

Aus der Klinik für Zahn -, Mund - und Kiefergesundheit
Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde
der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Groll

Das knöchernerne Einwachsen von
TiAgN – beschichteten Titanimplantaten im Kaninchenknochen.
Eine histologische Analyse.

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius – Maximilians – Universität Würzburg

vorgelegt von

Nadine Karola Meier

aus Arzberg

Würzburg, November 2019

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Uwe Gbureck

Korreferent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Alexander Kübler

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 22.06.2020

Die Promovendin ist Zahnärztin

Meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Vorwort	1
1.2	Studienziel	3
1.3	Kenntnisstand	4
1.3.1	Knochenaufbau und Physiologie	4
1.3.2	Knochenheilung und Implantateinheilung	5
1.3.3	Materialien für Endoprothesen	7
1.3.4	Antiinfektiöse Oberflächenbeschichtungen	10
1.3.5	Antimikrobielle Hartbeschichtungen auf Basis von TiN	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Prüfkörper und Beschichtung	19
2.2	Tierversuch	20
2.2.1	Versuchsaufbau	20
2.2.2	Operation der Versuchstiere	21
2.2.3	Euthanasie und Probenentnahme	23
2.3	Herstellung histologischer Schnitte mittels Trenn - Dünnschliff - Technik	23
2.3.1	Entwässerung und Fixierung	23
2.3.2	Herstellung der Trenn – Dünnschliffe	25
2.4	Masson – Trichrom – Goldner Färbung	28
2.4.1	Herstellung der Lösungen	29
2.4.2	Durchführung der Färbung	31
2.4.3	Markierung des Gewebes	32

2.5	Mikroskopische Aufnahmen für die Datenerhebung	32
2.6	Statistische Auswertung	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Mikroskopische Aufnahmen	36
3.1.1	Übersichtsbilder	36
3.1.2	Abschnittsbilder	38
3.1.3	Zusammengesetzte Bilder	42
3.2	Auswertung	44
3.2.1	Knochen – Implantat – Kontakt	44
3.2.2	Osteoid	48
3.2.3	Spalten	51
3.2.4	Artefakte	55
4	Diskussion	57
4.1	Interpretation der Ergebnisse im Kontext des aktuellen Forschungsstandes	58
4.2	Limitationen der Methode und Überlegungen für weiterführende Studien	66
5	Zusammenfassung und Ausblick	70
6	Literaturverzeichnis	72
	Abbildungsverzeichnis	92
	Tabellenverzeichnis	93

Abkürzungsverzeichnis

A:	Präparat A
Ag:	Silber
Art:	Artefakt
BMP:	Bone morphogenic protein
D:	Sandwichdicke
Dest:	destilliert
HA:	Hydroxylapatit
KIK:	Knochen – Implantat – Kontakt
KL:	Klebefläche
KLM:	Knochenlamelle
Ko:	Kontrolle (unbeschichtet)
Kor:	Kortikalis
L:	Linkes Femur
NT:	Nanotube
Os:	Osteoid
OT:	Objektträger
PEEK:	Polyetheretherketon
PEG:	Polyethylenglycol
PMMA:	Polymethylmethacrylat
PTFE:	Polytetrafluorethylen
Pr:	Probe (TiAgN beschichtet)
PVD:	Physical vapour deposition
R:	Rechtes Femur
Sp:	Spalten

Spo:	Spongiosa
TiAg:	Titansilber
TiAgN:	Titansilbernitrit
TiN:	Titannitrit
UHMWPE:	Ultra-Hochmolekulares Polyethylen
Y – TPP:	Yttrium verstärktes Zirkonoxid

1 Einleitung

1.1 Vorwort

Die Endoprothetik nimmt in Zeiten einer immer älter werdenden Gesellschaft einen zunehmend höheren Stellenwert ein. In Deutschland werden jährlich ca. 219.000 künstliche Hüft – und rund 149.000 künstliche Kniegelenke implantiert. Zu diesen Zahlen der Ersteingriffe kommen weitere rund 30.000 Hüft – bzw. 20.000 Knie – Wechseleingriffe (Rothbauer 2017). Gelenkdegenerationen äußern sich in Schmerzen und Deformitäten bis hin zu einem kompletten Funktionsverlust. Um die Funktion, Mobilität und Schmerzfreiheit eines Gelenkes wiederherzustellen, ist eine orthopädische Operation häufig unumgänglich. Jedoch birgt auch diese, wie alle chirurgischen Eingriffe, typische Risiken. Die aseptische Lockerung gilt in der Endoprothetik dabei als häufigste Versagensursache. Sie ist multifaktoriell bedingt und entsteht unter anderem aufgrund einer inflammatorischen Antwort des angrenzenden Knochens auf Abriebpartikel, die durch den Verschleiß der artikulierenden Flächen entstehen oder aufgrund des Versagens des Knochenzements (Sundfeldt et al. 2006). Diese Immunreaktion zieht einen nicht unerheblichen Knochenabbau nach sich, der im Implantatverlust endet. Eine weitere Gefahr für eine stabile Osseointegration stellt die Endoprotheseninfektion dar. Diese tritt zwar seltener als die aseptische Lockerung auf, ist aber um ein Vielfaches schwerwiegender, da sie mit wiederholten und belastenden Operationen verbunden ist. Die Infektionsraten betragen für primär implantierte Endoprothesen etwa 0,2 – 2 % und unterscheiden sich je nach Art und Lokalisation des Gelenkersatzes (Otto-Lambertz et al. 2017). Im Falle von Revisionseingriffen liegen die Infektionsraten deutlich über dem Niveau primärer Implantationen (Gollwitzer und Gerdesmeyer 2006).

