

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik – Groshadern
der Ludwig-Maximilian-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dipl. -Ing. V. Jansson

**Verteilung von Abriebpartikeln von
Titan und Stahl in verschiedene Organe
Eine vergleichende in-vivo Studie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von
Nadine Unterer, geb. Villinger
aus Konstanz

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. habil. Dr. Ing. W. Plitz
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Dr. h.c. W. Gernet Prof. Dr. M. Graw
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Ing. M.A. Wimmer
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	13.12.2007

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG	1
2 PROBLEMSTELLUNG	3
3 STAND DES WISSENS.....	4
3.1 Gängige Implantatmaterialien.....	4
3.1.1 Edelstahl.....	5
3.1.2 Titan	5
3.2 Auswirkungen von Abriebpartikeln.....	7
3.2.1 Lokale Reaktion	7
3.2.2 Verteilung im Körper	11
4 MATERIAL UND METHODEN	13
4.1 Titan und Stahlpartikel	13
4.1.1 Herstellung der Partikel.....	13
4.1.2 Charakterisierung der Partikel.....	15
4.1.3 Vorbereitung der zu implantierenden Partikel	18
4.2 Operative Methodik.....	20
4.2.1 Das Tiermodell.....	20
4.2.2 Anzahl der operierten Kaninchen.....	21
4.2.3 Operationsverfahren.....	24
4.2.4 Euthanasie und Explantation der Organe und Knochen	28
4.3 Quantitative Titan- und Stahlanalyse in den Organen.....	29
4.3.1 ICP-MS Titan und Stahl.....	29
4.4 Histologische Methodik	30
4.4.1 Probenpräparation	30
4.4.2 Lichtmikroskopie	32
4.4.3 Rasterelektronenmikroskopie Titan	33
5 ERGEBNISSE	35
5.1 Charakterisierung der Abriebpartikel.....	35
5.1.1 Charakterisierung mittels Elektronenmikroskopie	35
5.1.2 Röntgendiffraktometrie	41
5.1.3 Chemische Analyse.....	41
5.2 Quantitative Titan- und Stahlanalyse in den Organen.....	43
5.2.1 Titan in den Organen.....	43
5.2.2 Rostfreier Stahl in den Organen	44
5.3 Histologische Auswertung	48
5.3.1 Lichtmikroskopie	48
5.3.2 Rasterelektronenmikroskopie.....	66
5.3.3 EDX-Analyse der Partikel im Bohrloch.....	66
6 DISKUSSION	68
6.1 Abriebpartikel	68
6.2 Implantatmaterialien	70
6.3 Lokale Reaktion	73
6.4 Verteilung im Körper	75
6.5 Transportwege der Partikel	79
6.6 Kritik.....	79

7	ZUSAMMENFASSUNG	81
8	LITERATURVERZEICHNIS	83
9	DANKSAGUNG	94
10	CURRICULUM VITAE	95

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
BSE-mode	backscattered mode (Rückstreuverfahren)
C	Kohlenstoff
cpTi	commercially pure Titanium
Cr	Chrom
Cu	Kupfer
ECD	Equal Circle Diameter
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDX	energiedispersive Röntgenanalyse
Fe	Eisen
H	Wasserstoff
HF	Flusssäure
HNO ₃	Salpetersäure
ICP-MS	inductively coupled plasma-mass spectroscopy
ICP-OES	Optische Emmisionspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
kV	Kilo-Volt
mA	Milliampere
MMA	Methylmetacrylat
Mn	Mangan
Mo	Molybdän
N	Stickstoff
NaCl-Lösung	Natrium-Chlorid-Lösung 0,9%
Ni	Nickel
O ₂	Sauerstoff
P	Phosphat
REM	Rasterelektronenmikroskop
S	Schwefel
SE-mode	secondary electrons
Si	Silicium
SST	stainless steel, rostfreier Stahl
TAN	Titan-Aluminium-Niobium
TNF- α	Tumornekrosefaktor α

1 EINLEITUNG

Die operative Versorgung von Frakturen mittels Osteosynthese und der Ersatz von degenerierten Gelenken mittels Endoprothesen sind heutzutage Standardverfahren in der Unfallchirurgie. Eine Vielzahl von verschiedenen Osteosynthesemöglichkeiten (z.B. Schrauben, verschiedene Platten, intramedulläre Nägel, dynamische Hüftschrauben, Gammanägel usw.) je nach Indikationsbereich stehen dabei zur Verfügung. Ein Teil der Implantate werden nach einiger Zeit wieder entfernt, andere verbleiben ein Leben lang im Körper. Dies setzt hohe Ansprüche an das verwendete Material voraus. So müssen die verwendeten Materialien eine hohe Biokompatibilität und Korrosionsresistenz aufweisen.

Ein weiterer entscheidender Faktor für die dauerhafte mechanische Haltbarkeit und Funktion von Implantaten liegt in ihrer Gewebeverträglichkeit. Bislang konnte noch kein biologisch inertes Implantatmaterial gefunden werden, welches ohne lokale Gewebereaktion implantiert werden kann (GALANTE et al 1991, MERRIT und BROWN 1996). Die Umgebungsreaktion kann, je nach Material und Beschaffenheit des Implantates, schwach und temporär sein, jedoch auch so stark sein, dass es zu Gewebeveränderungen bis hin zu Nekrosen und einer damit verbundenen Implantatlockerung kommen kann (MERRIT und BROWN 1996, DORAN et al 1998). Besonders rasch kann es zu einer aseptischen Implantatlockerung kommen, wenn durch mechanische Beanspruchung und Korrosion große Mengen an Abriebpartikeln entstehen. Aus diesem Grund soll in dieser Studie die Auswirkung von Abrieb auf das implantatumgebende Gewebe untersucht werden. Hierzu sollen die am weitesten verbreiteten Implantatmaterialien in der Knochenchirurgie, Titan und Edelstahl, verglichen werden.

Neben der lokalen Reaktion spielt auch die Verteilung im Körper eine immer größer werdende Rolle. Schon 1994 wurde von *Urban et al* die Verteilung von Abriebpartikeln im Körper beschrieben. Er ging davon aus, dass einerseits Partikel in die Lymphknoten und in die Organe des retikuloendothelialen Systems transportiert werden können. Andererseits können aber auch lösliche Produkte der Partikel in ionaler Form im ganzen

Körper verteilt werden. In anderen Studien konnten Abriebpartikel post mortem in der Milz, in der Leber und in den Lymphknoten bei Patienten mit einer Hüftendoprothese nachgewiesen werden (LANGKAMER et al 1992, URBAN et al 2000). Bisher gab es noch kein Modell, das die Verteilung von Partikeln im Körper unter standardisierten Bedingungen zu untersuchen vermag. Unsere Intention war es, ein Modell hierfür zu etablieren und die Verteilung im Körper unter gleich bleibenden Bedingungen zu untersuchen. Auch sind die Langzeitauswirkungen der Verteilung nur unzureichend untersucht.

2 PROBLEMSTELLUNG

Die Hypothese dieser Studie besteht darin, dass Abriebpartikel einerseits eine lokale inflammatorische Reaktion hervorrufen und andererseits im Körper verteilt werden und sich je nach Material in verschiedenen Organen ablagern. Außerdem gingen wir davon aus, dass Stahlabrieb eine größere lokale entzündliche Reaktion erzeugt als Titanabrieb.

Das Ziel dieser Studie bestand demnach darin, ein Tiermodell zu etablieren und folgenden Fragen unter standardisierten Bedingungen nachzugehen:

- Wie sieht die lokale zelluläre Reaktion bei Titan und Stahl aus?
- Werden die Partikel im Körper verteilt und in welchen Organen lagern sich die Partikel ab?
- Wie werden sie dorthin transportiert?
- Entsteht in den Zielorganen eine entzündliche Reaktion?

Um diese Fragen zu beantworten, wählten wir ein Kaninchenmodell und applizierten die Partikel in ein unverschlossenes Bohrloch, um die Situation wie sie bei der Osteosynthese entsteht, zu simulieren.

3 STAND DES WISSENS

3.1 Gängige Implantatmaterialien

Bis dato besitzen lediglich metallische Werkstoffe die statische Zugfestigkeit und Dauerfestigkeit, die von den hoch beanspruchten internen Implantaten gefordert werden. Die zusätzliche Forderung hoher Beständigkeit gegenüber Korrosion und Korrosionsermüdung beschränkt die Auswahl der Metalle und Legierungen auf rostfreien Stahl für chirurgische Anwendungen, Kobalt-Chrom-Guß-Legierungen, Chrom-Nickel-Legierungen, Titan und Titanlegierungen mit Aluminium und Vanadium.

Polymere sind Werkstoffe, die bei hohen Belastungen nicht eingesetzt werden können. Polyethylen mit hohem Molekulargewicht (Ultrahochmolekulares Niederdruckpolyethylen – UHMWPE) hat sich als das bisher geeignetste Polymer herausgestellt und wird nun weitestgehend für die tribologisch beanspruchten Komponenten bei totalem endoprothetischem Gelenkersatz verwendet. Sofern die mechanischen Eigenschaften der Polymere betroffen sind, besteht das Hauptproblem bei ihrer Verwendung als lastaufnehmende Werkstoffe im Körper, in ihrer chemischen Strukturveränderung im Verlauf der Zeit (Degradation).

Keramische Werkstoffe sind außerordentlich spröde und können deswegen nur dann eingesetzt werden, wenn sie keiner Zugbeanspruchung unterworfen sind. Sie halten jedoch sehr hohe Druckbelastung aus, sind besonders hart und im allgemeinen chemisch beständig.

Die Liste der weiteren Biomaterialien, zu denen auch seit neuerem die bioresorbierbaren Implantate zählen, ist umfangreich und würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Da sich diese Studie letztlich nur mit metallischen Werkstoffen beschäftigt, wird im folgenden auf die zwei in der Knochenchirurgie am häufigsten verwendeten und von uns untersuchten Implantatmaterialien, rostfreier Stahl und Titan, eingegangen.

3.1.1 Edelstahl

Edelstahl wurde 1904 durch *Leon Guillet* entdeckt. Erstmals wurde er als Implantatmaterial 1926 durch *Strauss* patentiert, mit dem Hinweis, dass nun ein Metall gefunden sei, das durch seine niedrige Korrosionsrate in den Körper implantiert werden könne. Edelstahl (stainless steel), in der Regel SSt 316L, ist inzwischen das wohl am weitesten verbreitete Implantatmaterial für temporäre Implantate aufgrund seiner hohen mechanischen Belastbarkeit, der hohen Beständigkeit in einer korrosiven Umgebung, der guten Bearbeitungseigenschaften und der relativ kostengünstigen Herstellung (DISEGI und ESCHBACH 2000). Der Widerstand gegen Korrosion beruht auf einer extrem dünnen Passivschicht, die sich spontan auf der Oberfläche ausbildet und reich an Chromoxyd und Oxyhydroxy ist (WILLIAMS 1990, MULLER et al 1993). Nickel ist ein weit verbreiteter Legierungsbestandteil in metallischen Knochenimplantaten und sorgt dafür, dass der rostfreie Edelstahl korrosionsbeständiger und unmagnetisch wird.

Dennoch wird über Korrosionsprobleme bei diesem Implantatmaterial berichtet, was vermutlich auf dem Zusammenbrechen des passiven Oxidfilms beruht (WILLIAMS 1976, BLACK et al 1983). Edelstahlimplantate für den Gebrauch in der Knochenchirurgie enthalten zwischen 4 und 17% Nickel, wobei Nickel vor allem für sein allergisches Potential bekannt ist. Angesichts zunehmender Nickelallergien spielt dies eine zunehmend größere Rolle.

Stahl verfügt über eine akzeptable Biokompatibilität, ausgezeichnete physikalische Eigenschaften und kann in einer Vielzahl von Formen (Draht, Schrauben und Implantate) angeboten werden. Ein Nachteil von Stahl ist seine Korrosionstendenz unter physiologischen Bedingungen, die zur Freisetzung von Metallionen, vor allem Nickel und Chrom in das umgebende Gewebe führt (SCHMIDT et al 2000). Diese Ionen sind für ihre nachteiligen Gewebereaktionen bekannt, die im ungünstigsten Fall zum Implantatversagen führen können.

3.1.2 Titan

Titan ist das neunthäufigste Element und am vierthäufigsten in der Erdkruste vertreten. Seit nunmehr fast 50 Jahren ist es als Rohstoff im Bereich der Biomaterialien nicht mehr wegzudenken (LEVENTHAL 1951). Für den Gebrauch als Knochenimplantate

unterscheidet man zwischen dem kommerziell reinen Produkt, commercially pure Titan, c.p.Ti (Grad 1-4, je nach O₂-Gehalt) und verschiedenen Legierungen, wovon die bekannteste TAN (Titan –Aluminium 6%-Niobium 7%; ISO 5832-11) ist und sich seit ca. 1986 im Einsatz befindet (SEMLITSCH et al 1985).

In erster Linie unterscheiden sich die beiden oben genannten Metalle, neben der chemischen Komposition, hinsichtlich ihrer Festigkeit. Während Titan Grad 1 bei 240MPa maximal aufgebracht Zugkraft versagt, liegt Titan Grad 4 bei 550MPa und TAN bei ca. 860 MPa. Zum Vergleich versagt gängiger Edelstahl in Implantatqualität (316L) bei 480MPa. Dennoch bleibt Titan in der intraoperativen Handhabung wegen der geringeren Duktilität etwas heikler, da im Gegensatz zum rostfreien Stahl die Schwelle zum iatrogenen induzierten Materialbruch häufiger schnell erreicht ist, als der unerfahrene Operateur vermutet (DISEGI und ESCHBACH 2000).

Aufgrund der niedrigeren Dichte (Ti 4,51g/cc versus SSt (316L) 7,95g/cc) und der damit einhergehenden Gewichtsersparnis sowie auch des günstigeren Elastizitätsmoduls erfreut sich das Metall zunehmender Beliebtheit in der Knochenchirurgie. Hinzu kommt ein sehr hohes Maß an Biokompatibilität, was in vielfachen klinischen und experimentellen Studien nachgewiesen werden konnte (ARENS et al 1996 und 1999, WILLIAMS 1994, PAN et al 1997, HIERHOLZER und HIERHOLZER 1991). Obwohl Titan, was das elektrochemische Gefälle angeht, keineswegs als hochwertiges Metall eingestuft werden kann (es hat theoretisch eine recht hohe Bereitschaft mit seiner Umgebung zu reagieren), besitzt es dennoch exzellente gewebeverträgliche Eigenschaften, weil es sofort an seiner Oberfläche oxidiert. Hierdurch kommt es zur Bildung eines sehr widerstandsfähigen Titanoxidfilms (Passivierungsschicht), der sich auch nach einer eventuellen Zerstörung z.B. durch Abriebpartikel sofort wieder ausbildet, sofern ausreichend Sauerstoff vorhanden ist (SCHMIDT et al 2000). Dies verlangsamt zum einen die Korrosion des Metalls deutlich und zum anderen schützt es das Metall gegen aggressive körpereigene Flüssigkeiten (FRAKER 1983 und 1987, PAN et al 1997). Zur Zeit gilt Reintitan bzw. die hochwertigen Titanlegierungen als der „**Gold-Standard**“ bei metallischen osteosynthetischen Implantaten, mit attestierter hoher Biokompatibilität (WILLIAMS 1981, KRAFT et al 2000 und 2003, POHLER 2000), Korrosionsresistenz (SOLAR 1979) und guter Osseointegration bei direkter

Haftung an der Knochen-Implantat-Grenze (ALBREKTSSON 1984). Die Entfernung eines temporären Titanimplantates kann erhebliche Schwierigkeiten bereiten.

3.2 Auswirkungen von Abriebpartikeln

3.2.1 Lokale Reaktion

In Zusammenhang mit der Endoprothetik ist schon seit längerem bekannt, dass im Bereich der Implantate Abriebpartikel durch die verschiedenen Gleitpaarungen entstehen können. Diese Partikel haben einen negativen Einfluss auf das periimplantäre Gewebe, indem sie hier eine chronische aseptische Entzündungsreaktion initiieren, die dann schlussendlich zur Implantatlockerung führen kann.

Auch im Bereich von Osteosynthesen können Partikel generiert werden, z.B. schon initial beim Einbringen der Schrauben in die Platte, wenn die Schrauben am Rand des Plattenlochs entlang reiben. Auch während der Dauer der Implantation der Platte, die ständig biomechanischen Kräften und biologischen Prozessen ausgesetzt ist, entstehen erhebliche Mengen an Korrosionsprodukten. Über die genauen Auswirkungen und Ausbreitungsmechanismen der generierten Partikel wird immer noch geforscht. Seit einiger Zeit existieren erste Berichte über osteolytische Veränderungen im Zusammenhang mit Osteosyntheseverfahren (JACOBS et al 1999). Dabei wurde postuliert, dass die metallischen Implantate verschiedenen Fretting- und Korrosionsprozessen bei Metall-Metall-Kontakten ausgesetzt sind, wobei korrodierte Metallpartikel entstehen können. Dieser Abrieb kann anschließend eine Reihe von inflammatorischen Vorgängen induzieren, die weiter zum Knochenabbau und letztlich zu einem Implantatversagen aufgrund von aseptischer Lockerung oder sogar zu einem durch Korrosion bedingten Plattenbruch führen können (MORELAND 1988, GLANT und JACOBS 1994, JACOBS et al 1998, CHEN et al 1999, VERMES et al 2001).



Abb. 3.1: Korrodiertes Schraubenloch mit Kratzspuren des Schraubenkopfes

Bekannt ist auch, dass sich Abriebpartikel um das Implantat ablagern (AGINS et al 1988, BLACK et al 1990, DORR et al 1990, JACOBS et al 1991, CASE et al 1994, JACOBS et al 1995, SUN et al 1997, JACOBS et al 1998). *Charnley und Halley* bemerkten schon 1975, dass diese Partikel nicht biologisch inert sind und wahrscheinlich klinische Auswirkungen besitzen. Seitdem zeigte eine Reihe von Studien, dass die Gewebereaktionen direkt mit den Korrosions- und Abriebprodukten der metallischen Implantate in Verbindung stehen (WILLIAMS et al 1974, WINTER 1974 und 1976, RAE 1975, URBAN et al 1994, JACOBS et al 1998, CHEN et al 1999). Es ist inzwischen gut dokumentiert, dass von Implantatkomponenten generierte Partikel imstande sind, Entzündungs- und Immunabwehrzellen zu aktivieren, die weiterführend eine chronische Entzündungsreaktion hervorrufen können. Intraoperative Funde von fibröser Verkapselung an der Knochen-Implantat-Grenze nach Osteosynthese, sowie histologisch gesicherte Fremdkörperreaktionen unterstreichen diese Beobachtungen (WILLERT et al 1974, WILLERT 1977, HARRIS et al 1976, GOLDRING et al 1983, HOWIE 1990, GALANTE et al 1991, WITT und SWANN 1991, YAO et al 1999).



Abb. 3.2: Durch Abrieb verändertes Gewebe nach Entfernung einer Osteosyntheseplatte

Abriebpartikel veranlassen in Monozyten/Makrophagen, Lymphozyten, Synoviazellen und Fibroblasten eine Freisetzung von Mediatoren, die eine Entzündungsreaktion hervorrufen können (KOHILAS et al 1999). In Verbindung mit diesen biologischen Reaktionen auf Metallabrieb ist der Körper durch Enzyme und Entzündungsmediatoren imstande, vermehrt Knochen abzubauen. Solche Mediatoren, wie z.B. Prostaglandin E₂ (PGE₂), Interleukin-1 (IL-1), Metalloproteinasen, Osteoklasten aktivierender Faktor, Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) und Kollagenasen konnte man mit Implantatlockerungen in Verbindung bringen (GOLDRING et al 1983, MURRAY und RUSHTON 1990, MURRAY et al 1992, AMSTUTZ et al 1992, GLANT und JACOBS 1994, CHEN et al 1999). Man erkannte, dass die chronische Reaktion des Körpers von der Art, der Größe und der Anzahl der Abriebpartikel (LEE et al 1992, CHEN et al 1999, DOORN et al 1999), der Expositionsdauer (WILLERT 1977, HOWIE 1990) und der Oberflächenbeschaffenheit (WITT und SWANN 1991) der Partikel abhängig ist.

Von weitaus größerem Interesse ist die lokale Reaktion der Abriebpartikel auf das umgebende Weichteilgewebe, wenn man sich vor Augen hält, dass die Ernährung der Knochen von der Unversehrtheit des umgebenden Weichteilgewebes abhängt. Eine Schädigung dieses Gewebes kann somit tief greifende Konsequenzen für das knöcherne Gewebe haben. Auf diese Weise können Knochennekrosen eher entstehen und in Fällen, bei denen Implantate eingesetzt werden, die ossäre Integration behindert oder frühzeitige Implantatlockerungen gefördert werden.

Schematischer Ablauf der Abriebkaskade (ELKE 2001):

- Akkumulation von Partikeln im Gewebe
- Makrophageninfiltration und Partikelphagozytose
- Granulombildung
- Freisetzung von Mediatoren, die die Knochenresorption induzieren
- Osteoklastenaktivierung
- Osteolyse

Platten, die zu Osteosyntheszwecken eingebracht werden, können von einer dicken Knochenschicht bedeckt werden, die die Entfernung des Implantats häufig sehr schwierig gestaltet. Andererseits kann sich um die Osteosyntheseplatte auch eine fibröse Kapsel ausbilden (GALANTE und ROSTOKER 1972, RÜEDI et al 1975), die die Platte vom umgebenden Bindegewebe separiert. Diese Entzündungskapsel enthält dann ein schleimig-visköses Sekret, das sich aber als steril erweist. Es handelt sich also um eine aseptische Entzündungsreaktion (WILLERT et al 1978). Für die Entstehung dieses Kapselgewebes kommen mehrere Mechanismen in Betracht, die noch nicht abschließend geklärt sind, entweder durch die andauernde Bewegung zwischen Implantat und umgebendem Gewebe, durch das lokale biologische Milieu oder durch Produkte, die durch das Implantat selbst entstehen.

Makrophagen gelten als Schlüsselzellen in Bezug auf die Osteolyse, die daraus resultiert, dass die aktivierten Makrophagen vermehrt knochenresorbierende Faktoren sezernieren. Diese Zellen phagozytieren die kleinen Partikel ($< 5 \mu\text{m}$) ohne sie aber abbauen zu können. Durch zelluläre und biochemische Signalmechanismen werden sie dann zur Akkumulation, Proliferation und zur vermehrten Bildung von knochenresorbierenden Faktoren wie z.B. Prostaglandin E_2 , $\text{TNF-}\alpha$, Interleukin-1 und -6, angeregt. Diese Faktoren spielen eine große Rolle bei der Differenzierung, Reifung und Aktivierung von Osteoklasten und der damit verbundenen Knochenresorption (AMSTUTZ et al 1992, BASLÉ et al 1996). Andere Studien haben darüber hinaus gezeigt, dass die Partikel auch die Osteoblastenfunktion und damit die Knochenneubildung hemmen (TSUTSUI et al 1999).

In einer 2003 veröffentlichten Studie von *Kraft et al* konnte gezeigt werden, dass Abriebpartikel eine ausgeprägte lokale entzündliche Reaktion hervorrufen können, die im Falle von rostfreiem Stahl zu einem Zusammenbruch der Mikrozirkulation der Muskulatur führte. Im Gegensatz hierzu lösten Titanpartikel nur eine diskrete inflammatorische Reaktion aus. Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate anderer Studien, dass Titan eine bessere Biokompatibilität aufweist als rostfreier Stahl.

In-vitro und in-vivo Studien haben gezeigt, dass die zelluläre Reaktion durch die Größe, chemische Zusammensetzung, Form und Anzahl der Partikel determiniert ist. So spielt vor allem die Größe der Partikel eine entscheidende Rolle für die verschiedenen Zellen, die in die Phagozytose involviert sind. Sehr große Partikel ($>100\mu\text{m}$) werden von Fremdkörperriesenzellen umschlossen, ohne phagozytiert werden zu können. Die sehr kleinen, auch die, die im Lichtmikroskop nicht darstellbar sind, werden von Makrophagen aufgenommen und lösen dann eine physiologische Reaktion (= Aktivierung) aus, bei der die Zellen größer werden und eine Vielzahl von entzündungsfördernden, osteolytischen Faktoren sezernieren (AMSTUTZ et al 1992).

3.2.2 Verteilung im Körper

Nachdem schon seit längerem bekannt ist, dass Abriebpartikel im implantatungebenden Gewebe eine Entzündungsreaktion hervorrufen können, wurde in den vergangenen Jahren vermehrt Augenmerk auf die systemischen Auswirkungen dieser Partikel gelegt.

Hypersensibilität

Nickel- und Chromionen sind bekannt dafür, eine Hypersensibilität im Körper auszulösen. Die häufigste Form der Sensibilisierung stellt die Kontaktdermatitis dar. Hier kommt der Körper, vor allem die Haut, mit korrodierten Metallen in Berührung. Dies führt zu einer T-Zell vermittelten Reaktion. Diese Reaktion ist in der Bevölkerung weit verbreitet, so geht man davon aus, dass ca. 15% der Bevölkerung auf Nickel und 8% auf Chrom allergisch reagieren. Es gibt in der Literatur eine Vielzahl von Berichten über eine Hypersensibilität auf metallische Implantate, vor allem aus Stahl, die wieder zurückgeht, sobald die Implantate entfernt wurden (MERRIT und BROWN 1996). Die

Anzahl der Patienten mit einer Überempfindlichkeitsreaktion war bei Implantatversagen deutlich höher als bei Patienten mit gut funktionierendem Implantat.

