169-1172

SOBALLE, K., E.S. HANSEN, H. BROCKSTEDT-RASMUSSEN, C.M. PEDERSEN and C. BÜNGER, 1990

Hydroxyapatite coating enhances fixation of porous coated implants. A comparison in dogs between press fit and noninterference fit.

Acta Orthop Scand 61, No.4, 299-306

STANGL, R., A. PRIES, B. LOOS, M. MÜLLER and R.G. ERBEN, 2004

Influence of pores created by laser superfinishing on osseointegration of titanium alloy implants.

J Biomed Mater Res (im Druck)

STEFLIK, D.E., R.S. CORPE, F.T. LAKE, T.R. YOUNG, A.L. SISK, G.R. PARR, P.J. HANES and D.J. BERKERY, 1998

Ultrastructural analyses of the attachment (bonding) zone between bone and implanted biomaterials.

J Biomed Mater Res 39, 611-620

SUZUKI, K., K. AOKI and K. OHYA, 1997

Effects of Surface Roughness of Titanium Implants on Bone Remodeling Activity of Femur in Rabbits.

Bone 21, No.6, 507-514

THULL, R., 1993

Oberflächenmodifiziertes Titan durch Hartstoffbeschichtung als Werkstoff für endossale Zahnimplantate.

GOI Jahrbuch, 49-60

TISDEL, C.L., V.M. GOLDBERG, J.A. PARR, J.S. BENSUSAN, L.S. STAIKOFF and S. STEVENSON, 1994

The Influence of a Hydroxyapatite and Tricalcium-Phosphate Coating on Bone Growth into Titanium Fiber-Metal Implants.

J Bone Joint Surg 76-A, No.2, 159-171

TSURUGA, E., H. TAKITA, H. ITOH, Y. WAKISAKA and Y. KUBOKI, 1997

Pore Size of Porous Hydroxyapatite as the Cell-Substratum Controls BMP-Induced Osteogenesis.

J Biomech 121, 317-324

WISSING, H., K.M. STÜRMER und G. BREIDENSTEIN, 1990

Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspecies für experimentelle Untersuchungen am Knochen.

Unfallheilkunde 212, 479-488

7 DANKSAGUNG

Für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung und Unterstützung gilt mein besonderer Dank Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Reinhold G. Erben.

Bei Priv.-Doz. Dr. med. Richard Stangl und Dr. Marcus Müller bedanke ich mich für ihre freundliche Unterstützung, welche diese Form der Dissertation erst möglich gemacht hat.

Mein großer Dank für ihre Hilfsbereitschaft gilt auch Frau Claudia Bergow, Frau Sieglinde Lutz, Frau Karin Begsteiger und Frau Dr. Karin Weber sowie allen übrigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Erben.

Für ihre liebe Unterstützung und stete Aufmunterung bedanke ich mich sehr herzlich bei meiner Freundin Nina Unger.

Weiterhin großartig unterstützt und aufgebaut haben mich Frau Ingrid Ohr, Frau Dr. Dagmar Brunner, Frau Christiane Prokop und Frau Claudia Vaas, denen ich an dieser Stelle ganz herzlich für ihre Energie danken möchte!

Markus möchte ich ganz besonders danken für seine unermüdliche Geduld, die organisatorische Hilfe sowie vor allem für seine liebevolle Unterstützung, mit deren Hilfe ich dies alles schaffen konnte!

Mein größter Dank für ihre unendliche Aufbauarbeit und für ihre Liebe gilt meiner Mama und Reiner, die mir diesen Werdegang erst ermöglichten.

8 LEBENSLAUF

Heike Elisabeth Götz

Geboren am 13.05.1976 in Nürnberg

Vater: Ekkehard Götz, Speditionskaufmann, verstorben 1992

Mutter: Gertraud Götz, geb. Liepert, Großhandelskauffrau

Geschwister: Holger Götz, Masseur und medizinischer Bademeister

Schulbildung:

1982-1986 Grundschule Zirndorf

1986-1995 Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium Oberasbach

30.06.1995 Abitur

Studium:

1995-2001 Ludwig-Maximilians-Universität München

11.09.2001 Abschluss der Tierärztlichen Prüfungen

22.10.2001 Approbation

Dissertation:

Seit März 2002 Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der LMU München, Arbeitsgruppe Erben

Berufstätigkeit:

Seit September 2003 Assistenz in der Kleintierklinik Dr. Bernd Lukas, Amberg