

Aus dem
Center of Advanced Studies in Cranio-Maxillofacial Surgery
(Leiter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Dr. med. habil. Hans-Florian Zeilhofer)

und aus dem
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforchung
(Direktor Prof. Dr. med. B. Gänsbacher)

der
Technischen Universität München

Angefertigt unter der Leitung von
Priv.- Doz. Dr.med. Dr. med.dent. Dr. med. habil. R. Sader

Vorgelegt über
Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
am Institut für Tierpathologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Osseointegration einer mit Plasma-Immersion-Ionen-Implantation
behandelten Autokompressionsklammer aus Nitinol -
- Eine tierexperimentelle Studie**

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

von
Tanja Keller
aus
Bobingen

München 2004

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. U. Matis

Tag der Promotion: 13. Februar 2004

We`ll all be looking for changes, changes in the way we treat
our fellow creatures and we will learn how to grow
Paul McCartney

In Memoriam

Come back
Bomber
Romeo
Hippelchen
405
Uli
Captain Hook

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Schrifttum	3
2.1.	Grundlagen der Implantologie	3
2.2	Implantatmaterialien	4
2.2.1	Titan	4
2.2.2	Nitinol	6
2.2.3	Memory-Effekt	7
2.3	Oberflächenbeschaffenheit und –modifikation	10
2.3.1	Mechanische Bearbeitung	10
2.3.2	Plasmabeschichtung	11
2.3.3	Beschichtung mit anorganischen Substanzen	12
2.3.4	Diffusionsverfahren	12
2.3.5	Konventionelle Ionenimplantation	12
2.3.6	Plasma-Immersionen-Ionen-Implantation (PIII)	13
2.3.7	Funktionsweise des PIII-Verfahrens	13
2.3.8	Modifizierung biokompatibler Materialien	15
2.3.8.1	Titan	15
2.3.8.2	Titan-Aluminium-Vanadium-Legierung (TiAl6V4)	16
2.4	Kontakt- und Distanzosteogenese	16
2.4.1	Kontaktosteogenese	16
2.4.2	Distanzosteogenese	16
2.5	Osseointegration	18
2.6	Ablauf der Implantateinheilung	19
2.7	Remodeling	21
3.	Eigene Untersuchungen	24
3.1	Zielsetzung	24
3.2	Material und Methoden	25
3.2.1	Tierspezies	25
3.2.2	Versuchsaufbau	25
3.2.3	Implantatmaterial und –design	26
3.2.4	Operatives Modell	27
3.2.4.1	Anästhesie und Operationsvorbereitung	27
3.2.4.2	Operationstechnik	28
3.2.4.3	Postoperative Versorgung	30
3.2.5	Röntgenverlaufsuntersuchungen	31
3.2.6	Polychrome Sequenzmarkierung	31
3.2.7	Probengewinnung und –aufarbeitung	31
3.2.8	Färbung der histologischen Präparate	33
3.3	Auswertung und Dokumentation	34
3.3.1	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung	34
3.3.2	Histologische Untersuchung	37

3.3.3	Bestimmung des Titangehalts der inneren Organe	40
3.3.4	Statistische Auswertung	41
3.4	Ergebnisse	42
3.4.1	Operation und klinische Beobachtungen post operationem	42
3.4.2	Röntgenaufnahmen	43
3.4.3	Qualitative Auswertung der Fluoreszenz- und der Durchlichtmikroskopie	47
3.4.3.1	Nicht unter Kompression stehende Spalte	47
3.4.3.2	Unter Kompression stehende Spalte	53
3.4.3.3	Unbeschichtete Klammer	60
3.4.3.4	Beschichtete Klammer	64
3.4.3.5	Vergleich Spaltheilung und Heilung um das Implantat	67
3.4.4	Quantitative Auswertung der Fluoreszenz- und der Durchlichtmikroskopie	68
3.4.4.1	Vergleich der Fluoreszenz der Spalte unter Kompression bzw. ohne Kompression	68
3.4.4.2	Vergleich zwischen beschichteter und unbeschichteter Klammer	72
3.4.5	Bestimmung des Titangehalts	80
4.	Diskussion	83
4.1	Material und Methoden	83
4.1.1	Tiermodell	83
4.1.2	Implantatdesign und operatives Modell	84
4.1.3	Auswahl der Fluoreszenzfarbstoffe	85
4.1.4	Versuchsaufbau	86
4.2	Ergebnisse	87
4.2.1	Fluoreszenz – und Durchlichtmikroskopie der komprimierten / nicht komprimierten Spalte	87
4.2.2	Fluoreszenz – und Durchlichtmikroskopie der beschichteten / unbeschichteten Klammer	88
4.2.3	Titangehalte der Organe	90
4.3	Schlussfolgerung und klinischer Ausblick	93
5.	Zusammenfassung	94
6.	Summary	95
7.	Literaturverzeichnis	96
8.	Tabellenverzeichnis	106
9.	Abbildungsverzeichnis	107
10.	Abkürzungsverzeichnis	110
	Danksagung	111
	Lebenslauf	112

1. EINLEITUNG

Der früheste bekannte Versuch einer Implantation im Kieferbereich geht bis auf die präkolumbianische Zeit zurück, hier wurde versucht aus einem Stein einen Zahnwurzelersatz herzustellen (MARZIANI, 1955). Heute spielen metallische Implantate in vielen Bereichen der Chirurgie eine wesentliche Rolle: In der Orthopädie als Gelenkersatz oder für die osteosynthetische Frakturversorgung, sowie als enossale Implantate in der chirurgischen Zahnheilkunde.

Zur Zeit werden als Werkstoffe für Implantate vor allem Titan und seine Legierungen verwendet, die sich durch ihre gute Biokompatibilität auszeichnen. Diese ist auf eine dünne Titandioxidschicht, die sich in wässrigen Elektrolyten in einem pH-Wert-Bereich zwischen 2 und 10 spontan als Passivierungsschicht ausbildet, zurückzuführen. Bei Relativbewegungen zwischen dem Implantat und dem umgebenden Gewebe wird diese Schicht allerdings schnell zerstört. Es entstehen Titanabriebpartikel, die von Makrophagen und Riesenzellen aufgenommen und entweder intralysosomal zersetzt oder nach Eindringen der Makrophagen in die Lymphgefäße der kleinen Blutgefäße in die Endstrombahnen von Lunge, Leber, Niere und Milz abtransportiert werden. Es kommt so zu einer Anreicherung von Titan in diesen Organen.

Die Zerstörung oder Verletzung der Oxidschicht führt außerdem zu einer erhöhten Aktivität des Titans an der Oberfläche der Implantate. Es entstehen lokale elektrische Felder, welche die Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen beeinflussen können. Dies führt zu einer Aktivierung des Immunsystems und letztendlich zu einer Abwehrreaktion (THULL, 1993; RAUSCHENBACH et al., 2001).

Obwohl in den letzten Jahren im Bereich der Implantologie viele Forschungen stattfanden, liegt die Misserfolgsrate für Titanimplantate immer noch bei ca. 5% (LONG und RACK, 1998). Daraus ergibt sich allein bei den 120000 Hüftendoprothesen, die jährlich in Deutschland implantiert werden, eine Anzahl von 6000 Implantaten, die nicht den gewünschten Erfolg zeigen (WELLER, 1997).

Es ist daher unumgänglich weiter nach neuen Ansätzen zu suchen, die zur Steigerung des Integrationsverhaltens und damit zur Verbesserung des Einheilverhaltens führen. Es sollen eine hohe Biokompatibilität, Korrosionsstabilität und Verschleißresistenz, sowie stabile elektrische Oberflächeneigenschaften erreicht werden, um eine Ablösung von Materialaggregaten zu vermeiden, ohne dabei die günstigen Eigenschaften des Implantatwerkstoffs zu schmälern. Man erhofft sich, dies durch die Plasma-Immersionen-Ionen-Implantation (PIII) zu erzielen. Dabei handelt es sich um ein Verfahren bei dem die

EINLEITUNG

Beschichtungsmoleküle in Form von Ionen nicht auf, sondern unter die Implantatoberfläche gebracht werden.

Im Gegensatz zur konventionellen Ionenimplantation ist dieses Verfahren bei kurzer Behandlungsdauer und relativ niedrigen Temperaturen anwendbar und auch komplex geformte Teile können homogen modifiziert werden (MÄNDL und RAUSCHENBACH, 2000).

In der vorliegenden Arbeit soll nun untersucht werden, inwiefern sich die verbesserte Osseointegration vor allem von PIII modifizierten Nickel-Titan-Legierungen, wie KRAUSE (2001) sie am Rattmodell fand, auch auf ein anderes, dem Menschen bezüglich der Knochenstruktur ähnlicheres Tiermodell, den Hund, übertragen lässt.

Hierzu werden 7 Hunden jeweils an einer Unterkieferhälfte eine mittels PIII behandelte, an der anderen Hälfte zur Kontrolle eine unbehandelte Autokompressionsklammer aus Nitinol eingesetzt. Somit kann gleichzeitig die Heilung der Knochenspalten unter Kompression bzw. ohne Kompression verglichen werden. Die Einheilung und die Spaltheilung werden fluoreszenzmikroskopisch und durch konventionelle Histologie untersucht.

2. SCHRIFTTUM

2.1. Grundlagen der Implantologie

Der Erfolg einer Implantation hängt generell von mehreren Faktoren ab: Den chemischen und physikalischen Eigenschaften des Implantats, seiner Oberflächenbeschaffenheit und dem Zustand und der Reaktionsfähigkeit des Gewebes (KELLNER, 1974; LISTGARTEN et al., 1991).

Bei der Präparation des Implantatlagers ist große Sorgfalt anzuwenden. Um gute Ausgangsbedingungen zu schaffen, ist sowohl die Wahl des geeigneten Werkzeugs, als auch die Verwendung einer Spülvorrichtung zum Reinigen und Kühlen von Bedeutung (RIESS, 1984; SISK et al., 1992).

Schon nach einer 30 Sekunden dauernden Temperaturerhöhung des Gewebes auf 50°C wurden morphologische Veränderungen der Osteoblasten nachgewiesen. Bei Temperaturen über 70°C kommt es zur Osteonekrose, aus der eine verzögerte Regeneration des Knochengewebes oder Ersatz desselben durch ein fibröses Gewebe resultiert (HOBKIRK, 1983). Eine Infiltration des umliegenden Weichgewebes mit Knochensplintern ist zu vermeiden, da diese langsam abgebaut werden und als Fremdkörper eine Ursache für primäre Wundheilungsstörungen darstellen können.

Unabhängig von der Qualität des Implantats ist jede Implantation in ein chronisch entzündlich verändertes Gewebe zum Fehlschlagen verurteilt (KELLNER, 1974).

Die Anforderungen, die an Werkstoffe für die Langzeitimplantation gestellt werden sind hoch. Als mechanische Werte sind die Zug- und Druckfestigkeit, die Bruchdehnung, die Dauerfestigkeit und die Scherfestigkeit des Oxids von Bedeutung. Als elektrochemische Parameter sind die Korrosion und Oxidbildung wichtig. Die Löslichkeit des passivierenden Oxids spielt aus chemischer Sicht eine Rolle. Als physikalische Eigenschaften sind die Veränderungen als Folge von Adsorption oder Eindiffusion von Ionen oder Molekülen als Eignung eines Metalls für die Implantation zu erwähnen.

Aus biologischer Sicht darf es weder toxische, noch kanzerogene Eigenschaften haben und muss sich immunologisch inert verhalten (THULL, 1983).

Obwohl alle genannten Parameter primär mit der Zusammensetzung des Materials zusammenhängen, werden sie doch im wesentlichen vom Herstellungsverfahren, der Konstruktion und vor allem den Oberflächeneigenschaften bestimmt (THULL, 1983).

Für eine feste Verankerung des Implantats ist eine gewisse Rauigkeit seiner Oberfläche notwendig, durch die eine schnellere Knochenanlagerung und damit eine höhere Implantat-Knochen - Kontaktfläche erzielt wird (KELLNER, 1974; BUSER et al., 1989).

Ein ebenso wichtiger Faktor für die primäre osteogene Stabilisierung ist neben der Bioqualität des Werkstoffs die mechanische Ruhe zwischen Implantat und Knochengewebe (KIRSCH und DONATH, 1984).

Mikrobewegungen bis maximal 28 μm scheinen die knöcherne Integration nicht zu stören. Mikrobewegungen von 150 μm und mehr verhindern dagegen die Kontaktbildung zwischen Knochen und Implantat und somit die knöcherne Einheilung, was zur Ausbildung eines bindegewebigen Interfaces führt (MITTELMEIER et al., 1997).

BETHMANN und KNÖFLER (1987), sowie SISK et al. (1992) erachten sogar die Materialbeschaffenheit, sofern dieses biokompatibel ist, als unwichtig für eine erfolgreiche Implantation, sofern die chirurgische Technik minimal traumatisch ist bzw. primär eine mechanische Belastung vermieden wird, da diese die Knochenanlagerung verhindert oder bereits angelagertes Gewebe durch Resorption wieder verloren geht.

2.2 Implantatmaterialien

2.2.1 Titan

Titan und seine Legierungen sind sowohl in der allgemeinen Chirurgie, als auch in der Zahnmedizin häufig verwendete Implantatmaterialien, die sich durch ihren hohen Grad an Biokompatibilität und Korrosionswiderstand auszeichnen (KIM et al., 1997).

Reintitan hat in seiner elementaren Form einen hohen Schmelzpunkt (1678°C). Bis zu einer Temperatur von 882,5°C besitzt es eine dichtgepackte hexagonale Kristallstruktur (α), die bei weiterer Temperaturerhöhung in eine kubische Struktur (β) übergeht. Diese kann auch über mechanische Bearbeitung, wie z.B. schnelles Abkühlen der Metallschmelze, erreicht werden. Titan-Legierungen werden je nach ihrer bei Raumtemperatur vorliegenden Mikrostruktur entweder als α , α -nahe, α + β , metastabile β oder stabile β Formen klassifiziert.

Elemente, die mit Titan Legierungen bilden können, werden daher in drei Kategorien eingeteilt:

- ◆ Die α -Form unterstützende Elemente (α - Stabilisatoren): Al, O, N, C;
- ◆ Die β -Form unterstützende Elemente (β -Stabilisatoren): Mo, V, Nb, Ta, Fe, W, Cr, Si, Ni, Co, Mn, H;
- ◆ Neutrale Elemente, wie Zr;

A- und α -nahe Legierungen zeichnen sich durch ihre ausgezeichnete Widerstandsfähigkeit gegenüber Korrosion aus, ihre Bearbeitungseigenschaften sind aber nicht optimal. Außerdem wird ihr Einsatz durch ihre geringe Temperaturstabilität eingeschränkt. Die β -Legierungen haben eine hohe Festigkeit und Härte und zeigen eine gute Formbarkeit. Durch die Kombination beider Phasen können optimale Eigenschaften erreicht werden (LONG und RACK, 1998).

Die gute Biokompatibilität des Titans ist auf eine 2 bis 20 nm dünne Oxidschicht zurückzuführen, die sich bei Kontakt mit Luftsauerstoff in wässrigem Milieu in einem pH-Wert-Bereich zwischen 2 und 10 ausbildet. Diese Schicht wird auch als Passivierungsschicht bezeichnet (THULL, 1993). Sie ist hochpolar und zieht Wasser, wie auch wasserlösliche Moleküle an. Man nimmt an, dass auf der Titanoberfläche zwei Typen von Hydroxylgruppen existieren: Ein OH-Gruppen-Typ ist an das Titan gebunden (terminale OH-Gruppe), der andere Typ hat die Funktion der Brückenbildung. Brückenbildende OH-Gruppen sind stark polarisiert, haben einen sauren Charakter und können durch Kationen ausgetauscht werden. Biomoleküle können an dieser Schicht anhaften, der Grad der Anhaftung hängt allerdings von verschiedensten Faktoren, wie der Oberflächenbeschaffenheit und der Art der Moleküle ab (BROWNE und GREGSON, 1994).

Generell wird angenommen, dass die passiven Oxide bis zu einer bestimmten Schichtdicke amorph sind, wird diese überschritten kommt es zur Kristallisation (LARSSON et al., 1994; WILLIAMS et al., 1996).

Da diese Oxidschicht initial wenig geordnet ist, kommt es zu einer höheren Mobilität der Titanionen (BROWNE und GREGSON, 1994).

Wird die Oxidschicht zerstört, z.B. durch Relativbewegungen zwischen Implantat und Gewebe, kann es zur Freisetzung von Titanaggregaten kommen. Diese werden durch Makrophagen und Riesenzellen aufgenommen und entweder lysosomal zersetzt oder über das Lymph- und Blutgefäßsystem in die Endstrombahnen innerer Organe, wie Lunge, Leber, Milz und Niere transportiert (THULL, 1993).

Die Stabilität dieser Oxidschicht kann durch geeignete Oberflächenbehandlung verbessert werden (THULL, 1993; LARSSON et al., 1994).

Um die mechanischen Eigenschaften des Reintitans zu verbessern und es damit für medizinische Zwecke attraktiver zu gestalten, wurden verschiedene Legierungen entwickelt (WILLIAMS, 1981; KIM, 1997).

2.2.2 Nitinol

Bei Nitinol handelt es sich um die erste Legierung, die 1963 aus Titan und Nickel hergestellt wurde. Die Bezeichnung Nitinol wurde aus den Anfangsbuchstaben der Komponenten „Ni“ für Nickel, „Ti“ für Titan und „nol“ für Naval Ordnance Laboratory, den Herstellungsort, zusammengesetzt (HURST et al., 1990; ASSAD et al., 1998).

Dieses Material zeichnet sich durch seine gute Biokompatibilität, seine Widerstandsfähigkeit gegen Korrosion und seinen Formgedächtnis- bzw. Shape-Memory-Effekt aus (DRESCHER et al., 1990; DRUGACZ et al., 1995; CISSÈ et al., 2002).

Als Biokompatibilität bezeichnet man die Eigenschaft eines Materials in einer biologischen Umgebung nach der Implantation inert zu bleiben, so dass keine toxischen, allergischen oder kanzerogenen Reaktionen in Erscheinung treten (PUTTERS et al., 1992). Dies wird durch eine schützende Titanoxidschicht erreicht, die sich bei Kontakt mit Sauerstoff, wie bei Reintitan, auf der Oberfläche bildet.

KELLER et al. (1994) fanden um Titan-Legierungen eine signifikant dickere Oxidschicht, als um Reintitan. Diese Schicht erhöht einerseits die Stabilität der Oberfläche und schützt somit das Material vor Korrosion, andererseits bildet sie eine Barriere, welche die Freisetzung von Nickelaggregaten verhindert (CISSÈ et al., 2002).

Freigesetzte Nickelionen könnten als Inhibitoren für Enzyme der Proteinsynthese und der Zellreplikation wirken, daneben besitzen sie ein hohes Allergisierungspotential.

CISSÈ et al. (2002) berechneten eine Nickelfreisetzung aus Implantaten von 0,002µg pro Tag, was im Vergleich zur täglichen Nickelaufnahme mit der Nahrung, die 300 bis 600µg beträgt, vernachlässigbar ist. DRESCHER et al. (1990) wiesen eine Nickelfreisetzung von 40mg pro Tag aus einer kieferorthopädischen Apparatur nach, schätzten aber auch bei dieser Menge das Allergisierungspotential als sehr gering ein, da sich Nickelsulfat, das eigentliche Allergen, erst bei Kontakt mit der äußeren Haut bildet. ASSAD und Mitarbeiter (1998) fanden in einer Zellkultur in einem Zeitraum über vier Wochen eine Nickelfreisetzung aus Nitinol, die annähernd einem Zehntel der täglichen Nickelaufnahme in der Nahrung entspricht.

Auch andere Studien (PUTTERS et al., 1992) belegen, dass Nitinol sich ebenso inert verhält wie Titan und damit eine diesem vergleichbare Biokompatibilität hat. Dies bestätigt sich auch durch die Studie von KAPANEN et al. (2001), die keinen negativen Effekt von NiTi auf die Formation von neuem Knochengewebe fanden. Ebenso konnten WEVER und Mitarbeiter (1997) weder eine inhibitorische Wirkung auf das Zellwachstum in vitro, noch einen zytotoxischen, allergischen oder genotoxischen Effekt des Nitinols feststellen.

2.2.3 Memory-Effekt

Nickel-Titan-Legierungen liegen abhängig von Temperatur und mechanischer Spannung in zwei verschiedenen Kristallstrukturen vor, der Hochtemperaturphase, dem Austenit, und der Niedrigtemperaturphase, dem Martensit. Die Temperatur, bei welcher der Übergang dieser Phasen stattfindet wird als Umwandlungstemperatur, der Umwandlungsprozess selbst als martensitische Transformation bezeichnet (DRESCHER et al, 1990).

Die Umwandlungstemperatur ist in hohem Maße von der Zusammensetzung der Legierung und dem Herstellungsprozess abhängig (HURST et al., 1990).

Die Kristallstruktur des Austenits ist durch acht Atome gekennzeichnet, welche die Aussenkanten eines Würfels bilden, ein neuntes Atom befindet sich in dessen Zentrum. Diese kubisch zentrierte Anordnung der Atome ist für die hohe Festigkeit der Legierung in der Austenitphase verantwortlich. Bei Abkühlung oder durch das Wirken einer mechanischen Spannung entsteht durch Scherung des Austenitgitters die Martensitphase. Das resultierende Gitter ähnelt einem Fischgrätenmuster mit symmetrischen Strukturen, die als „Martensitzwillinge“ bezeichnet werden und hochverschiebliche Grenzflächen darstellen. Die Verschiebung dieser Grenzflächen ist dafür verantwortlich, dass es schon durch geringe Spannungen zur plastischen Deformation der martensitischen NiTi-Legierung kommt (BANTLEON et al., 1989; DRESCHER et al, 1990).

Dabei handelt es sich nur um eine scheinbar bleibende Deformation, da diese wieder rückgängig gemacht werden kann. Erwärmt man das Material über die Übergangstemperatur hinaus, wird die ursprüngliche Form wiederhergestellt (HURST et al.,1990). Damit unterscheidet sich die Kristallographie der Martensitverformung grundlegend vom Deformationsmechanismus anderer Metalle, da bei diesen durch plastische Verformung irreversible Deformationen des Gitters entstehen. Allerdings kann es auch bei NiTi-Legierungen es zu bleibenden Versetzungen der Gitterstruktur kommen, wenn das Material über ein bestimmtes Maß hinaus verformt wird.

Der Einweg-Memory-Effekt:

Wird ein martensitischer Draht (a) verformt, bleibt die Verformung (b) solange erhalten, wie die Temperatur unterhalb der Umwandlungstemperatur liegt. Kommt es aber zu einer Erhöhung der Temperatur bis über die Umwandlungstemperatur, beobachtet man eine Rückverformung des Werkstücks in seine ursprüngliche Form (c). Eine Abkühlung bewirkt keine weitere Formveränderung (d), daher wird der Effekt als Einwegeffekt bezeichnet.

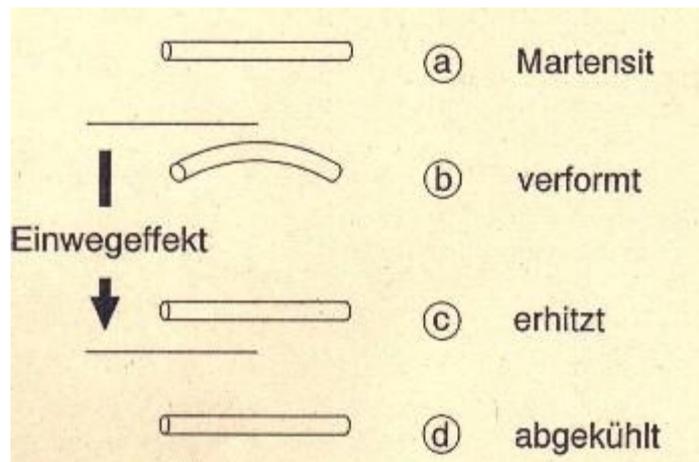


Abb.1: Einweg- Memory- Effekt (DRESCHER et al., 1990)

Der Zweiweg-Memory-Effekt:

Wird ein martensitisches Werkstück (a) stärker verformt, treten neben den Grenzflächenverschiebungen entlang der Zwillingsgrenzen teilweise auch irreversible Versetzungen (b) auf. Wird die Probe erwärmt, kommt es zu einer unvollständigen Rückverformung (c). Bei Abkühlung bewegt sich die Probe wieder auf den verformten Zustand zu (d). Dieser Vorgang ist reversibel und nahezu beliebig oft wiederholbar.

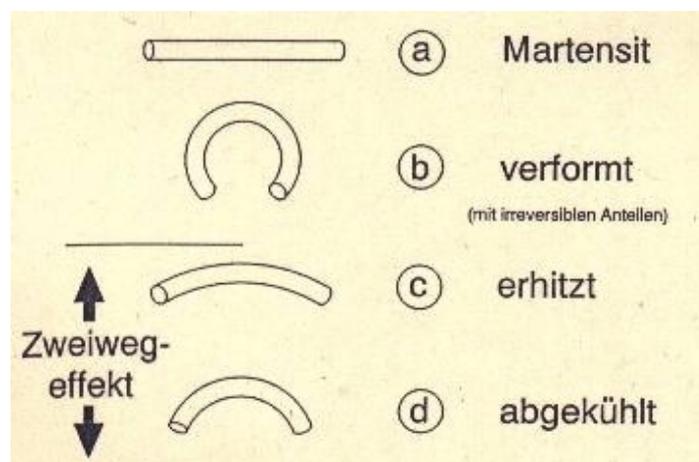


Abb. 2: Zweiweg-Memory-Effekt (DRESCHER et al., 1990)

Superelastizität:

Wird eine Probe, die bei der Untersuchungstemperatur gerade austenitisch ist, einer Belastung ausgesetzt, so steigt die Spannung bis zu einem bestimmten Punkt linear an. Wird dieser überschritten, kommt es zu einer Dehnung des Materials, ohne dass die Spannung weiter ansteigt. Dieses Plateau entsteht durch die Erzeugung spannungsinduzierten Martensits. Ist die Probe vollständig martensitisch, reagiert sie wieder linear elastisch. Bei der Rückverformung zeigt sich ebenfalls ein superelastisches Plateau, das durch die Rückbildung der Austenitphase bei nachlassender Spannung zustande kommt (MIURA et al., 1986; DRESCHER et al., 1990).

Klinische Anwendung des Memory-Effekts:

Ein Modell sich den Formgedächtniseffekt klinisch nutzbar zu machen, wurde 1980 von ANDREASEN präsentiert. Er verwendete einen aus einer Nitinol-Legierung bestehenden Draht mit einer Umwandlungstemperatur zwischen 31°C und 45°C. Dieser ist bei Raumtemperatur martensitisch und lässt sich leicht plastisch verformen. Nachdem die ideale Form erreicht ist, wird der Draht einer thermischen Behandlung unterzogen und dann am Patienten eingesetzt. Bei Erreichen der Körpertemperatur wandelt er sich zum Austenit um und versucht seine ursprüngliche Form wiederzuerlangen. Die hierbei wirksamen Kräfte bewegen sich im Bereich von 0,2 bis 1 Newton. Anhand dieses Modells wurde demonstriert, dass eine Zahnbogennivellierung mit nur einem Bogen durchgeführt werden kann.

In der Orthopädie wird der Memory-Effekt in Form von Marknägeln genutzt, die mit Untermaß in den vorgebohrten Markraum eingesetzt werden, sich durch Spülungen mit warmen Lösungen weiten und sich so der Wand des Markraums anpassen. Soll der Nagel nach Frakturheilung wieder entfernt werden, kühlt man ihn durch kalte Lösungen solange, bis er sich wieder zusammenzieht und sich ohne Kraftaufwand entfernen lässt (KRANKENPFLEGE JOURNAL, 1983).

In der Kieferchirurgie werden Klammern aus NiTi-Legierungen eingesetzt, um Mandibulafrakturen zu fixieren. Bei Raumtemperatur sind die Schenkel dieser Klammern eingezogen. Um die Klammerenden in dafür vorgebohrte Löcher einsetzen zu können, müssen diese erst aufgebogen werden. Dies geschieht nachdem die Klammer mit flüssigem Stickstoff auf -60°C abgekühlt wurde. Die so vorbereitete Klammer wird nun in die Bohrlöcher der Unterkieferfragmente eingesetzt. Unter Einfluss der Körpertemperatur ziehen sich die beiden Klammerschenkel in weniger als zwei Minuten wieder in ihre ursprüngliche

Form zurück. Dadurch entsteht eine auf die Fragmente wirkende Kompression. Meist werden bei derartigen Frakturen zwei bis drei Klammern eingesetzt (DRUGACZ et al., 1995).



Abb. 3: Klammer vor Insertion,
(Produktinformation Fa. NORMED)

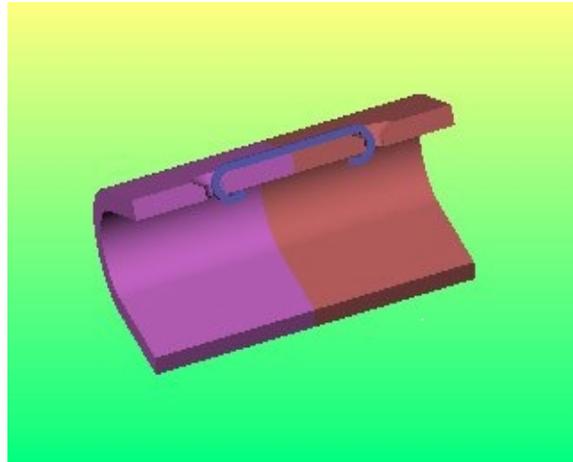


Abb. 4: Eingesetzte Klammer,
(Produktinformation Fa. NORMED)

2.3 Oberflächenbeschaffenheit und –Modifikation

Da die direkte Verankerung und die knöcherne Integration von Implantaten nur durch eine Oberflächenoptimierung erzielt werden können, wurden verschiedene Methoden zur Modifikation der Oberflächen entwickelt. Diese können in drei Gruppen eingeteilt werden (MITTELMEIER et al., 1997; MÄNDL und RAUSCHENBACH, 2000):

- ◆ Mechanische Bearbeitung
- ◆ Auftragen einer Schicht durch Beschichtungsverfahren
- ◆ Oberflächenmodifizierung durch Diffusions- und Implantationsverfahren

2.3.1 Mechanische Bearbeitung

Dass durch eine raue oder poröse Beschaffenheit der Oberfläche das Einheilverhalten erheblich verbessert wird, wurde in vielen Studien gezeigt (KIRSCH und DONATH, 1984; LARSSON et al, 1994). Daher wurden unterschiedliche Verfahren zur Gestaltung rauer und poröser Oberflächen entwickelt. Das gemeinsame Ziel dieser Methoden liegt in der Vergrößerung der Oberflächen, um zum einen das Einwachsen knöcherner Strukturen in die Oberfläche und damit eine knöcherne Verankerung des Implantats zu ermöglichen (HOBKIRK, 1983) und zum anderen die Mikrobewegungen zu reduzieren (HARTWIG et al., 1995).

MITTELMEIER et al. (1997) teilten die Oberflächen nach der Porengröße ein:

- ◆ Makrostrukturiert: Grobe Oberflächenformen $> 2000\mu\text{m}$, wie Lamellen, Stufen, Waben;
Makrostrukturen dienen im Wesentlichen einer Oberflächenvergrößerung mit formspezifischer Änderung der Krafteinleitung vom Implantat in den Knochen. Dadurch entstehen allerdings auch Spannungsspitzen im Knochenlager, die mit dem Risiko einer Druckatrophie verbunden sind.

- ◆ Mesostrukturiert: Kleinere Oberflächenformen mit einem Durchmesser von $100\mu\text{m}$ bis $2000\mu\text{m}$, z.B. poröse oder trabekuläre Strukturen, Netze, Kugeln;
So gestaltete Oberflächen zielen durch das tiefe Einwachsen zahlreicher spongioser Knochenanteile auf eine dauerhafte Verankerung ab.

- ◆ Mikrostrukturiert: Sehr kleine Oberflächenvergrößerungen mit einem Durchmesser $<100\mu\text{m}$, hierzu gehören sandgestrahlte Oberflächen;
Solche Oberflächenformen entstehen bei der Plasma-Spritz- und der Hydroxylapatit-Beschichtung. Sie sollen zur Erhöhung der Scherfestigkeit führen.

2.3.2 Plasmabeschichtungen

Es werden verschiedene Physical Vapour Deposition (PVD) und Chemical Vapour Deposition (CVP), sowie das Plasma-Spritz-Verfahren angewandt, um auf die Oberflächen eines Implantats Schichten aufzutragen, von denen man sich sowohl eine Verbesserung der Biokompatibilität und der Einheilquote, als auch eine erhöhte biomechanische Oberflächenstabilität erwartet (THULL, 1993; MÄNDL und RAUSCHENBACH, 2000).

Durch das PVD-Verfahren lassen sich die Eigenschaften der Schichten wie Härte, Rauigkeit und Dichte durch verschiedenen Parameter beim Herstellungsprozess einstellen (THULL, 1993).

Bei den Spritzverfahren werden feine Stäube durch eine Hydrocarbon-Flamme oder durch ein inertes Gas geblasen, wodurch die feinen Partikel sehr schnell zu schmelzen beginnen. Werden diese geschmolzenen Teilchen nun auf ein zu beschichtendes Material aufgebracht, verschmelzen diese miteinander und mit dem Implantat (WAGNER, 1992). Es entsteht eine raue Oberfläche mit Nischen und Poren, an welcher das Gewebe gut anhaften kann (SCHROEDER et al., 1976). Es gibt mehrere Studien in denen der positive Effekt der Titan-

Plasma-Beschichtung auf die Mikroverankerung zwischen Knochen und derart beschichteter Oberfläche nachgewiesen wurde (KIRSCH und DONATH, 1981; SCHROEDER et al., 1981). Mit dieser Methode können relativ einfach dicke ($> 1\mu\text{m}$) Beschichtungen erzeugt werden. Allerdings entstehen bei schnellem Abkühlen häufig Risse in der Beschichtung. Auch ein geringes Anhaftungsvermögen der Beschichtung, sowie die Erhöhung der korrosiven Eigenschaften stellen ein Problem dar (BECKER et al., 1991; WAGNER, 1992). Gekrümmte oder kompliziert geformte Werkstücke lassen sich durch derartige Verfahren nur unzureichend homogen beschichten. Während des Beschichtungsprozesses sind im Allgemeinen hohe Temperaturen notwendig, die den Spannungszustand und die Morphologie im Implantat nachhaltig verändern können (RAUSCHENBACH et al., 2001).