Malignität

Es ist sehr gut bekannt, dass Chrom, vor allem die Inhalation von Chromdämpfen ein kanzerogenes Potential und hexavalente Chromionen ein mutagenes Potential besitzen. Auch Nickel in bestimmten Formen, vor allem Nickelsulfide und Nickelkohlenstoffe ist als krebsauslösend bekannt (MERRIT und BROWN 1996).

Transportwege

Durch die Korrosion der Metalle, vor allem von Stahl und die Freisetzung von Nickel und Chrom in ionaler Form kann es zu einer Verteilung der Metallionen im Körper kommen. Nickel wird aus dem periimplantären Gewebe schnell abtransportiert und kann dann über den Urin ausgeschieden werden. So konnten bei Patienten mit Implantaten aus Stahl erhöhte Nickelkonzentrationen im Urin nachgewiesen werden. Dahingegen kann Chrom nicht so schnell über die Niere ausgeschieden werden. Dies führt zu einer Akkumulation von Chrom im Gewebe und in den Erythrozyten (MERRIT und BROWN 1996). Nickel- und Chromionen können an Proteine, vor allem Albumin binden und so im ganzen Körper verteilt werden. Da Albumin das häufigste Protein im Körper ist, stellt dies ein wichtiger Transportmechanismus dar. Die Bindung der Ionen ist reversibel, so dass die Ionen im gesamten Körper abgelagert werden können, so zum Beispiel in der Niere. Anschließend können die Metallionen dann mit dem Urin ausgeschieden werden (MERRIT und BROWN 1996).

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Titan und Stahlpartikel

4.1.1 Herstellung der Partikel

Für unsere Versuche verwendeten wir reines kommerzielles Titan (CP) und rostfreien Stahl (SSt), zwei der heute am meisten verbreiteten Implantatmaterialien für die Plattenosteosynthese. Ihre genaue Zusammensetzung und Reinheit wird gemäß ISO 5832-1 und ISO 5832-2 definiert und ist in folgender Tabelle dargestellt (Tabelle 4.1).

Chemische Anforderungen (in %)*

Element	Edelstahl 316L ISO 5832-1 CompD	Reintitan ISO 5832-2 Grad4
C	0,03	0,1
Mn	2	0
P	0,025	0
S	0,01	0
Si	1	0
Cr	17,0-19,0 ^A	0
Ni	13,0-15,0 ^A	0
Mo	2,25-3,5 ^A	0
N	0,1	0,05
Cu	0,5	0
Fe	Rest	0,5
O	0	0,4
H	0	0,125
Ti	0	Rest

*Maximum, bis auf Ausnahmen $A \%Cr + 3,3 \times \%Mo > 26$

Tabelle 4.1: Vergleich der chemischen Zusammensetzung zwischen regulärem Edelstahl und Titan von Implantatqualität

Zur Partikelherstellung kam eine Methode zum Einsatz, die zum ersten Mal bei *Ap. Gwynn und Ch. Wilson* 2001 beschrieben wurde.

Durch die taumelnde Bewegung des Rührfisches im Becherglas werden die Gleitwege zwischen Schraube und Metallplatte imitiert. Der Prozess kommt deshalb Fretting sehr nahe. Bei letzterem sind die Gleitamplituden $<100\mu\text{m}$. Der erzeugte Abrieb wird durch den stattfindenden Mischprozess an das Lösungsmedium abgegeben.

Titanabrieb

Die Partikel wurden hierfür in-vitro in einem Becherglas durch die Reibung von drei Titanschrauben, die in einen teflonbeschichteten Rührfisch (Abb. 4.1, links) eingeschraubt sind, auf einer Titanplatte erzeugt, die am Boden des Becherglases befestigt ist. Dieses Reibungssystem ist in einem mit Ringer-Laktat befüllten Becherglas angeordnet, das auf einem Magnetrührer platziert wurde (Abb. 4.1, rechts). Dadurch entsteht ein Reibungsprozess (unidirektional), bei dem die Schrauben über die Metallplatte gleiten und Abrieb erzeugen, der dann an die Lösung abgegeben wird. Die gesamte Herstellungsdauer beträgt bei Titan ca. vier Wochen, wobei alle drei bis fünf Tage die Ringer-Laktat-Lösung gewechselt wurde. Die Partikel wurden durch Zentrifugation und anschließende Trocknung (bei 50°C) gewonnen.



Abb. 4.1: Rührfisch mit Schrauben (links), Magnetprüher mit Becherglas (rechts)

Stahlabrieb

Die Herstellung der Stahlpartikel durch die Reibung von Schrauben auf einer Stahlplatte wurde nach dem gleichen, oben beschriebenen Schema durchgeführt. Bei den Stahlpartikeln dauerte die Herstellung etwas länger (ca. 6-8 Wochen), da Stahl im Vergleich zu Titan bessere Frettingeigenschaften besitzt und deshalb nicht so schnell so viel Abrieb entsteht.



Abb. 4.2: Titan- und Stahlpartikel nach der Herstellung

4.1.2 Charakterisierung der Partikel

4.1.2.1 Charakterisierung mittels Elektronenmikroskopie

Um Form und Größe der so erzeugten Titan- und Stahlpartikel zu ermitteln und sie mit den in der Literatur beschriebenen in-vivo entstandenen Partikeln zu vergleichen wurde ebenfalls eine Methode von *Ap Gwynn und Wilson 2001* angewendet. Der Ablauf des Verfahrens wird in Abbildung 4.3 schematisch dargestellt.

Es wurden von den Titan- und Stahlpartikeln jeweils 50 Bilder mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) im Rückstreuverfahren (BSE-mode) mit einer Beschleunigungsspannung von 5 kV aufgenommen, die dann anschließend mit Hilfe einer Analyse-Software (PC-Image) ausgewertet wurden.

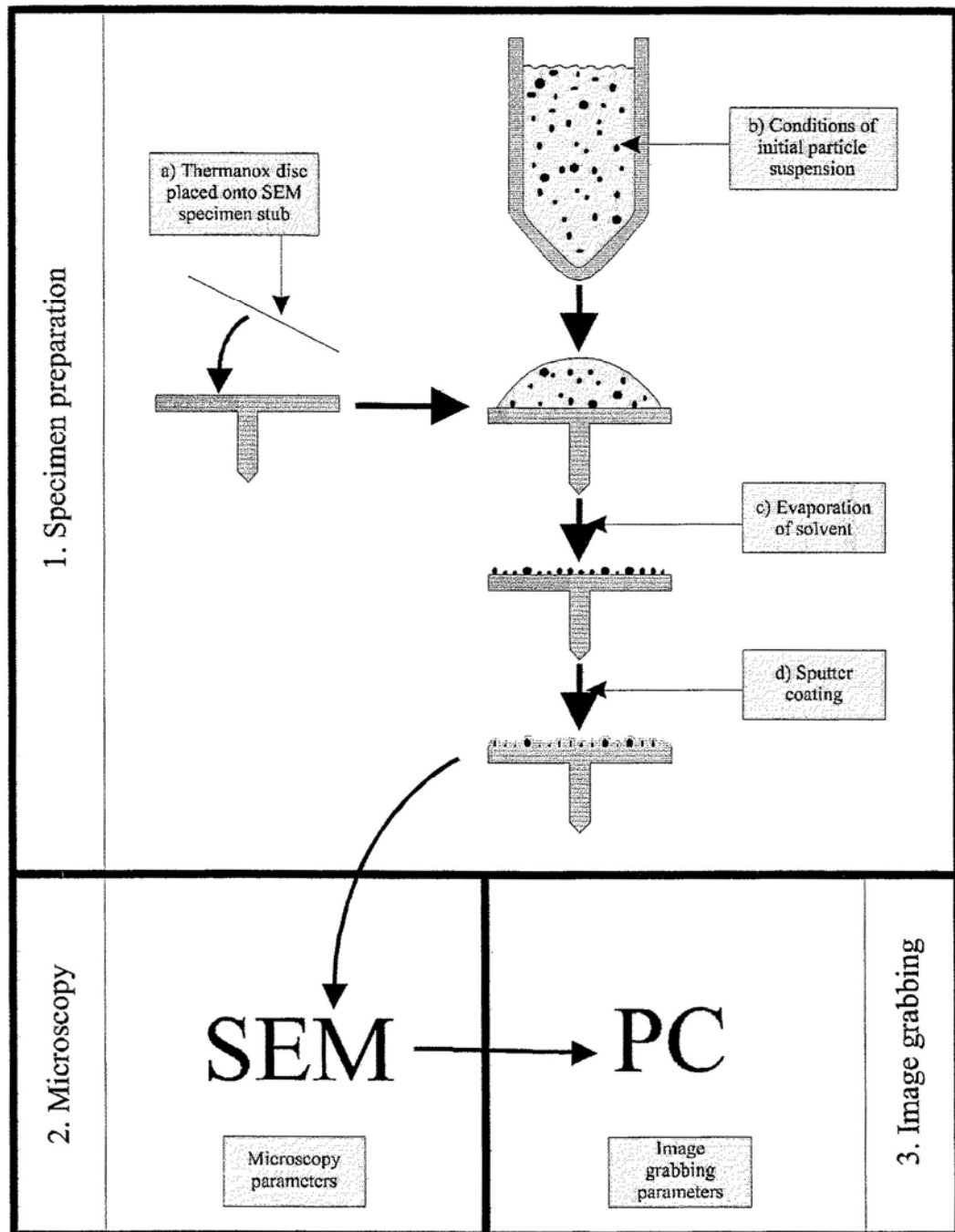


Abb. 4.3: schematische Darstellung der Partikelauflbereitung (Abb. aus Wilson, 1999)

Für die Analyse im REM wurden die getrockneten Partikel (Titan und Stahl) in Aceton wieder resuspendiert und während 10 min im Ultraschallbad homogenisiert, um eine gleichmäßige Verteilung der Partikel in der Lösung zu erzielen.

Aus dieser Lösung wurde ein Tropfen entnommen und auf einen mit Thermanoxfolie beklebten Probenhalter aufgetropft. Die getrockneten Proben wurden mit 8,8 nm

Kohlenstoff beschichtet und der Rand anschließend mit Silberlack bestrichen, um die elektrische Leitfähigkeit der Proben zu verbessern.

Die Bilder wurden im REM durch SE-mode (secondary electrons) und BSE-mode (backscattered electrons) mit einer Beschleunigungsspannung von 5kV aufgenommen. Zur Kalibrierung der Messeinrichtung dienten sphärische Latexpartikel mit einem bekannten Durchmesser von 10 µm.

Insgesamt wurden mit einem Computerprogramm (PC-Image VGA 24, Version 2.2.03) 714 Stahlpartikel und 465 Titanpartikel ausgewertet. Gemessen wurden die Größe und der Umfang der Partikel sowie die Form bestimmt.

4.1.2.2 Chemische Analyse der Partikel

Um die Partikel auf das Vorhandensein von weiteren chemischen Elementen (z.B. Ti, Co, Cr, Ni, Mo und Elektrolyte) zu untersuchen, wurde eine Analyse mittels ICP-OES (Optische Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma) durchgeführt.

Diese Messungen wurden freundlicherweise von J. Kunze an der Technischen Universität Hamburg-Harburg durchgeführt. Die genaue Methode wird in Kapitel 4.3.1 beschrieben.

4.1.2.3 Röntgendiffraktometrie

Des weiteren wurde, um die genaue Zusammensetzung der hergestellten Partikel beurteilen zu können, eine Röntgendiffraktometriemessung mit einem D5000 Theta-Theta Diffraktometer mit einer Kupferröhre (Fa. Siemens, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurden die Partikel auf einem Glasträger mit Haarspray als Fixierungshilfe präpariert. Gemessen wurde in einem Winkelbereich von 2 bis 100 2-Theta bei 40kV und 40 mA.

Die Messungen wurden freundlicherweise von M. Sulkowski an der Universität Essen durchgeführt.

4.1.2.4 EDX-Analyse der im Bohrloch befindlichen Stahlpartikel

Um zu verifizieren, dass es sich um die implantierten Partikel und nicht um ein anderes, durch Kontamination während der Operation oder bei der Euthanasie der Tiere

bedingtes Material handelt, wurden drei Sägeschnitte (Präparation siehe Kapitel 4.4.3.) im Rasterelektronenmikroskop mit EDX (energiedispersive Röntgenanalyse) analysiert.

Hierfür wurde die raue Oberfläche der angefertigten Sägeschnitte mit der Exakt Schleifmaschine geglättet und poliert. Die polierten Schnitte wurden dann auf die Größe des REM-Probenhalters zugeschnitten und mit Thermanoxfolie aufgeklebt. Um die elektrische Leitfähigkeit der Probe zu erhöhen, wurde der Rand mit Silberlack bestrichen. Die Oberfläche der Proben wurde mit einer 15nm dicken Kohlenstoffschicht überzogen.

4.1.3 Vorbereitung der zu implantierenden Partikel

4.1.3.1 Menge der zu implantierenden Partikel

Für unser Modell wurde ein Bohrloch mit einem Durchmesser von 2,5mm vorgesehen. Dies entspricht auch den Dimensionen, die unter operativen Bedingungen beim Menschen bei der Befestigung von Osteosyntheseplatten entstehen.

Folgende Berechnungen führten zu den implantierten Titan-Mengen:

Volumen des Bohrlochs: $39,3\text{mm}^3$

Spezifisches Gewicht: $r_{\text{Ti}} = 4,5 \text{ mg/mm}^3$

$$r_{\text{Fe}} = 7,8 \text{ mg/mm}^3$$

Gewichte eines Zylinders mit Volumen $V (=V \cdot r)$: $G_{\text{voll Ti}} = 176,7 \text{ mg}$;

$$G_{\text{voll Fe}} = 306,3 \text{ mg}$$

Die Menge der zu implantierenden Partikel wurde als 18% des Gewichtes des vollen Zylinders bestimmt.

18% des Gewichtes eines Zylinders mit Volumen $V (=0,18 \cdot G_{\text{voll}})$: **$G_{\text{Ti}} = 31,8 \text{ mg}$** ;

$$\mathbf{G_{\text{Fe}} = 55,1 \text{ mg}}$$

Um die Partikel intraoperativ genau in das Bohrloch einfüllen zu können, ohne allzu große Verunreinigungen des umliegenden Gewebes zu verursachen, wurde ein spezieller Applikator entwickelt (Abb. 4.4). Es handelt sich hierbei um ein Röhrchen

mit einem Außendurchmesser von 2,5mm und einem Innendurchmesser von 2,1mm aus rostfreiem Stahl. Als Stößel, mit dem die Partikel wie bei einer Spritze hinausgeschoben werden können, diente ein Stäbchen (Ø 2,06mm), ebenfalls aus rostfreiem Stahl.

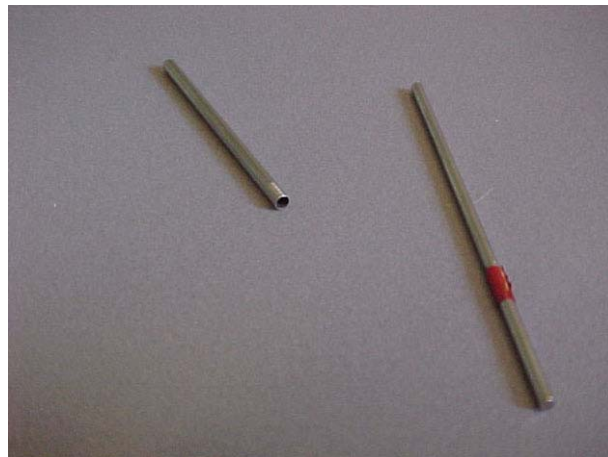


Abb. 4.4: Applikator (links) und Stößel (rechts)

Die zu implantierende Menge an Partikeln (Ti: 31,8mg und Fe: 55,1mg) wurde auf einer Waage (METTLER AE 260, Delta Range) abgewogen und dann mit Hilfe eines extra angefertigten Trichters in die Röhrchen gefüllt. Zur Kontrolle wurde das Röhrchen vor und nach dem Befüllen erneut gewogen. Somit ergibt sich die eingefüllte Menge an Partikeln aus der Differenz dieser zwei Werte. Der Applikator wurde nun auf beiden Seiten verschlossen, auf der einen Seite mit dem Stößel und auf der anderen Seite mit einem kleinen Metallstift.

Die Applikatoren wurden dann doppelt in Alufolie verpackt und bei 200°C sterilisiert.

4.2 Operative Methodik

In unserer Studie untersuchen wir die Lokalreaktion des Knochens auf die implantierten Partikel, sowie die Verteilung der Partikel im Organismus. Dafür wurde den Kaninchen intraoperativ Metallpartikel (Titan und Stahl) in die laterale Femurkondyle implantiert und 16 Wochen in-situ belassen. Nach der Euthanasie der Kaninchen wurden die Femurknochen und die Organe (Milz, popliteale Lymphknoten, Leber, Nieren) entnommen.

4.2.1 Das Tiermodell

Um die Knochenreaktion um das Bohrloch sowie die Verteilung der Titan- und Stahlpartikel im Körper unter standardisierten Bedingungen untersuchen zu können, wählten wir Kaninchen aus, da sie leicht nachzuzüchten und in der Haltung nicht allzu anspruchsvoll sind. Außerdem benötigt man ein Tier mit ausreichend großer Spongiosa an den distalen Femurkondylen, um ein Loch von 2,5 mm Durchmesser in die Spongiosa bohren zu können, ohne den Markraum zu eröffnen.

Diese Voraussetzungen konnten in den Vorversuchen bestätigt werden.

Hierfür wurden Kaninchenfemora (aus der Metzgerei) aufgesägt (Abb. 4.6), um die genaue Anatomie zu studieren und um die beste Platzierung für das Bohrloch festzulegen.

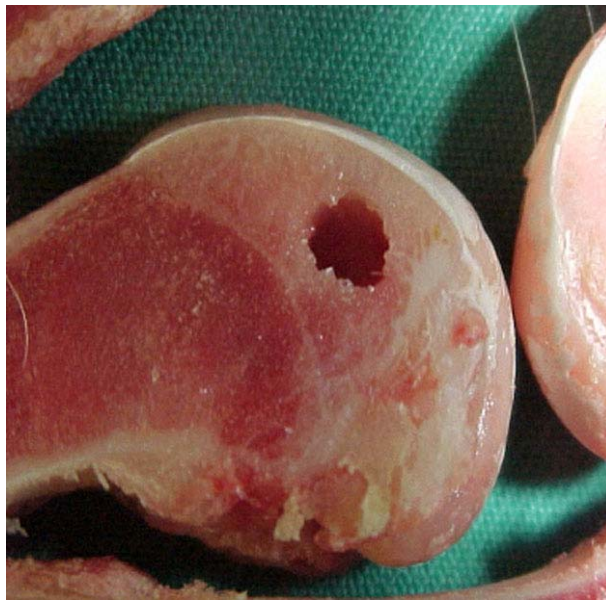


Abb. 4.5: Kaninchenfemur mit Bohrloch



Abb. 4.6: aufgesägtes Kaninchenfemur

Die Kaninchen, die wir für unsere Versuche verwendeten, stammten alle aus der Aufzucht von CHARLES RIVER WIGA Deutschland GmbH, Tiergesuchsbewilligungs-Nr. 11/1998. Es handelte sich um ca. zweijährige weiße, weibliche Kaninchen (sog. New Zealand White Rabbits).

4.2.2 Anzahl der operierten Kaninchen

Für unsere Versuche wurden insgesamt 19 Kaninchen operiert. Bei zwei Pilottieren wurden Titanpartikel implantiert; anhand dieser wurde dann die weitere

Vorgehensweise, d.h. die genaue histologische Methodik festgelegt. Sechs Kaninchen wurden Stahlpartikel implantiert, sieben Tieren Titanpartikel und vier Kaninchen dienten als Kontrollgruppe. Da man bei den Kontrolltieren von einer geringen Streubreite ausgehen kann und unter Berücksichtigung ethischer Gründe, wählten wir eine kleine Kontrollgruppe.

Bei den Titantieren wurden in beide Femurkondylen Löcher gebohrt, wobei aber immer nur in eines der beiden Löcher Titanpartikel eingefüllt wurden. Das andere der beiden Bohrlöcher diente als lokale Kontrolle.

Die Verteilung rechts/links ergibt sich aus folgender Tabelle (Tabelle 4.2).

OP-Nummer	Kaninchen-Nr.	Spezifikation	
		links	rechts
1	9844	Titan	leer
2	9856	Titan	leer
3	9845	leer	Titan
4	9852	leer	Titan
5	9846	Titan	leer
6	9855	Titan	leer
7	9853	leer	Titan

Tabelle 4.2: OP-Nummer und Verteilung rechts / links der Titankaninchen

Bei den Stahltieren wurde immer nur auf einer Seite ein Loch gebohrt, in das dann die Stahlpartikel mit Hilfe des Applikators eingefüllt wurden.

Die Verteilung rechts/links ergibt sich aus folgender Tabelle (Tabelle 4.3).

OP-Nummer	Kaninchen-Nr.	Spezifikation	
		links	rechts
1	9863	Stahl	
2	9854		Stahl
3	9832	Stahl	
4	9880		Stahl
5	9878		Stahl
6	9858	Stahl	

Tabelle 4.3: Verteilung rechts / links der Kaninchen mit Stahlpartikeln

Gleichzeitig mit den Stahltieren wurden noch vier Kaninchen operiert, die als Kontrollgruppe dienten. Hierfür wurde ebenfalls die gleiche Operation durchgeführt, jedoch ohne die gebohrten Löcher mit den Abriebpartikeln zu befüllen. Dies wurde durchgeführt, um zu sehen, ob es zu intraoperativen Verunreinigungen durch die Bohrinstrumente, die ebenfalls aus Stahl bestehen, gekommen ist.

Die nach 16 Wochen entnommenen Organe dieser Kontrollgruppe dienten dann beiden Versuchsreihen (Titan und Stahl) als Kontrolle. Die Verteilung rechts/links der operierten Kaninchen ergibt sich aus folgender Tabelle (Tabelle 4.4).

OP-Nummer	Kaninchen-Nr.	Spezifikation	
		links	rechts
1	9833		Kontrolle
2	9898	Kontrolle	
3	9859	Kontrolle	
4	9858		Kontrolle

Tabelle 4.4: Verteilung rechts/links der Kontrollkaninchen

Zusätzlich wurden noch die Organe von sechs Kaninchen vom Bestand untersucht, die keiner Operation unterzogen wurden, um die Basiswerte der Metallkonzentrationen in den Organen zu bestimmen. Diese Basiswerte wurden bestimmt, um eventuell erhöhte Metallkonzentrationen im Organismus zu evaluieren.

4.2.3 Operationsverfahren

- a.) Einbringen von Titan- bzw. Stahlpulver in eine Bohrung (2,5mm Durchmesser, 10mm Länge) in den distalen Femurkondylus rechts bzw. links.
- b.) Leerbohrung (2,5mm Durchmesser, 10mm Länge) in den distalen Femurkondylus rechts bzw. links.
- c.) Anästhesie: Intubationsnarkose

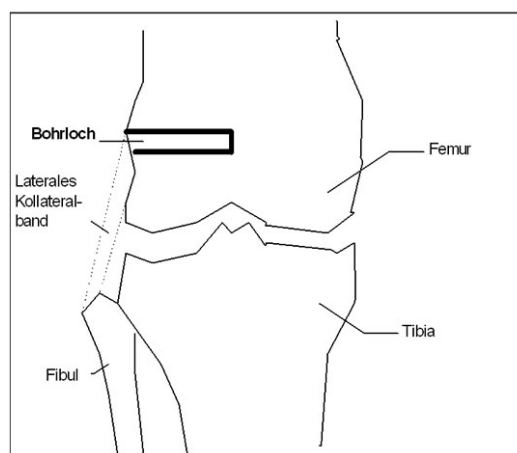


Abb. 4.7: Operationsschema

In Rückenlage wurde das Operationsgebiet mit Polividonjodlösung desinfiziert. Danach wurde der Gefäßspalt mit einer Kanüle zur Festlegung der Bohrrichtung sondiert. Anschließend Setzen eines lateralen Hautschnittes leicht dorsal des distalen Femurkondylus in Längsrichtung. Danach schichtweise Präparation bis zur Darstellung des lateralen Kollateralbandes.

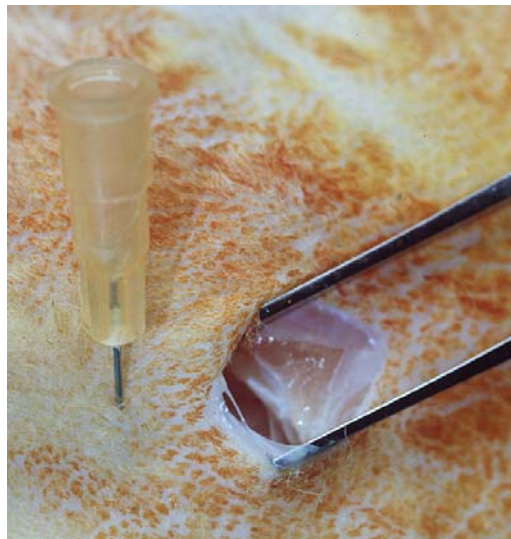


Abb. 4.8: Sondierung des Gefäßspaltes und Eröffnung des OP-Gebietes

Nach dem Freipräparieren des Knochens wurde eine Bohrung cranial des lateralen Kollateralbandes parallel zur Kniegelenksfläche, sowie zur fascies patellaris und zur Kanüle angebracht. Anschließend wurde die Bohrung mit Na-Cl-Lösung vorsichtig gespült.