Um Risiken wie die aseptische Lockerung sowie die Endoprotheseninfektion und die damit einhergehende erhöhte Morbidität der Patienten zu minimieren, rückten unter anderem Oberflächenbeschichtungen in den Fokus. Da zudem die steigende Anzahl multiresistenter Keime einen sorglosen Einsatz

herkömmlicher Antibiotika verbietet und die Erreichbarkeit des Infektionsortes durch eine systemische Antibiose sehr eingeschränkt ist (Lew und Waldvogel 2004), stellt eine antiinfektiöse Oberflächenbeschichtung eine gute Infektionsprophylaxe dar. Implantatbeschichtungen müssen bestimmte Eigenschaften aufweisen um den Erfolg von Endoprothesen zu gewährleisten. Eine Grundvoraussetzung ist die Biokompatibilität des Materials. Des Weiteren sollten Beschichtungen die Osseointegration des Implantats fördern, indem sie sowohl osteokonduktiv wirken, also die Adhäsion von Osteoblasten unterstützen, als auch osteoinduktiv, durch Rekrutieren von Stammzellen und Induktion dieser zur Differenzierung in Osteoblasten (Albrektsson und Johansson 2001). Neben diesen allgemeinen biologischen Eigenschaften müssen Beschichtungen von Endoprothesen eine hohe mechanische Stabilität aufweisen, um den Abrieb und damit die Gefahr der aseptischen Lockerung gering zu halten. Darüber hinaus soll eine antimikrobielle Wirkung der Oberflächenmodifikation das Risiko von Protheseninfektionen verringern (Gollwitzer und Gerdesmeyer 2006). Bisher ist für ossäre Implantate noch keine Beschichtung etabliert worden, die alle Anforderungen erfüllt.

Es existieren aber bereits einige Ansätze, um das Risiko für Implantat assoziierte Infektionen zu verhindern. Zum einen kann durch eine Veränderung der Oberflächenmorphologie, wie beispielsweise durch Titannanoröhrchen die bakterielle Adhäsion inhibiert und die Osteoblastenadhäsion gefördert werden. Zum anderen wurden zahlreiche antiinfektiöse Beschichtungen untersucht, die die bakterielle Adhäsion, Proliferation und Biofilmbildung verhindern sowie planktonisch lebende Bakterien abtöten. Dazu zählen unter anderem synthetische oder natürliche Polymerbeschichtungen, wie Polyethylenglycol und Chitosan, die im Stande sind die bakterielle Adhäsion zu verhindern. Die Proliferation und Biofilmbildung kann durch direkt auf der Oberfläche immobilisierte antimikrobielle Agentien, wie Antibiotika, antimikrobielle Peptide sowie Metallionen bzw. – Nanopartikel unterbunden werden. Zur Reduktion lokaler planktonischer Bakterien sind eine kontrollierte Abgabe von Antibiotika, antimikrobieller Peptide oder Metallionen vielversprechende Strategien (Pan et al. 2018, Wang und Tang 2019).

1.1 Studienziel

Eine in vitro sehr vielversprechende Oberflächenbeschichtung, die gute mechanische Eigenschaften mit einer antiinfektiösen Wirkung vereint, ist TiAgN (Moseke et al. 2011). Auf Grundlage der positiven Ergebnisse dieser in vitro Studie wird nun in der hier vorliegenden Arbeit erstmals das Einwachsen von Titanimplantaten, die mit TiAgN beschichtet sind, in vivo untersucht. Ziel dieser Studie ist es, die Osseointegration von TiAgN – beschichteten Titanimplantaten im Vergleich zu unbeschichteten Titanimplantaten im Kaninchenknochen zu ermitteln. Die Hypothese der vorliegenden Tierstudie ist, dass die TiAgN – beschichteten Titanimplantate kein schlechteres Einwachsverhalten zeigen als unbeschichtete Titanimplantate. Für diese histologische Analyse wurden in drei Kaninchen jeweils in das rechte und linke Femur eine unbeschichtete Kontrolle und zwei TiAgN – beschichtete Proben implantiert. Nach einer Einheilzeit von drei Monaten wurden die Tiere euthanasiert, die Proben entnommen und Dünnschliffe nach der Donath – Methode angefertigt (Donath 1988). Anhand der mikroskopierten Bilder wurde der Kontakt der Implantatoberflächen zu kalzifiziertem und nicht kalzifiziertem Knochen (Osteoid) sowie zu Bindegewebe untersucht. Des Weiteren wurde der Anteil an Spalten, Implantatoberflächenbereiche an denen kein Gewebe angewachsen ist, analysiert.