2.3.3 Beschichtungen mit anorganischen Substanzen

Um einen osteotropen Effekt auf der Implantatoberfläche zu erzielen, werden Implantate auch mit anorganischen Substanzen, wie Hydroxylapatit oder Trikalziumphosphaten beschichtet (LENTRODT, 1983). Beim Einheilen kommt es zum direkten ineinander Übergehen des Minerals der Beschichtung und des Minerals des Knochens (OSBORN, 1983). Obwohl die Adhäsion des Knochengewebes durch solche Beschichtungen verbessert wird, sind die Ergebnisse der Langzeitresultate fraglich (SCHENK und BUSER, 2000).

Durch die progressive Auflösung der Beschichtung und durch mechanische Eigenschaften kann es zum einen zur Ablösung der Hydroxylapatitschicht kommen, zum anderen kann sich aufgrund von Scherkräften eine bindegewebige Grenzschicht ausbilden (MITTELMEIER et al., 1997)

2.3.4 Diffusionsverfahren

Bei diesem Verfahren wird die Zusammensetzung und die Struktur im Implantatmaterial durch die Diffusion einer atomaren bzw. molekularen Spezies modifiziert. Diffusionsverfahren sind zeit- und kostenintensiv, ihre Anwendung auf Materialien beschränkt, die den Einsatz relativ hoher Temperaturen erlauben. Die Diffusionsschicht ist häufig spröde und neigt daher zur Rissbildung (MÄNDL und RAUSCHENBACH, 2000).

2.3.5 Konventionelle Ionenimplantation

Die Ionenimplantation stellt eine vielseitig verwendbare Technik zur Modifikation von Oberflächen und zur Veränderung der Oberflächenzusammensetzung dar. Dabei unterscheidet sie sich grundlegend von den bisher genannten Verfahren, da die zugeführten Elemente sich

nicht auf, sondern unter der Oberfläche anlagern. Ionen werden auf ein derart hohes Energieniveau gebracht, dass sie beim Aufprall auf ein Objekt in dessen Oberfläche penetrieren können. Auf diese Weise entstehen feinste Spalten in der Mikrostruktur der Oberfläche, die zu einer Verbesserung der mechanischen und chemischen Eigenschaften führen können (WAGNER, 1992).

Durch die Ionenimplantation kann die Härte des Materials, sowie die Widerstandsfähigkeit gegen Reibung und Verschleiß erhöht und das Korrosionsverhalten positiv beeinflusst werden (RIEU et al., 1991; LONG und RACK, 1998).

Eine derartige Behandlung erzielt auch eine erhebliche Steigerung der Rauigkeit der Oberfläche, deren Vorteil bereits erläutert wurde (LOIANZ et al., 1998). Die limitierenden Faktoren dieses Verfahrens sind die geringe Tiefe der modifizierten Schicht und die hohen Kosten der Apparaturen (WAGNER, 1992). Auch das Problem kompliziert geformte Werkstücke mit Ionenimplantation zu behandeln ist noch nicht gelöst, da es sich um einen sogenannten „Sichtlinienprozess“ handelt, bei dem Einkerbungen und Poren von Implantaten nicht erreicht werden (MÄNDL und RAUSCHENBACH, 2000).

2.3.6 Plasma-Immersion-Ionen-Implantation (PIII)

Als weitere Verbesserung der konventionellen Ionenimplantation wurde vor einigen Jahren das Verfahren der Plasma-Immersion-Ionen-Implantation (PIII) entwickelt, durch das die oben genannten Probleme umgangen werden sollen (MÄNDL et al., 2001).

Bisher wird das Verfahren vor allem in der metallverarbeitenden Industrie und zur Dotierung von Halbleitern eingesetzt (MÄNDL und RAUSCHENBACH, 2000).

Da mit dieser Methode auch komplex geformte, dreidimensionale Werkstücke homogen behandelt werden können, verspricht man sich auch einen positiven Einfluss vom Einsatz derart beschichteter Implantate in der Medizin (MÄNDL et al., 2001).

2.3.7 Funktionsweise des PIII-Verfahrens

Das zu implantierende Objekt befindet sich in einem Vakuumgefäß, das mit einem Arbeitsgas bei einem Druck von 0,01 bis 1 Pa gefüllt ist. Dieses Gas wird durch Mikrowelleneinstrahlung mit einer geeigneten Quelle ionisiert, so dass das Objekt homogen von einem Plasma, das aus den positiv geladenen Ionen des Arbeitsgases und den negativ geladenen Elektronen besteht, umgeben ist (MÄNDL und RAUSCHENBACH, 2000).

An das isoliert gelagerte Objekt werden nun durch einen Hochspannungsgenerator rechteckige, negative Hochspannungspulse zwischen 10 und 100 kV angelegt. Diese führen

einerseits zur Verdrängung von Elektronen aus dem äußeren Bereich des Objekts und somit zur Freilegung der Ionen, andererseits zur Beschleunigung positiv geladener, aus der Randschicht des Plasmas gelöster Ionen auf das nun negativ geladene Objekt hin. Die Bahntrajektorien der Ionen folgen den elektrischen Feldlinien und treffen damit aus allen Richtungen, mit einer Energie, die der angelegten Hochspannung entspricht, auf die Oberfläche des Objektes. Innerhalb weniger Mikrosekunden wird so die unmittelbare Umgebung des Objekts von Ionen geleert, so dass Ionen aus weiter entfernten Bereichen auf die Oberfläche beschleunigt werden. Aufgrund der sinkenden Ionenkonzentration dehnt sich die Plasmahülle aus (MÄNDL und RAUSCHENBACH, 2000).

Die Pulsdauer ist auf einige Mikrosekunden beschränkt, da sonst das Plasma kollabieren würde. Die Wiederholungsfrequenz für die angelegte Hochspannung variiert zwischen einigen 10 Hz und 10 kHz. Durch Variation der Frequenz kann die Temperatur ohne zusätzliche Heizung gezielt zwischen Raumtemperatur und einigen hundert Grad eingestellt werden. Eine im Vergleich zur konventionellen Ionenimplantation deutlich kürzere Behandlungszeit resultiert aus einer bei der PIII um den Faktor 1000 höhere Ionenstromdichte (Ionen pro Zeit- und Flächeneinheit) (MÄNDL und RAUSCHENBACH, 2000).

Die beim Abbremsen der Ionen freigesetzte Energie überschreitet die Bindungsenergie des implantierten Materials bei weitem (Bindungsbruch) und ihr anschließender Dissipationsprozess wird von der Bildung neuer Phasenmodifikationen in der Oberfläche geprägt. Damit können schon bei Raumtemperatur hochschmelzende, extrem harte Verbindungen gebildet werden. Die Dicke der modifizierten Schicht wird durch die angelegte Hochspannung bestimmt und ist in der Regel auf einen Bereich unterhalb eines Mikrometers beschränkt (MÄNDL und RAUSCHENBACH, 2000).

Die zu implantierende Spezies wird der Plasmaquelle in gasförmigem Zustand zugeführt. Somit bieten sich zur Implantation die Edelgase Neon, Argon, Krypton und Xenon, besonders aber auch Sauerstoff, Kohlenstoff und Stickstoff an, um damit Oxid-, Karbit-, Nitritverbindungen, etc. zu synthetisieren.

Die PIII-Methode ist ein relativ kostengünstiges Verfahren, bei dem schätzungsweise 0,05 €/cm² investiert werden müssen (MÄNDL und RAUSCHENBACH, 2000).

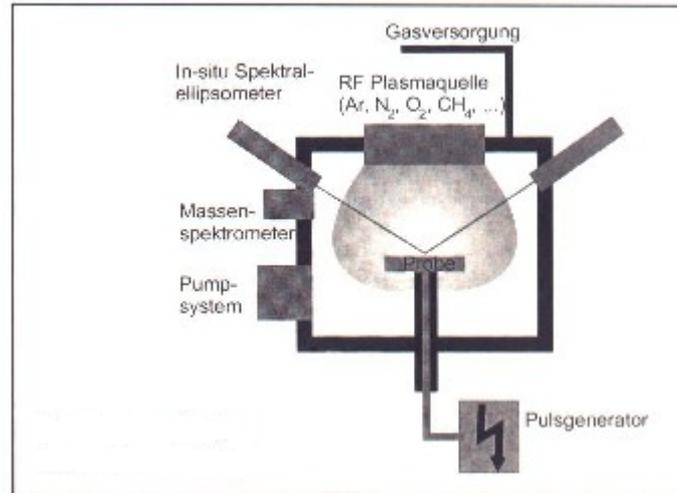


Abb.5: Schematischer Aufbau einer PIII-Anlage (RAUSCHENBACH et al., 2001)

2.3.8 Modifizierung biokompatibler Materialien

Für die Anwendung der PIII bei medizinischen Implantaten erwartet man eine Verbesserung des Integrationsverhaltens, eine Erhöhung der Biokompatibilität, sowie eine Vermeidung von Aggregaten im Laufe des Verschleißprozesses. Der Einsatz des PIII-Verfahrens ist dabei nicht nur auf Metalle beschränkt, sondern kann mit kleinen Verfahrensvariationen auch bei Kunststoff- und Keramikimplantaten angewendet werden (MÄNDL und RAUSCHENBACH, 2000).

Im Folgenden soll nur auf Titan und dessen Legierungen eingegangen werden:

2.3.8.1 Titan

Wie bereits erwähnt wurde, ist die Widerstandsfähigkeit der Passivierungsschicht von zentraler Bedeutung für die Biokompatibilität von Titanimplantaten. Durch die PIII lässt sich unter Anwendung eines Sauerstoffplasmas eine stabile geschlossene Schicht des Titanoxids bilden. Mit steigender Temperatur nimmt dabei die Diffusion des Sauerstoffs zu und die modifizierte Schichtdicke steigt. Bemerkenswert ist, dass damit das Rutil, die Hochtemperaturmodifikation dieses Oxids, bereits bei tiefen Temperaturen hergestellt werden kann. Rutil ist ein halbleitendes Oxid mit hoher Verschleißresistenz und die für die biomedizinische Anwendung bevorzugte Phase (MÄNDL et al., 2000; MÄNDL und RAUSCHENBACH, 2000).

2.3.8.2 Titan-Aluminium-Vanadium-Legierung (TiAl6V4)

Auch bei dieser Legierung, die u.a. für Endoprothesen eingesetzt wird, konnte durch die PIII die Resistenz gegen den abrasiven Verschleiß deutlich erhöht werden. Die hohe Verschleißresistenz beruht hier auf der Bildung einer Titannitridschicht von großer Härte und einem geringen Reibkoeffizienten (MÄNDL und RAUSCHENBACH, 2000).

2.4 Kontakt- und Distanzosteogenese

Abhängig von der chemischen Zusammensetzung des Materials und der Oberflächengestaltung zeigt das Knochengewebe im Implantatlager unterschiedliche Reaktionen. OSBORN (1983) erstellte aufgrund der Körperverträglichkeit folgende Einteilung der Materialien:

◆ Biotolerant: Einheilung nach dem Muster der Distanzosteogenese:

Zu dieser Gruppe zählen Edelstahl, PMMA-Zement und Cobalt-Legierungen.

◆ Bioinert: Einheilung nach dem Muster der Kontaktosteogenese:

Hierzu gehören Titan und seine Legierungen.

◆ Bioaktiv: Einheilung nach dem Muster der Verbundosteogenese:

In diese Gruppe gehören Calcium-Phosphat-haltige Keramiken und Hydroxylapatitbeschichtungen, bei deren Einheilung das Mineral der Keramik bzw. der Beschichtung direkt in das Mineral des Knochens übergeht.

2.4.1 Distanzosteogenese:

Neuer Knochen wird durch apositionelles Wachstum an der dem Implantat zugewandten Seite des umliegenden Knochens gebildet. Auf der Oberfläche dieses Knochens treten knochenbildende Zellen auf, die neue Knochenmatrix ablagern. Wenn die Osteogenese fortschreitet, breitet sich diese Matrix bis zum Implantat aus. Es findet also keine Bildung von neuem Knochengewebe auf dem Implantat statt, dieses wird vielmehr von neuem Knochen umgeben (DAVIES, 1998).

2.4.2 Kontaktosteogenese:

Hier bildet sich neuer Knochen zuerst auf der Oberfläche des Implantats. Dabei wird die Implantatoberfläche von knochenbildenden Zellen besetzt, die dann Knochengewebe ablagern.

Ein Einfluss des Implantatdesigns auf diesen Vorgang besteht insofern, da das Ausmaß der Fibrinanhftung von der Oberflächenbeschaffenheit des Implantats abhängt. Fibrin wird im Laufe der durch das chirurgische Trauma entstandenen Gerinnungskaskade gebildet und lagert sich an die Implantatoberfläche an. Die Anheftung des Fibrins ist an einer Oberfläche, die durch dreidimensionale Strukturen vergrößert ist, stärker als an einer glatten Oberfläche. In dieses Fibringerüst wandern Stromazellen und Osteoblastenvorläuferzellen ein. Die Migration dieser Zellen führt zur Kontraktion der Fibrinfäden, die sich nun je nach Stärke der Anheftung wieder vom Implantat ablösen. Bei rauen Oberflächen bleibt die Verbindung zwischen Fibrinnetz und Implantat erhalten, so dass die knochenbildenden Zellen entlang des Fibringerüsts bis auf die Implantatoberfläche wandern können, bevor sie sich differenzieren und mit der Ablagerung von Knochenmatrix beginnen (DAVIES, 1996 und 1998).

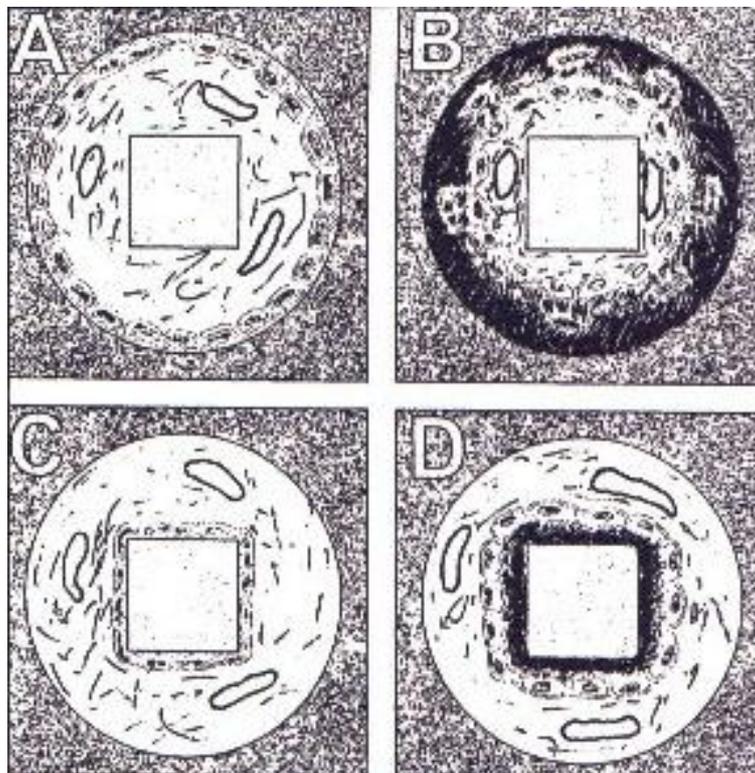


Abb. 6: A und B: Distanzosteo-genese

C und D: Kontaktosteogenese

Während sich die knochenbildenden Zellen in Abbildung A an die Oberfläche des alten Knochens anlagern, treten sie in Abbildung C mit der Implantatoberfläche in Kontakt. Die Ergebnisse der Osteogenesetypen sind in den Abbildungen B und D zu erkennen. In Abbildung B lagert sich neues Knochengewebe an den alten Knochen an, in Abbildung C hingegen ist eine um das Implantat herum beginnende Bildung von neuem Knochengewebe zu erkennen.

(DAVIES, 1998)

2.5 Osseointegration

Der Begriff *Osseointegration* wurde in den 70er Jahren durch den schwedischen Orthopäden Branemark geprägt. Er bezeichnete damit die direkte strukturelle und funktionelle Verbindung zwischen organisiertem lebendem Knochen und der Oberfläche eines belasteten Implantats (BRANEMARK, 1983; SCHENK und BUSER, 2000).

Später wurde diese Definition um den Zusatz „auf lichtmikroskopischer Ebene“ erweitert (SKRIPITZ und ASPENBERG, 1998; ALBREKTSSON und JOHANSSON, 2001).

Die Osseointegration ist die stabilste Form der Langzeitfixation zwischen Knochen und Implantat (BRANEMARK, 1983). LINDNER (1989) konnte diese Art der Einheilung für verschiedene Implantate nachweisen und folgerte daraus, dass die Osseointegration keine spezielle Reaktion auf ein bestimmtes Implantat ist, sondern ein grundsätzliches und unspezifisches Einheilungsverhalten des Knochens.

Die Osseointegration gehört zur Kategorie der direkten oder primären Knochenheilung und kann damit mit der primären Frakturheilung verglichen werden. Bei dieser kommt es zu einer knöchernen Verbindung der Fragmente ohne fibröses Gewebe dazwischen. Der grundsätzliche Unterschied dabei ist, dass Knochen nicht an Knochen, sondern an die Oberfläche eines Implantats, also eines fremden Materials angelagert werden soll. Die Osseointegration erfordert daher ein bioinertes oder bioaktives Implantatmaterial und eine Oberfläche welche die Knochenanlagerung begünstigt (SCHENK und BUSER, 2000).

Der Prozess der Osseointegration kann in drei Phasen unterteilt werden:

1. Osteophyllische Phase: Die initiale Reaktion ist zum einen durch die Wanderung von Osteoblasten zur Implantatoberfläche hin, zum anderen durch die Produktion von Osteoid gekennzeichnet. Gleichzeitig werden durch verschiedene Stimulatoren undifferenzierte, pluripotente Stammzellen veranlasst sich zu Zellen der Knochenzelllinie zu differenzieren (ALBREKTSSON und JOHANSSON, 2001).
2. Osteokonkutive Phase: Nach dem initialen Kontakt wachsen die Knochenzellen an der Implantatoberfläche entlang und lagern Osteoid und nachfolgend Geflechtknochen ab. Dieser Vorgang wird grundlegend vom Implantatdesign beeinflusst (DAVIES, 1998).

3. Osteoadaptive Phase: Diese abschließende Phase ist durch den Knochenumbau gekennzeichnet, der den initial gebildeten Geflechtknochen durch lamellär strukturierten Knochen ersetzt. Hier spielen Verformungen des neu gebildeten Knochens, die durch mechanische Belastung ausgelöst werden eine Rolle (MARX und GARG, 1998).

Eine detaillierte Beschreibung dieser Vorgänge findet sich im nächsten Kapitel:

2.6 Ablauf der Implantateinheilung

Zuerst sollen die an diesem Vorgang beteiligten Zellen kurz beschrieben werden:

Osteoblasten sind Zellen von kubischer bis hochprismatischer Form, die in der von ihnen produzierten Matrix liegen und über *gap junctions* miteinander, als auch mit Osteozyten und *bone-lining Cells* in Verbindung stehen. Sie haben exzentrisch gelegene Kerne und enthalten viele synthetisierende und sekretorische Organellen (MARTIN et al., 1988; MC KNEE und NANCI, 1993).

Osteoblasten entwickeln sich aus ihren Vorläuferzellen, den Präosteoblasten, die von Mesenchymzellen abstammen (DAVIES, 1998). Ihre Aufgabe besteht in der Produktion von Knochenmatrix, die vor allem Kollagen Typ I, aber auch nicht-kollagenartige Proteine enthält (MC KNEE und NANCI, 1993).

Bei den **Osteozyten** handelt es sich um terminal differenzierte Osteoblasten, die in kleinen Knochenzellhöhlen in der Interzellulärsubstanz des Knochens liegen und durch zahlreiche, feine Zellausläufer miteinander in Kontakt stehen (MÖRIKE et al, 1991).

Sie sind kleiner als Osteoblasten und besitzen weniger Zellorganellen als diese (MC KNEE und NANCI, 1993).

Osteoklasten sind große, vielkernige Zellen, die mehrere hundert Nucleoli enthalten können und reich an Mitochondrien und Lysosomen sind. Ihre Aufgabe besteht im Abbau und in der Resorption von mineralisiertem Knochengewebe. Durch ihre Resorptionsaktivität werden auf der Knochenoberfläche die sogenannten Howshipschen Lakunen gebildet. Osteoklasten leiten sich von Stammzellen, die in der Zirkulation oder in hämatopoetischem Gewebe zu finden sind ab und entstehen meist durch Fusion, seltener auch durch Mitose (PECK und WOODS, 1998).

Durch die instrumentelle Präparation des Implantatlagers werden Blutgefäße eröffnet und perivaskuläre Räume freigelegt. Dadurch kommt es zur Freisetzung von Prostaglandinen, Prostacyclinen und Osteoklasten aktivierenden Faktoren (RIESS, 1984). Geleitet durch die Chemotaxis wandern Osteoprogenitorzellen aus dem Knochenmark und aus dem Periost in die Wunde ein. Diese proliferieren und differenzieren sich zu Präosteoblasten und Osteoblasten, die mit der Ablagerung von Knochensubstanz, entweder an der Wand des Bohrkanals oder direkt am Implantat beginnen (SCHENK und BUSER, 2000).

Abhängig davon, wo zuerst neues Knochengewebe entsteht, kommt es zur Kontakt- oder zur Distanzosteogenese (s.o.).

Neben der Produktion von Kollagenfasern sind die Osteoblasten auch für die Mineralisation des neuen Gewebes zuständig. Ausgelöst wird dieser Vorgang durch die Expression eines Membranglykoproteins, der alkalischen Phosphatase. Initial werden 1 bis 2 nm große Calcium-Appatitkristalle gebildet, deren Ablagerung von der organischen Struktur beeinflusst wird. Später bestimmt die hochorganisierte Ionenstruktur der Kristalle die organische Architektur (MÖRIKE et al, 1991; DAVIES, 1996).

Das erste Knochengewebe, das gebildet wird, bezeichnet man als Geflechtknochen. Dieser ist zellreich, die Verteilung der Osteozyten in der knöchernen Matrix lässt keine Ordnungsstruktur erkennen. Die geformte Grundsubstanz wird von einem unregelmäßigen Geflecht von Kollagenfaserbündeln durchzogen, die keine besondere Verlaufsrichtung vorweisen. Der Geflechtknochen weist nur eine geringe mineralische Dichte auf. Da diese Gewebestruktur in der Lage ist sich schnell in umliegendes Gewebe auszubreiten, stellt sie ein ideales Füllmaterial dar und ist in der Lage erste Knochenbrücken zwischen der Implantatoberfläche und der Knochenwand zu bilden (SCHENK und BUSER, 2000).

Der Geflechtknochen wird später in lamellären Knochen umgewandelt. Dieser Umwandlungsprozess beginnt mit der Resorption des Gewebes durch Osteoklasten, gefolgt von der Ablagerung von lamellärem Knochen. Resorption und Formation sind während dieses Prozesses sowohl zeitlich, als auch örtlich verknüpft. In kortikalem Knochen formen Gruppen von Osteoklasten zylindrische Resorptionskanäle mit einem Durchmesser von 150 bis 200 μm . Die tägliche Resorptionsstrecke beträgt dabei ca. 50 μm .

Dieser Resorptionsfront folgen Gefäße, die knochenbildende Zellen mit sich bringen. Im Abstand von 100 μm nach den Osteoklasten besiedeln Osteoblasten den Resorptionskanal und beginnen mit der Ablagerung von konzentrischen Schichten lamellären Knochens. Auf diese Weise werden neue Osteone gebildet.

Dieser Prozess läuft in anderen Knochenstrukturen nach einem ähnlichen Schema ab:

Zuerst entsteht eine Ansammlung aus Osteoklasten, die im Knochengewebe eine Lakune aushöhlen. Einige Tage später treten dort Osteoblasten auf, die den Hohlraum mit neuem lamellärem Knochen ausfüllen. Die Faktoren, die diese Vorgänge auslösen, sind komplex und noch nicht im Detail erforscht (SCHENK und BUSER, 2000).

2.7 Remodeling

Als Remodeling bezeichnet man einen physiologischen, sich lebenslang wiederholenden Ablauf im Knochen, der das gesamte Skelett erneuert und rekonstruiert, um Mikroläsionen zu beheben und eine Anpassung des Knochens an die aktuellen Anforderungen zu gewährleisten. Während dieses Vorganges bleibt die Knochenmasse konstant (PARFITT, 1984; SCHENK und BUSER, 2000). Der Remodeling Zyklus wird in fünf Stadien eingeteilt:

Ruhephase ► Aktivierung ► Resorption ► Reversion ► Formation

(PARFITT, 1984; MARTIN et al., 1988; PECK und WOODS, 1998).

Bei ausgewachsenen Lebewesen befindet sich der Großteil der Knochenoberfläche, die von *bone-lining Cells* bedeckt ist, in **Ruhe**. Um die **Aktivierung** des Remodeling-Prozesses in Gang zu setzen, müssen Osteoklasten vorhanden sein. Durch welches Signal diese Zellen angezogen werden ist ebenso unbekannt wie deren Anhaftungsmechanismus. Sobald die Osteoklasten in Kontakt mit dem Knochengewebe stehen, beginnen sie mit der **Resorption**.

Die dadurch im Knochen entstehende Kavität ist durch eine bestimmte Anordnung und Größe charakterisiert, in trabekulärem Knochengewebe wird sie als Howshipsche Lakune bezeichnet. Die Hauptaufgabe der Osteoklasten besteht in der Auflösung des mineralisierten Gewebes, der Abbau des Kollagens wird von Zellen der mononukleären Linie bewerkstelligt.

Die Osteoklasten sind beweglich und können somit in einem größeren als dem direkt umliegenden Bereich zur gleichen Zeit Gewebe abbauen. Die Resorption kann noch Stunden nachdem der Osteoklast sich fortbewegt hat im Gange sein (JAWORSKI, 1981; PARFITT, 1984).

Auf welche Weise die Größe, der Zustand und die Tiefe der entstehenden Lakune kontrolliert werden, ist unklar. Es wird vermutet, dass die *bone-lining Cells* sowohl in die Initiation, als auch in die Termination der Resorptionsphase involviert sind. Von diesen Zellen könnten Faktoren freigesetzt werden, die entweder auf direkten Weg oder durch Stimulation oder Inhibition der Enzymfreisetzung zur Modulation der Osteoklastenaktivität führen. Mit dem Fortschreiten der Resorption und damit der Vergrößerung der Lakune entfernen sich die Osteoklasten allerdings mehr und mehr von den *bone-lining Cells*, somit könnte die lokale

Kontrolle effektiver von den Osteozyten beeinflusst werden. Möglicherweise stehen die Osteozyten dabei unter Kontrolle der *bone-lining Cells* (PARFITT, 1984).

Als **Reversions**phase wird die Zeit, die zwischen dem Abschluss der Resorption und dem Anfang der Formation liegt, bezeichnet. Während dieser Phase befinden sich makrophagenartige Zellen mit hohem Kollagenasegehalt im Resorptionsbereich, welche für die Entfernung der verbliebenen organischen Matrix zuständig sind. Diese Zellen glätten auch die durch die Osteoklastenaktivität entstandenen rauen Knochensäume und lagern eine dünne Schicht aus hoch-mineralisiertem, kollagenarmen Knochengewebe als Zementsubstanz ab. Diese auch als Kittlinie bezeichnete Schicht bereitet die Oberfläche für die Knochen**formation**, den Wiederaufbau des Knochens vor. Dieser Abschnitt ist durch die Osteoblastenaktivität gekennzeichnet. Die Osteoblasten lagern sich am Grund der Resorptionslakune ab und beginnen mit der Produktion organischer, unmineralisierter Knochenmatrix, dem Osteoid. Der Osteoidsaum formt eine dünne Schicht auf der Knochenoberfläche, die sich über die gesamte Lakune ausbreitet (PARFITT, 1984).

Eine Anbindung an den bereits bestehenden Knochen wird durch eine Schicht, die vor allem aus Osteopontin und Sialoprotein besteht, geschaffen. Diese Proteine zeichnen sich durch eine hohe Affinität zu Calciumionen aus und dienen daher als Kristallisationskerne für Calciumphosphat (MC KNEE und NANCI, 1993).

Die Ablagerung von Knochenmatrix schreitet rasch voran, mit der Zeit werden die Osteoblasten allerdings flacher und breiter, ihr Zytoplasma nimmt ab und wird weniger basophil. Damit kommt es auch zu einem Absinken der Aktivität der Osteoblasten. Am Ende ihrer aktiven Phase scheinen manche Osteoblasten durch einen bisher nicht bekannten Mechanismus, möglicherweise durch Apoptose zu verschwinden, andere hingegen werden zu *bone-lining Cells* oder Osteozyten (PARFITT, 1984; MARTIN et al., 1988).

Ist die Synthese der Knochenmatrix abgeschlossen, beginnt einige Tage später ihre Mineralisation (MÜNZENBERG und RÖSSLER, 1976).

Um die Formation neuen Knochengewebes in einer Reaktionszone zu bewerkstelligen, sind mehrere Generationen von Osteoblasten nötig. Wie vollständig eine Resorptionslakune ausgefüllt wird, hängt mehr von der Anzahl der initial vorhandenen Osteoblasten ab, als von ihrer individuellen Aktivität (PARFITT, 1984).

Beim Hund liegt der Sigma-R-Wert (Maß für die Abbauphase) bei 16 Tagen und der Sigma-F-Wert (Maß für die Aufbauphase) bei 76 Tagen, was eine Gesamtzeit des Remodeling-Prozesses von drei Monaten ergibt (RIESS, 1984).

Remodeling ist somit ein unverzichtbarer Ablauf, um den neuen um ein Implantat gebildeten Knochen an die bestehenden Anforderungen und Belastungen anzupassen, als auch den mechanischen und funktionellen Erfolg eines Implantats über lange Zeit zu gewährleisten (SCHENK und BUSER, 2000).

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Zielsetzung

Die folgenden Untersuchungen sollen einerseits Auskunft darüber geben, inwiefern sich die Ergebnisse eines durch Plasma-Immersion-Inonen-Implantation (PIII) oberflächenbehandelten Prüfkörpers des vorangegangenen Versuchs von KRAUSE (2001) am Rattenmodell auf ein der Knochenstruktur des Menschen ähnlicheres Tiermodell, den Hund, übertragen lassen, andererseits soll anhand einer Autokompressionsklammer der Unterschied zwischen der Heilung eines unter Kompression stehenden Knochenspaltes und eines nicht komprimierten Knochenspaltes untersucht werden.

Als Prüfkörper werden hierzu Autokompressionsklammern aus Nitinol verwendet, von denen jedem Tier jeweils eine durch PIII behandelte und als Kontrolle eine unbehandelte Klammer in je eine Unterkieferhälfte implantiert wird. Der Einfluss der Beschichtung auf das Einheilungsverhalten kann so intra-individuell beurteilt werden.

Aufgrund der autokompressiven Wirkung der Klammer ist es möglich die Heilungsvorgänge des Knochens mit und ohne Kompression zu vergleichen.

Drei Wochen nach der Operation werden Knochenstücke aus den Unterkiefern zur Weiterverarbeitung entnommen. Die Beurteilung der Proben erfolgt zuerst fluoreszenzmikroskopisch und danach histologisch.

Um festzustellen, ob es durch die Implantate zur Freisetzung und Ablagerung von Titan in den inneren Organen kommt, werden Proben aus Lunge, Milz, Leber und Niere entnommen und diese atomabsorptionsspektroskopisch untersucht.

Um aus ethischen und tierschützerischen Gründen die Zahl der Versuchstiere möglichst gering zu halten, werden die Hunde nicht nur für die vorliegende Studie, sondern auch für eine zweite Dissertation (C. v. HÄNISCH), in der ein CO₂-Laser mit einem Osteoskalpell verglichen werden soll, genutzt.

Der Tierversuch wurde gemäß § 8 des deutschen Tierschutzgesetzes von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Tierspezies

Die Versuche werden an 7 Beaglehunden beiderlei Geschlechts (4 Hündinnen und 3 Rüden) durchgeführt. Die Tiere sind zwischen 1,5 und 8 Jahre alt und wiegen 12,5 bis 18 kg. Sie stammen aus einer geschlossenen Zuchtanlage (GSF, Neuherberg), sind geimpft, entwurmt und haben ein ungestörtes Allgemeinbefinden. Die Hunde werden einige Tage vor Versuchsbeginn in die institutseigenen Ställe verbracht und als Gruppen von jeweils zwei oder drei Tieren in geschlossenen Boxen mit ausreichendem Auslauf gehalten. Die Temperatur beträgt 21 bis 23 °C, bei einer relativen Luftfeuchte von 50 bis 70%. Die künstliche Beleuchtung ist im Tag-Nacht-Rhythmus geschaltet mit einer maximalen Beleuchtungsintensität von 500 Lux während der Tagphase (6-18 Uhr) und völliger Dunkelheit in der Nachtphase. Die Hunde erhalten einmal täglich handelsübliches Dosenfutter. Wasser steht ad libitum zur Verfügung.

12 Stunden vor der Operation werden die Tiere nüchtern gehalten.

3.2.2 Versuchsaufbau

Alle Tiere werden der gleichen Behandlung unterzogen.

Auf welcher Seite ein Beschichtetes Implantat eingesetzt wird, wurde durch Randomisierung festgelegt:

Tab.1: Verteilung der beschichteten und unbeschichteten Klammern auf die Unterkieferhälften

Hund	Beschichtete Klammer	Unbeschichtete Klammer
1	links	links
2	rechts	links
3	rechts	links
4	rechts	rechts
5	rechts	links
6	links	rechts
7	rechts	links

Direkt postoperativ, am 6., 12., 17., 22. Tag nach der Operation werden Röntgenaufnahmen angefertigt.