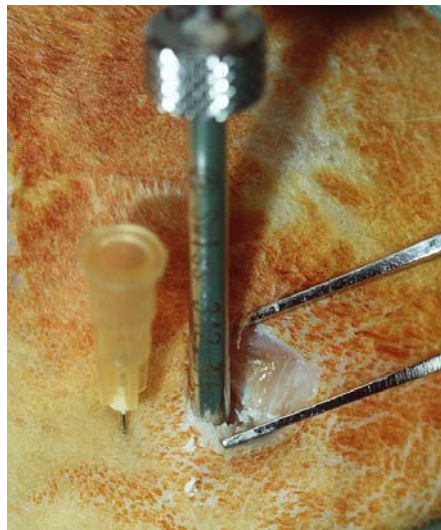


Abb. 4.9: Bohrung des Loches parallel zu Sonde mit Bohrhülse



Abb. 4.10: Bohrloch in-situ

Danach wurden die Metallpartikel mit Hilfe des Applikators (31,8mg Titanpulver bzw. 55,1mg Stahlpulver) in das Bohrloch eingefüllt.



Abb. 4.11: Bohrloch mit eingefüllten Titanpartikeln

Schichtweiser Verschluss des Bohrlochs mit nicht resorbierbarem Faden (Seralon 4:0). Danach fortlaufende Subkutannaht mit resorbierbarem Faden (Vicryl Rapid 4:0) und Intrakutannaht mit resorbierbarem Faden (Vicryl Rapid 4:0). Wir wählten resorbierbares Nahtmaterial, um die Fäden nicht mehr entfernen zu müssen.



Abb. 4.12: Intrakutannaht

Nach der Operation wurde eine Röntgenkontrolle mit dem Bildwandler durchgeführt.



Abb. 4.13: Röntgenbild mit Bohrloch und implantierten Partikeln

Während der postoperativen Versorgung wurden die Kaninchen zunächst täglich (über fünf Tage), danach wöchentlich, klinisch nachuntersucht, wobei vor allem auf Entzündungen im Wundbereich geachtet wurde. Außer einer kleinen Schwellung im Wundbereich zeigten sich aber keinerlei Auffälligkeiten.

4.2.4 Euthanasie und Explantation der Organe und Knochen

Die zwei Pilottiere wurden nach acht Wochen euthanasiert. Die Kaninchen des Hauptversuchs wurden nach 16 Wochen euthanasiert. Bei beiden Materialgruppen wurden anschließend die poplitealen Lymphknoten sowie die Leber, beide Nieren und die Milz entnommen. Da bei der Titangruppe in beide Femora ein Loch gebohrt wurde, wurden jeweils der linke und rechte Femur entnommen.

Da bei den Stahltieren immer nur ein Femur operiert wurde, wurde hier immer nur der entsprechend behandelte Knochen entnommen. Es wurde der komplette Femur entnommen. Später wurde dann mit einer Bandsäge die Femurkondyle zur Weiterverarbeitung abgetrennt.

Um die Organe im weiteren Verlauf nicht zu verwechseln wurden die symmetrischen Organ- und Knochenproben links mit blauem Faden markiert (Niere links, popliteale Lymphknoten links und Femur links).

Sofort nach der Entnahme der Organe wurde vom jeweiligen Gewebe (popliteale Lymphknoten, Leber, Milz, Nieren) ein ca. 1cm großes Stück für die quantitative Analyse der Legierungsbestandteile abgetrennt und in kleine Transportbehälter (ELMER®) gefüllt. Diese wurden dann bis zur weiteren Verarbeitung bei -18°C tiefgefroren.

Die Organreste wurden zur Konservierung und Aufbewahrung bis zur histologischen Weiterverarbeitung in 4%iger Formalinlösung fixiert.

4.3 Quantitative Titan- und Stahlanalyse in den Organen

4.3.1 ICP-MS Titan und Stahl

Bei der ICP-MS (Inductively coupled plasma – mass spectroscopy) handelt es sich um ein Auflösungs- und Analyseverfahren, mit dem Metallkonzentrationen in organischen Materialien nachgewiesen werden können. Das Prinzip beruht auf der Überführung von Schwermetallen in säurelösliche Verbindungen und Oxidation der organischen Inhaltsstoffe.

Dafür wurden die Organe zuerst gefriergetrocknet (ca. 72 Stunden) und anschließend mit Flusssäure (HF) und Salpetersäure (HNO₃) bei ca. 140 °C im Mikrowellenofen aufgeschlossen. Die Gesamtdauer des Aufschlusses beträgt 35 min.

Nach Abkühlung wurden 3,5ml aus dem Aufschlussgefäß in ICP-MS-Autosamplergefäße pipettiert und dann bei einer Wellenlänge von 336,121 nm während 300ms analysiert.

Mit dieser Methode kann man Titan direkt nachweisen, Stahl über seine Legierungsbestandteile Nickel und Chrom.

Die Nachweisgrenze liegt für Titan unter 2,0 ng/ml Gewebe. Bei Nickel und Chrom hängt die untere Nachweisgrenze mit der jeweiligen eingesetzten Probenmenge zusammen. Die Nachweisgrenze beträgt bei Nickel 20µg/kg gefriergetrocknetes Material und bei Chrom 5µg/kg gefriergetrocknetes Material.

4.4 Histologische Methodik

4.4.1 Probenpräparation

Die Proben der Stahl- und Titantiere wurden histologisch identisch behandelt.

Um die Organe unter dem Lichtmikroskop untersuchen zu können, müssen diese erst histologisch aufgearbeitet werden. Dazu wurde von den in Formalin fixierten Organen, d.h. von der Milz, der Leber, den Nieren, der Lunge, dem Herz und den Lymphknoten, ca. 1 cm große Stücke mit einem Skalpell abgetrennt und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, absoluter Alkohol) entwässert. Nach Einbettung in flüssiges Paraffin und Aushärtung wurden die festen Blöcke mit einem Paraffinmikrotom geschnitten und anschließend auf Objektträger aufgezogen. Von jedem Präparat wurden 10 Schnitte mit einer Dicke von 6µm angefertigt.

Es wurden dann jeweils zwei Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin und zwei mit der Berliner-Blau-Reaktion angefärbt.

Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung handelt es sich um eine Übersichtsfärbung, wobei die Zellkerne blauviolett und das Plasma zartrosa angefärbt werden.

Bei der Berliner-Blau-Reaktion handelt es sich um ein Nachweisverfahren für dreiwertiges Eisen. Mit diesem Verfahren wollten wir Indizien sammeln, ob es sich bei den gefundenen Partikeln in der Milz der Titanserie um Titan und nicht etwa um Eisenverunreinigungen handeln könne, da sich das Titan bei dieser Methode nicht anfärbt. Das Eisen färbt sich im Gegensatz dazu leuchtend blau an. Die Kerne erscheinen rot und die übrigen Gewebe rosarot durch die Gegenfärbung mit Kernechtrot.

4.4.1.1 Knochen

Nach Entnahme der Knochen wurde der Schaft noch im unfixierten Zustand mit einer Bandsäge abgetrennt, so dass nur noch die Femurkondylen übrig blieben. Im Anschluss an die Fixierung in 4%iger Formalinlösung wurden die Knochenproben mit EDTA über einen Zeitraum von acht Wochen entkalkt, um ein besseres Schnittbild zu erhalten und um die zellulären Bestandteile unter dem Mikroskop besser beurteilen zu können.

Nach dem Entkalken wurden die Knochen ebenfalls mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (70%, 96%, absoluter Alkohol). Zur Gewährleistung stabiler und gleichmäßiger Schnitte, ein Großteil enthält Metallanteile, wurden alle Knochenproben in MMA (Methylmetacrylat) eingebettet.

Die in MMA eingebetteten Kondylen wurden dann bis zur Hälfte in Beracryl eingegossen, so dass die laterale Kondyle, in der sich das Bohrloch befindet, nach oben zeigt. Die Beracryl-Klötzchen dienten als Halterung für die verschiedenen Sägen.

Mit einem diamantbeschichteten Sägemikrotom (Innenlochsäge Fa. Leitz) wurden 500µm dicke Schnitte abgesägt, bis die Oberfläche der Kondyle erreicht war.

Anschließend wurde nach folgendem Schema fortgefahren.

- 10 Schnitte mit dem Mikrotom à 6µm - Nummeriert von 1 bis 10
- 1 Schnitt mit der Innenlochsäge à 1500µm – Ebene 1

- 10 Schnitte mit dem Mikrotom à 6µm – Nummeriert mit 11 bis 20
- 2 Schnitte mit der Innenlochsäge à 750µm – Ebene 2/1 und 2/2

- 10 Schnitte mit dem Mikrotom à 6µm – Nummeriert mit 21 bis 30
- 2 Schnitte mit der Innenlochsäge à 750µm – Ebene 3/1 und 3/2

- 10 Schnitte mit dem Mikrotom à 6µm – Nummeriert mit 31 bis 40
- 2 Schnitt mit der Innenlochsäge à 750µm – Ebene 4/1 und 4/2

- 10 Schnitte mit dem Mikrotom à 6µm – Nummeriert mit 41 bis 50
- 2 Schnitte mit der Innenlochsäge à 750µm – Ebene 5/1 und 5/2

Bei den Proben, bei denen das Bohrloch noch gut sichtbar war, wurde noch bis zur 9. Ebene weiter geschnitten, dh. nochmals 10 Schnitte pro Ebene mit dem Mikrotom (51 bis 60, 61 bis 70, 71 bis 80 und 81 bis 90) und jeweils wieder 2 Zwischenschnitte mit der Innenlochsäge (Ebene 6/1 und 6/2, 7/1 und 7/2, 8/1 und 8/2).

Insgesamt wurden zwischen 50 und 90 histologische Schnitte pro Femurkondyle angefertigt, je nachdem ob das Bohrloch noch sichtbar war oder nicht. Von jeder Schnittebene (á 10 Schnitte) wurden jeweils 2 Schnitte mit Giemsa gefärbt. Dabei

handelt es sich um eine Übersichtsfärbung bei der das Zytoplasma neutrophiler Zellen rosa und das basophiler Zellen dunkelblau angefärbt wird.

4.4.2 Lichtmikroskopie

4.4.2.1 Knochen

Die Knochenschnitte wurden unter einem hochauflösenden Lichtmikroskop mit dem 40-er Objektiv ausgewertet, wobei hier vor allem auf lokale Reizerscheinungen und die Gewebeverträglichkeit geachtet wurde.

Um die Fremdkörperreaktion besser quantifizieren zu können, wurden von den Knochenschnitten zusätzlich noch Bilder mit einem Axio Vision Mikroskop von Zeiss mit angeschlossener Digitalkamera angefertigt. Von jedem Schnitt wurden drei Bilder mit dem 40-er Objektiv von verschiedenen Stellen aus der Region des Bohrlochs gemacht. Die Bilder wurden dann mit dem AxioVision Viewer von Zeiss am Computer ausgewertet. Insgesamt wurden 120 Bilder mit Stahlpartikeln, 100 Bilder mit Titanpartikeln und 64 Bilder der Kontrollgruppe ausgewertet. Hierfür wurden einerseits die eosinophilen Granulozyten (rote Kreuze) und andererseits die Fremdkörperriesenzellen (grüne Kreuze) gezählt, indem sie mit farbigen Kreuzen und Punkten versehen wurden (Abb 4.14).

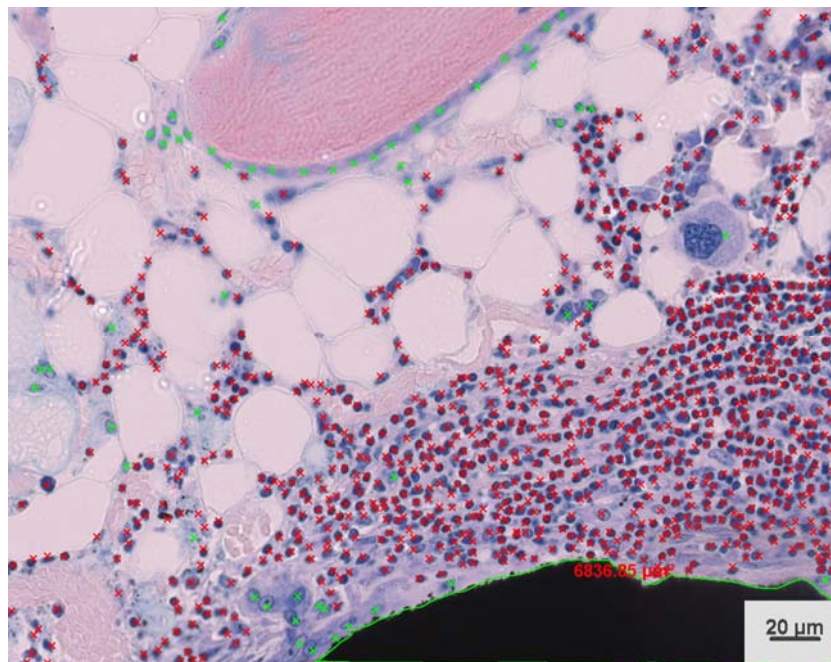


Abb. 4.14: Ausschnitt aus der Bohrlochregion mit Stahlpartikel und Markierungspunkten

Anschließend wurden der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Am Computer wurde die Grundfläche des Bildausschnittes (Breite x Höhe) bestimmt und größere Partikel oder ossäre Strukturen davon subtrahiert, um die Partikelanzahl auf die freie Fläche beziehen zu können.

4.4.2.2 Organe

Die Organschnitte wurden ebenfalls unter einem hochauflösenden Lichtmikroskop mit dem 40-er Objektiv und dem 100-er Objektiv mit Öl ausgewertet. Hierbei wurde vor allem auf zelluläre Veränderungen wie zum Beispiel Zellnekrosen, Entzündungsreaktionen und Fremdkörperriesenzellen geachtet. Außerdem wurde versucht, die implantierten Partikel (Titan und Stahl) in den Zielorganen (Milz, Leber, Nieren und popliteale Lymphknoten), zu identifizieren.

4.4.3 Rasterelektronenmikroskopie Titan

Um die implantierten Titanpartikel in der Milz wieder identifizieren und nach ihrer Größe und Form beurteilen zu können, wurden die in Formalin fixierten Organe mit aufsteigender Alkoholreihe entwässert und anschließend in MMA eingebettet.

Alle 500 μm wurde ein Schnitt mit dem Sägemikrotom (Fa. Leitz) angefertigt, wobei die Schnitte dann eine endgültige Dicke von ca. 200-250 μm aufweisen, da ein Verlust von ca. 250-300 μm für das Sägeblatt eingerechnet werden muss.

Im Anschluss daran wurden die Schnitte mit der Schere auf die Größe der Probenhalter zugeschnitten, mittels Klebefolie aufgeklebt und der Rand mit Silberlack bestrichen, um die elektrische Leitfähigkeit der Probe zu verbessern.

Die Bilder wurden im REM im SE-mode und im BSE-mode aufgenommen, die gefundenen Partikel wurden dann mit EDX analysiert, um die genaue chemische Zusammensetzung der Partikel zu bestimmen.

5 ERGEBNISSE

5.1 Charakterisierung der Abriebpartikel

5.1.1 Charakterisierung mittels Elektronenmikroskopie

Die Produktionsgeschwindigkeit für die Abriebpartikel variierte zwischen Titan und rostfreiem Stahl. So entstanden in der gleichen Zeit gewichtsbezogen 23-mal so viele Titan- wie Stahlpartikel. Pro Tag und Becherglas wurden 114mg Titanabrieb und 4,95mg Stahlabrieb erzeugt. Somit konnte das Partikelvolumen bei Titan 23 mal schneller gewonnen werden als bei Stahl.

Insgesamt wurden 465 Titanpartikel und 714 Stahlpartikel mit dem PC-Image-Programm in den vorgegebenen Feldern ausgewertet. Die Partikel wurden nach ihrer Größe, ihrem Durchmesser und nach ihrer Form beurteilt. Die Abbildungen (Abb. 5.1 und Abb. 5.2) zeigen rasterelektronenmikroskopische Bilder der Partikel jeweils der Ausgangsfraction, bei 5000-facher Vergrößerung im BSE-mode. Anhand der unterschiedlichen Maßstäbe kann man den Größenunterschied erkennen.

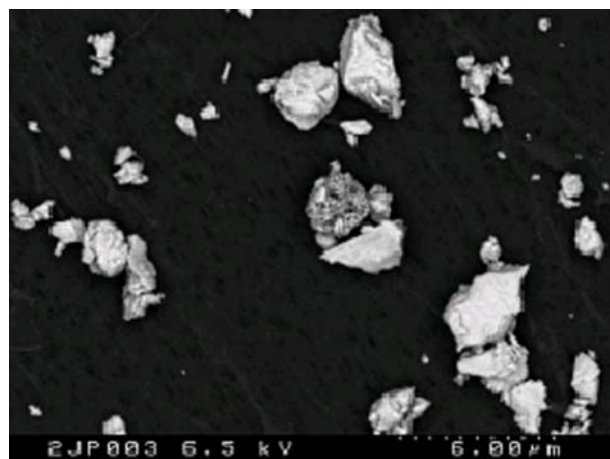


Abb. 5.1: Titanpartikel der Ausgangsfraction

Die entstandenen Titanpartikel sind insgesamt größer als die Stahlpartikel. Sie haben einen mittleren Durchmesser von $0,76\mu\text{m}$ und eine Standardabweichung von $0,88\mu\text{m}$

(0.11-9.02 μm), wobei 95% der Partikel kleiner waren als 2 μm . Die einzelnen Messdaten sind in Tabelle 5.1 aufgeföhrt.

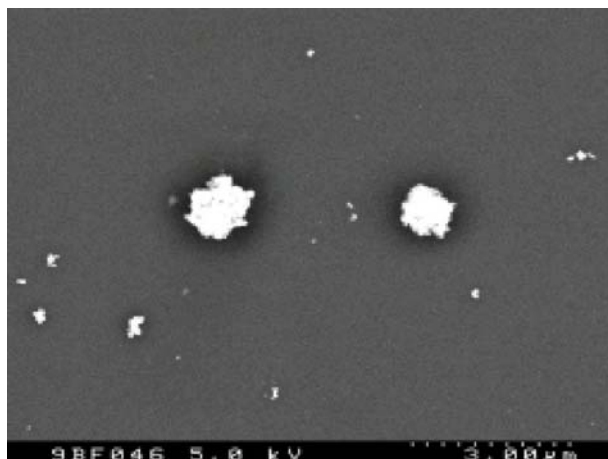


Abb. 5.2: *Stahlpartikel der Ausgangsfraction*

Ihre mittlere Form entsprach 0.62 mit einer Standardabweichung von ± 0.16 , wobei 1 perfekt rund und 0 nadelförmig entspricht.

	ECD (μm)	Fläche (μm^2)	Form (0-1)
Max.	7,080	39,374	0,93
Min.	0,121	0,011	0,10
Median	0,378	0,112	0,64
Mittelwert	0,652	0,802	0,62
Stand.-Abw.	0,773	2,789	0,16

Tabelle 5.1: *Messdaten der Titanpartikel (n= 465)*

Es wurden 714 Stahlpartikel nach der gleichen Methode ausgewertet. Die folgende Tabelle zeigt die zusammengefassten Daten.

	ECD (μm)	Fläche (μm^2)	Form (0-1)
Max.	0,442	0,154	0,94
Min.	0,048	0,001	0,09
Median	0,101	0,008	0,60
Mittelwert	0,121	0,015	0,58
Stand.-Abw.	0,064	0,019	0,18

Tabelle 5.2: Messdaten der Stahlpartikel (n= 714)

Die meisten der analysierten Stahlpartikel waren kleiner als die Titanpartikel und hatten einen mittleren Durchmesser von $0.28\mu\text{m}$ und eine Standardabweichung von ± 1.28 ($0.06- 26.92\mu\text{m}$). 95% der untersuchten Partikel waren kleiner als $0.5\mu\text{m}$. Die Form der Stahlpartikel war in etwa mit der der Titanpartikel vergleichbar: 0.57 ± 0.19 .

Die folgenden Diagramme (Abb. 5.3 – 5.8) verdeutlichen die Ergebnisse der Partikelanalyse nochmals graphisch.

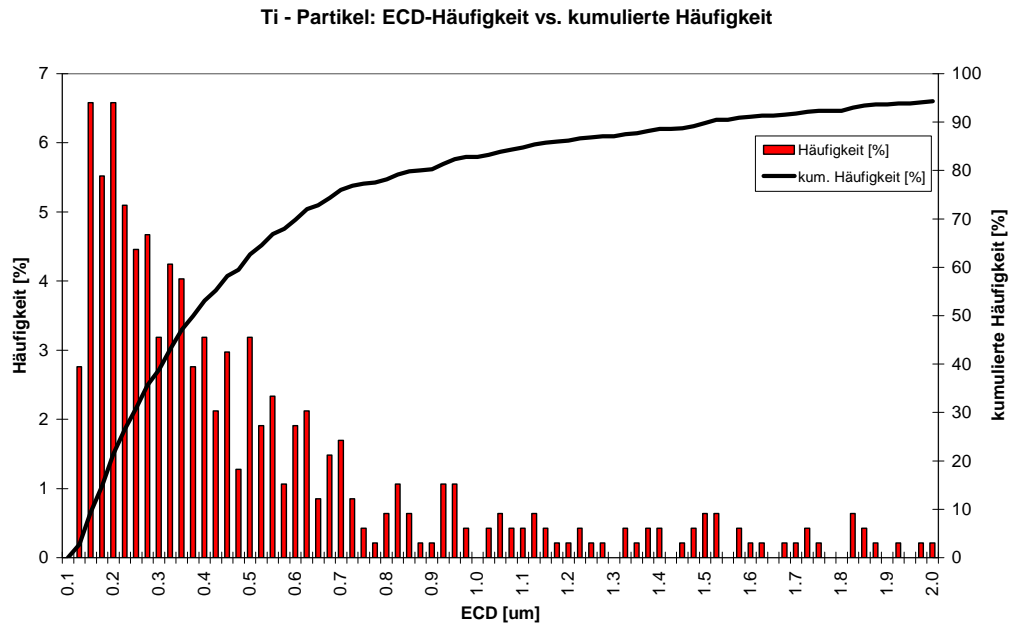


Abb. 5.3: Vermessungsergebnisse der elektronenmikroskopisch untersuchten Titanpartikel dargestellt als ECD (ECD = equal circle diameter, entspricht dem ungefähren Durchmesser eines Partikels, der aufgrund seiner als Kreis dargestellten angenommenen Fläche, berechnet wird)

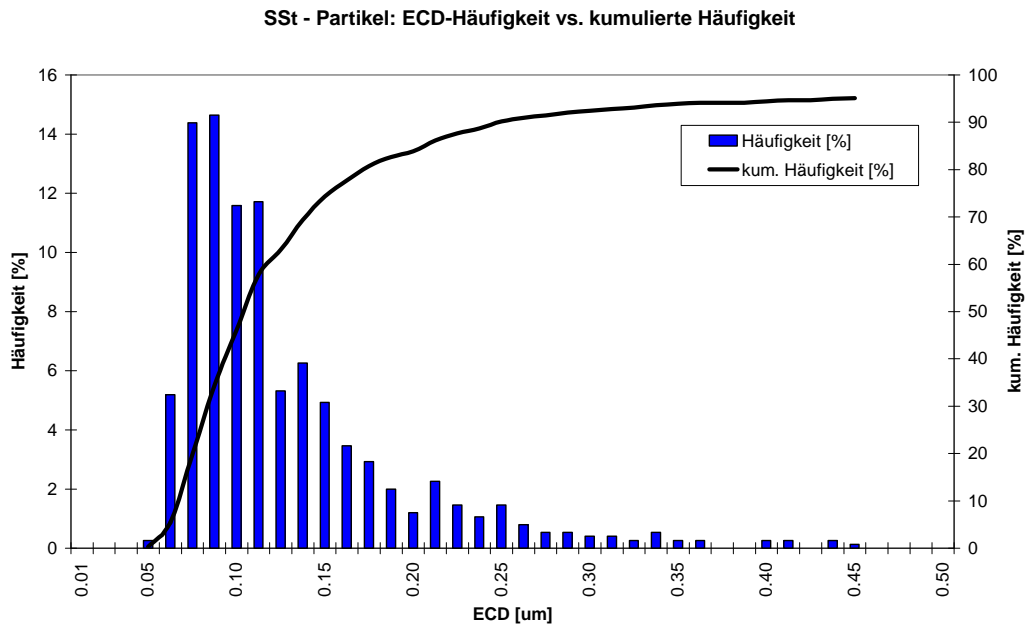


Abb. 5.4: Vermessungsergebnisse der elektronenmikroskopisch untersuchten Stahlpartikel dargestellt als ECD (ECD = equal circle diameter, entspricht dem ungefähren Durchmesser eines Partikels, der aufgrund seiner als Kreis dargestellten angenommenen Fläche, berechnet wird)