1.3 Kenntnisstand

1.3.1 Knochenaufbau und Physiologie

Knochen besteht makrostrukturell aus der locker in Platten und Bälkchen angeordneten Spongiosa und einer sie umgebenden homogenen Schicht, der Kortikalis. Die Struktur der Extrazellulärmatrix des reifen Knochens besteht aus Lamellenknochen, während neu gebildeter Knochen zunächst als Geflechtknochen gebildet und erst im weiteren Verlauf lamellär umgewandelt wird. Mikroskopisch ist die Kortikalis durch Haverskanäle gekennzeichnet, die mit den sie konzentrisch umgebenden Lamellen ein Osteon bilden (Lüllmann-Rauch 2015). Dieses vaskularisierte und mineralisierte Gewebe ist zeitlebens Umbauvorgängen unterworfen, die als Knochenremodeling bezeichnet werden (Riggs und Parfitt 2005).

An der Bildung und dem Umbau des Knochens sind vier Zelltypen beteiligt. Zum einen die Osteoblasten, die für die Bildung der Knochenmatrix verantwortlich sind, die inaktiven „Bone lining Cells“, die der Knochenoberfläche aufliegen, die Osteozyten, reife Osteoblasten, welche vollständig von mineralisierter Extrazellulärmatrix umgeben sind (Marks und Odgren 2002) sowie Osteoklasten, deren Hauptaufgabe der Abbau mineralisierter Matrix ist (Vaananen et al. 2000). Die von Osteoblasten gebildete, noch nicht mineralisierte Matrix aus Kollagen Typ 1 Fibrillen wird als Osteoid bezeichnet (Marks und Odgren 2002). Diese Kollagenfibrillen dienen als strukturelle Leitschienen und regulieren zusammen mit anderen Mineralisationsinhibitoren oder – Förderern, wie beispielsweise saure Phospholipide, Proteolipide, Osteopontin, Osteocalcin, Osteonectin und Knochen Sialoprotein die Größe und Verteilung der Apatitkristalle im Knochen. Diese mineralisierten Kollagenfibrillen sind die grundlegende Bildungseinheit des Knochens (Shah et al. 2019).

1.3.2 Knochenheilung und Implantateinheilung

Aufgrund der Tatsache, dass zwischen der Implantateinheilung und der Knochenheilung zahlreiche Gemeinsamkeiten bestehen (Davies 2003), wird zunächst ein kurzer Überblick über die Knochenheilung gegeben.

Grundsätzlich kann hierbei zwischen der primären und der sekundären Knochenheilung unterschieden werden:

Unter primärer Knochenheilung versteht man das Zusammenwachsen der Frakturenden durch direkte Ausbildung von Lamellenknochen ohne den Umweg einer bindegewebigen Knochennarbe, dem sogenannten Kallus. Hierbei sprießen von Markraum, Periost und Havers'schen Kanälen dünnwandige Gefäße ein, die von mesenchymalen Zellen begleitet werden. Diese differenzieren sich zunächst zu Präosteoblasten und später zu Osteoblasten, die die Gefäße direkt mit Lamellenknochen umschließen. Nach bereits 4 Wochen wird die Frakturlinie von Osteonen durchzogen. Diese Heilungsform kann nur bei stabiler Fixierung und direktem Kontakt der Fragmentenden stattfinden (Schenk und Willenegger 1964, Marsell und Einhorn 2011).

Im Gegensatz dazu steht bei der sekundären Knochenheilung die Kallusbildung im Vordergrund. Nach einer Verletzung bildet sich im Frakturbereich zunächst ein Hämatom, welches unter anderem Erythrozyten, Fibrin und Thrombozyten enthält. Letztgenannte setzen zahlreiche Faktoren frei, die für die Chemotaxis und die Regulation der Zellaktivität von Bedeutung sind. Es kommt zur inflammatorischen Reaktion. Ab dem dritten Tag migrieren Endothelzellen aus intakten benachbarten Blutgefäßen ein um neue Gefäße zu bilden und Fibroblasten bilden Granulationsgewebe. Des Weiteren werden mesenchymale Stammzellen angelockt, die sich im weiteren Verlauf durch zirkulierende Wachstumsfaktoren wie beispielsweise „bone morphogenic proteins (BMP)“ zu Osteoblasten und Chondrozyten differenzieren (Wang et al. 2017). Es folgt die Bildung eines zunächst bindegewebigen, teilweise knorpeligen Kallus, der später mineralisiert, resorbiert und durch Geflechtknochen ersetzt wird. Im Verlauf des Knochenremodelings wird der Geflechtknochen in den stabileren Lamellenknochen umgewandelt (McKibbin 1978, Hollinger und Wong 1996,

Gerstenfeld et al. 2006, Schindeler et al. 2008, Marsell und Einhorn 2011, Ghiasi et al. 2017, Wagner et al. 2019).