Die Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgt am 6., 12., 17. Tag post operationem.

Die Hunde werden am 22. Tag nach der Operation euthanasiert und direkt im Anschluss werden die Knochenproben mit den Implantaten aus den Unterkiefern herauspräpariert und in Schafferscher Lösung fixiert. Die Organproben aus Lunge, Milz, Leber und Niere werden in Formalin-Lösung (Histo-Lösung, Fa. Merck) eingelegt.

3.2.3 Implantatmaterial und -design

Als Implantat kommt eine Autokompressionsklammer der Firma Normed (Tuttlingen) zum Einsatz. Diese besteht aus Nitinol, einer Legierung aus Nickel und Titan.

Die in der vorliegenden Studie eingesetzten Klammern haben eine Länge von 8 mm, eine Breite von 1,6 mm und eine Materialdicke von 0,7 mm.



Abb.7: Länge der Klammer

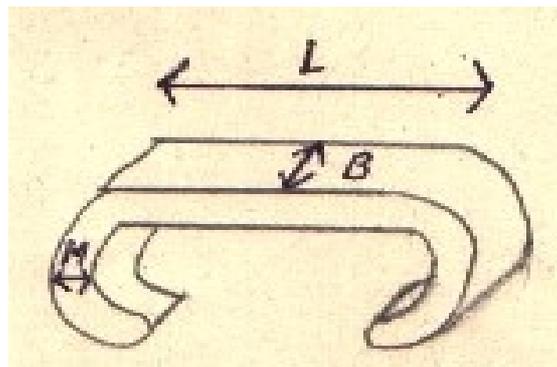


Abb. 8: Abmessungen der Klammer: Länge (L): 8mm,
Breite (B): 1,6 mm, Materialdicke (M): 0,7mm

Die Behandlung der Implantate mit PIII findet am Institut für Oberflächenmodifizierung der Universität Leipzig statt.

Den Klammern werden bei einer Temperatur von 400°C unter einer Spannung von 15 kV Sauerstoffionen implantiert. Nach einer Behandlungszeit von insgesamt 30 Minuten ist eine implantierte Dosis von $1,5 \times 10^{17}$ Atomen/ cm² erreicht.

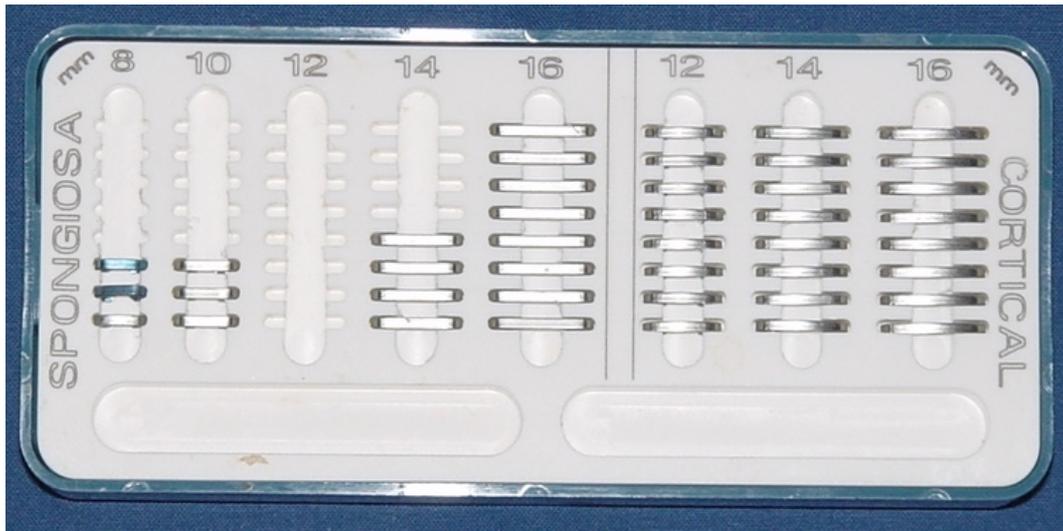


Abb. 9: Beschichtete (blau) und unbeschichtete Klammern der Länge 8mm

3.2.4 Operatives Modell

3.2.4.1 Anästhesie und Operationsvorbereitung

Etwa eine Stunde vor Beginn des operativen Eingriffs werden die Hunde durch eine i.m. Injektion von 0,02mg/kg KGW Acepromazin (Vetranquil[®], Fa. Albrecht) und 0,25mg/kg Levomethadon (Polamivet[®], Fa. Intervet) sedativ prämediziert. Gleichzeitig erhalten sie 4mg/kg Carprofen (Rimadyl[®], Fa. Pfizer) i.m.. Nach ca.15 min wird in die V. cephalica antebrachii ein venöser Zugang gelegt über den man zur Narkoseeinleitung 4mg/kg Propofol (Propofol, Fa. Fresenius Kabi) appliziert.

Im Bereich des Unterkiefers werden die Tiere geschoren, rasiert und die Haut mit Alkohol entfettet.

Nach endotrachealer Intubation wird die Narkose im Operationssaal mit 1 bis 2% Isofluran (Forene[®], Fa. Abott) und 2 bis 2,5mg/kg/h Propofol (Propofol, Fa. Fresenius Kabi) fortgeführt. Zusätzlich erhalten die Hunde 0,05 mg/kg/h Fentanyl (Fentanyl, Fa. Curamed)

Die perioperative Narkoseüberwachung erfolgt durch transkutane Sauerstoffpartialdruckmessung (Pulsoximeter, Fa. Siemens) und eine externe EKG Ableitung (Datex, Ohmeda S/5)

Die Hunde werden auf dem Operationstisch in Rückenlage fixiert und der Kopf im Nackenbereich durch ein Silikonkissen gestützt.

Zur antibiotischen Abdeckung des Eingriffs erhält jedes Tier 1,193g Ceftriaxon (Rocephin[®], Fa. Roche) vor Operationsbeginn.

Das Operationsfeld wird mit einem Hautdesinfizienz (Cutasept[®], Fa. Bode Chemie) eingesprüht und anschließend steril abgedeckt.

3.2.4.2 Operationstechnik

Der Hautschnitt erfolgt vom Beginn des kaudalen Drittels des Unterkiefers bis zum Kieferwinkel. Das darunter liegende subkutane Fettgewebe und der M. masseter werden durchtrennt und vom Knochen abgehoben.

Es erfolgen zuerst zwei senkrecht zum Margo ventralis geführte Schnitte in den vorderen Bereich des freipräparierten Knochens, der erste mit einem CO₂-Laser, der zweite mit einem Osteoskalpells nach Sachse (Fa. Medicon, Tuttlingen). (C.v.Hänisch, vet.med. Diss., in Vorbereitung)

Nun wird mit dem Osteoskalpell ein gleichseitiges Dreieck mit einer Kantenlänge von 6 bis 8 mm herauspräpariert. Während dessen erfolgt eine Kühlung der Schnittstellen mit physiologischer Kochsalzlösung. In die Mitte dieses Fragments wird mit einem 0,8 mm Bohrer (Fa. Bien Air, CH-Biehl) ein Loch gebohrt.

Die Nitinol-Klammer wird mit einer Halteklemme (Prototyp, Fa. Normed, Tuttlingen) erfasst und kräftig mit Kältespray (Endo-Frost, Fa. Roeko) besprüht. Nun werden die Enden mit einer Biegeklemme (Prototyp, Fa. Normed, Tuttlingen) aufgebogen.

Um das zweite Bohrloch im passenden Abstand zu setzen wird diese aufgebogene Klammer als Maßinstrument benutzt. Sobald das zweite Loch gebohrt ist, werden die Klammerenden in die Bohrlöcher eingesetzt. Die Klammer begibt sich innerhalb einiger Sekunden in ihre Ursprungsform zurück und fixiert dadurch das Knochenfragment. Die Unterhaut wird mit einem resorbierbaren Faden (Vicryl, 2 metric, Fa. Ethicon) in einer fortlaufenden Naht geschlossen. Der Verschluss der Haut erfolgt mit Einzelheften (Prolene, 2 metric, Fa. Ethicon). In analoger Weise wird die andere Kieferhälfte operiert.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN



Abb. 10: Osteoskalpell nach Sachse, Fa. Medicon



Abb. 11: Bohrer, Fa. Bien Air



Abb.12: Handstück von Säge und Bohrer, Fa. Bien Air



Abb.13: Einsprühen der Klammer mit Eisspray



Abb. 14: Aufbiegen eines Klammerschenkels



Abb. 15: Klammer einseitig aufgebogen

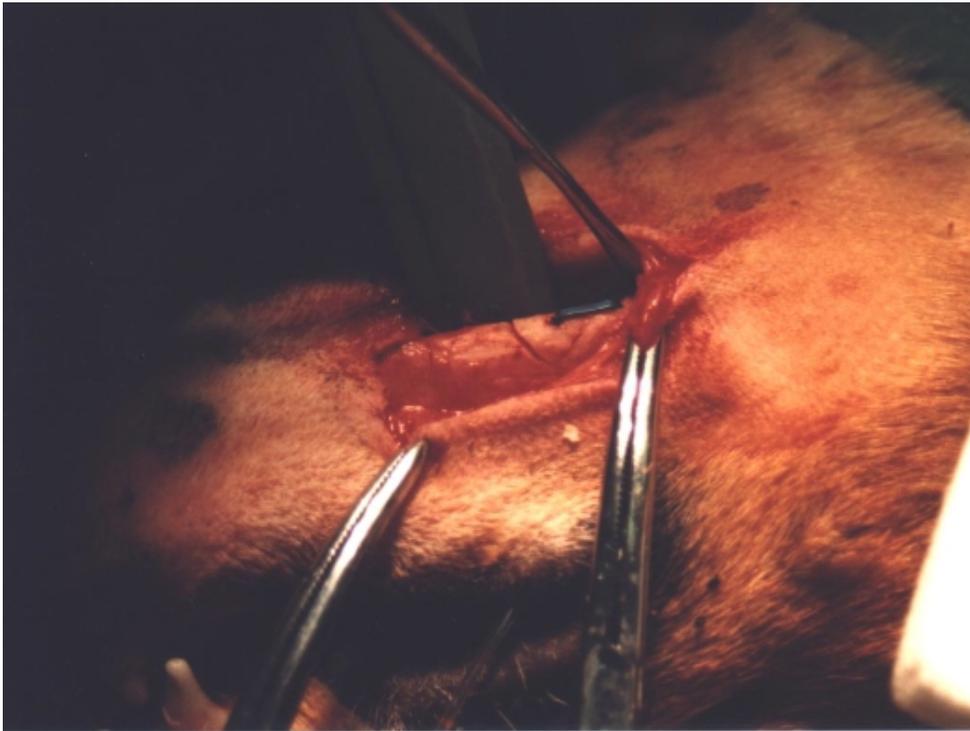


Abb.16: Knochenfragment durch Klammer fixiert

3.2.4.3 Postoperative Versorgung

Während der Narkoseausleitung werden die Hunde mit 0,02mg/kg Buprenorphin (Temgesic[®], Fa. Essex) s.c. und 30mg/kg Metamizol (Novalminsulfon-ratiopharm[®] 2,5, Fa. Ratiopharm) i.v. analgetisch versorgt.

Die ersten drei Tage nach der Operation erhalten die Hunde zweimal täglich 0,02mg/kg Buprenorphin (Temgesic[®], Fa. Essex) s.c. und 30mg/kg Metamizol (Novalminsulfon-ratiopharm[®] Tropfen, Fa. Ratiopharm) p.o., zusätzlich einmal täglich 4mg/kg Carprofen (Rimadyl[®], Fa. Pfizer) s.c.

Zur antibiotischen Versorgung erhalten die Hunde bis einschließlich des dritten postoperativen Tages 15mg/kg Amoxicillin i.m. (Duphamox[®], Fa. Fort Dodge).

Es findet täglich eine Kontrolle der Wunde und des Allgemeinbefindens der Tiere statt.

Am 10. postoperativen Tag werden die Fäden gezogen.

3.2.5 Röntgenverlaufsuntersuchungen

Unmittelbar postoperativ, am 6., 12., 17. und 22. Tag nach dem Eingriff werden mit einem C-Bogen (Exposcop, Fa. Ziehm, Nürnberg) Röntgenkontrollen durchgeführt. Um eine exakte Lagerung der Unterkieferhälften im 45 ° Winkel zu ermöglichen, werden die Hunde ca. 30 Minuten vorher mit 0,08mg/kg Medetomidinhydrochlorid (Domitor[®], Fa. Pfizer) i.m. sediert. Anhand der Röntgenaufnahmen wird die Position und der Sitz der Implantate kontrolliert, sowie die Heilung der Spalten mit bzw. ohne Kompression beurteilt.

3.2.6 Polychrome Sequenzmarkierung

Zur zeitlichen Darstellung der Umbauvorgänge im Knochen, wird eine polychrome Sequenzmarkierung nach RAHN und PERREN (1975) durchgeführt.

Es kommen folgende Fluorochrome zur Anwendung:

Calceingrün (Fa. Synopharm) 3%ige wässrige Lösung mit 2% NaHCO₃
30 mg/kg KGW i.v.

Xylenolorange (Fa. Synopharm) 3%ige wässrige Lösung mit 2% NaHCO₃
90 mg/kg KGW i.v.

Alizarinkomplexon (Fa. Sigma-Aldrich) 3%ige wässrige Lösung mit 2% NaHCO₃
30 mg/kg KGW i.v.

Die Substanzen werden über einen Sterilfilter (Minisart[®], Fa. Sartorius) verabreicht.

Die Farbstoffe werden nach dem Schema in Tabelle 2 injiziert und sollen im histologischen Bild folgende Farbbanden erzeugen:

Tab.2: Injektionsschema der Fluorochrome

Fluorochrom	Calceingrün	Xylenolorange	Alizarinkomplexon
Tag post OP	6	12	17
Farbbande	grün	Orange	rot

3.2.7 Probengewinnung und –aufarbeitung

Am 22.Tag post OP werden die Hunde durch intravenöse Injektion von 160 mg/kg Pentobarbital (Narcoren[®], Fa. Merial) und nachfolgend 0,5 mmol/kg Kaliumchlorid (KCl 7,45%, Fa. Braun) euthanasiert. Es werden die Unterkiefer, sowie Organproben von Lunge,

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Leber, Milz und Niere entnommen. Die Organproben werden in Formalin fixiert. Aus dem Unterkiefer werden Präparatblöcke von ca. 1 x 1 x 2 cm mit einer Bandsäge (Fa. Exakt, Norderstett) herausgeschnitten, diese werden über drei Tage in Schafferscher Lösung fixiert. Danach erfolgt die Entwässerung und die Einbettung in Methyl-Metacrylat (MMA) nach folgendem Schema:

Tab.3: Entwässerungs-und infiltrationsschema

Ethanol 50 %	3 Tage bei Raumtemperatur
Ethanol 70 %	3 Tage bei Raumtemperatur
Ethanol 80 %	3 Tage bei Raumtemperatur
Ethanol 90 %	3 Tage bei Raumtemperatur
Ethanol 100 %	3 Tage bei Raumtemperatur
Ethanol 100 %	3 Tage bei Raumtemperatur
Aceton 100 %	3 Tage bei Raumtemperatur
Aceton 100 %	3 Tage bei Raumtemperatur
Aceton/Methanol	3 Tage bei Raumtemperatur
Methanol 100%	3 Tage bei Raumtemperatur
Methylmetacrylat 100%	3 Tage im Kühlschrank
Methylmetacrylat 100%	3 Tage im Kühlschrank
MMA-Einbettgemisch	3 Tage im Kühlschrank
MMA-Einbettgemisch	Polymerisation

MMA- Einbettgemisch:

100ml Methylmetacrylat (Fa. Merck)

20ml Plastoid N (Fa. Röhn Pharma)

3g Benzylperoxid (Fa.Merck)

Die Einbettung der Präparate erfolgt in Glasröhrchen, die um eine feste Bodenplatte zu erhalten, zunächst ohne Probe 3 bis 4 mm mit MMA-Einbettgemisch aufgefüllt und polymerisiert werden. Anschließend werden die Proben senkrecht und mit einem Papierstreifen markiert in die Gefäße gestellt und diese bis 0,5 cm über die Präparatoberkante mit Einbettgemisch gefüllt. Die Gefäße werden luftdicht verschlossen und bei 37°C über ca. 4 Wochen im Wasserbad ausgehärtet. Schließlich werden die Gläser zerschlagen und die

erhaltenen Blöcke mit Sekundenkleber (Cyanolit adhesive, Fa. Panacol-Elosol) auf Metallplatten aufgeklebt, um sie in die Haltevorrichtung der Innenlochsäge (Leica SP 1600, Fa. Leica) einspannen zu können. Es werden nun Schnitte parallel zur Längsachse der Klammer mit einer Dicke von 150 μm angefertigt. Da der Sägeverlust 300 μm beträgt, erhält man pro Implantat nur 4 bis 5 Schnitte.

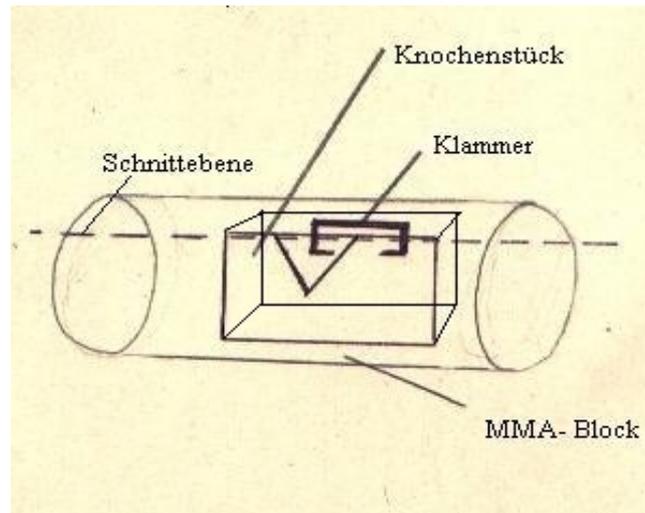


Abb. 17: Skizze der Schnittebene

3.2.8 Färbung der histologischen Präparate

Bevor die Präparate für die histologische Untersuchung gefärbt werden, muss die Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt werden, da durch Färbung die Intensität der Fluorochrome erheblich herabgesetzt oder überdeckt wird.

Die Präparate werden nach Paragon gefärbt (ROMEIS, 1989):

1. Präparat kurz in 100 % Ethanol schwenken
2. in Aqua dest. gut abspülen
3. 3-6 min in im Brutschrank auf 60°C vorgewärmter Färbelösung färben
4. 2x in Aqua dest. gründlich spülen
5. Schnitt trocknen
6. mit Eukitt eindeckeln

Paragon-Färbelösung:

0,73g Tolouidinblau (Fa. Sigma) und

0,27g bas. Fuchsin (Fa. Chroma)

in 100 ml 30% Ethanol unter Rühren lösen und filtrieren

auf pH 6,5 einstellen

3.3 Auswertung und Dokumentation

3.3.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung

Zunächst werden die Schnitte ohne weitere Behandlung fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Als Mikroskop wird ein Axiophot der Firma Zeiss verwendet. Dieses ist mit einer Digitalkamera (Axio Cam HRc, Fa. Zeiss) gekoppelt, die das mikroskopische Bild mit Hilfe eines Glasfaserkabels über einen Computer an den Monitor weiterleitet. Die Daten, die das mikroskopische Bild liefert, werden photographisch dokumentiert und später mit Axio Vision 3.1., einer Bildverarbeitungssoftware, verarbeitet. Es werden Aufnahmen in 2,5 und 5facher Vergrößerung, sowie schematische Übersichtszeichnungen angefertigt. Da die Fluoreszenzfarbstoffe unterschiedliche Anregungs- und Emissionspektren haben (s. Tab.4), wird jedes Bild mit drei verschiedenen Filtern (Filterset 17, 18, 31, Fa. Zeiss) aufgenommen. Die Einzelbilder können später mit Hilfe des Verarbeitungsprogramms übereinander gelegt werden.

Tab.4: Anregungs- und Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe

Farbstoff	Anregung (nm)	Emission (nm)
Calceingrün	495	500-550
Xylenolorange	377	610
Alizarinkomplexon	530-560	580

Die Fluorochromanreicherung gibt Auskunft darüber zu welcher Zeit der Knochen in diesem Gebiet entstanden ist. Die zeitliche Zuordnung ist Tabelle 2 auf Seite 31 zu entnehmen.

Die Beurteilung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder erfolgt sowohl quantitativ, als auch qualitativ.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die quantitative Auswertung der abgespeicherten Bilder findet mit Hilfe eines Computers statt. Dabei umfährt der Untersucher die fluoreszierenden Bereiche manuell mit einem Cursor. Die umfahrenen Flächen oder Strecken werden am Bildschirm durch eine Linie wiedergegeben. Mit der Axio Vision Software können die Flächeninhalte berechnet bzw. die Strecken gemessen werden. Ebenso ist es möglich, weitere für spätere Berechnungen benötigte Parameter, wie Abstände zwischen bestimmten Punkten oder Linien zu vermessen.

Folgende Parameter werden in der Umgebung des Implantats bestimmt:

Die Fläche des Bohrloches, die Fläche der Klammer, sowie alle fluoreszierenden Bereiche, um daraus den Anteil des Bohrlochs zu berechnen, der bereits mit neuem Gewebe ausgefüllt ist. Des Weiteren erfolgt die Vermessung der direkt der Klammer anliegenden fluoreszierenden Abschnitte, sowie des Umfangs der Klammer, um daraus den Anteil der Klammeroberfläche, die bereits mit neu gebildetem Gewebe besetzt ist, zu erhalten.

Zur Untersuchung der Spaltheilung mit bzw. ohne Kompression wird jeweils die Gesamtfläche des Spaltes, sowie die darin enthaltene fluoreszierende Fläche bestimmt und daraus der Anteil des neu gebildeten Gewebes im Spalt berechnet.

Die qualitative Auswertung der Heilungsvorgänge, findet nach folgenden Beurteilungskriterien statt:

Es wird untersucht, ob die Klammer zentral oder exzentrisch im Bohrloch liegt, im letzteren Fall wird unterschieden, ob die Lage der Klammer zur Kompression hin oder dieser entgegen gerichtet ist.

Des Weiteren wird notiert, wie viele Seiten der Klammer von Fluoreszenz umgeben sind und wie die Fluoreszenz in den Spalten verteilt ist.

Als Parameter für die Spaltheilung werden das Vorhandensein von Geflechtknochenstruktur und periostalen Heilungsvorgängen überprüft.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Hund- Nr.:	Präparat-Nr.:	Implantat:
------------	---------------	------------

Sitz der Klammer im Bohrloch			
Im Zentrum	Exzentrisch	Zur Kompression	Entgegen der Kompression

Fluoreszenz um die Klammer					
Einseitig		zweiseitig		dreiseitig	vierseitig
Zur Kompression	Entgegen der Kompression		┌ / ┘		

Fluoreszenz im Spalt ohne Kompression							
Einseitig		beidseitig		Fluoreszenz im Spalt - quantitativ			
Zur Kompression	Entgegen der Kompression			-	+	++	+++

Geflechtknochenstruktur erkennbar ja nein

Periostale Heilung ja nein

Fluoreszenz im Spalt ohne Kompression							
Einseitig		beidseitig		Fluoreszenz im Spalt - quantitativ			
Zur Kompression	Entgegen der Kompression			-	+	++	+++

Geflechtknochenstruktur erkennbar ja nein

Periostale Heilung ja nein

Abb. 18: Untersuchungsprotokoll für die qualitative fluoreszenzmikroskopische Auswertung

3.3.2 Histologische Untersuchung

Die histologische Auswertung erfolgt sowohl für die Überprüfung der Spaltheilung, als auch die Kontrolle der Implantateinheilung qualitativ. Als Mikroskop dient ein Axiophot der Firma Zeiss, unter Verwendung der Durchlichtvorrichtung. Zur Dokumentation werden mit einer Digitalkamera (Axio Cam HRc, Fa. Zeiss) von den Präparaten Übersichtsaufnahmen in 2,5-facher Vergrößerung, sowie Detailaufnahmen relevanter Bereiche in 5-, 10-, 20-, und 40-facher Vergrößerung angefertigt. Das Vorhandensein verschiedener in den Auswertungsbögen aufgeführter Knochenzellen dient dem Beurteilungskriterium der Knochenzubildung bzw. des Knochenabbaus. Daneben werden die Anwesenheit von Entzündungszellen, sowie die Beschaffenheit des Bindegewebes untersucht. Zur Beurteilung der Implantatintegration werden die unterschiedlichen Qualitäten der knöchernen Einheilung in die Auswertung einbezogen.

3.3.3 Bestimmung des Titangehalts der inneren Organe

Durch die Zerstörung der schützenden Titanoxidschicht kommt es zum Mikroabrieb und damit zur Freisetzung von Titanpartikeln aus den Implantaten. Diese werden von Makrophagen aufgenommen und entweder intralysosomal zersetzt oder über Blut- und Lymphbahnen in die Endstrombahnen der inneren Organe transportiert. Dort findet eine Akkumulation der Titanpartikel statt. Dieser Gehalt an Titan ist in Organproben mittels Atomabsorptionsspektrographie quantifizierbar.

Die Titangehaltsbestimmung findet im Institut für Toxikologie und Umwelthygiene der Technischen Universität München statt.

Zur Untersuchung gelangen Proben von Lunge, Leber, Milz und Niere der Hunde. Von Hund 1 stehen für diese Untersuchungen keine Proben zur Verfügung.

Die Gewebeproben werden in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, von anhaftender Feuchtigkeit befreit und in einem geschlossenen Quarzgefäß nassverascht. Der Titangehalt wird mittels IPC (inductively coupled plasma)- Massenspektrometrie bestimmt und auf das Frischgewicht des Gewebes bezogen.

Um ebenfalls auf das Trockengewicht der Organe bezogene Mengenangaben zu erhalten, wie sie häufig in der Literatur zu finden sind, wird ein Anteil der Organe, der ungefähr ein Drittel der Gesamtmasse ausmacht, einer Gefriergewichtsbestimmung unterzogen, die als Bezugsgröße dienen soll.

Tab.5: Organproben für die Atomabsorptionsspektrographie

Organgewicht in g	Leber	Milz	Niere	Lunge
Hund 2	1,30	0,88	0,81	0,66
Hund 3	1,45	0,45	0,96	0,58
Hund 4	2,47	5,05	2,49	1,82
Hund 5	6,16	3,00	3,62	5,09
Hund 6	2,54	4,28	3,62	3,93
Hund 7	3,31	2,82	4,54	5,88

Tab.6: Organproben für die Gefriertrocknung

Organgewicht in g	Leber	Milz	Niere	Lunge
Hund 2	0,51	0,48	0,42	0,18
Hund 3	0,68	0,22	0,46	0,31
Hund 4	0,93	2,19	0,94	0,66
Hund 5	2,96	1,37	1,85	2,27
Hund 6	1,18	1,82	1,64	1,96
Hund 7	1,49	1,18	2,22	2,76

3.3.4 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung gelangen die Ergebnisse der quantitativen Vermessungen der Fluoreszenzhistologie. Von diesen werden mit Hilfe des SAS-Systems die Mittelwerte, die Standardabweichungen, sowie die Minimal- und Maximalwerte getrennt nach Methoden berechnet.

Von folgenden qualitativen Merkmalen werden Häufigkeitsverteilungen erstellt:

- ◆ Lage der Klammer im Bohrloch
- ◆ Anzahl der von Fluoreszenz umgebenen Seiten der Klammer
- ◆ Beziehung der vorhandenen Fluoreszenz zur Kompression
- ◆ Häufigkeit des Vorhandenseins von Geflechtknochen

3.4 Ergebnisse

3.4.1 Operation und klinische Beobachtungen post operationem

Die Hunde überstehen die Narkose und die Operation alle gut.

Bei Hund 1 wird auf der rechten Seite das dreieckige Fragment beim Setzen des Bohrlochs in dieses Fragment derart beschädigt, dass dieses in zwei Einzelteile zerfällt. Aus diesem Grund ist das Einsetzen eines Implantats an dieser Unterkieferseite in der geplanten Weise nicht mehr möglich. Daher wird eine Klammer in den verbleibenden Teil des Unterkiefers, direkt neben die Stelle an der das Dreieck entnommen wurde, eingesetzt.

Bei allen anderen Tieren verläuft das Einsetzen der Klammern komplikationslos.

Die Tiere zeigen ab dem ersten postoperativen Tag ein ungestörtes Allgemeinbefinden und eine gute Futteraufnahme. Es sind keinerlei Anzeichen von Schmerzempfinden erkennbar.

Alle Hunde haben im Bereich der Wunde eine deutliche Wundschwellung, die sich nach zwei bis drei Tagen zurückbildet.

Die einzige Ausnahme zeigt sich bei Hund 4 auf der linken Seite. Hier nimmt der Umfang der Schwellung ab dem dritten Tag deutlich zu. Sie ist nicht vermehrt warm, fühlt sich weich an und der Hund äußert auf die Palpation keinen Schmerz. Bei der Röntgenkontrolle an Tag 6 post operationem zeigt sich, dass sich das Implantat gelöst hat und sowohl dieses als auch das Knochenfragment in dem Bereich der Schwellung frei herum schwimmen. Dies veranlasst eine zweite Operation, in der das Knochenfragment und die Klammer entnommen, das umliegende Gewebe mit einem scharfen Löffel küretiert, anschließend gespült und mit Leukase-Kegeln (Fa. Dermapharm) versehen wird. Nach dieser Behandlung kommt es zu einer raschen Abheilung ohne weitere Komplikationen.

Bei Hund 6 kommt es am zweiten Tag nach der Operation durch Eigenmanipulation des Hundes zum Verlust von zwei Heften der Hautfäden. Nach Desinfektion des entsprechenden Bereiches werden diese durch drei Hautklammern ersetzt. Eine Verschlechterung der Wundheilung aus diesem Grund kann nicht festgestellt werden.

Die Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe verläuft bis auf eine Ausnahme komplikationslos.

Bei Hund 4 kommt es einige Minuten nach der Applikation von Alizarinkomplexon zum Vomitus. Da das Tier bald wieder ein ungestörtes Allgemeinbefinden zeigt, bleibt dieser Vorfall unbehandelt. Alle Hunde zeigen einige Minuten nach Applikation der Farbstoffe eine Veränderung der Schleimhautfarbe, die nach ca. 30 Minuten wieder nachlässt. Bei Calceingrün ist diese nur sehr schwach ausgeprägt, die Schleimhäute erscheinen gelblich bis grünlich. Der stärkste Effekt mit kräftig violetter Verfärbung der Schleimhäute tritt bei

Xylenolorange auf. Etwas weniger spektakulär ist die fliederfarben bis rote Farbe nach Gabe von Alizarinkomplexon. Ebenso tritt eine Verfärbung des Urins der Tiere auf, die einige Stunden anhält und sich folgendermaßen gestaltet: Kräftig gelbgrün bei Calceingrün, violett nach Xylenolorange und fliederfarben bei Alizarinkomplexon.

3.4.2 Röntgenaufnahmen

Die Auswertung der Röntgenbilder ergibt bei **Hund 1** Folgendes:

Auf der linken Seite sitzt das Implantat zu allen Untersuchungszeitpunkten fest im Knochen verankert. Das dreieckige Fragment ist auch an Tag 21 noch deutlich zu erkennen, was darauf schließen lässt, dass das Gewebe noch nicht knöchern durchbaut ist.

Auf der rechten Seite sitzt die neben die Lücke des zerbrochenen Fragments gesetzte Klammer fest im Gewebe. Im Bereich dieser Lücke ist ab Tag 17 eine Verschattung auf der Röntgenaufnahme zu erkennen.

Bei **Hund 2** sitzen beide Klammern fest und tief im Knochen. Auch hier sind nach drei Wochen die beiden Dreiecke noch deutlich sichtbar.

Zwischen der Klammer und dem Knochen zeigt sich bei **Hund 3** an der linken Unterkieferhälfte ein feiner Spalt. Rechts ist das Implantat tief im Knochen verankert.

Auf der postoperativen Aufnahme der linken Seite von **Hund 4**, sind die Klammerschenkel wenig zusammengezogen, dennoch sitzt die Klammer fest im Gewebe. In der Kontrollaufnahme an Tag 6 stellt sich die Ursache für die klinisch festgestellte Schwellung in diesen Bereich dar: Die Klammer hat sich gelöst und sowohl diese, als auch das Knochenfragment schwimmen frei im Gewebe.

Das rechte Implantat ist fest im Knochen verankert. Durch den kräftigen Zug der Klammer wird das Fragment derartig auf eine Seite gezogen, dass sich der unter Kompression stehende Spalt als feine Linie darstellt, der andere Spalt ist deutlich sichtbar ist.

Auch bei **Hund 5** ist auf der linken Seite eine starke Kompression der fest im Knochen verankerten Klammer erkennbar.

Rechts hingegen befindet sich zwischen dem Knochengewebe und dem Implantat ein geringer Spalt, was den Halt der Klammer nicht beeinträchtigt.

Beide Klammern liegen bei **Hund 6** direkt dem Knochen an und zeigen eine feste Verbindung zum Knochengewebe.

Hund 7 zeigt eine fest im linken Unterkiefer sitzende Klammer, die durch einen feinen Spalt vom Knochen abgehoben ist und eine stark kompressive Wirkung hat.

Zwischen der rechten Klammer und dem Knochen ist ein deutlicher Spalt zu erkennen. Die Klammerschenkel sind gerade noch weit genug im Gewebe verankert, dass es nicht zum Implantatverlust kommt.

Bei allen Aufnahmen ist nach drei Wochen das Knochenfragment noch deutlich zu erkennen, wobei die nicht unter Kompression stehenden Spalten erheblich breiter sind.

