

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
Klinische Navigation und Robotik
der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Eine fluoreszenz- und lichtmikroskopische Untersuchung
der Osseointegration von
WI.TAL®-Implantaten am Schweinekiefer**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Katja Bayreuther
aus Kyritz

Gutachter:

1. PD Dr. K. Nelson
2. Prof. Dr. A. M. Schmidt-Westhausen
3. Prof. Dr. Dr. T. E. Reichert

Datum der Promotion: 14.06.2009

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	3
2	Einleitung	7
3	Literaturübersicht	8
3.1	Historischer Überblick	8
3.2	Knochen	9
3.2.1	Knochenstruktur	9
3.2.2	Knochenzellen	11
3.2.3	Vergleich des Knochens von Mensch und Schwein	12
3.3	Osseointegration	13
3.4	Mechanismen der Implantateinheilung	13
3.5	Das Knochen-Implantat-Interface	16
3.6	Einflussfaktoren einer erfolgreichen Osseointegration	18
3.7	Tierexperimentelle Untersuchungen des Knochen-Implantat-Kontaktes an Titanimplantaten	19
3.8	Implantatmaterial, -design und -oberflächen	24
3.8.1	Frühere Materialien	24
3.8.2	Titan als Implantatwerkstoff	25
3.8.3	Implantatdesign	25
3.8.4	Implantatoberflächen	26
3.9	Untersuchung der Implantateinheilung	29
3.9.1	Lichtmikroskopische Untersuchung	30
3.9.2	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung	30
3.9.2.1	Polyfluorochrome Sequenzmarkierung	30
3.9.2.2	Das Fluoreszenzmikroskop	31

4	Fragestellungen	33
5	Material und Methode	34
5.1	Versuchstiere	34
5.1.1	Historie und Auswahlkriterien	34
5.1.2	Haltung und Ernährung	35
5.1.3	Gruppeneinteilung	35
5.2	Implantatsystem	36
5.3	Versuchsaufbau	37
5.3.1	Operationsverfahren	37
5.3.1.1	Präoperative Behandlung	37
5.3.1.2	Sedierung	38
5.3.1.3	Narkose	38
5.3.1.4	Zahntfernung	39
5.3.1.5	Implantation	39
5.3.2	Postoperative Phase	40
5.3.2.1	Antibiose und Analgesie	40
5.3.2.2	Verlaufskontrollen	40
5.3.2.3	Fluorochrommarkierung	41
5.3.3	Tötung und Sektion	41
5.4	Aufbereitung der Proben	42
5.4.1	Fixierung und Kunststoffeinbettung	42
5.4.2	Anfertigung von Dünnschliffen	43
5.4.3	Färbung der fertigen Schliffe	44
5.5	Histologische Untersuchungen und deren Auswertung	45
5.5.1	Histomorphometrie	45

5.5.1.1	Lichtmikroskopische Auswertung	45
5.5.1.2	Fluoreszenzmikroskopische Auswertung	46
5.5.2	Statistische Auswertung	49
6	Ergebnisse	51
6.1	Beschreibung ausgewählter histologischer Aufnahmen	51
6.2	Knochen-Implantat-Kontakt (BIC) - Ergebnisse der histomorphometrischen Analyse	54
6.2.1	Vergleich des BIC zwischen Oberkiefer und Unterkiefer	56
6.2.2	Vergleich des BIC zwischen den cervicalen und mittleren Implantatabschnitten	56
6.2.3	Vergleich des BIC zwischen den cervicalen und mittleren Implantatabschnitten bei der alleinigen Betrachtung von Oberkiefer und Unterkiefer	58
6.2.4	Zweifaktorielle parameterfreie Varianzanalyse des BIC	59
6.3	Knochenneubildungsrate	59
6.3.1	Vergleich der Knochenneubildungsrate zwischen Oberkiefer und Unterkiefer	60
6.3.2	Vergleich der Knochenneubildungsraten innerhalb der unterschiedlichen Zeiträume in Bezug auf die einzelnen Implantatabschnitte	61
6.4	Richtung und Zeitpunkt der Knochenneubildung	65
7	Diskussion	72
7.1	Diskussion von Material und Methode	72
7.1.1	Auswahl des Versuchstieres	72
7.1.2	Zeitlicher Ablauf	73
7.1.3	Operationsverfahren	73

7.1.4	Einheilungsphase	74
7.1.5	Herstellung der histologischen Präparate	74
7.1.6	Histologische Untersuchungen	75
7.1.7	Anzahl der untersuchten Implantate	77
7.2	Diskussion der Ergebnisse	78
7.2.1	Diskussion des Knochen-Implantat-Kontaktes	78
7.2.2	Diskussion der Knochenneubildungsrate	81
7.2.3	Diskussion der Richtung und des Zeitpunktes der Knochenneubildung	82
8	Zusammenfassung	85
9	Summary	86
10	Literaturverzeichnis	87
11	Abkürzungen	95
12	Danksagung	97
13	Lebenslauf	98
14	Eidesstattliche Erklärung	99

2 Einleitung

Durch den Einzug der dentalen Implantologie in die Zahnmedizin haben sich die chirurgischen und prothetischen Therapiemöglichkeiten nach Zahnverlust grundlegend erweitert. Mit Hilfe implantologischer und augmentativer Techniken ist die funktionelle und ästhetische Rehabilitation des Kauorgans dem Ziel einer restitutio ad integrum näher gekommen. Auf kaum einem anderen Gebiet der Zahnheilkunde findet eine vergleichbar rasante Entwicklung statt. Die Anzahl der auf dem Weltmarkt bestehenden Implantatsysteme lag bereits im Jahr 2003 bei über 220 Fabrikaten und steigt stetig weiter [1]. Immer neue wissenschaftliche Erkenntnisse, klinische Erfahrungen, aber auch ein enormer Wettbewerbsdruck fordern von den Herstellern ständige Neu- und Weiterentwicklungen. Die Vielfalt der Implantatmaterialien, -formen, -oberflächen und -größen erlaubt dem Anwender heute zwischen mehr als 2000 verschiedenen Implantaten zu wählen [2]. Dies mag hinsichtlich der unterschiedlichen Indikationsbereiche, der individuellen klinischen Situation, des Allgemeinzustandes des Patienten und seiner Bedürfnisse von Vorteil sein. Jedoch scheint dadurch die Auswahl des „richtigen“ Implantates für den jeweiligen klinischen Einsatz eine bedeutsame Herausforderung und schwierige Aufgabe zu sein.

Die Firma Wieland stellte im Jahr 2006 das WI.TAL®-Implantatsystem vor, dessen säuregeätzte Oberfläche eine schnelle Osseointegration ermöglichen soll. Laut Hersteller können die Implantate zur Sofort- und Spätimplantation, transgingival einphasig oder gedeckt zweiphasig eingesetzt werden. Dabei sind alle Indikationsbereiche, wie der Einzelzahnersatz, die Versorgung von Schattlücken, Freundsituationen oder des zahnlosen Kiefers abgedeckt. In der vorliegenden tierexperimentellen Studie wurde die Osseointegration der genannten Implantate bei einer Spätimplantation und nach einer geschlossenen Einheilphase von zwölf Wochen untersucht. Dabei galt es, deren Einwachsverhalten im Kieferknochen von Miniaturschweinen histologisch zu analysieren.

3 Literaturübersicht

3.1 Historischer Überblick

Das bisher älteste, in einem Grab auf Honduras gefundene „Zahnimplantat“ wurde auf eine Zeit um 600 nach Christus datiert [3]. Dabei handelte es sich um aus Muschelkalk gefertigte künstliche Zähne, die einer jungen Mayafrau eingesetzt wurden. Als weitere Materialien dienten in den darauf folgenden Jahrhunderten Menschen- und Tierzähne, Tierknochen und Elfenbein, welche in die Extraktionsalveolen eingebracht wurden. Da diese „Implantate“ wahrscheinlich keinen langen Bestand hatten, besaßen sie nur eine temporäre Funktion und bargen stets die Gefahr einer Infektion [4]. Weitere Materialien wie Platin, Gold, Silber, Kupfer, Keramiken und Kunststoffe folgten, jedoch ohne langfristige Erfolge [5, 6]. Am Ende des 19. Jahrhunderts begannen Ollier und Barth zeitgleich, sich mit dem Thema „Biomaterial“ und Knochen auseinander zu setzen. Aus ihren tierexperimentellen Untersuchungen, in denen verschiedene Materialien zum Knochenersatz erprobt wurden, stammen die heute noch gebräuchlichen Begriffe autogen, allogenen und xenogen [7]. Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts gab es erste Versuche am Menschen, dentale Implantate subperiostal oder enossal zu inserieren. Die Insertion **subperiostaler Implantate** setzte sich jedoch aufgrund einer hohen Mobilität, bedingt durch eine fibröse Grenzschicht zwischen Implantat und Knochen und daraus folgender hoher Misserfolgsraten nicht durch [8]. Letztendlich zeigte Pruin 1974, dass sich die Knochenverhältnisse nach der Entfernung subperiostal gelagerter Implantate stark verschlechtert hatten [9]. Auch die damals benutzten Legierungen aus Platin-Iridium, eisenhaltigem Cobalt-Chrom und Cobalt-Chrom-Molybdän ließen keinen direkten Knochenkontakt zum Implantat zu [10]. **Enossale Implantate** wurden in Form von Hohlzylindern um 1906 von Greenfield gesetzt und können als Vorläufermodell der noch in jüngerer Zeit verwendeten Hohlzylinderimplantate angesehen werden [11]. Die Anfänge der Schraubenimplantate gehen auf Strock zurück, der 1937 schraubenförmige Implantate aus einer rostfreien Cobalt-Chrom-Molybdän-Legierung enossal inserierte [7]. Die Ära der Blattimplantate ist eng mit den Namen Linkow und Roberts verbunden [12, 13]. Dieser seit den 60iger Jahren benutzte Implantattyp wurde ständig in Form, Struktur und Oberflächengestaltung verändert. Die anfangs verwendeten Cobalt-Chrom-Molybdän-Legierungen wichen später dem besser

verträglichen Titan. Die jedoch nach Implantatverlust aufgetretenen starken Knochendefekte ließen diese Implantatform wieder in den Hintergrund geraten [14]. Den entscheidenden wissenschaftlichen Durchbruch auf dem Gebiet der dentalen Implantologie stellten die tierexperimentellen Forschungsergebnisse der Arbeitsgruppen von Professor P. I. Brånemark an der Universität Göteborg und Professor A. Schroeder an der Universität Bern dar. Sie zeigten unabhängig voneinander in den 60iger und 70iger Jahren, dass mit enossalen Titanimplantaten eine zuverlässige Verankerung mit einem direkten Knochen-Implantat-Kontakt erzielt werden kann. Dieses von Brånemark als Osseointegration bezeichnete Phänomen beschrieb Schroeder als funktionelle Ankylose [15-17]. Zur weiteren wissenschaftlichen Etablierung trugen außerdem Arbeiten von Schulte, Tetsch und Spiekermann bei [18-20]. Die internationale Anerkennung der Implantologie in der Zahnheilkunde stieg deutlich mit der Veröffentlichung des Buches „Tissue-Integrated Protheses, Osseointegration in Clinical Dentistry“ von Brånemark, Zarb und Albrektsson im Jahre 1985 [21]. Es trafen sich Wissenschaftler unterschiedlicher Arbeitsgruppen, um über die eigenen Erfahrungen mit Implantaten zu diskutieren und Erfolgskriterien festzulegen [21-23]. Im Jahr 1982 etablierte sich die Implantologie in Deutschland als wissenschaftlich anerkannte Therapiemaßnahme durch die Stellungnahme der DGZMK. Nachdem die rasante Weiterentwicklung vor allem funktionellen Aspekten dentaler Implantate galt, versucht die heutige Entwicklung mit einem erheblichen Aufwand, in Kombination mit modernen Knochen- und Weichgewebsaugmentationsverfahren die Indikationsstellungen für dentale Implantate zu erweitern und immer anspruchsvolleren Erfolgskriterien bezüglich Funktion, Ästhetik und Langlebigkeit gerecht zu werden.

3.2 Knochen

3.2.1 Knochenstruktur

Um die Vorgänge der Osseointegration und die Voraussetzungen für den Langzeiterhalt des periimplantären Knochens zu verstehen, ist es notwendig, sich dessen strukturellen Aufbau und physiologische Mechanismen zu veranschaulichen. Der Knochen, als ein lebendiges Gewebe, befindet sich fortwährend in einem dynamischen Zustand des An-, Ab- und Umbaus, der beispielsweise von der Aktivität

der Knochenzellen und von Belastungsmomenten bestimmt wird. Täglich werden circa 0,7 % des gesamten menschlichen Skeletts resorbiert und durch neuen Knochen ersetzt. Knochen setzt sich zu etwa 50 % aus Mineralien, zu 25 % aus Wasser und zu 25 % aus organischen Bestandteilen zusammen. Er bietet als Stützapparat funktionellen Halt und nimmt aktiv am Calciumstoffwechsel des Körpers teil [24]. **Makroskopisch** ist Knochen aus der substantia compacta und der substantia spongiosa zusammengesetzt. Je nach deren Anteil unterschieden schon Lekholm und Zarb 1985 in Brånemarks Werk zur Osseointegration die Kategorien der verschiedenen Knochenqualitäten, welche bedeutend bei der Auswahl des Implantates und der Präparation des Implantatbettes sind. Sie differenzierten die Klassen Q1 bis Q4, wobei die Klasse Q1 eine fast ausschließlich kompakte Knochensubstanz beschreibt und die Klasse Q4 den Knochen, dessen Kern aus lockerer Spongiosa besteht, welcher nur von einer dünnen Kortikalis umgeben ist. Die Knochenqualitäten der Klassen Q2 und Q3 stellen die jeweiligen Übergänge dar [25]. Eine ähnliche Einteilung (D1 bis D4) nahmen Misch et al. 1989 vor [26]. Truhlar et al. untersuchten in ihrer Studie von 1997 die Lokalisation der einzelnen Knochenqualitäten in unterschiedlichen Kieferabschnitten und konnten deutliche Verteilungsunterschiede feststellen [27]. **Mikroskopisch** wird zwischen Geflechtknochen, zusammengesetztem Knochen, lamellärem und bündelförmigem Knochen differenziert. Der auch als Phase-1-Knochen bezeichnete Geflechtknochen ist bedeutend bei der Knochenentwicklung und der Frakturheilung, weil er sich sehr schnell bilden kann. Aufgrund seiner unorganisierten Struktur und seines, im Vergleich zum Lamellenknochen, niedrigeren Mineralgehaltes ist er von geringerer mechanischer Festigkeit. Er wird relativ schnell resorbiert und langsam durch den lamellären Knochen, auch Phase-2-Knochen genannt, ersetzt. Der lamelläre Knochen besteht aus einer organisierten Kollagen-Protein-Mineralstruktur, die in multipel orientierten Schichten angeordnet ist und ihm eine außerordentliche Stabilität verleiht. Der zusammengesetzte Knochen ist im Übergangszustand des Phase-1- zum Phase-2-Knochen zu finden, Bündelknochen dagegen im Bereich von Ligamenten und Gelenken. Letzterer besitzt durch die Insertion der Ligamente ein gestreiftes Aussehen [28]. Die architektonische Grundeinheit des Knochens ist das Osteon, welches in einer Vielzahl in der substantia compacta des lamellären Knochens parallel zur Oberfläche und im spongiösen Anteil weniger regelmäßig angeordnet ist. Es setzt sich aus 5 bis 20 konzentrisch angeordneten Speziallamellen

zusammen, die in der Mitte, im so genannten Havers'schen Kanal, Blutgefäße und vegetative Axone beherbergen. Die Havers'schen Kanäle sind mit denen in benachbarten Osteonen, mit der Knochenoberfläche und dem Markraum über seitliche Volkmann-Kanäle verbunden, wodurch die Blutversorgung und Reizleitung im Knochen über Gefäß- und Nervengeflechte gesichert ist [29]. **Auf molekularer Ebene** bestehen die einzelnen Knochenlamellen aus parallel angeordneten Kollagenfaserbündeln, die in eine mineralische Grundsubstanz eingebettet sind. Diese setzt sich aus Calciumphosphat, Calciumcarbonat, kleinen Mengen Calcium- und Magnesiumfluorid zusammen und liegt hauptsächlich in Form von Hydroxylapatitkristallen vor. Die Ausrichtung der einzelnen Kollagenfasern legt das Mineralisierungsmuster fest und ermöglicht damit die funktionelle Anpassung des Knochens an seine biomechanische Umgebung und Belastung. Knochen enthält auch eine kleine Menge von Nicht-Kollagen-Proteinen, wie zum Beispiel Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), die in die mineralische Matrix eingebettet und als Wachstumsfaktoren von Bedeutung sind. Sie wirken regulierend auf Knochenzellen und spielen dadurch eine wesentliche Rolle bei der Knochenbildung, -heilung und dem Knochenumbau (remodelling) [28, 30].

3.2.2 Knochenzellen

Der Knochenstoffwechsel und die Physiologie des Knochens werden durch drei Haupttypen von Zellen bestimmt. Dazu gehören die Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten. Die Vorläuferzellen der Osteoblasten sind die noch teilungsfähigen Präosteoblasten, welche aus pluripotenten mesenchymalen Knochenvorläuferzellen hervorgehen, die sich auf den endostalen und periostalen Knochenoberflächen befinden. **Osteoblasten** sind überall dort zu finden, wo Knochenwachstum, -anbau und -umbau stattfinden. Sie synthetisieren und sezernieren den organischen Teil der Knochenmatrix, das Typ-I-Kollagen, und eine Reihe verschiedener Botenstoffe, die die Vermehrung, Differenzierung und Funktion der Knochenzellen stimulieren und zum Teil in die Matrix eingebaut werden. Zu den Botenstoffen gehören neben Prostaglandinen und Interleukinen TGF- β_{1-5} , BMP $_{1-12}$ und ILGF $_{1,2}$ [30, 31]. Die Schicht noch nicht verkalkter Matrix wird Osteon genannt. In diese werden im Anschluss die oben genannten Mineralien eingebettet. Während des Knochenwachstums lagern die Osteoblasten den neuen Knochen in konzentrisch aufeinander folgenden Schichten,

die zuvor beschriebenen Speziallamellen, an die Innenoberfläche des Hohlraums, in dem sie arbeiten an. Auf diese Weise mauern sie sich in die Knochenmatrix ein und formen sich in kleinen Lakunen zu spindelförmigen **Osteozyten** um. Diese sind dann für die Ernährung des Knochens und die Signalvermittlung verantwortlich. Über dendritische Zellfortsätze, welche in kleinen Kanälen liegen, und über gap junctions kommunizieren sie miteinander und mit Zellen auf der Knochenoberfläche. Dadurch wird der Stoffaustausch zwischen Osteozyten, Osteoblasten, mineralisierter Matrix und Blutgefäßen gewährleistet [24, 32]. Einzelne Forscher postulieren, dass Osteozyten auf die mechanische Beanspruchung des Knochens reagieren, indem sie durch die Expression des Wachstumsfaktors TGF- β auf remodellierende Zellen, wie Lining-Zellen, Osteoblasten und Osteoklasten an der Knochenoberfläche Einfluss nehmen [33]. **Osteoklasten** sind mehrkernige Zellen, die aus der Fusion mononukleärer Vorläuferzellen der Monozyten-Makrophagen-Reihe der Blutzellen hervorgehen und für die Knochenresorption verantwortlich sind. Damit sind sie aktiv an der Calciumhomöostase des Organismus und am Umbau des Knochens beteiligt. Zu finden sind sie in flachen Aushöhlungen, so genannten Howship'schen Lakunen, entlang der mineralisierten, zu resorbierenden Knochenoberfläche. Neben den drei genannten Zelltypen gibt es außerdem die inaktiven, flachen **Knochenbelegzellen (Lining-Zellen)**, welche die innere zellreiche Schicht des Periosts bilden und sich in Osteoblasten differenzieren können. Man nimmt an, dass sie den Knochenumbau, als Antwort auf verschiedene chemische oder mechanische Reize, anregen können [24, 29]

3.2.3 Vergleich des Knochens von Mensch und Schwein

Die Voraussetzungen für die Übertragbarkeit tierexperimenteller Untersuchungsergebnisse auf den Menschen bilden die physiologischen und anatomischen, die strukturellen und zellulären Ähnlichkeiten mit der untersuchten Spezies. Gesichtspunkte, wie die Größe, Festigkeit und Form des Knochens und damit das Vorgehen mit möglichst ähnlichen Instrumenten und Implantaten, die biomechanische Belastbarkeit, die Knochenregeneration, die Reaktion auf bestimmte Versuchsbedingungen und auch die aufzuwendenden Kosten sind dabei zu berücksichtigen und bestimmen die Auswahl des Versuchstieres [34]. Das Göttinger Miniaturschwein stellte sich zur Beantwortung osteologischer Fragestellungen,

besonders hinsichtlich der Knochenheilung als sehr geeignet heraus. Grund dafür ist eine bedeutende Ähnlichkeit zwischen Mensch und Miniaturschwein insbesondere in Bezug auf die Knochenqualität, den Knochenumbau und die Knochenappositionsrate im kaufunktionellen System [35, 36]. Eine Vergleichbarkeit ist auch möglich, da das Schwein bezüglich der Kieferform, -dimension und -bewegung den menschlichen Verhältnissen sehr nahe kommt und auch Analogien hinsichtlich der mechanischen Eigenschaften und der Physiologie des Knochens aufweist [37, 38].

3.3 Osseointegration

Der eigentliche Begriff der „Osseointegration“ wurde von Brånemark als ein „direkter und struktureller Verbund zwischen dem organisierten, lebenden Knochengewebe und der Oberfläche eines belasteten Implantates“ definiert [39]. Histologisch bedeutet dies, dass ein direkter Kontakt ohne dazwischen liegendes Bindegewebe besteht [5]. Nach Schulmann kann ein Implantat als osseointegriert bezeichnet werden, wenn 25–75 % seiner Oberfläche Kontakt zu lebendem Knochengewebe aufweist [40]. In den frühen 90iger Jahren wurde die Definition der Osseointegration nach einem Zusammentreffen von Zarb und Brånemark modifiziert, woraufhin sie als ein Prozess beschrieben wurde, bei dem klinisch eine asymptomatische, starre Fixation alloplastischen Materials erreicht und unter funktioneller Belastung im Knochen beibehalten wird [21, 41].

3.4 Mechanismen der Implantateinheilung

Bezüglich der Darstellung der Einheilungsmechanismen eines Implantates gibt es in der internationalen Literatur unterschiedliche Begriffsbestimmungen, die zu einer gewissen Verwirrung führen können, jedoch alle dieselben an der Implantat-Knochen-Grenzfläche ablaufenden Prozesse beschreiben. Des Weiteren werden die Erkenntnisse darüber immer detaillierter, was dieses Thema sehr komplex werden lässt. Davies bezeichnet die drei Phasen der Implantateinheilung als **Osteokonduktion**, **de novo-Knochenbildung** und als **Knochen-Remodelling** [42, 43]. Marx und Garg dagegen sprechen von der **osseophyllischen**, **osteokonduktiven** und der **osteoadaptiven Phase** der Implantateinheilung [28].

Albrektsson und Johansson wiederum unterteilen die Mechanismen in die **Osteoinduktion**, **Osteokonduktion** und **Osseointegration** [5]. Um die Beziehung zwischen der Oberfläche eines implantierten Materials und dem Knochengewebe während der Einheilungsphase darzustellen, beschrieben Osborn und Newesley 1980 die **Kontakt- und Distanzosteogenese** [44]. Nachfolgend werden die genannten Begriffe und ihre Zusammenhänge im Rahmen der Implantateinheilung erläutert. Die Vorgänge der Implantateinheilung erinnern laut Schenk und Buser an den Ablauf der primären Knochenheilung. Bei interfragmentärer Ruhe wird dabei das sich aus dem initialen Blutgerinnsel organisierende Granulationsgewebe im Bruchspalt direkt von einem Netzwerk aus Geflechtknochen, ausgehend vom Endost und Periost, durchbaut und ersetzt, ohne dass sich erst ein fibrocartilaginöser Kallus bildet [45]. Im Unterschied dazu wachsen bei der Implantateinheilung nicht zwei Knochenfragmente zusammen, sondern es findet eine direkte Verankerung zwischen der Implantatoberfläche und dem Knochen statt. Wird das Implantat in den Knochen inseriert, bildet sich zwischen Knochen- und Implantatoberfläche ein Blutgerinnsel aus [46]. Die im initialen Hämatom befindlichen Thrombozyten adhärieren an der Implantatoberfläche und sezernieren daraufhin Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise PDGF und TGF- β . Durch das chirurgisch gesetzte Trauma und durch initiale Resorptionsvorgänge von nekrotischem, an der Implantatoberfläche komprimiertem Knochen, werden weitere Wachstumsfaktoren aus der Knochenmatrix frei. Dazu gehören die oben erwähnten BMPs, FGFs und IGFs. Die genannten Wachstumsfaktoren sind für die Mechanismen der Implantateinheilung sehr bedeutsam. So berichtete Lind 1996, dass beispielsweise BMPs chemotaktisch und stimulierend auf mesenchymale Stammzellen wirken, welche daraufhin zur Implantatoberfläche wandern, dort adhärieren, proliferieren und sich zu Präosteoblasten und Osteoblasten differenzieren [30]. Der Mechanismus der Stimulation und Migration undifferenzierter mesenchymaler Zellen und deren darauf folgende Differenzierung zu knochenkompetenten Zellen wurde von Albrektsson et al. 2001 als **Osteoinduktion** bezeichnet [5]. Dieser von Marx und Garg auch als **osseophyllische Phase** beschriebene Prozess dauert etwa einen Monat und ist innerhalb der ersten Woche am stärksten ausgeprägt. Parallel dazu findet ab dem dritten Tag post implantationem eine Angiogenese um das Implantat herum statt [24, 28]. Stimulierend wirken dabei die oben erwähnten FGFs [30]. Das sich ausbildende vaskuläre Netzwerk ist Voraussetzung für die beschriebene Osteoinduktion und die

nun folgende **osteokonduktive Phase**. Letztere ist dadurch gekennzeichnet, dass die differenzierenden knochenkompetenten Zellen, sobald sie das Implantat erreicht haben, an der Oberfläche adhären, sich zu Osteoblasten weiterentwickeln und Osteoid bilden [5, 43]. Bagambisa et al. postulierten 1994, dass die vorherige Anlagerung von Proteinen, wie zum Beispiel Fibronectin auf der Implantatoberfläche die Voraussetzung für die Zelladhäsion darstellt und dass dies vom Implantatmaterial und der Oberflächenbeschaffenheit abhängt [47]. Davies nimmt an, dass das Fibrin eine Schlüsselrolle während der **Osteokonduktion** spielt. Nach der Implantatinsertion wird im umgebenden Blutgerinnsel Fibrinogen durch die Wirkung von Thrombin zu Fibrin. Dieses als Leitschiene wirkende Fibrinnetz, welches sich der Implantatoberfläche ein- und anlagert, macht die Zellmigration der knochenkompetenten Zellen zum Implantat hin erst möglich, indem es durchwandert wird [42]. Dabei kommt es, wie aus Studien der dermalen Wundheilung bekannt ist, zu einer Wund- beziehungsweise Fibrinnetzkontraktion [48]. Die Mikrostruktur der Implantatoberfläche hat dabei einen entscheidenden Einfluss sowohl auf die Fibrinretention und damit auf die Osteokonduktion, als auch auf die Zelladhäsion und das Zellverhalten an der Implantat-Knochen-Grenzfläche [42, 49]. Die Knochenneubildung an der Implantatoberfläche bezeichnet Davies als **de novo-Knochenbildung** und vergleicht sie mit der von Osborn und Newesley beschriebenen **Kontaktosteogenese**. Während dieser Phase sezernieren die sich auf der Implantatoberfläche differenzierenden knochenkompetenten Zellen initial eine kollagenfreie, organische Matrix aus Osteopontin und Sialoproteinen. Calciumphosphat-Kristalle lagern sich anschließend ein und wachsen. Daraufhin folgt die geflechtartige Anlagerung von Kollagenfasern, welche ebenfalls mit Calciumphosphat-Kristallen durchbaut werden. Der so neu gebildete Geflechtknochen besitzt, wie bereits beschrieben, eine irreguläre Mikroarchitektur. Im Gegensatz zur Kontaktosteogenese geht die Knochenneubildung bei der **Distanzosteogenese** nicht von der Implantatoberfläche aus, sondern von knochenkompetenten Zellen, die von der Oberfläche des ortsständigen periimplantären Knochens bereitgestellt werden [44]. Das Implantat wird durch ein zentripetales Wachstum des umliegenden Knochens umgeben und integriert. Davies geht davon aus, dass beide Prozesse parallel ablaufen und deshalb auch das Knochen-Implantat-Interface nicht universal beschrieben werden kann [43]. Puleo et al. 2006 nahmen an, dass das Auftreten der Distanz- oder Kontaktosteogenese vom

Implantattyp und dessen Oberfläche abhängt [2]. Nach dieser Phase der Knochenneubildung schließt sich die **osteoadaptive Phase der Osseointegration**, auch **Knochen-Remodelling** genannt, an. Während sich idealer Weise der Knochenkontakt des Implantates in dieser Phase grundsätzlich nicht mehr verändert, findet jedoch ein Umbau des periimplantären Geflechtknochens in Lamellenknochen statt. Daran sind sowohl Osteoklasten als auch Osteoblasten beteiligt [28]. Die Mikroarchitektur des Knochens verändert sich entsprechend der vom Implantat auf den Knochen übertragenden Zug-, Scher- und Druckkräfte und passt sich der Belastung nach der prothetischen Versorgung an. Der Umbau erfolgt über einen Zeitraum von bis zu zwölf Monaten [50, 51]. Andere Autoren sind der Meinung, dass diese Phase drei Monate post implantationem beginnt, in den ersten Wochen besonders ausgeprägt ist und ein Leben lang anhält [45]. Dies brachte auch Zarb in seiner Definition der Osseointegration zum Ausdruck [52].

