

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Implantatprüfkörper**

Es wurden insgesamt 120 Prüfkörper aus Ti<sup>o</sup>4 mit einem Durchmesser von 4 mm hergestellt. Die Proben hatten eine Gesamtlänge von 20 mm. Die Gestaltung, d.h. die Einteilung in einen Träger und einen 8 mm langen Implantatprüfkörper, erlaubte ein Einspannen in ein Bohrfutter auf der einen Seite, um die Prüfkörper oberflächlich bearbeiten zu können. Die Verbindung zwischen dem Halteelement und dem eigentlichen Prüfkörper wurde als Sollbruchstelle präpariert, so dass nach Implantation das Halteelement durch Brechen vom Implantatprüfkörper getrennt werden konnte. Es wurde eine Teilung in Gruppen zu je 40 Prüfkörpern vorgenommen, um diese dann entsprechend der Aufgabenstellung oberflächlich bearbeiten zu können.

Folgende drei Varianten der Oberflächenbearbeitung wurden vorbereitet:

1. Maschinenbearbeitet,
2. abgestrahlt mit Korund (Korox) (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>),
3. abgestrahlt mit Biokeramik (GB14/AP40).

Die Bearbeitung der Oberfläche erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie im Produktionsprozess für die Herstellung des Semados-Implantats. Das Strahlgut wurde mit einem Druck von 4 bar auf die Oberfläche mit Hilfe eines Luftstroms transportiert. Der Arbeitsabstand betrug 1cm. Sämtliches Strahlgut wurde nur als Einwegmaterial verwendet, um Verunreinigungen durch metallischen Abtrag zu vermeiden. Um eine gleichmäßige Bearbeitung zu realisieren, wurden die Proben mit einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 50 U/min bewegt. Die Bearbeitung erfolgte so lange, bis ein gleichmäßiger optischer Eindruck der veränderten Oberfläche gegeben war (Abb. 3).

Anschließend wurden die Proben verpackt und einer Sterilisierung durch Gammastrahlen zugeführt. Die Verpackung der Probekörper wurde farblich so gestaltet, dass keine Verwechslungen möglich waren.

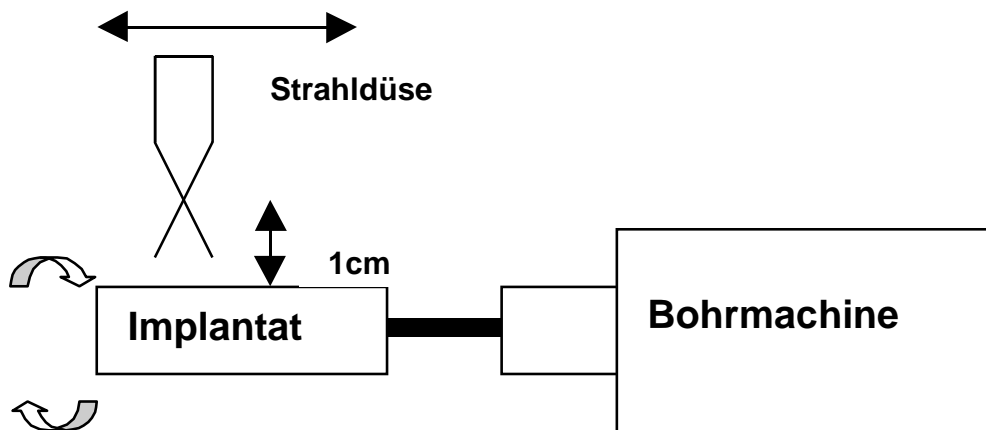


Abb. 3: Schematische Darstellung der Oberflächenbearbeitung mit Strahlgut

Für die Untersuchungen standen dann farblich unterschiedlich gekennzeichnete, sterilisierte Implantatprüfkörper zur Verfügung (Abb. 4, Tab. 6).

Die Farben hatten folgende Bedeutung:

- weiß: unbehandelt (machined),
- rot: mit Korund (Korox) abgestrahlt,
- blau: mit Biokeramik (GB14/AP40) abgestrahlt.