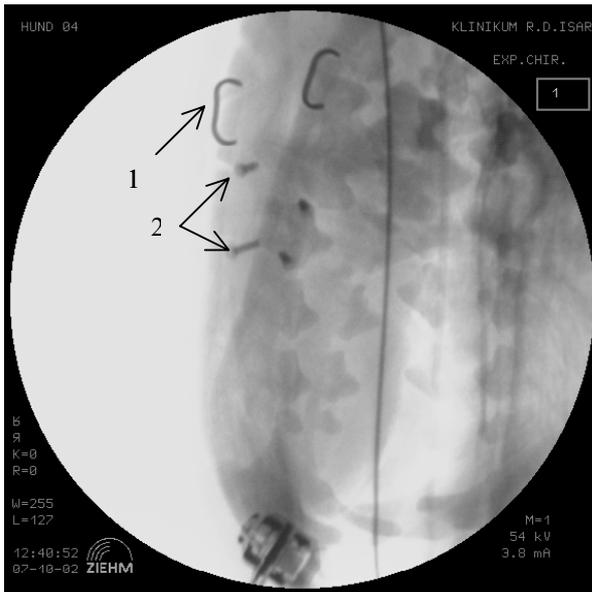


Abb.21: Hund 4, Tag 0, links

Klammer sitzt im Knochen (1)
 (2) Markierungsschrauben der Laser- und Säge-
 Schnitte (C. v. Hänisch, vet.med. Diss., in Vorb.)

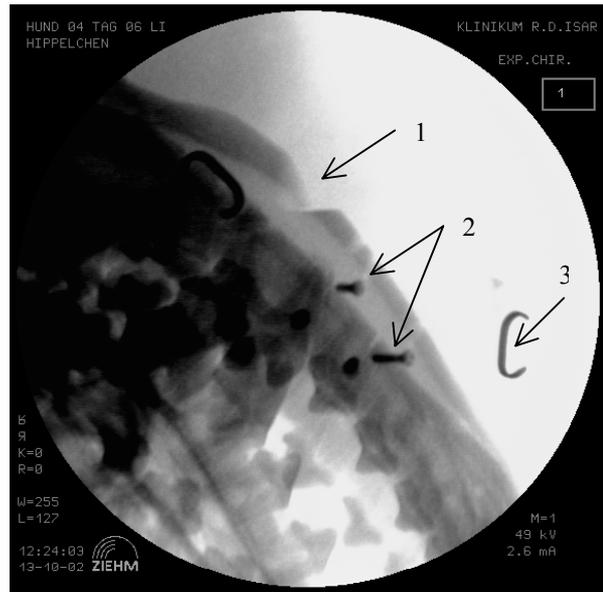


Abb. 22: Hund 4, Tag 6, links, Implantatverlust

Das Knochenfragment hat sich gelöst (1),
 die Klammer schwimmt frei (3).
 (2) Markierungsschrauben

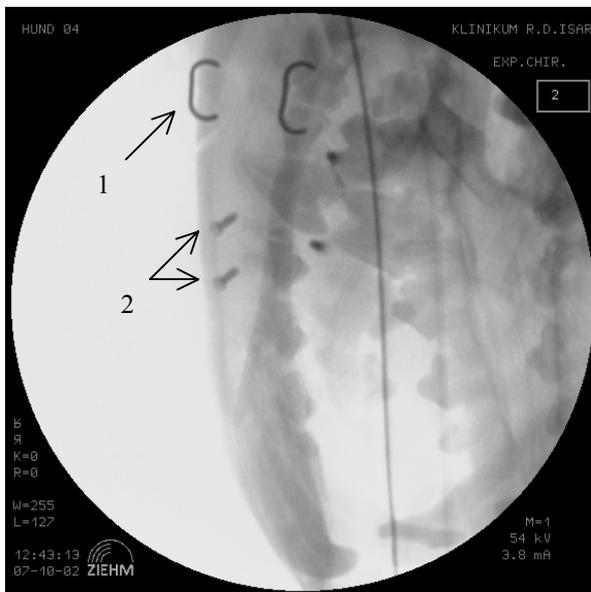


Abb. 23: Hund 4, Tag 0, rechts

Das Implantat sitzt fest im Gewebe (1).
 (2) Markierungsschrauben

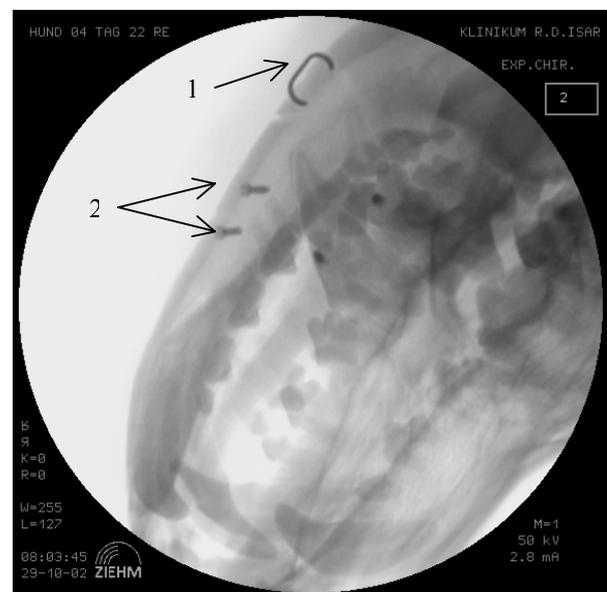


Abb. 24: Hund 4, Tag 22, rechts

Die Klammer ist im Knochen verankert (1),
 sowohl der Komprimierte, als auch der
 nicht komprimierte Spalt sind noch zu
 erkennen. (2) Markierungsschrauben



Abb. 25: Hund 3, Tag 6, links

Die Klammer ist tief im Knochen verankert (1).
(2) Markierungsschrauben

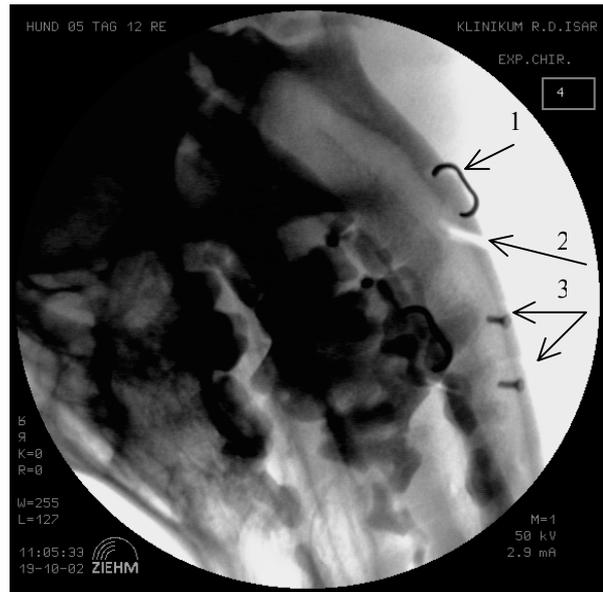


Abb. 26: Hund 5, Tag 12, links

Die Klammer sitzt fest im Knochen (1). Der nicht komprimierte Spalt stellt sich deutlich dar (2). (3) Markierungsschrauben

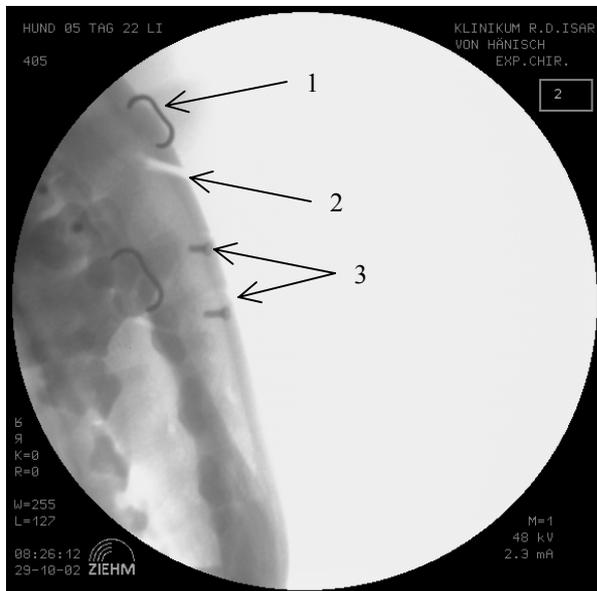


Abb. 27: Hund 5, Tag 22, links

Die Klammer ist fest im Knochen verankert (1).
Der nicht komprimierte Spalt ist deutlich erkennbar (2). (3) Markierungsschrauben

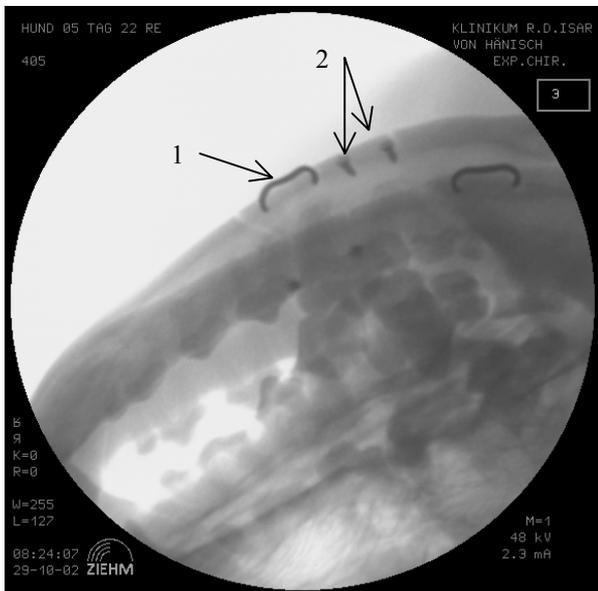


Abb. 28: Hund 5, Tag 22, rechts

Das Implantat sitzt im Gewebe (1), die Klammerschenkel sind kaum eingezogen.
(2) Markierungsschrauben

3.4.3 Qualitative Auswertung der Fluoreszenz- und der Durchlichtmikroskopie

Es stellt sich heraus, dass nur zwei der drei applizierten Farbstoffe zu sehen sind. Es zeigen sich grüne durch Calceingrün ausgelöste und orange auf Xylenolorange zurückzuführende Banden. Eine rote auf der Einlagerung von Alizarinkomplexon basierende Fluoreszenz ist nicht zu erkennen.

3.4.3.1 Nicht unter Kompression stehende Spalte

Hund 1:

Links:

Fluoreszenzmikroskopie:

Präparationsbedingt ist dieser Spalt nicht komplett erhalten, der vorliegende Abschnitt zeigt kaum Fluoreszenz. Nur an einem Spaltrand stellt sich eine dünne fluoreszierende Linie dar.

Durchlichtmikroskopie:

Der Spalt ist komplett mit zellreichem Bindegewebe ausgefüllt. In der Spaltmitte befinden sich viele Gefäße, im Randbereich sind einige von Osteoid umgebene Osteoblasten zu erkennen. Es sind wenige einzeln liegende Osteoklasten vorhanden.

Hund 2:

Links:

Fluoreszenzmikroskopie:

Beide Spaltränder weisen eine fluoreszierende Linie auf, die an einigen Stellen unterbrochen ist. In der Spaltmitte ist keine Fluoreszenz vorhanden.

Durchlichtmikroskopie:

Der Spalt hat zum großen Teil einen glatten Rand, dieser wird nur an einigen Stellen von Ausbuchtungen, in denen sich Osteoklasten befinden, unterbrochen. Die Randzone zeichnet sich durch das Vorhandensein vieler Osteoblasten aus. Die Spaltmitte ist mit Bindegewebe gefüllt, das großteils parallel angeordnet ist. Auf der lateralen Seite ist am Übergang zwischen dem Periost und dem Spalt die Formation von Geflechtknochen erkennbar.

Rechts:

Fluoreszenzmikroskopie:

Fluoreszenz ist an diesem Schnitt nur fragmentweise am Rand zu erkennen.

Durchlichtmikroskopie:

Der bindegewebsgefüllte Spalt geht nicht bis an die mediale Seite des Knochens durch. Am gefäßreichen Spaltende ist ein Saum aus Osteoblasten zu erkennen. In der restlichen gerade verlaufenden Randzone befinden sich nur vereinzelt Osteoblasten, die in Bindegewebe eingebettet sind.

Hund 3:

Links:

Fluoreszenzmikroskopie:

Bei diesem Präparat zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Fluoreszenzfarbstoffen. Während beide Randzonen deutlich grün fluoreszieren, stellt sich nur eine erheblich schmalere Randzone orange dar. In der Spaltmitte ist ein amorpher Bereich zu erkennen, der kräftig grün und ein kleinerer Anteil davon orange fluoresziert.

Durchlichtmikroskopie:

Der gerade verlaufende Spalt weist im lateralen Bereich in der Randzone eine gute Osteoblastentätigkeit auf. Am Übergang zwischen dem Periost und dem Spalt ist einseitig bereits Geflechtknochen vorhanden. Dessen knochenbildende Inseln sind von *bone-lining Cells* gesäumt, dazwischen befinden sich einzelne Osteozyten. Die Spaltmitte ist mit Bindegewebe gefüllt, das meist parallelfaserig angeordnet ist.

Rechts:

Fluoreszenzmikroskopie:

Fluoreszenz aufgrund der Anreicherung von Calceingrün stellt sich in diesem Präparat nur abschnittsweise an einem Rand dar. Auf der Anreicherung von Xylenolorange basierende Fluoreszenz ist nicht vorhanden.

Durchlichtmikroskopie:

Im Rand des breiten Spalts befinden sich einige kleine Ausbuchtungen, die wie auch der Übergang vom Periost zum Spalt von Osteoklasten besetzt sind. Die restliche Randzone ist

von einem in Osteoid eingelagerten Osteoblastensaum besetzt. Die Spaltmitte ist mit längsorientiertem Bindegewebe gefüllt, das nur wenige Gefäße enthält.

Hund 4:

Rechts:

Fluoreszenzmikroskopie:

Auch hier ist ein deutlicher Unterschied zwischen den Fluoreszenzfarbstoffen zu erkennen.

Während durch die Einlagerung von Calceingrün nur die Spaltränder eine deutliche Fluoreszenz aufweisen, ist durch die Xylenolorange-Einlagerung bereits eine Füllung des gesamten Spaltes durch Geflechtknochenstrukturen erkennbar.

Durchlichtmikroskopie:

Der komplette Spalt, in dem sich zahlreiche Gefäße befinden, ist mit Geflechtknochen durchbaut. Die einzelnen knochenbildenden Abschnitte sind von *bone-lining Cells* umgeben. Zwischen diesen Bereichen befinden sich Osteozyten.

Hund 5:

Links:

Fluoreszenzmikroskopie:

Entlang des kompletten Spaltes fluoreszieren nur einige winzige Punkte.

Durchlichtmikroskopie:

Der extrem breite Spalt ist mit Bindegewebe gefüllt. In der Mitte des Spaltes befinden sich viele kleine Gefäße. Am Rand sind vereinzelt Osteoblasten vorhanden, die aber keinen geschlossenen Saum ausbilden.

Rechts:

Fluoreszenzmikroskopie:

Am Randbereich ist beidseitig ein breiter Streifen, der eine deutliche Fluoreszenz aufweist, zu erkennen. Auch in der Spaltmitte befinden sich einzelne fluoreszierende Bereiche.

Durchlichtmikroskopie:

Der feine Spalt hat eine trichterförmige Gestalt, in seinen breiten Randzonen ist eine deutliche Osteoblastentätigkeit vorhanden. Die Osteoblasten sind von reichlich Osteoid umgeben.

In der schmalen Mittelzone des Spaltes befinden sich viele Gefäße und zellreiches Bindegewebe.

Hund 6:

Links:

Fluoreszenzmikroskopie:

Die Spaltränder zeigen beidseitig eine an mehreren Stellen unterbrochene grüne Fluoreszenz, aber nur an einem Rand eine ebenfalls nicht durchgehende orange Fluoreszenz. In der Spaltmitte ist ein ovaler Bereich, der ausschließlich orange fluoresziert, erkennbar.

Durchlichtmikroskopie:

Der breite Spalt besitzt auf einer Seite einen geraden, auf der anderen Seite einen unregelmäßig geformten Rand. Am lateralen und medialen Ende des Spaltes ist die osteoblasten- und osteoidreiche Randzone breit, im mittleren Bereich verjüngt sich diese. Am Übergang zwischen Periost und Spalt befindet sich erster Geflechtknochen. Um dessen Knochenbälkchen liegen *bone-lining Cells*, dazwischen sind einzelne Osteozyten zu erkennen. Die Spaltmitte ist von zellreichem Bindegewebe und vielen Gefäßen ausgefüllt.

Rechts:

Fluoreszenzmikroskopie:

Bei diesem Präparat zeigt sich ein breiter Fluoreszenzsaum, der an mehreren Stellen deutlich unterbrochen ist. Die durch Xylenolorange hervorgerufene Fluoreszenz ist geringer ausgebildet, als die durch Calceingrün entstandene.

Durchlichtmikroskopie:

Auf der medialen Seite sind die Spaltränder beidseitig unregelmäßig geformt und von Osteoklasten besetzt. Weiter in Richtung Mitte verlaufen die Ränder gerade. Dort befinden sich in der Randzone, die durch einen breiten Osteoblastensaum und viel Osteoid gekennzeichnet ist, einige große Gefäße. Das laterale Drittel des Spaltes ist gefäßreich und zeigt eine Geflechtknochenstruktur, zwischen dessen Knochenbälkchen einzelne Osteozyten liegen. Die Spaltmitte ist von vielen Gefäßen besetzt und mit zellreichem Bindegewebe gefüllt.

Hund 7:

Links:

Fluoreszenzmikroskopie:

Beide Ränder weisen einen deutlichen kontinuierlich verlaufenden Fluoreszenzstreifen auf. In der Spaltmitte befinden sich einige ovale fluoreszierende Zonen.

Durchlichtmikroskopie:

Der gerade Rand des Präparats ist durch einen breiten Saum von Osteoblasten, die von Osteoid umgeben sind, gekennzeichnet. Im lateralen Abschnitt sind viele Gefäße zu erkennen. In der Mitte des Spaltes befindet sich ein dreieckiges nicht identifizierbares schwarzes Gebilde, das von einem deutlichen Nekroseherd mit mehrkernigen Riesenzellen umgeben ist. Über den gesamten Spalt ist ein schwarzes Pigment verteilt, dessen Ausgangspunkt diese Struktur sein dürfte.

Rechts:

Fluoreszenzmikroskopie:

Beide Spaltränder weisen eine deutliche Fluoreszenz auf, die an wenigen Stellen unterbrochen ist. In der Spaltmitte liegen einige Strukturen, die ebenfalls fluoreszieren.

Durchlichtmikroskopie:

Am lateralen Übergang vom Periost in den Spalt ist eine ausgeprägte, am medialen Übergang eine mäßige Osteoklastenaktivität an den unregelmäßig geformten Rändern zu erkennen. An den Spalträndern befindet sich viel Osteoid und eine große Anzahl von Osteoblasten. Osteoklasten sind dort nur vereinzelt vorhanden. Die Spaltmitte ist von zellreichem Bindegewebe ausgefüllt, in dem eine Granulozyten- und Lymphozytenreiche Nekrosezone zu finden ist. In diesem Bereich ist eine Ansammlung aus mehrkernigen Riesenzellen zu beobachten.

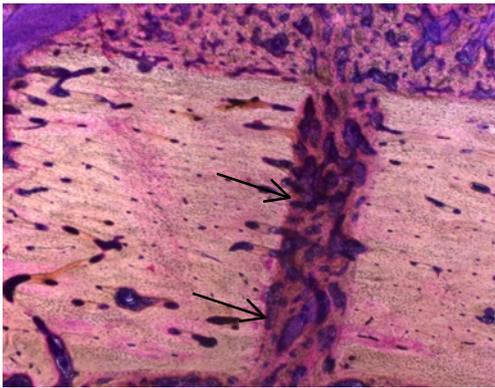


Abb. 29: Hund 4, rechts, ohne Kompression
2,5fache Vergrößerung
Komplette Durchbauung des Spaltes
mit Geflechtknochen (→)

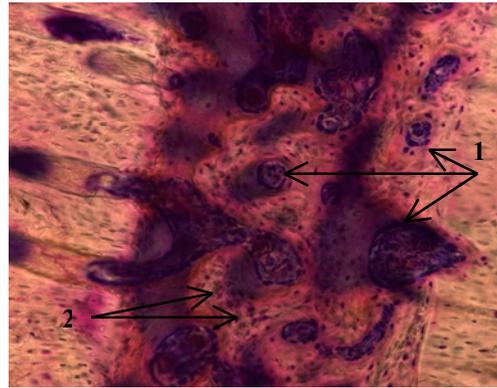


Abb. 30: Hund 4, rechts, ohne Kompression
10fache Vergrößerung
Von *bone-lining Cells* begrenzte Knochen-
inseln (1), dazwischen liegen Osteozyten (2)

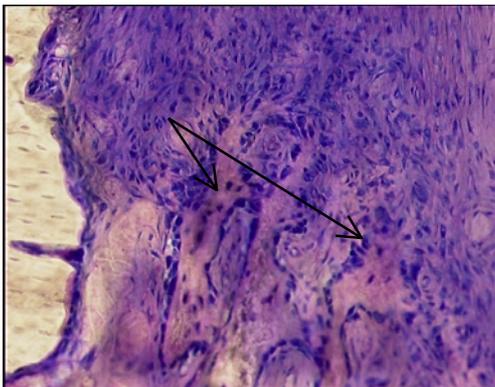


Abb.31: Hund 3, rechts, mit Kompression
10fache Vergrößerung
Beginnende Formation zu Geflecht-
knochen (→)

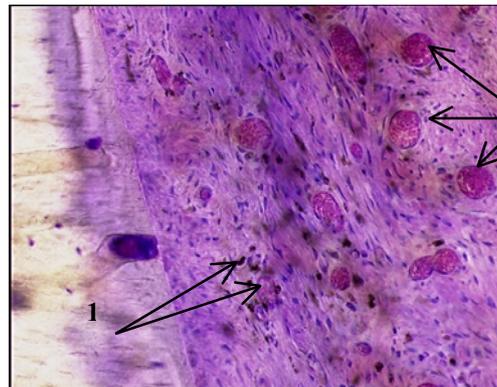


Abb.32: Hund 6, rechts, mit Kompression
10fache Vergrößerung
Schwarzes Pigment im Spalt (1), große
Gefäße (2)

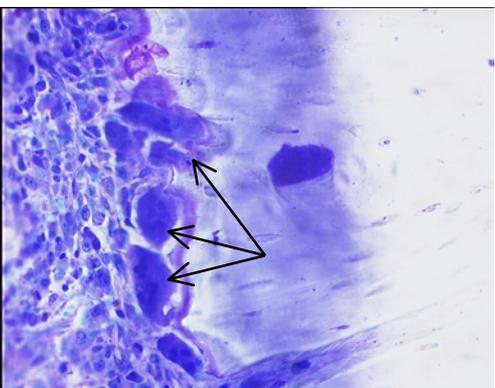


Abb. 33: Hund 5, links, mit Kompression
20fache Vergrößerung
Osteoklasten am unregelmäßig
geformten Rand (→)

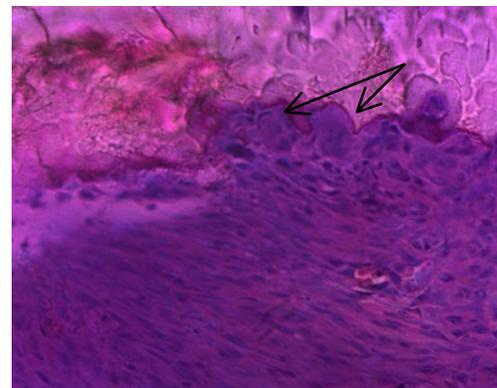


Abb. 34: Hund 5, links, mit Kompression
20fache Vergrößerung
Osteoklasten in Ausbuchtungen (→)

3.4.3.2 Unter Kompression stehende Spalte

Hund 1:

Links:

Fluoreszenzmikroskopie:

Auf einer Seite wird der Spalt von einer dünnen fluoreszierenden Linie begrenzt, auf der anderen Seite ist keine Fluoreszenz zu erkennen. In der Spaltmitte befinden sich einige kleine rund bis oval geformte fluoreszierende Bereiche.

Durchlichtmikroskopie:

Der Übergangsbereich vom Periost in den Spalt ist von Osteoklasten gesäumt, hinter diesen befindet sich eine Reihe von mit Osteoid umgebenen Osteoblasten. Lateral zieht sich ein V-förmiger Osteoklasten und vereinzelt auch Osteoblasten enthaltender Bereich vom Periost aus in den Spalt hinein. Die Spaltränder zeigen an mehreren Stellen Ausbuchtungen, in denen Osteoklasten und dahinter Osteoblasten zu finden sind. Die Spaltmitte ist mit Bindegewebe ausgefüllt. Im gesamten Spalt sind nur wenige Gefäße vorhanden.

Hund 2:

Links:

Fluoreszenzmikroskopie:

An beiden Spalträndern sind feine fluoreszierende Linien zu erkennen, die an mehreren Stellen deutlich unterbrochen sind. Es zeigt sich, dass der Spalt nicht von einem geraden, sondern von einem unregelmäßig geformten Rand begrenzt wird.

Durchlichtmikroskopie:

An den Spalträndern ist eine rege Tätigkeit von Osteoblasten, die von Osteoid umgeben sind, zu erkennen. Auf der einen Seite wird der Rand nur durch einige von Osteoklasten besetzten Ausbuchtungen unterbrochen, auf der anderen Seite ist er deutlich wellenförmig gestaltet. Lateral ist am Übergang vom Periost in den Spalt erster Geflechtknochen vorhanden. Dieser besteht aus kleinen knochenbildenden Inseln, die *von bone-lining Cells* umgeben sind. Zwischen den Knochenbälkchen liegen Osteozyten. Die Spaltmitte ist durch parallel angeordnetes Bindegewebe gefüllt.

Rechts:

Fluoreszenzmikroskopie:

Beide Spaltränder weisen eine fluoreszierende Linie auf, die an einigen Stellen unterbrochen ist. In der Spaltmitte ist keine Fluoreszenz zu erkennen.

Durchlichtmikroskopie:

Die Ränder sind unregelmäßig gestaltet, in den Ausbuchtungen ist eine rege Tätigkeit von Osteoklasten vorhanden. Lateral ist die Randzone, in der eine gute Osteoblastentätigkeit vorherrscht, breit, zur Mitte hin verschmälert sie sich. Am Übergang vom mittleren zum medialen Drittel des Spaltes, sowie im lateralen Bereich zwischen Periost und Spalt ist Geflechtknochen zu erkennen. In der restlichen Innenzone des Spaltes befindet sich parallelfaseriges Bindegewebe.

Hund 3:

Links:

Fluoreszenzmikroskopie:

An den Spalträndern zeigt sich ein dünnes Fluoreszenzband, das an mehreren Stellen unterbrochen ist. In der Spaltmitte stellt sich ein rechteckiger Bereich dar, dessen Ränder eine Fluoreszenz aufweisen, allerdings nur für Xylenolorange.

Durchlichtmikroskopie:

Die Peripherie des Spaltes zeichnet sich durch eine gute Osteoblastentätigkeit aus. Die Spaltränder sind von vielen kleinen Ausbuchtungen gesäumt, in denen sich zahlreiche Osteoklasten befinden. Am lateralen Übergang zwischen Periost und Spalt deutet sich auf einer Seite bereits eine Formation zu Geflechtknochen an. Zwischen dessen von *bone-lining Cells* gesäumten Inseln, liegen einzelne Osteozyten. Im lateralen Drittel der Spaltmitte befinden sich mehrere große Kapillaren, wahrscheinlich von venöser Art. Unterhalb dieser liegt ein Nekroseherd mit einer großen Ansammlung von Granulozyten, mehrkernigen Riesenzellen und Lymphozyten.

Die übrige Spaltmitte ist mit längs zum Rand liegendem zellreichem Bindegewebe und mit vielen kleinen Gefäßen gefüllt.

Rechts:

Fluoreszenzmikroskopie:

Bei diesem Präparat zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Fluoreszenzfarbstoffen. Während sich beide Ränder durch einen deutlichen grünen Streifen begrenzt darstellen, ist nur eine feine orange Randlinie zu erkennen.

Durchlichtmikroskopie:

Der breite Spalt ist von einem mit vielen kleinen nach außen gewölbten Nischen versehenen Rand begrenzt. In diesen befinden sich einzelne Osteoklasten. Der übrige Randbereich ist nur abschnittsweise durch Osteoblasten gesäumt, die von Osteoid umgeben sind. Der gesamte Spalt ist gefäßarm, seine Mitte bindegewebsgefüllt. Am medialen Übergang vom Periost zum Spalt ist eine osteoblastenreiche Zone mit beginnender Geflechtknochenformation zu erkennen. Im gleichen Bereich auf der lateralen Seite zeigt sich um ein nicht zu identifizierendes Gebilde eine deutliche Fremdkörperreaktion bestehend aus einer Ansammlung von Lymphozyten, Granulozyten, mehrkernigen Riesenzellen und einigen Makrophagen.

Hund 4:

Rechts:

Fluoreszenzmikroskopie:

Fluoreszierende Abschnitte sind beiderseits an den Rändern nur bruchstückhaft vorhanden. Im Spalt befinden sich einige fluoreszierende Abschnitte, die von ihrer Anordnung auf das Vorhandensein von Geflechtknochen hindeuten.

Durchlichtmikroskopie:

Der breite Spalt ist mit Ausnahme eines genau in der Mitte liegenden Abschnitts vollkommen mit Geflechtknochen durchbaut. In diesem Bereich befinden sich neben zellreichem Bindegewebe, mehrere große Gefäße und zahlreiche Osteoblasten. Die Spaltränder stellen sich gezackt dar, in diesen Zacken ist eine rege Osteoklastenaktivität zu beobachten.

Hund 5:

Links:

Fluoreszenzmikroskopie:

Es besteht ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Fluoreszenzfarbstoffen. Während auf der Einlagerung von Calceingrün basierend nur wenige Punkte oder sehr kleine Abschnitte fluoreszieren, zeigt sich durch Xylenolorange ausgelöst ein breiter fluoreszierender Saum, der im medialen Bereich den dünnen Spalt komplett ausfüllt.

Durchlichtmikroskopie:

Der sehr schmale Spalt verläuft trichterförmig, sein mediales Drittel stellt sich nur fadenförmig dar. Der Rand ist unregelmäßig geformt, in den Ausbuchtungen befinden sich Osteoklasten. Dahinter ist der Rand von einer durchgehenden Reihe von Osteoblasten, die von Osteoid umgeben sind, gesäumt. Am Übergang vom mittleren zum medialen Drittel liegen einige große Gefäße, dort zeigt sich auch eine beginnende Formation von Geflechtknochen. In diesem Bereich sind sowohl der Spaltrand, als auch die knochenbildenden Inseln von *bone-lining Cells* gesäumt. Lateral zieht vom Periost aus V-förmig Bindegewebe in den Spalt.

Rechts:

Fluoreszenzmikroskopie:

Der Spalt ist beidseitig durch einen deutlichen Fluoreszenzstreifen begrenzt. Im Spalt befindet sich ein großes ovales Gebilde, das deutlich von einer fluoreszierenden Bande umgeben ist.

Durchlichtmikroskopie:

Im Übergangsbereich zwischen Periost und Spalt ist eine rege Osteoklastentätigkeit vorhanden. Der Spalt wird von einer dünnen unregelmäßig geformten Randzone begrenzt, in der sich vereinzelt Osteoklasten und einige Osteoblasten befinden. In der Spaltmitte ist sowohl lateral, als auch medial jeweils eine ausgedehnte Nekrosezone mit einer Ansammlung aus Granulozyten, Lymphozyten, mehrkernigen Riesenzellen und Makrophagen zu erkennen. Zwischen diesen beiden Nekrosezonen ist ein Bereich mit dunkel gefärbten knorpelartigen Zellen, die einem Säulenknorpel ähnlich angeordnet sind.

Hund 6:

Links:

Fluoreszenzmikroskopie:

Der Spalt wird beiderseits von einem deutlichen Fluoreszenzstreifen begrenzt.

Durchlichtmikroskopie:

Der schmale trichterförmig verlaufende Spalt hat großteils einen geraden Rand, der an mehreren Stellen von Ausbuchtungen, in denen eine rege Osteoklastentätigkeit herrscht, unterbrochen wird. In der Peripherie des Spaltes befinden sich viele Osteoblasten, die von reichlich Osteoid umgeben sind. Die Spaltmitte ist gefäßreich. Das mediale Drittel des Spaltes ist von Geflechtknochen durchbaut. In diesem Bereich ist der Rand des Spaltes von *bone-lining Cells* besetzt. Zwischen den Knochenbälkchen liegen Osteozyten.

Rechts:

Fluoreszenzmikroskopie:

Die durch Calceingrün hervorgerufene Fluoreszenz ist an den Spalträndern auffallend stärker vertreten, als die feine Linie, die durch Xylenorange zustande kommt.

Durchlichtmikroskopie:

Am lateralen Übergangsbereich zwischen Periost und Spalt ist auf einer Seite der Rand durch die Tätigkeit von zahlreichen Osteoklasten deutlich gezackt geformt, auf der anderen Seite ist eine beginnende Formation von Geflechtknochen zu sehen. Der Spalt besitzt einen unregelmäßig verlaufenden Rand und einen relativ geraden Rand, der an wenigen Stellen von Nischen unterbrochen ist, in denen eine ausgeprägte Osteoklastentätigkeit vorherrscht. Die Randzone gestaltet sich über den gesamten Spalt hinweg breit und enthält viele von Osteoid umgebene Osteoblasten. In der Spaltmitte befindet sich zellreiches Bindegewebe. Der komplette Spalt zeichnet sich durch das Vorhandensein zahlreicher Gefäße aus.

Hund 7:

Links:

Fluoreszenzmikroskopie:

Beide Spaltränder weisen einen deutlichen Fluoreszenzstreifen auf. In der Spaltmitte befinden sich einige ovale Gebilde, die ebenfalls fluoreszieren.