3.5 Das Knochen-Implantat-Interface

Die auch als Interface bezeichnete Übergangszone beschreibt die organische Schicht zwischen dem alloplastischen Material und der mineralisierten Knochenmatrix. Die Morphologie und Dicke dieser Schicht wird in der internationalen Literatur unterschiedlich beschrieben. Eine Erklärungsmöglichkeit dafür könnte zum einen in der Anwendung unterschiedlicher Tierspezies und Materialien in den in vivo Studien bestehen. Zum anderen könnten in den Untersuchungen verschiedene Stadien des Interface-Remodellings vorgelegen haben. Davies beschrieb in vitro und in vivo das Knochen-Implantat-Interface als eine etwa 0,5 µm dicke Schicht kollagenfreier mineralisierter Matrix aus Osteopontin und Sialoproteinen, von der die Knochenneubildung ausgeht. Sie entspricht den so genannten Kittlinien (Cement Lines), die bereits 1875 durch von Ebner beschrieben wurden. In vitro Studien zeigten, dass kein faserreiches Bindegewebe auf der Implantatoberfläche abgelagert wird [53, 54]. Dies widerspricht der Hypothese nach Albrektsson et al., welche besagt, dass zuerst eine unmineralisierte kollagenhaltige Matrix auf der Implantatoberfläche abgelagert und anschließend mineralisiert wird [55]. Steflik et al. 1998 postulierten weiter, dass Osteoblasten mit einer 20 bis 50 nm dicken Matrix interagieren, indem sie, wie bereits beschrieben, darin eingemauert werden. Die sich daraus entwickelnden Osteozyten stehen über Canaliculi miteinander und direkt mit

der Implantatoberfläche in Verbindung, so dass Informationen, wie zum Beispiel Belastungsmomente vermittelt werden und entsprechende Reaktionen von Osteozyten und Osteoblasten im Rahmen des Remodellings eingeleitet werden können [56]. Aktive molekulare und zelluläre Interaktionen zwischen den Knochenzellen und der Implantatoberfläche zeigten auch Bagambisa et al. 1994 mit in vitro Versuchen [47]. Kasemo et al. 1999 bedienten sich zur detaillierten Beschreibung der molekularen Vorgänge an der Implantatoberfläche der Raster- und Transmissions-Elektronen Mikroskopie, mit denen eine Auflösung von circa zehn beziehungsweise einem Nanometer möglich ist. Sie beobachteten, dass nach der Implantatinsertion innerhalb von Nanosekunden als erstes Wassermoleküle an das Implantat binden. In Abhängigkeit von den Oberflächeneigenschaften, speziell deren Hydrophilie beziehungsweise -phobie, binden die Moleküle unterschiedlich stark oder hydroxylieren die Oberfläche, indem sie dissoziieren. In diese Schicht werden anschließend unter anderem Chlorid-, Natrium- oder Calciumionen als hydratisierte Ionen eingebunden. Erst jetzt ist es möglich, dass sich Proteine aus dem Blut an die Oberfläche binden. Dabei spielen sich auf molekularer Ebene beispielsweise Konformationsänderungen, eine Denaturierung und/oder ein Austausch von gebundenen Proteinen statt, so dass dieser Prozess kein statischer ist und maßgeblich von den Oberflächeneigenschaften des Implantates mitbestimmt wird [57]. Wenn nun lebende Zellen das Implantat erreichen, können sie über ihre Zellmembran, Membranproteine oder spezielle Rezeptoren an die an der Oberfläche haftenden Proteine binden. Zellen interagieren somit nicht direkt mit der „blanken“ Implantatoberfläche [2]. Welche Zellen in welcher Form binden ist wiederum abhängig von der Zusammensetzung der adsorbierten Proteine und damit von der Implantatoberfläche. Die Art und Aktivität der Zellen bestimmt nach Aussagen Kasemos, welches Gewebe an der Implantatoberfläche entsteht [58]. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Möglichkeit der positiven Stimulation von Zellen durch die an der Implantatoberfläche stattfindende Abgabe von Ionen, wie zum Beispiel Ca^{2+} und PO_4^{3-} oder von bestimmten Molekülen. Dies wäre bei Implantaten mit Calciumphosphat- oder BMP-Beschichtungen denkbar.

3.6 Einflussfaktoren einer erfolgreichen Osseointegration

Schon 1969 folgerte Brånemark aus seinen Untersuchungsergebnissen, dass eine erfolgreiche Implantation und eine dauerhafte Osseointegration von verschiedenen Faktoren abhängen. Dazu gehören seiner Meinung nach eine möglichst schonende Präparationstechnik, die Primärstabilität des Implantates nach der Insertion, die Vermeidung einer Früh- und Fehlbelastung des Knochen-Implantat-Komplexes und die orale Hygiene, um periimplantäre Zahnfleischentzündungen zu vermeiden. Viele andere Autoren schließen sich dem an und behaupten, dass sich nur dadurch die Gewebeaktivität und Vitalität des Knochens langfristig sichern lassen. Weitere Schlüsselfaktoren sind die Sterilität des Implantates vor der Insertion, die Eigenschaften des Implantatmaterials, das Implantatdesign sowie die Makro- und Mikrostruktur der Oberfläche [16, 59, 60]. Die knöcherne Einheilung eines Implantates erfordert im Empfängerbett eine adäquate Trabekeldichte, Kieferkammhöhe und -breite bei einer ausreichenden Vaskularisation [24]. Zu den Voraussetzungen des Implantatlagers gehört ebenfalls, dass der Spalt zwischen Implantat und Lagerknochen mit einem stabilen Koagulum ausgefüllt ist und der zu regenerierende periimplantäre Raum vor dem Einwachsen konkurrierenden Weichgewebes geschützt wird [61]. Albrektsson fasst die zu kontrollierenden Aspekte in sechs Faktoren zusammen:

1. die Biokompatibilität des Materials
2. das Implantatdesign
3. die Oberfläche des Implantates
4. die Voraussetzungen des Implantatlagers
5. die chirurgische Technik bei der Insertion
6. die Belastungsmomente beziehungsweise eine belastungsfreie Einheilung von drei bis vier Monaten [62].

Auch Lioubavina et al. 2006 verwiesen auf die absolute Notwendigkeit einer initialen Primärstabilität um eine Osseointegration zu erreichen, da ein klinisch mobiles Implantat nicht reosseintegrieren kann [63]. Raghavendra et al. 2005 beschrieben den Übergang der „mechanischen Primärstabilität“, die durch das Implantatdesign gewährleistet wird, in eine „biologische Stabilität“, die durch die periimplantäre

Knochenneubildung und -verankerung gesichert wird, als eine sehr kritische Phase der frühen Implantateinheilung. Hier müssen nach Meinung der Autoren Mikrobewegungen vermieden werden [64].

3.7 Tierexperimentelle Untersuchungen des Knochen-Implantat-Kontaktes an Titanimplantaten

In der internationalen Literatur lassen sich verschiedene Beispiele für tierexperimentelle Untersuchungen des Knochen-Implantat-Kontaktes finden, die im Folgenden kurz dargestellt werden. Dabei handelt es sich um Studien an Minischweinen, Hunden, Kaninchen und Affen. Vor der Implantatinserion im Kieferbereich wurde in den meisten Fällen eine mindestens dreimonatige Wartezeit zur Reossifikation der Alveolen eingehalten. In der Minischweinstudie von Rimondini et al. 2005 wurde sofort nach der Molarenextraktion in das interradiikuläre Septum implantiert [65]. Mit zwei Ausnahmen heilten die Implantate in allen ausgewählten Studien bis zur Entnahme unbelastet ein. Nkenke et al. 2003 belasteten die untersuchten Implantate zum Teil sofort und werteten nach vier Monaten den Knochen-Implantat-Kontakt aus [66]. Abrahamsson et al. 2001 belasteten nach drei Monaten bei einem gesamten Beobachtungszeitraum von sechs Monaten [67]. Die untersuchten Implantatoberflächen variierten in ihrer Beschaffenheit. Die Studienübersichten und deren Untersuchungsergebnisse werden nachfolgend tabellarisch (Tabelle 1 bis 4) dargestellt.

An **Minischweinen** zeigten sich BIC-Werte zwischen durchschnittlich **20 %** und **78 %** [37, 65, 66, 68-71]. In fünf von sieben Fällen wurde in die Mandibula implantiert. Buser et al. 2004 untersuchten in die Maxilla inserierte Schraubenimplantate [68]. In einer weiteren Studie nutzten Buser und Kollegen das periphere Knochenlager in Femur und Tibia und werteten den Knochen-Implantat-Kontakt aus [69]. Eine Übersicht der Ergebnisse findet sich in Tabelle 1.

In den Untersuchungen an **Hunden** betrug der durchschnittliche BIC zwischen **39 %** und **71 %**. Als Knochenlager dienten sowohl die Maxilla [72] als auch die Mandibula [67, 73-75]. Tabelle 2 zeigt die dazugehörige Studienübersicht.

Die durchschnittlichen BIC-Werte in Studien an **Kaninchen** lagen zwischen **5 %** und **72 %**. Es wurde in Femur [57] oder Tibia [76-79] implantiert. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse aufgeführt.

Ein Beispiel für die Untersuchung des Knochen-Implantat-Kontaktes in der Maxilla von **Affen** zeigt Tabelle 4. Hier betrug der durchschnittliche BIC **74 %** [80].

Autor	Jahr	Knochen-lager	n	Beobachtungs-zeitraum	Titanimplantat	Implantatoberfläche	BIC [%]
Buser et al.	2004	Maxilla	48	2, 4, 8 Wochen	schraubenförmig (Straumann)	1. sandgestrahlt + geätzt (SLA) 2. hydrophilisierte SLA-Oberfläche (SLActive)	nach 2 / 4 / 8 Wochen: 1.= 29,42 / 66,57 / 75,45 2.= 49,30 / 87,91 / 78,47
Buser et al.	1991	Femur, Tibia	60	3, 6 Wochen	perforierte Hohlzylinder	1. maschinierter Oberfläche 2. sandgestrahlt 3. TPS 4. SLA 5. HA-Plasma-Spray	nach 3 / 6 Wochen: 1.= 24,9 / 25,1 2.= 30,4 / 33,6 3.= 39,2 / 37,8 4.= 52,1 / 57,7 5.= 60,6 / 69,5
Eckelt et al.	2007	Mandibula	120	6 Monate	zylindrisch mit 2 definierten Defektzonen	Korund-gestrahlt + beschichtet mit: 1. Kollagen 2. Kollagen + Chondroitinsulfat 3. Kollagen + Chondroitinsulfat + BMP-4	1.= 29,6 2.= 40,2 3.= 26,5
Hale et al.	1991	Mandibula	10	6, 18 Wochen	schraubenförmig (Bränemark)	maschinierter 1. coronal 2. mittig 3. apical 4. gesamt	1.= 28,4 / 28,2 2.= 28,5 / 46,8 3.= 40,6 / 27,9 4.= 32,5 / 34,5
Nkenke et al.	2003	Mandibula	35	4 Monate (Sofortbelastung)	schraubenförmig (Friadent)	Korund-gestrahlt + säuregeätzt	30 sofort belastet / 5 unbelastet: 77,8 / 78
Rimondini et al.	2005	Mandibula (Sofort-implantation)	16	7, 15, 30, 60 Tage	schraubenförmig (Friadent)	Korund-gestrahlt + säuregeätzt 1. coronal 2. mittig 3. apical 4. gesamt	nach 7 / 15 / 30 / 60 Tagen: 1.= 0,54 / 17,2 / 43,4 / 69,19 2.= 11,28 / 22,41 / 35,16 / 47,38 3.= 53,45 / 41,45 / 27,92 / 67,38 4.= 21,76 / 27,02 / 35,5 / 61,32
Zechner et al.	2003	Mandibula	72	12 Wochen	schraubenförmig	1. maschinierter 2. anodisch modifiziert 3. Hydroxylapatit beschichtet	19,39 42,72 39,05

Tabelle 1: Studien zur Untersuchung des Knochen-Implantat-Kontaktes (BIC) am Minischwein

Autor	Jahr	Knochen- lager	n	Beobachtungs- zeitraum	Titanimplantat	Implantatoberfläche	BIC [%]
Abrahamsson et al.	2001	Mandibula	8	6 Monate (Belastung nach 3 Monaten)	schraubenförmig (3i)	1. maschinerte Oberfläche 2. dual geätzt (Osseotie)	1. = 58,1 2. = 71,8
Arvidson et al.	1990	Mandibula	24	6 Monate	schraubenförmig (Astra)	TiO ₂ gestrahlt (TiOblast)	61,3
Ericsson et al.	1994	Maxilla	20	2,4 Monate	schraubenförmig (Astra)	1. maschinerte Oberfläche 2. TiO ₂ gestrahlt (TiOblast)	nach 2 / 4 Monaten: 1. = 39,4 / 42,9 2. = 40,5 / 65,1
Novaes et al.	2002	Mandibula	20	12 Wochen	schraubenförmig	1. maschinert 2. TPS 3. Hydroxylapatit beschichtet 4. sandgestrahlt mit löslichen Partikeln	1. = 41,7 2. = 48,9 3. = 57,9 4. = 68,5
Xiropaidis et al.	2005	Mandibula	4	8 Wochen	schraubenförmig (Nobel Biocare)	1. glatt, Calciumphosphat beschichtet 2. porös, modifiziertes Titanoxid (TiUnite)	1. = 57 2. = 71

Tabelle 2: Studien zur Untersuchung des Knochen-Implantat-Kontaktes (BIC) an Hunden

Autor	Jahr	Knochen- lager	Beobachtungs- zeitraum	Titanimplantat	Implantatoberfläche	BIC [%]
Cordioli et al.	2000	Tibia	48 5 Wochen	schraubenförmig (3i)	1. maschinierter Oberfläche 2. TiO ₂ gestrahlt 3. Titan-Plasma-Spray 4. dual geätzt (Osseotite)	1.= 48,60 2.= 54,80 3.= 56,80 4.= 72,40
Ellingsen et al.	2004	Tibia	80 1,3 Monate	schraubenförmig (Astra)	TiO ₂ gestrahlt (TiOblast): 1. mit Fluoridmodifikation (OsseoSpeed) 2. ohne Fluoridmodifikation	nach 1 / 3 Monaten 1.= 35 / 39 2.= 26 / 31
Platelli et al.	1998	Femur	90 1,2,3,4,8 Wochen	schraubenförmig	1. Al ₂ O ₃ -gestrahlt 2. maschinierter	nach 1 / 2 / 3 / 4 / 8 Wochen 5,1 / 17 / 42 / 54 / 60 5,1 / 15,1 / 30 / 45 / 51
Wennerberg et al.	1995	Tibia	40 12 Wochen	schraubenförmig	kombiniert je Implantatseite: 1. maschinierter/Al ₂ O ₃ -gestrahlt (25µm) 2. maschinierter/Al ₂ O ₃ -gestrahlt (250µm) 3. Al ₂ O ₃ -gestrahlt (25µm)/Al ₂ O ₃ -gestrahlt (75µm) 4. Al ₂ O ₃ -gestrahlt (25µm)/Al ₂ O ₃ -gestrahlt (250µm)	11 / 25 12 / 21 17 / 25 26 / 23
Wennerberg et al.	1996	Tibia	36 4 Wochen	schraubenförmig	1. Al ₂ O ₃ -gestrahlt (25µm) 2. Al ₂ O ₃ -gestrahlt (250µm)	1.= 26,1 2.= 20,2

Tabelle 3: Studien zur Untersuchung des Knochen-Implantat-Kontaktes (BIC) an Kaninchen

Autor	Jahr	Knochen- lager	Beobachtungs- zeitraum	Titanimplantat	Implantatoberfläche	BIC [%]
Huang et al.	2005	Maxilla	24 16 Wochen	schraubenförmig (Nobel Biocare)	porös, modifiziertes Titanoxid (TiUnite)	74,1

Tabelle 4: Studie zur Untersuchung des Knochen-Implantat-Kontaktes (BIC) am Affen

3.8 Implantatmaterial, -design und -oberflächen

Dentale Implantate müssen nicht nur die bereits genannten Kriterien für eine erfolgreiche Osseointegration erfüllen. Neben diesen gibt es Forderungen nach einer schnelleren und sichereren Einheilung sowie einer stabileren Weichgewebsintegration im Übergangsbereich von Implantat zu Abutment bei steigenden ästhetischen Ansprüchen [81, 82]. Viele experimentelle und klinische Studien widmen sich der Suche nach dem „optimalen Implantat“, dessen Material, Design und Oberfläche.

3.8.1 Frühere Materialien

In der dentalen Implantologie spielen bei der Wahl des Implantatmaterials dessen biologische und mechanische Eigenschaften die entscheidende Rolle. So muss das Material biokompatibel, formstabil, mechanisch belastbar und radioopak sein und dem Ziel der Osseointegration gerecht werden [7, 83]. Als Implantatwerkstoffe wurden Metalle, Keramiken und Polymere erprobt. Polymere haben sich aufgrund ihrer schlechten mechanischen Eigenschaften und einer unbefriedigenden biologischen Antwort in Form einer fibrösen Einkapselung nicht bewährt [6, 84]. Keramiken als reine Implantatwerkstoffe stellten sich als zu spröde heraus und zeigten in einigen Studien nur geringe Überlebensraten nach fünf Jahren (zum Beispiel Aluminiumoxidkeramik: 24-65 %, Carbon-Silizium-Keramik: 69-91 %) [83]. Zu der ältesten, in der dentalen Implantologie verwendeten Werkstoffgruppe gehören die Metalle. Es zeigte sich jedoch beispielsweise bei Goldlegierungen, rostfreiem Stahl, Cobalt-Chrom-Legierungen und Nickel-Chrom-Legierungen, dass diese langfristig zu typischen lokalen oder systemischen Abstoßungsreaktionen führten. Dabei kommt es durch die Korrosion zu einer kontinuierlichen Abgabe von Metallionen in das umliegende Gewebe und damit zur bindegewebigen Einkapselung des Implantates [4, 6]. Aktuelle Studien belegen jedoch, dass Titanimplantate im Vergleich zu den genannten Legierungen einen größeren Knochen-Implantat-Kontakt aufweisen. Die aufgeführten Metalle gelten somit heute als obsolet [82, 85, 86]. Titan und seine Legierungen sind daher seit langem das Implantatmaterial der Wahl aufgrund deren ausgezeichneten biologischen und physikalischen Eigenschaften, die für den Langzeiterfolg notwendig sind [86-88].

3.8.2 Titan als Implantatwerkstoff

Die beiden heutigen für enossale Implantate verwendeten Formen sind zum einen das Reintitan und die Titan-Aluminium-Vanadium-Legierung Ti6Al4V. Das Reintitan gibt es in vier verschiedenen Graden, die sich hauptsächlich im Sauerstoffanteil unterscheiden [89]. Titan Grad vier hat mit 0,4 % den größten Sauerstoffanteil. Des Weiteren sind Spuren elementaren Stickstoffs, Kohlenstoffs, Wasserstoffs und Eisens im Reintitan zu finden. Eisen dient dabei dem Korrosionsschutz [84]. Der Ti6Al4V-Legierung sind außerdem ca. 6 % Aluminium und 4 % Vanadium beigemischt. Aluminium erhöht dabei die Festigkeit und Dichte und Vanadium verhindert die durch das Aluminium bedingte mögliche Korrosion [90]. Die physikalischen und mechanischen Eigenschaften variieren etwas in Abhängigkeit des Grades beziehungsweise der Legierungszusammensetzung des Titans. Das Verhältnis zwischen mechanischer Festigkeit und dem Gewicht ist bei Titan und dessen Legierung am besten im Vergleich zu allen anderen Implantatmaterialien [90]. Eine wesentliche Bedeutung für die Korrosionsbeständigkeit und damit für die Gewebeverträglichkeit hat die sich in Anwesenheit von Sauerstoff auf der Titanoberfläche ausbildende Oxidschicht. Sie besitzt in Abhängigkeit von der Oberflächenbearbeitung, der Rauigkeit und dem Sterilisationsverfahren nach einer Sekunde eine Dicke von 20 bis 100 Å [10]. Obwohl diese Passivierungsschicht für eine hohe Korrosionsfestigkeit sorgt, ist die minimale Abgabe von Titanionen in vitro und in vivo in das umliegende Gewebe und auch systemisch nachgewiesen worden. Die biologische Bedeutung der Titanionen im Organismus, die chemische Bindung in den Geweben und die Langzeitwirkung bedürfen jedoch weiterer Untersuchungen. Die weltweit klinischen Erfahrungen zeigen, dass Titanionen die Knochenanlagerung lokal wahrscheinlich nicht beeinträchtigen [91-93].

3.8.3 Implantatdesign

Das Implantatdesign beschreibt die dreidimensionale Struktur eines Implantates und besitzt eine große Variabilität. Charakteristika sind die äußere Implantatform, die Art der Verbindung zwischen Implantat und Abutment, die Oberflächenmakrostruktur, das Vorhandensein oder Fehlen und die Form eines Gewindes sowie zusätzliche Makroirregularitäten [82, 86]. Das Implantatdesign beeinflusst die Kraftübertragung

auf den Knochen [82, 94]. Die übertragenen mechanischen Reize bestimmen während der Einheilungs- und Belastungsphase die Zellantwort, Zelldifferenzierung und das Remodelling des Knochengewebes und die periimplantäre Weichgewebsformation [81]. Aufgrund des Designs können unterschiedliche Einteilungen der Implantate vorgenommen werden. Nach der Anzahl der Implantatteile wird in einteilige oder zweiteilige Implantate unterschieden, was unterschiedliche chirurgische Vorgehensweisen bei der Implantatinsertion und verschiedene Einheilungsmodi mit sich bringt. Die Art der Verbindungsstelle zwischen dem Implantat und dem Abutment bei zweiteiligen Implantaten kann extern oder intern liegen. Dabei werden ein Mikropalt zwischen Implantat und Abutment und dadurch auftretende Mikrobewegungen und Scheerspannungen im koronalen Knochen-Implantat-Kontaktbereich diskutiert [95-97]. Bei der äußeren Form werden parallelwandige, konische und kombiniert parallel-konische (beispielsweise das „conical seal design“ bei Astra Implantaten) rotationssymmetrische Implantate unterschieden. Das apicale Ende kann abgeflacht, rund oder spitz sein [98]. Es gibt Implantate ohne und mit Gewinde, wobei das Gewinde unterschiedlicher Gestalt sein kann. Das Vorhandensein von Schraubenwindungen maximiert den initialen Knochenkontakt, verbessert somit die Primärstabilität und führt zu einer Oberflächenvergrößerung in Abhängigkeit von der Gewindeanzahl und -tiefe [99]. Dies spielt beispielsweise, nach Meinung Steigengas et al. 2003 eine Rolle bei der Implantatinsertion in Typ IV Knochen [98]. Durch unterschiedliche geometrische Gewindeparameter kann außerdem die biomechanische Belastungsverteilung zwischen Knochen und Implantat beeinflusst werden und eine Umwandlung der für den Knochen nachteiligen Scheerkräfte in Druckkräfte stattfinden, denen der periimplantäre Knochen besser Stand halten kann [98, 100]. Die bereits erwähnte Form der Blattimplantate ist heute obsolet.

3.8.4 Implantatoberflächen

Die Art und Qualität der Implantatoberfläche ist einer der sechs Faktoren, der nach Albrektsson et al. die periimplantäre Heilung und damit die Osseointegration des Implantates bestimmt [62]. Die Oberfläche wird durch das Zusammenspiel all ihrer mikromechanischen, topographischen und physikochemischen Eigenschaften charakterisiert [101]. Um die Einheilung und knöcherne Verankerung des Implantates

zu verbessern, können die Oberflächen auf verschiedene Arten modifiziert werden [60]. Dabei können, wie in Tabelle 5 aufgeführt, subtraktive, additive und kombinierte Konditionierungsverfahren unterschieden werden.

Konditionierungsverfahren	Beispiel-oberflächen	Firma
<u>subtraktiv</u> Abstrahlen mit verschiedenen Partikeln unterschiedlicher Größe wie Sand, Al_2O_3 , TiO_2 Säureätzung (beispielsweise mit $\text{HCl}/\text{H}_2\text{SO}_4$)	TiOblast OsseoAttract® Osseotite®	Astra Tech Wieland Biomet 3i
<u>Kombination verschiedener subtraktiver Verfahren</u> sandgestrahlt + säuregeätzt sandgestrahlt + säuregeätzt + hydroxyliert gestrahlt + geätzt	SLA SLActive Promote®	Straumann Straumann Camlog
<u>additiv</u> Titanplasmabeschichtung	TPS	Camlog (Cylinder-Line)
<u>Kombination von subtraktiven+additiven Verfahren</u> säuregeätzt + CaP beschichtet TiO_2 -gestrahlt + fluoridmodifiziert gestrahlt + HA beschichtet elektrochemische Verfahren zur Verdickung der natürlichen Titanoxidschicht	NanoTite™ OsseoSpeed™ TiUnite™	Biomet 3i Astra Tech BioHorizons Nobel Biocare

Tabelle 5: Beispiele für Oberflächenkonditionierungen

In den nachfolgenden Abbildungen sind Beispiele rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen einer mikrorauen säuregeätzten Oberfläche eines WI.TAL®-Implantates (Abbildung 1) und im Gegensatz dazu einer glatten maschinieren Oberfläche (Abbildung 2) gegenübergestellt.

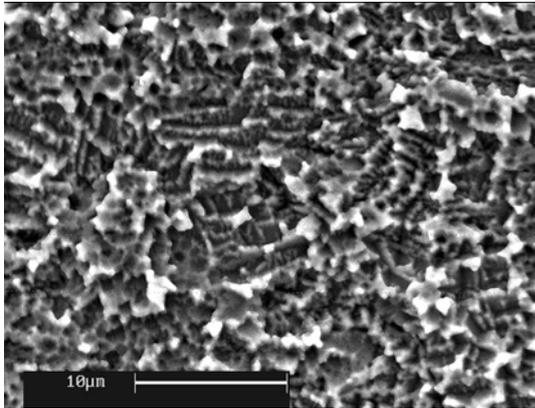


Abbildung 1: mikrorauere säuregeätzte Oberfläche (WI.TAL®-Implantat)

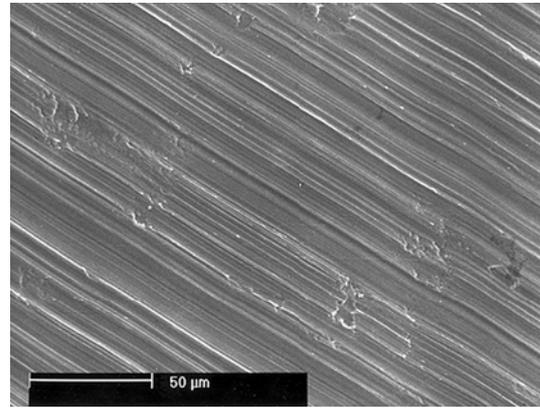


Abbildung 2: glatte maschinieren Oberfläche [102]

Die Beschaffenheit der Oberflächenmikrostruktur beeinflusst, wie bereits beschrieben, die Benetzbarkeit der Oberfläche, die Proteinbindung und damit verschiedene Aspekte des zellulären Verhaltens sowohl im umliegenden Knochen als auch im Weichgewebe. Dies sind beispielsweise die Migration, Adhäsion, Proliferation, Differenzierung, Morphologie und Orientierung von Zellen [57, 58, 103-105]. Auf glatten Oberflächen konnte eine signifikant höhere Anlagerung und Proliferation humaner Fibroblasten gezeigt werden, was ausschlaggebend für die cervicale Weichgewebsheilung ist, wohingegen raue Oberflächen die Knochenanlagerung aktiv unterstützen sollen [106]. Sie bewirken eine Vergrößerung der Implantatoberfläche und können in Abhängigkeit von der Mikrotopographie die Protein- und Zelladhäsion verbessern [58]. Weiterhin zeigen sich bei rauen Oberflächen eine vermehrte Knochenappositionsrate und eine verbesserte biomechanische Interaktion bei der Kraftübertragung auf den periimplantären Knochen im Vergleich zu glatten Oberflächen [60]. Mit in vitro Untersuchungen zeigten Schwartz et al. 1997 eine gesteigerte Produktion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen an rauen Oberflächen [61]. Bereits 1975 postulierte Mühlemann, dass die ideale Implantatoberfläche rau sein müsse [107]. In den letzten Jahrzehnten

widmeten sich etliche Studien dem Vergleich und der Untersuchung unterschiedlicher Oberflächenbeschaffenheiten. Thomas und Cook führten 1985 Experimente an Hunden durch, bei denen zwölf Implantattypen unterschiedlicher Materialien, Elastizitätsmodule und Oberflächentexturen auf das Osseointegrationsverhalten biomechanisch und histologisch untersucht wurden. Dabei stellten sie lediglich signifikante Auswirkungen der Oberflächenrauigkeit auf die Festigkeit des Knochen-Implantat-Verbundes fest, wobei raue Oberflächen zu einem knöchernen Verbund und glatte zu einer fibrösen Einkapselung des Implantates führten [108]. In zahlreichen tierexperimentellen Studien wurde ein signifikant größerer prozentualer Knochen-Implantat-Kontakt und erhöhte Ausdrehmomente für raue Oberflächen festgestellt [68, 69, 78, 109-111]. Auch klinische Untersuchungen postulieren den scheinbaren Vorteil moderat rauer Oberflächen, mit einem Rauigkeitswert von 1,0 bis 2,0 μm gegenüber einer glatteren und raueren Mikrostruktur im Hinblick auf die Osseointegration [112]. Jedoch sind laut Albrektsson und Wennerberg die Unterschiede sehr klein und oft nicht signifikant. Des Weiteren fehlen häufig klinische Langzeitergebnisse [101, 113]. Zu diskutieren sind mögliche Partikelabspaltungen und -ablagerungen bei additiven Verfahren, was für einige Autoren den Schluss zulässt, subtraktive Oberflächenkonditionierungen vorzuziehen [88, 92]. Neue Perspektiven ergeben sich möglicherweise mit der Entwicklung so genannter bioaktiver Implantate, deren Oberflächen mit Wachstumsfaktoren modifiziert sein können, um die Knochenanlagerung nicht nur zu verbessern, sondern auch zu beschleunigen [21, 114].