Verteilung der Fläche von SSt- Partikeln

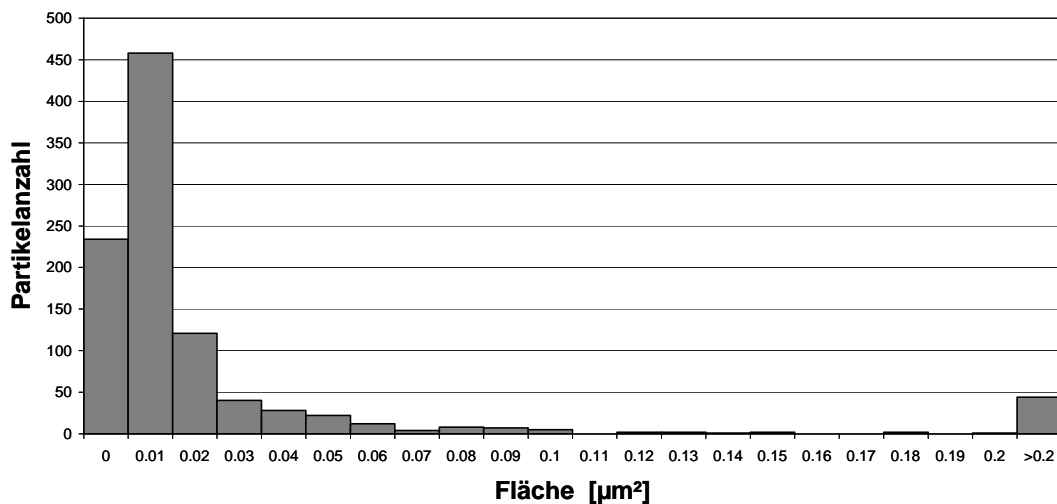


Abb. 5.5: Flächenverteilung der Stahlpartikel

Verteilung der Fläche von Ti - Partikeln

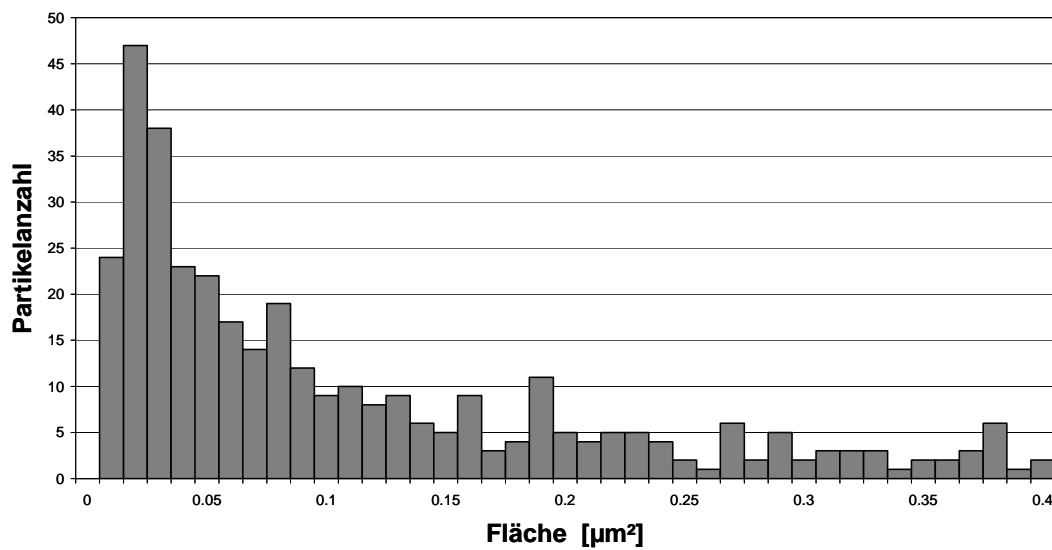


Abb. 5.6: Flächenverteilung der Titanpartikel

Verteilung des Parameters "Rundheit" bei Ti - Partikeln

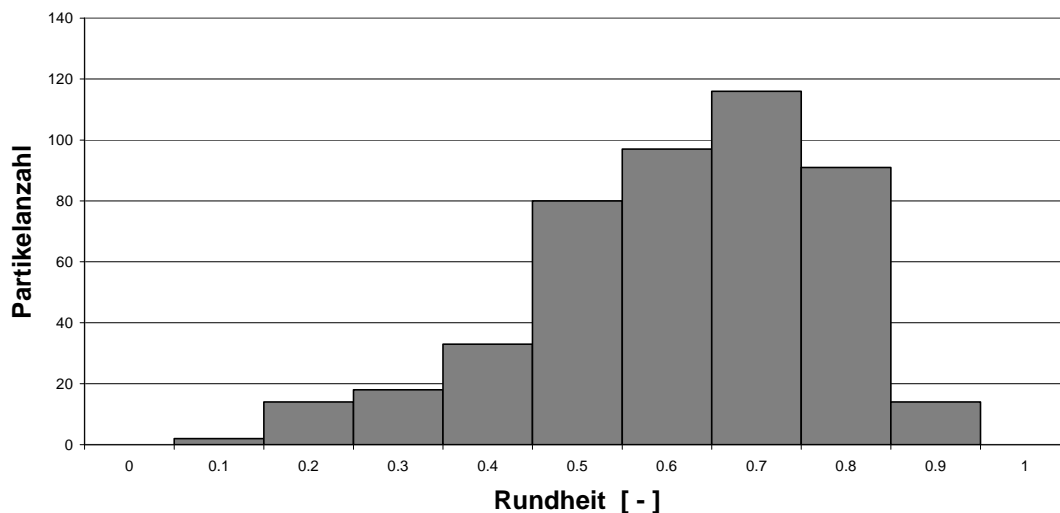


Abb. 5.7: Verteilung des Parameters Rundheit bei Titan

Verteilung des Parameters "Rundheit" bei SSt - Partikeln

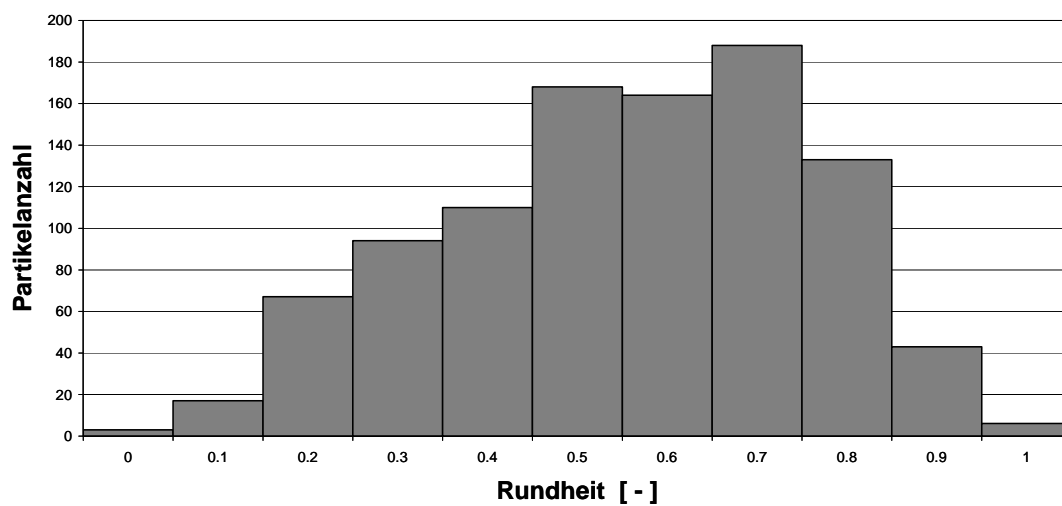


Abb. 5.8: Verteilung des Parameters Rundheit bei Stahl

5.1.2 Röntgendiffraktometrie

Bedingt durch den Glasträger und die geringe Probenmenge ist in den Diffraktogrammen ein sehr hoher amorpher Untergrund zu erkennen. Dies wird durch starkes Rauschen, bedingt durch die geringe Probenmenge und die eher schlechte Kristallinität noch überlagert. Nach dem Glätten der Diffraktogramme und der Subtraktion des Untergrundes lassen sich dennoch einzelne Peaks deutlich ausmachen und bestimmten Phasen zuordnen.

Bei der Titanprobe findet sich im Wesentlichen metallisches Titan, untergeordnet Titanoxid mit wechselnder Stöchiometrie. Das heißt, dass die Partikel nicht durchoxidiert, sondern von einer Titanoxidschicht überzogen sind.

Die Stahlproben liefern neben Reflexen für einen rostfreien Nickel-Chrom-Stahl noch Reflexe für Kohlenstoff und Chromoxide. Darüber hinaus finden sich deutliche Spuren von freiem Nickel, was sehr wahrscheinlich lose in der Oxidschicht der Partikel sitzt.

5.1.3 Chemische Analyse

Bei der Untersuchung der Stahlpartikel auf weitere Legierungsbestandteile mit der ICP-OES ergaben sich folgende Werte.

Probe	Chrom	Nickel	Molybdän	Magnesium	Kupfer	Eisen
	%	%	%	%	%	%
Probe 1	16,70	10,20	0,97	0,88	<0,15	53,90
Probe 2	17,80	10,80	1,04	0,94	<0,15	56,20
Mittelwert	17,25	10,50	1,005	0,91	<0,15	55,05
Implantatqualität SSt ISO 5832-1 Comp.D	17-19	13-15	2.25-3.5	2,00	0,50	Rest

Tabelle 5.3: ICP-OES-Werte der Stahlpartikel

Hierbei zeigt sich, dass der Chromwert im Toleranzbereich für Implantatstahl liegt, wohingegen die Werte für Nickel, Molybdän, Mangan und Kupfer zum Teil stark unter

den Referenzwerten liegen. Der fehlende Anteil von ca. 17% entspricht größtenteils Sauerstoff.

Bei der spektroskopischen Untersuchung der Titanpartikel wurden nur Reintitan und Titanoxid gefunden.

5.2 Quantitative Titan- und Stahlanalyse in den Organen

5.2.1 Titan in den Organen

Es wurden mit der ICP-MS-Methode die Milz, die Nieren, die Leber, die poplitealen sowie die inguinalen Lymphknoten untersucht. Von jedem Organ wurden ungefähr 100mg gefriergetrocknetes Gewebe analysiert. In der Milz konnten die folgenden Titankonzentrationen festgestellt werden.

Kaninchen-Nr.	9844	9856	9852	9846	9855	9853	9845
Titankonzentration mg/kg	3.16	4.94	5.67	2.83	5.66	3.04	9.78

Tabelle 5.4: Titankonzentrationen in der Milz der Versuchstiere (ICP-MS)

Es ergaben sich für die Titankonzentration in der Milz ein Mittelwert von 3.904mg/kg und eine Standardabweichung von ± 2.7443 mg/kg.

In den restlichen entnommenen Organen konnte kein Titan nachgewiesen werden.

In den Kontrollmilzen wurden erwartungsgemäß geringere Titankonzentrationen gemessen als bei den Versuchstieren. Hier ergab sich ein Mittelwert für die Titankonzentration in den Kontrollmilzen von 0,96mg/kg und die Standardabweichung entsprach $\pm 0,8786$ mg/kg. Die Einzelwerte sind in Tabelle 5.5 dargestellt.

Kontrollmilz	1	2	3	4	5	6
Titankonzentration mg/kg	0.67	0.04	<0.04	1.06	2.39	0.64

Tabelle 5.5: Titankonzentration in der Milz der Kontrolltieren (ICP-MS)

Abb. 5.9 zeigt die grafische Verdeutlichung der Ergebnisse.

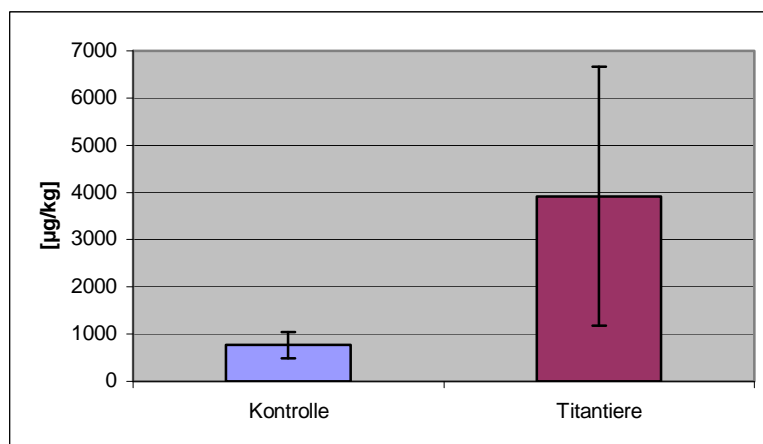


Abb. 5.9: Vergleich der Titankonzentrationen in der Milz der Versuchstiere mit den Kontrolltieren

5.2.2 Rostfreier Stahl in den Organen

Die Organe der Stahltiere wurden ebenfalls nach der Euthanasie entnommen und von jedem Organ wurden ca. 100mg abgetrennt, um sie dann mit der induktivgekoppelten Plasmaanalyse (ICP-MS) zu untersuchen. Da mit dieser Methode das Eisen selbst nicht bestimmt werden kann, wurden die Organe auf den Gehalt der Legierungsbestandteile Nickel und Chrom hin untersucht.

Bei der Bestimmung der Chrom- und Nickelwerte mittels der induktivgekoppelten Plasmaanalyse variiert die Nachweisgrenze je nach Einwaage von Messung zu Messung. Die Mittelwerte der Nachweisgrenzen sind in den Tabellen mitaufgeführt. Bei Chrom lagen alle Messwerte, auch die der Kontrollen, über der Nachweisgrenze. Bei Nickel konnten in einigen Organen keine erhöhten Werte über der Nachweisgrenze bestimmt werden. So in der Milz, der Leber, im Herzen und in den Lymphknoten der Stahltiere. In der Kontrollgruppe konnten in der Milz und in der Lunge keine erhöhten Werte über der Nachweisgrenze nachgewiesen werden.

Chrom

Deutlich erhöhte Chromkonzentrationen wurden in der Milz mit einem Mittelwert von 1107µg/kg im Vergleich zu den Kontrollproben mit 92µg/kg gemessen. In der Leber wurden noch deutlich erhöhte Werte und in beiden Nieren noch gering erhöhte Werte

im Vergleich mit den Kontrollen gefunden. In den poplitealen Lymphknoten und im Herz wurden in den Kontrollen höhere Werte als in den Versuchsorganen gefunden. Die genauen Werte sind in der folgenden Tabelle (Tabelle 5.6) dargestellt.

Chrom	Milz	Leber	Niere rechts	Niere links	Herz	Lunge	LK Knie
Mittelwert Stahltiere	1106,98	434,31	215,03	219,15	47,15	94,07	86,53
Standardabweichung	723,34	83,53	87,15	90,19	19,57	49,41	103,69
Mittelwert Nachweisgrenze Stahltiere	28,28	21,61	33,18	35,53	27,63	35,99	28,11
Standardabweichung	8,58	2,94	4,31	9,29	6,91	8,89	7,24
Mittelwert Kontrolle	91,80	57,33	124,05	112,15	78,22	55,86	241,05
Standardabweichung	66,87	27,32	53,67	66,72	35,65	18,22	92,63
Mittelwert Nachweisgrenze Kontrolle	23,00	24,59	30,45	30,57	25,97	36,97	56,11
Standardabweichung	2,38	7,48	3,81	8,22	6,20	10,56	46,90

Tabelle 5.6: Chromkonzentrationen (Alle Werte in $\mu\text{g}/\text{kg}$) in den Organen (ICP-MS)

Nickel

Für Nickel wurden in beiden Nieren deutlich erhöhte Konzentrationen mit einem Mittelwert von $1240\mu\text{g}/\text{kg}$ (Niere rechts) und $1489\mu\text{g}/\text{kg}$ (Niere links) im Vergleich zu den Kontrollen mit einem Mittelwert von $467\mu\text{g}/\text{kg}$ (Niere rechts) und $496\mu\text{g}/\text{kg}$ (Niere links) gemessen. In den Milzproben wurden nur gering erhöhte Werte ($189\mu\text{g}/\text{kg}$) im Vergleich mit den Kontrollen ($153\mu\text{g}/\text{kg}$) gefunden. In der Leber, im Herz und in den Lymphknoten wurden in den Kontrollen höhere Werte gemessen. Die genauen Werte sind in der folgenden Tabelle (Tabelle 4.7) dargestellt.

Nickel	Milz	Leber	Niere rechts	Niere links	Herz	Lunge	LK Knie
Mittelwert Stahltiere	188,54	144,04	1240,04	1488,63	184,21	247,01	187,39
Standardabweichung	57,18	19,56	732,51	1822,52	46,08	48,71	48,25
Mittelwert Nachweisgrenze Stahltiere	188,54	144,04	221,23	236,85	184,21	239,91	187,39
Standardabweichung	57,18	19,56	28,72	61,90	46,08	59,26	48,25
Mittelwert Kontrolle	153,37	180,48	467,13	496,44	269,03	246,47	374,04
Standardabweichung	15,8	47,6	185,17	247,98	183,81	70,37	312,68
Mittelwert Nachweisgrenze Kontrolle	153,37	163,92	202,98	203,78	173,16	246,47	200,03
Standardabweichung	15,86	49,87	25,42	54,80	41,33	70,38	8,62

Tabelle 5.7: Nickelkonzentrationen (Alle Werte in $\mu\text{g}/\text{kg}$) in den Organen (ICP-MS)

In den folgenden Diagrammen werden die Werte graphisch verdeutlicht.

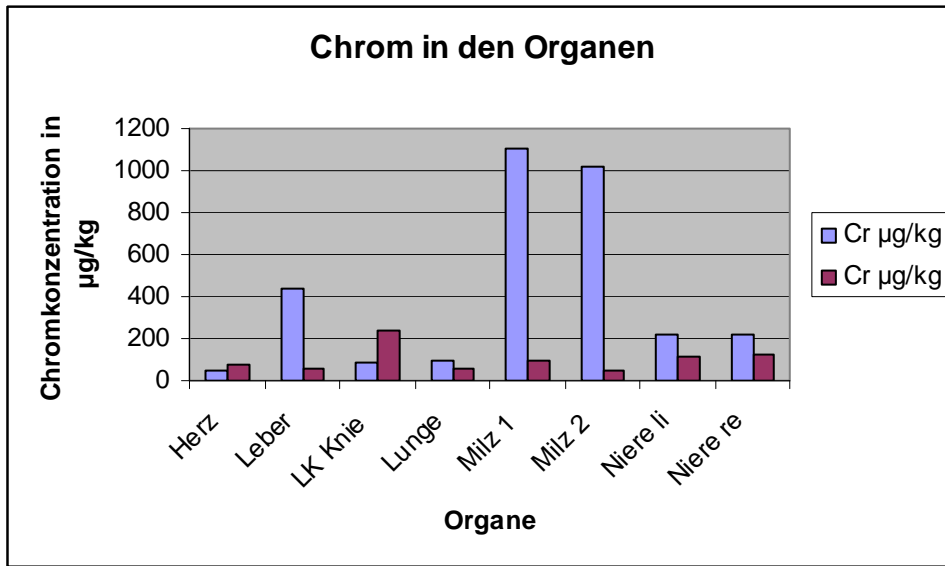


Abb. 5.10: Graphische Darstellung der Chromkonzentrationen in den verschiedenen Organen der Stahltiere (blau) im Vergleich mit den Kontrolltieren (rot)

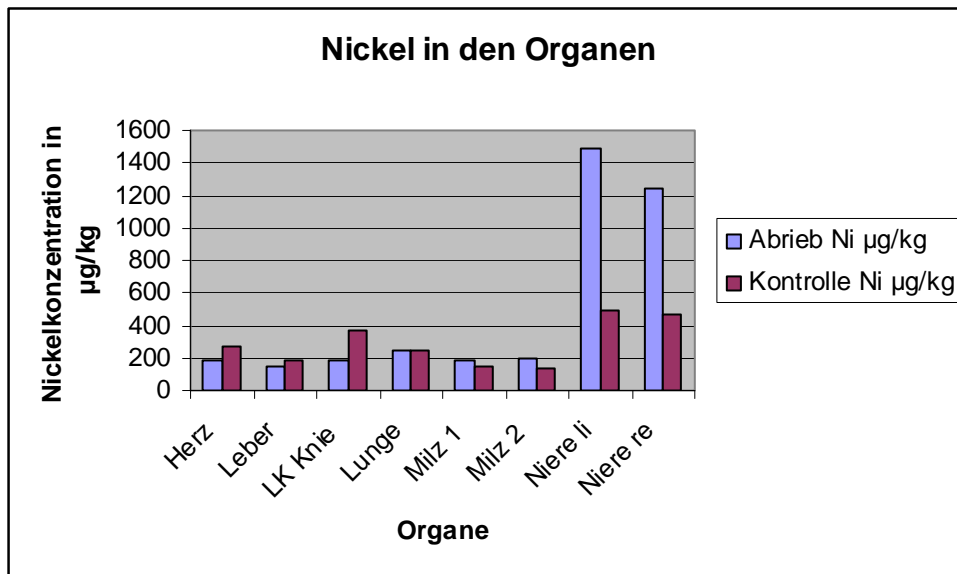


Abb. 5.11: Graphische Darstellung der Nickelkonzentrationen in den verschiedenen Organen der Stahltiere (blau) im Vergleich mit den Kontrolltieren (rot)

5.3 Histologische Auswertung

5.3.1 Lichtmikroskopie

5.3.1.1 Knochen Titan

Bei der Auswertung konnte in der Übersichtsvergrößerung (2,5-er Objektiv) in allen Schnitten mit implantierten Partikeln das Bohrloch noch gut identifiziert werden. Außerdem zeigte sich bei allen Schnitten, dass die Bohrlöcher gut in der Kondylenmitte platziert waren und nur in einem Fall der Markraum akzidentiell eröffnet wurde. Die Partikel befanden sich zum Großteil noch an der Implantationsstelle, d.h. im Bohrloch (Abb. 5.12). Bei allen Schnitten sowohl der Titan- als auch der Kontrollgruppe erkannte man in den beiden äußeren Ebenen das Bohrloch in keinem der Präparate mehr, was für eine geringe Toxizität des Titans und eine intakte Regenerationsfähigkeit des Knochens spricht. Bei den Kontrollfemora erkannte man das Bohrloch nur noch in den tieferen Schichten und hier auch nur in der Hälfte der Fälle (3 von 6), was auf die generell unkritische Größe des Bohrlochs hinweist (Abb. 5.13). Hier war das Bohrloch teilweise von neuen Knochen trabekeln durchsetzt.



Abb. 5.12: Femurkondyle mit Titanpartikeln im Bohrloch in der Übersicht, Giemsa-Färbung

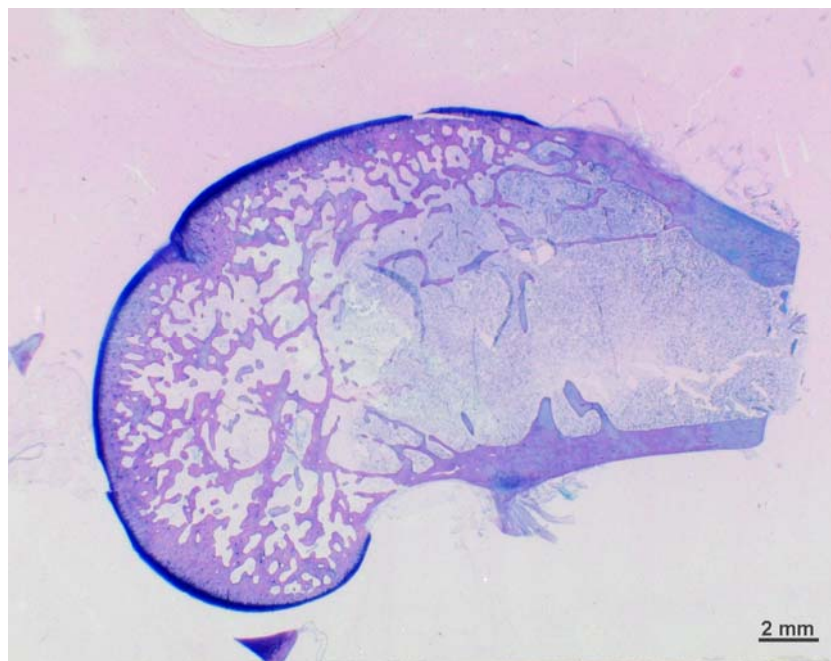


Abb. 5.13: Femurkondyle mit Bohrloch ohne Partikel

Bei mittlerer Vergrößerung erkannte man, dass sich die Partikel zum Großteil noch an der Implantationsstelle befanden und sich nur vereinzelt zwischen die angrenzenden Trabekel verteilten (Abb. 5.14). Es ist auch zu erkennen, dass sich zwischen den Titanpartikeln vereinzelt neue trabekuläre Strukturen bildeten.