Abb. 4: Fertiggestellte Probeimplantate in der Verpackung nach der Sterilisation

Tab. 6: Kennzeichnung der Probenserien

Prüfkörper blank (unbehandelt)	Prüfkörper gestrahlt (GB14/AP40)	Prüfkörper gestrahlt (Korox 110)
LOT 94453	LOT 94125	LOT 94124
sterile R	sterile R	sterile R
1998-11	1998-11	1998-11
CE0044	CE 0044	CE 0044

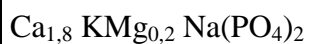
### 2.1.2 Strahlgut

Zur Bearbeitung, d.h. Modifizierung der Implantatoberfläche wurde zum einen Korund und zum anderen ein Biokeramikgemisch eingesetzt.

Edelkorund ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) ist chemisch inert und wird sehr rein als Strahlmittel eingesetzt. Für diese Untersuchungen wurde Korund der Fa. Bego (Bremen), Handelsname Korox, mit einer mittleren Korngröße von 110  $\mu\text{m}$  verwendet.

Das patentierte Biokeramikgemisch bestand aus GB14 und AP40.

Die Biokeramik GB14 kann mit folgender stöchiometrischen Formel beschrieben werden:



AP40 ist ein Gemisch aus Hydroxylapatit und/oder Fluorapatit und Wollastonit (Tab. 7).

Tab. 7: Zusammensetzung der Biokeramik AP40

Verbindung	Anteil [Gew.%]
$\text{SiO}_2$	45 – 50
$\text{Na}_2\text{O}$	0 – 5
$\text{CaO}$	15 – 25
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	20 – 30
$\text{MgO}$	0 – 5
$\text{K}_2\text{O}$	0 – 3
$\text{CaF}_2$	0 – 6

Die unterschiedlichen Zusammensetzungen von GB14 und AP40 bedingen unterschiedliche Eigenschaften und somit auch Unterschiede im Löslichkeitsverhalten. So gehört GB14 zu den resorbierbaren und AP40 zu den stabilen Biokeramiken.

Beide Materialien wurden im Fachbereich Biokeramiken der Bundesanstalt für Materialforschung (BAM) unter der Leitung von Dr. sc. G. Berger (1992-1994) entwickelt.

Bisher wurden diese Materialien für folgende Einsatzgebiete getestet und untersucht:

- Implantate, in diesem Falle reiner Keramikimplantate,
- Knochenersatzmaterialien zum Auffüllen von Knochendefekten.

Erste tierexperimentelle Untersuchungen mit diesen Materialien wurden von Köhler und Retemeyer (1981) durchgeführt.

In Untersuchungen zur Biokompatibilität, wie der Testung der Zellcytotoxizität im Kontakt mit Tumorzellen, dem Agardiffusionstest, dem MTT-Test sowie im Kontakt mit Osteoblastenkulturen wurden AP40 und GB14 sehr positiv bewertet (Berger 1992-1994). Die Löslichkeit von GB14 liegt bei ca. 500 mg/l im Gegensatz zu Hydroxylapatit mit ca. 7mg/l.

Das Löslichkeitsverhalten entsprechender Ti-Prüfkörper wurde von Pischzik (1999) untersucht. Für diese Untersuchungen wurden Ti-Plättchen mit einer Fläche von 10 x 15 mm und einer Dicke von 1 mm mit der Biokeramik GB14 abgestrahlt und 7 Tage in 1% NaCl gelagert. Anschließend wurde die Lösung mit Hilfe der Atom-Absorptions-Spektrometrie analysiert. Im Falle der GB14 Modifizierung ist eine deutlich erhöhte Ca-Ionen Konzentration in der Lösung nachweisbar.

Die Korngrößenverteilung ist dem Protokoll der Teilchengrößenbestimmung zu entnehmen. Der Schwerpunkt liegt bei 50 µm, siehe Anhang.

## 2.2 Methoden

Zu Beginn der Versuche wurde eine Bewertung des Ausgangszustandes vor Implantation vorgenommen. Dazu erfolgte die Bestimmung der Oberflächenstruktur (Rauheit) und -zusammensetzung der Proben. Ebenfalls zu Beginn sowie nach einer Liegezeit von 7, 28 und 84 Tagen erfolgten lichtmikroskopische (LM) und rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen der Schnitte.