3.9 Untersuchung der Implantateinheilung

Um die Qualität und Quantität der knöchernen Verankerung eines Implantates zu untersuchen und verschiedene Systeme miteinander vergleichen zu können, gibt es unterschiedliche Verfahren [55, 82, 98]. Die am häufigsten angewandten Methoden sind sowohl radiologische und histologische Untersuchungen als auch biomechanische Tests. Dazu gehören beispielsweise der Push-Out- und Pull-Out-Test, der vorzugsweise bei Zylinderimplantaten ohne Gewinde angewandt wird sowie der Lösungsdrehmoment-Test für Schraubenimplantate. Des Weiteren steht der Periotest zur Verfügung, welcher Mikrobewegungen an eingehheilten Implantaten misst und damit einen Rückschluss auf die Osseointegration erlaubt. Die nach

Brånemark definierte Osseointegration kann laut Albrektsson ausschließlich histologisch nachgewiesen werden [5]. Daher bedient sich die vorliegende Studie bestimmter histologischer Untersuchungsmethoden, die nachfolgend genauer dargestellt werden.

3.9.1 Lichtmikroskopische Untersuchung

Bei der Lichtmikroskopie werden gefärbte Proben im Durchlicht betrachtet, wobei Lichtquellen verwendet werden, die Licht des für das menschliche Auge sichtbaren Wellenlängenbereiches (380-760nm) ausstrahlen. Die optischen Komponenten des Mikroskops bestehen aus drei Linsensystemen, dem Kondensor, dem Objektiv und dem Okular. Der Kondensor sammelt und fokussiert das ausgestrahlte Licht zu einem Lichtkegel mit dem das zu beobachtende Objekt durchleuchtet wird. Das Objektbild wird durch die Linsen des Objektivs vergrößert und in Richtung der Okularlinsen projiziert. Diese vergrößern das Bild zusätzlich und projizieren es auf die Netzhaut des Betrachters oder auf einen Film. Somit errechnet sich die Gesamtvergrößerung aus der multiplizierten Vergrößerungsleistung von Objektiv- und Okularlinsen [32]. Von der Qualität der Objektivlinsen hängen außerdem das Auflösungsvermögen und damit die Qualität des mikroskopischen Bildes ab. Um die meist farblosen Gewebekomponenten unterscheiden zu können, wurden verschiedene Färbemethoden entwickelt. Diese beruhen darauf, dass bestimmte Gewebestrukturen eine Affinität zu bestimmten Farbstoffen besitzen. Beispielsweise gehen saure oder basische Farbstoffe Ionenbindungen mit unterschiedlichen Gewebeanteilen ein, in Abhängigkeit von deren Azidophilie oder Basophilie.

3.9.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung

3.9.2.1 *Polyfluorochrome Sequenzmarkierung*

Es gibt Stoffe mit einer besonderen Eigenschaft, der Photolumineszenz, die bei Zufuhr von Energie in Form von ultraviolettem Licht, dieses absorbieren und es in einem für das menschliche Auge sichtbaren Wellenlängenbereich wieder abstrahlen beziehungsweise emittieren. Man spricht von Fluoreszenz, wenn die Leuchterscheinung nach Beendigung der anregenden Strahlung aufhört. Knochen

und auch andere organische und anorganische Strukturen zeigen von Natur aus eine gewisse Eigen- oder Primärfluoreszenz. Bei der polyfluorochromen Sequenzmarkierung werden dem Knochengewebe zu unterschiedlichen Zeitpunkten verschiedene fluoreszierende Substanzen, so genannte Fluorochrome angelagert, was zu Sekundärfluoreszenzen führt. Diese lassen sich mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops darstellen [115]. Anhand der Anordnung der Markierungen werden der zeitliche und örtliche Ablauf von Wachstum, Umbau und Heilung des Knochens identifizierbar [116, 117]. Die Affinität der Fluorochrome zum Knochengewebe erklärt sich aus der Bildung von Calcium-Fluorochrom-Chelaten und somit aus der festen Bindung an das Hydroxylapatit in der Mineralisationsphase der Knochenneubildung. Dadurch wird die Mineralisationsfront zum Zeitpunkt der Fluorochromgabe sichtbar. Schon 1599 wurde festgestellt, dass sich neu bildender Knochen mit Alizarin, dem Hauptfarbstoff der Krappwurzel anfärben lässt. Die ersten beschriebenen Knochenfluorochrome waren Porphyrine. 1958 entdeckten Milch et al., dass sich Tetrazykline in verkalkendem Knochen ablagern und im ultravioletten Licht als gelbe Farbbänder sichtbar werden [118]. Weitere Farbstoffe kamen durch Rahn und Perren hinzu. Sie führten das sich orange darstellende Xylenolorange und den roten Alizarinkomplex ein [119]. Das von Suzuki und Mathews entdeckte Calcein zeigt eine leuchtend grüne Bande [120]. Bei der Auswahl der Fluorochrome lassen sich verschiedene Anforderungen stellen. So muss der Einfluss auf den Knochenmetabolismus möglichst gering und die Substanz allgemein gut verträglich sein. Die dargestellte Fluoreszenz des einen Farbstoffes soll scharf begrenzt und von den anderen Bändern deutlich zu unterscheiden sein. Der Farbstoff darf durch die Aufbereitung der Proben für die histologische Untersuchung und die Anregung mit ultraviolettem Licht nicht beeinträchtigt werden. Studien von Rahn et al. belegen, dass sich die Dreifachmarkierung mit Alizarinrot, Calceingrün und Xylenolorange zur polyfluorochromen Sequenzmarkierung unter Berücksichtigung der genannten Anforderungen gut eignet [117, 119, 121, 122].

3.9.2.2 Das Fluoreszenzmikroskop

In den polyfluorochrom markierten Schläfen absorbiert jeder Farbstoff, abhängig vom inneren Molekulaufbau, nur einen für sich spezifischen schmalen Spektralbereich der Erregungsstrahlung. Die dazu benutzte Lichtquelle ist eine

Quecksilberhöchstdrucklampe, die sehr helles Licht mit einem hohen UV-Anteil ausstrahlt. Mit einem wählbaren Anregungsfilter wird aus diesem Licht der entsprechende Wellenlängenbereich ausgewählt, der das Objekt beleuchtet und zur gewünschten Fluoreszenz anregen soll. Das kurzwellige Anregungslicht wird von einem Strahlenteiler fast verlustfrei reflektiert und trifft über das Objektiv auf das Präparat. Das somit indirekt beleuchtete Objekt emittiert für den Betrachter sichtbares langwelligeres, für den jeweiligen Farbstoff spezifisches Licht. Diese entstehende Emissionsstrahlung kann den Strahlenteiler aufgrund der größeren Wellenlänge passieren. Oberhalb des Strahlenteilers treffen nun das Emissionslicht und der Rest des Anregungslichtes auf den Sperrfilter, der die für das menschliche Auge schädlichen UV-Lichtanteile herausfiltert. Danach entsteht das eigentliche Bild, das durch die Okularlinsen auf die Netzhaut des Betrachters projiziert wird [32, 121].

4 Fragestellungen

In der vorliegenden Untersuchung wurden histologische und histomorphometrische Methoden angewandt, um die Osseointegration des WI.TAL®-Implantatsystems am Schweinekiefer auszuwerten. Dabei galt es, folgende Fragen zu beantworten:

- 1a. Wie groß ist der Knochen-Implantat-Kontakt (BIC) an säuregeätzten rauen WI.TAL®-Implantaten?
- 1b. Gibt es Unterschiede bezüglich des Knochen-Implantat-Kontaktes zwischen Ober- und Unterkiefer oder zwischen den einzelnen Implantatabschnitten?
- 2a. Wie hoch ist die Knochenneubildungsrate (KNR) an WI.TAL®-Implantaten?
- 2b. Gibt es Unterschiede bezüglich der Knochenneubildungsrate zwischen Ober- und Unterkiefer oder innerhalb der unterschiedlichen Zeiträume in Bezug auf die einzelnen Implantatabschnitte?
3. Welche Aussagen lassen sich anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zum Zeitpunkt und zur Richtung der Knochenneubildung während der Osseointegrationsphase der Implantate machen?

5 Material und Methode

Bevor die im Folgenden beschriebenen wissenschaftlichen Untersuchungen durchgeführt werden konnten, musste, nach Paragraph 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes, ein Antrag auf Genehmigung eines Versuchsvorhabens gestellt und bewilligt werden. Dieses Projekt lief unter der Registrierung G 0403/05 beim Landesamt für Gesundheit und Soziales in 10707 Berlin.

5.1 Versuchstiere

5.1.1 Historie und Auswahlkriterien

Die Auswahl der Versuchstiere ist für die Ergebnisse klinischer Studien von entscheidender Bedeutung. Bei den ausgewählten Tieren handelte es sich um fünf gesunde, etwa zweijährige, weibliche Minischweine mit einem mittleren Körpergewicht von 32,2 kg. Diese als Göttinger Minipigs®¹ bezeichnete Rasse wird seit den sechziger Jahren an der Universität zu Göttingen gezüchtet. Ursprünglich stammen sie von einer Kreuzung des „Minnesota Minipig“ und des vietnamesischen Hängebauchschweines ab [123]. Die aus dieser Vereinigung hervorgegangenen Tiere wurden mit einer deutschen Landrasse rückgekreuzt, wobei der entstandene Nachwuchs aufgrund der Dominanz des weißen Phänotyps der deutschen Landrasse als „white line“ des Göttinger Minipigs bezeichnet wird. Die bei der Züchtung bedeutenden Rassemerkmale sind neben dem Körpergewicht die Anzahl und Qualität der Ohrvenen und das Temperament. Neben den schon beschriebenen Ähnlichkeiten in der Knochenphysiologie erweisen sie sich aufgrund des komplikationslosen postoperativen Heilungsvermögens und einer hohen Indolenz nach chirurgischen Eingriffen für diese wissenschaftliche Untersuchung als sehr geeignet [124]. Auch die unkomplizierte Haltung und die fehlende Automutilation sprechen für die Auswahl des Minischweines.

¹ Ellegaard Göttingen Minipigs ApS, Dalmose, Denmark

5.1.2 Haltung und Ernährung

Die Unterbringung, die operativen Eingriffe und Untersuchungen der Minipigs fanden im Biomedizinischen Forschungsinstitut der Charité, Campus Virchow Klinikum, Berlin (Genehmigungsnummer: ZH 76) unter der Leitung von PD Dr. Große-Siestrup statt. Die Tierärztin Dr. Rühle übernahm die Hauptverantwortlichkeit. Das Tierpflegepersonal garantierte eine ganztägige Fürsorge. Die Operationen wurden von der erfahrenen Implantologin Frau PD Dr. Nelson, Abteilung für Implantologie und Spezialprothetik, durchgeführt. Die fünf Minipigs wurden in einem gefliesten 4x6 m großen Gehege bei einer Raumtemperatur von 20 °C gehalten. Die Ernährung beinhaltete Wasser, vitaminreiches Mischfutter als Pellet² und Stroh. Am Tag der Operation bekamen die Tiere präoperativ und vier Stunden post operationem kein Futter, jedoch Wasser ad libitum. Des Weiteren wurden vier Wochen nach der Implantatinsertion kein Stroh, sondern nur eingeweichte Pellet gefüttert, welche die Minischweine bereits auch präoperativ zur Gewöhnung erhielten.

5.1.3 Gruppeneinteilung

Die für die Untersuchung des Implantatsystems ausgewählten fünf Tiere wurden durch Ohrmarken mit den Nummern 12, 22, 24, 25, 26 identifizierbar. Insgesamt wurden 15 Implantate inseriert, wobei die Schweine Nr. 12 und 25 vier Implantate, Nr. 24 drei Implantate und die Schweine Nr. 22 und 26 zwei Implantate jeweils in die Region des ersten Molaren gesetzt bekamen. Die Implantation erfolgte abhängig vom Knochenangebot in den jeweiligen Implantationsregionen. Da nur in vollständig ossifizierte Kieferbereiche implantiert wurde, resultierte daraus eine unterschiedliche Anzahl von Implantaten je Schwein. Die Positionierung der Implantate ist der Tabelle 6 zu entnehmen.

² ssniff Mpig-H, ssniff Spezialitäten GmbH, 59494 Soest

Nummer der Schweine	Implantatregion
12	Oberkiefer links Oberkiefer rechts Unterkiefer links Unterkiefer rechts
22	Oberkiefer links Oberkiefer rechts
24	Oberkiefer rechts Unterkiefer links Unterkiefer rechts
25	Oberkiefer links Oberkiefer rechts Unterkiefer links Unterkiefer rechts
26	Oberkiefer rechts Unterkiefer links

Tabelle 6: Gruppeneinteilung und Implantationsregionen

5.2 Implantatsystem

Bei dem untersuchten System handelte es sich um das WI.TAL®-Implantatsystem der Firma Wieland³. Der Implantatkörper ist ein selbst schneidendes, parallelwandiges Schraubenimplantat mit einer für alle Implantatdurchmesser gleichen Innenverbindung. Es besteht aus Titan Grad 4, was nach Aussagen der Firma Wieland chemisch neben mehr als 99% Titan geringe Mengen an elementarem Sauerstoff (max. 0,4 %), Kohlenstoff (max. 0,1 %), Stickstoff (max. 0,05 %), Wasserstoff (max. 0,0125 %) und Eisen (max. 0,3 %) enthält. Des Weiteren machte der Hersteller Angaben zu den physikalischen Eigenschaften des Titans, zur Anfertigung und Oberflächenbearbeitung der Implantate. Die physikalischen Eigenschaften zeichnen sich durch eine Festigkeit von 680 MPa, eine Dehnung von 10 % und ein Elastizitätsmodul von 110 GPa aus. Bei der Implantatherstellung wird ein Stangenmaterial mit Schleifkörpern auf einem Langdrehautomat gedreht und in die entsprechende Form gebracht. Nach dem Bearbeiten ist das Implantat relativ glatt. Die Oberfläche der WI.TAL®-Implantate

³ Wieland Dental Implants GmbH, Wiernsheim

wird als OsseoAttract®-Oberfläche bezeichnet. Sie ist säuregeätzt und reicht bis zur Implantatplattform. Die genauen Rauigkeitswerte und die Zusammensetzung der verwendeten Säure gab die Firma Wieland nicht bekannt. In dieser Untersuchung wurden 15 Implantate mit einem Durchmesser von 3,5 mm und einer Länge von 9 mm inseriert.

5.3 Versuchsaufbau

Der Versuch gliederte sich in vier Einzelschritte:

- beidseitige Entfernung der ersten Molaren im Ober- und Unterkiefer
- Implantatinsertion acht Wochen post extractionem
- Impfung der Minischweine mit den Fluorochromfarbstoffen: Xylenorange zwei Wochen, Calceingrün fünf und Alizarinrot acht Wochen post implantationem
- Tötung und Sektion der Tiere zwölf Wochen post implantationem

5.3.1 Operationsverfahren

Sowohl die Zahnextraktionen als auch die Implantationen erfolgten nach demselben Sedations- und Narkoseprotokoll. Die präoperative Antibiose fand sowohl vor der Zahnentfernung als auch vor der Implantation statt.

5.3.1.1 Präoperative Behandlung

Die antibiotische Vorbehandlung begann 24 Stunden prae operationem mit der intramuskulären Gabe von Baytryl®⁴. Diese 10 %ige Injektionslösung wurde in einer Dosierung von 0,25 ml/10 kg Körpergewicht appliziert.

⁴ Firma Bayer

5.3.1.2 Sedierung

Jedes Tier bekam zwischen 0,5 und 0,8 ml Atropin 1 % und gewichtsabhängig Ketamin 10 %, Xylazin 2 % und 3 ml des Neuroleptikums Stresnil^{TM5} i.m. gespritzt. Atropin hebt als Anticholinergikum die durch Xylazin verursachte verminderte Herzmuskelerregbarkeit auf. Neben der Erhöhung der Herzfrequenz führt Atropin zu einer Speichelreduktion und wirkt bronchodilatatorisch, was insgesamt vorteilhaft für die Narkoseeinleitung ist. Ketamin wirkt hypnotisch, analgetisch und führt zu einer motorischen Starre (Katalepsie). Deshalb wird es vor Operationen in Kombination mit Xylazin verabreicht, welches eine muskelrelaxierende Eigenschaft besitzt. Xylazin wirkt ebenfalls sedativ und speziesabhängig analgetisch. Stresnil, als spezielles Neuroleptikum für Schweine führt zur Sedation und wird prophylaktisch und therapeutisch gegen Stress eingesetzt. Es führt ebenfalls in der Peripherie zu einer Gefäßerweiterung. Für die weitere intravenöse Applikation der Medikamente wurde den Tieren eine Flexüle in eine Ohrvene gelegt. Danach erfolgte die Intubation.

5.3.1.3 Narkose

In Abhängigkeit von der Sedierungstiefe wurden gegebenenfalls 2-4 mg Propofol 2 % i.v. zur Narkoseeinleitung verabreicht. Mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran-Baxter⁶ 1,5 % wurde die Narkose aufrechterhalten. Da dieses zwar eine gute hypnotische und muskelrelaxierende, jedoch nur schwach analgetische Wirkung hat, wurden zur Schmerzprophylaxe intraoperativ halbstündlich 0,1 mg Fentanyl®-Jansson⁷ intravenös verabreicht. Als Volumenersatz wurden während des Eingriffs Jonosteril⁸ ad 1,5 l und HAES-steril⁸ 6 % ad 0,5 l infundiert. Um im Operationsgebiet eine Blutarmut und damit eine gute Übersicht zu gewährleisten, erhielten die Tiere zusätzlich eine vestibuläre und orale Lokalanästhesie mit 5 ml Ultracain⁹ 4 % mit einem Adrenalinzusatz von 1:100.000.

⁵ Janssen Cilag GmbH, Neuss, Germany

⁶ Baxter AG

⁷ Janssen - Cilag, Neuss, Germany

⁸ Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Germany

⁹ Sanofi - Aventis

5.3.1.4 Zahnentfernung

Im ersten operativen Eingriff wurden die ersten Molaren mit der Zange luxiert und extrahiert. Brach dabei die Krone ab, erfolgte die operative Entfernung durch Osteotomie.

5.3.1.5 Implantation

Acht Wochen post extractionem fand die Implantation statt. Die Schleimhaut war bei allen Tieren ohne sichtbare Veränderung verheilt. Nach einer crestalen Schnittführung in der Region des ersten Molaren wurde ein Muko-Periost-Lappen präpariert. Bei der Überprüfung der anatomischen Gegebenheiten war in den meisten Fällen eine vollständige Knochenregeneration zu erkennen. In Regionen mit einer für die Implantation nicht optimalen Ossifikation der Alveolen wurden keine Implantate inseriert. Die Implantatbettaufrbereitung und Implantatinsertion erfolgten gemäß dem Protokoll des Herstellers. Alle folgenden Bohrungen wurden unter ständiger Kühlung mit steriler, physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt. Dabei lagen die empfohlenen Drehzahlen zwischen 400 und 1500 U/min in Abhängigkeit von dem Bohrerdurchmesser, der Knochendichte und sonstigen lokalen Faktoren mit dem Ziel, stets eine Knochenschädigung zu vermeiden. Nach Ankörnung des Alveolarfortsatzes mit einer kleinen Kugelfräse zur Markierung der genauen Implantatposition wurde eine Pilotbohrung vorgenommen, welche die geplante Implantatachse und -länge vorgab. Der dafür benutzte Pilotbohrer hatte einen Durchmesser von 2 mm und Markierungen zur Bestimmung der Bohrlochtiefe. Mit dem Formbohrer wurde danach das Implantatbett bis zum gewünschten Durchmesser von 3,5 mm und der entsprechenden Länge von 9 mm präpariert. Das Implantat wurde mit Hilfe der Drehmomentratsche und einem Drehmoment von maximal 40 Ncm primärstabil eingebracht. Die empfohlene Einbringtiefe wurde dabei berücksichtigt, was eine epicrestale Lage der Implantatplattform bedeutete. Nach Reposition des Muko-Periost-Lappens wurden die Wundränder adaptiert und speicheldicht durch mehrere Einzelknopfnähte mit resorbierbarem Nahtmaterial (Monocryl 3-0) gesichert. Angestrebt wurde eine subgingivale Einheilung der Implantate ohne Belastung.

5.3.2 Postoperative Phase

5.3.2.1 Antibiose und Analgesie

Als postoperative Antibiose wurde den Tieren drei Wochen lang kombinierend 0,25 ml/10 kg Körpergewicht Baytril® und 3 ml Borgal®¹⁰ einmal täglich i.m. injiziert. Zur Analgesie wurde Caprofen in Form von 2,5 ml Rimadyl®¹¹ ebenfalls einmal täglich i.m. verabreicht, welches neben der schmerzlindernden auch eine fiebersenkende und entzündungshemmende Wirkung hat.

5.3.2.2 Verlaufskontrollen

In der ersten postoperativen Woche wurden die Versuchstiere täglich einmal nach Befinden, Fressverhalten, Körpertemperatur und Gewicht untersucht und im weiteren Verlauf einmal wöchentlich daraufhin kontrolliert. Das Schwein mit der Nummer 12 erlitt eine Pneumonie, was zu einem verschlechterten Allgemeinbefinden führte und eine zusätzliche Antibiose mit Gentamycin-Ratiopharm¹² 40 (1 ml 2x täglich i.m.) und Amoxidura plus¹³ 500/125 mg (1 Tablette 2x täglich) für zehn Tage notwendig machte. Die anderen Tiere verhielten sich unauffällig. Der Wundheilungsverlauf wurde in Sedierung zwei, drei, fünf und acht Wochen post operationem klinisch beurteilt. Wie in Tabelle 7 dargestellt, konnten an 9 von 15 Implantaten Nahtdehiszenzen bis zum Zeitpunkt der Probeentnahme beobachtet werden.

¹⁰ Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Germany

¹¹ Pfizer GmbH, Karlsruhe, Germany

¹² Ratiopharm GmbH, Germany

¹³ Merck dura GmbH, Germany

Nummer der Schweine	Region des Implantates	Dehiszenzen
12	Oberkiefer links	ja
	Oberkiefer rechts	ja
	Unterkiefer links	ja
	Unterkiefer rechts	ja
22	Oberkiefer links	nein
	Oberkiefer rechts	nein
24	Oberkiefer rechts	ja
	Unterkiefer links	nein
	Unterkiefer rechts	nein
25	Oberkiefer links	nein
	Oberkiefer rechts	nein
	Unterkiefer links	ja
	Unterkiefer rechts	ja
26	Oberkiefer rechts	ja
	Unterkiefer links	ja

Tabelle 7: Verteilung der aufgetretenen Dehiszenzen

5.3.2.3 Fluorochrommarkierung

Um die polyfluorochrome Sequenzmarkierung für die dynamische Analyse der Knochenanbau- und Umbauvorgänge durchführen zu können, wurden die Tiere wie oben beschrieben sediert. Entsprechend der von Rahn et al. 1976 empfohlenen Dreifachmarkierung wurden nach zwei Wochen post operationem 90 mg/kg Körpergewicht Xylenolorange¹⁴, nach fünf Wochen post operationem 20 mg/kg Körpergewicht Calceingrün¹⁵ und nach acht Wochen post operationem 30 mg/kg Körpergewicht Alizarinrot¹⁶ jeweils i.v. in die Ohrvenen injiziert [116].

5.3.3 Tötung und Sektion

Die Tötung der Minipigs fand zwölf Wochen post implantationem statt. Dazu wurden die Tiere mit 2 g Trapanal¹⁷ i.v. narkotisiert und mit 4 mg Pancuronium¹⁸ i.v.

¹⁴ Xylenolorange Tetrasodium Salz, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze, Germany

¹⁵ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze, Germany

¹⁶ Alizarin-3-methylamin-N,N-diessigsäure-Dihydrat, Merck KGaA, Darmstadt, Germany

¹⁷ Byck-Gulden, Konstanz, Germany

muskelrelaxiert. Die schnelle Tötung erfolgte mit 60 mval einer ebenfalls intravenös verabreichten 7,45 %igen Kaliumchloridlösung. Die Sicherung des Todes erfolgte durch Auskultation des Herzens. Im Anschluss daran wurden die Knochenfragmente mit dem jeweiligen Implantat entnommen. Bei der Probeentnahme wurde darauf geachtet, den Sägeschnitt im ausreichenden Abstand zum Implantat und parallel zu dessen Achse durchzuführen.

5.4 Aufbereitung der Proben

5.4.1 Fixierung und Kunststoffeinfbettung

Mit Hilfe abgestimmter Fixierungs-, Entwässerungs- und Einbettverfahren ließen sich die zuvor entnommenen Biopsate für die Trenn-Dünnschliff-Technik nach Donath vorbereiten [125]. Zur Fixierung wurden die Proben circa zwei Wochen in einer isotonen neutralen Formaldehyd-Alkohollösung nach Burkhardt gelagert und anschließend in aufsteigender Reihe mit Ethanol dehydriert [126]. Abschließend wurden sie für vier Stunden in reinem Xylol entfettet. Vor der Polymerisation wurden die Proben mit einer Polymethylmetacrylatlösung (PMMA) infiltriert. Dabei fand die Präinfiltration für vier Stunden und die Infiltration für eine Woche statt. Der verwendete Kunststoff hieß „Technovit®¹⁹ 9100 Neu“. Er besteht aus drei Komponenten und enthält 94 % Methylmetacrylat als Basislösung, 5 % Weichmacher und 1 % Aktivator. Vor dem Ansetzen der Lösungsgemische lief er zur Entstabilisierung durch eine Chromatographiesäule mit 50 g Aluminiumoxid. Je nach Präinfiltrations-, Infiltrations- und Polymerisationsvorgang wurde eine entsprechende Menge an Härter hinzugefügt. Zur Polymerisation wurden die Proben in kleine Plastikzylinder eingebettet und mindestens fünf Tage im Kühlschrank bei vorgeschriebenen -8 °C bis -20 °C langsam ausgehärtet. Dies erfolgte, um Schrumpfungartefakte gering zu halten. Während der gesamten Aufbereitung der Proben war eine Lichtexposition so gut wie möglich zu vermeiden, da dies sonst zur Verblässung der Fluoreszenzen und damit zu einer Beeinträchtigung der

¹⁸ Delta-Select, Pfullingen, Germany

¹⁹ Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim, Germany

Auswertbarkeit geführt hätte. Dazu wurde in halb abgedunkelten Räumen gearbeitet. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten fand eine Abdeckung der Proben oder eine Lagerung unter Lichtausschluss statt.

5.4.2 Anfertigung von Dünnschliffen

Bei der angewandten Trenn-Dünnschliff-Technik nach Donath wurden die mit einer Schleifmaschine²⁰ klein getrimmten Probenblöcke mit einem Cyanoacrylatkleber auf einen Plexiglasobjektträger parallel zur Implantatachse und damit parallel zur Sägeebene aufgeklebt. Dann wurden am LEITZ-Sägemikrotom²¹, dessen Kernstück eine diamantbeschichtete Innenlochsäge ist, unter ständiger Wasserkühlung circa 150 µm dicke Längsschnitte hergestellt (siehe Abbildung 3).



Abbildung 3: Anfertigung eines Dünnschliffes mit dem LEITZ-Sägemikrotom

Mit dem Exakt-Mikro-Schleifsystem²² erfolgte durch weitere Schleif- und Poliervorgänge die für die fluoreszenzmikroskopische Auswertung notwendige Reduzierung der Schliffe auf eine Stärke zwischen 40-60 µm [125, 127]. Das dafür benutzte Schleifpapier hatte eine Körnung von 800, 1000 und 1200.