Bei der Implantateinheilung kann grundsätzlich zwischen zwei Heilungsformen unterschieden werden, der Distanz – und der Kontaktosteogenese. Als Distanzosteogenese wird die implantatferne Knochenneubildung bezeichnet, die an der Oberfläche des alten Knochens stattfindet. Im Gegensatz dazu kann bei der Kontaktosteogenese die Ablagerung der Knochenmatrix direkt auf der Implantatoberfläche beobachtet werden (Osborn und Newesely 1980, Salvi et al. 2015). Da die Implantatbettbohrung eine iatrogene Wundsetzung darstellt, kommt die Implantatoberfläche zuerst mit Blut in Kontakt (Davies 1996). Das während der Blutgerinnung entstehende Fibringerüst und die Aktivierung von Blutzellen durch den Kontakt mit der Implantatoberfläche sind entscheidende Vorgänge, die für die initiale Heilung von Bedeutung sind (Davies 1998). Das Fibringerüst stellt eine Art Leitfaden für die Migration von Osteozyten und deren Vorläuferzellen dar (Davies 1998). Des Weiteren wird dieser Prozess durch die Freisetzung von Zytokinen und weiteren löslichen Faktoren durch die aktivierten Blutzellen beeinflusst (Park und Davies 2000). Nach etwa vier Tagen wird dieses Blutkoagel mit Granulationsgewebe durchsetzt, welches zahlreiche mesenchymale Zellen, Matrixkomponenten und neugebildete Gefäße enthält (Berglundh et al. 2003, Abrahamsson et al. 2004). Eine Woche nach der Implantatinsertion kann um die Blutgefäße und direkt auf der Implantatoberfläche zellreicher, unreifer Geflechtknochen nachgewiesen werden (Kontaktosteogenese) (Berglundh et al. 2003, Abrahamsson et al. 2004). Dabei synthetisieren die Ostoblasten auf der Implantatoberfläche zunächst eine von „von Ebner“ (1875) als Kittlinie bezeichnete kollagenfreie, organische Matrix, die im weiteren Verlauf mineralisiert (Davies 1996). Darauf folgt die Synthese der kollagenen Matrix, die durch Einlagerung von Kalziumphosphat – Keimbildnern und anschließendem Kristallwachstum mineralisiert (Davies 2003). Die Distanzosteogenese und der Abbau alten Knochens durch Osteoklasten findet nach ca. zwei Wochen statt. Nach ungefähr vier Wochen ist die Implantatoberfläche komplett mit neuer mineralisierter Knochenmatrix umgeben und das Remodeling beginnt zwischen

der sechsten und zwölften Woche (Berglundh et al. 2003, Abrahamsson et al. 2004, Terheyden et al. 2012, Salvi et al. 2015). Die mineralisierten Kollagenfibrillen sind die Hauptbausteine des Implantat – Knochen – Interface. Es wird angenommen, dass das Knochenremodeling eine Erklärung für das Vorhandensein lamellären Knochens am Implantat – Knochen – Interface sein könnte, als Versuch eine natürliche Mikrostruktur nach initialer Stabilisierung durch Geflechtknochen zu erzeugen. Da sich Lamellenknochen normalerweise nur als umlaufende äußere Schicht an der Knochenoberfläche organisiert oder in Schichten Osteone ausfüllt (Shah et al. 2019).

1.3.3 Materialien für Endoprothesen

Um als Implantatwerkstoff Anwendung zu finden, müssen die Materialien zahlreichen Anforderungen gerecht werden. Eine hohe Dauerwechselfestigkeit, an den Knochen angepasste Steifigkeiten sowie eine hohe Bruchdehnung sind mechanische Anforderungen, die erfüllt werden müssen. Darüber hinaus kommt der biologischen Verträglichkeit der Materialien eine große Bedeutung zu (Repenning 2006).

Im Bereich der Knie – und Hüftendoprothetik kommen für die Prothesenkörper vor allem Kobaltbasislegierungen ($\text{CoCr}_{28}\text{Mo}_6$, $\text{CoNi}_{35}\text{Cr}_{20}\text{Mo}_{10}$) und Titan mit seinen Legierungen (Ti – Grade 2, Ti – Grade 4, TiAl_5Nb_7 , TiAl_6V_4) zur Anwendung. Den guten mechanischen Eigenschaften der Kobaltbasislegierungen, wie Dauerwechselfestigkeit, Kerbunempfindlichkeit und gute Korrosionsbeständigkeit, stehen die mögliche Sensibilisierung des Patienten auf Nickel, Chrom oder Kobalt und damit einhergehend eine allergische Reaktion gegenüber (Thomas und Summer 2006). Auch Titan steht neben seiner hohen Biokompatibilität, welche aus der spontanen Bildung einer Passivschicht resultiert und zu hoher Korrosionsbeständigkeit führt (Solar et al. 1979, Zitter und Plenk 1987), das Problem der Depassivierung im anaeroben Milieu und damit eine Korrosionsanfälligkeit bei Infektionen gegenüber (Marsh P, Martin MV 2002).