Im Verlauf wurde eine Bewertung des Metall-Knochen-Kontakts (MBC) in Abhängigkeit vom Bearbeitungszustand der Implantatoberfläche und der Liegezeit vorgenommen. Die zylindrischen Prüfkörper wurden deshalb nach einer Liegezeit von 7, 28 und 84 Tagen in der distalen Epiphyse des Femurs vom Kaninchen histologisch und morphometrisch untersucht.

Schließlich erfolgte nach 84 Tagen Liegezeit eine Analyse der Zugfestigkeit in Abhängigkeit vom Bearbeitungszustand der Implantatoberfläche und der Liegezeit (Abb. 5).

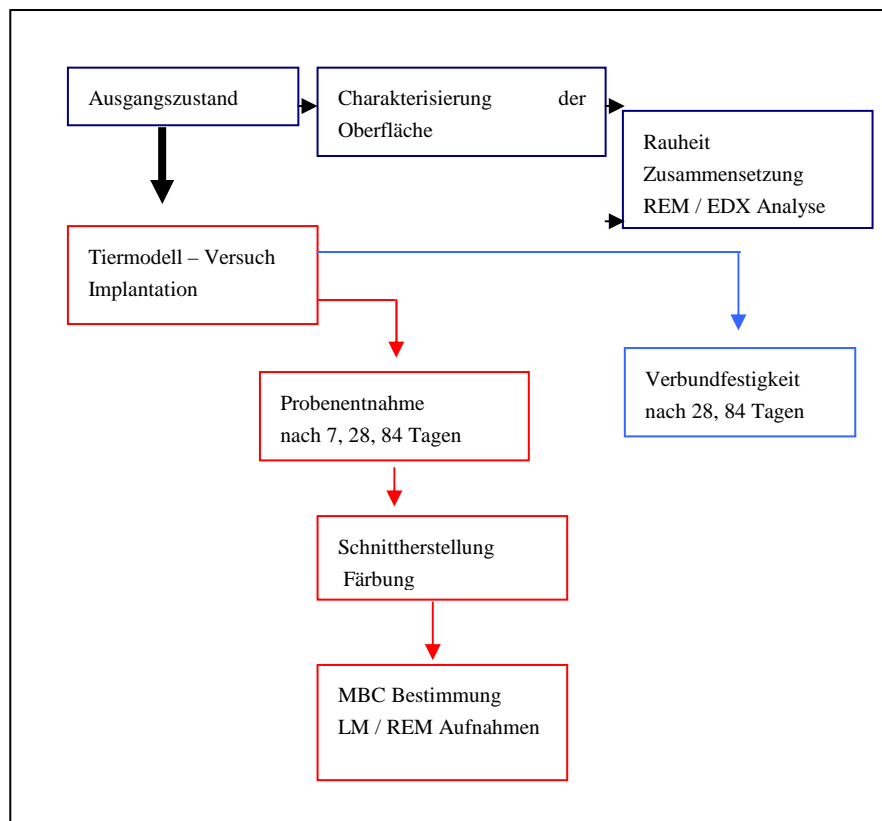


Abb. 5: Schematische Darstellung des Untersuchungsablaufes

### 2.2.1 Charakterisierung des Ausgangszustandes der Prüfkörper

Zur Charakterisierung des Ausgangszustandes wurden Rauheitsmessungen sowie raster-elektronenmikroskopische Aufnahmen und mikroanalytische Untersuchungen durchgeführt.

### 2.2.2 Ermittlung der Oberflächenrauheit

Die Oberflächenrauheit der bearbeiteten Probe wurde an fünf willkürlich ausgewählten Probekörpern gemessen. Es wurde die gemittelte Rautiefe  $R_z$ , der Mittenrauwert  $R_a$  und die maximale Rautiefe  $R_{max}$  ermittelt. Dafür stand ein Hommeltest (Göttingen) zur Verfügung. Der Spitzendurchmesser betrug  $10\ \mu\text{m}$ .

Je nach Möglichkeit und Gegebenheit wurde die Messstrecke zwischen 5 und 10 mm festgelegt. Die vertikale Auflösung betrug  $5\ \mu\text{m}$  je Teilstrich des Ausdruckes und die horizontale Auflösung  $250\ \mu\text{m}$  bzw.  $50\ \mu\text{m}$ . Die Daten wurden den Ausdrucken entnommen. Letztere sind im Anhang aufgeführt. Die Messungen wurden auf den drei Proben durchgeführt, die nicht in die Tierexperimente mit einbezogen wurden.