²⁰ Phoenix 3000, Jean-Wirtz GmbH & Co. KG, Düsseldorf, Germany

²¹ E. Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar, Germany

²² Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, Germany

5.4.3 Färbung der fertigen Schliffe

Nach der Auswertung der Präparate am Fluoreszenzmikroskop erfolgte die Färbung, die den nicht entplastinierten Schliffen aufgelagert wurde. Für die Färbung unentkalkter Knochenpräparate hat sich die Versilberung nach „von-Kossa“ bewährt. Bei dem seit 1901 bekannten Verfahren handelt es sich um eine heute noch spezifische Methode zur Darstellung kalzifizierter Matrix [128]. Dabei bindet sich das Silbernitrat der Färbelösung an das Calciumphosphat des mineralisierten Knochens. Durch eine Gegenfärbung mit einer Paragon-Lösung, einem Gemisch aus Toluidinblau und basischem Fuchsin, ließen sich Bindegewebe und Zellen gut darstellen. Neu gebildeter Knochen (Osteoid) erschien dunkelbraun bis schwarz, der ortsständige Knochen etwas heller. Bindegewebige Faserkomponenten färbten sich in unterschiedlichen rot-violetten Farbtönen. Das Zytoplasma der Zellen zeigte sich hellblau und deren Kerne kräftig blau-violett. Die Schliffe wurden mit aqua destillata abgetupft und anschließend für fünf bis zehn Minuten, je nach gewünschtem Schwärzungsgrad, in einer 5 %igen Silbernitratlösung gefärbt. Nach gründlichem Abspülen mit aqua destillata wurde das Silbernitrat für drei Minuten in einer Natriumcarbonat-Formaldehydlösung reduziert. Die Präparate wurden etwa zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült, darauf folgend für fünf Minuten in 5 %igem Natriumthiosulfat fixiert und wiederum zehn Minuten in Leitungswasser gewässert. Die Gegenfärbung erfolgte nun für 20 Minuten in einer circa 60 °C warmen Paragon-Lösung, einem Gemisch aus 0,8 g Toluidinblau und 0,2 g Fuchsin gelöst in 100 ml Ethanol. Nach nochmaligem Abspülen mit Leitungswasser wurden die Schliffe abschließend mit Isopropylalkohol gesäubert und entfettet.

5.5 Histologische Untersuchungen und deren Auswertung

Es wurde von jedem Implantat jeweils der repräsentativste Schliff ausgewählt und histologisch untersucht.

5.5.1 Histomorphometrie

Die Histomorphometrie umfasst histologische Auswertungsverfahren, mittels derer Gewebestrukturen vermessen und somit durch quantifizierbare Messwerte charakterisiert werden können. Die histomorphometrischen Methoden, die auf Raster- und Gesichtsfeldzählungen beruhten, wurden in den letzten Jahren zunehmend durch digitale Messprogramme ersetzt beziehungsweise ergänzt. Durch diese Entwicklung konnte die Vergleichbarkeit von Studien verbessert und der Arbeitsaufwand, insbesondere bei großen Fallzahlen, verringert werden.

Sowohl die fluoreszenz- als auch die lichtmikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte mit dem Photomikroskop „Axiophot“²³. Bei einer 10- und 20-fachen Vergrößerung wurden die gewünschten Bildausschnitte mit Hilfe der „AxioCam MRc 5“-Kamera²⁴ aufgenommen, digitalisiert und ausgewertet. Mittels des Bildanalyseprogramms „AxioVision Rel.4.6“²⁵ fand die Bearbeitung und Vermessung der Aufnahmen statt.

5.5.1.1 Lichtmikroskopische Auswertung

Die ausgewählten Schliffe wurden zur Bestimmung des Knochen-Implantat-Kontaktes (BIC) lichtmikroskopisch betrachtet und ausgewertet. Es erfolgte, wie in Abbildung 4 dargestellt, eine Einteilung der Implantatoberfläche in fünf Abschnitte. Der „cervicale“ Abschnitt reichte von der Implantatplattform bis zur ersten Windung. Als „apical“ galt der Oberflächenabschnitt um die Implantatspitze herum bis unterhalb der letzten Windung. Der zwischen „cervical“ und „apical“ liegende Bereich wurde als

²³ Okular: PI 10x/25 Br foc, verwendete Objektive: Plan–Neofluar 10x/0,30, Plan–Neofluar 20x/0,50, Carl Zeiss, Göttingen, Germany

²⁴ 5 Megapixel (2584x1936), 36 Bit RGB Farbtiefe, Sensorgröße 2/3“, Carl Zeiss, Göttingen, Germany

²⁵ Carl Zeiss, Göttingen, Germany

„mittig“ bezeichnet. Diese Einteilung erfolgte, um eventuelle Unterschiede des Knochen-Implantat-Kontaktes bezüglich einzelner Implantatabschnitte feststellen zu können. Sinnvoll erschien vor allem die gesonderte Untersuchung des cervicalen Abschnittes, da die Implantatoberfläche vom Hersteller bis an die Implantatplattform heran für eine bessere knöcherne Integration geätzt wurde. Die Messungen wurden auf beiden Seiten und damit an der gesamten Oberfläche des Implantatschliffes vorgenommen, um eine größtmögliche Datenmenge erfassen zu können. Je nach Schnittebene ließen sich bei einem 9 mm langen Implantat neun bis zehn Windungen darstellen. Bei einer 10-fachen Vergrößerung wurden entsprechend der Bildausschnittsgröße Einzelaufnahmen angefertigt. Diese wurden zu einem Übersichtsbild der gesamten Implantatregion zusammengesetzt. Die Oberfläche des Implantates wurde als Strecke vermessen. Die danach ermittelten Einzelstrecken der Knochen-Implantat-Kontaktbereiche wurden dazu ins Verhältnis gesetzt. Dieses wurde mit Hilfe des Excel-Programms nach Erfassen der Daten als „BIC“, Bone-Implant Contact, errechnet und in % angegeben.

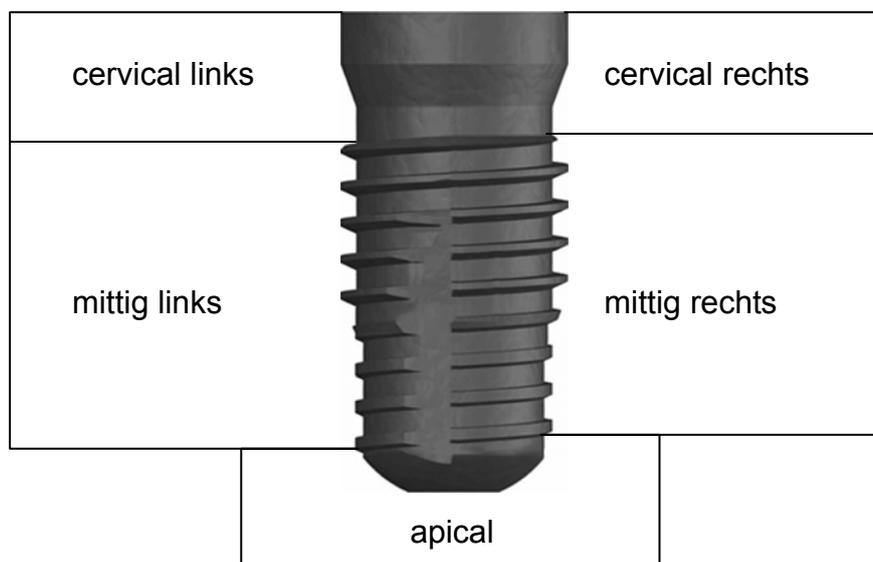


Abbildung 4: Einteilung der Implantate für die lichtmikroskopische Untersuchung in fünf Abschnitte

5.5.1.2 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Ziel der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung war die quantitative und qualitative Beurteilung der Knochenneubildung um das Implantat. Die gesamte Implantatoberfläche wurde in neun Abschnitte eingeteilt. Dabei wurde der Bereich

von der Implantatplattform bis zur ersten Windung als „cervical“ bezeichnet. Der „apicale“ Abschnitt reichte um den Apex des Implantates herum bis zur letzten Windung. Der dazwischen liegende Bereich wurde in drei Abschnitte gegliedert, die als „oben“ (einschließlich erste Windung bis zur Mitte zwischen Windung drei und vier), „mittig“ (Mitte zwischen Windung drei und vier bis Mitte zwischen Windung sechs und sieben) und „unten“ (Mitte zwischen Windung sechs und sieben bis einschließlich der letzten Windung) definiert wurden (siehe Abbildung 5). Die Messungen wurden auf beiden Seiten und damit an der gesamten Oberfläche des Implantatschliffes vorgenommen, um eine größtmögliche Datenmenge erfassen zu können. Je nach Schnittebene ließen sich bei einem 9 mm langen Implantat neun bis zehn Windungen darstellen.

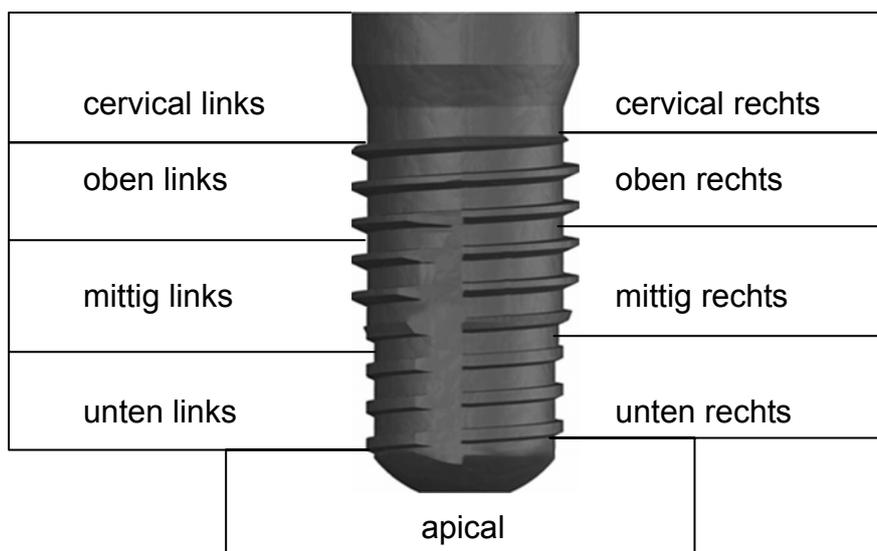


Abbildung 5: Einteilung der Implantate für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung in neun Abschnitte

Bei einer 10- und 20-fachen Vergrößerung wurden in jedem der neun Abschnitte deutliche 3-fach Fluoreszenzbanden in unmittelbarer Nähe zur Implantatoberfläche aufgesucht. Für die Calceinbande wurde der Anregungsfilter 02²⁶, für Xylenol Orange der Filter 09²⁴ und für Alizarin der Filter 14²⁴ ausgewählt. Calceingrün erschien leuchtend grün, Xylenolorange stellte sich orange und Alizarinrot leuchtend rot dar. In dem ausgewählten Ausschnitt wurden Einzelfotos von jeder Bande aufgenommen

und mit Hilfe des AxioVision Programms zu einem Bild zusammengesetzt. Dieses Verfahren wird als „mehrdimensionale Bildaufnahme“ bezeichnet. Vereinzelt war es bei sehr starker Fluoreszenz möglich, mit dem Filter 02 ein so genanntes „Livebild“ zu machen, auf dem alle drei Fluoreszenzbanden sicht- und unterscheidbar waren. Dies lag daran, dass ein Farbstoff entweder durch die farbspezifische UV-Erregungsstrahlung oder durch das Emissionslicht eines anderen Farbstoffes mit angeregt wurde. Vor der Bildaufnahme war darauf zu achten, den dem Objektiv entsprechenden Vergrößerungsfaktor im Programm auszuwählen. Die digitalen Fotos wurden im AxioVision Programm ausgewertet. Dazu wurde der Abstand zwischen den einzelnen Fluoreszenzbanden an drei Stellen pro Abschnitt gemessen. Die eigentliche Messung erfolgte durch Markierung des Anfangs- und Endpunktes der Strecke zwischen zwei Farbbanden auf dem Bildschirm. Das Bildanalyseprogramm berechnete dann den gemessenen Wert entsprechend dem gewählten Vergrößerungsfaktor und zeigte diesen in Mikrometer (μm) an (siehe Abbildung 6). Die Daten wurden abschließend mit Hilfe der Tabellenkalkulations-Software Excel²⁷ archiviert und verschlüsselt. Neben dieser quantitativen Datenerfassung ließen sich aufgrund der Anordnung der Banden zusätzlich Aussagen zur Wachstumsrichtung des neu gebildeten Knochens machen.

²⁶ Carl Zeiss, Göttingen, Germany

²⁷ Version, Microsoft Excel 2002, Microsoft Cooperation, USA

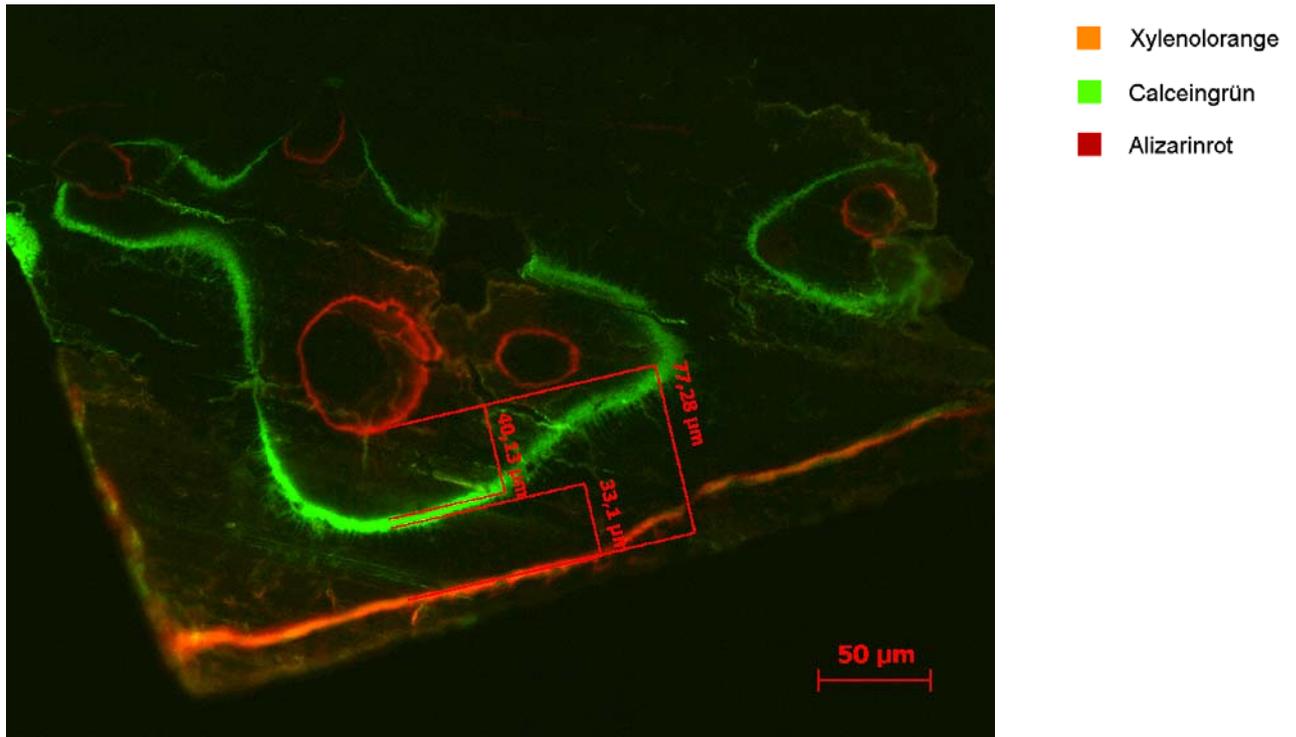


Abbildung 6: Beispiel für die Messung der Abstände zwischen den einzelnen Fluoreszenzbanden bei 20-facher Vergrößerung. Die Xylenolorange-Farbbande stellt sich orange dar und liegt in unmittelbarer Nähe zur Implantatoberfläche, gefolgt von der grünen Calcein- und der roten Alizarin-Farbbande. Die Messwerte in μm entsprechen der Knochenneubildung innerhalb des entsprechenden Zeitraumes. Das bedeutet, dass im ersten Zeitraum (einschließlich Woche 3 bis 5) $33,1 \mu\text{m}$, im zweiten Zeitraum (einschließlich Woche 6 bis 8) $40,13 \mu\text{m}$ und im Gesamtzeitraum (einschließlich Woche 3 bis 8) $77,28 \mu\text{m}$ Knochen neu gebildet wurden. Das Wachstum des neuen periimplantären Knochens fand in diesem Beispiel von der Implantatoberfläche ausgehend statt.

5.5.2 Statistische Auswertung

Die mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel archivierten und verschlüsselten Datensätze wurden in das SPSS V13.0- und SAS V9.1²⁸-Statistikprogramm importiert und entsprechend ihrer Skalierung und Verteilung deskriptiv ausgewertet und grafisch dargestellt.

Unterschiede zwischen unabhängigen Stichproben (Oberkieferimplantate versus Unterkieferimplantate; BIC [%] an Implantaten mit versus ohne Dehiszenzen) wurden mit dem **Mann-Whitney-U-Test** auf statistische Signifikanz geprüft. Unabhängig

²⁸ SPSS Inc., Chicago, IL, USA

bedeutet dabei, dass man denselben Parameter, wie zum Beispiel den Knochen-Implantat-Kontakt, an unterschiedlichen Objekten, das heißt an verschiedenen Implantaten misst. Der **Wilcoxon signed ranks-Test** wurde angewandt, um zwei abhängige, am selben Objekt gemessene Parameter auf einen signifikanten Unterschied hin zu testen. Dies trifft beispielsweise auf die Unterscheidung der Knochenneubildungsrate im ersten (2. bis 5. Woche) und zweiten (5. bis 8. Woche) Zeitraum post implantationem an ein und demselben Implantat zu. Unterschiede zwischen mehr als zwei abhängigen Stichproben wurden mit dem **Friedman-Test** überprüft. Dabei wird nach mindestens zwei sich signifikant unterscheidenden Parametern gesucht. Gibt es diese, findet man wiederum mit dem Wilcoxon-Test heraus, um welche es sich handelt. Zur Überprüfung der abhängigen und unabhängigen Stichproben in einem gemeinsamen Modell wurde eine **zweifaktorielle parameterfreie Varianzanalyse** angewandt [129]. Dabei handelt es sich um ein nicht parametrisches Verfahren longitudinaler Daten. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als signifikant betrachtet. Alle Auswertungen erfolgten im explorativen Sinne.

6 Ergebnisse

6.1 Beschreibung ausgewählter histologischer Aufnahmen

Bevor im Einzelnen auf die Ergebnisse des Knochen-Implantat-Kontaktes eingegangen wird, werden nachfolgend einige lichtmikroskopische Aufnahmen zur Veranschaulichung beschrieben. Die Abbildungen 7 und 8 zeigen Übersichtsaufnahmen zweier WI.TAL®-Implantate bei 2,5-facher Vergrößerung. Links ist ein in den Unterkiefer inseriertes Implantat mit dem höchsten BIC aller untersuchten Implantate abgebildet. Dagegen zeigt die rechte Aufnahme ein in den Oberkiefer gesetztes Implantat, welches den niedrigsten Knochen-Implantat-Kontakt aufwies. Durch die „von-Kossa“ Färbung stellt sich die Knochenstruktur braun dar, wobei neu gebildeter Knochen dunkler erscheint als der ältere Lagerknochen. Periimplantäres Weichgewebe zeigt sich aufgrund der Gegenfärbung mit der Paragon-Lösung violett.



Abbildung 7: In den Unterkiefer inseriertes Implantat bei 2,5-facher Vergrößerung. Deutlich zu erkennen sind die trabekuläre Knochenstruktur, der dunkelbraun erscheinende, zum Teil auf die Implantatplattform reichende, neue periimplantäre Knochen und im Gegensatz dazu der hellere, graubraun dargestellte Lagerknochen. Auf der Implantatplattform zeigt sich violett angefärbtes Bindegewebe.

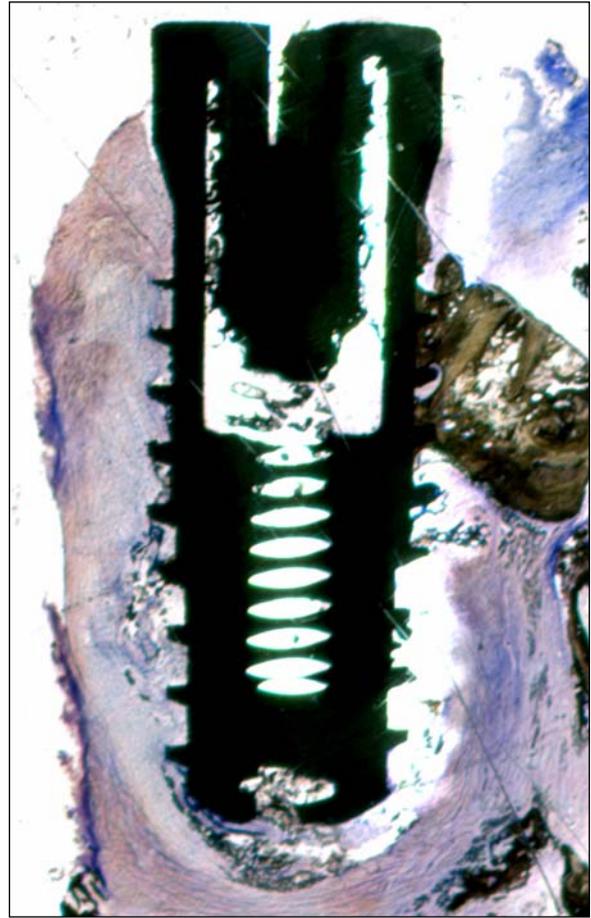


Abbildung 8: In den Oberkiefer inseriertes Implantat bei 2,5-facher Vergrößerung. Es zeigt sich eine größtenteils bindegewebige Einheilung des Implantates und nur eine kleine Knochen-Implantat-Kontakt-Zone im mittleren Bereich auf der rechten Seite.

Für die Vermessung des BIC sind Aufnahmen bei einer 10-fachen Vergrößerung erforderlich. Ein solcher Ausschnitt ist in Abbildung 9 dargestellt. Es zeigt sich deutlich der Kontakt des Knochens an der Implantatoberfläche ohne dazwischen liegendes Bindegewebe. Im unteren Bildanteil ist ein noch nicht verknöchertes hell erscheinender Bezirk zu erkennen. Auf der diesen Hohlraum begrenzenden Knochenoberfläche deutet sich hellblau ein Osteoblastensaum an. In der gebildeten Knochenmatrix sind eingemauerte spindelförmige Osteozyten sichtbar.



Abbildung 9: Detailaufnahme eines Ausschnittes des in Abbildung 7 gezeigten Implantates bei 10-facher Vergrößerung

In der nachfolgenden Abbildung 10 sind die ersten drei cervicalen Windungen (entspricht dem als „mittig“ bezeichneten Implantatabschnitt) eines in den Oberkiefer inserierten Implantates aufgenommen worden, wobei sich im obersten Abschnitt ein zellreiches Granulationsgewebe befindet. Die an das Weichgewebe angrenzende Knochenoberfläche zeigt kleine Resorptionslakunen mit mehrkernigen Riesenzellen (Osteoklasten). Der neu gebildete Knochen, der dem Implantat anliegt, ist bräunlich und besteht aus teilweise konzentrisch angeordneten Lamellen. Die dazwischen liegenden grau-braun dargestellten Bereiche zeigen Inseln des ortsständigen Lagerknochens.

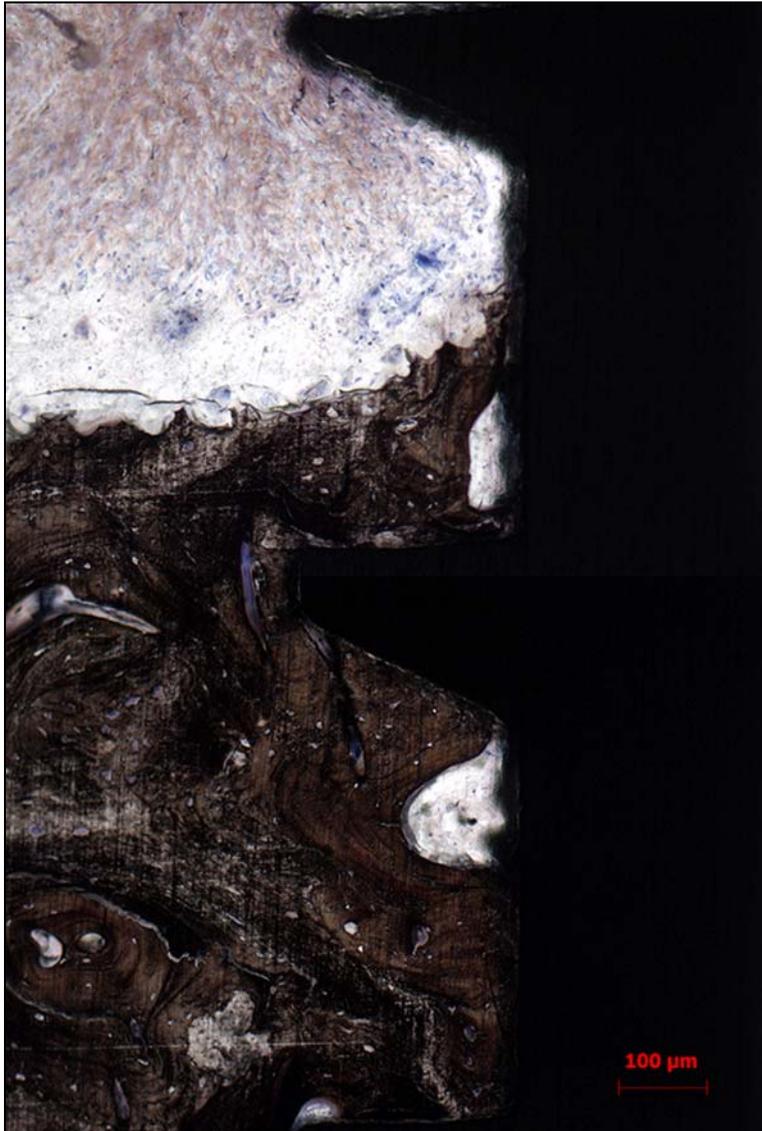


Abbildung 10: Detailaufnahme der ersten drei cervicalen Windungen eines in den Oberkiefer inserierten Implantates bei 10-facher Vergrößerung

6.2 Knochen-Implantat-Kontakt (BIC) - Ergebnisse der histomorphometrischen Analyse

Mit Hilfe des Programms AxioVision Rel.4.6²⁹ wurden die histologischen Bilder vermessen und der Knochen-Implantat-Kontakt berechnet. Die BIC-Werte bewegten sich zwischen 14,51 % und 68,97 %. Der **mittlere Knochen-Implantat-Kontakt** betrug für alle ausgewerteten Implantate zusammen **54,19 %**. Die BIC-Werte der einzelnen Implantate sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Gleichzeitig wurden die

²⁹ Carl Zeiss, Göttingen, Germany

Werte hinsichtlich der an den Implantaten aufgetretenen Dehiszenzen aufgeschlüsselt. Es ergaben sich daraus durchschnittliche BIC-Werte an Implantaten mit Dehiszenzen von 50,65 % und an Implantaten ohne Dehiszenzen von 59,5 %. Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p=0,29$). Des Weiteren wurde der cervicale Implantatabschnitt separat dargestellt, um einen eventuellen Zusammenhang zwischen Dehiszenzen und den cervicalen BIC-Werten herauszufinden. Dieser bestätigte sich jedoch nicht. Zwischen dehiszenten (41,17 %) und nicht dehiszenten (39,48 %) Implantaten unterschieden sich die cervicalen Knochen-Implantat-Kontaktraten nicht signifikant ($p=0,814$).

Nummer der Schweine	Implantatregion	Implantatnummer	BIC in % gesamtes Implantat	BIC in % cervical
12	Oberkiefer links	1	14,51	22,92
	Oberkiefer rechts	2	40,87	7,68
	Unterkiefer links	3	56,85	66,11
	Unterkiefer rechts	4	41,34	42,37
22	Oberkiefer links	5	49,82	46,75
	Oberkiefer rechts	6	68,77	55,62
24	Oberkiefer rechts	7	67,58	69,05
	Unterkiefer links	8	57,25	30,18
	Unterkiefer rechts	9	65,60	49,60
25	Oberkiefer links	10	65,65	37,91
	Oberkiefer rechts	11	49,91	16,80
	Unterkiefer links	12	68,97	70,72
	Unterkiefer rechts	13	53,40	63,23
26	Oberkiefer rechts	14	64,67	28,41
	Unterkiefer links	15	47,65	0,00
BIC% Mittelwert gesamt:			54,19	40,49
BIC% Mittelwert an Implantaten ohne Dehiszenzen:			59,50	39,48
BIC% Mittelwert an Implantaten mit Dehiszenzen:			50,65	41,17

Tabelle 8: Knochen-Implantat-Kontakt, BIC[%] an 15 WI.TAL®-Implantaten. Die BIC-Werte der Implantate, an denen nach einem Zeitraum von acht Wochen Dehiszenzen beobachtet wurden, sind rot dargestellt. Der Unterschied des BIC der gesamten Implantatoberfläche zwischen Implantaten ohne (59,5 %) und mit Dehiszenzen (50,65 %) war nicht signifikant ($p=0,29$). In der rechten Spalte sind die Knochen-Implantat-Kontakte der cervicalen Implantatabschnitte aufgeführt. Auch dabei fanden sich keine signifikanten Unterschiede (39,48% vs. 41,17%, $p=0,814$)

6.2.1 Vergleich des BIC zwischen Oberkiefer und Unterkiefer

Der Knochen-Implantat-Kontakt der drei Abschnitte (cervical, mittig, apical) wurde für die folgende Berechnung zusammengefasst. Es errechnete sich im Oberkiefer (n=8) ein mittlerer BIC von 52,72 % (14,51 % - 68,77 %) und im Unterkiefer (n=7) von 55,87 % (41,34 % - 68,97 %). Die Ergebnisse zeigten **keinen signifikanten Unterschied** zwischen den Implantaten des Oberkiefers und Unterkiefers ($p=0,908$) (siehe Abbildung 11).