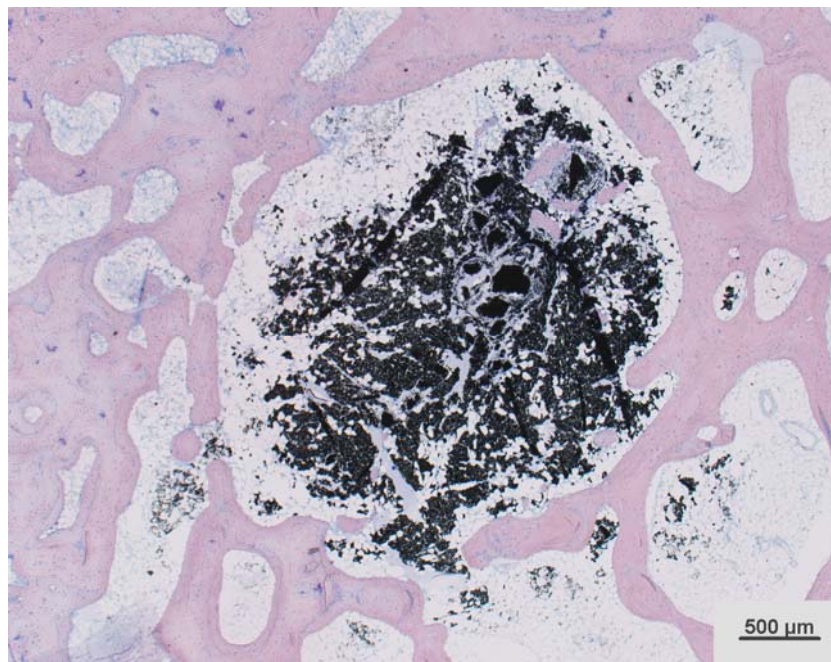


Abb. 5.14: Bohrloch bei mittlerer Vergrößerung mit Titanpartikeln, Giemsa-Färbung

In fast allen Schnitten fand man Titanpartikel auch im periösären Bindegewebe. Dies kann einerseits durch eine Verunreinigung beim Einfüllen der Partikel zustande kommen. Andererseits kann es sich dabei aber auch um einen beginnenden Abtransport der Partikel und eine lokale Ablagerung handeln. Die Partikel fand man hier in Gruppen zusammengelagert und von Fremdkörperriesenzellen umgeben, man sah aber keinen Anhalt für eine entzündliche Reaktion oder Zellnekrosen (Abb. 5.15).

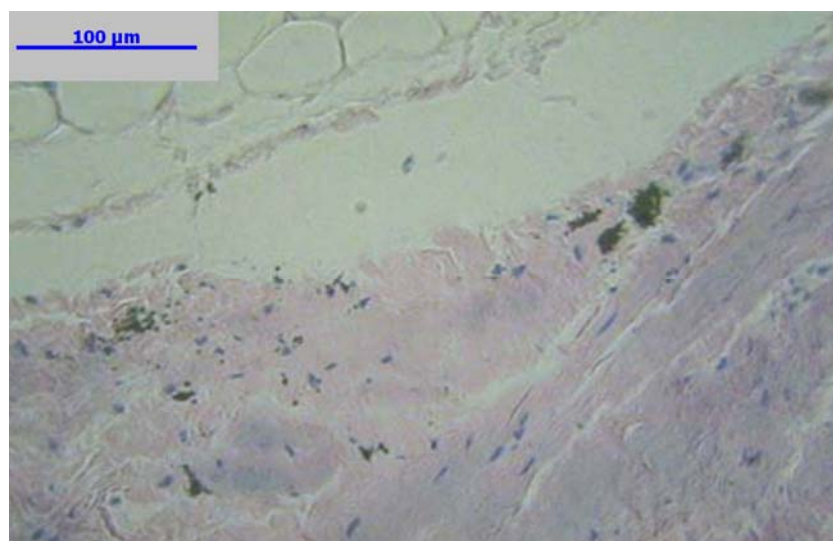


Abb. 5.15: periösäres Bindegewebe mit Titanpartikeln

Bei der Auswertung am Bildschirm erkannte man im Gegensatz zu den Schnitten der Stahltiere, dass hier kaum Fremdkörperriesenzellen und eosinophile Granulozyten vorhanden waren. Die Werte entsprachen ungefähr denen der Kontrolltiere. Die Werte sind in Tabelle 5.8 und Tabelle 5.9 dargestellt.

	Fremdkörperriesenzellen	Eosinophile Granulozyten
Mittelwert	5,53	18,38
Std.-Abw.	4,37	12,13

Tabelle 5.8: Anzahl der Fremdkörperriesenzellen und der Eosinophilen bei Titan

	Fremdkörperriesenzellen	Eosinophile Granulozyten
Mittelwert	4,48	16,64
Std.-Abw.	4,37	9,66

Tabelle 5.9: Anzahl der Fremdkörperriesenzellen und der Eosinophilen ohne Implantat

Die Partikel waren meist von einer amorphen blau angefärbten Masse umgeben, die nur vereinzelt Zellen enthält, die meist nicht mehr eindeutig identifiziert werden konnten, da sie häufig zerstört waren und sich nahtlos in die amorphe Masse einfügten. Dabei könnte es sich einerseits um bei der Präparation entstandene Artefakte handeln oder andererseits um eine pathologische Reaktion der Knochenmarkszellen auf die implantierten Partikel. Wobei man hier im allgemeinen keine Abstoßungsreaktionen auf den Abrieb erkennen kann, was sich auch daran zeigt, dass sich die Partikel auch am Rande der Trabekel ablagern, ohne von Fremdkörperriesenzellen umgeben zu sein (Abb. 5.17).

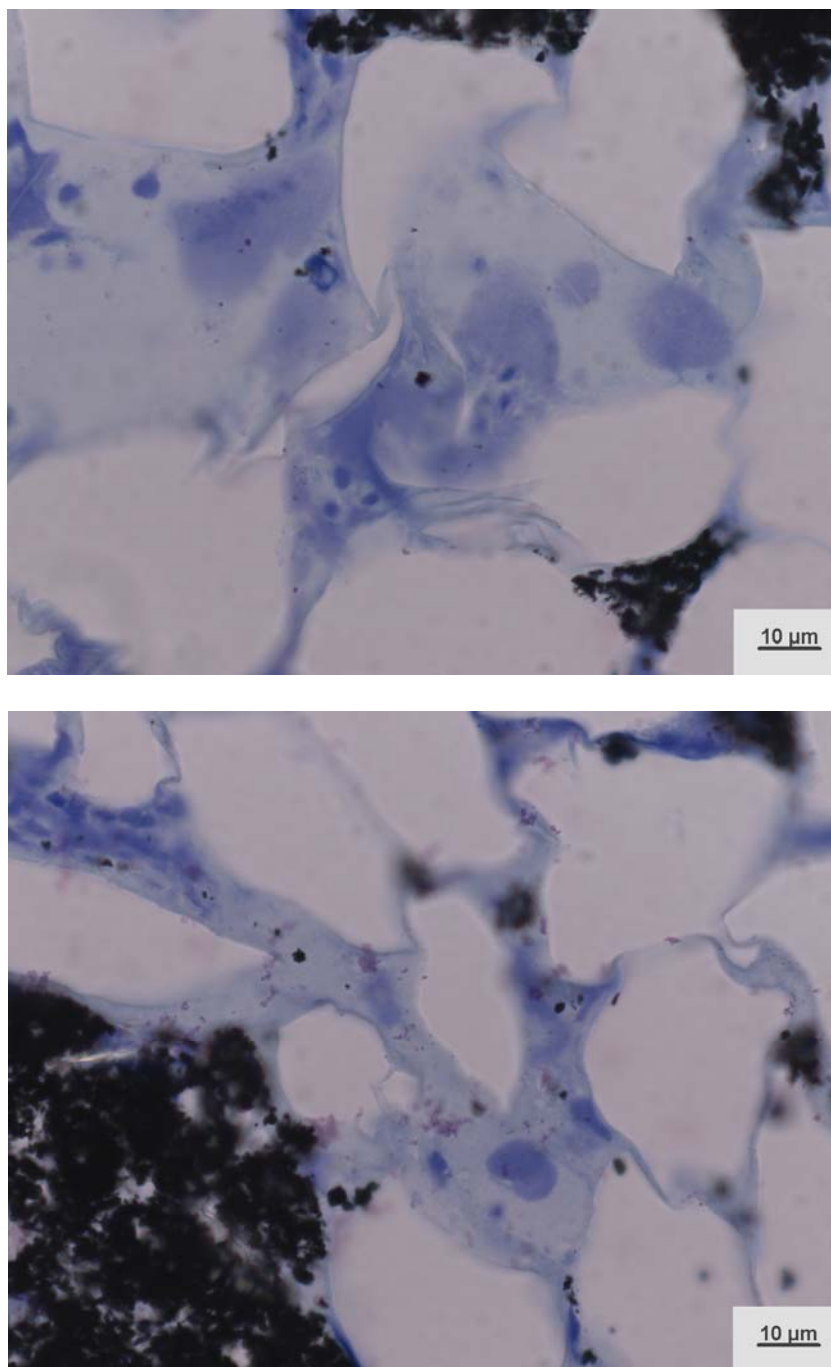


Abb. 5.16: Fibroblasten bei hoher Vergrößerung (100-er Objektiv) bei Titan, Giemsa-Färbung

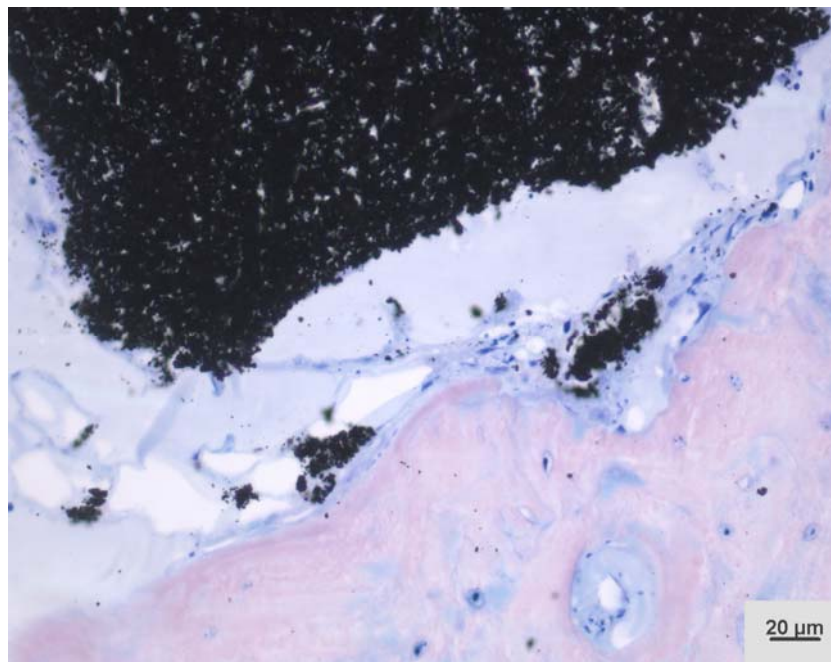


Abb. 5.17: Titanpartikel am Rande eines Trabekels (40-er Objektiv), Giemsa-Färbung

Für eine relativ gute Biokompatibilität spricht auch die Tatsache, dass sich zwischen den Partikelansammlungen neue Trabekel ausgebildet haben (Abb. 5.18), die von Partikeln umgeben sind.

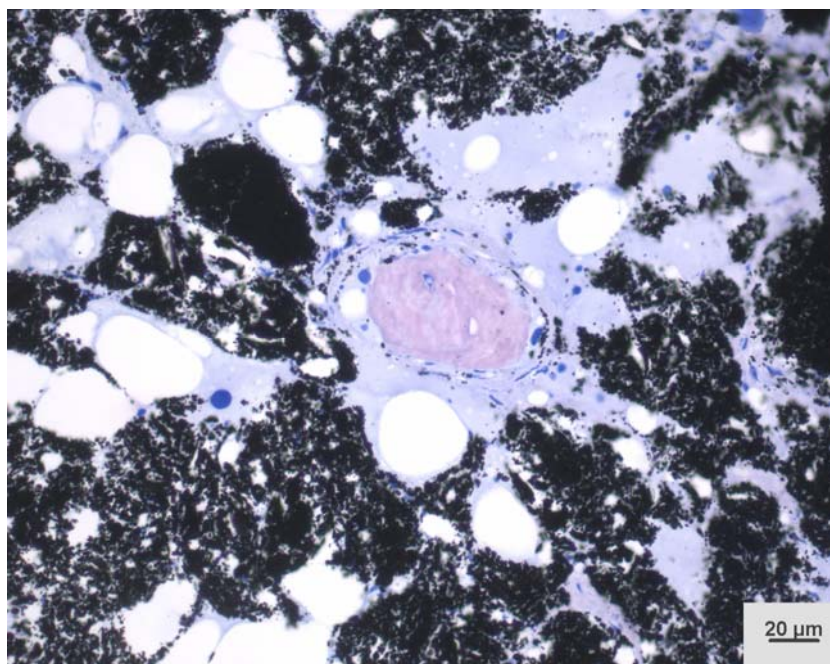


Abb. 5.18: Neugebildeter Trabekel von Titanpartikeln umgeben (40-er Objektiv), Giemsa-Färbung

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich die Partikel noch an Ort und Stelle befinden, ohne eine signifikante pathologische Reaktion im Sinne einer Abstoßungs- oder Fremdkörperreaktion auszulösen.

5.3.1.2 Knochen Stahl

Auch hier erkannte man schon makroskopisch, dass sich die Partikel noch im Bohrloch befinden. Die Bohrlöcher befanden sich alle in Kondylenmitte, d.h. komplett von Spongiosa umgeben (Abb. 5.19). Die Bohrlöcher der Kontrolltiere waren auch hier nur noch teilweise sichtbar.

Schon in der Übersichtsvergrößerung erkannte man den Unterschied zu den Knochen mit Titanpartikeln. Die Partikel erschienen hier viel größer und von viel mehr zellulärer Substanz umgeben. Dies bestätigte sich bei mittlerer Vergrößerung. Man erkannte viele Partikel, die in ihrer Größe und ihrer Form nicht unseren Erwartungen, der implantierten Partikelfraktion entsprachen, da hier die großen Partikel nur als Einzelereignisse in der Frequenzanalyse registriert wurden. Diese großen Partikel könnten bei der Herstellung durch Abbrechen von Teilen des Schraubengewindes verursacht worden sein. Außerdem ist es möglich, dass diese Partikel bei der Analyse

nicht mit untersucht wurden, da man sich auf die kleinen Partikel der Ausgangsfraction beschränkte. Man kann davon ausgehen, dass vor allem noch die großen Partikel im Bohrloch vorhanden sind und die kleineren Partikel abtransportiert wurden oder sich aufgelöst haben, bzw. ihre Ionen in Lösung gegangen sind.

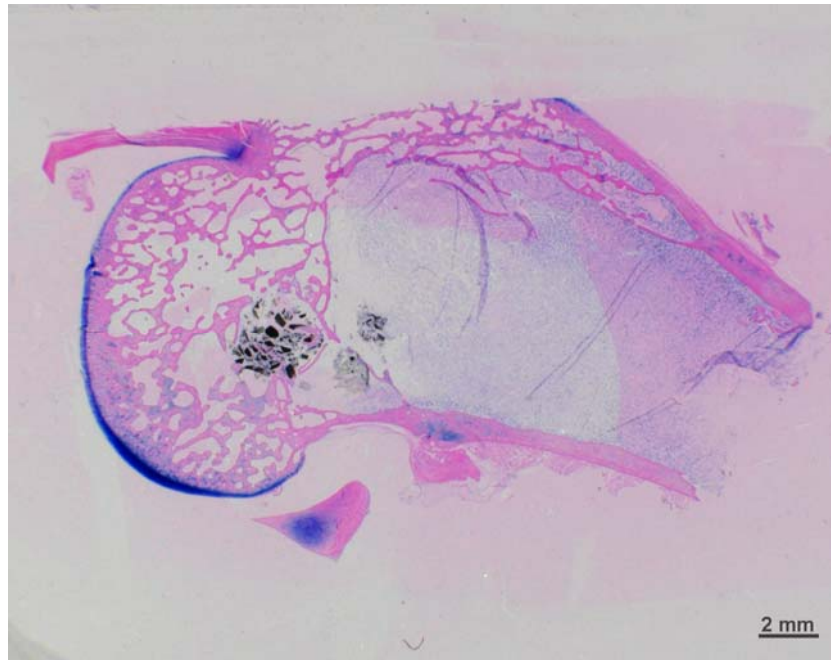


Abb. 5.19: Femurkondyle mit Stahlpartikeln in der Übersicht, Giemsa-Färbung

Die Partikel befanden sich meist noch im Bohrloch und verteilten sich nur vereinzelt ins umgebende Knochengewebe, was ebenfalls für Auflösung spricht. Die größeren Partikel waren von Fremdkörperriesenzellen umgeben, die sich wie ein Saum um die Partikel legten. Viele der kleineren Partikel wurden von Makrophagen inkorporiert, die so auch die Partikel eventuell abtransportieren können. In den Zwischenräumen der Partikel fand man auch große Ansammlungen von eosinophilen Granulozyten (Abb. 5.20) und zu Gruppen zusammen gelagerten Makrophagen, die aber lichtmikroskopisch keine Partikel enthielten (Abb. 5.21). Auch die Knochentrabekel, die an die Partikel heranreichten, waren von einem Saum aus Fremdkörperriesenzellen umgeben (Abb. 5.22)

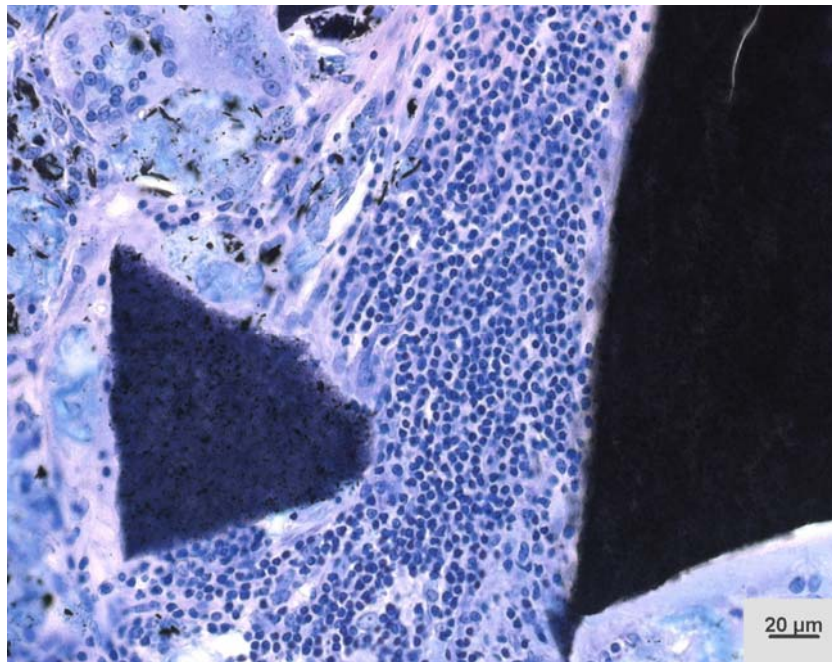


Abb. 5.20: Eosinophile Granulozyten zwischen den Stahlpartikeln (40-er Objektiv) und Fremdkörperriesenzellen um die Stahlpartikel, Giemsa-Färbung

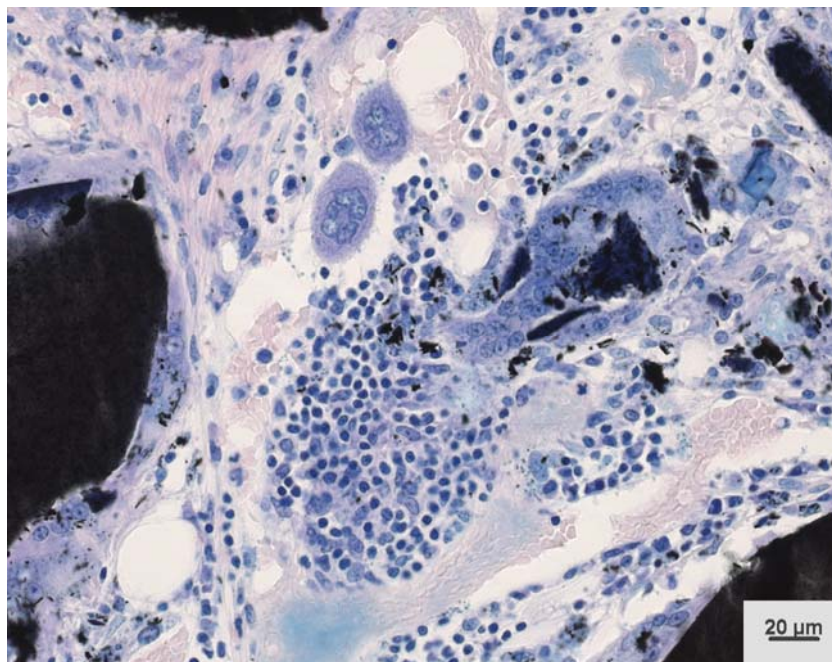


Abb. 5.21: Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen zwischen Stahlpartikeln (40-er Objektiv), Giemsa-Färbung

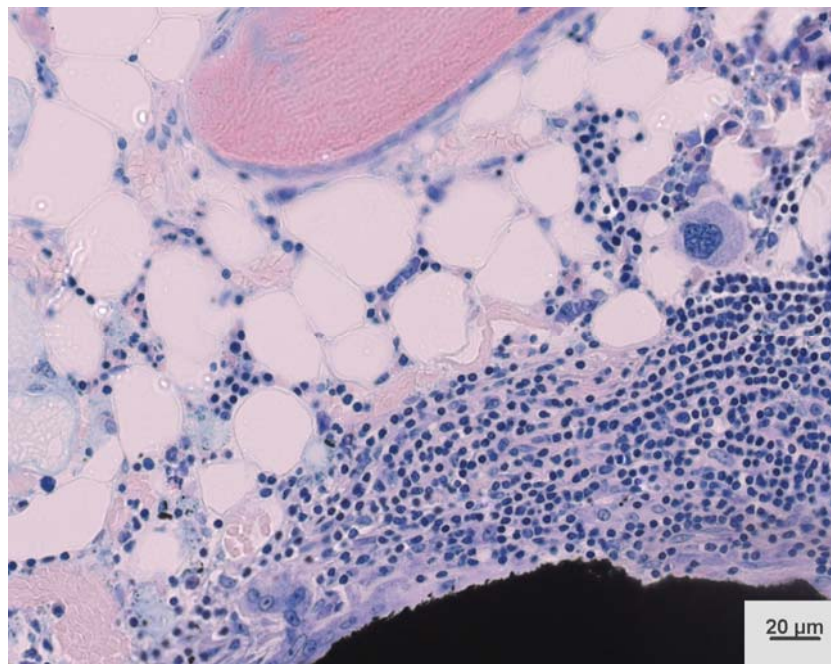


Abb. 5.22: Knochen trabekel von Fremdkörperriesenzellen umgeben (40-er Objektiv), Giemsa-Färbung

Bei der Auswertung am Bildschirm erhielt man für die eosinophilen Granulozyten eine sehr große Variation der Werte zwischen null und 1181 Zellen, der Mittelwert lag bei 233,8 Zellen und die Standardabweichung bei $\pm 214,6$ Zellen. Bei den Fremdkörperriesenzellen lagen die Werte zwischen null und 192 Zellen, der Mittelwert betrug 66,1 Zellen und die Standardabweichung $\pm 37,9$ Zellen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.10 und in Abbildung (Abb. 5.23) graphisch dargestellt.

	Fremdkörperriesenzellen	Eosinophile Granulozyten
Mittelwert	66,12	233,77
Std.-Abw.	37,94	214,59

Tabelle 5.10: Anzahl der FKRZ und der Eosinophilen um die Stahlpartikel

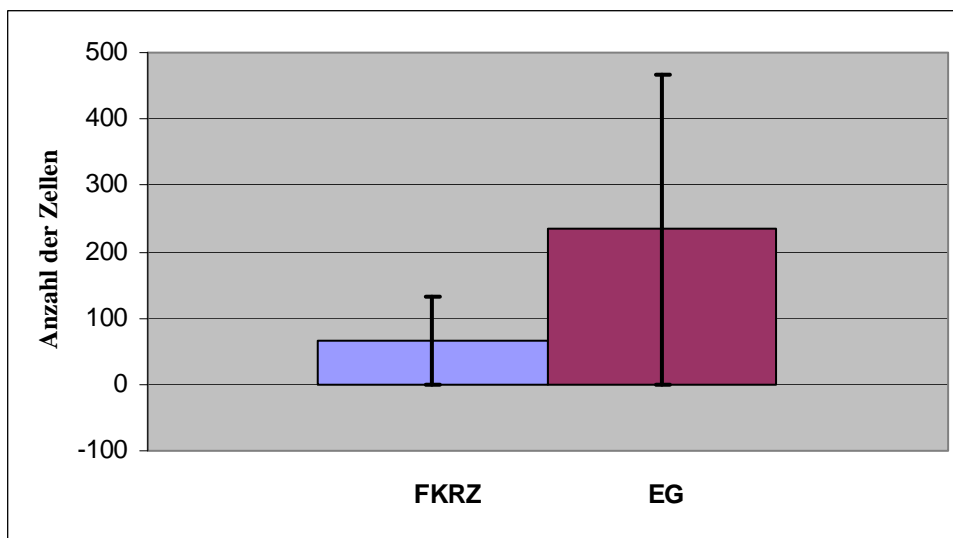


Abb. 5.23: Diagramm der Anzahl der Fremdkörperriesenzellen (FKRZ) und der Eosinophilen Granulozyten (EG) um die Stahlpartikel

Die Daten der Kontrollgruppe sind auf Seite 51 in Tabelle 5.9 aufgeführt.