Hüftgelenksprothesen bestehen heutzutage aus Metallen, Keramiken und Polymeren. Gängige Werkstoffe für Schäfte und Hälse sind Metalle, beispielsweise Titanlegierungen, rostfreier Stahl oder spezielle hochfeste Legierungen. Für die Femurköpfe kommen ebenfalls Metalle oder Keramiken zum Einsatz. Zu den Keramiken zählen Aluminiumoxid, Zirkonoxid und Zirkon verstärktes Aluminiumoxid. Das Acetabulum kann sowohl aus Metallen, Keramiken oder Polymeren (UHMWPE) hergestellt werden. Für die Gleitpaarungen existieren vier verschiedene Haupttypen: Metall auf Metall (MOM), Metall auf Polyethylen (MOP), Keramik auf Keramik (COC) und Keramik auf Polyethylen (COP). Faktoren, die die Wahl der Gleitpaarung beeinflussen sind das Patientenalter und deren Aktivität, die Komplikationsraten sowie die Kosten. MOM werden nur noch in weniger als 1% der Operationen eingesetzt, da sie zwar einen geringen Reibemoment aufweisen aber dennoch sehr kleine Abriebpartikel produzieren, deren potentiell toxische Wirkung lokal oder systemisch ihren Einsatz beschränkt. MOP werden hauptsächlich bei älteren, wenig aktiven Patienten eingesetzt, da es auch hier durch Abriebpartikel zur aseptischen Lockerung und damit Prothesenverlust kommen kann. COC ist die beste Wahl für junge, aktive Patienten, da sie eine hohe Härte und inerte Eigenschaften der Abriebpartikel aufweisen. Vor – und Nachteile der einzelnen Werkstoffe sind in Tabelle 1 zusammengefasst. (Merola und Affatato 2019).

Tabelle 1: Materialien für Endoprothesen modifiziert nach Merola und Affatato (2019)

Material		Vorteile	Nachteile
Metalle	CoCrMo	<ul style="list-style-type: none"> - gute Korrosionsresistenz - Dauerwechselfestigkeit - Hohe Zähigkeit - Hohe Abriebresistenz 	<ul style="list-style-type: none"> - Mögliche Sensibilisierung (Co, Cr) - Abrieb wenig chem. inert
	Rostfreier Stahl	<ul style="list-style-type: none"> - Hohe Abriebfestigkeit 	<ul style="list-style-type: none"> - Geringe Duktilität - Geringe Festigkeit
	Ti ₆ Al ₄ V	<ul style="list-style-type: none"> - Hohe Biokompatibilität - Mechanische Resistenz 	<ul style="list-style-type: none"> - Depassivierung im anaeroben Millieu
Polymere	PTFE	<ul style="list-style-type: none"> - Hohe thermische Stabilität - Hydrophob - Chem. Inert 	<ul style="list-style-type: none"> - Hoher Abrieb - Ausgeprägte Fremdkörperreaktion auf Abriebpartikel - Höhere Infektionsrate und Verlustraten
	UHMWPE	<ul style="list-style-type: none"> - Gute Abriebfestigkeit - Geringer Abrieb - Hohe Schlagfestigkeit 	<ul style="list-style-type: none"> - Osteolyse durch Abrieb - Evtl. verbliebene freie Radikale
	PEEK	<ul style="list-style-type: none"> - Biokompatibilität - Gute mech. Eigenschaften - Chem. Resistenz - Therm. Stabilität 	<ul style="list-style-type: none"> - Fragliche mech. Stabilität
Keramiken	Al ₂ O ₃	<ul style="list-style-type: none"> - Abriebfestigkeit - Härte - Hitzestabilität - Gutes Reibungsverhalten 	<ul style="list-style-type: none"> - Geringer mech. Widerstand - Geringer Widerstand bei Zugspannung
	ZrO ₂ (Y-TZP)	<ul style="list-style-type: none"> - Gute mech. Eigenschaften - Hohe Zähigkeit - Bruchfestigkeit 	<ul style="list-style-type: none"> - Alterung in Anwesenheit von Wasser
	ZrO ₂ – Al ₂ O ₃ Mischkeramik	<ul style="list-style-type: none"> - Vereint positive Eigenschaften von Aluminium - u. Zirkonoxid 	<ul style="list-style-type: none"> - Alterung

Da die bisher zur Verfügung stehenden Materialien nicht allen Anforderungen gerecht werden, besteht die Möglichkeit, die positiven mechanischen Eigenschaften des Grundwerkstoffes mit einer biokompatiblen Beschichtung zu kombinieren. Aufgrund der Tatsache, dass mit einer Protheseninfektion eine starke Morbidität und lange Immobilität des Patienten einhergeht wird deutlich, dass der Suche nach einer Beschichtung, die das Anwachsen des Gewebes an das Implantat fördert, aber gleichzeitig das Anhaften von Bakterien verhindert oder diese abtötet, ein hoher Stellenwert beigemessen wird.

1.3.4 Antiinfektiöse Oberflächenbeschichtungen

Nach der Implantation des Prothesenkörpers kommt dieser unmittelbar mit Blut und Gewebe in Kontakt. Es folgt die Adsorption von Proteinen, wie z.B. Fibronectin und Fibrinogen sowie die Bildung einer Extrazellulärmatrix an der Implantatoberfläche (Wilson et al. 2005, Franz et al. 2011). Da diese Proteinadsorption neben dem von Zellen auch das Anhaften von Bakterien begünstigt (Delmi et al. 1994), hängt das Schicksal des Implantats bei einer bakteriellen Infektion davon ab, mit welcher Geschwindigkeit die osteogenen Zellen und die Bakterien die Implantatoberfläche erreichen. Die Erreger von Implantatinfektionen bilden spezifische Bindungsstellen aus, mit denen sie an entsprechende Bestandteile des Proteinfilms binden und anschließend einen Biofilm bilden (Otto 2009, Arciola et al. 2012, Arciola et al. 2018). *Staphylococcus aureus* beispielsweise hat mit seinem sogenannten „clumping factor“ die Möglichkeit an Fibrinogen zu binden (Moreillon et al. 1995, McAdow et al. 2011, Herman-Bausier et al. 2018). Wenn die Bakterien die Oberfläche vor den Osteoblasten erreichen, können sie diese kolonisieren und einen Biofilm ausbilden, was unausweichlich zu einer Protheseninfektion führt. Kolonisieren jedoch die Osteoblasten die Oberfläche zuerst und bilden eine stabile Verbindung zum Implantat, kann eine Infektion verhindert werden (Gristina 1987). Neben dieser frühen Protheseninfektion, die durch das