Tab. 8: Kenngrößen

Mittenrauwert $R_a$	$R_a = -1/lm \int y(x) dx$	arithmetisches Mittel der absoluten Beträge aller Abstände des Profiles über die Gesamtmessstrecke
Gemittelte Rautiefe $R_z$	$R_z = 1/5 \sum z_i (i=1....5)$	Mittelwert aus fünf maximalen Einzelrautiefen
Maximale Rautiefe $R_{max}$		Abstand zwischen dem höchsten und dem tiefsten Punkt der Messstrecke

### Analytische Betrachtung zur Oberflächenmodifizierung:

Dazu wurden mikroskopische Aufnahmen am Lichtmikroskop mit Hilfe des verkehrten Auflichtmikroskops Metaval (CZ Jena) und rasterelektronenmikroskopische Betrachtungen am Stereoscan S 360 (Cambridge Instruments) durchgeführt. Das Rasterelektronenmikroskop bot durch den EDX-Zusatz (energiedispersive Röntgenstrahlanalyse) die Möglichkeit, Mikroanalysen bezüglich der Elementverteilung und Menge durchführen zu können. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen wurden nur zur Kontrolle bzw. vergleichenden Bewertung der messbaren Effekte herangezogen. Die ESMA Untersuchungen (Elektronenstrahlmikroanalyse) dienten der Bewertung möglicher Elementverteilungen und Veränderungen, der Zusammensetzung an der bearbeiteten Oberfläche. Basierend auf der Tatsache, dass durch die Strahlung von Festkörpern mit Elektronenstrahlen charakteristische Röntgenstrahlen erzeugt werden und diese für die Analyse benutzt werden können, konnten also entsprechende Zusammensetzungs- und Verteilungscharakteristika als Merkmal für die jeweilige behandelte Oberfläche erhalten werden.

### **2.2.3 Tiermodell**

Es wurden 32 weibliche Chinchilla-Kaninchen, Stamm CH bb-CH für die Untersuchungen genutzt.

Als Futter wurde Altromin Standarddiät (Fa. Altromin, Lage, Lippe) und Leitungswasser ad libitum gegeben. Die Tiere konnten sich nach der Op frei bewegen so dass eine vergleichbare Belastung der Implantate gewährleistet werden konnte.

Nach der Lieferung der Tiere wurden sie eine Woche an ihre neue Umgebung gewöhnt, auch um eventuelle Infektionen ausschließen zu können.

### Operation:

In allgemeiner Anästhesie mit Ketanest, 6 ml und Rompun, 3 ml in der Mischspritze wurden die Tiere im Bereich der Oberschenkel, Knie und Unterschenkel rasiert, mit Braunoderm-Lösung desinfiziert und abgedeckt. Über einen medialen Zugang wurde das Kniegelenk eröffnet, die Patella luxiert und mit dem Bohrgerät Aesculap Microtron 60 mit einem diamantierten Hohlzylinderschleifer, Durchmesser 3,95 bzw. 4,05 mm ein

Bohrloch im patellaren Gleitlager sagittal und senkrecht zur Längsachse des Femur eingebracht. Knorpel und Knochenkern wurden entfernt und das Implantat eingefügt, das Kniegelenk gespült und die Patella repositioniert. Anschließend erfolgte ein schichtweiser Wundverschluss mit Mersilen FS1/3-0 Vicryl SH1/3-0. Nach der Operation wurde Refobacin 80, 0,5 ml / Aubikal 0,5 ml zur Infektionsprophylaxe verabreicht.

Das Gewicht der Tiere lag zwischen 3000 und 4000 g.

Nach einer Liegezeit von 7, 28 und 84 Tagen wurden die Tiere in Allgemeinnarkose, siehe oben, unter CO<sub>2</sub> ad exitum gebracht und präpariert. Das distale Femur mit dem Implantat wurde entnommen und für die histologische Untersuchung aufgearbeitet.