Durchlichtmikroskopie:

Sowohl lateral, als auch medial sind am Übergang zwischen Periost und Spalt Säume aus Osteoklasten vorhanden. In dem zum großen Teil gerade gestalteten Rand befinden sich einige Nischen, in denen eine Osteoklastenaktivität zu erkennen ist. Die Randzone ist schmal und enthält einige Osteoblasten. Auf der lateralen Seite sind viele Gefäße in einer V-förmigen Anordnung in die Spaltmitte reichend zu sehen. Am Übergang vom lateralen zum mittleren Spaltdrittel befindet sich eine aus zahlreichen Granulozyten, mehrkernigen Riesenzellen und Lymphozyten bestehende Nekrosezone um ein dreieckiges, schwarzes, nicht zu identifizierendes Gebilde herum. Über den gesamten Spalt sind punktförmige dunkelbraune bis schwarze Pigmente verteilt.

Rechts:

Fluoreszenzmikroskopie:

Der Spalt wird auf beiden Seiten von einem breiten fluoreszierenden Saum begrenzt, der an einigen Stellen eine unregelmäßige Form aufweist oder kurze Unterbrechungen zeigt.

Durchlichtmikroskopie:

Die Peripherie des Spaltes wird von Osteoblasten, die von Osteoid umgeben sind, gesäumt. An den Übergängen vom Periost zum Spalt befinden sich viele Gefäße; an dem in diesem Bereich unregelmäßig geformten Rand ist eine rege Osteoblastentätigkeit zu erkennen. Der übrige Rand ist großteils glatt, weist aber einige Ausbuchtungen, in denen Osteoklasten zu finden sind, auf. In der Mitte des Spaltes befindet sich eine Nekrosezone, die zahlreiche mehrkernige Riesenzellen, Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen beinhaltet. Mit Ausnahme von diesem Bereich ist die Spaltmitte mit Bindegewebe gefüllt.

Zusammenfassung der Untersuchungen zum Einfluss der Kompression:

Die unter Kompression stehenden Spalten sind schmaler, als die nicht unter Kompression stehenden. Besonders deutlich ist dies bei Hund 5 und 6, jeweils auf der linken Seite zu sehen, wo sich der komprimierte Spalt fast fadenförmig darstellt. Eine Ausnahme davon bilden Hund 4 auf der rechten Seite und Hund 7 auf der linken Seite. Bei Hund 7 ist der nicht komprimierte Spalt geringfügig, bei Hund 4 hingegen deutlich schmaler, als der sich unter Kompression befindende Spalt.

Auffallend ist, dass alle unter Kompression stehenden Spalten einen unregelmäßigen oder einen mit mehreren Ausbuchtungen versehenen Rand aufweisen, in denen Osteoklasten zu finden sind. Die nicht unter Kompression stehenden Spalten haben dagegen fast immer einen glatten Rand.

Die Spaltmitte ist mit Ausnahme von Hund 4, bei dem bereits eine komplette Durchbauung des Spaltes mit Geflechtknochen zu erkennen ist, mit Bindegewebe gefüllt. An den Rändern zeigt sich eine sehr unterschiedliche Osteoblastenaktivität.

Ein deutlicher Unterschied besteht im Vorkommen von Geflechtknochen. Bei den nicht unter Kompression stehenden Spalten zeigt sich diese Gewebsstruktur nur an drei Präparaten (Hund 3, links; Hund 4, rechts, Hund 6, links). Im Gegensatz dazu findet sich in den komprimierten Spalten von acht Präparaten Geflechtknochen (Hund 2, beidseitig; Hund 3, beidseitig; Hund 4, rechts; Hund 5, links; Hund 6, beidseitig).

Eine komplette Durchbauung beider Spalten mit Geflechtknochen zeigt sich nur bei Hund 4.

3.4.3.3 Unbeschichtete Klammer

Hund 1, links:

Fluoreszenzmikroskopie:

Das Implantat sitzt zentral im Bohrloch und ist mit Ausnahme einer kurzen Strecke vollständig von einer Fluoreszenzbande umgeben.

Durchlichtmikroskopie:

Im histologischen Bild zeigt sich, dass es sich bei dem das Implantat umgebenden Gewebe um Bindegewebe handelt, in dem sich auch einzelne Fremdkörperzellen befinden. An einer Stelle ist neben dem Implantat ein Nekroseherd zu sehen, der aus einer Ansammlung von Granulozyten, Lymphozyten und vereinzelt Makrophagen besteht.

Es sind keine Anzeichen einer knöchernen Einheilung vorhanden.

Hund 2, links:

Fluoreszenzmikroskopie:

Die Klammer sitzt exzentrisch im Bohrloch, wobei ein Klammerschenkel der Kompression zugewandt, der andere der Kompression abgewandt ist.

Die Klammer wird auf den beiden der Kompression abgewandten Seiten von Fluoreszenz umgeben. Die Abgrenzung des Bohrloches gegenüber dem umliegenden Knochengewebe ist nur in der durch Calceingrün ausgelösten Fluoreszenz deutlich zu erkennen. Bei beiden Farbstoffen stellt sich innerhalb des Bohrlochs eine wolkeig erscheinende fluoreszierende Masse dar.

Durchlichtmikroskopie:

Die Klammer ist auf allen Seiten von Bindegewebe umgeben, dessen Fasern keine Ordnungsstruktur erkennen lassen. Das Bohrloch ist mit Bindegewebe zwischen dem sich einige Gefäße befinden, ausgefüllt. Es enthält außerdem eine großflächige Nekrosezone mit vielen Granulozyten, Lymphozyten, mehrkernigen Riesenzellen und wenigen Makrophagen.

Es ist keine Osseointegration vorhanden.

Hund 3, links:

Fluoreszenzmikroskopie:

Die Klammerenden liegen exzentrisch im Bohrloch, wobei ein Ende sich zur Kompression, das andere sich dieser entgegen richtet.

Ein Klammerschenkel ist einseitig von Fluoreszenz umgeben, der andere weist keine Fluoreszenz auf. Das Bohrloch ist durch einen fluoreszierenden Saum, der an mehreren Stellen unterbrochen ist, vom umliegenden Gewebe abgegrenzt.

Durchlichtmikroskopie:

Das Bohrloch ist vollständig mit Bindegewebe gefüllt. Im Randbereich und um die Klammer sind die Bindegewebsfasern parallel angeordnet, dazwischen ist die Struktur ungeordnet. Die Gefäße sind in einem Bohrloch derart verteilt, dass es auf der zur Kompression gerichteten Seite zu einer Gefäßanhäufung kommt. Im zweiten Bohrloch herrscht eine genau entgegengesetzte Gefäßverteilung. Ein Schenkel der Klammer steht komplett mit Bindegewebe in Kontakt, der andere nur zur Hälfte. Dessen zweite Hälfte weist zwischen Implantat und Bindegewebe einen dünnen Spalt auf. Der Bohrlochrand zeigt an einigen Stellen kleine Ausbuchtungen, in denen sich Osteoklasten befinden.

Eine knöcherne Integration des Implantats liegt nicht vor.

Hund 5, links:

Fluoreszenzmikroskopie:

Ein Ende der Klammer liegt mittig, das andere exzentrisch, von der Kompression abgewandt, im Bohrloch. Das Bohrloch grenzt sich durch einen deutlichen Fluoreszenzstreifen vom umliegenden Knochengewebe ab. Um die Klammer ist jeweils an einer kurzen Seite und der der Kompression entgegengesetzten Seite Fluoreszenz zu beobachten. Innerhalb des Bohrlochs liegen einige ovale fluoreszierende Gebilde.

Durchlichtmikroskopie:

In der Peripherie des Bohrlochs und um die Klammer liegt parallelfaseriges Bindegewebe. Im übrigen Bereich weist es eine ungeordnete Struktur auf. Entlang des Bohrlochrandes kommen vereinzelt Osteoklasten vor. Direkter Kontakt zwischen Implantat und Bindegewebe besteht nur an einer kurzen Seite. An einer Längsseite ist eine Fremdkörperreaktion zu beobachten, dort befinden sich viele Granulozyten, mehrkernige Riesenzellen und Lymphozyten. Die Gefäße liegen mehrheitlich auf der der Kompression zugewandten Seite.

Eine Osseointegration des Implantats hat nicht stattgefunden.

Hund 6, rechts:

Fluoreszenzmikroskopie:

Einer der beiden Klammerschenkel besitzt eine zentrale Lage im Bohrkanal, der andere liegt exzentrisch zur Kompression gewandt. Das Bohrloch hebt sich durch einen Ring aus Fluoreszenz von der Umgebung ab. Eines der beiden Klammerenden zeigt an der der Kompression entgegen liegenden Längsseite einen breiten Fluoreszenzstreifen, das andere weist kaum Fluoreszenz auf. In einem der Bohrlöcher befindet sich eine fluoreszierende Masse, die sich über ein Viertel der Gesamtfläche erstreckt.

Durchlichtmikroskopie:

In der Peripherie des Bohrlochs und um die Klammer ist Bindegewebe von paralleler Faserstruktur zu finden. Im restlichen Bereich weist dieses eine ungeordnete Struktur auf. Zwischen dem Gewebe liegen wenige gleichmäßig verteilte Gefäße. Es sind zwei großflächige Nekrosezonen, die eine Vielzahl von mehrkernigen Riesenzellen, Granulozyten und Lymphozyten, sowie einige Makrophagen beinhalten, zu sehen.

Es liegen keine Anzeichen für eine knöcherne Integration vor.

Hund 7, links:

Fluoreszenzmikroskopie:

Beide Klammerschenkel liegen exzentrisch, zur Kompression gerichtet im Bohrloch. Am Rand des Bohrkanals zeigt sich eine deutliche fluoreszierende Bande. Um die Klammer ist keine Fluoreszenz vorhanden.

Durchlichtmikroskopie:

Ungefähr ein Drittel der Wand des Bohrloches weist kleine Ausbuchtungen auf, in denen sich Osteoklasten und Osteoblasten befinden. Daneben befindet sich ein Bereich, in dem der Rand aufgelöst und erster Geflechtknochen vorhanden ist. Dessen knochenbildende Inseln sind von *bone-lining Cells* umgeben. Zwischen den Knochenbälkchen sind einzelne Osteozyten. Am Rand des Bohrkanals und um die Klammer zeigt das Bindegewebe eine parallel angeordnete Faserstruktur, sonst weist es keine Ordnungsstruktur auf. Zwischen dem Gewebe befinden sich wenige Gefäße, die gehäuft auf der zur Kompression gerichteten Seite liegen. Zwei Drittel der Implantatoberfläche stehen in direktem Kontakt mit dem Bindegewebe. Neben einem der Klammerenden befindet sich ein schwarzes Gebilde. Über das gesamte Präparat ist ein schwarzes Pigment verteilt. Es liegt keine Osseointegration vor.



Abb.35: Hund 7, rechts, beschichtet
2,5fache Vergrößerung
Klammer liegt exzentrisch

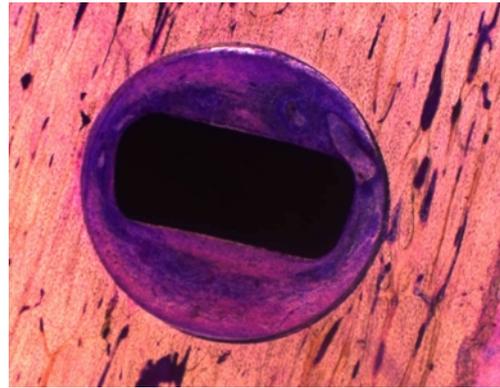


Abb.36: Hund 5, rechts, beschichtet
2,5fache Vergrößerung
Zentrale Lage der Klammer

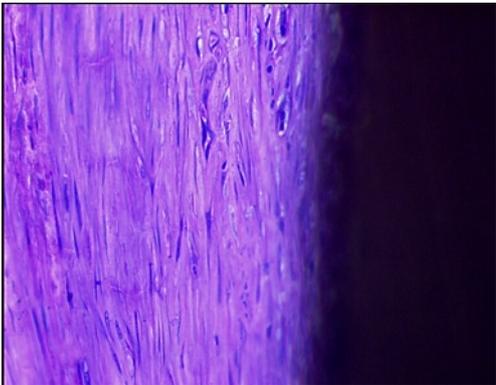


Abb.37: Hund 3, links, unbeschichtet
20fache Vergrößerung
Parallele Fasern um die Klammer

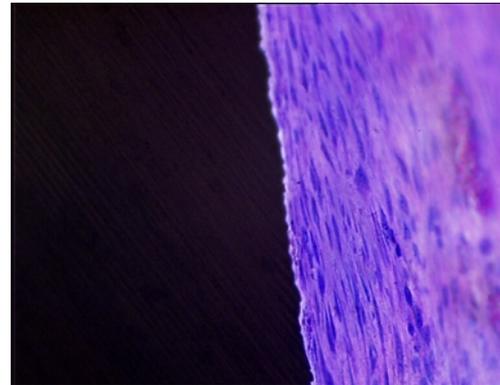


Abb.38: Hund 4, rechts, beschichtet
20fache Vergrößerung
Parallele Fasern um die Klammer



Abb.39: Hund 4, rechts, beschichtet
10fache Vergrößerung
Geflechtknochen am Bohrlochrand
(→)

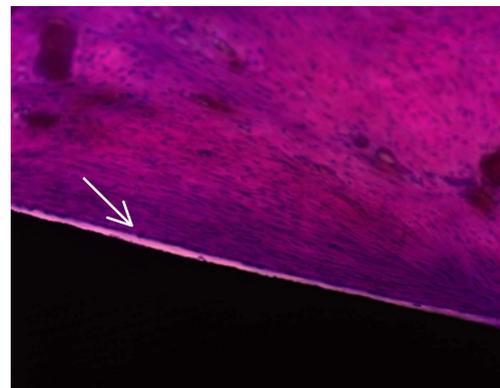


Abb.40: Hund 4, rechts, beschichtet
10fache Vergrößerung
Spalt zwischen Klammer und Gewebe
(→)

3.4.3.4 Beschichtete Klammer

Hund 2, rechts:

Fluoreszenzmikroskopie:

Die Klammer liegt zentral im Bohrloch. Um einen Klammerschenkel zeigt sich keine Fluoreszenz, um den anderen nur ein fluoreszierender Streifen, der sich auf der von der Kompression abgewendeten Seite befindet.

Das Bohrloch ist durch eine fluoreszierende Linie deutlich vom umliegenden Gewebe abgegrenzt.

Durchlichtmikroskopie:

Der Bohrlochrand weist einige unregelmäßig geformte Stellen mit ausgebuchteten Nischen, auf. In diesen befinden sich einzelne Osteoklasten. Das gesamte Bohrloch ist mit Bindegewebe gefüllt. Dieses weist sowohl um die Hälfte der Klammeroberfläche, als auch an etlichen Stellen des Bohrlochrandes einen parallelen Faserverlauf auf. Im übrigen Bereich zeigt es eine ungeordnete Struktur. Mit Ausnahme eines kurzen Abschnitts an der Längsseite der Klammer liegt das Bindegewebe der Klammer direkt an. Im Bohrkanal befinden sich nur wenige Gefäße, die über die gesamte Fläche regelmäßig verteilt sind.

Hund 3, rechts:

Fluoreszenzmikroskopie:

Die Klammerschenkel sitzen exzentrisch, von der Kompression abgewandt im Bohrloch. Um die Klammer befindet sich an der langen von der Kompression angewendeten Seite und einer kurzen Seite Fluoreszenz. Um das Bohrloch zieht sich ein deutlicher fluoreszierender Streifen.

Durchlichtmikroskopie:

Die Abgrenzung des Bohrlochs zum umliegenden Gewebe weist an einigen Stellen Ausbuchtungen auf, in denen Osteoklasten zu finden sind. An der Wand des Bohrloches, sowie direkt der Klammer anliegend ist parallelfaseriges Bindegewebe zu erkennen. Die restliche Fläche ist von ungeordnetem Bindegewebe ausgefüllt. Mit Ausnahme eines kleinen Abschnitts an einer der kurzen Seiten besteht ein direkter Kontakt zwischen Implantat und Bindegewebe. Über dieser Stelle ist eine Nekrosezone, die aus einer Ansammlung aus Lymphozyten, mehrkernigen Riesenzellen und Granulozyten besteht. An einem

Klammerende ist der Großteil der Gefäße zur Kompression gerichtet, an dem anderen ist die Mehrheit der Gefäße dieser abgewandt.

Es ist keine knöcherne Einheilung vorhanden.

Hund 4, rechts:

Fluoreszenzmikroskopie:

Die Klammerenden sitzen mittig in den Bohrlöchern. Diese sind nur durch bruchstückhafte fluoreszierende Linien von dem umgebenden Knochen abgegrenzt. Um die Klammer ist keine Fluoreszenz erkennbar.

Durchlichtmikroskopie:

Der Rand des Bohrlochs weist eine unregelmäßige Struktur aus etlichen, kleinen, nach außen bewölbten Nischen auf, in denen einzelne Osteoklasten liegen. Der komplette Bohrkanal ist von einem Osteoblastensaum umgeben. An zwei Stellen, die zusammen etwa ein Viertel der Randzone ausmachen, ist eine Formation zu Geflechtkochen erkennbar. Zwischen dessen Knochenbälkchen, die von *bone-lining Cells* gesäumt sind, befinden sich einzelne Osteozyten. Der Klammer liegt nur über die halbe Strecke einer langen Seite direkt Bindegewebe an, im restlichen Bereich wird sie durch einen Spalt von diesem getrennt. In diesem Bohrloch sind viele Gefäße vorhanden, deren Mehrheit zur Kompression gerichtet liegt.

Es sind keine Anzeichen für eine knöcherne Integration des Implantats vorhanden.

Hund 5, rechts:

Fluoreszenzmikroskopie:

Die Klammerschenkel sind zentral im Bohrloch gelegen. Eine feine fluoreszierende Linie grenzt das Bohrloch ab. Ein Klammerende ist von zwei Seiten von Fluoreszenz umgeben, das andere weist keine Fluoreszenz auf. Im Bohrloch befindet sich ein ovales ebenfalls fluoreszierendes Gebilde.

Durchlichtmikroskopie:

Um die Klammer und an der Wand des Bohrlochs weist das Bindegewebe eine parallele Faserausrichtung auf, im übrigen Bereich ist es ungeordnet. Ein direkter Kontakt zwischen dem Bindegewebe und der Klammer besteht nur an deren kurzen Seiten. Dort sind auch einzelne Fremdkörperzellen zu erkennen. Das Gewebe ist von wenigen gleichmäßig verteilten Gefäßen

durchzogen. In dem Bohrloch sind drei Nekroseherde erkennbar, die aus Ansammlungen von Granulozyten, Lymphozyten, mehrkernigen Riesenzellen und Makrophagen bestehen.

Das Implantat ist nicht osseointegriert.

Hund 6, links:

Fluoreszenzmikroskopie:

Die Klammerenden liegen exzentrisch im Bohrloch wobei die Ausrichtung hinsichtlich der Lage zur oder gegen die Kompression gleichmäßig verteilt ist. Ein Ring aus Fluoreszenz, der an mehreren Stellen unterbrochen ist, grenzt das Bohrloch vom umliegenden Gewebe ab. Um die Klammer ist nur an einer kurzen und ca. einem Drittel einer langen Seite Fluoreszenz zu sehen. In einem der Bohrlöcher befindet sich ein größeres amorphes Gebilde, das eine deutliche Fluoreszenz aufweist.

Durchlichtmikroskopie:

Parallelfaseriges Bindegewebe befindet sich zum einen an den kurzen Seiten der Klammer, zum anderen kleidet es die Hälfte der Bohrlochwand aus. An den übrigen Stellen besitzt es eine ungeordnete Struktur. Zwischen Bindegewebe und Implantat ist ein Spalt gelegen. Eine Ausnahme davon bilden die beiden kurzen Seiten der Klammer, an denen es zum direkten Kontakt kommt. Im Bohrloch ist eine aus einer Anhäufung aus Granulozyten, Lymphozyten, mehrkernigen Riesenzellen und Makrophagen bestehende Nekrosezone zu erkennen.

Eine knöcherne Einheilung des Implantats liegt nicht vor.

Hund 7, rechts:

Fluoreszenzmikroskopie:

Beide Klammerenden weisen eine exzentrische Lage im Bohrloch auf, dabei ist ein Ende der Kompression zugewandt, das andere dieser entgegengerichtet. Der Bohrkanal besitzt einen deutlich fluoreszierenden Rand. Um die Klammer ist nur an jeweils einer Seite Fluoreszenz erkennbar.

Durchlichtmikroskopie:

Die Bohrlochwand hat an mehreren Stellen Ausbuchtungen, in denen sowohl Osteoklasten, wie auch Osteoblasten liegen. Der Bohrkanal ist komplett mit Bindegewebe gefüllt, das um die Klammer, sowie in der Peripherie eine parallele Anordnung der Fasern aufweist. An einer Längsseite der Klammer sind Fremdkörperzellen zu erkennen. Auffallend an diesem Präparat

ist die Gefäßverteilung. Es befinden sich deutlich mehr Gefäße auf der der Kompression zugewandten Seite. Allerdings sind die wenigen Gefäße, die auf der von der Kompression abgewendeten Seite zu finden sind, erheblich größer. Um diese Gefäße sind vereinzelt mehrkernige Riesenzellen, Granulozyten und Lymphozyten zu finden. Über das gesamte Bohrloch ist in der Gewebeebe ein schwarzes Pigment verteilt, das sich teilweise in den Zellen befindet.

Es sind keine Anzeichen für eine Osseointegration vorhanden.

Zusammenfassung:

Alle Bohrlöcher sind mit Bindegewebe gefüllt. Dieses zeigt sowohl an den Rändern der Bohrkanäle, als auch direkt um die Klammerschenkel eine parallel angeordnete Faserrichtung. Außerhalb dieser Bereiche besitzt es eine ungeordnete Struktur. An den meisten Implantaten besteht ein direkter flächiger Kontakt zum Bindegewebe, dessen Größe sehr unterschiedlich ausgeprägt ist. Bei keinem der Klammerenden erstreckt sich dieser Kontakt über die gesamte Oberfläche.

Dem Knochengewebe zugehörige Zellen, wie Osteoklasten und Osteoblasten finden sich nur an einigen Bohrlochrändern (Hund 2, rechts; Hund 3, beidseitig, Hund 4, rechts; Hund 5, links; Hund 7, beidseitig). Bei Hund 4 auf der rechten und bei Hund 7 auf der linken Seite zeigt sich am Rand des Bohrkanals jeweils eine Zone in der Geflechtknochen vorhanden ist.

Eine knöcherne Integration des Implantats ist bei keinem Präparat auch nur in Ansätzen zu erkennen.

3.4.4.5 Vergleich Spaltheilung und Heilung um das Implantat

Vergleicht man die Heilungsvorgänge der Spalten mit denen, die um die Implantate stattfinden, lässt sich ein feststellen, dass die Heilung in den Spalten weiter fortgeschritten ist. Während in den Spalten teilweise bereits Zonen mit Geflechtknochen vorhanden sind, findet man um die Klammern überhaupt keine Knochenzellen. Besonders auffällig ist dies bei Hund 4, dessen Spalten komplett von Geflechtknochen durchbaut sind (siehe Abb.29 auf S.52), um das Implantat herum aber weder in der Fluoreszenz-, noch in der Durchlichtmikroskopie (siehe Abb. 38 und 40 auf S. 63) eine Gewebeanlagerung zu erkennen ist.

3.4.4 Quantitative Auswertung der Fluoreszenz- und der Durchlichtmikroskopie

3.4.4.1 Vergleich der Fluoreszenz der Spalte unter Kompression bzw. ohne Kompression

Die beiden folgenden Diagramme stellen die prozentualen Anteile der Fluoreszenz in den Spalten ohne bzw. mit Kompression dar. Da es sowohl bei Hund 1, als auch bei Hund 4 zu einem Implantatverlust gekommen ist, kann von diesen beiden Tieren nur ein Präparat in die Auswertung einbezogen werden. Ebenso fehlt von Hund 2 auf der rechten Seite der nicht unter Kompression stehende Spalt.

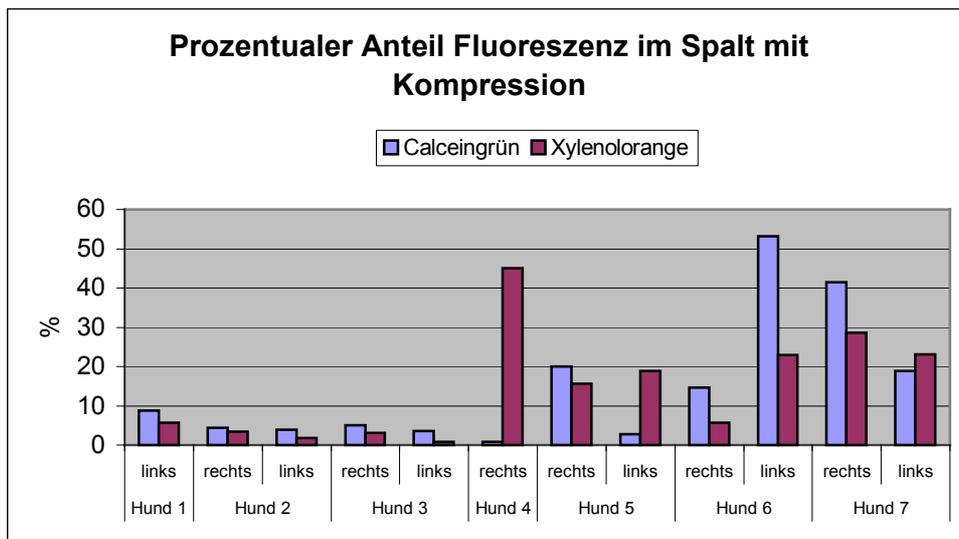
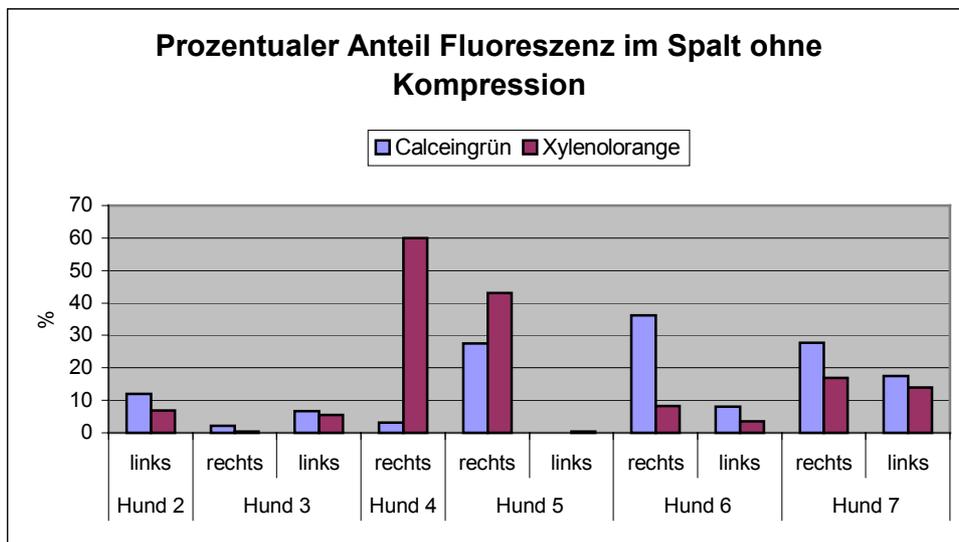


Abb. 41: Vergleich der Anteile an Fluoreszenz in den Spalten mit bzw. ohne Kompression

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Es fällt auf, dass bei den nicht komprimierten Spalten der grün fluoreszierende Bereich mit Ausnahme von Hund 4 und 5 jeweils auf der rechten Seite überwiegt. Eine Ähnliche Verteilung ist auch bei den komprimierten Spalten zu sehen. Hier überwiegt die orange Fluoreszenz nur bei Hund 4, rechts und bei den Hunden 5 und 7 auf den linken Seiten.

Hervorstechend sind die hohen Werte für Xylenolorange von Hund 4, die bei 45,02 % für den komprimierten und bei 59,96% für den nicht unter Kompression stehenden Spalt liegen, sowie die Werte für Calceingrün des Spaltes mit Kompression von Hund 6, links (53,24%) und Hund 7, rechts (41,50%).

Einen direkten Vergleich der Mittelwerte, Standardabweichungen, Minimal- und Maximalwerte von beiden Farbstoffen bei Vorhandensein von Kompression bzw. keiner Kompression zeigt die nächste Tabelle:

Tab.7: Mittelwerte, Standardabweichungen, Minimal- und Maximalwerte der Fluoreszenz in den Spalten

	Ohne Kompression Ca	Ohne Kompression Xy	Mit Kompression Ca	Mit Kompression Xy
Mittelwert	14,1	15,9	14,8	15,7
Standardabweichung	11,9	18,9	15,9	13,1
Minimalwert	0,1	0,3	0,8	0,9
Maximalwert	36,3	59,9	53,2	45,0

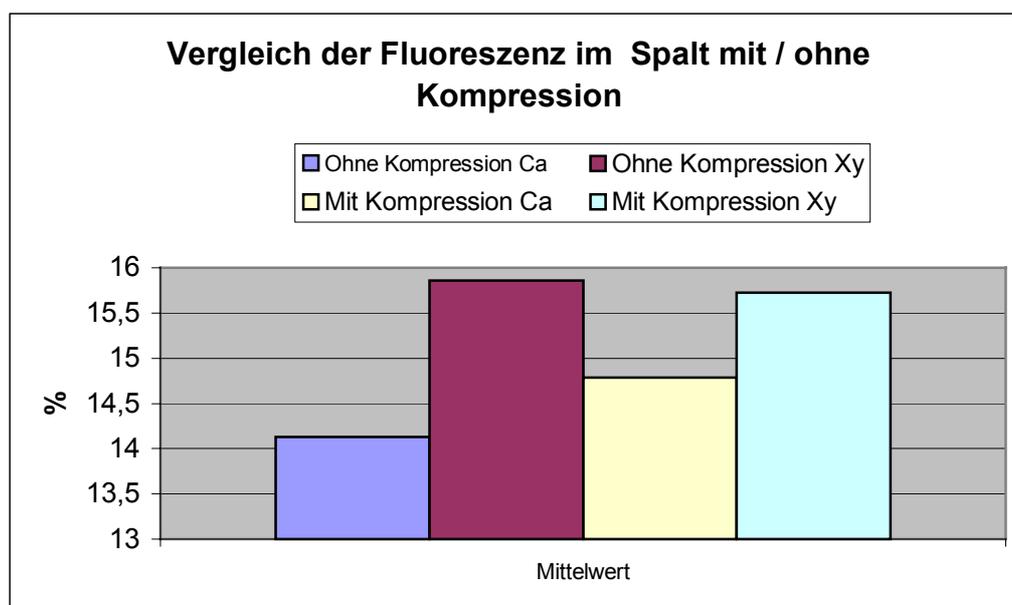


Abb. 42: Mittelwerte der Fluoreszenz in den Spalten, Ca = Calceingrün, Xy = Xylenolorange

Während die Mittelwerte alle in einen engen Bereich liegen, ist eine breite Streuung der Einzelwerte zu erkennen.

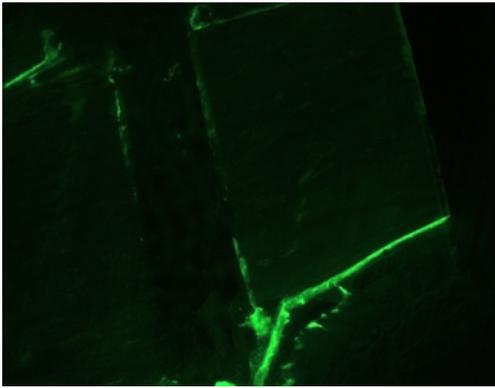


Abb.43: Hund 4, rechte Seite, Spalt ohne Kompression
2,5fache Vergrößerung, Calceingrün
Punktueller Fluoreszenz am Spaltrand

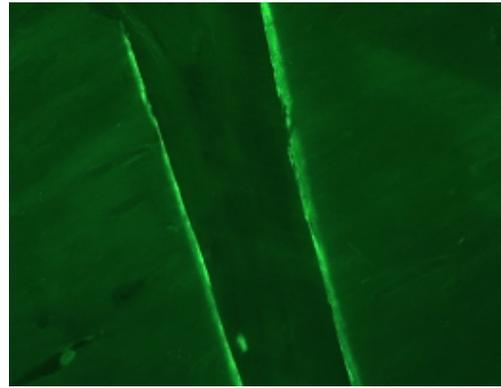


Abb.44: Hund 3, rechts, mit Kompression
2,5fache Vergrößerung, Calceingrün
Durchgehende Fluoreszenz am Spaltrand

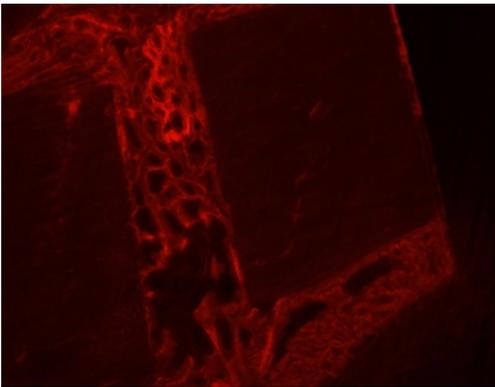


Abb.45: Hund 4, rechte Seite, Spalt ohne Kompression
2,5fache Vergrößerung, Xylenolorange
Der komplette Spalt ist mit Geflechtknochenstruktur gefüllt.