5.3.1.3 Organe Titan

Bei der Übersichtsvergrößerung mit dem 2,5-er Objektiv fielen in allen Organen keinerlei pathologische Veränderungen auf. Auffallend war nur, dass die Milz in der Berlinerblau-Färbung eine massive Reaktion zeigte (Abb. 5.24). Dies deutet auf einen erhöhten Eisengehalt hin, der eventuell durch einen vermehrten physiologischen Abbau von Erythrozyten zustande gekommen sein kann. Die restlichen Organe zeigten keine Blaufärbung.

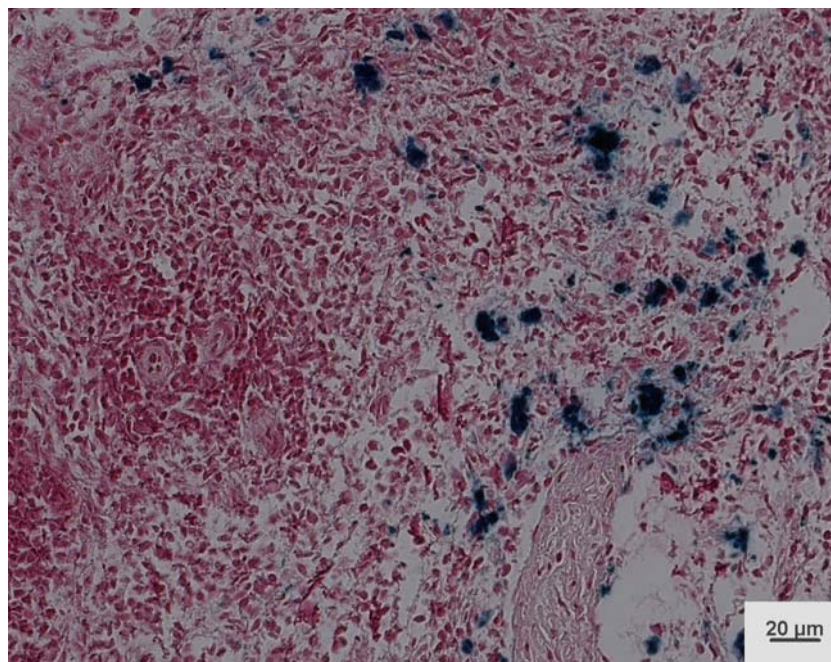


Abb. 5.24: Milz in der Berlinerblau-Färbung

Bei höherer Vergrößerung (40-er und 100-er Objektiv mit Öl) wurden nur in einem Präparat Titanpartikel wieder gefunden. Die Partikel lagen hier am Rande eines Milztrabekels, jedoch ohne eine entzündliche Reaktion in Form eines Fremdkörpergranuloms auszulösen (Abb. 5.25).

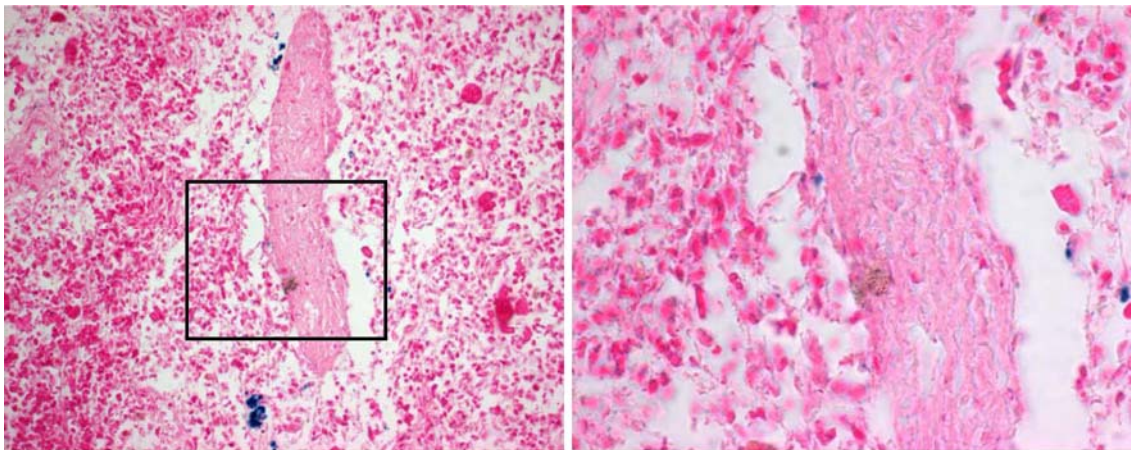


Abb. 5.25: Milz mit Titanpartikel (links 40-er Objektiv, rechts 100-er Objektiv); man erkennt in der Mitte ein Trabekel, an dessen Rand die Partikelansammlungen liegen.

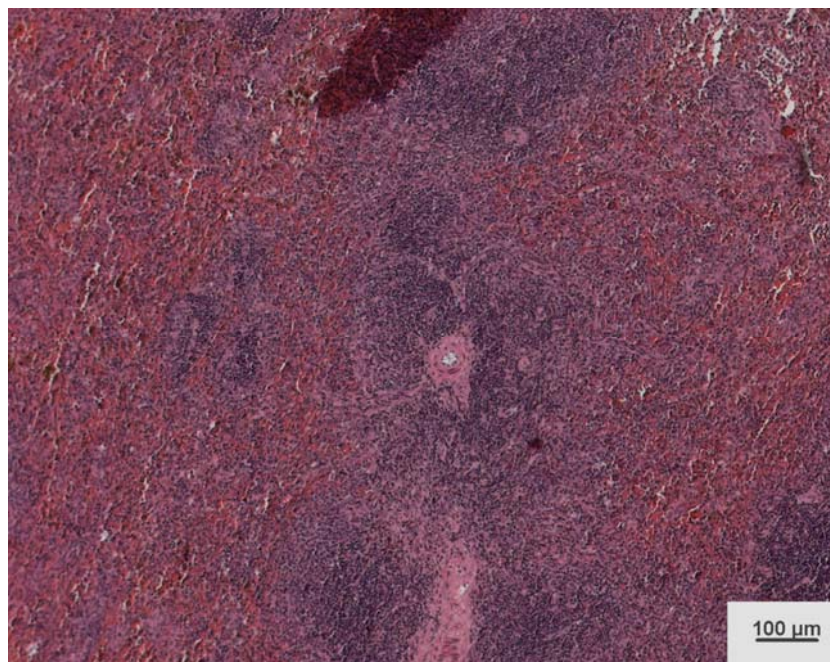


Abb. 5.26: Milz in der Übersichtsvergrößerung (10-er Objektiv), HE-Färbung

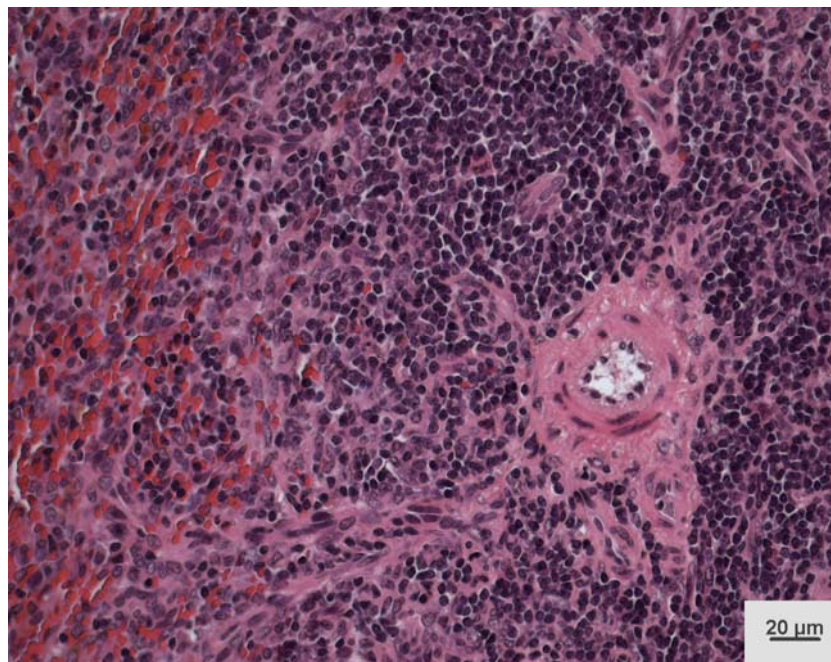


Abb. 5.27: Milz bei höherer Vergrößerung (40-er Objektiv), HE-Färbung

Eine Möglichkeit, warum lichtmikroskopisch nicht mehr vor allem einzelne von Makrophagen inkorporierte Partikel gefunden wurden, besteht darin, dass die Auflösung des Lichtmikroskops zu gering ist, um Partikel im Submikronbereich darzustellen. Weiterhin könnte es sein, dass nur die kleinen Partikel der Ausgangsfraction (mittlerer Durchmesser $0,76\mu\text{m}$) in die Zielorgane transportiert werden. Aus diesem Grund wurde die Milz noch im Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht, um festzustellen, was für Partikel transportiert wurden. Es waren aber auch keine vermehrten Ansammlungen von Makrophagen oder von Fremdkörperriesenzellen sichtbar, die auf ein eventuelles Vorhandensein von Abriebpartikeln hinweisen würden, ohne die Partikel selbst zu sehen.

In keinem der untersuchten Organe fand man Anhaltspunkte für eine pathologische Veränderung. Man fand weder nekrotische Regionen noch entzündliche Reaktionen. Histologisch stellten sich die Organe der Titantiere identisch mit denen der Kontrolltiere dar, so dass man davon ausgehen kann, dass die Titanpartikel in den hier gefundenen Konzentrationen und in der kurzen Zeit von 16 Wochen keine pathologischen Reaktionen in den Zielorganen auslösen.

5.3.1.4 Organe Stahl

In der Übersichtsvergrößerung (10-er Objektiv) konnte man auch hier keine histopathologischen Veränderungen feststellen (Abb. 5.28 + 5.29). Es bestand in der morphologischen Struktur der Organe kein Unterschied zwischen den Versuchstieren und den Kontrolltieren.

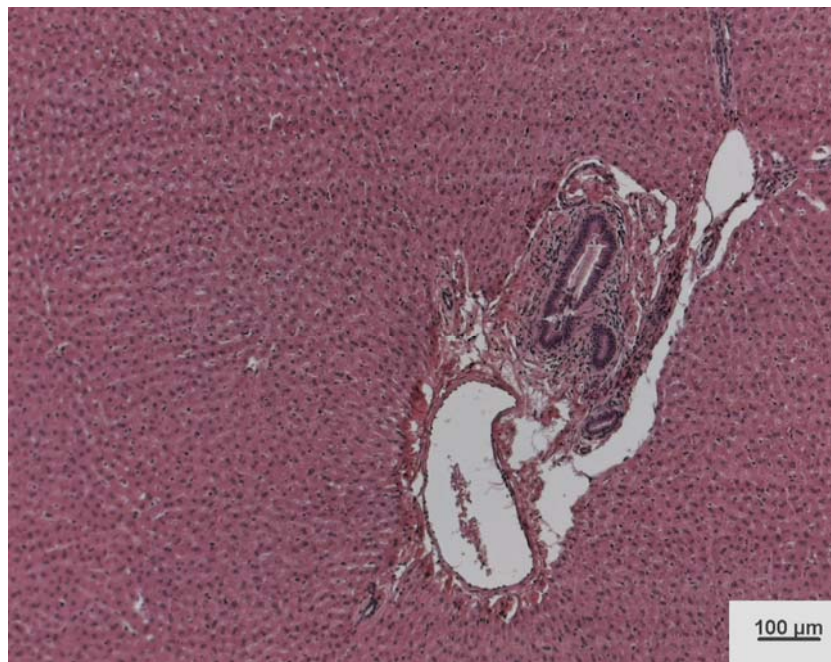


Abb. 5.28: Leber in der Übersichtsvergrößerung (10-er Objektiv), HE-Färbung

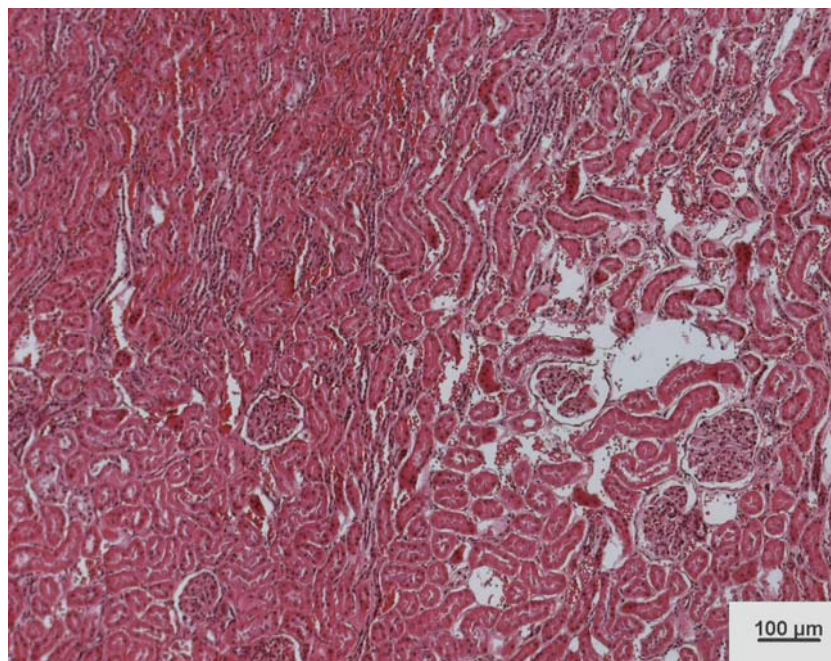


Abb. 5.29: Niere in der Übersichtsvergrößerung (10-er Objektiv), HE-Färbung

Bei der Untersuchung der Präparate mit höherer Vergrößerung (20-er Objektiv und 40-er Objektiv) wurde besonderes Augenmerk auf die Leber, die Milz und die Nieren gelenkt, also auf die Organe, bei denen mit der ICP-MS-Messung erhöhte Werte für Nickel und Chrom gemessen wurden. Bei diesen Organen sowie auch bei allen anderen Organen fielen keinerlei pathologischen Veränderungen auf, auch wurden keine Partikel

gefunden, weder in Ansammlungen noch von Makrophagen phagozytierte (Abb. 5.30 und Abb. 5.31). Auch hier gehen wir davon aus, dass die Partikel zu klein sind, um lichtmikroskopisch identifiziert zu werden oder in Lösung gegangen sind.

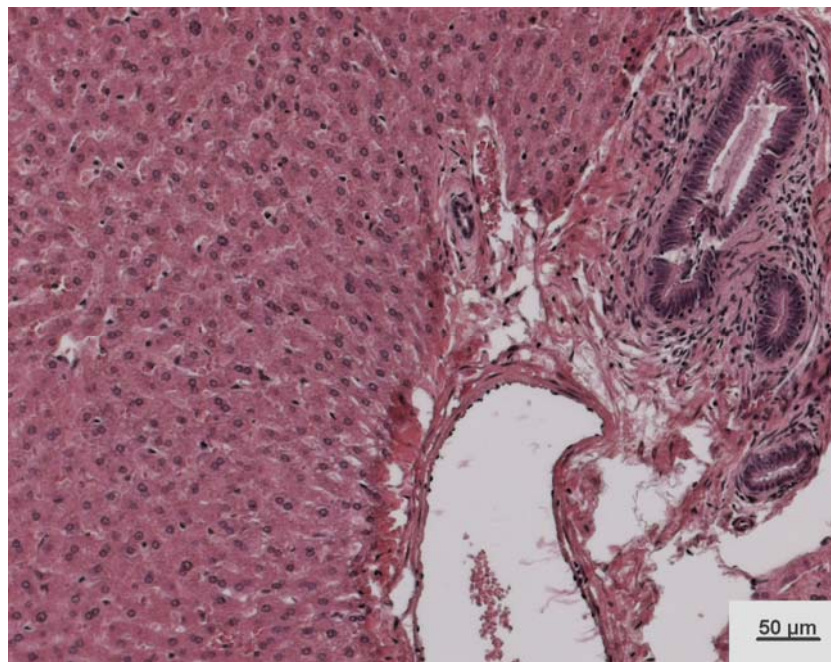


Abb. 5.30: Leber bei höherer Vergrößerung (20-er Objektiv), HE-Färbung

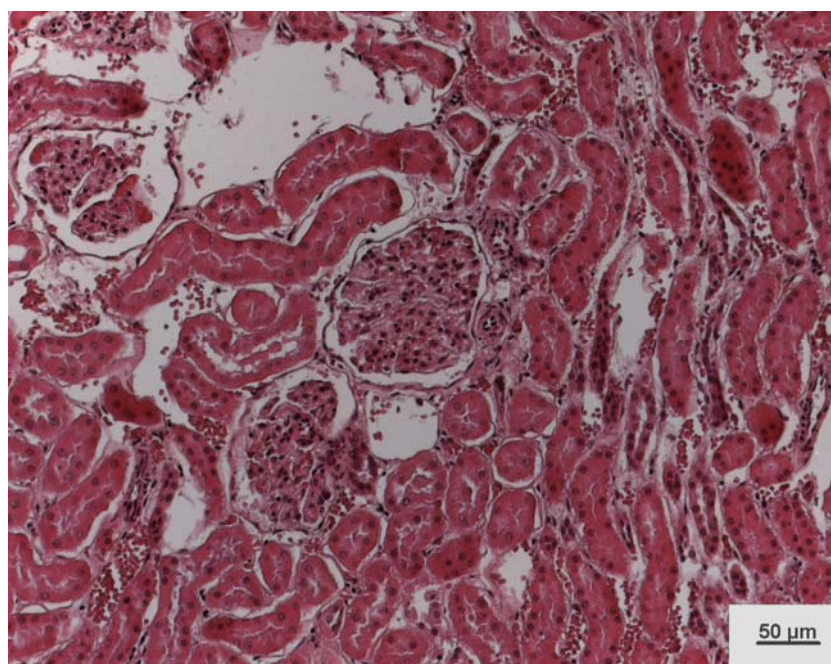


Abb. 5.31: Niere bei höherer Vergrößerung (20-er Objektiv), HE-Färbung

In allen Organen waren keine pathologischen Veränderungen in Form einer Entzündung oder Nekrose sichtbar, so dass anzunehmen ist, dass die Stahlpartikel bzw. ihre Legierungsbestandteile Nickel und Chrom in den vorhandenen Konzentrationen und während der Zeit von 16 Wochen keine Zellschädigungen in den betroffenen Organen auslösen können.

5.3.2 Rasterelektronenmikroskopie

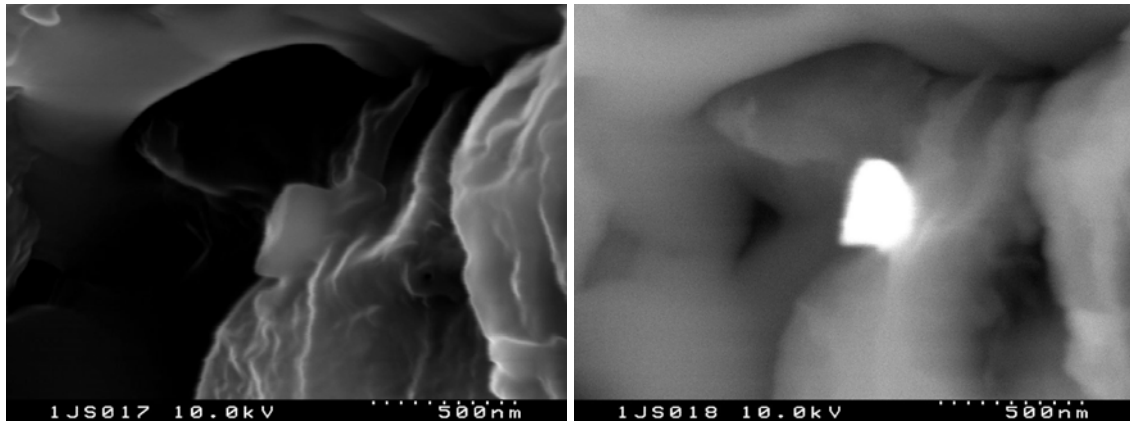


Abb. 5.32: Titanpartikel in der Milz im BSE-Modus (links) und SE-Modus (rechts)

In den untersuchten Milzen konnten 21 Partikel gefunden werden (Abb. 5.32). Die EDX-Analyse ergab, dass es sich dabei um Titanpartikel handelt. Es wurden allerdings nur sehr kleine Partikel gefunden, was die Frage aufwirft, ob nur die kleinen Partikel transportiert werden.

5.3.3 EDX-Analyse der Partikel im Bohrloch

In der durchgeführten EDX-Analyse der Titanpartikel im Bohrloch wurden nur Partikel der Ausgangsfraction identifiziert. Die Form und Größe war mit der der Ausgangsfraction vergleichbar.

Bei der Analyse der Titanpartikel an der Implantationsstelle konnten keine Verunreinigungen durch die Operationsinstrumente oder den Applikator, die größtenteils aus Edelstahl bestanden, nachgewiesen werden. Das rasterelektronenmikroskopische Bild (Abb. 5.33) zeigt die Titanpartikel im Bohrloch.

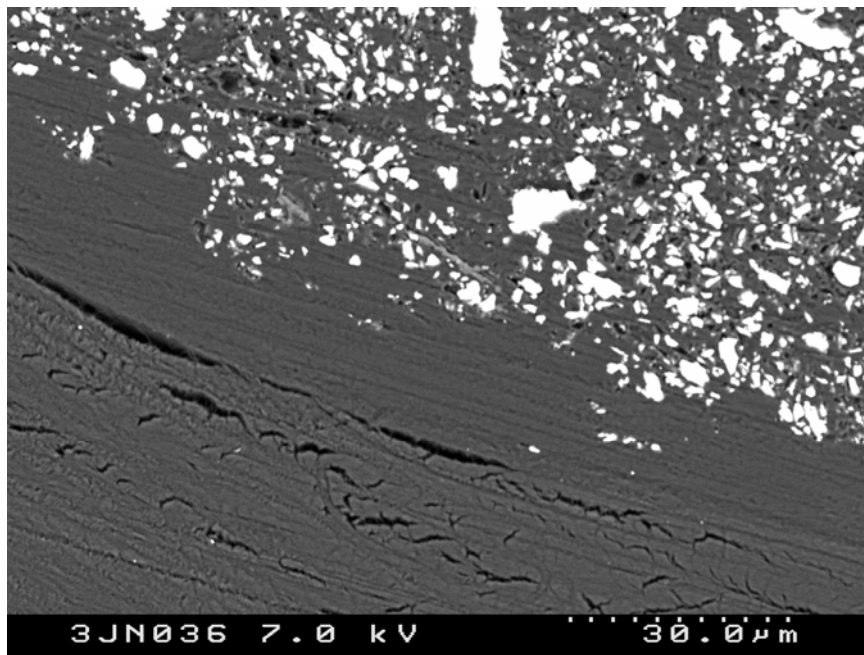


Abb. 5.33: Titanpartikel im Bohrloch

Auch bei der EDX-Analyse der Partikel der Stahlserie (Abb. 5.34) zeigten sich nur Peaks für die Elemente, die auch in der Ausgangsfraktion enthalten waren. Es konnten keine Verunreinigungen nachgewiesen werden.

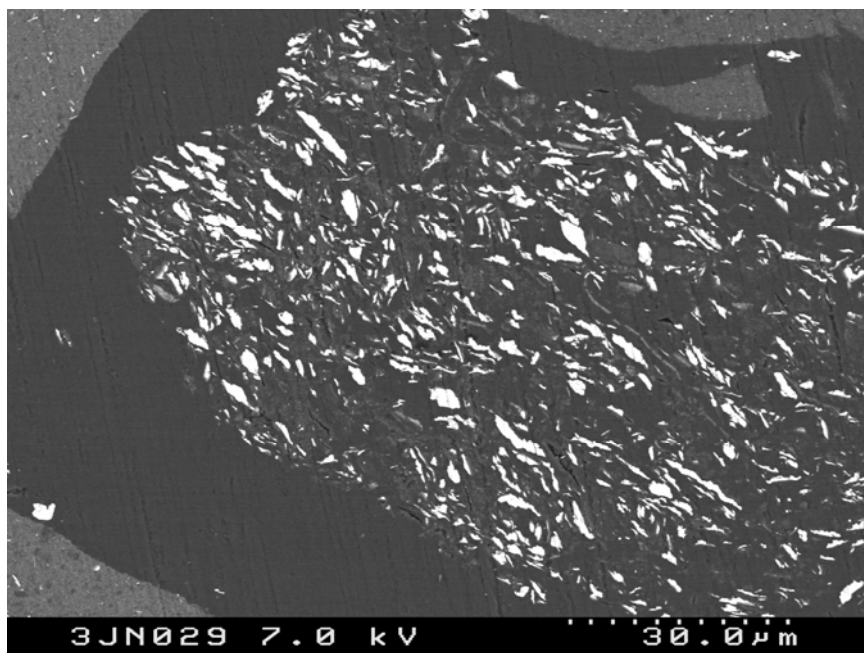


Abb. 5.34: Stahlpartikel im Bohrloch

6 DISKUSSION

6.1 Abriebpartikel

Es ist schon seit längerem bekannt, dass bei der Osteosynthese sowie der Endoprothetik Abrieb durch die Interaktion zweier Stoffe miteinander entstehen kann. So konnten bei einer Vielzahl von Revisionsoperationen oder post mortem im implantatungebenden Gewebe, aber auch in weit entfernten Organen Abriebpartikel identifiziert werden. Eine wichtige Frage dieser Studie war es, ob die Größe und die Beschaffenheit dieser Partikel eine Auswirkung auf die Reaktion des Organismus ausübt. *Ap Gwynn und Wilson* (2001) beschrieben, dass die Morphologie (Form, Oberflächenbeschaffenheit und Größe der Partikel) die biologische Antwort der Immunzellen beeinflusst. Die Fähigkeit, Partikel phagozytieren zu können, hängt stark von der Größe ab und damit verbunden auch die Immunantwort und die Biokompatibilität. So wurde ein unteres und oberes Größenlimit der Phagozytierbarkeit von Partikeln beschrieben (SHANBHAG et al 1994a). Die kleineren Partikel ($<0,15\mu\text{m}$) sind weniger entzündungsfördernd als die größeren ($>1,76\mu\text{m}$). Dies hängt mit den unterschiedlichen Aufnahmemöglichkeiten der Zelle zusammen. Die kleineren Partikel können mittels Pinozytose in die Zelle aufgenommen werden. Bei der Pinozytose handelt es sich um einen natürlichen Vorgang der Zellen, Stoffe aufzunehmen, bei dem keine entzündungsfördernden Mediatoren freigesetzt werden. Im Gegensatz dazu ist die Phagozytose der erste Schritt einer pathologischen Immunantwort, der mit der Freisetzung von verschiedenen Entzündungsmediatoren verbunden ist. Einige Studien mit Partikeln unterschiedlicher Größe haben eine Zunahme des entzündlichen Potentials bei Partikeln gefunden, die unterhalb der Phagozytosegrenze liegen (EVANS 1991, GONZALEZ et al 1996, SHANBHAG et al 1994a). Es gilt als anerkannt, dass Phagozyten runde Partikel mit einem maximalen Durchmesser von $10\text{-}15\mu\text{m}$ aufnehmen können. Auch längliche Partikel können phagozytiert werden, wenn die längste Achse $10\text{-}15\mu\text{m}$ nicht übersteigt. In unserer Studie konnten ebenfalls kleine Partikel in Makrophagen an der

Implantationsstelle nachgewiesen werden. Größere Partikel, die nicht phagozytiert werden konnten, wurden von Fremdkörperriesenzellen umschlossen.