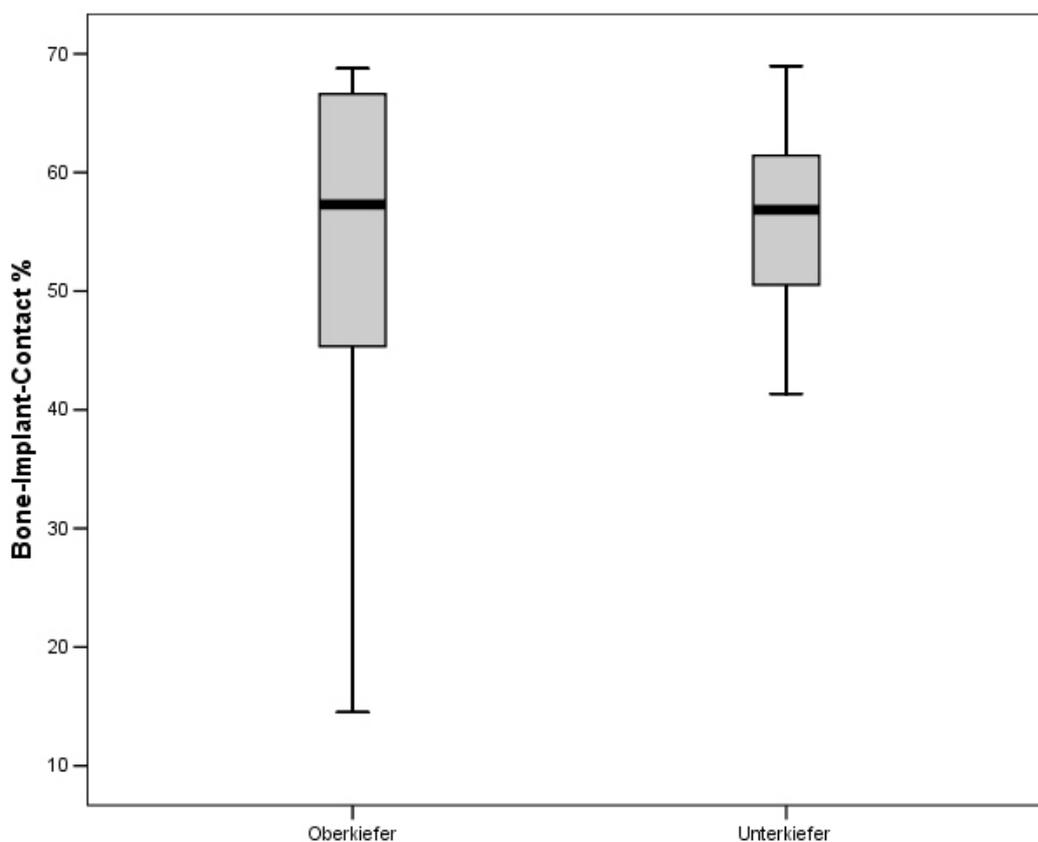


Abbildung 11: BIC[%] des Oberkiefers (n=8) und Unterkiefers (n=7)

6.2.2 Vergleich des BIC zwischen den cervicalen und mittleren Implantatabschnitten

Für die weiteren Untersuchungen wurde die Implantatoberfläche, wie bereits auf Seite 46 dargestellt in fünf Bereiche unterteilt. Für die Bestimmung der BIC-Werte der Regionen „cervical“ und „mittig“ wurden die Daten der linken und rechten Seite der jeweiligen Schliffe zusammengefasst und gemittelt. Vorteil dieses Vorgehens ist die größtmögliche Menge an Daten pro Implantatregion innerhalb eines Schliffes. Es ist

davon auszugehen, dass dadurch der ermittelte BIC näher an der klinischen Realität liegt, als wenn nur eine Seite des geschliffenen Implantates in die Auswertung einbezogen werden würde. Es zeigte sich, dass im cervicalen Bereich der niedrigste durchschnittliche BIC mit 40,49 % (0-70,72 %) gemessen wurde. Im mittleren Anteil der Implantate betrug der BIC durchschnittlich 58,43 % (15,9-79,8 %). Der apicale Abschnitt dagegen zeigte einen durchschnittlichen Knochen-Implantat-Kontakt von 55,74 % (0-100 %) (siehe Abbildung 12). Interessant erschien der statistische Vergleich des cervicalen und mittleren Implantatabschnittes, um die klinisch relevante, möglicherweise cervical geringere Osseointegration an Implantaten diskutieren zu können. Bei der Auswertung mit dem Wilcoxon signed ranks-Test zeigte sich dabei für den cervicalen Bereich ein signifikant geringerer Knochen-Implantat-Kontakt ($p=0,036$).

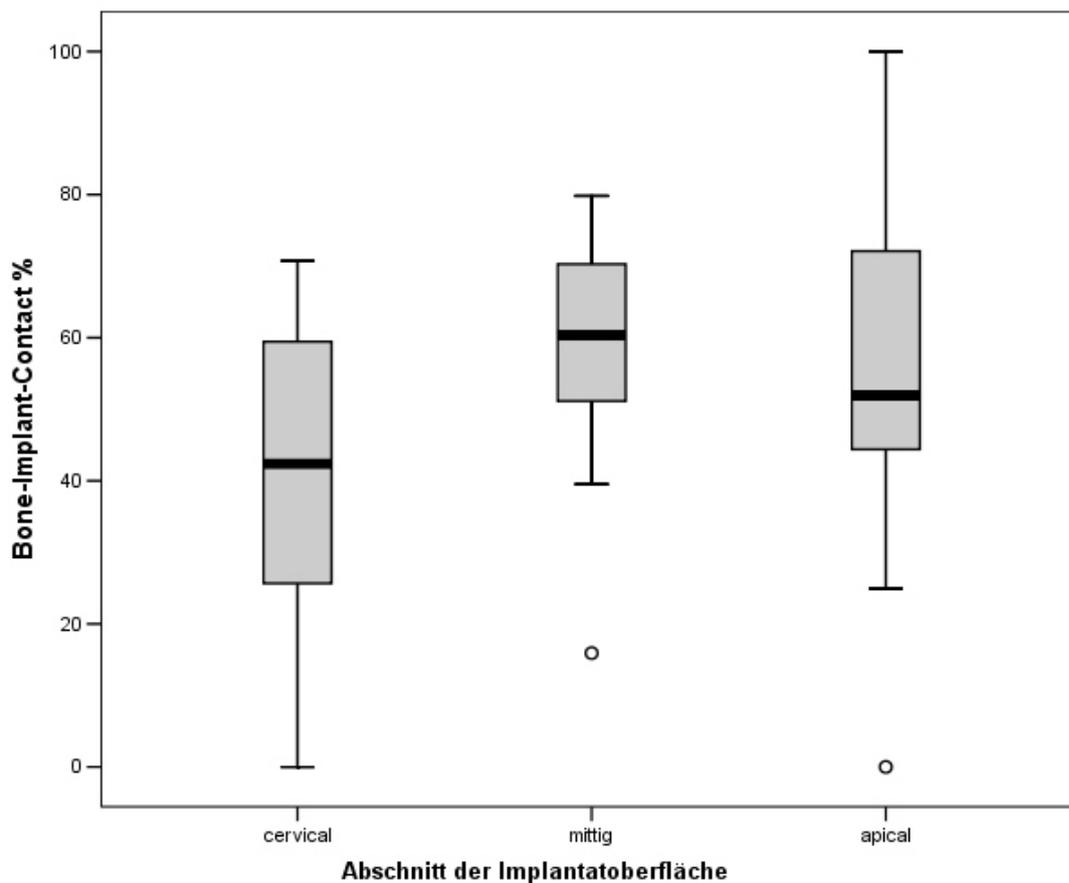


Abbildung 12: BIC[%] der einzelnen Abschnitte der Implantatoberfläche

6.2.3 Vergleich des BIC zwischen den cervicalen und mittleren Implantatabschnitten bei der alleinigen Betrachtung von Oberkiefer und Unterkiefer

Bei der alleinigen Betrachtung des Oberkiefers (n=8) lagen die Mittelwerte des BIC im cervicalen Bereich bei 35,64 % (7,68-69,05 %), mittig bei 58,32 % (15,91-79,8 %) und apical bei 51,3 % (0-85,77 %). Im Unterkiefer (n=7) betrug der durchschnittliche BIC in der cervicalen Region 46,03 % (0-70,72 %), im mittleren Abschnitt 58,55 % (39,53-75,27 %) und im apicalen Bereich 60,81 % (39,5-100 %). (siehe Abbildung 13). Der Wilcoxon signed ranks-Test zeigte zwischen den cervicalen und mittleren Knochen-Implantat-Kontaktraten im Oberkiefer keinen signifikanten Unterschied ($p=0,069$). Auch im Unterkiefer unterschieden sich die cervicalen und mittleren Knochen-Implantat-Kontaktraten nicht signifikant voneinander ($p=0,31$).

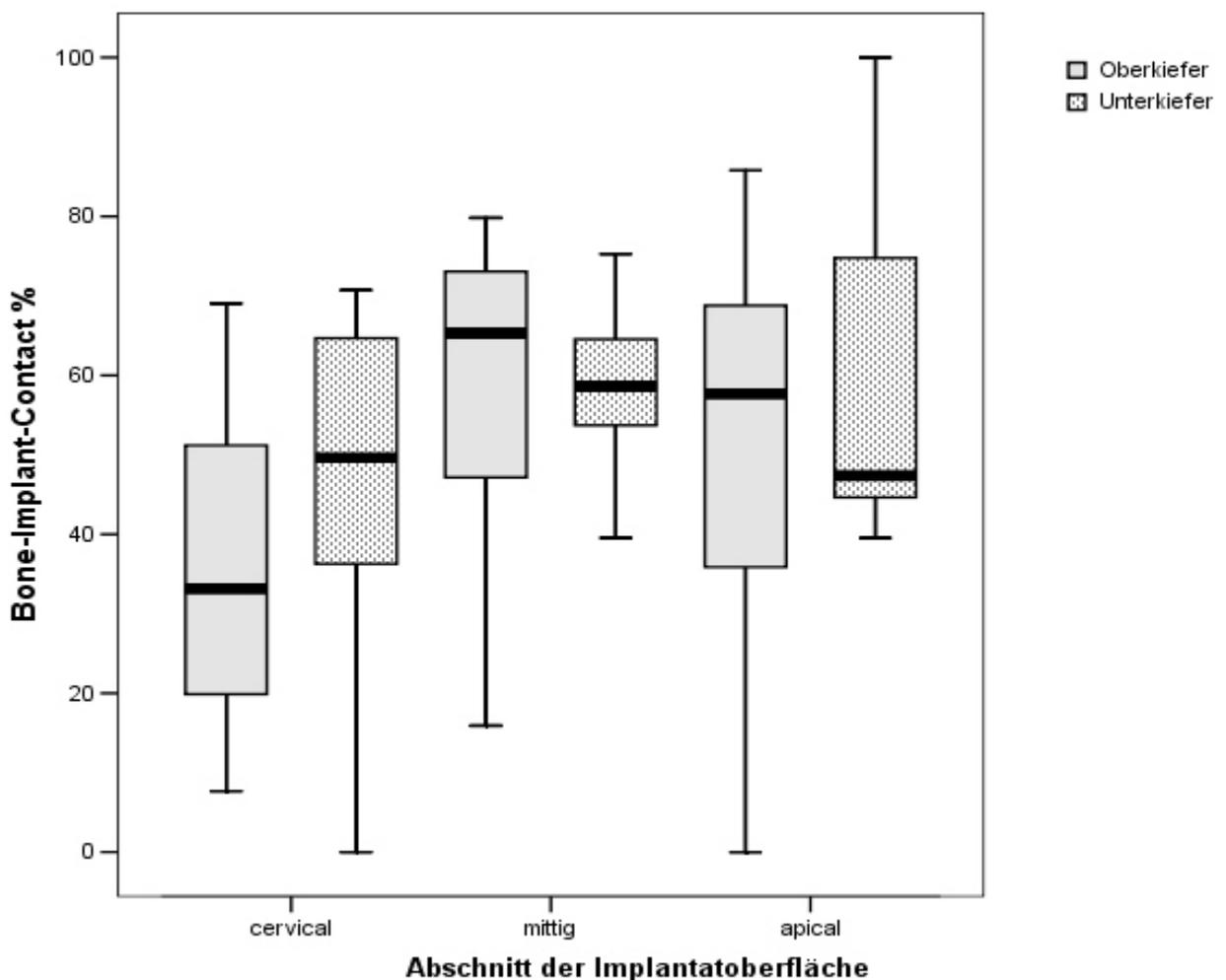


Abbildung 13: BIC[%] der einzelnen Implantatabschnitte von Oberkiefer (n=8) und Unterkiefer (n=7)

6.2.4 Zweifaktorielle parameterfreie Varianzanalyse des BIC

In der abschließenden statistischen Auswertung des BIC wurden in einer zweifaktoriellen parameterfreien Varianzanalyse die unabhängigen Faktoren und die abhängigen Faktoren gleichzeitig betrachtet. Dabei galten Ober- und Unterkiefer als unabhängig und die Abschnitte der Implantatoberfläche (cervical, mittig, apical) als abhängig. Es ergaben sich 45 Messwerte (15 Implantate x 3 Abschnitte), die verglichen wurden. Daraus resultierten keine signifikanten Unterschiede zwischen Ober- und Unterkiefer ($p=0,49$). Die drei Implantatabschnitte zeigten mit $p=0,059$ eine Tendenz, sich signifikant zu unterscheiden, wobei die cervicalen Bereiche durchschnittlich niedrigere BIC-Werte aufwiesen.

6.3 Knochenneubildungsrate

Wie bereits beschrieben, erfolgte zur Bestimmung der Knochenneubildungsrate eine polyfluorochrome Sequenzmarkierung mit drei unterschiedlichen Farbstoffen, die nach zwei, fünf und acht Wochen post implantationem injiziert wurden. Die Bandenmuster wurden, wie einleitend erläutert, vermessen und statistisch ausgewertet. Für die nachfolgenden Berechnungen wurden die Werte der Implantatabschnitte beider Seiten eines Schliffes zusammengefasst und gemittelt. Aus den aufgenommenen Daten konnte für den ersten Zeitraum der dritten bis zur einschließlich fünften Woche post implantationem eine durchschnittliche Knochenneubildungsrate von $2,33 \mu\text{m}/\text{Tag}$ ($1,75\text{-}3,17 \mu\text{m}/\text{Tag}$) ermittelt werden. In der sechsten bis einschließlich achten Woche wurden durchschnittlich $1,99 \mu\text{m}/\text{Tag}$ ($1,55\text{-}3,01 \mu\text{m}/\text{Tag}$) gebildet. Über den gesamten Zeitraum ergab sich eine **durchschnittliche Knochenneubildungsrate von $2,32 \mu\text{m}/\text{Tag}$** ($1,76\text{-}2,82 \mu\text{m}/\text{Tag}$). Die genaue Aufschlüsselung ist in Tabelle 9 dargestellt.

Nummer des Schweines	Region des Implantates	Implantatnummer	KNR [μm] 3.-5. Woche	KNR [μm] 6.-8. Woche	KNR [μm] 3.-8. Woche
12	Oberkiefer links	1	38,56	38,98	87,89
	Oberkiefer rechts	2	42,12	46,94	96,66
	Unterkiefer links	3	51,58	34,82	94,66
	Unterkiefer rechts	4	63,68	41,37	112,79
22	Oberkiefer links	5	41,97	37,42	88,32
	Oberkiefer rechts	6	36,69	32,57	73,71
24	Oberkiefer rechts	7	40,37	34,63	85,32
	Unterkiefer links	8	52,17	44,31	102,57
	Unterkiefer rechts	9	48,03	41,53	96,50
25	Oberkiefer links	10	49,29	43,17	98,24
	Oberkiefer rechts	11	53,24	46,61	103,13
	Unterkiefer links	12	49,80	63,14	118,33
	Unterkiefer rechts	13	54,53	42,05	100,61
26	Oberkiefer rechts	14	45,68	38,53	91,39
	Unterkiefer links	15	66,47	40,82	112,63
Mittelwert:			48,94	41,79	97,52
KNR/Tag [$\mu\text{m}/\text{d}$]			2,33	1,99	2,32

Tabelle 9: Knochenneubildung an 15 WI.TAL®-Implantaten innerhalb der gewählten Zeiträume

6.3.1 Vergleich der Knochenneubildungsrate zwischen Oberkiefer und Unterkiefer

Zur Analyse der Knochenneubildungsraten im Oberkiefer und Unterkiefer erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests eine getrennte Auswertung der Fluoreszenzdaten aller Implantate beider Kiefer. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$). Daher konnten in den nachfolgenden Berechnungen die Implantate des Ober- und Unterkiefers zusammengefasst werden.

6.3.2 Vergleich der Knochenneubildungsraten innerhalb der unterschiedlichen Zeiträume in Bezug auf die einzelnen Implantatabschnitte

Die beim Vergleich der KNR im ersten (3.-5. Woche) und im zweiten (6.-8. Woche) Zeitraum für die jeweiligen Implantatabschnitte berechneten p-Werte sind in Tabelle 10 dargestellt.

Implantatabschnitt	Zeitraum 1 versus 2
1= cervical	0,331
2= oben	0,03
3= mittig	0,177
4= unten	0,035
5= apical	0,875

Tabelle 10: p-Werte des Vergleiches der KNR im ersten und zweiten Zeitraum für die jeweiligen Implantatabschnitte

Die Knochenneubildungsrate wies im Vergleich der ersten beiden Zeiträume in den Abschnitten 2 und 4 einen signifikanten Unterschied auf. Das bedeutet, dass in diesen Abschnitten in der 6. bis 8. Woche post implantationem signifikant weniger Knochen neu gebildet wurde, als in der 3. bis 5. Woche. Dies spiegelt sich in den nachfolgenden Boxplot-Diagrammen (Abbildungen 15 und 17) wieder.

Bei der Gegenüberstellung der jeweiligen beiden Zeiträume (3.-5. und 6.-8. Woche) zum Gesamtzeitraum (3.-8. Woche) waren die Unterschiede erwartungsgemäß höchst signifikant. Im Gesamtzeitraum wurde in allen Implantatabschnitten annähernd doppelt so viel Knochen neu gebildet, wie in den jeweiligen Einzelzeiträumen.

Die folgenden Abbildungen 14, 15, 16, 17 und 18 zeigen Boxplots zu der Knochenneubildung [μm] innerhalb der drei Zeiträume für die jeweiligen Abschnitte der Implantatoberfläche.

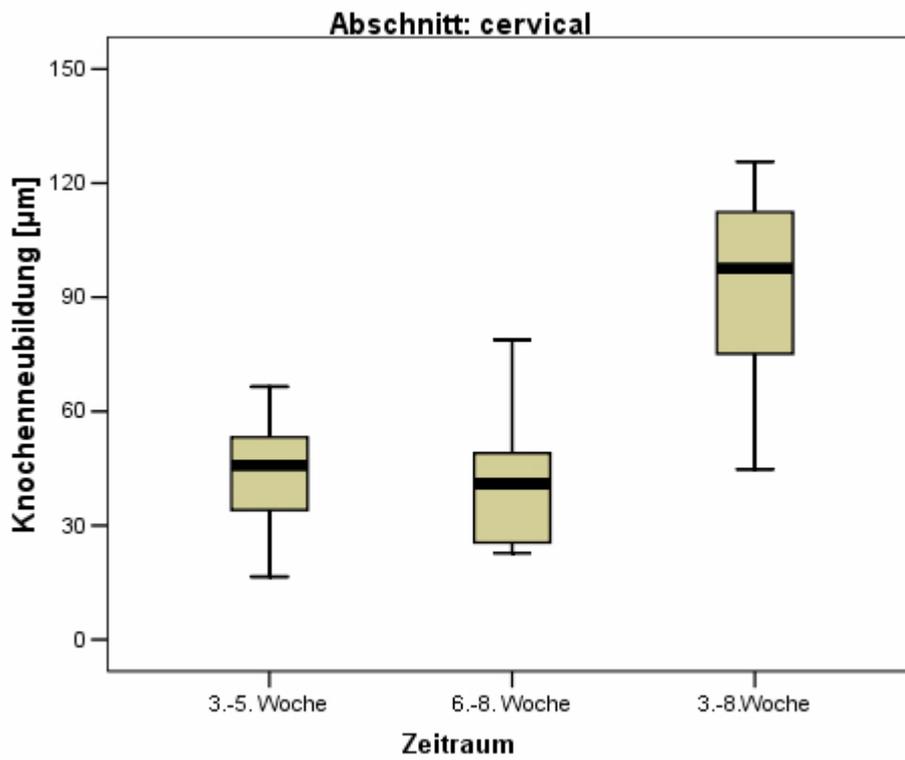


Abbildung 14: Implantatabschnitt 1: cervical, KNR [μm] für den Zeitraum 1, 2 und 3

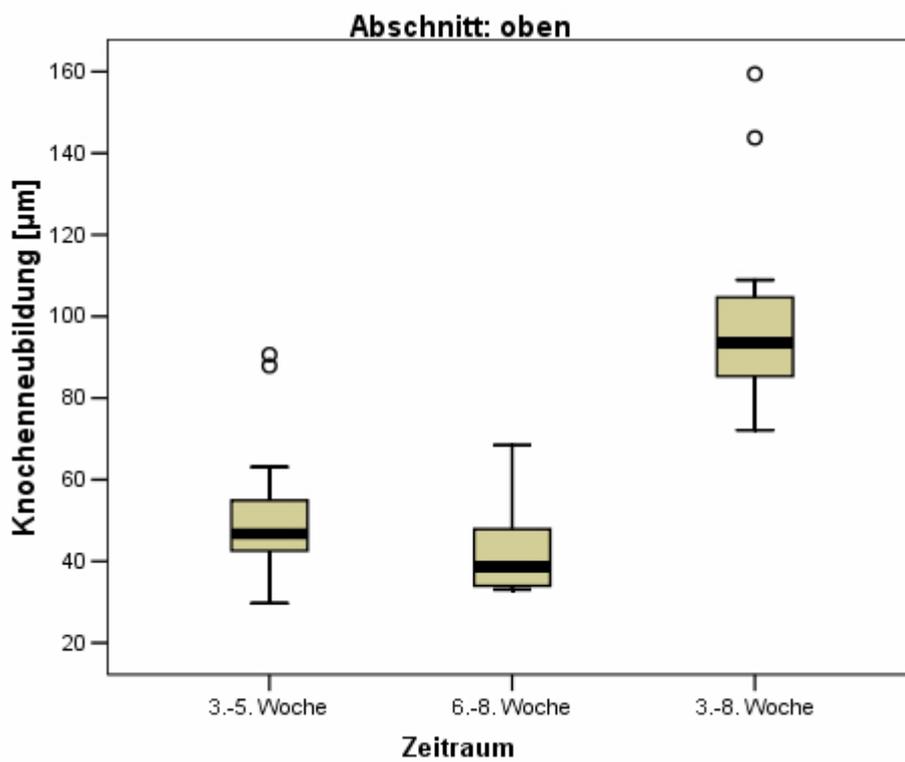


Abbildung 15: Implantatabschnitt 2: oben, KNR [μm] für den Zeitraum 1, 2 und 3

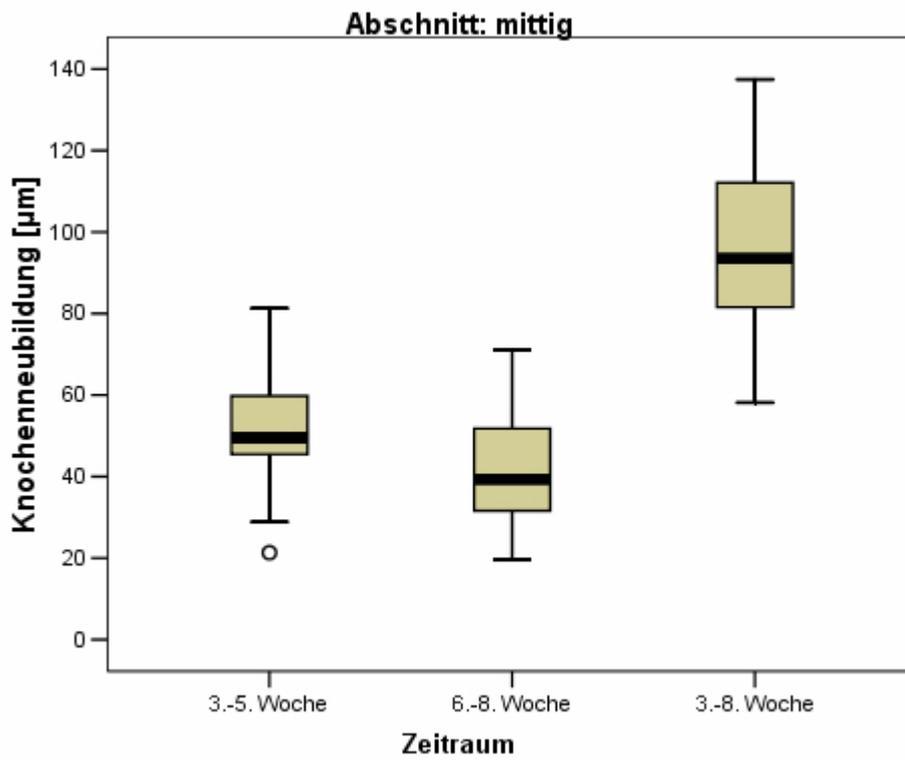


Abbildung 16: Implantatabschnitt 3: mittig, KNR [μm] für den Zeitraum 1, 2 und 3

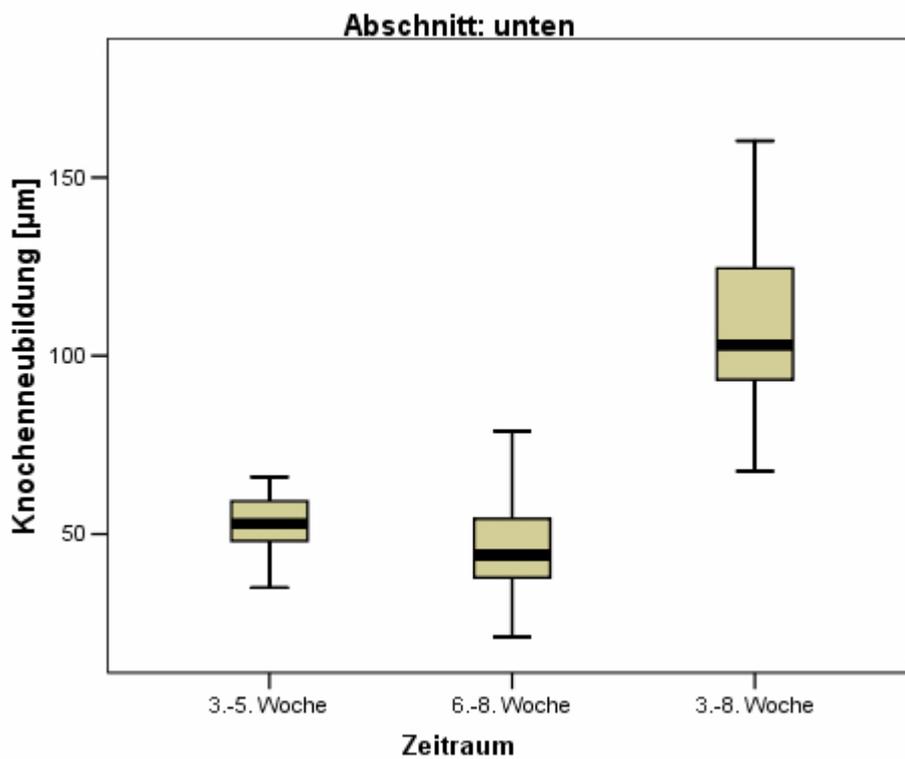


Abbildung 17: Implantatabschnitt 4: unten, KNR [μm] für den Zeitraum 1, 2 und 3

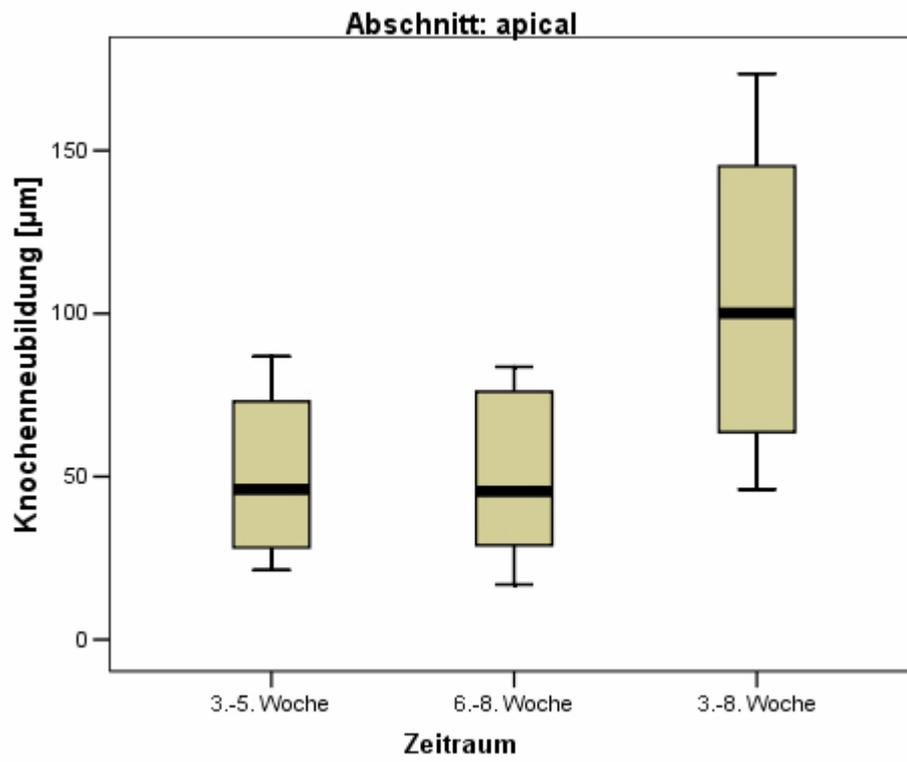


Abbildung 18: Implantatabschnitt 5: apical, KNR [μm] für den Zeitraum 1, 2 und 3

6.4 Richtung und Zeitpunkt der Knochenneubildung

Durch die qualitative Auswertung der polyfluorochrom markierten Schliffe konnte die Wachstumsrichtung des neu gebildeten Knochens beurteilt werden. Dazu wurde an jedem der neun Abschnitte die Knochenneubildungsrichtung anhand der Reihenfolge der Farbbanden in Bezug auf die Implantatoberfläche bestimmt. Nachfolgend werden eine Übersicht (siehe Abbildung 19) und einige repräsentative Ausschnitte gezeigt.