Ferner wurden Stücke aus linkem und rechtem Herzventrikel, Lungen, Leber, Milz und Nieren in Formaldehydlösung nach Lillie, pH 7,4 fixiert und nach Entwässerung in der Alkoholreihe in Paraffin eingebettet, im Mikrotron geschnitten und mit Hämalaun und Eosin gefärbt sowie mikroskopiert.

Die Versuchsnummern und Versuchstiere sind tabellarisch aufgeführt (Tab. 9).

In Versuch 97-104 ist das Tier 1023 spontan ad exitum gekommen. Röntgenbild und histopathologische Untersuchung ergaben eine nicht mehr frische transmurale Nekrose und Ulzeration mit Perforation des Darms und nicht mehr frische eitrige und kotige Peritonitis. Die Ursache dieser Nekrose und Ulzeration ist nicht klar. Ein Zusammenhang mit der Implantation ist unwahrscheinlich.

Das Tierversuchsvorhaben wurde unter Reg.-Nr. 0241/96 von der Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales, Berlin, genehmigt.



Tab. 9: Probenbezeichnung

	7 Tage		28 Tage		84 Tage	
	Versuchsnummer	Versuchsternr.	Versuchsnummer	Versuchsternr.	Versuchsnummer	Versuchsternr.
unbehandelt	97-101	1001	97-109	1049	97-103	1013
		1002		1050		1014
		1003		1051		1015
		1004		1052		1016
		1005		1053		1017
		1006		1054		1018
Biokeramik (GB14/AP40) abgestrahlt	97-102	1007	97-107	1037	97-104	1019
		1008		1038		1020
		1009		1039		1021
		1010		1040		1022
		1011		1041		1023
		1012		1042		1024
Korund (Korox) abgestrahlt	97-105	1025	97-108	1043	97-106	1031
		1026		1044		1032
		1027		1045		1033
		1028		1046		1034
		1029		1047		1035
		1030		1048		1036

## 2.2.4 Histologie

### Schnittherstellung:

Die zylindrischen Prüfkörper wurden nach einer Liegezeit von 7, 28 und 84 Tagen in der distalen Epiphyse des Femur von Kaninchen histologisch und morphometrisch untersucht. Dafür ist die Herstellung von Sägeschnitten unerlässlich und wird im Folgenden beschrieben.

1. Entnahme des distalen Femur
2. Immersionsfixierung mit Formaldehyd nach Lillie, pH 7,4, je nach Größe 4°C, 7 Tage
3. Spülen in Leitungswasser über Nacht
4. Entwässern in aufsteigender Ethanolreihe:  
70%, 80%, 90%, 96% absolut (2x)  
Äther-Chloroform (1+1)  
Äther-Chloroform / Methylmetacrylat (1+1)  
je nach Größe bei Raumtemperatur (RT) 7 Tage
5. Infiltrieren in Methylmetacrylat / Merck 800590 (Monomer), RT 7 Tage
6. Infiltrieren in Methylmetacrylat MMA 1 Lösung, 4°C, 7 Tage  
900 ml Methylmetacrylat, Merck 800 590  
90 ml Phthalsäuredibutylester, Merck 800 919  
15 g  $\alpha$ ,  $\alpha$ -Azobisisobutyronitril, Aldrich A 9640-1 7
7. Infiltrierten in Methylmetacrylat MMA2, Lösung, 4°C, 7 Tage
8. Polymerisation: Einlegen in verschließbare Glasröhrchen mit frischem Methylmetacrylat s. Pos. 6 auffüllen bis ca. 1 cm über Knochenoberfläche und verschlossen im Brutschrank im Wasserbad aushärten lassen 38°C, 2 – 4 Tage.
9. Öffnen der Glasröhrchen unter dem Abzug und über Nacht nachhärten lassen (ev. bei 60°C trockener Hitze)
10. Zerschlagen der Glasröhrchen, Blöcke ggf. trimmen und in gewünschter Position mit Technovit 3040 (Fa. Kulzer) auf den Präparatehalter kleben.
11. Anfertigen von Sägeschnitten auf dem Sägemikrotom, Leitz 1600, beschriftete Plexiglas-Objektträger mit Instantbond (Fa. M. Langnas) auf angesägte Knochenoberfläche kleben, Schnittdicke einstellen, anschl. Sägeschnitt vom Sägeblatt nehmen, Schnitte in der Schleifmaschine polieren. Danach die Sägeschnitte in den Dünnschliffhalter einlegen und auf der Schleifmaschine mit SiC Nassschleifpapier der Körnung 1000 und 2400 schleifen. Schnitte mit 100% Ethanol abwischen.