Eindringen von Bakterien während der Implantation entsteht, besteht noch die Möglichkeit einer späteren Infektion, auch nach Jahren, aufgrund einer hämatogenen Streuung (Zimmerli et al. 2004).

Aus den oben genannten Gründen könnten Beschichtungen, die die Osseointegration fördern auch zu einer Reduktion der Infektionen führen. Jedoch zeigte sich in einigen Studien, dass Beschichtungen, die die Adsorption von Osteoblasten fördern ebenfalls das Anhaften von Bakterien begünstigen (Teughels et al. 2006, Mitik-Dineva et al. 2009, Ivanova et al. 2010, Truong et al. 2010). Aufgrund der Tatsache, dass beide ähnliche Anhaftungsmechanismen besitzen und auf die gleichen Signalstoffe antworten, bevorzugen Bakterien, wie auch Osteoblasten, Oberflächen mit hoher Oberflächenenergie und Rauigkeit (Teughels et al. 2006, Mitik-Dineva et al. 2009, Truong et al. 2010). Um die feinen Unterschiede im Adhäsionsverhalten von Bakterien und Osteoblasten für antiinfektive Oberflächenbeschichtungen nutzen zu können sind weitere Studien notwendig. Bisher wurden verschiedene antiinfektiöse Agentien der Implantatoberfläche beigefügt, um eine bakterielle Besiedelung zu verhindern.

Dabei kann die Oberfläche auf unterschiedliche Weise modifiziert werden. Entweder durch Beschichtung mittels antimikrobieller Substanzen, wie Silber (Marx und Barillo 2014), lokale Antibiotika und Chitosan (Neoh und Kang 2011, Tan et al. 2012), oder Heparin (Arciola et al. 2003) sowie Polymerbeschichtungen (Pan et al. 2018, Wang und Tang 2019) für antiadhäsive Eigenschaften. Auch die Kombination aus antiadhäsiv und antimikrobiell wirksamen Substanzen, wie beispielsweise die Verbindung von Heparin mit Chitosan wurden diskutiert (Fu et al. 2005, Zhou et al. 2018). Des Weiteren gibt es auch Untersuchungen zu Beschichtungen, die die Biofilmbildung verhindern und gleichzeitig die Knochenbildung fördern, wie beispielsweise silberhaltige Hydroxylapatit – Beschichtungen (Arciola et al. 2012, Eto et al. 2015). In der nachfolgend dargestellten Tabelle (2) sind einige Ansätze für antiinfektiöse Beschichtungen aufgelistet.

Tabelle 2: antiinfektiöse Beschichtungen

Eigenschaft	Beschichtung	Literaturquelle
Antimikrobiell	Lokale Antibiotika	Antoci et al. (2008) Antoci et al. (2007)
	Ag – Ionen/Nanopartikel	Ullah Khan et al. (2018)
	Antimikrobielle Peptide (AMPs)	Yala et al. (2011) Kazemzadeh-Narbat et al. (2013)
	Chitosan	Peng et al. (2015) Tan et al. (2012) Yang et al. (2016)
	Enzyme (Dispersin B, Deoxyribonuklease 1)	Swartjes et al. (2013), Pavluhina et al. (2012)
Antiadhäsiv	Heparin	Arciola et al. (2003)
	Polymerbeschichtungen (z.B. PEG)	Caro et al. (2009)
	Ti – Nanotubes	Peng et al. (2013)
antimikrobiell/ antiadhäsiv u. osteoinduktiv	Ag-haltiges Hydroxylapatit	Arciola et al. (2012)
	TiO ₂ – Nanotubes	Peng et al. (2013)
	Polymerbeschichtungen mit biologisch aktiven Substanzen (z.B. BMP – 2)	Shi et al. (2009)

Eine Ausführung aller Modifikationsmöglichkeiten würde den Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen, daher hat sich die Autorin auf die Darstellung einiger antimikrobieller Agentien beschränkt.