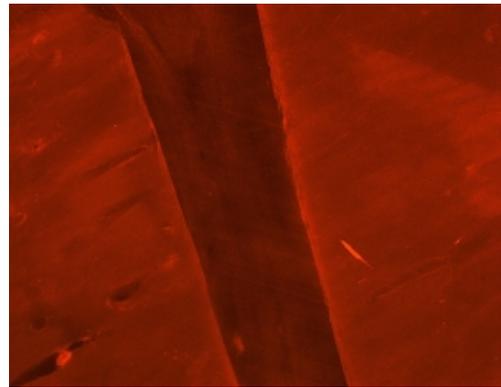


Abb.46: Hund 3, rechts, mit Kompression
2,5fache Vergrößerung, Xylenolorange
Kontinuierliche Fluoreszenz am Spaltrand

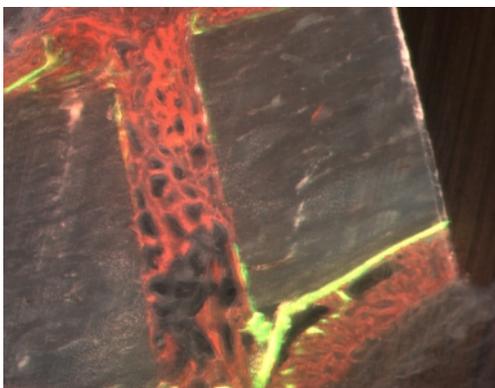


Abb.47: Hund 4, rechte Seite, Spalt ohne Kompression
2,5fache Vergrößerung, beide Farbstoffe

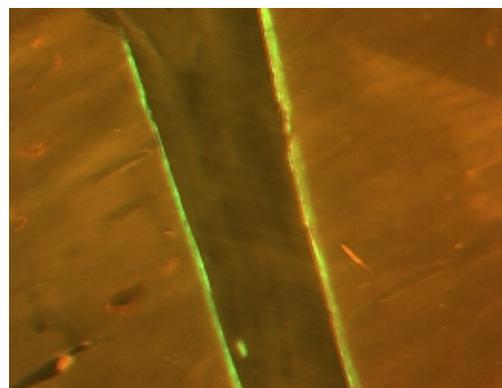


Abb.48: Hund 3, rechts, mit Kompression
2,5fache Vergrößerung, beide Farbstoffe

Das folgende Diagramm stellt den prozentualen Anteil des Restspaltes der komprimierten bzw. der nicht unter Kompression stehenden Spalte für beide Fluoreszenzfarbstoffe gegenüber.

Als Restspalt wird die Gesamtfläche des Spaltes abzüglich der fluoreszierenden Bereiche bezeichnet.

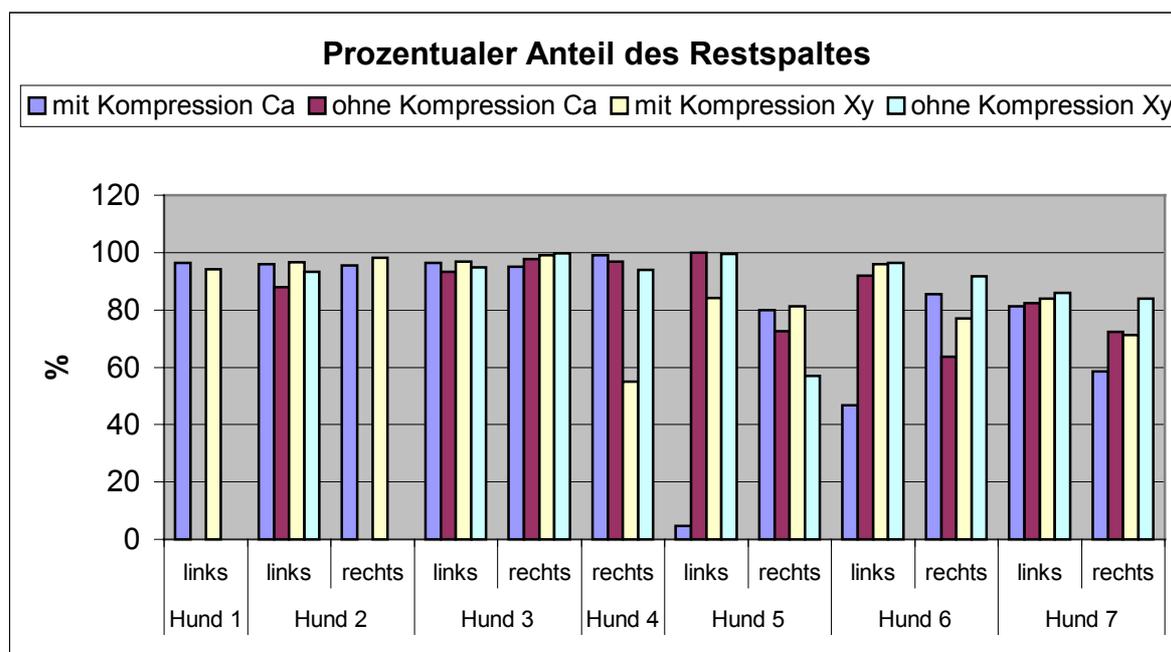


Abb. 49: Prozentualer Anteil der Restspalte

Ca = Calceingrün, Xy = Xylenolorange

Während alle Werte bei Hund 1, 2 und 3 in einem engen Bereich beieinander liegen, ist bei den Tieren 5, 6 und 7 ein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen Merkmalen zu erkennen. Bei diesen Hunden ist der Restspalt generell geringer als bei den ersten.

Hervorstechende Unterschiede bestehen in der orangen Fluoreszenz für den nicht komprimierten Spalt bei Hund 4. Hier liegt der Wert für den Restspalt mit Kompression bei 54,98% ohne Kompression hingegen bei 94,0%. Eine ebenso augenfällige Abweichung ist für die grüne Fluoreszenz der komprimierten Spalte von Hund 5 und Hund 6 jeweils links zu sehen. Während der Wert bei Hund 5 mit Kompression bei 4,68% liegt, ist er ohne Kompression bei 99,91%, entsprechend bei Hund 6 ein Restspalt von 46,74% unter Kompression, ohne diese 91,84%.

Es kann keine generelle Aussage darüber getroffen werden, ob der Restspalt mit oder ohne Kompression geringer ist, da hier deutliche Unterschiede bei den einzelnen Hunden vorhanden sind.

3.4.4.2 Vergleich zwischen beschichteter und unbeschichteter Klammer

Die nächsten beiden Graphiken geben eine Übersicht über den Anteil an Fluoreszenz, der in den Bohrlöchern um eine unbeschichtete bzw. eine beschichtete Klammer zu finden ist.

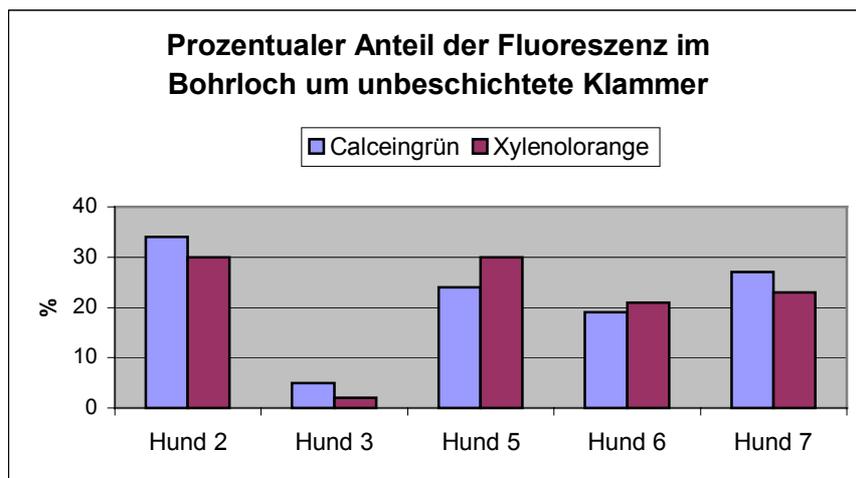
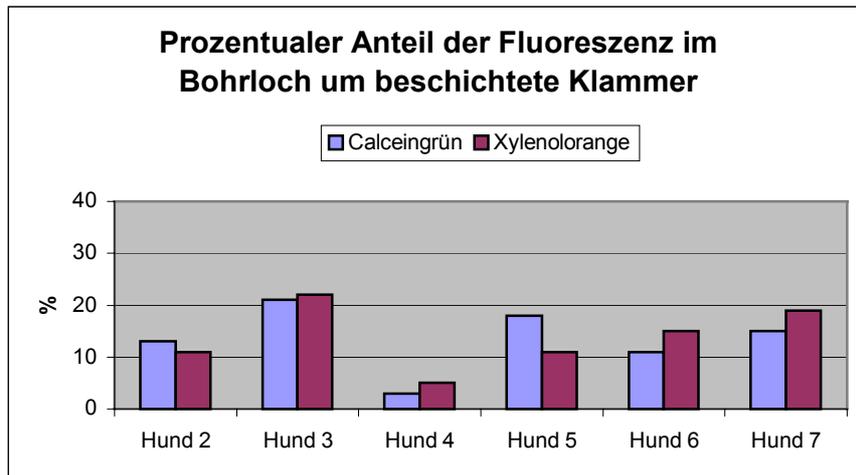


Abb. 50: Vergleich der Fluoreszenz im Bohrloch um die beschichteten / unbeschichteten Klammern

Hier ist mit Ausnahme von Hund 3 in allen Bohrlöchern um die unbeschichtete Klammer mehr Fluoreszenz vorhanden. Bei Hund 3 ist der deutlichste Unterschied zu sehen. Um die unbeschichtete Klammer fluoreszieren 5% grün, 2% orange, um die beschichtete dagegen beträgt die grüne Fluoreszenz 21% und die orange Fluoreszenz 22%, wobei hier die Fluoreszenz am Rand des Bohrlochs einen großen Anteil ausmacht.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die folgenden Diagramme stellen den Anteil der Klammeroberfläche, der von Fluoreszenz umgeben ist dar.

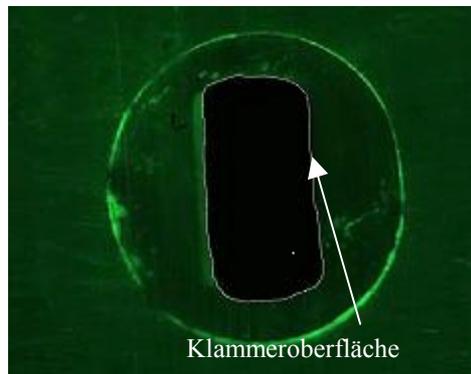


Abb.51: Skizze Klammeroberfläche

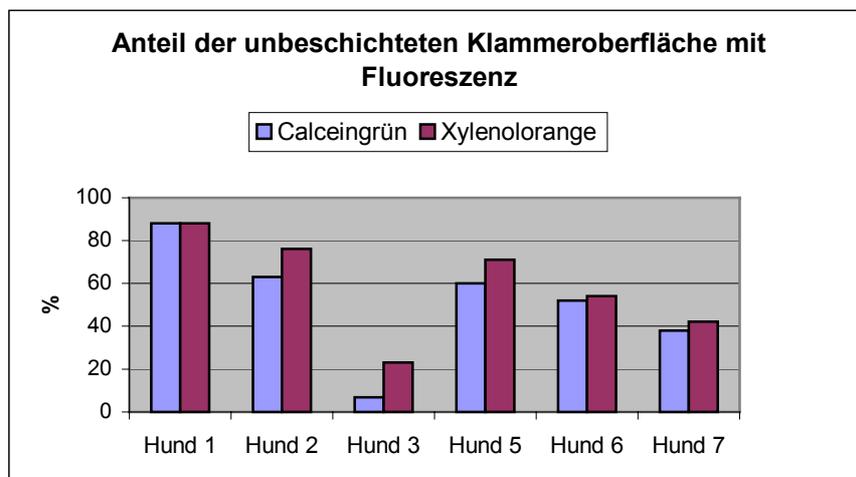
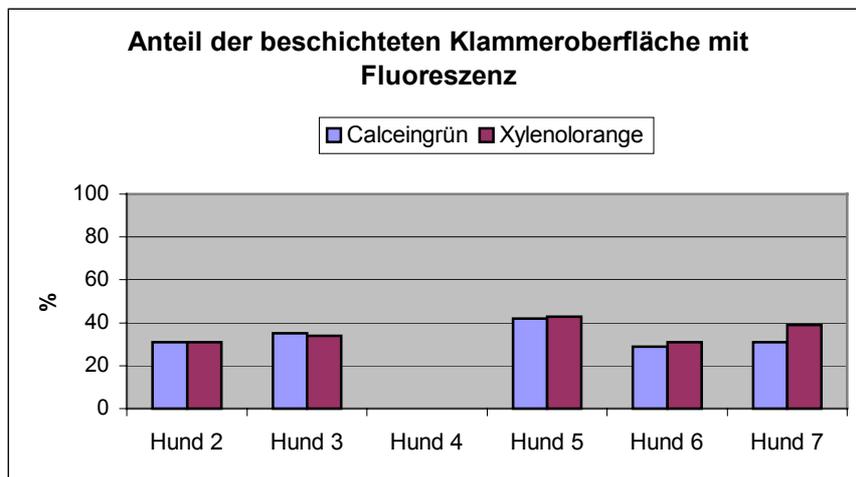


Abb. 52: Vergleich der Fluoreszenz an den Oberflächen der beschichteten / unbeschichteten Klammern

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Hier zeigt sich, dass um die unbeschichteten Klammern mehr Fluoreszenz zu sehen ist. Eine Ausnahme davon stellt wieder Hund 3 dar, bei dem ein deutlich größerer Anteil der beschichteten Klammerumgebung fluoresziert. Der deutlichste Unterschied ist bei Hund 2 festzustellen. Hier liegt die Fluoreszenz um die beschichtete Klammer für beide Farbstoffe bei 31% und die der unbeschichteten Klammer bei 63% für Calceingrün und bei 76% für Xylenolorange.

Bei Hund 4, von dem nur Präparate der beschichteten Klammer vorhanden sind, ist um die Klammer überhaupt keine Fluoreszenz zu sehen.

Auffällig ist, dass wiederum mit Ausnahme von Hund 3 der Anteil der durch Xylenolorange ausgelösten Fluoreszenz größer oder wie bei Hund 1 unbeschichtet und bei Hund 2 beschichtet gleich hoch ist.

In der nächsten Tabelle ist eine Gegenüberstellung der Mittelwerte, Standardabweichungen, Minimal- und Maximalwerte der beschichteten bzw. unbeschichteten Klammer für beide Fluoreszenzfarbstoffe zu sehen.

Tab.8: Mittelwerte, Standardabweichungen, Minimal- und Maximalwerte der Fluoreszenz um die Klammern

	Calceingrün beschichtet	Xylenolorange beschichtet	Calceingrün unbeschichtet	Xylenolorange unbeschichtet
Mittelwert	29	31	48	55
Standardabweichung	23	22	33	30
Minimalwert	0	0	0	0
Maximalwert	90	69	100	100

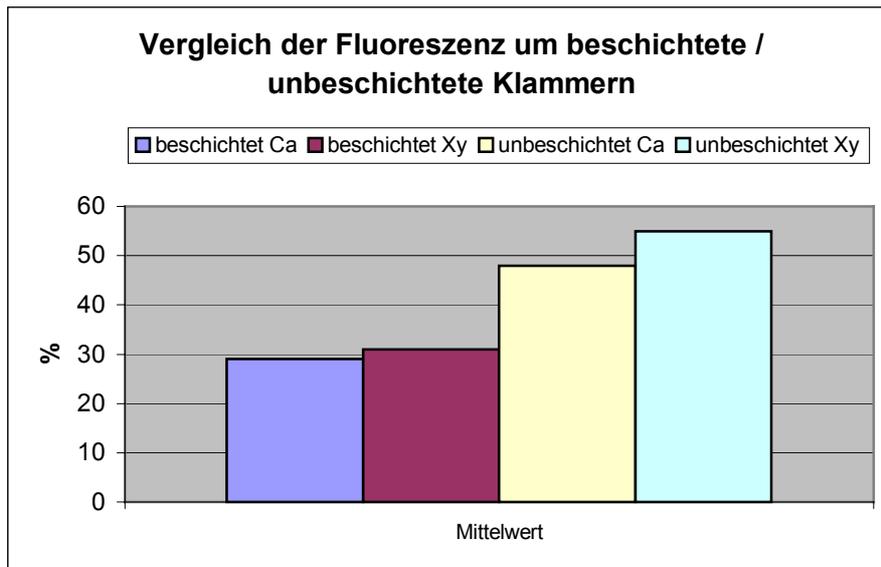


Abb. 53: Vergleich der Mittelwerte um die Klammern

Ca = Calceingrün, Xy = Xylenolorange

Auch hier ist der deutliche Unterschied zwischen beschichteter und unbeschichteter Klammer augenfällig, wobei die letztere erheblich höhere Werte aufweist.

Bemerkenswert ist die große Differenz zwischen den Minimal- und Maximalwerten, was auf eine breite Streuung der Werte hinweist.

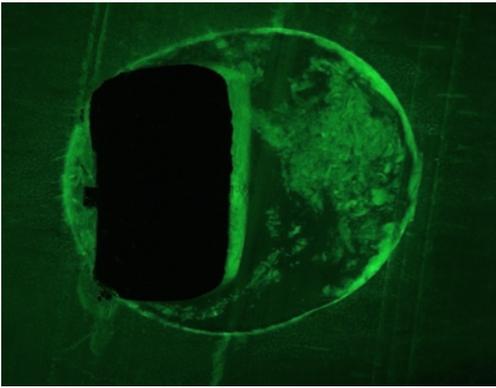


Abb.54: Hund 2, links, unbeschichtete Klammer
2,5fache Vergrößerung, Calceingrün
Fluoreszenz an der Bohrlochkante und
an beiden langen Seiten der Klammer

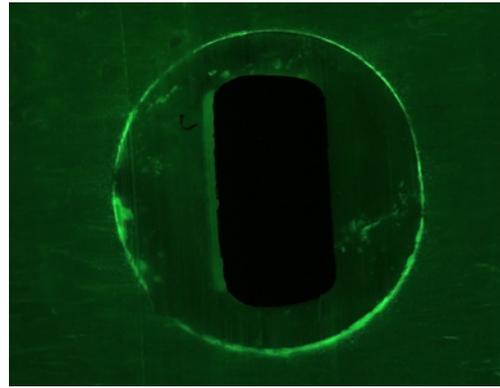


Abb.55: Hund 2, rechts, beschichtete Klammer
2,5fache Vergrößerung, Calceingrün
Fluoreszenz an der Bohrlochkante und
einseitig um die Klammer

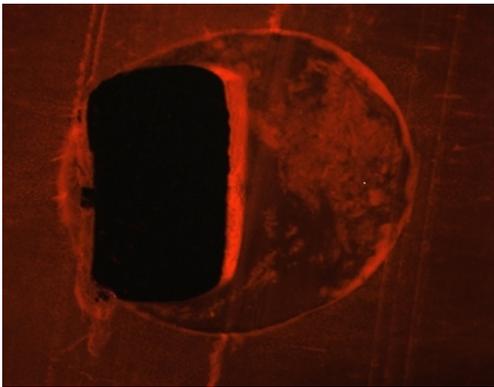


Abb.56: Hund 2, links, unbeschichtete Klammer
2,5fache Vergrößerung, Xylenorange
Fluoreszenz an der Bohrlochkante und
an beiden langen Seiten der Klammer

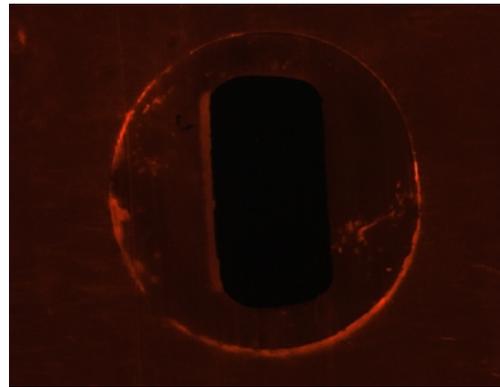


Abb.57: Hund 2, rechts, beschichtete Klammer
2,5fache Vergrößerung, Xylenorange
Fluoreszenz an der Bohrlochkante und
einseitig um die Klammer

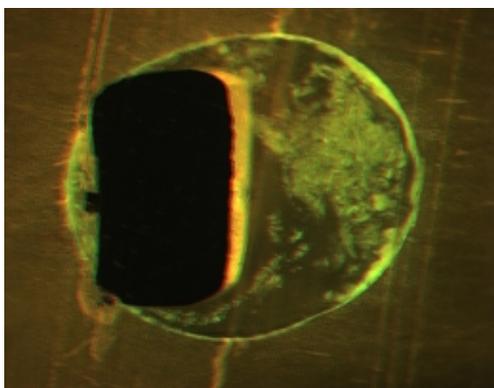


Abb.58: Hund 2, links, unbeschichtete Klammer
2,5fache Vergrößerung, beide Farbstoffe

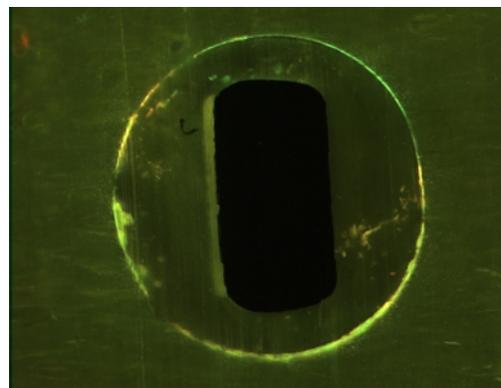


Abb.59: Hund 2, rechts, beschichtete Klammer
2,5fache Vergrößerung, beide
Farbstoffe

Die folgende Graphik gibt eine Übersicht darüber, auf wie vielen Seiten die Klammern von Fluoreszenz umgeben sind. Dabei wird nicht zwischen beschichtet und unbeschichtet unterschieden.

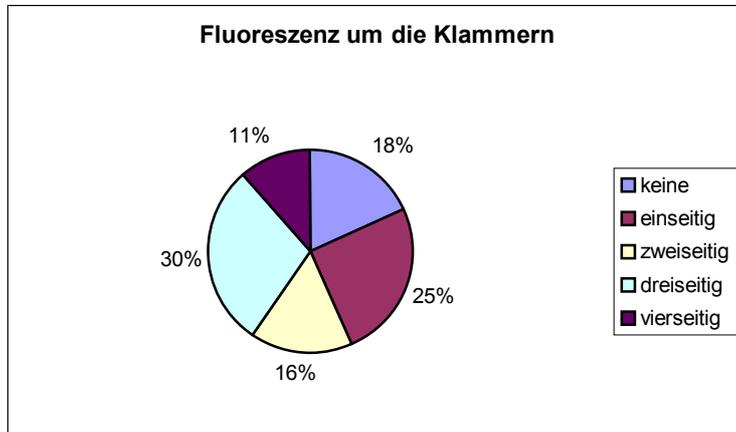


Abb. 60: Verteilung der Fluoreszenz um die Klammern

Dabei zeigt sich, dass die meisten Klammern nur auf drei Seiten von Fluoreszenz flankiert sind, gefolgt von Klammern, die einseitig von Fluoreszenz umgeben sind. Auffallend ist, dass um knapp ein Fünftel der Klammern überhaupt keine Fluoreszenz zu finden ist, während lediglich 11% komplett von Fluoreszenz eingerahmt werden.

Die nächsten Diagramme stellen dasselbe Merkmal getrennt nach beschichteten und unbeschichteten Klammern dar.

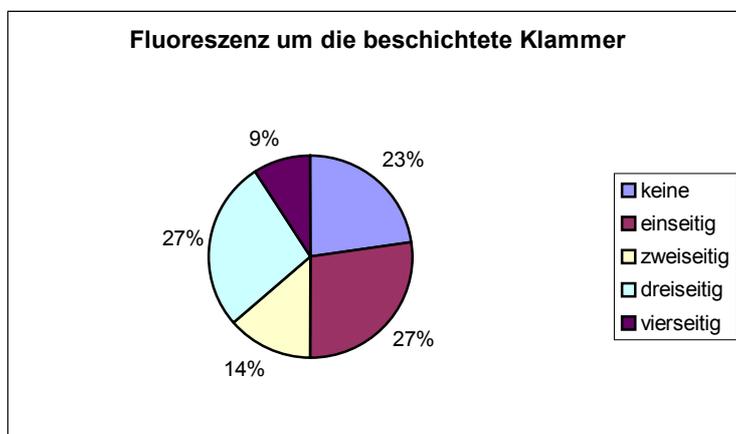


Abb. 61: Verteilung der Fluoreszenz um die beschichteten Klammern

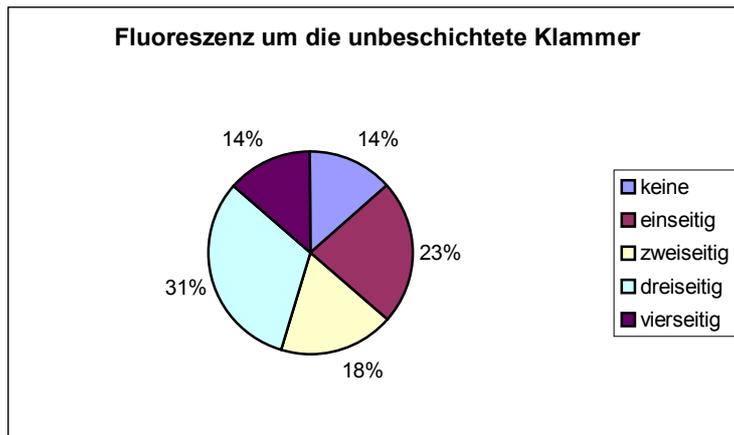


Abb. 62: Verteilung der Fluoreszenz um die unbeschichteten Klammern

Hier stellt sich heraus, dass der Anteil der Klammern ohne oder mit einseitiger Fluoreszenz bei den beschichteten Klammern höher ist, der Anteil mit zwei- und mehrseitiger Fluoreszenz hingegen bei den unbeschichteten Klammern höhere Werte aufweist.

Dabei stellt sich die Ausrichtung der Fluoreszenz zur Kompression folgendermaßen dar:

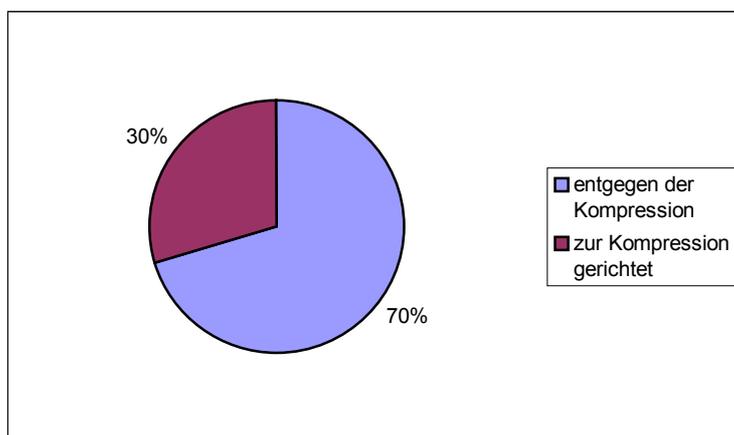


Abb. 63: Ausrichtung der Fluoreszenz gegenüber der Kompression

Bemerkenswert ist, dass 70% der Fluoreszenz auf den von der Kompression abgewandten Seiten zu finden sind, hingegen nur 30% der zur Kompression gerichteten Seiten fluoreszieren.

Über die Lokalisation der Klammer im Bohrloch gibt die nächste Graphik Auskunft:

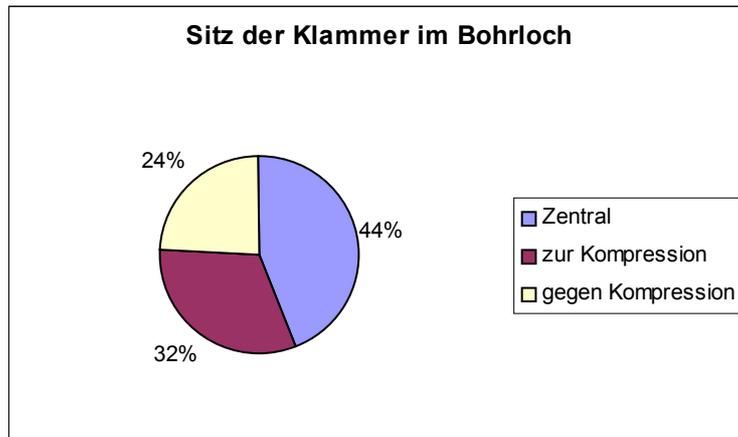


Abb. 64: Sitz der Klammer im Bohrloch

Im Zentrum des Bohrloches sitzen mit 44% knapp die Hälfte aller Klammern. Die restlichen Klammern liegen exzentrisch, wobei hier ein etwas größerer Anteil von 32% zur Kompression und der kleinere Teil mit 24% der Kompression entgegen gerichtet ist.

Im folgenden Diagramm sind die Häufigkeiten des Vorkommens von Geflechtknochen dargestellt, darauf bezogen, ob der Spalt unter Kompression steht oder nicht.

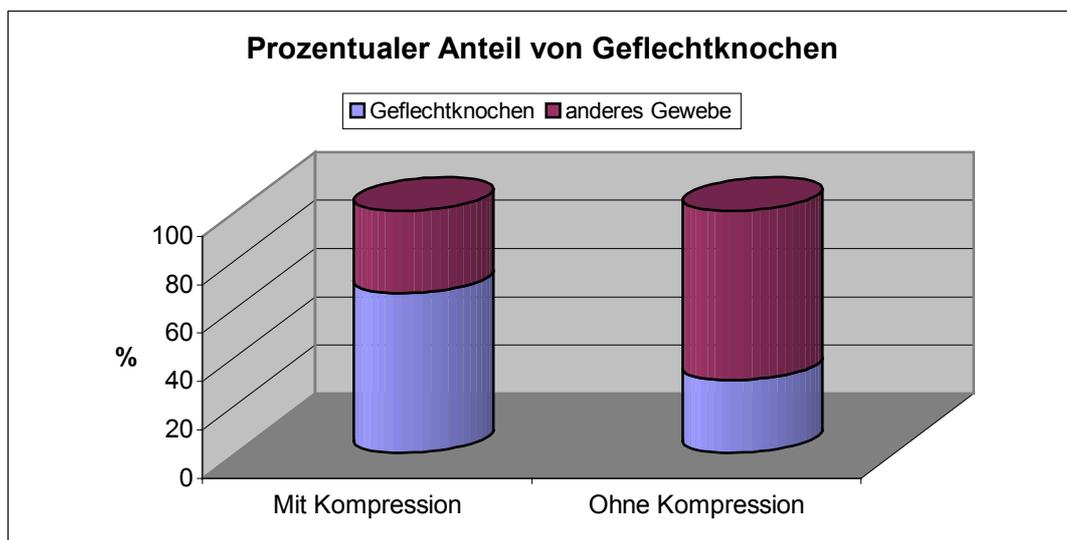


Abb. 65: Prozentualer Anteil von Geflechtknochen

Hier zeigt sich, dass in den komprimierten Spalten erheblich häufiger, nämlich zu 66%, Geflechtknochen vorhanden ist, als in denen ohne Kompression. Hier liegt der Anteil bei 30%.

3.4.5 Bestimmung des Titangehalts

Nach der Gefriertrocknung der Organproben ergeben sich folgende Werte:

Tab.9: Organproben nach der Gefriertrocknung

Probengewicht in g	Leber	Milz	Niere	Lunge
Hund 2	0,16	0,14	0,13	0,07
Hund 3	0,19	0,09	0,09	0,09
Hund 4	0,28	0,78	0,23	0,13
Hund 5	0,90	0,49	0,50	0,49
Hund 6	0,40	0,63	0,51	0,41
Hund 7	0,46	0,41	0,68	0,52

Diese Werte werden benutzt um sich auf das Trockengewicht beziehende Titan-Gehalte zu errechnen und sie den auf das Frischgewicht bezogenen Organtitangehalten, die sich aus der Atomabsorptionsspektrographie ergeben, gegenüber zu stellen.

Tab.10: Titangehalte der Leber

LEBER	µg/kg Feuchtgewicht	µg/kg Trockengewicht
Hund 2	59,8	0,024
Hund 3	36,2	0,015
Hund 4	136	0,101
Hund 5	55,4	0,104
Hund 6	85,4	0,074
Hund 7	51,1	0,052

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tab.11: Titangehalte der Milz

MILZ	$\mu\text{g/kg}$ Feuchtgewicht	$\mu\text{g/kg}$ Trockengewicht
Hund 2	160	0,041
Hund 3	49,8	0,009
Hund 4	152	0,273
Hund 5	107	0,115
Hund 6	136	0,202
Hund 7	65,3	0,064

Tab.12: Titangehalte der Niere

NIERE	$\mu\text{g/kg}$ Feuchtgewicht	$\mu\text{g/kg}$ Trockengewicht
Hund 2	38,4	0,010
Hund 3	31,4	0,006
Hund 4	69,1	0,042
Hund 5	51	0,050
Hund 6	75,1	0,085
Hund 7	45,9	0,064

Tab.13: Titangehalte der Lunge

LUNGE	$\mu\text{g/kg}$ Feuchtgewicht	$\mu\text{g/kg}$ Trockengewicht
Hund 2	33	0,008
Hund 3	42,4	0,007
Hund 4	48,7	0,018
Hund 5	38,6	0,042
Hund 6	25,2	0,021
Hund 7	32,8	0,036

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die beiden folgenden Graphiken stellen die Mittelwerte der in den inneren Organen gemessenen Titangehalte einmal bezogen auf das Feuchtgewicht, zum anderen bezogen auf das Trockengewicht dar.

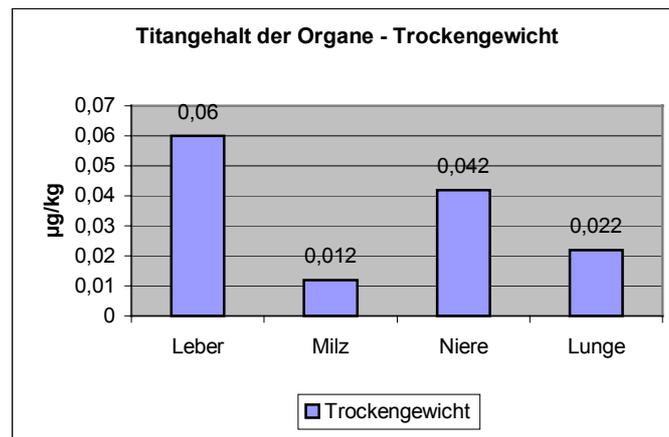
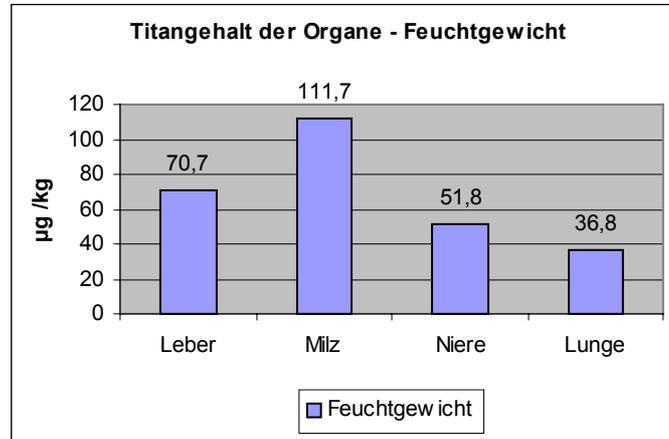


Abb. 66: Vergleich der Titangehalte in den Organen bezogen auf Feucht- bzw.- Trockengewicht

Es fällt auf, dass die Organproben der Milz, die im Feuchtzustand die höchsten Werte aufweisen, bezogen auf das Trockengewicht, den geringsten Titangehalt beinhalten. Die Gehalte von Leber und Niere liegen bei beiden Untersuchungen im oberen Bereich. Die Proben der Lunge beinhalten dagegen eine geringere Menge an Titanpartikeln.