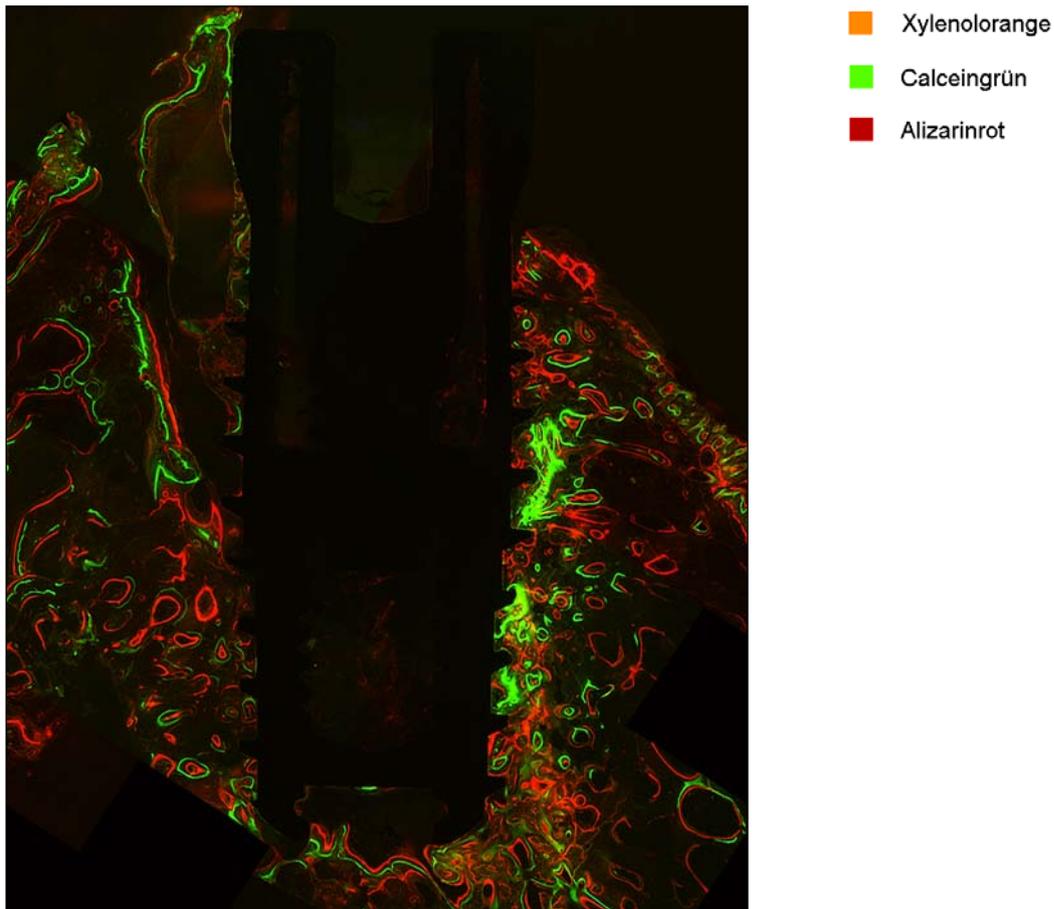


Abbildung 19: Übersichtsbild eines Implantatschliffes bei 2,5-facher Vergrößerung. Zu erkennen sind linienförmige, konzentrische und unregelmäßig angeordnete Fluoreszenzen im Bereich des periimplantären Knochens. Schwach identifizierbar ist in dieser Vergrößerung die Anordnung der Xylenolorange-, Calceingrün- und Alizarinrot-Farbbanden zueinander und zur Implantatoberfläche.

Bei einem Vergrößerungsfaktor von 2,5 wurden Einzelaufnahmen des in Abbildung 19 dargestellten Schliffes angefertigt und mit dem Bildanalyseprogramm „AxioVision Rel.4.6“³⁰ zusammengesetzt. Es handelt sich bei diesem Bild um ein in den Unterkiefer inseriertes Implantat. Die Aufnahme zeigt deutliche linienförmige, konzentrische und unregelmäßige Fluoreszenzen im Bereich des periimplantären Knochens, wobei die Anordnung der drei Farbbanden in dieser Vergrößerung nur schwach identifizierbar ist. Besonders auf der rechten Bildhälfte konzentrieren sich die Farbbanden dicht an der Implantatoberfläche, was für eine besonders aktive Knochenneubildung in diesem Areal spricht. Am cervicalen Implantatabschnitt reicht der Knochen auf der linken Seite bis an die Implantatplattform heran. Auf der rechten Seite ist die Implantatschulter nicht von Knochen bedeckt. Apical haben die Fluoreszenzen und damit die Mineralisationsfront einen deutlichen Abstand zur Implantatoberfläche. Bei stärkerer Vergrößerung können meistens drei, selten auch zwei (nur Calceingrün und Alizarinrot) zusammenhängende Farbbanden identifiziert werden. Sie sind in Bezug zur Implantatoberfläche unterschiedlich angeordnet.

Nachfolgende Detailaufnahmen veranschaulichen verschiedene Knochenwachstumsrichtungen und unterschiedliche Zeitpunkte des Beginns der Knochenneubildung. In den Abbildungen 20 und 21 erscheint die Xylenolorange-Farbbande im größten Abstand zur Implantatoberfläche, gefolgt von der grünen Calcein- und der roten Alizarin-Farbbande. Dies spricht für die eingangs beschriebene Distanzosteogenese, bei der die Mineralisationsfront und damit die Wachstumsrichtung des neu gebildeten Knochens vom Lagerknochen ausgehen und in Richtung Implantatoberfläche verlaufen. Ein so genanntes implantatopetales Wachstum liegt vor.

³⁰ Carl Zeiss, Göttingen, Germany

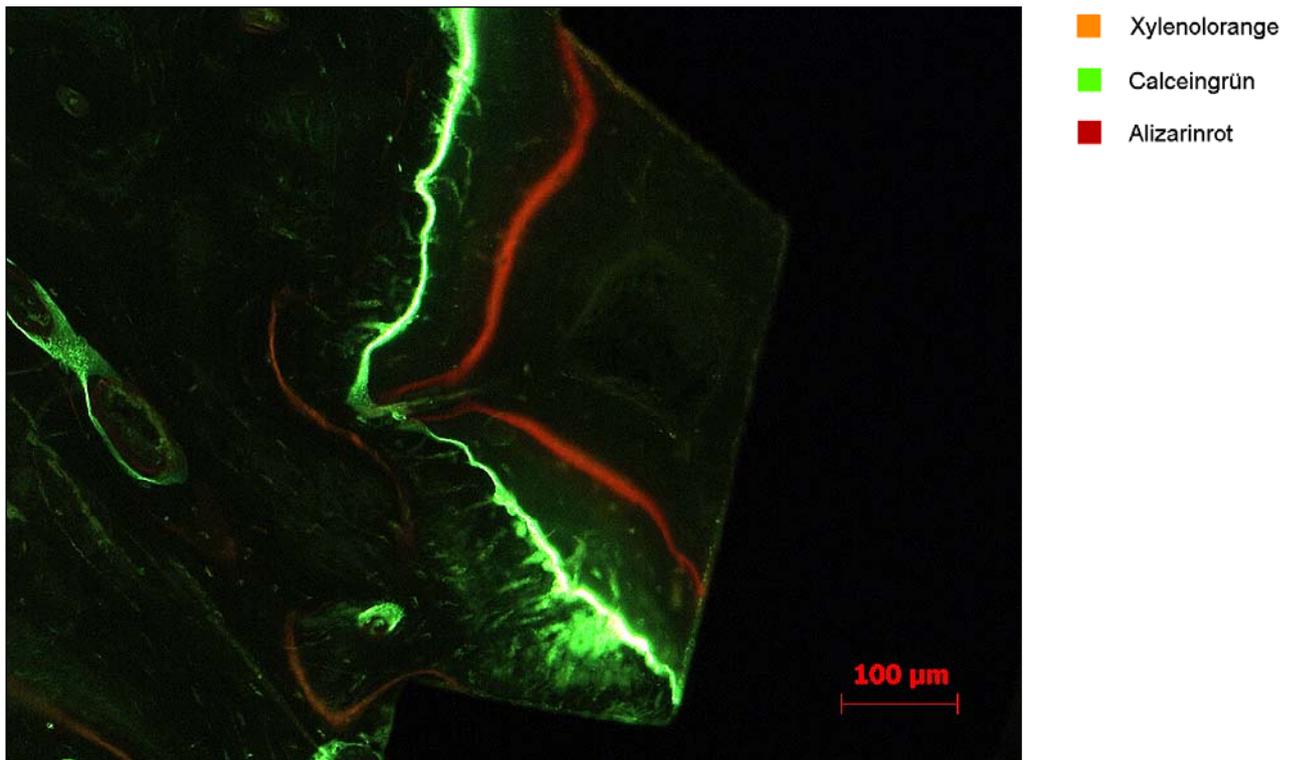


Abbildung 20: Distanzosteogenese bei 10-facher Vergrößerung, Knochenwachstum ausgehend vom Lagerknochen in Richtung Implantat

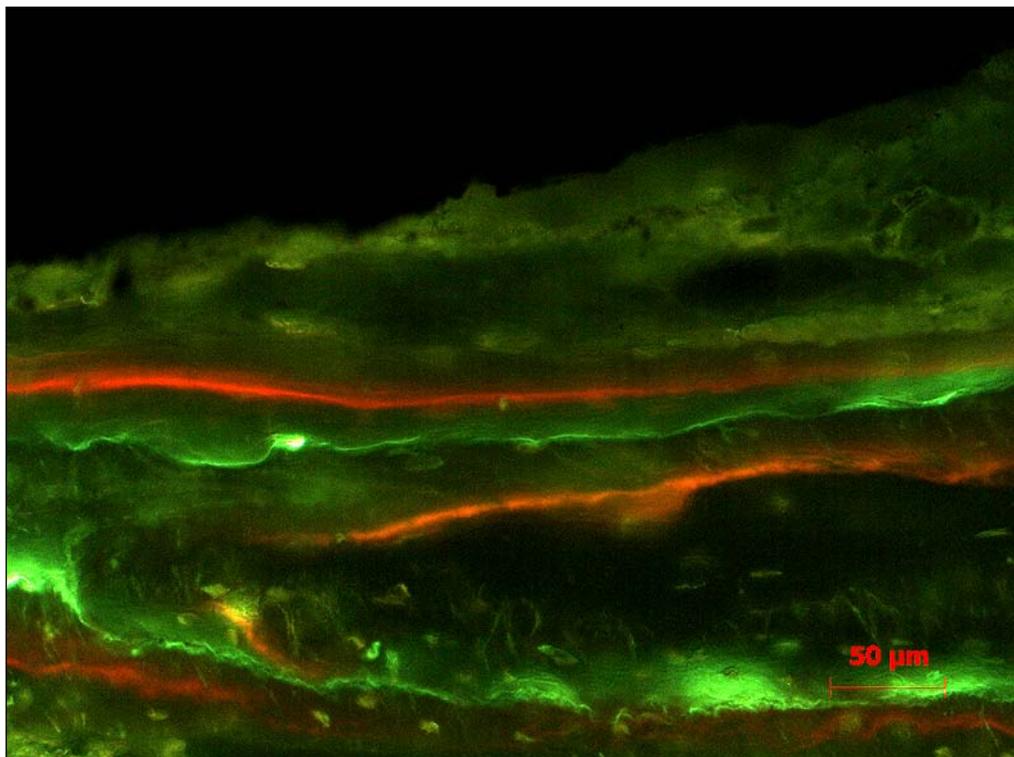


Abbildung 21: Distanzosteogenese bei 20-facher Vergrößerung, Farbbanden apical eines Implantates

In den nachfolgenden Abbildungen 22, 23 und 24 zeigt sich eine Bandenumkehr. Die Xylenolorange-Farbbande liegt der Implantatoberfläche unterschiedlich dicht an und mit größerem Abstand folgen Calceingrün und Alizarinrot. Die implantatofugale Knochenneubildung beginnt an der Implantatoberfläche und setzt sich zur Peripherie hin fort. Dies entspricht den eingangs erläuterten Abläufen bei der Kontaktosteogenese. In Abbildung 24 liegt die orange Farbbande direkt der Implantatoberfläche an, was für einen Beginn der lokalen Knochenneubildung zum Zeitpunkt der Injektion von Xylenolorange zwei Wochen post implantationem spricht.

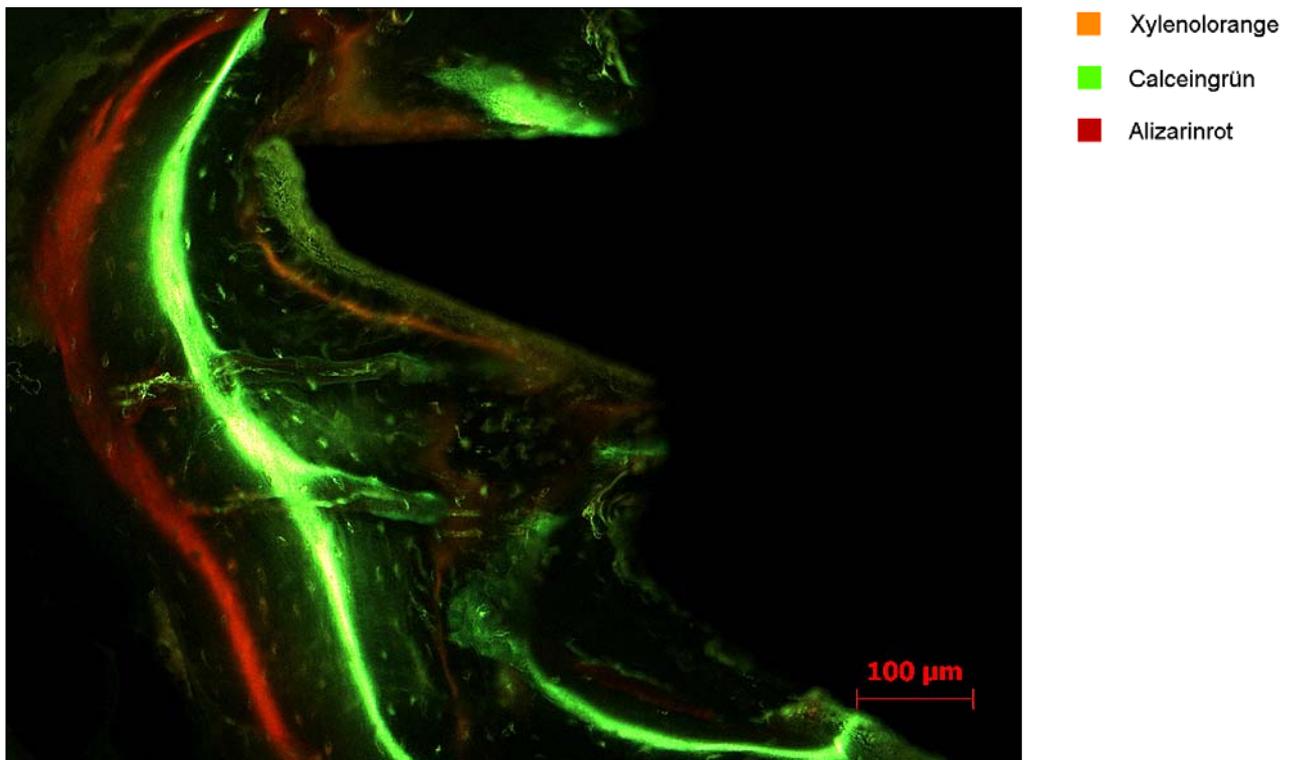
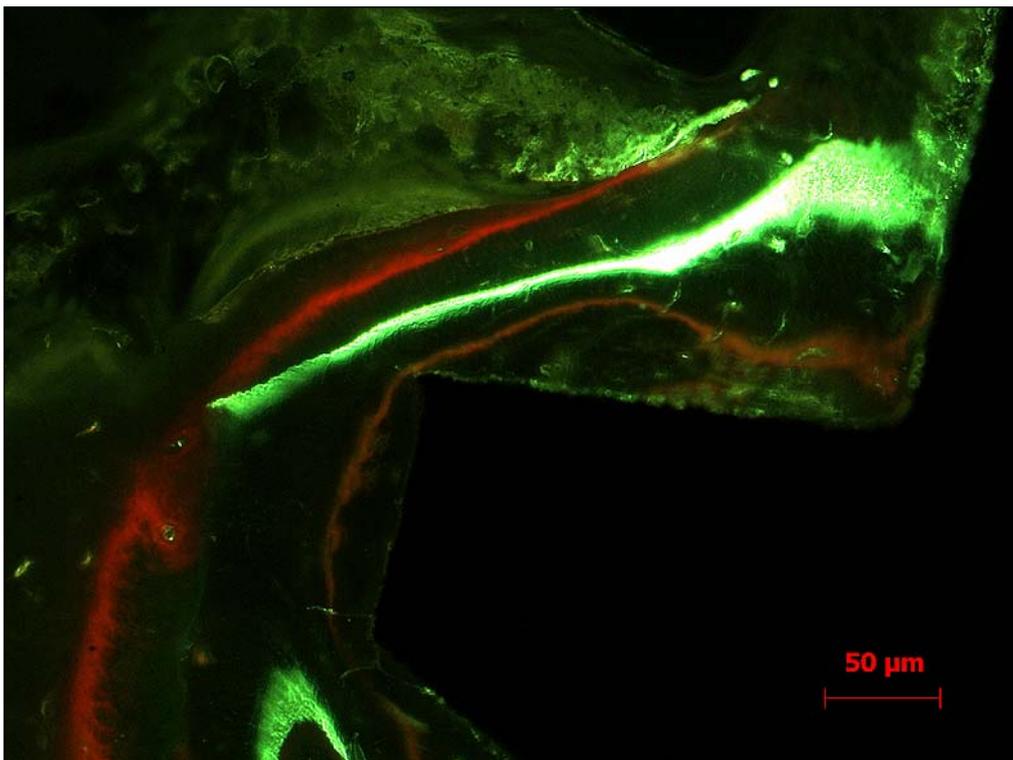


Abbildung 22: Kontaktosteogenese bei 10-facher Vergrößerung



- Xylenolorange
- Calceingrün
- Alizarinrot

Abbildung 23: Kontaktosteogenese bei 20-facher Vergrößerung

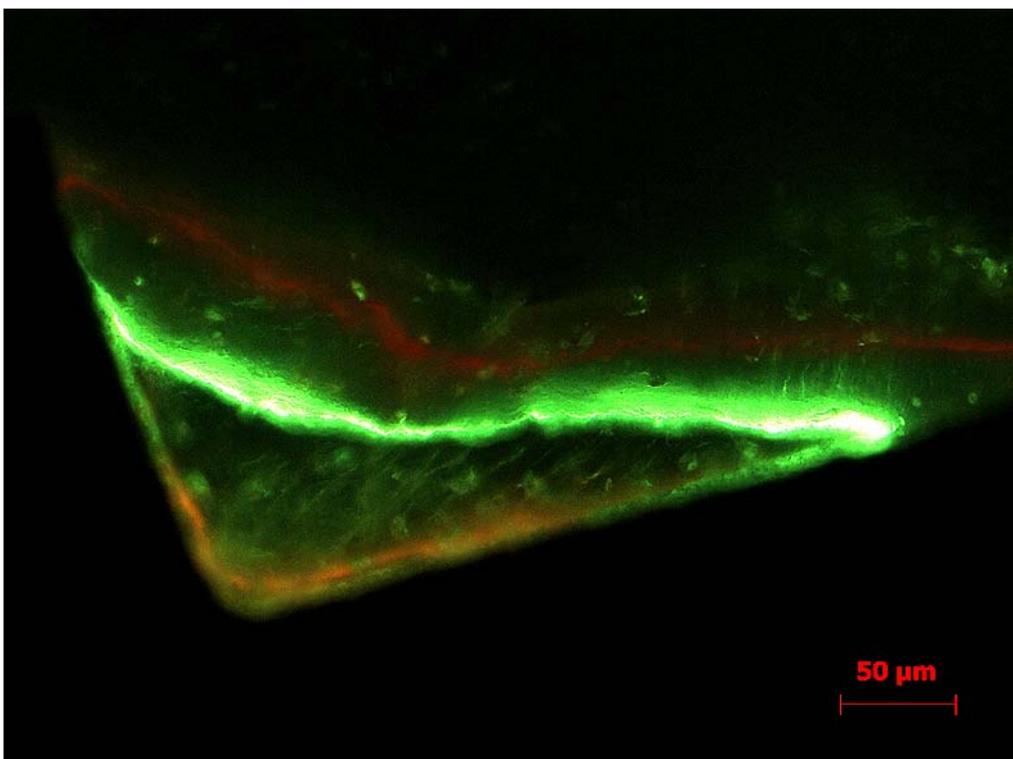


Abbildung 24: Kontaktosteogenese bei 20-facher Vergrößerung mit dichter Anlagerung der Xylenolorange-Farbbande an die Implantatoberfläche

In der letzten Abbildung 25 sind die Fluoreszenzbanden konzentrisch angeordnet. Der am linken Bildrand abgebildete alte Lagerknochen zeigt keine deutlichen Fluoreszenzen. Rechts ist der Implantatanschnitt erkennbar. Zur gleichen Zeit scheint die Knochenneubildung vom Lagerknochen und von der Implantatoberfläche ausgegangen zu sein. Das bedeutet, dass nicht nur zur selben Zeit, sondern auch am selben Ort beide Wachstumsvorgänge im Sinne von Distanz- und Kontaktosteogenese nebeneinander abzulaufen scheinen.

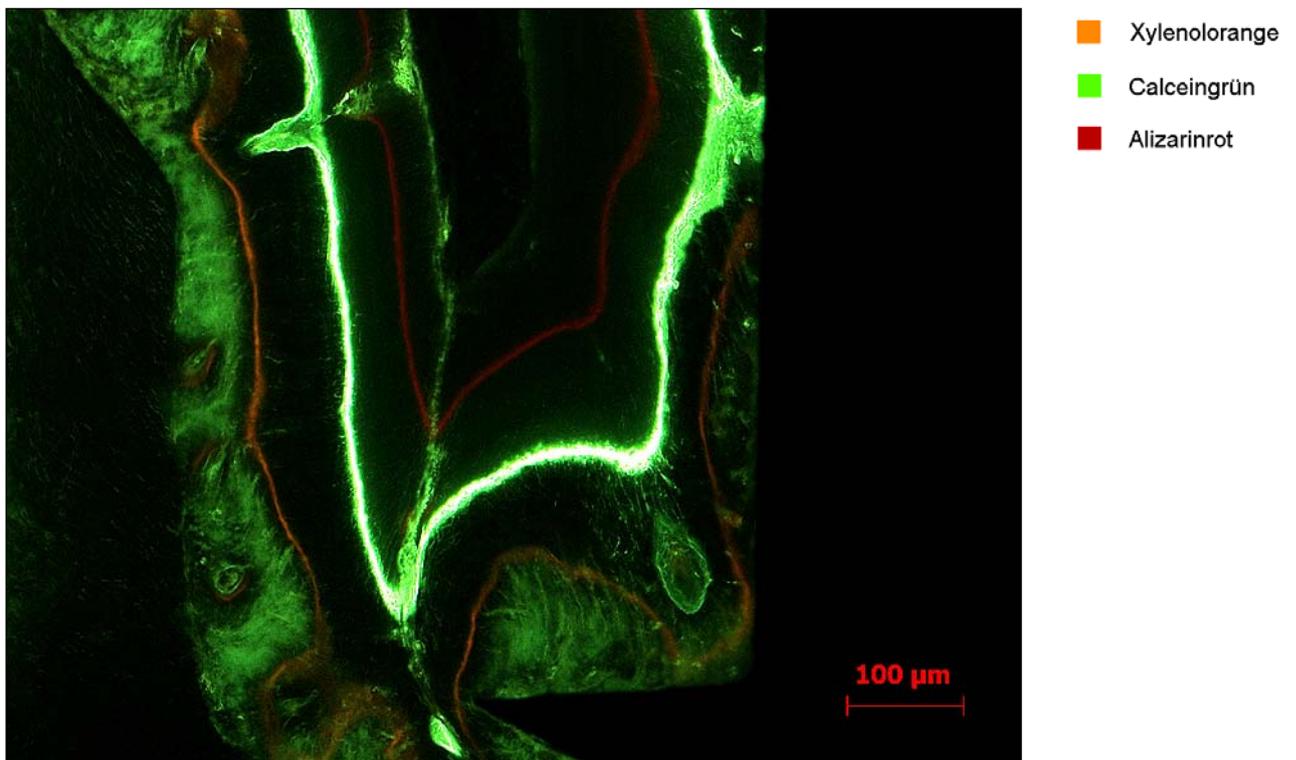


Abbildung 25: konzentrische Anordnung der Fluoreszenzbanden bei 10-facher Vergrößerung, Distanz- und Kontaktosteogenese scheinen gleichzeitig nebeneinander am selben Ort ablaufen zu können, da sich die Knochenneubildung in sowohl implantatopetaler als auch in implantatofugaler Richtung erfolgend darstellt.

Nachfolgend wurden in Tabelle 11 beide Wachstumsrichtungen des neu gebildeten Knochens einander gegenübergestellt. In jedem der neun Implantatabschnitte (siehe Abbildung 5) wurde die Richtung der Knochenneubildung beurteilt (Summe pro Implantat = 9). Als Kontaktosteogenese galt nur der Osseointegrationsvorgang, bei dem die Xylenolorange-Farbbande der Implantatoberfläche, wie in den Beispielabbildungen gezeigt, dicht anlag. Bei einer dem Implantat teilweise

anliegenden ringförmigen Anordnung der Farbbanden wurde dies sowohl als Kontakt- als auch als Distanzosteogenese gezählt (Summe pro Implantat=10). Das Implantat Nummer 1 konnte nur in vier Abschnitten ausgewertet werden, da es in den übrigen Bereichen bindegewebig eingehüllt war und demzufolge keine Fluoreszenzen zeigte (Summe pro Implantat=4). In 62 Fällen konnte ein implantatofugales und in 70 Fällen ein implantatopetales Wachstum beobachtet werden. Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p=0,5$).

Nummer der Schweine	Implantatregion	Implantat-nummer	Kontakt-osteogenese	Distanz-osteogenese
12	Oberkiefer links	1	2	2
	Oberkiefer rechts	2	3	6
	Unterkiefer links	3	5	5
	Unterkiefer rechts	4	5	4
22	Oberkiefer links	5	2	7
	Oberkiefer rechts	6	6	4
24	Oberkiefer rechts	7	4	5
	Unterkiefer links	8	4	5
	Unterkiefer rechts	9	2	7
25	Oberkiefer links	10	7	2
	Oberkiefer rechts	11	5	4
	Unterkiefer links	12	4	5
	Unterkiefer rechts	13	4	5
26	Oberkiefer rechts	14	7	2
	Unterkiefer links	15	2	7
Gesamtanzahl Kontakt- /Distanzosteogenese:			62 (46,97%)	70 (53,03%)

Tabelle 11: Anzahl der beobachteten Kontakt- und Distanzosteogenesen pro Implantat.

7 Diskussion

7.1 Diskussion von Material und Methode

7.1.1 Auswahl des Versuchstieres

Bei der Durchführung einer tierexperimentellen Studie ist die Auswahl eines geeigneten Versuchstieres von entscheidender Bedeutung. Wie bereits dargestellt, eignen sich die für diese Untersuchung ausgewählten Göttinger Miniaturschweine im Vergleich zu anderen Versuchstierspezies vor allem aufgrund ihrer dem Menschen ähnlichen Größe, Form und Festigkeit des Knochens, ihrer Knochenphysiologie und aufgrund ähnlicher Kieferbewegungen bei der Mastikation [35-38]. Daher kamen vergleichbare Operationsverfahren mit einem humanmedizinischen Instrumentarium zum Einsatz. Des Weiteren sprachen die unkomplizierte Haltung und die relative Infektionsresistenz für dieses Versuchstier [37, 124]. Letzteres wurde von Olsen et al. eher kritisch gesehen, da es in deren Untersuchungen zu ausgeprägten Dehiszenzen und Implantatverlusten kam [130]. Auch in der vorliegenden Studie konnten zum Teil Dehiszenzen beobachtet werden. Zufriedenstellende Ergebnisse bei der Untersuchung der Implantateinheilung an Miniaturschweinen lieferten Hale et al. 1991 und Buser et al. 1998, 1999. Die Autoren beobachteten unter anderem eine sehr schnelle periimplantäre Knochenneubildung und etablierten das Versuchsprotokoll mit dieser ausgewählten Spezies für die Beantwortung von Fragen bezüglich der Osseointegration dentaler Implantate [37, 69, 131, 132]. Laut Wissing et al. 1990 stellt nur noch das Schaf eine vergleichbar gut geeignete Alternative als Versuchstier dar, wobei Differenzen in der Knochenfeinstruktur und daraus resultierende Unterschiede in der Gefäßversorgung im Vergleich zum Menschen vorliegen. Das oft verwendete Kaninchen ist aufgrund der kleinen Größenverhältnisse und der sehr rasch ablaufenden Regenerationsvorgänge im Knochen für Implantatstudien eher ungeeignet. Der Hund wies in Wissings Untersuchungen individuell starke Schwankungen im Knochenumbau und eine besondere Infektanfälligkeit auf [34]. Auch die Vergleichbarkeit mit anderen wissenschaftlichen Arbeiten, wie beispielsweise mit denen von Hale et al. und Zechner et al. 2003 [37, 71], gab im Rahmen der hier vorliegenden Studie den Ausschlag für die Auswahl des Minipigs als Versuchstier.