Silber

Silberionen werden in der Medizin seit Langem zur Reduktion nosokomialer Infektionen und zur Personalhygiene eingesetzt. Es findet unter anderem bei der Wasserreinigung, Wundsäuberung, bei rekonstruktiven orthopädischen Operationen, Herzgeräten und Kathetern Anwendung (Lansdown 2006). Der obligatorische erste Schritt zur antimikrobiellen Wirkung der Silberionen ist die Bindung an die Zellmembran von Bakterien, Hefen und Pilzen und die

anschließende Adsorption (Lansdown 2006). Silberkationen binden intrazellulär an Elektronen – Donorgruppen biologischer Moleküle, die Sauerstoff, Schwefel und Stickstoff enthalten (Lansdown 2006) und inhibieren dadurch lebenswichtige Enzyme, wie die der Atmungskette von Bakterien (Bragg und Rainnie 1974, Feng et al. 2000, Dibrov et al. 2002, Holt und Bard 2005, Bovenkamp et al. 2013). Ein weiterer antimikrobieller Mechanismus ist die direkte Interaktion und Ruptur der Zellmembran durch Bindung der Silberkationen an die Anionen der Membran (Slawson et al. 1990, Lim et al. 2014). Darüber hinaus können Silberionen an die frei im Zytoplasma liegende bakterielle DNA binden und zu Mutationen und zum Tod des Bakteriums führen (Russell und Hugo 1994, Feng et al. 2000, Saulou-Berion et al. 2015). Ebenso können freie Silberradikale in den Bakterienzellen akkumulieren und sowohl die Elektronentransportkette sowie bakterielle DNA und RNA inaktivieren als auch Zellmembranen zerstören oder durch Proteinbindung und – Ausfällung zum Zelltod führen (Lansdown 2002, Marx und Barillo 2014). Aufgrund der geringen Resistenzbildung gegen Silberionen wird angenommen, dass mehrere dieser Mechanismen gleichzeitig ablaufen (Marx und Barillo 2014). Dennoch wurden in einigen Studien Resistenzbildungen beobachtet (Deshpande und Chopade 1994, Li et al. 1997, Loh et al. 2009), die aber selten und nicht von klinischer Bedeutung waren (Marx und Barillo 2014). In zahlreichen in vitro und in vivo Studien wurden die antimikrobiellen Eigenschaften der Silberbeschichtungen deutlich (Collinge et al. 1994, Gosheger et al. 2004, Chen et al. 2007). Als Trägermaterial für Silberionen dienen Kalziumphosphat (Song et al. 2009), Polyamide (Kumar und Munstedt 2005), Titananotubes (Zhao et al. 2011), Polyelektrolytmembranen bestehend aus Heparin und einem Chitosan – Silberionen Komplex (Fu et al. 2006) sowie antiabrasive Keramiken wie Titanitrit (TiN) (Kelly et al. 2009, Kelly et al. 2010, Sánchez-López et al. 2012). Um die Reibekorrosion und die Bildung von Abriebpartikeln zu reduzieren, wurden sowohl Titanitrit (TiN) als auch Titancarbonitrit (TiCN) als Beschichtungen für Hüftgelenkersatz genutzt (Pappas et al. 1995, Ward et al. 1998, Gispert et al. 2007).

Neuere Untersuchungen beschäftigen sich vor allem mit Silbernanopartikeln (AgNPs). Dies sind Partikel von einer Größe zwischen 1 und 100 nm (Gong et al. 2007, Ullah Khan et al. 2018). Ihre antimikrobielle Wirkung zeigt sich sowohl gegen grampositive als auch gramnegative Bakterien (Marambio-Jones und Hoek 2010, Ullah Khan et al. 2018).

Der genaue Wirkmechanismus der Nanopartikel ist noch nicht bis ins letzte Detail geklärt, jedoch weisen zahlreiche Studien auf zwei Hauptmechanismen hin. Zum einen schädigen diese Partikel die Zellmembran, penetrieren in die Zelle, stören die Zellfunktionen und verursachen damit den Zelltod. Dem gegenüber steht die Induktion zellulären oxidativen Stresses durch die Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS). Diese interagieren mit Enzymen und Biomolekülen, was wiederum die Bakterienzelle schädigt. (McShan et al. 2014, Naik und Kowshik 2017, Siddiqi et al. 2018, Ullah Khan et al. 2018). Die Abgabe von Ag – Ionen durch die AgNPs und die partikelspezifischen Effekte erzielen in gleichem Maße ihre antibakterielle Wirkung (Yan et al. 2018).

Neben der guten antimikrobiellen Wirkung von Silber müssen jedoch auch einige Nebenwirkungen kritisch betrachtet werden. Die Anreicherung von metallischem Silber oder Silbersulfiden subepithelial in der Haut, der Konjunktiva, den Nägeln oder der Gingiva wird als Argyrie bezeichnet und tritt lokalisiert oder generalisiert auf. Sie stellt sich als irreversible graue Hautverfärbung dar (Marx und Barillo 2014). Eine generalisierte Argyrie kann bei kumulativen Dosen von 70 – 1500 mg Silber/Kg Körpergewicht beziehungsweise bei Serumsilberspiegeln von 63 – 283 µg/L auftreten (Hadrup et al. 2018). Des Weiteren hat Silber ein geringes Potential für Haut – und Augenreizungen und einige Individuen entwickelten eine allergene Kontaktdermatitis. Zudem wurden von einigen Autoren toxische Effekte auf innere Organe berichtet (Hadrup et al. 2018).