4. DISKUSSION

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Tiermodell

Bei der Übertragung von tierexperimentell erzeugten Befunden auf den Menschen stellt sich die Frage, ob das experimentelle Resultat bei der jeweiligen Tierart den morphologischen Verhältnissen des Menschen entspricht und damit erst übertragbar wird. Die physiologische und anatomische Ähnlichkeit einer bestimmten Spezies bilden daher die Voraussetzung zur Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Untersuchungen am Tier auf den Menschen (HÖNIG und MERTEN, 1993).

Bei der Auswahl des geeigneten Versuchstieres für die osteologische Untersuchung müssen folgende Gesichtspunkte beachtet werden: Der Knochen muss in Größe, Form und Festigkeit dem des Menschen entsprechen, um ein analoges Vorgehen mit in der Humanmedizin üblichen Instrumenten und Implantaten zu ermöglichen. Dabei sollen die Knochenregeneration und die biomechanische Belastung mit der des Menschen vergleichbar sein. Weiterhin müssen die Möglichkeiten im Tierversuch die beim Menschen erhofften Langzeitergebnisse zu simulieren und eine Reproduzierbarkeit der Reaktion auf die Versuchsbedingungen gegeben sein. Nicht zuletzt soll die Wahl auf die Tierart fallen mit der die anstehende Fragestellung unter guten Laborbedingungen und kostengünstig beantwortet werden kann (WISSING et al., 1991).

Die Verwendung einer kleinen Tierspezies, wie dem Kaninchen oder den Ratten, war für die vorliegende Studie aus verschiedenen Gründen nicht möglich. Zum einen sind die Größenverhältnisse zu eingeschränkt, um mit den üblichen Instrumenten und Implantaten zu arbeiten, zum anderen besitzt das Kaninchen eine zu geringe Knochenfestigkeit und eine erheblich rascher ablaufende Knochenumbaurate als der Mensch. Nach WISSING et al. (1991) ist die Knochenheilung beim Kaninchen bereits nach 6 Wochen abgeschlossen.

In Bezug auf die Knochenfeinstruktur ist, abgesehen von den Primaten, der Hund das Tier, das den Verhältnissen des Menschen am ähnlichsten ist (POHL et al., 1995). Der Hund weist, wie der Mensch, vorwiegend eine Sekundärosteonenstruktur auf, im Gegensatz dazu zeigen Kaninchen, Schaf, Schwein und Huftiere vor allem die niedriger organisierte primäre Osteonenstruktur. Während der Anteil der Sekundärosteone beim Schwein bei 30% liegt (HÖNIG und MERTEN, 1993), besitzt der Hund zu über 90% eine Sekundärosteonenstruktur

(WISSING et al., 1991). Primärosteone treten bei dieser Spezies nur fetal und unmittelbar postnatal auf, im Laufe des Wachstums werden sie durch Sekundärosteone ersetzt.

Der Unterschied dieser beiden Osteonenstrukturen liegt im Gefäßverteilungsmuster. Bei den primären Osteonen besteht eine plexiforme Gefäßverteilung, die eine Regenerationsfähigkeit des Knochens von peripher erlaubt, da bei einer Blockade der zentralen Arterie eine Stromumkehr möglich ist. Bei dem funktionellen Endarteriensystem der Sekundärosteonenstruktur kann dagegen eine Revaskularisation nur zentrifugal von der Markhöhle aus erfolgen. Damit lässt sich auch erklären, warum die Knochenbruchheilung bei jüngeren Individuen offenbar schneller vor sich geht, als bei älteren. Letztere besitzen mehr Sekundärosteonenbezirke pro Knochenvolumen, als die jüngeren, bei denen als Reste des appositionellen Dickenwachstums des Röhrenknochens periostal noch mehr oder weniger ausgedehnte plexiforme Areale mit größerer Kompensationsfähigkeit bestehen (EITEL, et al., 1981a).

EITEL und Mitarbeiter (1981b) folgern aus der Vergleichbarkeit unter physiologischen Bedingungen, dass die Übertragung der Untersuchungsbefunde auch unter pathophysiologischen Bedingungen nicht fehlerhaft ist.

Aus der Isomorphie der Knochenstruktur des Hundes im Vergleich zum Menschen schließen sie darauf, dass im Hinblick auf den knöchernen Regenerationsprozess beim Hund gewonnene Ergebnisse eher auf die Humansituation übertragen werden können als Ergebnisse von anderen Spezies.

4.1.2 Implantatdesign und operatives Modell

Sowohl das zum Einsatz gekommene Implantatmaterial, wie auch das Implantatdesign sind in der Medizin zugelassen und kommen dort auch zur Anwendung. Als Modell zur Überprüfung der Osseointegration erscheinen die Abmessungen des Prüfkörpers in Zusammenhang mit der Präparationstechnik des Implantatlagers als ungünstig. Der Grund hierfür sind die Maße des Querschnitts der Klammerenden von 1,6 x 0,7 mm im Verhältnis zur Größe des runden Bohrlochs, da der Abstand der langen Seiten der Klammerschenkel zum Bohrlochrand erheblich größer ist als derjenige der kurzen Seiten und somit auch eine unterschiedliche Gewebeanlagerung zustande kommt. Da zwischen Implantat und Knochen kein direkter Kontakt besteht, kommt es zu einer sekundären Knochenheilung und einer Einheilung des Implantats nach dem Muster der Distanzosteogenese.

Den passenden Abstand für die Bohrlöcher der Klammerenden zu finden, gestaltete sich anfangs schwierig, da es beim Abkühlen und anschließendem Aufbiegen der Klammer zu

einer Ausdehnung des Materials kommt. Daher wurde ab Hund 2 eine aufgebogene Klammer zur Abstandsmessung verwendet.

4.1.3 Auswahl der Fluoreszenzfarbstoffe

Bestimmte Vitalfarbstoffe gehen während der Mineralisation der organischen Matrix eine Chelatbindung ein und werden somit in die Mineralisationsfront eingelagert. Diese wandert bei fortwährender Knochenbildung in die Tiefe. Bei der Verteilung der Fluorochrome im Knochen fanden MILCH et al. (1958) weder alters- noch geschlechtsspezifische Unterschiede.

Während einzelne Marken Auskunft über die Knochenanlagerung zu einem bestimmten Zeitpunkt geben, gestattet die sequenzielle Gabe von Fluorochromen die Anbaurichtung und die topographische Lokalisation des Knochenbaus zu verfolgen. Ebenso können auf diese Weise Remodeling-Prozesse dargestellt werden. Diese Farbstoffe behalten ihre Eigenschaft der Fotolumineszenz, daher können diese Regionen unter UV-Anregung durch Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden (RAHN et al., 1970; KNÖFLER et al., 1990).

An eine Substanz zur Fluoreszenzmarkierung werden daher verschiedene Anforderungen gestellt. Zum einen muss die Fluoreszenz klar begrenzt sein und sich deutlich von anderen Substanzen unterscheiden, zum anderen soll der Einfluss der Markiersubstanz auf die Knochenheilung möglichst gering sein und die Substanz soll allgemein eine gute Verträglichkeit aufweisen. Außerdem soll es weder durch die Chemikalien während der Verarbeitung noch durch das ultraviolette Licht bei der Fluoreszenzanregung zu einer Beeinträchtigung der Fluoreszenz kommen (RAHN, 1976). Für die vorliegende Studie wurden daher die Farbstoffe ausgewählt, welche die meisten der oben genannten Kriterien erfüllen: Nach den Forschungen von RAHN und PERREN (1971b) zeigen Calceingrün, Xylenolorange, Alizarinkomplexon und Tetracycline deutliche und gut voneinander abgrenzbare Banden und weisen alle eine gute Verträglichkeit auf. In einigen Untersuchungen (HARRIS, 1960; RAHN et al., 1970) wurde allerdings festgestellt, dass Tetracycline einen negativen Einfluss auf das Knochenwachstum und die Mineralisation haben. Daher kamen sie für die vorliegende Untersuchung nicht zum Einsatz.

Während in der vorliegenden Studie sowohl für Calceingrün, als auch für Xylenolorange deutliche Fluoreszenzbanden zu sehen sind, kann keine Bande für Alizarinkomplexon nachgewiesen werden. Ein möglicher Grund hierfür ist die Einbettung der Präparate in

Methylmetacrylat, durch das es zu einer deutlichen Abschwächung und zu einer Veränderung der Farbe kommen kann (RAHN und PERREN, 1971a; RAHN und PERREN, 1976).

Ein anderer Grund weswegen bestimmte Farbbanden nicht mehr sichtbar sind, liegt an Remodeling-Prozessen, während denen die eingelagerten Farbstoffe abgebaut werden. KNÖFLER und Mitarbeiter (1990) konnten derartige Umbauprozesse bei Meerschweinchen nach 30 Tagen feststellen. Da in den eigenen Untersuchungen der Beobachtungszeitraum kürzer war und Alizarinkomplexon der letzte der verabreichten Farbstoffe war, erscheint es unwahrscheinlich, dass er aufgrund eines Umbauprozesses nicht zu sehen ist.

4.1.4 Versuchsaufbau

Ziel der Studie ist es, zu überprüfen, inwiefern sich die verbesserte Einheilung PIII-beschichteter Nickel-Titan-Implantate vom Tiermodell der Ratte (KRAUSE, 2001) auf ein dem Menschen bezüglich der Knochenstruktur ähnlicheres Tiermodell, den Hund, übertragen lassen. Gleichzeitig sollen die Heilungsvorgänge mit bzw. ohne Kompression verglichen werden. Für den ersten Teil der Untersuchungen ist es notwendig, in einem standardisierten Verfahren die Gewebsreaktionen auf behandelte und unbehandelte Implantate zu vergleichen, für den zweiten Teil ist die Gegenüberstellung von komprimierten bzw. nicht komprimierten Spalten nötig. Da für die Auswertung die Kontaktzone von Implantat und Knochen von Interesse ist, wurde das Verfahren der Kunststoffeinfettung gewählt, welches das Verbleiben der Implantate im Knochen und somit die Herstellung artefaktarmer Präparate ermöglicht. Um in jedem Präparat einen Überblick über beide Bohrlöcher, den komprimierten und den nicht unter Kompression stehenden Spalt zu erhalten, wurde eine Schnittebene parallel zur Längsachse der Klammer gewählt.

Die histologische Auswertung des Implantat–Interface-Bereichs sollte sich ähnlich wie in der vorausgegangenen Arbeit von KRAUSE (2001) gestalten. Da aber in der Auswertung kein knöcherner Kontakt zwischen Implantat und Knochen festgestellt wurde, konnten einige Punkte des Auswertungsschemas nicht übernommen werden.

Die nun erfolgte histologische Auswertung erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Sie bezieht sich für beide Teile der Untersuchung vor allem auf qualitative Gesichtspunkte, die einander gegenübergestellt werden können.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Fluoreszenz – und Durchlichtmikroskopie der komprimierten / nicht komprimierten Spalte

Der Vergleich der fluoreszierenden Anteile der Spalten, die unter Kompression stehen mit den nicht komprimierten ergibt kein einheitliches Bild, da je nach Individuum und Seite teils der komprimierte, teils der Spalt ohne Kompression geringfügig mehr Fluoreszenz aufweisen. Auch die Gegenüberstellung der Mittelwerte zeigt für beide Fluoreszenzfarbstoffe nur geringfügige Abweichungen. Anhand des Vergleichs der Minimal- mit den Maximalwerten ist eine breite Streuung der Ergebnisse zu erkennen.

In der histologischen Auswertung zeigte sich, dass es sich bei den im Innenbereich der Spalte fluoreszierenden Bereiche häufig um Nekrosezonen handelt.

An den fluoreszierenden Spalträndern hingegen sind im histologischen Bild knochenauf- oder abbauende Zellen zu erkennen. Die Spaltmitten sind mit faserreichem Bindegewebe gefüllt. Diese Befunde decken sich mit den in der Literatur vorhandenen Studien an Hunden. So fanden BORCKMANN und Mitarbeiter (1982) zwei Wochen postoperativ eine Defektausfüllung mit einem lockeren, faserreichen Granulationsgewebe, eine beginnende Knochenneubildung an den Rändern und Zeichen einer osteoklastären Reaktion. Nach vier Wochen stellten sie eine deutlich fortgeschrittene Knochenheilung, aber noch keine komplette Durchbauung des Defekts fest. In den eigenen Untersuchungen konnten an mehreren Präparaten Stellen mit erstem Geflechtknochen festgestellt werden. Hier ist der Anteil bei den unter Kompression stehenden Spalten deutlich höher. Ob dies damit zusammenhängt, dass die komprimierten Spalten enger sind und damit schneller eine Durchbauung als bei den nicht unter Kompression stehenden Spalten stattfindet oder ob ein direkter positiver Einfluss der Kompression auf das Heilungsverhalten vorhanden ist, kann nicht geklärt werden. Es gibt allerdings einige Studien, die eine vermehrte Knochenneubildung unter Kompression nachweisen (ECKE, 1976; BORCKMANN et al., 1982; SOBALLE et al., 1990). Dies lässt sich auf die primäre Stabilisierung des Koagulums aufgrund des Drucks und damit der Verhinderung von Spaltbildungen durch die Retraktion zurückführen, wodurch eine störungsfreie Organisation des Koagulums ermöglicht wird (BORCKMANN et al., 1982).

Das bei den komprimierten Spalten im Gegensatz zu denen ohne Kompression deutlich häufigere Vorkommen von osteoklastären Ausbuchtungen an den Spalträndern, deutet auf eine Knochenresorption in diesen Bereichen hin.

Bemerkenswert ist die komplette Durchbauung der Spalten mit Geflechtknochen bei Hund 4.

Als Grund hierfür kann das Alter des Tieres in Betracht gezogen werden. Er war mit eineinhalb Jahren der jüngste in der Studie. Knochenheilungsvorgänge laufen bei jüngeren Individuen schneller ab als bei älteren (EITEL et al., 1981b).

4.2.2 Fluoreszenz – und Durchlichtmikroskopie der beschichteten / unbeschichteten

Klammer

In den Bohrlöchern ist die Fluoreszenz generell an den Kanten der Bohrkanäle und in unterschiedlichem Maße um die Klammern zu finden. In einigen Präparaten sind zusätzlich zwischen diesen Bereichen liegende fluoreszierende Abschnitte vorhanden. Es zeigt sich, dass dieser Gesamtanteil an Fluoreszenz in den Bohrlöchern, in denen sich nicht beschichtete Klammern befinden, deutlich höher ist. Ein ähnliches Bild ergibt sich bei der Fluoreszenz, die direkt an der Oberfläche der Klammerenden liegt. Hier weisen die unbeschichteten Klammern im Vergleich zu den beschichteten von einem Viertel bis über die Hälfte mehr fluoreszierende Oberfläche auf. Vergleicht man die Minimal- mit den Maximalwerten, stellt man eine breite Streuung der Einzelwerte fest.

In der histologischen Untersuchung waren sowohl an den Rändern der Bohrlöcher als auch um Teilabschnitte der Klammerschenkel parallel angeordnete Faserbündel zu finden. Ein ähnliches Bild einer großteils parallelen Faserordnung um Titanplasma beschichtete Implantate wurde auch in anderen Untersuchungen beschrieben (BUSER et al., 1992; LISTGARTEN et al., 1992). In einer früheren Studie fanden BUSER und Mitarbeiter (1989) um ebenfalls Titanplasma beschichtete Implantate eine senkrechte Anordnung der Fasern, hingegen um glatt polierte Oberflächen eine parallele Faserrichtung. Da dies auch an Untersuchungen in Zellkulturen festgestellt wurde (INOUE et al., 1987; GRÖSSNER-SCHREIBER und TUAN, 1991) folgerten die Autoren, dass in der neueren Untersuchung die Implantate eine zu geringe Rauigkeit aufweisen.

Knochenzellen konnten ausschließlich an den Rändern der Bohrlöcher festgestellt werden. Da die Präparate aber auch an den Stellen, an denen die parallel angeordneten Faserbündel zu erkennen sind, fluoreszieren, kann die Hypothese von KNÖFLER und Mitarbeitern (1990) vertreten werden, die neben der Bindung der Fluoreszenzfarbstoffe an Mineralien, auch die Bindung an Gerüsteiweiße und Kollagen diskutieren.

Die Bohrlöcher sind alle durch ein faserreiches Bindegewebe aufgefüllt, an ihren Rändern sind stellenweise osteoklastäre Reaktionen, ebenso zu beobachten wie eine Osteoblastentätigkeit. An zwei Präparaten ist in einem Bereich bereits Geflechtknochen

erkennbar. Vergleichbare Ergebnisse sind auch in der Literatur zu finden. So fanden BORCKMANN et al. (1982) beim Hund zwei Wochen postoperativ einen durch lockeres, faserreiches Granulationsgewebe gefüllten Bohrkanal, an dessen Kante eine geringe Knochenneubildung zu beobachten war, die sich nach vier Wochen deutlicher darstellte. KNÖFLER et al. (1990) beschreiben eine an der Knochenwunde bevorzugt an den Stellen der Berührung durch das Implantat beginnende Heilung, die sich appositional auf das Implantat zubewegt. In den eigenen Untersuchungen konnte an diesen Stellen eine engere Schichtung der das Implantat umgebenden Fasern festgestellt werden. Allerdings bestand hier kein direkter Kontakt zwischen Bohrlochrand und Implantat, sondern nur ein geringerer Abstand. SOBALLE et al. (1990) stellten an Titanimplantaten, die in eine Lücke eingesetzt wurden verglichen mit an die Umgebung gepressten eine reduzierte mineralisierende Oberfläche fest. Daher stellt sich die Frage, ob für die vorliegende Studie ein kleineres, der Implantatform angepasstes Bohrloch geeigneter gewesen wäre. Zudem muss bedacht werden, dass durch den Einsatz rotierender Instrumente, wie den Bohrer, eine Hitzeschädigung des umliegenden Knochengewebes und damit eine Nekrosezone von 0,5 mm entsteht (KNÖFLER et al., 1989; LISTGARTEN et al., 1991).

Während in Studien an der Ratte bereits nach vier Wochen eine komplette Heilung und Osseointegration festgestellt wurden (FJUI et al., 1998; TAKESHITA et al., 1996), dauerte die komplette Einheilung beim Hund einige Monate (LISTGARTEN et al., 1992; OHMAE et al., 2001). Dies ist allerdings keine Erklärung dafür, warum in der vorliegenden Studie auf der Implantatoberfläche überhaupt keine knochenbildenden Zellen gefunden wurden, da erste Knochenkontakte bereits erheblich früher beschrieben werden. So fanden DEPORTER und Mitarbeiter (1986), wie auch CHANG et al. (1998) beim Hund bereits vier Wochen nach der Implantation eines Titanimplantats einen Kontakt zwischen diesem und dem Knochengewebe. ERICSSON et al. (1994) konnten nach zweimonatiger Implantatliegedauer eine Kontaktfläche von 40% nachweisen. SELVIG (1994) vertritt die Meinung, dass die Frage, ob eine Gewebeverbindung zustande kommt oder nicht, unabhängig vom Versuchstier bereits nach einer bis zwei Wochen geklärt werden kann, da hierfür das Vorhandensein von endgültigem Knochengewebe nicht nötig ist. Für den Hund empfiehlt er eine Beobachtungszeit von vier Wochen, da in diesem Zeitraum zwar Knochengewebe erst in geringem Maße vorhanden ist, aber bereits eine ausreichende Gewebeverbindung, die er als „Kollagen-Adhäsion“ bezeichnet, vorhanden ist. Wenn das in den eigenen Präparaten gefundene parallelfaserige Gewebe als eine derartige Kollagen-Verbindung angesehen wird, zeigt sich, dass die nicht beschichteten Klammern ein erheblich höheres Maß an Bindung

aufweisen. Aus welchen Gründen die in der Untersuchung von KRAUSE (2001) gefundenen positiven Auswirkungen der PIII-Beschichtung in den eigenen Untersuchungen beim Hund nicht nachvollzogen werden konnten, bleibt unklar.

Die Tatsache, dass die Fluoreszenz um die Klammer großteils derartig verteilt ist, dass sie auf der von der Kompression abgewendeten Seite liegt, lässt vermuten, dass der durch die Klammer ausgeübte Zug einen negativen Einfluss auf die Anlagerung von Gewebe in diesem Bereich hat.

4.2.3 Titangehalte der Organe

Als Ursache für die Freisetzung von Titanpartikeln aus Implantaten wird sowohl eine Ionisierung des Metalls im Kontakt mit den umgebenden Geweben und Körperflüssigkeiten, als auch Mikroabrieb diskutiert. Eine erhöhte Leitfähigkeit für Titankationen soll durch eine Chloridkontamination der passivierenden Oxidschicht zustande kommen (SCHLIEPHAKE et al., 1991). Häufiger wird allerdings der Mikroabrieb aufgrund mechanischer Gegebenheiten beschrieben (SCHLIEPHAKE et al., 1993a; DEPPE et al., 2002). SCHLIEPHAKE und Mitarbeiter (1993a) fanden Titanpartikel extrazellulär zwischen den Kollagenfasern und in der Nähe von Gefäßen. Ebenso beobachteten sie wie Makrophagen, die Titanpartikel phagozytiert hatten, in Blut- oder Lymphgefäße eindringen. Dort werden die Titanpartikel entweder lysosomal zersetzt oder sie werden weitertransportiert und lagern sich in den Endstrombahnen der inneren Organe ab.

Die in der vorliegenden Studie gemessenen Titangehalte der Organe weisen große Streuungen auf, was auch in anderen Untersuchungen beobachtet werden konnte (SCHLIEPHAKE et al., 1991; DEPPE et al., 2002). Während SCHLIEPHAKE et al. (1991) in der Milz von Göttinger Miniaturschweinen nach dreimonatiger Implantationszeit einen durchschnittlichen Titangehalt von 46,3 µg/g Trockengewicht finden, wird in den eigenen Untersuchungen ein mittlerer Wert 117,32 µg/g Trockengewicht festgestellt, was dem 2,5-fachen des in der Literatur gefundenen Wertes entspricht. Auch der Lebertitangehalt der Hunde, der im Mittel bei 61,62 µg/g liegt, weist ein Vielfaches dessen auf, was in den Schweinelebern gemessen wurde. In der Studie von SCHLIEPHAKE et al. aus dem Jahr 1989 lag der Mittelwert bei 11,93 µg/g und in einer ähnlichen Untersuchung von 1991 bei 11,5 µg/g. Dort konnte nach fünf Monaten Liegedauer der Implantate eine geringe Abnahme des Titangehalts in der Leber auf 10,93 µg/g festgestellt werden.

DISKUSSION

Bezüglich der Titananreicherung in den Nieren besteht ein deutlicher Unterschied zwischen den Angaben zweier gleichartiger Versuche von SCHLIEPHAKE und Mitarbeitern. Während in einer Studie von 1989 ein Wert von 1,68 µg/g gemessen wurde, wurde 1991 ein Gehalt von 7,9 µg/g gefunden. Die in der eigenen Untersuchung festgestellten Werte liegen mit einem Durchschnitt von 42,65 µg/g deutlich darüber.

Im Gegensatz dazu liegt der Mittelwert des Titangehalts der Lunge mit 22,09 µg/g wesentlich unter den in der Literatur beschriebenen, die mit 209,5 µg/g (1989) bzw. 99,6 µg/g (1991) angegeben werden. Dort kommt es nach fünfmonatiger Implantationsdauer zu einem signifikanten Anstieg auf 432,86 µg/g bzw. 135,7 µg/g.

Aus diesen Ergebnissen schließen SCHLIEPHAKE et al. (1989; 1991), dass es bevorzugt in der Lunge und in der Milz zu einer Anreicherung von Titanaggregaten kommt, hingegen die Anreicherung in Leber und Niere nicht dauerhaft ist.

Bezüglich des Titangehaltes der Milz trifft diese Aussage auch auf die eigenen Untersuchungen zu.

Hinsichtlich der Mengenverhältnisse der in den verschiedenen Organen gefundenen Titangehalte stimmen die durch die vorliegende Studie erhaltenen Ergebnisse mit denen von DEPPE et al. (2002) überein, die nach Implantation von Zylindern aus Reintitan Titanablagerungen in absteigender Reihenfolge in Milz, Leber, Niere und Lunge von Hunden finden. Daraus kann geschlossen werden, dass Nitinol bezüglich der Titanfreisetzung dem Reintitan gleichzusetzen ist.

Auffallend ist, dass sich die bei Hund 4 gemessenen Werte generell deutlich über den Mittelwerten befinden. Als Ursache hierfür kann das gelockerte Implantat gesehen werden.

In der Humanmedizin werden bei Lockerungen von Prothesen Erhöhungen von Titan-Konzentrationen im Serum bis auf das 50fache des Normalwertes gemessen (LIU et al., 1998; JACOBS et al., 1999).

Nicht zu vernachlässigen ist, dass es auch durch Umweltbelastungen zur Anreicherung von Titan in den inneren Organen kommt. So wird beim Menschen ein Gehalt von 50 µg/kg Frischgewebe in der Lunge als normal angesehen (SCHMITZ-MOORMANN et al., 1964).

In den eigenen Untersuchungen liegt das Maximum mit 48,7 µg/kg noch knapp unter diesem Wert.

Da die in der Literatur angegebenen Titangehalte eine sehr breite Streuung aufweisen und bei unterschiedlichen Spezies gemessen wurden, ist eine konkrete Interpretation der Ergebnisse nicht möglich.

DISKUSSION

Es stellt sich aber die Frage, welche Auswirkungen die freigesetzten Titanpartikel einerseits auf das umliegende Gewebe und andererseits auf die Organe haben, in denen sie akkumulieren.

OSBORN und Mitarbeiter (1990) beschreiben eine durch Titan ausgelöste Schädigung der Leukozyten, sowie der Lymphozyten. Außerdem soll die alkalische Phosphatase um 40% reduziert werden, was einen negativen Einfluss auf die Knochenheilung hat. Durch Bindung von Titan an Hydroxylapatitkristalle soll das aktive Kristallwachstum gehemmt werden. Da in einer Untersuchung mit einem durch Titan-Plasma beschichteten Implantat eine 2,5fach höhere Freisetzung von Titan festgestellt wurde, empfehlen die Autoren von einer Beschichtung für Langzeitimplantate abzusehen. In anderen Studien wird die gegenteilige Meinung vertreten, da durch eine Beschichtung der Abrieb von Partikeln minimiert werden soll. Es konnte auch keine negative Induktion einer abnormalen morphologischen Änderung von Fibroblasten und Makrophagen veranlasst durch Titanpartikel nachgewiesen werden (SCHLIEPHAKE et al., 1993b).

ASSAD et al. (1999) stellen *in vitro* keine Freisetzung von Titan aus Nitinol fest und führen dies zum einen auf die schützende Oxidschicht, zum anderen auf die sehr stabile Verbindung zurück, die auftritt, wenn Titan und Nickel in den gleichen atomaren Mengen vorhanden sind. In der Diskussion über die zellschädigenden Auswirkungen des Titans ist es unumgänglich dessen Partikelgröße zu beachten. EVANS (1994) stellte in einer *in vitro* Studie fest, dass gemahlene Titanpartikel, die kleiner als 5µm sind, Zellschäden verursachen, während größere Teilchen auch bei direktem Zellkontakt keinen negativen Einfluss zeigten. Daher ist notwendig, Implantate derartig zu gestalten dass eine Freisetzung feiner Partikel vermieden wird.

4.3 Schlussfolgerung und klinischer Ausblick

Wie zu erwarten war, zeigen die unter Kompression stehenden Spalten ein rascheres Heilungsverhalten. Für den weiteren klinischen Einsatz sollte aber ein Maßsystem entwickelt werden, das ein zuverlässiges Bohren der Löcher im passenden Abstand und damit ein rasches und reibungsloses Einsetzen der Klammern ermöglicht.

Obwohl weder unter den beschichteten noch unter den unbeschichteten Klammern zum Zeitpunkt der Probenentnahme eine Osseointegration besteht, weisen die Letzteren eine höhere fluoreszenzmikroskopische Aktivität auf.

Anhand der Ergebnisse kann keine Stimulation der Osseointegration durch die PIII-Beschichtung festgestellt werden.

Da aber in einer anderen Studie (KRAUSE, 2001) ein verbessertes Einheilverhalten für PIII-behandelte Implantate festgestellt wurde, sollte diese Art der Oberflächenmodifizierung Gegenstand weiterer Forschungen sein. Dafür sollten ein standardisiertes Implantatdesign und eine längere Einheilungszeit gewählt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Entwicklung neuer Beschichtungstechnologien ist ein wichtiges Gebiet der Implantationsmedizin. Dabei wird eine ausgeprägte Osseointegration angestrebt, um eine dauerhafte, biologische Fixation des Implantats zu gewährleisten. Bei der Plasma-Immersion-Ionen-Implantation (PIII) handelt es sich um ein Verfahren, mit dem Beschichtungsionen stabil unter die Oberfläche eingelagert werden können.

In der vorliegenden Studie wird untersucht, ob sich das verbesserte Einheilverhalten PIII-behandelter Implantate, wie es bei der Ratte gefunden wurde, auf ein dem Menschen bezüglich seiner Knochenstruktur ähnlicheres Tiermodell, den Hund, übertragen lässt. Dazu werden 7 Beagle-Hunden an beiden Unterkieferästen mit einem Osteoskalpell gleichseitige Dreiecke herausgesägt, die randomisiert auf der einen Seite mit einer PIII-behandelten, auf der anderen Seite mit einer unbehandelten Autokompressionsklammer aus Nitinol wieder fixiert werden. Damit kann gleichzeitig die Einheilung einer unter Kompression stehenden Knochenspalte mit der ohne Kompression verglichen werden.

Nach einer Implantationszeit von drei Wochen werden die Knochenproben in Kunststoff eingebettet, in 150µm dicke Scheiben geschnitten und fluoreszenzmikroskopisch und histologisch untersucht.

In Organproben von Lunge, Leber, Milz und Niere wird der Titangehalt atomabsorptionsspektrographisch bestimmt. Hier ergibt sich auf das Frischgewicht bezogen eine absteigende Reihenfolge der Titangehalte für Milz > Leber > Niere > Lunge und ein absteigender Gehalt in Leber > Niere > Lunge > Milz in bezug auf das Trockengewicht.

Bei der Auswertung zeigt sich, dass die unter Kompression stehenden Spalten eine raschere Heilung aufweisen, als die nicht komprimierten.

In die Bewertung der Implantate gehen 12 Präparate ein. Hier ist weder bei den beschichteten, noch bei den unbeschichteten eine knöcherne Einheilung festzustellen. Die unbeschichteten Klammern weisen eine höhere fluoreszenzmikroskopische Aktivität auf.

Die gefundenen Ergebnisse zeigen, dass es durch die PIII-Beschichtung nicht zu einer Stimulation der Osseointegration kommt. Da diese Aussage nicht mit den Resultaten vorausgegangener Studien übereinstimmt, müssen weitere Untersuchungen den genauen Wirkmechanismus der PIII-Beschichtung auf osseointegrative Prozesse zeigen.

6. SUMMARY

Osseointegration of nickel-titanium shape-memory clamps after surface modification by plasma immersion ion implantation – an experimental study on animals

The development of new coating technologies is an important field of implantation medicine. The aim is an extensive osseointegration to obtain long lasting biological anchorage of the implant.

The plasma immersion ion implantation (PIII) is a method to deposit ions firmly under the implant's surface.

The present study determines the possibility of transferring the positive effects of a PIII-coating to osseointegration, like it was seen in a study on rats, to another animal model with a bone structure comparable to the human bone structure, the dog. In seven beagle dogs a triangular bone fragment is prepared with a bone scalpel in both mandibles. This fragment is fixed again randomised with a PIII-coated shape-memory clamp of nickel-titanium alloy on one site and with an uncoated one at the other site. So it is possible to draw a comparison between the healing of the bone gap with and without press fit.

After three weeks of implantation the samples are embedded in methymetacrylate and after polymerisation cut in slices of 150 µm. These are examined by fluorescencemicroscopical and histological methods. In tissue samples of lung, liver, spleen and kidneys the titanium concentration is detected by atomic absorption spectrography. Converted to the concentration of the fresh tissue there is in decreasing order of the titanium concentration in spleen > liver > kidneys > lung and referred to the dry weight a decreasing titanium deposition in liver > kidneys > lung > spleen.

In the evaluation of the bone gaps the gaps under press fit show a faster healing process as the ones without press fit.

For the evaluation of the implants 12 samples are used. Neither in the coated nor in the untreated clamps osseointegration is detectable. The uncoated implants showed a higher fluorescencemicroscopical activity.

The results show no stimulation of the PIII-coating on osseointegration.

This is not confirm with the results of an earlier study, so further investigations have to clarify the acting-mechanism of the PIII treatment on osseointegration.