Die Beschaffenheit von Abriebpartikeln ist Gegenstand von vielen Studien. Untersuchte Partikel, die bei Revisionsoperationen gewonnen wurden, zeigten meist (92%) eine Größe im Submikronbereich (SHANBHAG et al 1994b). Auch *Schmiedberg et al.* (1994) machten die gleichen Beobachtungen.

Ap Gwynn und Wilson (2001) entwickelten eine Methode, Abriebpartikel in ausreichender Menge in-vitro herzustellen, um sie dann charakterisieren zu können. Diese Partikel sollten natürlich den in-vivo entstandenen in Form, Größe und Oberflächenbeschaffenheit entsprechen. Auch wir wendeten diese Methode an, um die Titan- und Stahlpartikel für unsere Studie zu gewinnen. Die meisten der produzierten Partikel waren kleiner als $0,5\mu\text{m}$ wobei die Stahlpartikel allgemein kleiner waren als die Titanpartikel und eine einheitlichere Größenverteilung aufwiesen. Bis zu 20% der Titanpartikel waren im Durchmesser größer als $10\mu\text{m}$. Die Ergebnisse dieser Studie entsprechen, was die Größe und die Form anbelangt, fast genau den in-vivo bei Revisionsoperationen gefundenen Partikeln. Auch die von uns hergestellten und für die Experimente verwendeten Titan- und Stahlpartikel entsprechen den Ergebnissen von *Ap Gwynn* (2001).

Die Tatsache, dass bei Titan eine große Anzahl von Partikeln größer sind als $10\mu\text{m}$ lässt Platz für Spekulationen in Bezug auf die klinische Beobachtung, dass bei der Verwendung von reinem Titan als Implantat das implantatumgebende Gewebe häufig eine dunkle Pigmentierung aufweist. Partikel mit einer phagozytierbaren Größe können aus dem umgebenden Gewebe abtransportiert werden (CASE et al 1994). Es ist anzunehmen, dass Partikel, die über der phagozytierbaren Grenze liegen, im Gewebe akkumulieren und die beschriebene Pigmentierung hervorrufen. Da Titan im Vergleich mit anderen Materialien eine geringere Abriebfestigkeit aufweist, kann es sich dabei auch um ein quantitatives Phänomen handeln. So konnten auch wir im periostären Gewebe Titanpartikel nachweisen, die jedoch keine inflammatorische Reaktion hervorriefen.

6.2 Implantatmaterialien

Die beiden in dieser Studie verwendeten Materialien Titan und rostfreier Stahl sind die gängigsten Biomaterialien in der orthopädischen Chirurgie. Sie werden aufgrund ihrer guten physikalischen Eigenschaften sowie der geringen Korrosion in der operativen Frakturbehandlung und in der Endoprothetik verwendet.

Die beiden Materialien unterscheiden sich jedoch erheblich in ihrer Zusammensetzung voneinander. Während es sich beim implantierten Titan weitestgehend um reines Titan (commercially pure titanium) handelt, ist der rostfreie Stahl eine Legierung, deren Hauptbestandteil Eisen ist. Weitere Bestandteile sind Nickel, Chrom, Molybdän sowie in geringeren Mengen Mangan, Silizium, Kupfer und Stickstoff.

Edelstahl (stainless steel), in der Regel SS 316 L, ist bekannt wegen seiner ausgezeichneten mechanischen Belastbarkeit und seiner hohen Korrosionsbeständigkeit. Der Edelstahl erhält seinen Korrosionsschutz aufgrund einer sehr dünnen passiven Schicht, die reich an Chromoxid ist (WILLIAMS 1990, MUELLER et al 1993) und sich spontan auf der Oberfläche ausbildet. Das in der Legierung enthaltene Nickel ist ein wichtiger Faktor, der zu einem erhöhten Korrosionsschutz beiträgt.

Auch Titan ist seit mehr als 50 Jahren als Werkstoff im Bereich von Implantaten bekannt (LEVENTHAL 1951). Die mechanischen Eigenschaften des Titans hängen sehr stark von den anderen enthaltenen Elementen (Sauerstoff, Stickstoff, Kohlenstoff, Eisen und Wasserstoff) ab. So werden vier verschiedene Titan-Grade (Grad 1 bis 4 je nach Sauerstoffgehalt) für technische und biomedizinische Anwendungen unterschieden (Nach ISO 5832-2:1998). Titan hat eine ausgezeichnete Biokompatibilität, (HIERHOLZER und HIERHOLZER 1991, WILLIAMS 1994, ARENS et al 1996 und 1999, PAN et al 1997, POHLER 2000) was vor allem auch damit zusammen hängt, dass sich auf der Oberfläche des c.p. Titans unter dem Einfluss von Sauerstoff eine Dioxidschicht ausbildet, die das Metall vor weiterer Korrosion schützt. Es handelt sich dabei um einen dünnen, so genannten Passiv-Film. Dieser Film bildet sich nach einer eventuellen Zerstörung z.B. durch Abriebpartikel sofort wieder aus. Dies ist der Grund dafür, dass morphologisch keinerlei Korrosion unter Fretting-Bedingungen z.B. zwischen Titanschraube und Titanplatte gefunden werden konnte, obwohl

Abriebpartikel entstanden sind (KASEMO et al 1983, POHLER 2000). Deshalb hat besonders Reintitan den Ruf des „Goldstandards“ im Bereich der Knochenimplantate, mit hoher Biokompatibilität, Korrosionsschutz und guter Osseointegration (SOLAR 1979, WILLIAMS 1981, ALBREKTSSON 1985, KRAFT et al 2000 und 2003).

Trotz der allgemein guten Verträglichkeit der Implantate muss davon ausgegangen werden, dass Metallionen in den Körper gelangen. Die genauen Vorgänge sind schon länger bekannt (BROWN und MERRITT 1981, BROWN et al 1988b), und man differenziert hierbei fünf verschiedene Korrosionsarten für die ionale Freisetzung:

- passive Dissoziation,
- Spaltkorrosion,
- Lochfraß,
- galvanische Korrosion,
- Tribo-Korrosion

Unter *passiver Dissoziation* versteht man die mechanische Zerstörung des Oxidationsfilms auf der Implantatoberfläche bei der intraoperativen Bearbeitung und Implantation. Diese recht langsam stattfindende Korrosion führt zur allmählichen Freisetzung von Metallionen, wenn das Implantat mit den physiologischen und relativ aggressiven Körperflüssigkeiten in Kontakt kommt (MERRITT und BROWN 1996). Häufiger kommen *Spaltkorrosion* und *Lochfraß* vor, die ebenfalls signifikante Mengen an Metallionen freisetzen können. Sie entstehen aufgrund des relativ sauren Milieus im Spalt (BROWN et al 1988b). Die *galvanische Korrosion* ist bei der Verwendung verschiedener Metallpaarungen von großem Interesse. Hierbei korrodiert nur eines der Metalle, wobei bislang bei der Paarung von Edelstahl und Titanimplantaten keine Korrosion festgestellt werden konnte (BROWN und MERRITT 1981).

Den wahrscheinlich größten Anteil an der Metallionenfreisetzung hat die Entstehung von Abrieb. Dabei können nicht nur kleinste Partikel entstehen, die im umliegenden Gewebe akkumulieren, sondern die auch direkt in die Gefäßbahn gelangen. Hierbei können große Mengen an Ionen mittels passiver Dissoziation, aufgrund der dann stark

vergrößerten Oberfläche des Werkstoffes, freigesetzt werden. Des weiteren wird die Ionenfreisetzung bei phagozytierten Partikeln durch den erniedrigten pH der Zellumgebung vereinfacht (BROWN und MERRITT 1996).

Untersuchungen von *Doran et al* (1998) sowie *Shettlemore* und *Bundy* (1999) haben gezeigt, dass die Elemente Eisen, Titan, Vanadium und Titan relativ inert sind und zum jetzigen Kenntnisstand als ungefährlich eingestuft werden. Die gleichen Autoren stellten fest, dass die Metalle Nickel, Chrom, Kobalt und Molybdän einen maßgeblichen Einfluss auf die Biokompatibilität eines Implantatstoffes haben.

6.3 Lokale Reaktion

Es wurde mittlerweile in mehreren Studien (SHANBHAG et al 1994; URBAN et al 1994; WILLERT et al 1978) beschrieben, dass es durch die Entstehung von Abrieb lokal zu einer chronischen Entzündungsreaktion kommen kann. Hierbei spielen vor allem Makrophagen eine Schlüsselrolle. Durch die Aufnahme von Partikeln durch Makrophagen werden diese stimuliert und sezernieren dann Cytokine wie z.B. PGE₂ (Prostaglandin E₂), Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6), die dann wiederum Osteoklasten zur Differenzierung und somit zur Knochenresorption anregen (MURRAY und RUSHTON 1990, YANMING et al 2001). Dadurch kommt es zu Knochenabbau und der damit verbundenen Lockerung der Implantate, was dann zu weiterem Abrieb, jetzt auch vermehrt zwischen Knochen und Implantat, führt. Es beginnt damit ein Teufelskreis, der meist in einer Revisionsoperation endet, was für den Patienten mit wiederholten Klinikaufenthalten und Schmerzen verbunden ist.

In der Umgebung von Implantaten finden sich Fremdkörperreaktionen mit ein und mehrkernigen Makrophagen, bei denen frisch eingewanderte, inflammatorisch aktive von älteren partikelspeichernden Makrophagen differenziert werden können. Diese Befunde sprechen für eine chronische Entzündung mit kontinuierlicher Rekrutierung inflammatorischer Makrophagen aus dem peripheren Blut (WILLERT et al 2000). Dies entspricht auch unseren Beobachtungen. Im Bereich der Implantationsstelle fanden sich vermehrt Makrophagen mit inkorporierten Partikeln. Vor allem die Stahlpartikel waren von signifikant mehr Makrophagen umgeben als die Titanpartikel. Dies spricht für eine vermehrte inflammatorische Reaktion auf Stahlpartikel im Vergleich mit Titanpartikeln.

Im implantatumgebenden Gewebe werden die Partikel in Histiozyten und in Fremdkörperriesenzellen gespeichert. Zusätzlich werden die Partikel über das Lymphsystem abtransportiert. Falls das Lymphsystem durch den Anfall von zu vielen Partikeln überfordert ist, werden die Partikel im umgebenden Gewebe abgelagert. Dies verursacht dann eine Knochenresorption und Lockerung des Implantates (DOORN et al 1999). Bei der Revisionsoperation findet sich dann eine grau-schwarze Färbung des Gewebes: histologisch sieht man eine grau-blaue Färbung des Zytoplasmas der Histiozyten, gelegentlich mit kleinen schwarzen Punkten, die Metallpartikel darstellen.

Auch wir konnten histologisch Metallpartikel in Fremdkörperriesenzellen nachweisen. Dabei handelte es sich um kleine Partikel, die von den Fremdkörperriesenzellen phagozytiert werden konnten. Größere Partikel bzw. Agglomerate von kleineren Partikeln waren von Fremdkörperriesenzellen umgeben.

6.4 Verteilung im Körper

In der Vergangenheit wurde das Hauptaugenmerk auf die lokale Reaktion von Abriebpartikeln gelenkt. So ist vieles über die lokale Reaktion bekannt, aber nur wenig über die systemische Ausbreitung der Partikel und die systemischen Reaktionen des Körpers auf den Abrieb.

Die Abriebpartikel sind biologisch nicht inert, d.h. dass ihre Ablagerung in den lokalen Geweben (z.B. Gelenkkapsel, implantatumgebendes Bindegewebe) mit einer chronischen Entzündungsreaktion verbunden ist, die in ihrem Ausmaß von der Größe und der Zusammensetzung der Partikel, aber auch von der Dauer der Exposition abhängig ist. (AMSTUTZ et al 1992, GALANTE und ROSTOKER 1972)

In den vergangenen 15 Jahren wurden mehrere Studien zu diesem Thema durchgeführt (CASE et al 1994, CASE 1999, DOORN et al 1999, LANGKAMER et al 1992, URBAN et al 2000), die alle auf die systemische Verteilung im Körper und auf verschiedene Erkrankungen hinweisen, die in Zusammenhang mit Osteosyntheseimplantaten (Platten, Marknägel usw.), aber auch mit Hüft-/Knieendoprothesen stehen sollen, so z.B. eine allgemeine Schwächung des Immunsystems, Hepato-Splenomegalie und die Nekrose von Lymphknoten. Auch *Engh* (1997) beschreibt in seiner Studie, dass Partikel im Knochenmark gefunden wurden und damit zu Allgemeinsymptomen wie Müdigkeit, intermittierendem Fieber, Anämie und Leukopenie geführt haben. Diese Befunde unterstützen die Hypothese, dass Partikel im Körper verteilt werden und sich in weit entfernten Organen ablagern können.

Es wird aber auch von malignen Entartungen berichtet, die im Zusammenhang mit orthopädischen Implantaten stehen sollen, da die selben Werkstoffe, wenn sie inhaliert werden, Neoplasien der Lunge verursachen können. Es wurde bisher nur von 24 malignen Erkrankungen berichtet, die in Verbindung mit Hüft-/Knieimplantaten stehen sollen (GOODFELLOW 1992). Vor einigen Jahren warnten *Doran et al* (1998) vor einem Zusammenhang von Hüftimplantaten und malignen Entartungen wie z.B. Lymphomen und Leukämie.

In verschiedenen Studien (JACOBS et al 1995, LANGKAMER et al 1992, URBAN et al 1994 und 2000) konnten die schwarzen Metallabriebpartikel in den lokalen Lymphknoten, und hier häufig intrazellulär in Sinusmakrophagen, nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu fand man nur wenige Partikel in der extrazellulären Matrix. Sehr hohe Metallkonzentrationen führen in den nahegelegenen ipsilateralen Lymphknoten zu Zellnekrosen bis hin zur völligen Zerstörung. In den weiter entfernten Lymphknoten konnten keine Zellnekrosen festgestellt werden, obwohl auch hier Metallpartikel vorhanden waren. So kann man davon ausgehen, dass die pathologischen Veränderungen konzentrationsabhängig sind.

Bei unseren Untersuchungen konnten wir in den ipsilateralen poplitealen Lymphknoten keine Partikel oder erhöhte Metallkonzentrationen für Titan, Nickel oder Chrom nachweisen. Darüber hinaus haben wir aber auch keine Entzündungsreaktionen oder Zellnekrosen in den Lymphknoten gefunden, was auch dafür spricht, dass die Lymphknoten keinen Kontakt, oder nur in sehr geringer Konzentration, zu den Partikeln hatten. Dies könnte einerseits daran liegen, dass wir die Partikel aufgrund ihrer Größe im Lichtmikroskop nicht nachweisen konnten oder aber andererseits die Partikel nicht nur über das Lymphsystem transportiert werden. Eine andere Hypothese besteht darin, dass die Zeit von 16 Wochen zu kurz sein könnte, um ausgeprägte pathologische Veränderungen zu initiieren. In vergleichbaren Studien (CASE et al 1994, URBAN et al 2000) wurden vor allem Organe von Patienten mit Hüft-/oder Knieendoprothesen post mortem untersucht. Hier variierte der Untersuchungszeitraum zwischen einigen Monaten und mehreren Jahren (2 Monate bis 14 Jahre). Diese Fragen konnten abschließend mit unserem Versuchsaufbau nicht geklärt werden.

In den selben oben genannten Studien (JACOBS et al 1995, LANGKAMER et al 1992, URBAN et al 1994 und 2000) wurden die Partikel in der Milz ebenfalls in Makrophagen, in der Nähe der Milzsinus und in der roten Pulpa, der eine große Filterfunktion zukommt, gefunden.

So konnten auch bei unseren Untersuchungen erhöhte Titan und Chromkonzentrationen, jedoch keine erhöhten Nickelkonzentrationen in der Milz identifiziert werden. Lichtmikroskopisch fanden wir nur an einer Stelle im Bereich eines Milzsinus eine

Ansammlung von mehreren Titanpartikeln, aber ohne jegliche entzündliche Veränderungen. Auch in allen anderen untersuchten Milzpräparaten (Titan, Stahl und Kontrolltiere) fanden sich lichtmikroskopisch keinerlei pathologische Korrelate zu den erhöhten Metallkonzentrationen. Im Rasterelektronenmikroskop konnte man vereinzelte Titanpartikel identifizieren, die aber im Gegensatz zu unserer Ausgangsfraktion nur aus den kleinsten Partikeln bestanden, was natürlich die Frage aufwirft, ob der Transport größenabhängig ist und nur die kleinsten Partikel transportiert werden. Hierfür würde auch sprechen, dass wir unter dem Lichtmikroskop trotz einer hohen Metallkonzentration (Titan und Chrom) keine Partikel identifizieren konnten.

Auch in der Leber werden die Partikel in Makrophagen und in Kupffer-Sternzellen vor allem in den periportalen Feldern abgelagert.

Bei unseren Untersuchungen konnten auch in der Leber keine Partikel identifiziert werden, trotz deutlich erhöhter Chrom-Konzentrationen und geringgradig erhöhter Titan-Konzentrationen.

Freigesetzte Nickel-Ionen werden zwar rasch aus dem periimplantären Weichgewebe aufgenommen und über die Blutbahn und die Nieren ausgeschieden (BLACK et al 1983, BROWN et al 1988a und b), andererseits lassen sich aber ständig erhöhte Nickel-Konzentrationen im periimplantären Bindegewebe und in anderen Organen wie Leber, Milz und paraaortalen Lymphknoten nachweisen (ABREU et al 1995, PEREIRA et al 1998, URBAN et al 2000). Dies entspricht nicht ganz unseren Ergebnissen, da wir deutlich erhöhte Nickel-Konzentrationen nur in den Nieren gefunden haben und in den übrigen Organen nur diskrete Erhöhungen messbar waren. Auch hier spielt wahrscheinlich die Zeitfrage wieder eine entscheidende Rolle. Wir gehen davon aus, dass die Zeit von 16 Wochen zu kurz ist um Nickel in anderen Organen abzulagern und erhöhte Nickel-Konzentrationen in verschiedenen anderen Organen nachzuweisen. In einer vergleichbaren Studie (URBAN et al 2000) variierte der Untersuchungszeitraum im Mittel zwischen 69 und 84 Monaten.

Bei unseren Untersuchungen haben wir die höchsten Chromkonzentrationen in der Leber und in der Milz, dem Abbauort der Erythrozyten gefunden. Dies entspricht den Beobachtungen von *Merrit* et al (1984, 1989 und 1990), die beschreiben, dass das aus

den Implantaten freigesetzte Chrom nicht wie Nickel oder Molybdän rasch über die Niere ausgeschieden wird, sondern im periimplantären Bindegewebe und in Erythrozyten akkumuliert. Damit wird auch verständlich, warum wir die höchsten Chromkonzentrationen in der Milz, dem Abbauort der Erythrozyten, nachweisen konnten.

6.5 Transportwege der Partikel

Von einigen Autoren (BASLE et al 1996; CASE et al 1994; LANGKAMER et al 1992; WILLERT et al 1978) wird der Transport über das Lymphgefäßsystem als wahrscheinlich angesehen, da die höchsten Partikelkonzentrationen und die stärksten pathologischen Veränderungen in den nahen Lymphknoten (zur Implantationsstelle) gefunden wurden. Außerdem findet man die größte Anzahl an Partikeln intrazellulär in Makrophagen. So geht man davon aus, dass die Partikel an ihrem Entstehungsort von diesen Zellen phagozytiert und dann abtransportiert werden. Des Weiteren nimmt man an, dass die nahe gelegenen Lymphknoten für die primäre Immunantwort verantwortlich sind. Dazu exprimieren die aktivierten Makrophagen (durch Partikel) einen MHC-II-Komplex, der dann mit CD-4 positiven Zellen interagieren kann, um die Immunantwort zu aktivieren.

Weitere Autoren gehen andererseits davon aus, dass die Partikel über den Blutstrom abtransportiert werden können (ENGH et al 1997, SHEA et al 1997). Für den Transport über das Blutgefäßsystem spricht auch, dass man bei Patienten mit Totalendoprothesen oder nach Osteosynthese erhöhte Serum-Metallkonzentrationen findet (JACOBS et al 1995).

Außerdem wurde beschrieben (VERMES et al 2001), dass sich die lokalen Blutkapillaren unter dem Einfluss der Entzündungsreaktion aufweiten und so die Möglichkeit besteht, dass auch größere Partikel in den Blutstrom gelangen und so abtransportiert werden können (JANSSEN et al 1988). Andererseits konnte von *Kraft* et al (2001) gezeigt werden, dass die lokale Mikrozirkulation unter dem Einfluss von Abriebpartikeln total zusammen brechen kann.

6.6 Kritik

Für unsere Untersuchungen wählten wir einen Beobachtungszeitraum von 16 Wochen. Dies entspricht nicht ganz der klinischen Situation, da viele Osteosynthesematerialien über einen längeren Zeitraum im Körper belassen werden, teilweise auch lebenslang. Auch Endoprothesen verbleiben über einen längeren Zeitraum im Körper. So konnten

wir in den Organen (noch) keine pathologischen Veränderungen feststellen, wie sie von anderen Autoren beschrieben wurden. Hierfür war unser Beobachtungszeitraum vermutlich zu kurz. Andererseits konnten wir aber schon nach relativ kurzer Zeit erhöhte Metallkonzentrationen in den verschiedenen Organen nachweisen.

Des Weiteren differiert dieses Modell von der klinischen Situation. In dieser Studie wurden die Partikel in einem Bolus appliziert, wohingegen in der klinischen Situation die Partikelfreisetzung kontinuierlich und über einen längeren Zeitraum abgegeben werden. Daher kann in der klinischen Situation eine adäquate Langzeitreaktion des biologischen Systems erwartet werden. Wie bereits von *Willert* (1980) und *Chen et al* (1999) vermutet wurde, ist hier möglicherweise eine dosisabhängige Beziehung von Abrieb mit einer schwellenabhängigen Konzentration notwendig, um eine akute Entzündungsreaktion auszulösen. Zu diesem Sachverhalt lassen sich mit dem hier gewählten Studiendesign keine Aussagen treffen.

Dieser Aspekt, sowie auch die möglichen weiteren Einflüsse auf die Entzündungsreaktion, beginnend mit der Größe der Partikel, der Oberflächenbeschaffenheit und der Form, müssen in zukünftigen Studien, fokussiert auf die einzelnen Variablen, geklärt werden.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Studie war es, die Verteilung von Abriebpartikeln im Körper sowie die lokalen Auswirkungen von Abrieb verschiedener Implantatmaterialien, Titan und Stahl, unter standardisierten Bedingungen zu untersuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass sich schon nach einer Zeit von 16 Wochen erhöhte Metallkonzentrationen in entfernten Organen, wie der Milz, der Leber und der Niere nachweisen ließen. So konnte die Hypothese von *Urban* (2000) bestätigt werden. Wir konnten erhöhte Konzentrationen von Titan, sowie auch elektronenmikroskopisch Titanpartikel, in der Milz nachweisen. Titanpartikel ließen sich in den anderen Organen, so auch der Lymphknoten, nicht identifizieren.

Erhöhte Konzentrationen von Chrom und Nickel konnten in der Leber und in den Nieren nachgewiesen werden. Histologisch sah man in den betroffenen Organen, weder für Titan noch für Chrom oder Nickel, keine pathologischen Veränderungen. Hierfür war der Beobachtungszeitraum wahrscheinlich zu kurz, um schwerwiegende pathologische Auswirkungen zu sehen. Dieser Frage sollte noch in einer Langzeitstudie nachgegangen werden.