7.1.2 Zeitlicher Ablauf

Bei dem gewählten zeitlichen Ablauf von den Extraktionen bis zur Implantatinsertion ist zu diskutieren, ob eine Wartezeit von acht Wochen post extractionem genügt, um eine ausreichende Reossifikation der Alveole zu erwarten. Klinisch zeigte sich, dass nach dieser Zeit häufig eine nahezu vollständige Reossifikation der Alveolen stattgefunden hatte und die Implantate bis zur Implantatplattform in den Knochen inseriert werden konnten. Dies ist möglicherweise auf die schon von anderen Autoren beobachtete schnelle Knochenregeneration bei den Miniaturschweinen zurückzuführen [132]. Rimondini et al. zeigten bei Sofortimplantationen im Unterkiefer-Molarenbereich von Minischweinen nach einer achtwöchigen unbelasteten Einheilung durchschnittlich ähnliche Knochen-Implantat-Kontaktraten (BIC=61,32 %) an Korund gestrahlten und anschließend säuregeätzten Titan-Schraubenimplantaten, wie in der vorliegenden Studie [65]. Andererseits ist zu bedenken, dass es durchaus auch nach mehreren Monaten post extractionem aufgrund von Wundheilungsstörungen oder Infektionen zu einer unvollständigen Reossifikation der Extraktionsalveolen kommen kann. Eine Wartezeit von acht Wochen schien insofern gerechtfertigt zu sein, als dass sich die Versuchsplanung an der klinischen Situation orientierte und in Bereichen mit einer nicht optimalen Verknöcherung auf eine Implantatinsertion verzichtet wurde. Dies betraf fünf Alveolen.

7.1.3 Operationsverfahren

Bei der Implantatinsertion waren die schonende und präzise Implantatbettauflbereitung zu beachten. Zur Vermeidung eines zu großen Druckes und einer Überhitzung des Gewebes wurde das Bohrprotokoll mit den entsprechenden Bohrgeschwindigkeiten und Drehmomenten eingehalten und unter sterilen Bedingungen und ständiger Kühlung mit physiologischer Kochsalzlösung gearbeitet. Diese Voraussetzungen wurden von vielen Autoren in Studien formuliert und bestätigt [90, 133, 134]. Das achsengerechte Einbringen der Implantate war für die spätere Entnahme von Bedeutung, um einen Anschnitt des Implantates zu verhindern.

7.1.4 Einheilungsphase

Das Allgemeinbefinden der Tiere war mit einer Ausnahme zu jedem Zeitpunkt der Untersuchungen unauffällig. Klinisch zeigten sich bei den postoperativen Verlaufskontrollen zum Teil Dehiszenzen. Diese konnten unterschiedliche Ursachen haben. Beispielsweise spielen Faktoren wie die chirurgische Vorgehensweise, lokale mechanische Irritationen und das postoperative Verhalten der Tiere eine Rolle. Auffällig war, dass bei dem Minipig Nummer 12, welches eine Pneumonie erlitt, in allen vier Quadranten Dehiszenzen auftraten und die BIC-Werte (14,51 %, 40,87 % und 41,34 %), bis auf einen (56,85 %), unter dem Durchschnittswert von 54,19 % lagen. Im Gegensatz dazu wiesen jedoch auch andere Tiere Dehiszenzen an Implantaten auf, wobei der Knochen-Implantat-Kontakt dieser Implantate sogar teilweise über dem durchschnittlichen BIC lag. Ein Zusammenhang zwischen aufgetretenen Dehiszenzen und der Osseointegration von WI.TAL®-Implantaten konnte bezüglich der vorliegenden Ergebnisse nicht nachgewiesen werden, sollte jedoch in Untersuchungen mit einem speziell auf diese Fragestellung ausgerichteten Studiendesign und mit einer Differenzierung zwischen dem Grad der jeweiligen Dehiszenzen weiter verfolgt werden. Da bei den Versuchstieren eine Mund- und Zahnpflege nicht realisierbar ist, wurden die Schweine zum Schutz vor Wundinfektionen und zur Sicherung des Behandlungsergebnisses drei Wochen lang systemisch antibiotisch abgeschirmt. Um außerdem die mechanische Belastung der Wundgebiete so gering wie möglich zu halten, wurde vier Wochen lang weiche Kost gefüttert. All diese Maßnahmen trugen dazu bei, die „äußeren“ und „inneren“ Bedingungen der Wundheilung positiv zu beeinflussen und damit ein möglichst repräsentatives Ergebnis der geschlossenen Implantateinheilung zu erzielen.

7.1.5 Herstellung der histologischen Präparate

Die nach Donath angefertigten Schliffe entsprachen dem internationalen Standard [53, 127, 135]. Während des Sägevorganges war darauf zu achten, dass eine zu hohe Druckbelastung und eine dadurch bedingte Stauchung des Schnittes vermieden wurden. Die Geschwindigkeit des Sägeblattes musste deshalb an den zu sägenden Präparatanteil (Knochen oder Titan) angepasst werden, um Risse im Gewebe beziehungsweise Abrisse des Knochengewebes vom Implantat möglichst zu

verhindern. Des Weiteren musste stets eine ausreichende Wasserkühlung der Schnittfläche gesichert werden, um Überhitzungen des plastinierten Gewebes zu vermeiden. An vorher angefertigten Probeschleifen zeigten sich diese Bereiche als verschmolzene, dunkle, nicht beurteilbare Regionen. Beim anschließenden Schleifvorgang war mehrfach die Dicke des Präparates zu überprüfen. Zu dicke Schleife führten ansonsten zu Überlagerungen der Fluoreszenzen beziehungsweise zu sehr breiten Farbbanden und damit zu einer erschwerten Auswertbarkeit. Trotz sorgfältigster Arbeitsweise konnten vereinzelt kleine Risse und Falten in der zu vermessenden Region nicht ganz vermieden werden. Diese möglichen Fehlerquellen mussten bei der quantitativen Auswertung im Messablauf berücksichtigt werden.

Ein großer Vorteil bei der Verwendung unentkalkter Präparate ist die Möglichkeit der Anfärbung des Knochens mit Silbernitrat, was für die histomorphometrische Auswertung eine ideale Ausgangsfärbung darstellt. Sie ist schnell und einfach durchführbar und erzeugt einen starken Kontrast. Um gleichzeitig Weichgewebe und Zellen darstellen zu können, eignete sich eine Gegenfärbung mit einer Fuchsin-Toluidin-Mischung (Paragon). Andere Übersichtsfärbungen, wie beispielsweise die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (HE) stellten sich als problematisch dar. Dies lag daran, dass die Farbmoleküle zu groß sind, um in die Poren des plastinierten Präparates einzudringen. Für die Beantwortung der in der vorliegenden Studie gestellten Fragen erwiesen sich die angewandten Färbungen mit Silbernitrat und Paragon jedoch als sehr gut geeignet, weshalb auf andere Färbemethoden verzichtet werden konnte.

7.1.6 Histologische Untersuchungen

Die lichtmikroskopische Darstellung und Auswertung des Knochen-Implantat-Kontaktes stellte sich als recht aufwändig heraus. Bedingt war dies dadurch, dass für die genaue Beurteilung der Knochen-Implantat-Grenzfläche eine mindestens zehnfache Vergrößerung am Objektiv gewählt werden musste und dabei der durch die Okulare sichtbare Sehfelddurchmesser deutlich größer war als der Bereich, den die Kamera erfasste. Um letztendlich die gesamte Implantatoberfläche aufnehmen, vermessen und beurteilen zu können, waren durchschnittlich 35 Einzelaufnahmen pro Implantat notwendig. Diese wurden so zusammengesetzt, dass anschließend die

jeweils gewünschten Implantatabschnitte vermessen werden konnten. Da es sich in der vorliegenden Untersuchung lediglich um 15 Implantate handelte, spielte dieser beschriebene Mehraufwand eine eher untergeordnete Rolle. Für die Beurteilung größerer Fallzahlen bleibt jedoch zu untersuchen, ob mittels eines kleineren Objektivs mit einer möglichst großen numerischen Apertur und einer Kamera mit möglichst vielen Pixeln weniger Aufnahmen bei gleicher Detailschärfe möglich wären.

Ist mit Hilfe der Lichtmikroskopie eine optimale Beurteilung möglich?

Auf der Ebene der Lichtmikroskopie bezeichneten Albrektsson et al. den direkten Kontakt zwischen lebendem Knochen und der Implantatoberfläche ohne dazwischen liegendes Bindegewebe als Osseointegration. Dabei gaben die Autoren zu bedenken, dass bei einer lichtmikroskopischen Auflösung ($> 0,5 \mu\text{m}$) die amorphe Knochen-Implantat-Grenzzone nicht detailliert sichtbar und beurteilbar sei. Lichtmikroskopisch sei laut Albrektsson et al. in dieser Zone ein direkter Knochenkontakt, eine Osteogenese und eine Knochenresorption nicht exakt voneinander zu unterscheiden [5, 58, 136]. Sollten die Vorgänge an der Knochen-Implantat-Grenzfläche genauer beschrieben werden, kann die Raster- und Transmissions-Elektronen-Mikroskopie genutzt werden, mit denen eine Auflösung bis zu 10 nm beziehungsweise 1 nm möglich ist [58]. Ziel der vorliegenden lichtmikroskopischen Untersuchung war es jedoch, den Knochen-Implantat-Kontakt als standardisiertes Maß für die Osseointegration zu berechnen, ohne detaillierte Aussagen zum histologischen Aufbau des Interfaces zu machen. Daher stellte die Lichtmikroskopie die Untersuchungsmethode der Wahl dar.

Die durch die Fixierung, Entwässerung und Einbettung bedingten unvermeidbaren Schrumpfungartefakte [32] und die durch den Sägevorgang verursachten Stauchungen und Mikrorisse im Gewebe führten, wie oben beschrieben an einigen wenigen Stellen zu Abrissen des Knochens von der Implantatoberfläche. Dies stellte sich als minimaler leerer Zwischenraum ohne Zellstrukturen oder Bindegewebe zwischen der Titanoberfläche und dem formkongruenten Knochen dar. In diesen Bereichen wurde trotzdem eine Vermessung der Implantat- und Knochenoberfläche vorgenommen, weil zu erkennen war, dass es sich um aufbereitungsbedingte Artefakte und nicht um einen fehlenden Knochen-Implantat-Kontakt handelte.

Zur Bestimmung des Knochenanbaus im Tierexperiment ist die polyfluorochrome Sequenzmarkierung eine seit den siebziger Jahren bewährte Methode [116, 117]. Die drei in der vorliegenden Studie verwendeten Farbstoffe sind in Abhängigkeit vom jeweiligen Filter fluoreszenzmikroskopisch gut voneinander abgrenzbar. Bei der oben beschriebenen mehrdimensionalen Bildaufnahme, unter Benutzung aller drei Filter, ließen sich jedoch in einigen Fällen das Xylenolorange und das Alizarinrot nur schwer voneinander unterscheiden. In diesen Situationen war es für die Auswertung sinnvoller, nur mit einem Filter (02) ein Livebild aller drei Farbbanden aufzunehmen, auch wenn dabei die Leuchtkraft der Fluoreszenzen unter Umständen etwas reduziert war. Die Differenzierung und damit die Messung waren jedoch gut möglich. Es bleibt zu überprüfen, ob mit anderen Anregungsfiltern die mehrdimensionale Bildaufnahme und damit die Brillanz der Bilder optimiert werden könnte.

7.1.7 Anzahl der untersuchten Implantate

Ziel der als Pilotstudie angelegten Untersuchung war die erstmalige Datenerhebung zum Osseointegrationsverhalten von WI.TAL®-Implantaten. Eine Einteilung in eine Versuchs- und Kontrollgruppe war daher nicht erforderlich. In Bezug auf den BIC, die KNR und deren Vergleichbarkeit mit anderen internationalen tierexperimentellen Studien ist zu erwähnen, dass neben anderen Faktoren gerade die Anzahl der untersuchten Implantate in diversen Untersuchungen stark schwankt. Wie beispielsweise in Tabelle 1 ersichtlich ist, lag die Fallzahl zwischen 10 und 120 bei Mischweinen, zwischen 4 und 24 bei Hunden und bei 36 bis 90 Implantaten bei Kaninchen. Es stellte sich daher die Frage, ob die Anzahl der 15 untersuchten WI.TAL®-Implantate zu einem repräsentativen und vergleichbaren Ergebnis führen kann. Bei genauer Betrachtung wurden in Studien mit beispielsweise 60 Implantaten fünf verschiedene Oberflächen untersucht, so dass pro Implantattyp 12 Proben ausgewertet wurden. Insofern scheinen die Ergebnisse der 15 untersuchten WI.TAL®-Implantate bezüglich der Fallzahl und unter Berücksichtigung eines ähnlichen Studiendesigns durchaus vergleichbar zu sein mit internationalen Ergebnissen von beispielsweise Buser et al. 1991, Hale et al. 1991, Rimondini et al. 2005 [37, 65, 69]. Beim Vergleich des BIC der cervicalen und mittleren Implantatabschnitte aller Implantate (n=15) zeigte sich ein signifikanter Unterschied. Diese Signifikanz konnte bei der getrennten Untersuchung von Oberkiefer (n=8) und

Unterkiefer (n=7) nicht mehr festgestellt werden, was auf die geringe Fallzahl im einzelnen Kiefer zurückzuführen ist.

7.2 Diskussion der Ergebnisse

7.2.1 Diskussion des Knochen-Implantat-Kontaktes

Ein häufig in Tierexperimenten angewandtes Maß für die Osseointegration eines Implantates ist der Knochen-Implantat-Kontakt. In der vorliegenden Studie an Minischweinen betrug der mittlere BIC nach einem Beobachtungszeitraum von zwölf Wochen für alle ausgewerteten Implantate zusammen 54,19 %. Die Werte bewegten sich zwischen minimal 14,51 % und maximal 68,97 %. Insgesamt ergab sich zwischen Ober- und Unterkiefer kein signifikanter Unterschied (52,72 % versus 55,87 %, $p=0,908$). Es stellt sich daher die Frage, ob eine möglicherweise geringere Knochendichte, wie sie von einigen Autoren für den Oberkiefer angegeben wird, die unbelastete Einheilung innerhalb dieses Zeitraumes wirklich wesentlich beeinflusst [27]. Buser et al. fanden beispielsweise bei der Insertion von Titan-Schraubenimplantaten in die Maxilla von Minischweinen Knochen-Implantat-Kontaktraten, die sogar über denen der vorliegenden Studie lagen. Sie untersuchten nach vier und acht Wochen unbelasteter Einheilung SLA-Oberflächen (BIC=66,57 % und 75,45 %) und SLActive-Oberflächen (BIC=87,91 % und 78,47 %) [68]. In einer Studie an Hunden werteten Ericsson et al. 1994 den BIC an in die Maxilla inserierten Titan-Schraubenimplantaten nach zwei und vier Monaten aus, wobei zu erwähnen ist, dass Hunde eine etwas höhere Knochenneubildungsrate als Schweine haben [36]. Die Ergebnisse zeigten an maschinieren Oberflächen 39,4 % und 42,9 % und an TiO₂-gestrahlten Oberflächen 40,5 % und 65,1 % Knochen-Implantat-Kontakt [72]. Einen noch größeren BIC (74,1 %) fanden Huang et al. 2005 in TypIV-Knochen heraus. Nach einer Zeit von 16 Wochen untersuchten sie an Affen 24 Implantate mit einer porösen modifizierten Titanoxid-Oberfläche (TiUnite), die in die posteriore Maxillaregion inseriert wurden. Die Autoren schlossen daraus, dass die TiUnite-Oberfläche aufgrund ihrer osteokonduktiven Eigenschaften gute Voraussetzungen für die Osseointegration in TypIV-Knochen besitzt [80]. Die Beschaffenheit der Oberfläche und die unbelastete Einheilung halten auch andere Autoren in ihren Untersuchungen für wichtig, um eine Osseointegration in Kieferbereichen mit

geringerer Knochendichte zu erreichen und langfristig beizubehalten [137, 138]. Die in der vorliegenden Studie ermittelten Ergebnisse an in die Maxilla inserierten WI.TAL®-Implantaten (BIC=52,72 %) und die dargestellten Ergebnisse internationaler Studien deuten darauf hin, dass die spongiöse Knochenstruktur des posterioren Oberkiefers keine schlechtere Osseointegration von Implantaten nach sich zieht. Vielmehr scheint die Beschaffenheit der Implantatoberfläche für das Erreichen hoher Knochen-Kontakt-Raten in diesen Kieferbereichen von wesentlicher Bedeutung zu sein.

Der Vergleich der cervicalen und mittleren Implantatabschnitte miteinander zeigte in der vorliegenden Studie einen signifikanten Unterschied. Eine Beeinflussung durch aufgetretene Dehiszenzen konnte statistisch nicht nachgewiesen werden (siehe Tabelle 8). Um dahingehende Zusammenhänge zu untersuchen, nahmen beispielsweise auch Hale et al. 1991 eine Unterteilung in drei Implantatabschnitte bei ihren Studien an Minischweinen vor. Die Autoren gaben an, bei allen untersuchten Implantaten Dehiszenzen innerhalb der ersten postoperativen Woche beobachtet zu haben. Es zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den BIC-Werten der einzelnen Implantatregionen [37]. Diese Untersuchungsergebnisse lassen zum einen vermuten, dass es trotz fehlenden speicheldichten Wundverschlusses durch auftretende Dehiszenzen zu einer regelrechten Osseointegration über die gesamte Implantatlänge kommen kann. Zum anderen scheinen andere Einflussfaktoren als Dehiszenzen zu einem geringeren Knochen-Implantat-Kontakt im cervicalen Implantatabschnitt führen zu können. Bei einer unbelasteten Einheilung könnte beispielsweise neben der Mikrostruktur der Oberfläche auch die cervicale Implantatgeometrie für den BIC in diesem Bereich von Bedeutung sein. Dort können der initiale Knochenkontakt und somit die Primärstabilität und folglich auch Osseointegration durch das Vorhandensein von Schraubenwindungen und einer damit verbundenen Oberflächenvergrößerung in Abhängigkeit von der Gewindeanzahl und -tiefe maximiert werden [99]. Das WI.TAL®-Implantatsystem weist im cervicalen Abschnitt keine Windungen auf, was möglicherweise zu geringeren Knochen-Implantat-Kontaktraten geführt haben könnte. Einen weiteren von Schwartz et al. 1997 diskutierten Einflussfaktor stellt das Einwachsen von konkurrierendem Weichgewebe in den Zwischenraum zwischen Implantat und Knochen im cervicalen Bereich dar, was laut der Autoren ebenfalls zu

geringeren Knochen-Implantat-Kontaktraten führen kann [61]. Interessant ist in diesem Zusammenhang eine Untersuchung von Rimondini et al. 2005, in der die BIC-Werte an Sofortimplantaten am Minischwein ausgewertet wurden. Nach der Insertion in das interradikuläre Septum post extractionem und einer offenen, weitgehend unbelasteten Einheilung fanden sich nach 60 postoperativen Tagen keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den drei Implantatabschnitten (coronal, mittig, apical). Dabei wurden weder Knochenersatzmaterialien zum Auffüllen der periimplantären Knochendefekte, noch Membranen als Weichgewebsbarriere benutzt [65]. Bezüglich des Vergleiches der einzelnen Implantatabschnitte lässt sich somit laut Scharz et al. und Rimondini et al. schlussfolgern, dass die Osseointegration, besonders im cervicalen Bereich, von einem stabilen Koagulum im periimplantären Spalt, einer ausreichenden initialen Primärstabilität und einer unbelasteten Einheilung abzuhängen scheint [61, 65]. Diese Bedingungen, insbesondere die letzten beiden Aspekte wurden neben einer formkongruenten Implantatbettbohrung auch in der vorliegenden Untersuchung an WI.TAL®-Implantaten berücksichtigt. Inwiefern die Implantatgeometrie, das heißt das Fehlen von cervicalen Windungen an WI.TAL®-Implantaten, für geringere cervicale BIC-Werte von Bedeutung war, bleibt näher zu untersuchen.

Werden die Ergebnisse anderer Minischweinstudien zur Osseointegration verschiedener Titanimplantate bei einer unbelasteten Einheilung (Tabelle 1) betrachtet, lässt sich folgendes erkennen: Bei einer großen Variabilität der verwendeten Oberflächenmodifikationen liegen die Knochen-Implantat-Kontaktraten in Abhängigkeit vom jeweiligen Beobachtungszeitraum zwischen 20 % nach drei Monaten und 78 % nach zwei beziehungsweise vier Monaten [37, 65, 66, 68-71]. Verglichen damit liegt der BIC der vorliegenden Studie mit 54,19 % nach drei Monaten im mittleren Bereich, unabhängig davon ob Dehiszenzen auftraten oder nicht. Aus den Ergebnissen der vorgenannten Versuche lässt sich ebenfalls vermuten, dass raue Oberflächen, im Gegensatz zu glatten, einen positiven Einfluss auf den Knochen-Implantat-Kontakt und damit auf die Osseointegration haben. Wennerberg et al. zeigten im Kaninchenexperiment, dass sogar der Grad der Rauigkeit von Bedeutung ist, wobei Implantate mit moderaten Rauigkeitswerten besser osseointegrierten als glattere und rauere Oberflächen [78, 79]. Da die Firma Wieland zum Grad der Oberflächenrauigkeit keine exakten Angaben macht, kann

dieser Einflussfaktor nicht näher dargestellt werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

7.2.2 Diskussion der Knochenneubildungsrate

Die durchschnittliche Gesamt-KNR ergab 2,32 $\mu\text{m}/\text{Tag}$. Somit betrug diese nicht wie zu erwarten wäre 2,16 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ (Mittelwert zwischen beiden Untersuchungszeiträumen von 2,33 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ und 1,99 $\mu\text{m}/\text{Tag}$). Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei der Messung des gesamten Zeitraumes noch die Breite der Calceinbande hinzugerechnet werden musste (siehe Abbildung 6). Beim Vergleich der KNR zwischen dem ersten (3.-5. Woche) und zweiten (6.-8. Woche) Zeitraum stellte sich heraus, dass die Knochenneubildungsrate von durchschnittlich 2,33 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ auf 1,99 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ sank. Somit scheint sich über den Zeitraum von der zweiten bis zur achten Woche eine Verlangsamung der KNR abzuzeichnen. Studienergebnisse von Hönig et al. 1993 zeigten ebenfalls an Göttinger Minischweinen einen geringfügigen Abfall der Knochenneubildungsraten über einen Zeitraum von zehn Wochen. Untersucht wurde dabei die Knochenheilung im Bruchspalt nach Tibiafraktur und der Versorgung mit Osteosyntheseplatten [35]. Der Vergleich mit den Ergebnissen von Hönig et al. scheint gerechtfertigt, da die Osseointegrationsvorgänge am Implantat den Abläufen der primären Knochenheilung ähnlich sind. Bei der Betrachtung der einzelnen WI.TAL®-Implantatabschnitte unterschied sich im oberen und unteren Bereich die Knochenneubildungsrate im ersten versus zweiten Zeitraum sogar signifikant (Tabelle 10). Eine wissenschaftliche Erklärung für diesen regionalen Unterschied kann jedoch derzeit nicht gegeben werden.

In internationalen tierexperimentellen Studien fanden sich bis dato nur sehr vereinzelt fluoreszenzmikroskopische Daten zur KNR beziehungsweise Bone-Mineral-Apposition-Rate (BMAR). In der oben erwähnten Untersuchung von Hönig et al. lagen die Ergebnisse im Durchschnitt bei 1,2 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ [35]. In der Studie von Nkenke et al. 2003 an im Unterkiefer von Minischweinen inserierten unbelasteten und belasteten Titanimplantaten fielen die BMAR-Werte innerhalb des Beobachtungszeitraumes von der 2. bis 14. Woche post implantationem von 1,8 auf 1,6 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ [66]. Eine weitere Studie zum Knochenmetabolismus an Minipigs führten

Piert et al. 2001 durch und erzielten eine durchschnittliche BMAR von $1,8 \mu\text{m}/\text{Tag}$ [139]. Alle aufgeführten Ergebnisse liegen geringfügig unter den ermittelten Werten an WI.TAL®-Implantaten. Inwiefern die Daten zur Knochenappositionsrate aus den tierexperimentellen Untersuchungen auf den Menschen übertragbar sind, bleibt ungewiss. Einige Autoren beschrieben, dass das Göttinger Minischwein durchaus reproduzierbare Rückschlüsse auf die beim Menschen ablaufenden Knochenbeziehungsweise Frakturheilungsprozesse bezüglich der KNR zulässt. Laut Schenk et al. 1977 und Pearce et al. 2007 liegt diese beim Menschen bei circa $0,9 \mu\text{m}/\text{Tag}$ beziehungsweise zwischen $1-1,5 \mu\text{m}/\text{Tag}$, was durchaus mit den oben genannten Ergebnissen vergleichbar zu sein scheint [35, 36, 140].

7.2.3 Diskussion der Richtung und des Zeitpunktes der Knochenneubildung

Anhand der Anordnung der Fluorochrom-Farbbanden konnte in der vorliegenden Studie ein sowohl implantatopetales (53,03 %) als auch ein implantatofugales (46,97 %) Wachstum festgestellt werden. Die direkte Anlagerung der Xylenolorange-Farbbande an die Implantatoberfläche (Abbildung 23) lässt darauf schließen, dass in diesem Fall zum Zeitpunkt der Xylenolorangeinjektion zwei Wochen post implantationem eine aktive Knochenneubildung, von der Implantatoberfläche ausgehend, begann. In den anderen Beispielen für eine Kontaktosteo-genese (Abbildung 21, 22 und 24) ist zwischen dem Implantat und der ersten Farbbande (Xylenolorange) ein geringer Abstand zu erkennen. Dieser könnte daraus resultieren, dass der Beginn der Knochenneubildung schon vor der Injektion des Xylenoloranges, das heißt vor dem Ende der zweiten Woche lag und sich der in dieser Zeit gebildete Knochen auf der Implantatoberfläche durch schwache Eigenfluoreszenzen darstellt. Andererseits ist zu überlegen, ob es sich bei einem etwas größeren Abstand, wie er teilweise an dem Implantatabschnitt in Abbildung 24 erkennbar ist, um dazwischen liegende Knochen-trabekel des ortsständigen Knochens handeln könnte. Wird eine bestimmte Implantatoberfläche auf deren osteokonduktive Eigenschaften hin untersucht, wäre es daher interessant, eine Fluoreszenzmarkierung zu einem früheren Zeitpunkt post implantationem durchzuführen, um herauszufinden, wann die Knochenneubildung ausgehend von der untersuchten Implantatoberfläche frühestmöglich einsetzt. Dies könnte zusammen mit anderen Kriterien eine Rolle für den möglichen Belastungszeitpunkt spielen. Auftreten und Zeitpunkt einer

einsetzenden Kontaktosteogenese könnten unter anderem von der Beschaffenheit der Implantatoberfläche abhängen, was im Vergleich zu der vorliegenden Studie beispielsweise auch eine Untersuchung von Piatelli et al. 1998 zeigte. Anhand ihrer ausschließlich lichtmikroskopischen Aufnahmen beschrieben die Autoren ebenfalls das Auftreten beider Wachstumsrichtungen bei der Implantateinheilung am Kaninchenfemur. Sie fanden bei maschinieren Implantaten ein implantatopetales Wachstum (Distanzosteogenese), wobei ein direkter Knochen-Implantat-Kontakt erst ab der vierten Woche post implantationem an einigen wenigen Implantatabschnitten beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigte sich an sandgestrahlten Implantatoberflächen nach bereits einer Woche ein direkter Kontakt von Osteoblasten und Ablagerung von Osteoid auf der Implantatoberfläche (Kontaktosteogenese) [57]. Fluoreszenzmikroskopische Studien zu Osseointegrationsvorgängen an dentalen Implantaten lassen sich in der internationalen Literatur nur vereinzelt finden [70, 80]. Huang et al. untersuchten beispielsweise Implantate mit einer porösen, modifizierten Titanoxidoberfläche (TiUnite™) in der Maxilla von Affen und nahmen 2, 3, 4 und 16 Wochen post implantationem eine polyfluorochrome Sequenzmarkierung vor. Die erste Markierung mit Alizarin war an keinem der 24 Implantate identifizierbar. Daraus schlossen die Autoren auf ein Wachstum neuen Knochens erst ab der dritten Woche post implantationem. Nähere Angaben zur Wachstumsrichtung wurden dabei nicht gemacht [80]. Eckelt et al. 2007 beschichteten die zu untersuchenden Implantatoberflächen mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix (Kollagen und Chondroitinsulfat). Insgesamt wurden 120 in die Mandibula von Minischweinen inserierte Titanimplantate untersucht. Fluoreszenzmikroskopisch stellten die Autoren ein sowohl implantatopetales als auch ein implantatofugales Wachstum fest, wobei ersteres deutlich überwog. Nur vereinzelt beobachteten sie eine Kontaktosteogenese, die ab der dritten Woche einsetzte. Als eine mögliche Erklärung für die aufgetretene Bandenumkehr bei der Kontaktosteogenese diskutierten Eckelt et al. die biochemischen Interaktionen zwischen der beschichteten Implantatoberfläche und den endogenen Wachstumsfaktoren beziehungsweise den bei der Implantation freiwerdenden Zytokinen. Weshalb die Kontaktosteogenese jedoch bei gleichen Oberflächeneigenschaften nur sehr vereinzelt neben der Distanzosteogenese zu finden war, konnte nicht eindeutig geklärt werden [70].