Die verwendeten Lösungsansätze für die Schnittherstellung sind im folgenden aufgeführt:

Formalin-Ansatz nach Lillie:

1 Teil Formaldehydkonzentrat

4 Teile Aqua dest. pH 7,4

Aufbewahrung im Kühlschrank

Methylmetacrylat-Ansatz:

900 ml Methylmetacrylat (Merck 800 590)

90 ml Phthalsäuredibutylester (Merck 800 919)

15 g Alpha-alpha-azo-iso-butyronitril (Merck 12431)

Giemsa-Färbung:

Die Färbung erfolgt in frisch angesetzter, filtrierter Giemsa-Lösung über 20 – 30 Min. Anschließend werden die Proben mit Aquadest gespült.

Giemsalösungs-Ansatz:

Giemsa (Merck 9204): 25 ml gemischt mit

Sörensen-Phosphat-Puffer: 25 ml, pH 7,4

Sörensen-Phosphat-Puffer-Ansatz:

97,150 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  \*

16,525 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Salzeinwaage für pH 7,4, gelöst in 5 l Aqua dest.

Zu beachten ist, dass das Wasser vorgelegt werden sollte, um dann darin das Na-Hydrogenphosphat erst vollständig zu lösen, da sich sonst schwer lösliche Mischkristalle bilden (pH-Kontrolle)

Für 1 Liter: 21,616 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  und 3,305 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

\* bei  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ : 108,08 g einwiegen

Kossa-Kalkdarstellung kombiniert mit Paragon (für Knochen)

Zur Darstellung mineralisierter Bestandteile im Implantat-Knochen-Interface und der Bewertung des Implantat – Knochen – Kontaktes wurde die von Kossa-Paragon-Färbung genutzt.

Der Ablauf gestaltete sich wie folgt:

Schnitte	Aqua dest.	abtupfen
5%	Silbernitratlösung	10 bis 15 Min
3 x	Aqua dest.	je 5 Min
	Soda Formol Gemisch	3 bis 5 Min
	Leitungswasser (fließend)	10 Min
5%	Natrium-thiosulfat	5 Min
	Leitungswasser (fließend)	10 Min
60°	vorgewärmte Paragon-Lösung	20 bis 30 Min
	kurz abspülen in Leitungswasser	

Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungs- und Färbeansätze ist nachfolgend beschrieben.

Soda-Formol-Gemisch :

200 ml	100 ml	50 ml
10 g	5 g	2,5 g Na-Carbonat
150 ml	75 ml	37,5 ml Aqua dest
50 g	25 g	12,5 ml Formaldehyd, 37%ig

Natrium Carbonat: Merck Nr. 6392

Silbernitrat ( $\text{AgNO}_3$ ): Merck Nr. 1512, 5% in Aqua dest.

Na-thiosulfat-pentahydrat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ): Merck Nr. 6516 in 5% Aqua dest

Paragon-Lösung:

0,8 g Toluidinblau O (Merck Nr. 1273) und

0,2 g basisches Fuchsin (Merck Nr. 15973)

lösen in 100 ml 30% Ethanol (wässrig) bei 60°C

Um die Quantität der Gewebe am Interface bewerten zu können, wurden die Schnitte morphometriert. Dafür wurde zunächst die Länge des Interfaces zwischen Metall und Gewebe, d.h. der Umfang des Implantatschnittes, gemessen. Anschließend wurde der Prozentsatz von Knochen, Osteoid, Chondroid und Weichgewebe am Interface bestimmt.