Eine weitere Frage war die lokale Auswirkung von Abriebpartikeln unterschiedlicher Materialien, die sich einerseits im Knochen, andererseits aber auch im umgebenden Bindegewebe befinden, so wie sie bei der Osteosynthese entstehen. Wir konnten einen deutlichen Unterschied zwischen Titan und Stahlpartikeln nachweisen. Die zelluläre inflammatorische Reaktion war bei Stahl deutlich ausgeprägter als bei Titan, so dass man von einer besseren Biokompatibilität von Titan ausgehen kann. Dies wurde auch schon in bisherigen Studien beschrieben. Hier bildete sich in unmittelbarer Umgebung der Titanpartikel neuer Knochen aus und es fanden sich signifikant weniger inflammatorische Zellen als bei Stahlpartikeln.

Abschließend kann man von einer deutlich besseren Biokompatibilität von Titan im Vergleich mit Stahl ausgehen, so dass Titan immer noch den „Goldstandard“ im Bereich der Osteosynthese und des Gelenkersatzes darstellt. Dies sollte im weiteren

Verlauf bei der Osteosynthese berücksichtigt werden, da eine schlechtere Biokompatibilität zum Implantatversagen beitragen kann. Bezüglich der Verteilung im Körper werden sowohl die Abriebprodukte von Stahl als auch von Titan im Körper schon nach sehr kurzer Zeit verteilt. Die Langzeitauswirkungen konnten mit unserem Versuchsaufbau nicht untersucht werden.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Abreu, A.M.; Tracana, R.B.; Carvalho, G.S.; Sousa, J.P. Determination of metal ions released from metallic biomaterials using absorption spectroscopy and microelectrodes. *Biomed Lett* 1995; 52: 133-148

Agins, H.J.; Alcock, N.W.; Bansal, M.; Salvati, E.A.; Wilson, P.D. Jr; Pellicci, P.M.; Bullough, P.G. Metallic wear in failed titanium-alloy total hip replacements. A histological and quantitative analysis. *J Bone Joint Surg* 1988; 70-A, 347-356

Albrektsson, T. The response of bone to titanium implants. *CRC, Crit. Rev. Biocomp*, 1985; 1: 53-84

Amstutz, H.C.; Campbell, P.; Kossovsky, N.; Clarke, I.C. Mechanism and clinical significance of wear debris-induced osteolysis. *Clin Orthop Rel Res* 1992; 276: 7-18

Ap Gwynn, I.; Wilson, C. Characterizing fretting particles by analysis of SEM images. *J Europ Cells Mat* 2001; 1: 1-11

Arens, S.; Schlegel, U.; Printzen, G.; Ziegler, W.J.; Perren, S.M.; Hansis, M. Influence of materials for fixation implants on local infection. An experimental study of steel vs. titanium DCP in rabbits. *J Bone Joint Surg Br* 1996; 78: 647-651

Arens, S.; Kraft, C.N.; Schlegel, U.; Printzen, G.; Perren, S.M.; Hansis, M. Susceptibility to local infection in biological internal infection. Experimental study of open vs. minimally invasive plate osteosynthesis in rabbits. *Arch Orthop Traum Surg* 1999; 119: 82-85

- Baslé, M.F.; Bertrand, G.; Guyetant, S.; Chappard, D.; Lesourd, M.** Migration of metal and polyethylene particles from articular prostheses may generate lymphadenopathy with histiocytosis. *J Biomed Mater Res* 1996; 30: 157-164
- Black, J.; Maitin, E.C.; Gelman, H.; Morris, D.M.** Serum concentrations of chromium cobalt and nickel after total hip replacement: a six month study. *Biomaterials* 1983; 4: 160-164
- Black, J.; Sherk, H.; Bonini, J.; Rostocker, W.R.; Schajowicz, F.; Galante, J.O.** Metallosis associated with a stable titanium-alloy femoral component in total hip replacement. A case report. *J Bone Joint Surg* 1990; 72-A, NO 1, January: 126-130
- Black, J.** In vitro and in vivo corrosion of chromium passivated alloys and some biological consequences. In: Kovacs P, Istephanous NS, eds., *Compatibility of Biomedical Implants. Proceedings of the 185th Meeting of the Electrochemical Society, Vol. 95-15, San Francisco 1994: 35-41*
- Brown, S.A.; Merrit, K.** Metal allergy and metallurgy. In: Weinstein, A., Gibbons, D., Brown, S., Ruff, W., eds., *Implant Retrieval: Material and Biological Analysis*. Washington: NBS SP 601; 1981: 299-321
- Brown, S.A.; Farnsworth, L.J.; Merrit, K.; Crowe, T.D.** Biological significance of metal ion release. In: Lemons, J.E., ed., *Quantitative Characteristics and Performance of Porous Implants*. Philadelphia: ASTM-STP953; 1988a: 163-181
- Brown, S.A.; Farnsworth, L.J.; Merrit, K.; Crowe, T.D.** In-vitro and in-vivo metal ion release. *J Biomed Mater Res* 1988b; 22: 321-338
- Case, C.P.; Langkamer, V.G.; James, C.; Palmer, M.R.; Kemp, A.J.; Heap, P.F.; Solomon, L.** Widespread dissemination of metal debris from implants. *J Bone Joint Surg* 1994; 76-B, No. 5, September: 701-712

- Case, P.** Accumulation of wear debris in the human body in *METASUL- a Metal-on-Metal Bearing*, 1999; C. Riecker (Edt.), ISBN 3-456-83048-3: 133-148
- Charnley, J.; Halley, D.K.** Rate of wear in total hip replacement. *Clin Orthop* 1975; 112: 170-179
- Chen, F.S.; Scher, D.M.; Clancy, R.M.; AyeshaV-Y.; DiCesare, P.E.** In vitro and in vivo activation of polymorphonuclear leucocytes in response to particulate debris. *J Biomed Mater Res* 1999; 48: 904-912
- Cooper, R.A.; McAllister, C.M.; Borden, L.S.; Bauer, T.W.** Polyethylene debris-induced osteolysis and loosening in uncemented total hip arthroplasty. A cause of late failure. *J Arthroplasty* 1992; 7: 285-290
- Disegi, J.A.; Eschbach, L.** Stainless steel in bone surgery. *Injury* 2000; Vol. 31, Suppl. 4: S-D 2-6
- Doorn, P.F.; Campbell, P.; Amstutz, H.C.** Particle disease in metal-on-metal total hip replacement in *METASUL- a Metal-on-Metal Bearing*, 1999; C. Riecker (Edt.), Bern; ISBN 3-456-83048-3: 113-120
- Doran, A.; Law, F.C.,; Allen, M.J.; Rushton, N.** Neoplastic transformation of cells by soluble but not particulate forms of metals used in orthopaedic implants. *Biomaterials* 1998; 19: 751-759
- Dorr, L.D.; Bloebaum, R.; Emmanuel, J.; Meldrum, R.** Histologic, biochemical, and ion analysis of tissue and fluids retrieved during total hip arthroplasty. *Clin Orthop* 1990; 261: 82-95
- Elke, R.** Partikelkrankheit. *Der Orthopäde* 2001; 30: 258-265
- Engh, C.A.; Moore, K.D.; Vinh, T.N.; Engh, G.A.** Titanium prosthetic wear debris in remote bone marrow. *J Bone Joint Surgery* 1997; 79-A, No. 11, November: 1721-25

- Evans, E.J.** Toxicity of hydroxyapatite in vitro-the effect of particle-size. *Biomaterials* 1991; Vol.12, 574-576
- Fraker, A.** Surface preparation and corrosion behaviour of titanium alloys for surgical implants. In: *Titanium alloys in surgical implants ASTM STP 796*, American Society for Testing and Materials 1983: 206-289
- Fraker, A.** Corrosion of metallic implants and prosthetic devices. In: *Metals Handbook, 9th ed., Vol. 13-Corrosion. Ohio: ASM International 1987: 1324-1335*
- Galante, J.O.; Rostocker, W.** Corrosion-related failures in metallic implants. An experimental study. *Clin Orthop Rel Res* 1972, No. 86, July-August: 237-244
- Galante, J.O.; Lemons, J.; Spector, M.; Wilson, P.D.; Wright, T.M.** The biologic effect of implant materials. *J Orthop Res* 1991; 9: 760-775
- Glant, T.T.; Jacobs, J.J.** Response of three murine macrophage populations to particulate debris: bone resorption in organ cultures. *J Orthop Res* 1994; 12: 720-731
- Goldring, S.R.; Schiller, A.L.; Roelke, M.; Rourke, C.M.; O'Neill, D.A.; Harris, W.H.** The synovial-like membrane at the bone-cement interface in loose total hip replacements and its proposed role in bone lysis. *J Bone Joint Surg Am* 1983; 65: 575-584
- Gonzalez, O.; Smith, R.L.; Goodman, S.B.** Effect of size, concentration, surface-area and volume of polymethylmethacrylate particles on human macrophages in-vitro. *J Biomed Mat Res* 1996; 30: 463-473
- Goodfellow, J.** Malignancy and joint replacement. *J Bone Joint Surg Br* 1992; 74: 645
- Harris, W.H.; Schiller, A.L.; Scholler, J.M.; Freiberg, R.A.; Scott, R.** Extensive localized bone resorption in the femur following total hip replacements. *J Bone Joint Surg Am* 1976; 58: 612-618

- Hierholzer, S.; Hierholzer, G.** Osteosynthese und Metallallergie. Klinische Untersuchungen, Immunologie und Histologie des Implantatlagers. *In: Traumatologie Aktuell. Stuttgart, New York, Thieme Medical Publishers 1991*
- Howie, D.W.**, Tissue response in relation to type of wear particle around failed hip arthroplasties. *J Arthroplasty 1990; 5: 337-348*
- Jacobs, J.J.; Skipor, A.K.; Black, J.; Urban, R.M.; Galante, J.O.** Release and excretion of metal in patients who have a total hip-replacement component made of titanium-base alloy. *J Bone Joint Surg Am 1991; 73: 1475-86*
- Jacobs, J.J.; Urban, R.M.; Gilbert, J.L.; Skipor, A.K.; Black, J.; Jasty, M.; Galante, J.O.** Local and distant products from modularity. *J Clin Orthop 1995; 319: 94-105*
- Jacobs, J.J.; Gilbert, J.L.; Urban, R.M.** Corrosion of metal orthopaedic implants. *J Bone Joint Surg Am 1998; 80-A: 268-282*
- Jacobs, J.J.; Skipor, A.K.; Jones, D.M.; Marsch, J.L.; Nepola, J.V.; Urban, R.M.** Osteolysis and serum chromium elevations in patients with modular femoral intramedullary nails. *45th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, February 1-4, Anaheim, California 1999, p.965*
- Janssen, H.F.; Robertson, W.W.; Berlin, S.** Venous drainage of the femur permits passage of 100µm particles. *J Orthop Res 1988; 5: 671-675*
- Kasemo, B.** Biocompatibility of titanium implants: Surface science aspects. *J Prosth Dent 1983; Vol. 49, No. 6: 832-837*
- Kohilas, K.; Lyons, M.; Lofthouse, R.; Frondoza, C.G.; Jinnah, R.; Hungerford, D.S.** Effects of prosthetic titanium wear debris on mitogen-induced monocyte and lymphoid activation. *J Biomed Mater Res 1999; 47: 95-103*

- Kraft, C.N.; Hansis, M.; Arens, S.; Menger, M.D.; Vollmar, B.** Striated muscle microvascular response to silver implants: a comparative in vivo study with titanium and stainless steel. *J Biomed Mater Res* 2000; 49: 192-199
- Kraft, C.N.; Burian, B.; Diedrich, O.; Wimmer, M.A.** Implications of orthopaedic fretting corrosion particles. *J Mat Sci: Mat Med* 2001; 12: 1057-1062
- Kraft, C.N.; Diedrich, O.; Burian, B.; Schmitt, O.; Wimmer, M.A.** Microvascular response of striated muscle to metal debris. *J Bone Joint Surg* 2003; 85-B: 133-141
- Langkamer, V.G.; Case, C.P.; Heap, P.; Taylor, A.; Collins, C.; Pearse, M.; Solomon, L.** Systemic distribution of wear debris after hip replacement. A cause for concern? *J Bone Joint Surg* 1992; 74-B, No. 6, November: 831-839
- Lee, J-M.; Salvati, E.A.; Betts, F.; DiCarlo, E.F.; Doty, S.B.; Bullough, P.G.** Size of metallic and polyethylene debris particles in failed cemented total hip replacements. *J Bone Joint Surg Br* 1992; 74: 380-384
- Leventhal, G.** Titanium, a metal for surgery, *J Bone Joint Surg Am* 1951; 33: 475-480
- Merritt, K.; Brown, S.A.; Sharkey, N.A.** The binding of metal salts and corrosion products to cells and proteins in vitro. *J Biomed Mater Res* 1984; 18: 1005-1015
- Merritt, K.; Crowe, T.D.; Brown, S.A.** Elimination of nickel, cobalt, and chromium following repeated injections of high dose metal salts. *J Biomed Mater Res* 1989; 23: 845-862
- Merritt, K.; Wenz, L.M.; Brown, S.A.** Cell association of fretting corrosion products generated in a cell culture. *J Orthop Res* 1991; 9: 289-296
- Merritt, K.; Brown, S.** Distribution of cobalt chromium wear and corrosion particles and biologic reactions. *Clin Orthop* 1996; 329: 233-243

- Moreland, J.R.;** Mechanisms of failure in total knee arthroplasty. *Clin Orthop Rel Res* 1988; 266: 49-64
- Muller, A.W.J.; Maessen, F.J.M.J.; Davidson, C.L.** Determination of the corrosion rates of six dental NiCrMo alloys in an artificial saliva by chemical analysis of the medium using ICP-AES. *Dent Mater* 1993; 6: 63-66
- Murray, D.W.; Rushton, N.** Macrophages stimulate bone resorption when they phagozytose particles. *J Bone Joint Surg* 1990; 72-B, No. 6, November: 988-92
- Murray, D.W.; Rushton, N.** Mediators of bone resorption around implants. *J Clin Orthop Rel Res* 1992; 281: 295-303
- Pan, J.; Leygraf, C.; Thierry, D.; Ektessabi, A.M.** Corrosion resistance for biomaterial applications of TiO₂ films deposited on titanium and stainless steel by ion-beam-assisted sputtering. *J Biomed Mater Res* 1997; 35: 309-318
- Pereira, M.C.; Pereira, M.L.; Sousa, J.P.** Evaluation of nickel toxicity on liver, spleen, and kidney of mice after administration of high-dose metal ion. *J Biomed Mater Res* 1998; 40: 40-47
- Pohler, O.E.M.** Unalloyed titanium for implants in bone surgery. *Injury* 2000; Vol. 31: Suppl. 4: 7-13
- Rae, T.** A study on the effects of particulate metals of orthopaedic interest on murine macrophages in vitro. *J Bone Joint Surg Br* 1975; 57: 444-450
- Riede, U.N.; Rüedi, T.; Limacher, F.** Quantitative und morphologische Erfassung der Gewebereaktion auf Metallimplantate (Osteosynthesematerial). *Arch Orthop Unfall-Chir* 1974; 79: 205-215
- Rüedi, T.; Perren, S.M.; Pohler, O.; Riede, U.** Titan, Stahl und deren Kombinationen in der Knochenchirurgie. *Langenbecks Arch Chir Suppl Chir Forum* 1975: 395-398

- Schmidt, C.; Ignatius, A.A.; Claes, L.E.** Proliferation and differentiation parameters of human osteoblasts on titanium and steel surfaces. *J Biomed Mat Res* 2000; 54: 209-215
- Schmiedberg, S.K.; Chang, D.H.; Frondoza, C.G.; Valdevit, A.D.C.; Kostuik, J.J.** Isolation and characterization of metallic wear debris from a dynamic intervertebral disc prosthesis. *J Biomed Mat Res* 1994; 28: 1277-1288
- Semlitsch, M.; Staub, F.; Weber, H.** Titanium-aluminium- niobium alloy, development for biocompatible, high strength surgical implants. *Biomed Tech* 1985; 30: 334-339
- Shanbhag, A.S.; Jacobs, J.J.; Black, J.; Galante, J.O.; Glant, T.T.** Macrophage/particle interactions: effect of size, composition and surface area. *J Biomed Mater Res* 1994; 28: 81-90 (1994a)
- Shanbhag, A.S.; Jacobs, J.J.; Glant, T.T.; Gilbert, J.L.; Black, J.; Galante, J.O.** Composition and morphology of wear debris in failed uncemented hip-replacement. *J Bone Joint Surg Br* 1994; 76B: 60-67 (1994b)
- Shea, K.G.; Lundeen, G.A.; Bloebaum, R.D.; Bachus, K.N.; Zou, L.** Lymphoreticular dissemination of metal particles after primary joint replacements. *J Clin Orthop Rel Res* 1997; 338: 219-226
- Shettleworth, M.G.; Bundy, K.J.** Toxicity measurement of orthopaedic implant alloy degradation products using a bioluminescent bacterial assay. *J Biomed Mater Res* 1999; 45: 395-403
- Solar, R.** Corrosion resistance of titanium surgical implant alloys: a review. In: *Corrosion and degradation of implant materials. ASTM STP 684, American Society for Testing and Materials, 1979: 259-273*
- Sun, Z.L.; Wataha, C.; Hanks, C.T.** Effects of metal ions on osteoblast-like metabolism and differentiation. *J Biomed Mater Res* 1997; 34: 29-37

- Tsutsui, T.; Kawaguchi, H.; Fujino, A.; Sakai, A.; Kaji, H.** Exposure of macrophage-like cells to titanium particles does not affect bone resorption, but inhibits bone formation. *J Orthop Sci* 1999; 4: 32-38
- Ungethüm, M.; Winkler-Gniewek, W.** Toxikologie der Metalle und Biokompatibilität metallischer Implantatstoffe. *Z Orthop* 1984; 122: 99-105
- Urban, R.M.; Jacobs, J.J.; Gilbert, J.L.; Galante, J.O.** Migration of corrosion products from modular hip prostheses. Particle microanalysis and histological findings. *J Bone Joint Surg Am* 1994; 76: 1345-1359
- Urban, R.M.; Jacobs, J.J.; Tomlinson M.J.; GavriloVIC, J.; Black, J.; Peoc'h, M.** Dissemination of wear particles to the liver, spleen and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee replacement. *J Bone Joint Surg* 2000; 82-A; No. 4, April: 457-76
- Vermes, C.; Chandrasekaran, R.; Jacobs, R.R.; Galante, J.O.; Roebuck, K.A.; Glant, T.T.** The effects of particulate wear debris, cytokines and growth factors on the functions of MG-63 osteoblasts. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83: 201-211
- Visuri, T.; Koskenvuo, M.** Cancer risk after McKee-Farrar total hip replacement. *Orthopedics* 1991; 14 (2): 137-142
- Willert, H.G.** Reactions of the articular capsule to wear products of artificial joint prostheses. *J Biomed Mater Res* 1977; 11: 157-164
- Willert, H.G.** Die Reaktionen des Gewebes auf Verschleißprodukte von Gelenk-Endoprothesen der oberen Extremitäten. *Orthopäde* 1980; 9: 94-107
- Willert, H.G.; Buchhorn, G.H.; Fayyazi, A.; Lohmann, C.H.** Histopathologische Veränderungen bei Metall/Metall-Gelenken geben Hinweise auf eine zellvermittelte Überempfindlichkeit. Vorläufige Untersuchungsergebnisse von 14 Fällen. *Osteologie* 2000; Band 9, Heft 3: 165-179

- Willert, H.G.; Ludwig, J.; Semlitsch, M.** Reaction of bone to metacrylate after hip arthroplasty: A long-term gross, light microscopic and scanning electron microscopic study. *J Bone Joint Surg Am* 1974; 56: 1368-1382
- Willert, H.G.; Semlitsch, M.; Buchhorn, G.; Kriete, U.** Materialverschleiß und Gewebereaktion bei künstlichen Gelenken. *Orthopäde* 1978, 7; 62-83
- Williams, D.F. Meachim G.** A combined metallurgical and histological study of tissue-prosthesis interactions in orthopaedic patients. *J Biomed Mater Res* 1974; 8: 1-9
- Williams, D.F.** Corrosion of implant materials. *Ann Rev Mat Sci* 1976; 6: 237-266
- Williams, D.F.** Toxicology of implanted metals. Fundamental Aspects of Biocompatibility. In: *Williams DF, ed., CRC Series in Biocompatibility, Vol. II. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1981: 45-61*
- Williams, D.F.** Encyclopaedia of Medical and Dental Materials. *Oxford: Pergamon Press* 1990
- Williams, D.F.** Titanium: epitome of biocompatibility or cause for concern? *J Bone Joint Surg Br* 1994; 76: 348-349
- Wilson, C.** In vitro biocompatibility evaluation and morphological description of fretting wear debris from orthopaedic implant materials. *Ph.D. thesis, Institute of Biological Sciences of the University of Wales & AO/ASIF Research Institute* 1999;: 30-35 und 126-161
- Winter, G.D.** Tissue reactions to metallic wear and corrosion products in human patients. *J Biomed Mater Res* 1974; 8: 11-26
- Winter, G.D.** Wear and corrosion products in tissue and the reactions they provoke. In *Williams D, ed. Biocompatibility of Implant Materials. London, Sector, 1976; 28-39*

- Witt, J.D.; Swann, M.** Metal wear and tissue response in failed titanium alloy total hip replacements, *J Bone Joint Surg Br* 1991; 73: 559-563
- Yanming, B.; Van de Motter, R.R.; Ragab, A.A.; Goldberg, V.M.; Anderson, J.M.; Greenfield, E.M.** Titanium particles stimulate bone resorption by inducing differentiation of murine osteoclasts. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83-A, No. 4: 501-508
- Yao, J.L.; Glant, T.T.; Mikeca, K.; Jacobs, J.J.; Hutchinson, N.I.; Hoerrner, L.A.; Uo, M.; Watari, F.; Yokoyama, A.; Matsuno, H.; Kawasaki, T.** Dissolution of nickel and tissue response observed by X-ray scanning analytical microscopy. *Biomaterials* 1999; 20: 747-55

9 DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. med. habil. Dr. Ing. W. Plitz, Leiter des Instituts für Biomechanik an der Ludwig Maximilian Universität München danke ich für die Möglichkeit an seinem Institut und unter seiner Ägide zu promovieren.

Herrn Dipl. Ing. Dr. M. Wimmer, inzwischen Leiter der Abteilung für Tribologie am Department für Orthopaedic Surgery an der RUSH-University in Chicago (USA) danke ich für die Überlassung des Themas sowie für seine freundliche Unterstützung und die Zeit, die er in meine Arbeit investierte.

Herrn Professor Dr. sc. Techn. E. Schneider, Direktor des AO-Forschungsinstituts in Davos (Schweiz) danke ich für die Möglichkeit, meine Arbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Herrn Professor Dr. med. Dr. med. dent. B. Rahn danke ich für die Unterstützung und Zeit bei der Anfertigung der mikroskopischen Bilder sowie der Fertigstellung meiner Arbeit.

Herrn Eng. HTL C. Sprecher, Mitarbeiter am AO-Forschungsinstitut in Davos (Schweiz), danke ich für die umfassende Unterstützung in vielen Bereichen.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des AO-Forschungsinstituts in Davos (Schweiz), die mich bei der Durchführung meiner Arbeit in allen Bereichen unterstützten.

Ein ganz spezieller Dank gilt meiner Familie und meinem Mann Fabian. Immer hatten sie ein offenes Ohr für meine Sorgen und standen mir in vieler Hinsicht hilfreich zur Seite.

10 CURRICULUM VITAE

Persönliche Angaben

Geboren	01.07.1975 in Konstanz
Geburtsname	Villinger
Familienstand	verheiratet mit Jens Fabian Unterer, Arzt
Konfession	römisch-katholisch

Ausbildung

1982-1986	Sonnenrain-Grundschule, Radolfzell
1986-1995	Gymnasium Radolfzell
1995-1996	Studium der Humanmedizin an der Université Louis Pasteur in Straßburg
1996-2002	Studium der Humanmedizin in Ulm
2002-2003	Praktisches Jahr am Zentralklinikum Augsburg Wahlfach Pädiatrie
11/2003	Drittes Staatsexamen
10/2004	Vollapprobation

Klinische Tätigkeit

1/2004-6/2005	ÄIP bzw. Assistenzärztin in der Klinik für Kinder und Jugendliche in Augsburg, davon 9 Monate in der Kinderchirurgie
7/2005 – 04/2006	Assistenzärztin am Sozialpädiatrischen Zentrum in Altötting
Seit 05/2006	Assistenzärztin in der Kinderchirurgie an der Kinderklinik in Augsburg

Promotion

Seit 1999 Experimentelle Studie auf dem Gebiet der Orthopädie am AO-Forschungsinstitut in Davos (Schweiz)

Doktorvater: Prof. Dr. Dr. W. Plitz (Institut für experimentelle Orthopädie der LMU München)

Studienbegleitende Tätigkeiten

Ab 1997 mehrere Praktika im AO-Forschungsinstitut in Davos und Mitarbeit an verschiedenen experimentellen Studien auf dem Gebiet der experimentellen Orthopädie

11-12/2003 Studienaufenthalt am Rush-Presbyterian-St. Luke's Medical Center, Chicago (USA) im Rahmen der Dissertation