7. LITERATURVERZEICHNIS

ALBREKTSSON, T., JOHANSSON, C. (2001)
Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration
Eur Spine J, 10, 96-101

ANDREASSEN, G. (1980)
A clinical trial of alignment of teeth using a 0.019 inch thermal nitinol wire with a transition temperature range between 31°C. and 45°C.
Am J Orthod, 78, 528-537

ASSAD, M., YAHIA, L.H., RIVARD, C.H., LEMIEUX, N. (1998)
In vitro biocompatibility assessment of a nickel-titanium alloy using electron microscopy in situ end labelling (EM-ISEL)
J Biomed Mater Res, 41, 154-161

ASSAD, M., LEMIEUX, N., RIVARD, C.H., YAHIA, L.H. (1999)
Comparative in vitro biocompatibility of nickel-titanium, pure titanium and stainless steel: genotoxicity and atomic absorption evaluation
Bio-Med Mater Eng, 9, 1-12

BANTLEON, H.P., DROSCHL, H., PFEIFFER, K..P. (1989)
Neue Drähte und deren Kraftabgabe-Konsequenzen für die kieferorthopädische Therapie
Fortschr Kieferorthop 50, 243-255

BECKER, J., MEISSNER, T., NEUKAM, F.W., KNÖFLER, W., GRAF, L.-H. (1991)
Tierexperimentelle Untersuchungen zur Einheilung von ANOF-beschichteten Titanimplantaten
Z Zahnärztl Implantol VII, 162-169

BETHMANN, W., KNÖFLER, W. (1987)
Geweberaktionen auf implantierte Materialien
Zahnärztl Praxis, 5, 162-167

BORCKMANN, B.U., FRENKEL, G., HAUKE, H. (1982)
Knochenheilung nach Gelatineschwammimplantation unter Kompression beim Hund
Dtsch Zahnärztl Z, 37, 25-29

BRANEMARK, P.-J. (1983)
Osseointegration and its experimental background
J Prosth Dent, 50, 399-410

BROWNE, M., GREGSON, P.J. (1994)
Surface modification of titanium alloy implants
Biomaterials, 15, 894-898

BUSER, D., STICH, H., KREKELER, G., SCHROEDER, A. (1989)
Faserstrukturen der periimplantären Mukosa bei Titanimplantaten: Eine tierexperimentelle Studie am Beagle -Hund
Z Zahnärztl Implantol V, 15-23

BUSER, D., WEBER, H.P., DONATH, H.P., FIORELLINI, J.P., PAQUETTE, D.W., WILLIAMS, R.C. (1992)

Soft tissue reactions to nonsubmerged unloaded titanium implants in beagle dogs
J Periodontol, 63, 226-236

CHANG, Y.S., GU, H.O., KOBAYASHI, M., OKA, M. (1998)

Influence of various structure treatments on histological fixation of titanium implants
J Arthroplasty, 13, 816-825

CISSÈ, O., SAVADOGO, O., WU, M., YAHIA, L'H. (2002)

Effect of surface treatment of NiTi alloy on its corrosion behaviour in hanks solution
J Biomed Mater Res, 61, 339-345

DAVIES, J.E. (1996)

In vitro modelling of the bone / implant interface
Anatomical Rec, 245, 426-445

DAVIES, J.E. (1998)

Mechanisms of endosseous integration
Int J Prosthodont, 11, 391-401

DEPORTER, D.A., WATSON, P.A., PILLIAR, R.M., MELCHER, A.H., WISLOW, J., HOWLEY, T.P., HANSEL, P., MANIATOPOULOS, C., RODRIGUEZ, A., ABDULLA, K., PARISIEN, K., SMITH, D.C. (1986)

A histological assessment of the initial healing response adjacent to porous-surfaced, titanium alloy dental implants in dogs
J Dent Res, 65, 1064-1070

DEPPE, H., GREIM, H., BRILL, T., WAGENPFEIL, S. (2002)

Titanium deposition after peri-implant care with the carbon dioxide laser
Int J Oral Maxillofac Implants, 17, 707-714

DRESCHER, D., BOURAUUEL, CH., THEIR, M. (1990)

Materialtechnische Besonderheiten orthodontischer NiTi-Drähte
Fortschr Kieferorthop, 51, 320-326

DRUGACZ, J., LEKSTON, Z., MORAVIEC, H., JANUSZEWSKI, K. (1995)

Use of NiTiCo shape-memory clamps in the surgical treatment of mandibular fractures
J Oral Maxillofac Surg, 53, 665-671

ECKE, H. (1976)

Quantitative Erfassung der Knochenneubildung
Nova Acta Leopoldina, N.F., 44, 285-288

EITEL, F., KLAPP, F., JACOBSON, W., SCHWEIBERER, L. (1981a)

Bone regeneration in animal and in man: a contribution to understanding the relative value of animal experiments to human pathophysiology
Arch Orthop Trauma Surg, 99, 59-64

LITERATURVERZEICHNIS

- EITEL, F., SEILER, H., SCHWEIBERER, L. (1981b)
Vergleichende morphologische Untersuchungen zur Übertragung tierexperimenteller Ergebnisse auf den Regenerationsprozess des menschlichen Röhrenknochens
Unfallheilkunde, 84, 255-264
- ERICSSON, J., JOHANSSON, C.B., BYSTEDT, H., NORTON, M.R. (1994)
A histomorphometric evaluation of bone-to-implant contact on machine-prepared and roughened titanium dental implants
Clin Oral Impl Res, 5, 202-206
- EVANS, E.J. (1994)
Cell damage in vitro following direct contact with fine particles of titanium, titanium alloy and cobalt-chrome-molybdenum alloy
Biomaterials, 15, 713-717
- FUJI, N., KUSAKARI, H., MAEDA, T. (1998)
A histological study on tissue responses to titanium implantation in rat maxilla: the process of epithelial regeneration and bone reaction
J Periodontol, 69, 485-495
- GRÖSSNER-SCHREIBER, B., TUAN, R.S. (1991)
Die Bedeutung der Oberfläche von Titanimplantaten im Osseointegrationsvorgang
Dtsch Zahnärztl Z, 46, 691-693
- HARRIS, W.H. (1960)
A microscopic method of determining rates of bone growth
Nature, 17, 1038-1039
- HÄNISCH v., C. J.
Osteogenese nach Laserosteotomie mit einem CO₂-Laser im Vergleich zur Osteotomie mit konventioneller Sägetechnik- eine tierexperimentelle Studie
Vet.med. Diss., München, (in Vorbereitung)
- HARTWIG, C.H., REHAK, L., MILZ, S., BENNER, K.U. KÜSSWETTER, W., WILLMANN, G. (1995)
Das Einwachsverhalten von Titan-Prüfkörpern unterschiedlicher Oberflächenbeschaffenheit im metaphysären Knochenlager des Hundes- eine biomechanische und histologische Analyse
Biomed Tech, 40, 99-105
- HOBKIRK, J.A. (1983)
Progress in implant research
Int Dent J, 33, 341-349
- HÖNIG, J.F., MERTEN, H.A. (1993)
Das Göttinger Miniaturschwein (GMS) als Versuchstier in der human-medizinisch osteologischen Grundlagenforschung
Z Zahnärztl Implantol IX, 244-254
- HURST, L., DUNCANSON, G., NANDA, S., ANGOLKAR, V. (1990)
An evaluation of the shape-memory phenomenon of nickel-titanium orthodontic wires
Am J Orthod Dentofac Orthop, 98, 72-76

- INOUE, T., COX, J.E., PILIAR, R.M., MELCHER, A.H. (1987)
Effect of the surface geometry of smooth and porous-coated titanium alloy on the orientation of fibroblasts in vitro
J Biomed Mater Res, 21, 107-126
- JACOBS, J.J., SILVERTON, C., HALLAB, N.J., SKIPOR, A.K., PATTERSON, L., BLACK, J., GALANTE, J.O. (1999)
Metal release and excretion from cementless titanium alloy total knee replacements
Clin Orthop Relat Res, 358, 173-180
- JAWORSKI, Z.F.G. (1981)
Physiology and pathology of bone remodeling- cellular basis of bone structure in health and in osteoporosis
Symposium on the Osteoporoses
Orthop Clin N Amer, 12, 485-512
- KAPANEN, A., RYHÄNEN, J., DANILOV, A., TUUKKANEN, J. (2001)
Effect of nickel-titanium shape memory metal alloy on bone formation
Biomaterials, 22, 2475-2480
- KELLER, J.C., STANFORD, C.M., WIGHTMAN, J.P., DRAUGHN, R.A., ZAHARIAS, R. (1994)
Characterisations of titanium implant surfaces III
J Biomed Mater Res, 28, 939-946
- KELLNER, G. (1974)
Implantation und Implantat
Österr Z Stomatol, 71, 83-86
- KIM, T.-I., HAN, J.-H., LEE, I.-S., LEE, K.-H., SHIN, M.-C., CHOI, B.-B. (1997)
New titanium alloys for biomaterials: a study of mechanical and corrosion properties and cytotoxicity
Bio-Med Mater Eng, 7, 253-263
- KIRSCH, A., DONATH, K. (1984)
Tierexperimentelle Untersuchungen zur Bedeutung der Mikromorphologie von Titanimplantatoberflächen
Fortschr Zahnärztl Implantol I, 35-40
- KNÖFLER, W., GRAF, H.-L. (1990)
Zur Knochenreaktion auf Biomaterialien:
Komplexes Versuchsmodell zur Beschreibung der Knochenumbauvorgänge und Interfacereaktionen unter Biomaterialeinfluss
Z Zahnärztl Implantol V, 256-262
- KNÖFLER, W., GRAF, H.-L., GRÖSCHEL, T., LÖWICKE, G. (1990)
Zur Knochenreaktion auf Biomaterialien:
II. Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung zur Beobachtung der initialen Knochenbildung
Z Zahnärztl Implantol VI, 145-152

LITERATURVERZEICHNIS

- KRANKENPFLEGE-JOURNAL, N.N. (1983)
Nickel-Titan - ein Metall mit Gedächtnis
Krankenpfl J, 21, 4-5
- KRAUSE, D. (2001)
Über die Osseointegration von Prüfkörpern aus Titan bzw. Titanlegierungen nach Oberflächenbehandlung mit Plasma-Immersionen-Ionen-Implantation- eine tierexperimentelle Studie
Vet.med. Diss., München, 2001
- LARSSON, C., THOMSEN, P., LAUSMAA, J., KASEMO, B., ERICSON, L.E. (1994)
Bone response to surface modified titanium implants: studies on electropolished implants with different oxide thickness and morphology
Biomaterials, 15, 1062-1074
- LENTRODT, J. (1983)
Die Entwicklung der Implantologie bis heute
Dtsch Zahnärztl Z, 38, 77-82
- LINDNER, L. (1989)
Osseointegration of metallic implants- I. Light microscopy in the rabbit
Acta Orthop Scand, 60, 129-134
- LISTGARTEN, M.A., LANG, N.P., SCHROEDER, H.E., SCHROEDER, A. (1991)
Periodontal tissues and their counterparts around endosseous implants
Clin Oral Impl Res, 2, 1-19
- LISTGARTEN, M.A., BUSER, D., STEINEMANN, S.G., DONATH, K., LANG, N.P., WEBER, H.P., (1992)
Light and transmission electron microscopy of the intact interfaces between non-submerged titanium-coated epoxy resin implants and bone or gingiva
J Dent Res, 71, 364-371
- LIU, T.K., LIU, S.H., CHANG, C.H., YANG, R.S. (1998)
Concentration of metal elements in the blood and urine in the patients with cementless total knee arthroplasty
Tohoku J Exp Med, 185, 253-262
- LOIANZ, A., RINNER, M., ALONSO, F., ONATE, J.I., ENSINGER, W. (1998)
Effects of plasma immersion ion implantation of oxygen on mechanical properties and microstructure of Ti6Al4V
Surf Coat Technol, 103-104, 262-267
- LONG, M., RACK, H.J. (1998)
Titanium alloys in total joint replacement- a materials science perspective
Biomaterials, 19, 1621-1639
- MÄNDL, S., KRAUSE, D., THORWARTH, G., SADER, R., ZEILHOFER, F., HORCH, H.H., RAUSCHENBACH, B. (2001)
Plasma immersion ion implantation treatment of medical implants
Surf Coat Technol, 142-144, 1046-1050

- MÄNDL, S., RAUSCHENBACH, B. (2000)
Plasma-Immersion-Ionen-Implantation: Ein neues Verfahren zur homogenen Oberflächenmodifizierung komplex-geformter medizinischer Implantate
Biomed Tech, 45, 193-198
- MÄNDL, S., THORWARTH, G., SCHRECK, B., STRITZKER, B., RAUSCHENBACH, B. (2000)
Raman study of titanium oxide layers produced with plasma immersion ion implantation
Surf Coat Technol, 125, 84-88
- MARTIN, T.J., WAHNG, K., NICHOLSON, G.C. (1988)
Cell biology of bone
In: Martin, T.J. (Ed.): Bailliere's clinical endocrinology and metabolism Vol.2
Baillière Tindall, London, 1-29
- MARX, R.E., GARG, A.K. (1998)
Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implants
Implant Dentistry, 7, 267-275
- MARZIANI, L. (1955)
Subperiostale Gerüstimplantate zu prothetischen Zwecken
Dtsch Zahnärztl Z, 10, 1115-1129
- MC KNEE, M.D., NANCI, A. (1993)
Ultrastructural, cytochemical and immunohistochemical studies on bone and its interfaces
Cell Material, 3, 219-243
- MILCH, R.A., RALL, D.P., TOBIE, J.E. (1958)
Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone
J Bone Joint Surg, 40, 897-910
- MIURA, F., MOGI, M., OHURA, Y., HAMANAKA, H. (1986)
The super-elastic property of the Japanese NiTi alloy wire for use in orthodontics
Am J Orthod Dentofac Orthop, 90, 1-10
- MITTELMEIER, W., GRUNWALD, I., SCHÄFER, R., GRUNDEI, H., GRADINGER, R. (1997)
Zementlose Endoprothesenverankerung mittels trabekulären, dreidimensional interkonnektierenden Oberflächenstrukturen
Orthopädie, 26, 117-124
- MÖRIKE, K.D., BETZ, E., MERGENTHALER, W. (1991)
Biologie des Menschen, 13. Aufl., 38-44
- MÜNZENBERG, J., RÖSSLER, H. (1976)
Physikalische Veränderungen des Callusgewebes durch Knochenmineraleinlagerung
Nova Acta Leopoldina, N.F., 44, 257-262

NORMED Medizin-Technik GmbH
D-78532 Tuttlingen

OHMAE, M., SAITO, S., MOROHASHI, T., SEKI, K., QU, H., KANOMI, R., YAMASAKI, K., OKANO, T., YAMADA, S., SHIBASAKI, Y. (2001)

A clinical and histological evaluation of titanium mini-implants as anchors for orthodontic intrusion in the beagle dog
Am J Orthod Dentofacial Orthop, 119, 489-197

OSBORN, J.-F. (1983)

Hydroxylapatitkeramik - ein osteotroper Werkstoff für den Knochenersatz
Fortschritte der Kiefer- und Gesichtschirurgie XXVIII, Georg Thieme Verlag, 37-39

OSBORN, J.-F., WILLICH, P., MEENEN, N. (1990)

The release of titanium into human bone from a titanium implant coated with plasma-sprayed titanium

In: Heimke, G., Soltész, U., Lee, A.J.C. (Eds.): Clinical Implant Materials
Advances in Biomaterials, 9, Amsterdam, 75-80

PARFITT, A.M. (1984)

The cellular basis of bone remodelling: the quantum concept reexamined in light of recent advances in the cell biology of bone
Calcif Tissue Int, 36, 37-45

PECK, W.A., WOODS, W.L. (1998)

The cells of bone
In: Riggs, B.L., Melton III, L.J. (Eds.): Osteoporosis: Etiology, Diagnosis and Management
Raven Press, New York, 1-44

POHL, Y., JOOS, G., SCHUBERTH, S., SEFCSEK, J., HAUCK, M., FURKA, I., KIRSCHNER, H. (1995)

Der Hund als Modell für die Zahnärztliche Implantologie
Acta Chir Austriaca, 117, 13-14

PUTTERS, J.L.M., SUKUL, K., DE ZEEUW, G.R., BIJMBA, A., BESSELINK, P.A. (1992)

Comparative cell culture effects of shape memory metal (Nitinol®), nickel and titanium: a biocompatibility estimation
Eur Surg Res, 24, 378-382

RAHN, B.A., FLEISCH, H., MOOR, R., PERREN, S.M. (1970)

The Effect of Fluorescent Labels on Bone Growth and Calcification in Tissue Culture
European society for Experimental Surgery, 5th Congress, 137-138

RAHN, B.A., PERREN, S.M. (1971a)

Alizarinkomplexon-Fluorochrom zur Markierung von Knochen –und Dentinanbau
Experientia, 28, 180

RAHN, B.A., PERREN, S.M. (1971b)

Xylenol orange, a fluorochrome useful in polychrome sequential labelling of calcifying tissue
Stain Technology, 46, 125-129

- RAHN, B.A., PERREN, S.M. (1975)
Die mehrfarbige Fluoreszenzmarkierung des Knochenanbaus
Chem. Rundschau, 28, 12-15
- RAHN, B.A. (1976)
Die polychrome Sequenzmarkierung des Knochens
Nova Acta Leopoldina, N.F, 44, 249-255
- RAUSCHENBACH, B., MÄNDL, S., GREGORY, J.K., SADER, R., KRAUSE, D.
ASSMANN, W., STEINHAUSER, E. (2001)
Oberflächenbehandlung von Titanwerkstoffen für biomedizinische Implantate
Biomaterialien, 2, 215-221
- RIESS, G. (1984)
Osteoklastisch-osteogene Reaktionen und deren Darstellung an der Implantat-Knochengrenze
Fortschr Zahnärztl Implantol I, 28-34
- RIEU, J., PICHAT, A., RABBE, L.-M., RAMBERT, A., CHABROL, C., ROBELET, M.
(1991)
Ion Implantation effects on friction and wear of joint prosthesis materials
Biomaterials, 12, 139-143
- ROMEIS, B. (1989)
Mikroskopische Technik, 17. Aufl.,
Urban & Schwarzenberg, München, 555
- SCHENK, R.K., BUSER, D. (2000)
Osseointegration: a reality
Periodontology, 17, 22-35
- SCHLIEPHAKE, H., NEUKAM, F.W., URBAN, R. (1989)
Titanbelastung parenchymatöser Organe nach Insertion von Titanschraubenimplantaten
Z Zahnärztl Implantol V, 180-184
- SCHLIEPHAKE, H., REISS, J., URBAN, R., NEUKAM, F.W., GRÜNAY, H. (1991)
Freisetzung von Titan aus Schraubenimplantaten
Z Zahnärztl Implantol VII, 6-10
- SCHLIEPHAKE, H., LEHMANN, H., KUNZ, U., SCHMELZEISEN, R. (1993a)
Ultrastructural findings in soft tissues adjacent to titanium plates used in jaw fracture
treatment
Int J Oral Maxillofac Surg, 22, 20-25
- SCHLIEPHAKE, H., REISS, J., URBAN, R., NEUKAM, F.W., GUCKEL, S. (1993b)
Metal release from titanium fixtures during placement in the mandible: an experimental study
Int J Oral and Maxillofac Surg, 8, 502-511
- SCHMITZ-MOORMANN, P., HÖRLEIN, H., HANEFELD, F. (1964)
Lungenveränderung bei Titanstaubexposition
Beitr Silikoseforsch, 80, 1-17

LITERATURVERZEICHNIS

- SCHROEDER, A., POHLER, O., SUTTER, F. (1976)
Gewebsreaktion auf ein Titan-Hohlzylinderimplantat mit Titan-Spritzschichtoberfläche
Schw Mschr Zahnheilk, 86, 713-727
- SCHROEDER, A., ZYPEN, E. v.d., STICH, H., SUTTER, F. (1981)
The Reactions of Bone, Connective Tissue, and Epithelium to Endosteal Implants with
Titanium-Sprayed Surfaces
J max-fac Surg, 9, 15-25
- SELVIG, K.A. (1994)
Discussion: animal models in reconstructive therapy
J Periodontol, 65, 1169-1172
- SISK, A.L., STEFLIK, D.E., PARR, G.R., HANES, P.J. (1992)
A light and electron microscopic comparison of osseointegration of six implant types
J Oral Maxillofac Surg, 50, 709-716
- SKRIPITZ, R., ASPENBERG, P. (1998)
Tensile bond between bone and titanium: a reappraisal of osseointegration
Acta Orthop Scand, 69, 315-319
- SOBALLE, K., HANSEN, E.S., BROCHSTED-RASMUSSEN, H., PEDERSEN, C.M.,
BÜNGER, C. (1990)
Hydroxyapatite coating enhances fixation of porous coated implants
Acta Orthop Scand, 61, 299-306
- TAKESHITA, F., AYUKAWA, Y., IYAMA, S., MURAI, K., SUETSUGU, T. (1997)
Long-term evaluation of bone-titanium interface in rat tibiae using light microscopy,
transmission electron microscopy, and image processing
J Biomed Mater Res, 37, 235-242
- THULL, R. (1983)
Oberflächenreaktionen an Implantaten unter Funktionsbedingungen
Biomedizinische Technik, Band 28, Ergänzungsband, 38-41
- THULL, R. (1993)
Oberflächenmodifiziertes Titan durch Hartstoffbeschichtung als Werkstoff für enossale
Zahnimplantate
GOI Jahrbuch, 49-60
- WAGNER, W.C. (1992)
A brief introduction to advanced surface modification technologies
J Oral Implantol, 18, 231-235
- WELLER, S. (1997)
Biologische Zustände erhalten und knochenschonend implantieren
In: Implant spezial
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 9-10

LITERATURVERZEICHNIS

WEVER; D.J., VELDHUIZEN, A.G., SANDERS, M.M., SCHAKENRAD, J.M.,
v. HORN, J.R. (1997)

Cytotoxic, allergic and genotoxic activity of a nickel-titanium alloy
Biomaterials, 18, 1115-1120

WILLIAMS, D.F. (1981)

Implants in dental and maxillofacial surgery
Biomaterials, 2, 1981, 133-145

WILLIAMS, J.M., RIESTER, L. PANDEY, R., EBERHARDT, A.W. (1996)

Properties of nitrogen-implanted alloys and comparison materials
Surf Coat Technol, 88, 132-138

WISSING, H., STÜRMER, K.M., BREIDENSTEIN, G. (1991)

Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspezies für experimentelle Untersuchungen am
Knochen

Hefte Unfallheilk, 212, 479-488

8. Tabellenverzeichnis

- Tab.1: Verteilung der beschichteten und unbeschichteten Klammern auf die Unterkieferhälften
- Tab.2: Injektionsschema der Flouochrome
- Tab.3: Entwässerungs-und infiltrationsschema
- Tab.4: Anregungs- und Emissionspektren der Fluoreszenzfarbstoffe
- Tab.5: Organproben für die Atomabsorptionsspektrographie
- Tab.6: Organproben für die Gefriertrocknung
- Tab.7: Mittelwerte, Standardabweichungen, Minimal- und Maximalwerte der Fluoreszenz in den Spalten
- Tab.8: Mittelwerte, Standardabweichungen, Minimal- und Maximalwerte der Fluoreszenz um die Klammern
- Tab.9: Organproben nach der Gefriertrocknung
- Tab.10: Titangehalte der Leber
- Tab.11: Titangehalte der Milz
- Tab.12: Titangehalte der Niere
- Tab.13: Titangehalte der Lunge

9. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Einweg- Memory- Effekt (DRESCHER et al., 1990)
- Abb. 2: Zweiweg-Memory-Effekt (DRESCHER et al., 1990)
- Abb. 3: Klammer vor Insertion, (Produktinformation Fa. NORMED)
- Abb. 4: Eingesetzte Klammer, (Produktinformation Fa. NORMED)
- Abb. 5: Schematischer Aufbau einer PIII-Anlage (RAUSCHENBACH et al., 2001)
- Abb. 6: A und B: Distanzosteogenese, C und D: Kontaktosteogenese
Während sich die knochenbildenden Zellen in Abbildung A an die Oberfläche des alten Knochens anlagern, treten sie in Abbildung C mit der Implantatoberfläche in Kontakt. Die Ergebnisse der Osteogenesetypen sind in den Abbildungen B und D zu erkennen. In Abbildung B lagert sich neues Knochengewebe an den alten Knochen an, in Abbildung C hingegen ist eine um das Implantat herum beginnende Bildung von neuem Knochengewebe zu erkennen. (DAVIES, 1998)
- Abb. 7: Länge der Klammer
- Abb. 8: Abmessungen der Klammer: Länge (L): 8mm, Breite (B): 1,6 mm, Materialdicke (M): 0,7mm
- Abb. 9: Beschichtete (blau) und Unbeschichtete Klammern der Länge 8mm
- Abb. 10: Osteoskalpell nach Sachse, Fa. Medicon
- Abb. 11: Bohrer, Fa. Bien Air
- Abb. 12: Handstück von Säge und Bohrer, Fa. Bien Air
- Abb. 13: Einsprühen der Klammer mit Eisspray
- Abb. 14: Aufbiegen eines Klammerschenkels
- Abb. 15: Klammer einseitig aufgebogen
- Abb. 16: Knochenfragment durch Klammer fixiert
- Abb. 17: Skizze der Schnittebene
- Abb. 18: Untersuchungsprotokoll für die qualitative fluoreszenzmikroskopische Auswertung
- Abb. 19: Auswertungsprotokoll für die Spaltheilung
- Abb. 20: Auswertungsprotokoll für die Einheilung der Klammern
- Abb. 21: Hund 4, Tag 0, links
- Abb. 22: Hund 4, Tag 6, links, Implantatverlust
- Abb. 23: Hund 4, Tag 0, rechts
- Abb. 24: Hund 4, Tag 22, rechts
- Abb. 25: Hund 3, Tag 6, links
- Abb. 26: Hund 5, Tag 12, links
- Abb. 27: Hund 5, Tag 22, links
- Abb. 28: Hund 5, Tag 22, rechts

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 29: Hund 4, rechts, ohne Kompression, 2,5fache Vergrößerung
Komplette Durchbauung des Spaltes mit Geflechtknochen
- Abb. 30: Hund 4, rechts, ohne Kompression, 10fache Vergrößerung
Von bone lining Cells begrenzte Knocheninseln (1), dazwischen Osteozyten (2)
- Abb. 31: Hund 3, rechts, mit Kompression, 10fache Vergrößerung
Beginnende Formation zu Geflechtknochen
- Abb. 32: Hund 6, rechts, mit Kompression, 10fache Vergrößerung
Schwarzes Pigment im Spalt (1), große Gefäße (2)
- Abb. 33: Hund 5, links, mit Kompression, 20fache Vergrößerung
Osteoklasten am unregelmäßig geformten Rand
- Abb. 34: Hund 5, links, mit Kompression, 20fache Vergrößerung
Osteoklasten in Ausbuchtungen
- Abb. 35: Hund 7, rechts, beschichtet, 2,5fache Vergrößerung
Klammer liegt exzentrisch
- Abb. 36: Hund 5, rechts, beschichtet, 2,5fache Vergrößerung
Zentrale Lage der Klammer
- Abb. 37: Hund 3, links, unbeschichtet, 20fache Vergrößerung
Parallele Fasern um die Klammer
- Abb. 38: Hund 4, rechts, beschichtet, 20fache Vergrößerung
Parallele Fasern um die Klammer
- Abb. 39: Hund 4, rechts, beschichtet, 10fache Vergrößerung
Geflechtknochen am Bohrlochrand
- Abb. 40: Hund 4, rechts, beschichtet, 10fache Vergrößerung
Spalt zwischen Klammer und Gewebe
- Abb. 41: Vergleich der Anteile an Fluoreszenz in den Spalten mit bzw. ohne Kompression
- Abb. 42: Mittelwerte der Fluoreszenz in den Spalten
- Abb. 43: Hund 4, rechte Seite, Spalt ohne Kompression, 2,5fache Vergrößerung, Calceingrün
Punktuelle Fluoreszenz am Spaltrand
- Abb. 44: Hund 3, rechts, mit Kompression, 2,5fache Vergrößerung, Calceingrün
Durchgehende Fluoreszenz am Spaltrand
- Abb. 45: Hund 4, rechte Seite, Spalt ohne Kompression, 25fache Vergrößerung, Xylenolorange
Der komplette Spalt ist mit Geflechtknochenstruktur gefüllt.
- Abb. 46: Hund 3, rechts, mit Kompression, 2,5fache Vergrößerung, Xylenolorange
Kontinuierliche Fluoreszenz am Spaltrand
- Abb. 47: Hund 4, rechte Seite, Spalt ohne Kompression, 2,5fache Vergrößerung, beide Farbstoffe
- Abb. 48: Hund 3, rechts, mit Kompression, 2,5fache Vergrößerung, beide Farbstoffe
- Abb. 49: Prozentualer Anteil der Restspalte

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 50: Vergleich der Fluoreszenz im Bohrloch um die beschichteten / unbeschichteten Klammern

Abb. 51: Skizze Klammeroberfläche

Abb. 52: Vergleich der Fluoreszenz an den Oberflächen der beschichteten/ unbeschichteten Klammern

Abb. 53: Vergleich der Mittelwerte um die Klammern

Abb. 54: Hund 2, links, unbeschichtete Klammer, 2,5fache Vergrößerung, Calceingrün
Fluoreszenz an der Bohrlochkante und an beiden langen Seiten der Klammer

Abb. 55: Hund 2, rechts, beschichtete Klammer, 2,5fache Vergrößerung, Calceingrün
Fluoreszenz an der Bohrlochkante und einseitig um die Klammer

Abb. 56: Hund 2, links, unbeschichtete Klammer, 2,5fache Vergrößerung, Xylenolorange
Fluoreszenz an der Bohrlochkante und an beiden langen Seiten der Klammer

Abb. 57: Hund 2, rechts, beschichtete Klammer, 2,5fache Vergrößerung, Xylenolorange
Fluoreszenz an der Bohrlochkante und einseitig um die Klammer

Abb. 58: Hund 2, links, unbeschichtete Klammer, 2,5fache Vergrößerung, beide Farbstoffe

Abb. 59: Hund 2, rechts, beschichtete Klammer, 2,5fache Vergrößerung, beide Farbstoffe

Abb. 60: Verteilung der Fluoreszenz um die Klammern

Abb. 61: Verteilung der Fluoreszenz um die beschichteten Klammern

Abb. 62: Verteilung der Fluoreszenz um die unbeschichteten Klammern

Abb. 63: Ausrichtung der Fluoreszenz gegenüber der Kompression

Abb. 64: Sitz der Klammer im Bohrloch

Abb. 65: Prozentualer Anteil von Geflechtknochen

Abb. 66: Vergleich der Titangehalte in den Organen bezogen auf Feucht- bzw.- Trockengewicht

10. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calceingrün
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
°C.	Grad Celsius
€	Euro
et al.	et altera
g	Gramm
Fa.	Firma
Hz	Hertz
i.m.	intra muskulär
i.v.	intra venös
kHz	Kilohertz
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
kV	Kilovolt
med.vet.	veterinärmedizinisch
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
MMA	Methylmetacrylat
NaHCO ₂	Natriumhydrogencarbonat
nm	Nanometer
NiTi	Nickel-Titan
Pa	Pascal
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PIII	Plasma-Immersionen-Ionen-Implantation
p.o.	per os
p. Op.	post operationem
s.o.	siehe oben
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
Xy	Xylenolorange
z.B.	zum Beispiel

DANKSAGUNG

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med.vet. W. Schmahl danke ich herzlich für die Übernahme der Arbeit an die tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Herrn Prof. Dr. med. B. Gänsbacher, Direktor des Institutes für experimentelle Therapieforschung und Onkologie der TU München danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med.vet. W. Erhardt für seine hervorragende Betreuung und Unterstützung, die mir jederzeit zuteil wurde.

Für ihre tatkräftige Unterstützung während der praktischen Durchführung möchte ich Frau Dr. med.vet. J. Henke und Frau Dr. med.vet. B. Eißner meinen Dank aussprechen.

Herrn Priv- Doz. Dr. med. Dr. med.dent. Dr. med. habil. R. Sader danke ich für die Bereitstellung des Themas.

Bei Herrn Dr. med. S. Milz möchte ich mich herzlich für seine freundliche Unterstützung und kompetente Beratung während der Auswertung der Präparate bedanken.

Herrn Pöttinger von der Firma Zeiss gilt mein Dank für die großzügige Bereitstellung der Digitalkamera und der Verarbeitungssoftware.

Herrn Prof. Dr. med. H. Greim danke ich für die Durchführung der Atomabsorptionsspektrographie und seine Beratung bezüglich deren Auswertung.

Herrn Hösle von der Firma Normed gilt mein Dank für die Bereitstellung der Instrumente und die freundliche Erstellung der Fotos. Herrn Dr. S. Mändl danke ich für die Beschichtung der Implantate.

Bei Frau Dr. med.vet. M.-L. Schmeller möchte ich mich für die Beratung und die oft richtungsweisenden Tipps bezüglich der histologischen Auswertung bedanken.

Herrn Dr. med.vet. S. Reese danke ich für die Unterstützung bei der Entnahme der Knochenproben.

Den Tierpflegern des Instituts für experimentelle Therapieforschung und Onkologie, sowie den Tierpflegern der GSF möchte ich herzlich für die liebevolle Betreuung der Hunde danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Christian für die nette Zusammenarbeit und seine endlose Geduld und Unterstützung bei computertechnischen Fragen.

LEBENS LAUF

LEBENS LAUF

Name: Tanja Keller

Geburtsdatum: 31.10.75

Geburtsort: Bobingen

Schule: 1982- 1986: Johann-Strauß-Grundschule in Augsburg
1986- 1995: Gymnasium bei St. Anna in Augsburg

Studium: 1995- 2001: Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität in München

09 / 2001: Staatsexamen

01 / 2002: Tierärztliche Approbation

Seit 11/ 2001: Doktorandin am Institut für experimentelle Therapieforschung
und Onkologie am Klinikum Rechts der Isar in München

01/2002-06/2003: Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für
Molekulare Tierzucht und Biotechnologie in München

06/2003-09/2003: Assistentin in der Tierärztlichen Klinik für Kleintiere und Pferde,
Dr. Burczyk, Dr. Meier in Bamberg

Seit 11/2003: Assistentin in der Tierärztlichen Klinik für Kleintiere,
Dr. Kessler, Dr. Kosfeld, Dr. Tassani-Prell in Hofheim