Wie bereits 1998 von Davies postuliert wurde, zeigte sich auch an den untersuchten WI.TAL®-Implantaten, dass am gleichen Ort zur gleichen Zeit die Prozesse der Distanz- und Kontaktosteogenese ablaufen können [43]. In Anbetracht dieser Ergebnisse und der dargestellten internationalen Studien stellt sich somit die Frage, welche lokalen Bedingungen gegeben sein müssen und welche Eigenschaften eine Implantatoberfläche haben sollte, um eine möglichst frühe Kontaktosteogenese und damit eine möglicherweise schnellere Osseointegration zu bewirken.

8 Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war die Untersuchung der Osseointegration von säuregeätzten WI.TAL®-Implantaten am Miniaturschwein. Fünf Tieren wurden acht Wochen nach der Extraktion der ersten Molaren insgesamt 15 der genannten Titanimplantate inseriert. Zwei, fünf und acht Wochen post implantationem fand eine polyfluorochrome Sequenzmarkierung mit Xylenolorange, Calceingrün und Alizarinrot statt. Es zeigten sich an neun Implantaten Dehiszenzen während des postoperativen Heilungsverlaufes. Nach insgesamt zwölf Wochen unbelasteter geschlossener Einheilung wurden die Implantate in Knochenblöcken entnommen. Nach der Aufbereitung der nicht entkalkten, in PMMA eingebetteten Proben wurden Dünnschliffe (40-60 μm) angefertigt. Die Bestimmung des Knochen-Implantat-Kontaktes (BIC) erfolgte lichtmikroskopisch und histomorphometrisch mit dem Axiophot-Photomikroskop. Die periimplantäre Knochenneubildungsrate (KNR) und die Wachstumsrichtung des neuen Knochens konnten fluoreszenzmikroskopisch anhand der drei Farbbanden bestimmt werden. Zur statistischen Auswertung wurden der Mann-Whitney-U-, Wilcoxon signed ranks- und der Friedman-Test herangezogen. Der durchschnittliche BIC lag bei 54,19 % (14,51-68,97 %). Im Vergleich zu den mittleren Implantatabschnitten ergaben sich cervical signifikant geringere Knochen-Implantat-Kontaktraten. Ein Einfluss von Dehiszenzen auf die Osseointegration konnte nicht nachgewiesen werden. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den BIC-Werten des Ober- und Unterkiefers. Über den Beobachtungszeitraum von der zweiten bis zur achten Woche nach Implantation betrug die durchschnittliche KNR 2,32 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ (1,76-2,82 $\mu\text{m}/\text{Tag}$). Über diesen Zeitraum schien die Geschwindigkeit der Knochenneubildung geringfügig abzunehmen. Anhand der Anordnung der Fluoreszenzbanden konnte einerseits zu 52,94 % ein implantatopetales Knochenwachstum beobachtet werden. Andererseits zeigte sich an den WI.TAL®-Implantaten zu 47,06 % ein implantatofugales Knochenwachstum, welches zum Teil vor dem Ende der zweiten postoperativen Woche einsetzte. Daher scheint die säuregeätzte Oberfläche eine gute Voraussetzung für eine schnelle Osseointegration zu bieten. Es ist nahe liegend, dass aufgrund der Parallelen bezüglich des Knochenaufbaus und der Knochenphysiologie ähnliche Osseointegrationsvorgänge bei Minischwein und Mensch zu erwarten sind.

9 Summary

The aim of this study was to examine the osseointegration of acid-etched WI.TAL®-dental implants in the miniature pig. Five animals received 15 titanium implants eight weeks after the extraction of the first molars. A polyfluorochrome sequence labeling with xylenolorange, calceingreen and alizarinred was performed two, five and eight weeks after implant placement. During the healing period dehiscences were observed at nine implants. After a total of twelve weeks of unloaded and submerged healing the implants were removed en bloc. After the processing of the undecalcified PMMA embedded samples thin ground sections (40-60 µm) were made. The histomorphometric determination of the bone-implant contact (BIC) was calculated using light microscopy (Axiophot-photo microscope, Zeiss, Jena, Germany). The periimplant bone apposition rate (KNR) and the direction bone growth were determined with the fluorescence microscope. For statistical evaluation the Mann-Whitney-U-, Wilcoxon signed ranks- and the Friedman-test were chosen. The average BIC was 54.19 % (14.51-68.97 %). There were significantly lower bone-implant contact rates on the cervical part of the implants in comparison with the middle ones. An influence of dehiscences on the osseointegration could not be proved. There were no significant differences between the BIC values of the upper and lower jaw. During the observation period from the second to the eighth week after implantation the average KNR was 2.32 µm/day (1,76-2,82 µm/day). During this period the amount of new bone growth decreased insignificantly. Based on the sequence of the polyfluorochrome labeling on the one hand it could be observed an implantopetal bone formation (53,03 %), i.e. new periimplant bone growth starting from the resident bone. On the other hand the WI.TAL®-implants showed an implantofugal growth (46,97 %), i.e. growth starting from the surface of the implant, which partly began before the end of the second week after operation. Therefore the acid-etched surface seems to offer a good condition for a fast osseointegration. Due to the parallels of bone structure and physiology it can be also expected that the processes of osseointegration in minipigs and in human beings are similar.

10 Literaturverzeichnis

1. Jokstad A, Braegger U, Brunski JB, et al. Quality of dental implants. *Int Dent J* 2003; 53: 409-43.
2. Puleo DA, Thomas MV. Implant surfaces. *Dent Clin North Am* 2006; 50: 323-38.
3. Ring ME. *Geschichte der Zahnmedizin*. Könenmann Verlagsgesellschaft 1997: 17.
4. Worthington P, Lang BR, La Velle WE. Osseointegration in dentistry. An Introduction. Quintessence Publ. Co. 1994: 11.
5. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 2001; 10: 96-101.
6. Lemons JE. Dental implant biomaterials. *J Am Dent Assoc* 1990; 121: 716-9.
7. Koeck B, Wagner W. *Implantologie*. Urban & Fischer, München, Jena 2004: 62.
8. Reichenbach E, Naucke R. The implantation of metallic braces for dental prosthetic purposes. *Zentralbl Chir* 1955; 80: 769-78.
9. Pruin EH. Long experience with implants. *Quintessenz* 1974; 25: 13-22.
10. Wataha JC. Materials for endosseous dental implants. *J Oral Rehabil* 1996; 23: 79-90.
11. Greenfield EJ. Implantation of artificial crown and bridge abutments. 1913. *Int J Oral Implantol* 1991; 7: 63-8.
12. Linkow LI. The blade vent - a new dimension in endosseous implants. *Dent Concepts* 1968; 11: 3.
13. Linkow LI. Clinical evaluation of the various designed endosseous implants. *J Oral Implant Transplant Surg* 1966; 12: 35-46.
14. Koch WL. Statistical evaluation of success and reasons for failure in 700 endosseous blade implants done in the office. *Orale Implantol* 1974; 1: 105-38.
15. Brånemark PI. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent* 1983; 50: 399-410.
16. Brånemark PI, Adell R, Breine U, et al. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1969; 3: 81-100.
17. Schroeder A, Pohler O, Sutter F. [Tissue reaction to an implant of a titanium hollow cylinder with a titanium surface spray layer]. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd* 1976; 86: 713-27.
18. Spiekermann H. *Enossale Implantate in der Zahnheilkunde. Klinische Erfahrungen und tierexperimentelle Untersuchungen*. Med Habil Düsseldorf 1977.
19. Tetsch P. [Current status of endosseous implantology in dental medicine]. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 1985; 95 Spec No: 818-22.
20. Tetsch P. [Endosseous implants in the jaw: indications and contraindications]. *Tidsskr Tandlaeger* 1985: 114-6.
21. Albrektsson T, Wennerberg A. The impact of oral implants - past and future, 1966-2042. *J Can Dent Assoc* 2005; 71: 327.

22. Schnitman PA, Shulman LB. Recommendations of the consensus development conference on dental implants. *J Am Dent Assoc* 1979; 98: 373-7.
23. Zarb GA. Proceedings of the Toronto conference on osseointegration in clinical dentistry. *J Prosthet Dent* 1983; 49 and 50: 1-84.
24. Garg KA. Knochen-Biologie, Gewinnung, Transplantation in der zahnärztlichen Implantologie. Quintessenz Verlag-GmbH 2006: 3-20.
25. Lekholm U, Zarb GA. Patientenselektion und Aufklärung der Patienten; in Brånemark, PI, Zarb GA, Albrektsson, T (Hrsg.): *Gewebeintegrierter Zahnersatz. Osseointegration in klinischer Zahnheilkunde*. Quintessence 1985: 195-205.
26. Misch CE. Bone classification, training keys to implant success. *Dent Today* 1989; 8: 39-44.
27. Truhlar RS, Orenstein IH, Morris HF, Ochi S. Distribution of bone quality in patients receiving endosseous dental implants. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55: 38-45.
28. Marx RE, Garg AK. Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. *Implant Dent* 1998; 7: 267-76.
29. Hees H, Sinowatz F. *Histologie-Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. Deutscher Ärzte-Verlag Köln 2000: 133-37.
30. Lind M. Growth factors: possible new clinical tools. A review. *Acta Orthop Scand* 1996; 67: 407-17.
31. Mundy GR. Local control of bone formation by osteoblasts. *Clin Orthop Relat Res* 1995: 19-26.
32. Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologie*. Springer-Verlag 2005: 438-452.
33. Mundy GR. Bone remodeling. In: Mundy, GR (ed). *Bone remodeling and its disorders*, ed 2. London: Martin Dunitz. 1999: 1-11.
34. Wissing H, Stürmer KM, Breidenstein G. Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspecies für experimentelle Untersuchungen am Knochen. *Hefte zur Unfallheilkunde* 1990: 479-488.
35. Hönig JF, Merten HA. Das Göttinger Miniaturschwein (GMS) als Versuchstier in der human-medizinischen osteologischen Grundlagenforschung. *Z Zahnärztl Implantol* 1993; 9: 244-254.
36. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, P. SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur cell materials* 2007; 13: 1-10.
37. Hale TM, Boretsky BB, Scheidt MJ, et al. Evaluation of titanium dental implant osseointegration in posterior edentulous areas of micro swine. *J Oral Implantol* 1991; 17: 118-24.
38. Mosekilde L. Assessing bone quality-animal models in preclinical osteoporosis research. *Bone* 1995; 17: 343-52.
39. Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl* 1977; 16: 1-132.
40. Schulman LB. Surgical considerations in implant dentistry. *J Dent Educ* 1988; 52: 712-20.

41. Zarb GA, Schmitt A. Osseointegration and the edentulous predicament. The 10-year-old Toronto study. *Br Dent J* 1991; 170: 439-44.
42. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ* 2003; 67: 932-49.
43. Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont* 1998; 11: 391-401.
44. Osborn JF, Newesley H. Dynamics aspects of the implant - bone interface. In Heimke, G (ed). *Dental Implants - Materials and Systems*. Munich: Carl Hanser 1980: 111-23.
45. Schenk RK, Buser D. Osseointegration: a reality. *Periodontol 2000* 1998; 17: 22-35.
46. Brånemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. *Gewebeintegrierter Zahnersatz - Osseointegration in klinischer Zahnheilkunde*. Quintessenz Verlag-GmbH 1985: 11-76.
47. Bagambisa FB, Kappert HF, Schilli W. Cellular and molecular biological events at the implant interface. *J Craniomaxillofac Surg* 1994; 22: 12-7.
48. Walter JB. Wound healing. *J Otolaryngol* 1976; 5: 171-6.
49. Cooper LF, Masuda T, Yliheikkila PK, Felton DA. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part II. In vitro studies. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998; 13: 163-74.
50. Neukam FW, Hausamen JE, Scheller H. Möglichkeiten und Grenzen der Implantologie beim älteren Menschen. *Dtsch Zahnärztl Z* 1989; 44: 490.
51. Neukam FW, Scheller H, Günay H. Experimentelle und klinische Untersuchung zur Auflagerungsplastik in Kombination mit enossalen Implantaten. *Z Zahnärztl Implantol* 1989; 5: 235.
52. Zarb GA, Albrektsson T. Osseointegration - a requiem for the periodontal ligament? *Int J Periodontics Restorative Dent* 1991; 11: 88-91.
53. Davies JE, Park JY. Critical issues in endosseous periimplant wound healing. In: Ellingsen J, ed. *Bioimplant interface: improving biomaterials and tissue reactions*. Boca Raton, FL: CRC Press 2003.
54. Davies JE. In vitro modeling of the bone/implant interface. *Anat Rec* 1996; 245: 426-45.
55. Albrektsson T, Johansson CB, Sennerby L. Biological aspects of implant dentistry: osseointegration. *Periodontol 2000* 1994; 4: 58-73.
56. Steflik DE, Corpe RS, Lake FT, et al. Ultrastructural analyses of the attachment (bonding) zone between bone and implanted biomaterials. *J Biomed Mater Res* 1998; 39: 611-20.
57. Piattelli A, Manzon L, Scarano A, Paolantonio M, Piattelli M. Histologic and histomorphometric analysis of the bone response to machined and sandblasted titanium implants: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998; 13: 805-10.
58. Kasemo B, Gold J. Implant surfaces and interface processes. *Adv Dent Res* 1999; 13: 8-20.
59. Buchter A, Joos U, Wiesmann HP, Seper L, Meyer U. Biological and biomechanical evaluation of interface reaction at conical screw-type implants. *Head Face Med* 2006; 2: 5.

60. Cooper LF. A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. *J Prosthet Dent* 2000; 84: 522-34.
61. Schwartz Z, Kieswetter K, Dean DD, Boyan BD. Underlying mechanisms at the bone-surface interface during regeneration. *J Periodontal Res* 1997; 32: 166-71.
62. Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand* 1981; 52: 155-70.
63. Lioubavina-Hack N, Lang NP, Karring T. Significance of primary stability for osseointegration of dental implants. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17: 244-50.
64. Raghavendra S, Wood MC, Taylor TD. Early wound healing around endosseous implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20: 425-31.
65. Rimondini L, Bruschi GB, Scipioni A, et al. Tissue healing in implants immediately placed into postextraction sockets: a pilot study in a mini-pig model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 100: e43-50.
66. Nkenke E, Lehner B, Weinzierl K, et al. Bone contact, growth, and density around immediately loaded implants in the mandible of mini pigs. *Clin Oral Implants Res* 2003; 14: 312-21.
67. Abrahamsson I, Zitzmann NU, Berglundh T, Wennerberg A, Lindhe J. Bone and soft tissue integration to titanium implants with different surface topography: an experimental study in the dog. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001; 16: 323-32.
68. Buser D, Broggini N, Wieland M, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res* 2004; 83: 529-33.
69. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, et al. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 1991; 25: 889-902.
70. Eckelt U, Pilling E, Mai R, et al. Beschleunigte Osseointegration durch Implantatbeschichtungen mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix. *Z Zahnärztl Implantol* 2007; 23: 101-110.
71. Zechner W, Tangl S, Furst G, et al. Osseous healing characteristics of three different implant types. *Clin Oral Implants Res* 2003; 14: 150-7.
72. Ericsson I, Johansson CB, Bystedt H, Norton MR. A histomorphometric evaluation of bone-to-implant contact on machine-prepared and roughened titanium dental implants. A pilot study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 1994; 5: 202-6.
73. Arvidson K, Bystedt H, Ericsson I. Histometric and ultrastructural studies of tissues surrounding Astra dental implants in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1990; 5: 127-34.
74. Novaes AB Jr, Souza SL, de Oliveira PT, Souza AM. Histomorphometric analysis of the bone-implant contact obtained with 4 different implant surface treatments placed side by side in the dog mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17: 377-83.
75. Xiropaidis AV, Qahash M, Lim WH, et al. Bone-implant contact at calcium phosphate-coated and porous titanium oxide (TiUnite)-modified oral implants. *Clin Oral Implants Res* 2005; 16: 532-9.

76. Cordioli G, Majzoub Z, Piattelli A, Scarano A. Removal torque and histomorphometric investigation of 4 different titanium surfaces: an experimental study in the rabbit tibia. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000; 15: 668-74.
77. Ellingsen JE, Johansson CB, Wennerberg A, Holmen A. Improved retention and bone-to-implant contact with fluoride-modified titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004; 19: 659-66.
78. Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B, Krol JJ. A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. *Clin Oral Implants Res* 1995; 6: 24-30.
79. Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B. Bone tissue response to commercially pure titanium implants blasted with fine and coarse particles of aluminum oxide. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996; 11: 38-45.
80. Huang YH, Xiropaidis AV, Sorensen RG, et al. Bone formation at titanium porous oxide (TiUnite) oral implants in type IV bone. *Clin Oral Implants Res* 2005; 16: 105-11.
81. Cehreli M, Sahin S, Akca K. Role of mechanical environment and implant design on bone tissue differentiation: current knowledge and future contexts. *J Dent* 2004; 32: 123-32.
82. Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, Triplett RG, Woody RD. Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000; 15: 675-90.
83. Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1986; 1: 11-25.
84. Williams DF. Implants in dental and maxillofacial surgery. *Biomaterials* 1981; 2: 133-46.
85. Abrahamsson I, Cardaropoli G. Peri-implant hard and soft tissue integration to dental implants made of titanium and gold. *Clin Oral Implants Res* 2007; 18: 269-74.
86. Triplett RG, Froberg U, Sykaras N, Woody RD. Implant materials, design, and surface topographies: their influence on osseointegration of dental implants. *J Long Term Eff Med Implants* 2003; 13: 485-501.
87. Adell R, Eriksson B, Lekholm U, Brånemark PI, Jemt T. Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1990; 5: 347-59.
88. Buser D, Belser U. Fortschritte und aktuelle Trends in der oralen Implantologie. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 1998; 108: 327-342.
89. Lautenschlager EP, Monaghan P. Titanium and titanium alloys as dental materials. *Int Dent J* 1993; 43: 245-53.
90. Meffert RM, Langer B, Fritz ME. Dental implants: a review. *J Periodontol* 1992; 63: 859-70.
91. Schliephake H, Neukam FW, Urban R. Titanbelastung parenchymatöser Organe nach Insertion von Titanschraubenimplantaten. *Z Zahnärztl Implantol* 1989; 5: 180-184.

92. Weingart D, Steinemann S, Schilli W, et al. Titanium deposition in regional lymph nodes after insertion of titanium screw implants in maxillofacial region. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1994; 23: 450-2.
93. Bianco PD, Ducheyne P, Cuckler JM. Local accumulation of titanium released from a titanium implant in the absence of wear. *J Biomed Mater Res* 1996; 31: 227-34.
94. Joos U, Vollmer D, Kleinheinz J. Einfluss der Implantatgeometrie auf die Strainverteilung im periimplantären Knochen. *Mund Kiefer GesichtsChir* 2000; 4: 143-147.
95. Jansen VK, Conrads G, Richter EJ. Microbial leakage and marginal fit of the implant-abutment interface. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997; 12: 527-40.
96. Hansson S. Implant-abutment interface: biomechanical study of flat top versus conical. *Clin Implant Dent Relat Res* 2000; 2: 33-41.
97. Abrahamsson I, Berglundh T, Moon IS, Lindhe J. Peri-implant tissues at submerged and non-submerged titanium implants. *J Clin Periodontol* 1999; 26: 600-7.
98. Steigenga JT, al-Shammari KF, Nociti FH, Misch CE, Wang HL. Dental implant design and its relationship to long-term implant success. *Implant Dent* 2003; 12: 306-17.
99. Ivanoff CJ, Gröndahl K, Sennerby L, Bergström C, Lekholm U. Influence of variations in implant diameters: a 3- to 5-year retrospective clinical report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14: 173-80.
100. Hansson S. The implant neck: smooth or provided with retention elements. A biomechanical approach. *Clin Oral Implants Res* 1999; 10: 394-405.
101. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont* 2004; 17: 536-43.
102. Massaro C, Rotolo P, De Riccardis F, Milella E, Napoli A. Comparative investigation of the surface properties of commercial titanium dental implants. Part I: chemical composition. *J Mater Sci Mater Med* 2002; 13: 535-48.
103. Zinger O, Anselme K, Denzer A, et al. Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. *Biomaterials* 2004; 25: 2695-711.
104. Sader MS, Balduino A, Soares Gde A, Borojevic R. Effect of three distinct treatments of titanium surface on osteoblast attachment, proliferation, and differentiation. *Clin Oral Implants Res* 2005; 16: 667-75.
105. Brunette DM, Chehroudi B. The effects of the surface topography of micromachined titanium substrata on cell behavior in vitro and in vivo. *J Biomech Eng* 1999; 121: 49-57.
106. Cochran DL, Simpson J, Weber H, Buser D. Attachment and growth of periodontal cells on smooth and rough titanium. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994; 9: 289-97.
107. Mühlemann HR. Zur Mikrostruktur der Implantatoberfläche. *Schweiz Monatsschr Zahnheilk* 1975; 85: 97-112.
108. Thomas KA, Cook SD. An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. *J Biomed Mater Res* 1985; 19: 875-901.

109. Gotfredsen K, Berglundh T, Lindhe J. Anchorage of titanium implants with different surface characteristics: an experimental study in rabbits. *Clin Implant Dent Relat Res* 2000; 2: 120-8.
110. Wennerberg A, Hallgren C, Johansson C, Danelli S. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clin Oral Implants Res* 1998; 9: 11-9.
111. Abrahamsson I, Berglundh T, Linder E, Lang NP, Lindhe J. Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 2004; 15: 381-92.
112. Grassi S, Piattelli A, de Figueiredo LC, et al. Histologic evaluation of early human bone response to different implant surfaces. *J Periodontol* 2006; 77: 1736-43.
113. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 2--review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *Int J Prosthodont* 2004; 17: 544-64.
114. Cooper LF, Deporter D, Wennerberg A, Hammerle C. What physical and/or biochemical characteristics of roughened endosseous implant surfaces particularly enhance their bone-implant contact capability? *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20: 307-12.
115. Knoche H. Leitfaden der histologischen Technik. Gustav Fischer Verlag 1979: 140-142.
116. Rahn BA. Die polychrome Sequenzmarkierung. *Nova Acta Leopoldina* 1976; 44: 249.
117. Rahn BA, Bacellar FC, Trapp L, Perren SM. [A method for morphometry of bone formation using fluorochromes (author's transl)]. *Aktuelle Traumatol* 1980; 10: 109-15.
118. Milch RA, Rall DP, Tobie JE. Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone. *J Bone Joint Surg Am* 1958; 40: 897-910.
119. Rahn BA, Perren SM. [Alizarin complexon-fluorochrome for bone and dentine labeling]. *Experientia* 1972; 28: 180.
120. Suzuki HK, Mathews A. Two-color fluorescent labeling of mineralizing tissues with tetracycline and 2,4-bis[N,N' - di-(carbomethyl)aminomethyl] fluorescein. *Stain Technol* 1966; 41: 57-60.
121. Gabler F. Fluoreszenzmikroskopie. *Biologie unserer Zeit* 2005; 2: 1-7.
122. Rahn BA, Perren SM. Xylenol orange, a fluorochrome useful in polychrome sequential labeling of calcifying tissues. *Stain Technol* 1971; 46: 125-9.
123. Sambras HH. Atlas der Nutztierassen. 2001.
124. Beglinger R, Becker M, Eggenberger E, Lombard C. Das Göttinger Miniaturschwein als Versuchstier. *Res Exp Med* 1975; 165: 251.
125. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 1982; 11: 318-26.
126. Burkhardt R. Farbatlas der klinischen Histopathologie von Knochenmark und Knochen. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1970: 8-11.
127. van der Lubbe HB, Klein CP, de Groot K. A simple method for preparing thin (10 microM) histological sections of undecalcified plastic embedded bone with implants. *Stain Technol* 1988; 63: 171-6.

128. Kruttsay M. Methode zur Darstellung einzelner Kalziumverbindungen in histologischen Schnitten. *Acta histochem* 1963; 15: 189-191.
129. Brunner E, Dornhof S, Langer F. Nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. Wiley New York 2002.
130. Olsen ML, Aaboe M, Hjorting-Hansen E, Hansen AK. Problems related to an intraoral approach for experimental surgery on minipigs. *Clin Oral Implants Res* 2004; 15: 333-8.
131. Buser D, Nydegger T, Hirt HP, Cochran DL, Nolte LP. Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998; 13: 611-9.
132. Buser D, Nydegger T, Oxland T, et al. Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 1999; 45: 75-83.
133. Albrektsson T, Lekholm U. Osseointegration: current state of the art. *Dent Clin North Am* 1989; 33: 537-54.
134. Piattelli A, Piattelli M, Mangano C, Scarano A. A histologic evaluation of eight cases of failed dental implants: is bone overheating the most probable cause? *Biomaterials* 1998; 19: 683-90.
135. Gotfredsen K, Budtz-Jorgensen E, Jensen LN. A method for preparing and staining histological sections containing titanium implants for light microscopy. *Stain Technol* 1989; 64: 121-7.
136. Röser K, Johansson C, Donath K, Albrektsson T. A new approach to demonstrate cellular activity in bone formation adjacent to implants *J Biomed Mater Res* 2000; 51: 280-91.
137. Lezzi G, Degidi M, Scarano A, Perrotti V, Piattelli A. Bone response to submerged, unloaded implants inserted in poor bone sites: a histological and histomorphometrical study of 8 titanium implants retrieved from man. *J Oral Implantol* 2005; 31: 225-33.
138. Trisi P, Rao W, Rebaudi A. A histometric comparison of smooth and rough titanium implants in human low-density jawbone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14: 689-98.
139. Piert M, Zittel TT, Becker GA, et al. Assessment of porcine bone metabolism by dynamic. *Journal of Nuclear Medicine* 2001; 42: 1091-100.
140. Schenk RK, Willenegger K. Zur Histologie der primären Knochenheilung. *Unfallheilkd* 1977; 80: 155.

11 Abkürzungen

Å	Angström
Al ₂ O ₃	Aluminiumoxid
BIC	Bone-Implant-Contact
BMAR	Bone-Mineral-Apposition-Rate
BMP	Bone Morphogenetic Protein
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calciumionen
DGZMK	Deutsche Gesellschaft für Zahn- Mund- und Kieferheilkunde
FGF	Fibroblast Growth Factor
g	Gramm
Gpa	Gigapascal
HA	Hydroxylapatit
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin/Eosin
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
kg	Kilogramm
i.e.	id est (Latein) - das heißt
IGF	Insulin-Like Growth Factor
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
KNR	Knochenneubildungsrate
l	Liter
max.	maximal

mg	Milligramm
mm	Millimeter
μm	Mikrometer
ml	Milliliter
MPa	Megapascal
mval	Millival
Ncm	Newtonzentimeter
nm	Nanometer
PD	Privatdozent/in
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PMMA	Polymethylmetacrylat
PO_4^{3-}	Phosphationen
SLA	sand-blasted, large grit, acid-etched
TGF	Transforming Growth Factor
TiO_2	Titanoxid
U/min	Umdrehung pro Minute
UV	ultraviolett

12 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. Bodo Hoffmeister danke ich für die Möglichkeit der Nutzung der Forschungseinrichtung.

Frau PD Dr. Katja Nelson danke ich sehr für die hilfreiche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Sie führte die chirurgischen Eingriffe durch und betreute das Vorhaben bis zum Schluss.

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. Christian Große-Siestrup, Leiter der tierexperimentellen Einrichtung des Rudolf-Virchow-Klinikums der Charité Berlin.

Frau Ute Kruse-Boitschenko gilt mein besonderer Dank für die Mitorganisation und die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der labortechnischen Arbeiten.

Frau Dr. Bärbel Rühle danke ich für die Betreuung bei der Durchführung der tierexperimentellen Versuche.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. J. Radlanski, der mir die Möglichkeit gab, die klinischen Einrichtungen zur Anfertigung der Dünnschliffe zu nutzen und insbesondere Frau Margret Dilger, die mir dabei stets mit gutem Rat zur Seite stand.

Frau Gerda Siebert danke ich herzlichst für die Unterstützung bei den statistischen Berechnungen.

Mein Dank gilt Andreas Lutter für seine ständige Bereitschaft zur Beantwortung von Fragen hinsichtlich der digitalen Bildaufnahme und -auswertung.

Rüdiger Meyer danke ich für die Beantwortung meiner Fragen zum WI.TAL®-Implantatsystem.

Meinem Freund Andreas danke ich für seine Aufmunterungen und seinen Ansporn. Ohne ihn wäre die Arbeit nicht so schnell fertig geworden.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern bedanken, die mir meine Ausbildung ermöglicht haben und die Durchführung dieses Projektes mit großem Interesse verfolgten.

13 Lebenslauf

In der elektronischen Version meiner Promotionsarbeit wird der Lebenslauf aus Datenschutzgründen nicht veröffentlicht.

14 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Katja Bayreuther, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

Eine fluoreszenz- und lichtmikroskopische Untersuchung der Osseointegration von WI.TAL®-Implantaten am Schweinekiefer

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“