### **2.2.5 Verbundfestigkeit**

Die Festigkeit des Implantatknochenverbundes wurde nach 28 und 84 Tagen Liegezeit, sowie unmittelbar nach der Operation, in einem Zeitraum bis zu 4 Stunden danach bestimmt. Dazu wurden die aus den Knien der Kaninchen extrahierten Proben so getrennt, dass längs des Implantatkörpers die Hälfte des einen Knochens abgespalten wurde. Anschließend wurde das Implantat sowie der Knochen in einer speziell dafür vorgesehenen Einspannvorrichtung gefasst. Mit einer Spindelprüfmaschine (Fa. Instron, Standort BAM) wurde die Zugkraft zwischen Implantat und Knochen so lange kontinuierlich erhöht, bis der Knochen, der noch auf dem Implantat vorhanden war, abgezogen wurde. Die sich dabei einstellende Kraft wurde direkt gemessen. Es wurden jeweils 5 Prüfungen durchgeführt und daraus ein Mittelwert berechnet. Die Versuche erfolgten unter vergleichbaren Bedingungen.

Die Versuchsgestaltung sowie die Probenpräparation sind in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt, wie von Gross et al. (1987) beschrieben wurde.

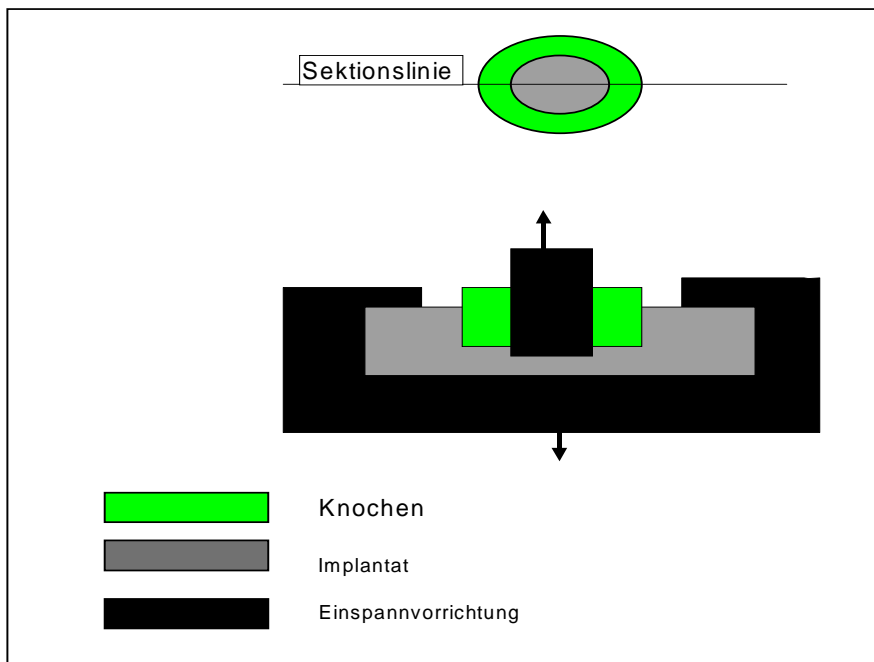


Abb. 6: Messung der Verbundfestigkeit

### 2.2.6 Statistische Analyse

Alle Messwerte wurden mit Hilfe der ANOVA einer statistischen Bewertung unterzogen. Es wurde zunächst geprüft, ob eine Normalverteilung der Messwerte vorliegt und anschließend mit F- und t-Test die Unterscheidbarkeit der ermittelten Mittelwerte berechnet. Als Unterscheidungsparameter wurde eine Voraussagesicherheit von 95 % angenommen ( $p=0,05$ ). Der Signifikanztest wurde sowohl für die analysierte Knochenmenge als auch für die Rauheitsmessungen durchgeführt. Eine Bewertung der Verbundfestigkeitswerte war nicht sinnvoll, da nicht genügend Messwerte vorlagen und die Streuungen auch zu groß waren. So konnten diese Werte nur als erste Orientierung in der Bewertung mit herangezogen werden.

Die Rauheitsmessungen wurden einer Paarvergleichsanalyse der Mittelwerte aus  $n=5$  Messungen unterzogen und auf einem Signifikanzniveau von 95% ( $p=0,05$ ) geprüft.

Die Mikrosondenanalysen sind ebenfalls nicht statistisch abgesichert, liefern aber durch die zufällige Auswahl der zur Untersuchung herangezogenen Proben wie auch durch das Messprinzip, Flächenscan, verlässliche Daten.