Chitosan

Ein weiteres Agens, welches sich als antimikrobielle Beschichtung eignet, ist Chitosan. Es ist ein hydrophiles Biopolymer, welches durch N – Deacetylierung

von Chitin aus Krustentieren gewonnen wird. Die antibakteriellen Eigenschaften dieses Polysaccharids beruhen auf positiv geladenen Aminogruppen der Hauptkette, welche die negativ geladenen bakteriellen Membranen binden und eine Membranleckage verursachen können (Rabea et al. 2003, Tan et al. 2012). Oberflächen, die beispielsweise mit einem Chitosan – Heparin – Multilayer modifiziert wurden, zeigten nicht nur eine Reduktion der bakteriellen Adhäsion, sondern auch eine Abtötung (Fu et al. 2005). Jedoch wird der Gebrauch von Chitosan durch dessen geringe Löslichkeit in Wasser bei pH-Werten von mehr als 6,5 limitiert (Rabea et al. 2003, Sahariah und Masson 2017). Eine weitere Limitation ist der geringe Reinheitsgrad, der die Hauptursache für Nebenwirkungen darstellt. Um diese Probleme zu umgehen wurden einige Chitosanderivate untersucht. Dazu zählen beispielsweise das quarternisierte Chitosan (Tan et al. 2013) und das Hydroxypropyltrimethyl Ammoniumchlorid Chitosan (HACC) (Yang et al. 2017), welche eine bessere Löslichkeit in Wasser und eine stärkere antimikrobielle Wirksamkeit aufweisen.

Antibiotika als Beschichtungsbestandteile

Traditionell wurden Antibiotika wie Gentamicin oder Vancomycin bei zementierten Gelenkarthroplastiken zur Infektionsprophylaxe in den PMMA – Zement eingebracht. Jedoch stellen zahlreiche Nachteile, wie eine zu schnelle, unzuverlässige und inkomplette Medikamentenabgabe (Bunetel et al. 1989) sowie die Verschlechterung der mechanischen Eigenschaften des PMMA – Zements durch das eingebrachte Antibiotikum (Klekamp et al. 1999, Persson et al. 2006) dieses Verfahren in den Hintergrund.

Alternativen zu antibiotikabeladenen PMMA – Zementen stellen unter anderem die Osseointegration fördernden Beschichtungen wie Titannanotubes oder Kalziumphosphat dar. Diese können ebenfalls als Antibiotikaträger fungieren und zeigen damit eine ausgeprägte antimikrobielle Wirkung (Alt et al. 2006, Popat et al. 2007).

Aufgrund der Tatsache, dass die abgegebene Antibiotikamenge nach einiger Zeit durch die abnehmende Konzentration subtherapeutische Level erreicht und

das Implantat durch eventuell überlebende bzw. resistente Bakterien kolonisiert werden kann (Hickok und Shapiro 2012), sollten Antibiotika fest an die Implantatoberfläche angebunden sein und für die gesamte Lebensspanne des Implantats eine antibakterielle Oberfläche bereitstellen (Zhang et al. 2014). Kovalent an Titanimplantate gebundenes Vancomycin zum Beispiel konnte eine Kolonisation und Biofilmbildung durch *S. epidermidis* verhindern (Antoci et al. 2007, Antoci et al. 2008).

Des Weiteren können antimikrobielle Peptide als vielversprechende Alternative zu herkömmlichen Antibiotika angesehen werden. Diese Peptide werden auf abbaubare Beschichtungen, wie zum Beispiel Phosphatbeschichtungen aufgebracht, die eine über Stunden kontinuierliche Abgabe der Peptide gewährleisten (Wang und Tang 2019). Diese hydrophoben Peptide werden von Säugetieren, Amphibien und Pflanzen produziert und enthalten kationisch geladene Aminosäuren. Sie binden an die negativ geladenen Zellmembranen von Bakterien und zerstören diese durch Porenbildung und Rupturen. Darüber hinaus können diese Peptide in das Zytoplasma eindringen und mit intrazellulären Zielen interagieren, beispielsweise mit Proteinen, die den bakteriellen Metabolismus regulieren (Hwang und Vogel 1998, Yala et al. 2011). Multilayer Beschichtungen mit antimikrobiellen Peptiden, wie dem Peptid HHC – 36 zeigen eine kontrollierte und kontinuierliche Peptidabgabe und somit eine effektive Wirkung gegen *S. aureus* u *P. aeruginosa* (Kazemzadeh-Narbat et al. 2013). Das auf die Implantatoberfläche aufgebrachte antimikrobielle Peptid LL – 37 zeigte einen bakteriziden Effekt gegen *E. coli* bei gleichzeitig geringerer Toxizität und höherer Spezifität (Gabriel et al. 2006). Jedoch wird der Einsatz antimikrobieller Peptide durch zwei Faktoren limitiert. Zum einen werden einige in vivo durch Proteasen schnell abgebaut, zum anderen können sie durch ihre polykationische Struktur neben Bakterien auch körpereigene Zellen schädigen und somit toxisch wirken (Ramesh et al. 2016).

1.3.5 Antimikrobielle Hartbeschichtungen auf Basis von TiN

TiN – Beschichtungen

TiN kommt aufgrund seiner guten mechanischen Eigenschaften sowohl als Beschichtung von Werkzeugoberflächen, die hohen Belastungen ausgesetzt sind, als auch im medizinischen Bereich, beispielsweise in der Kardiologie bei Schrittmacherelektroden zum Einsatz (Schaldach et al. 1989). TiN ist ein keramischer Werkstoff der sich unter anderem durch einen hohen Härtegrad (2000 kg/mm^2), chemischer Stabilität bei Raumtemperatur, hoher Zersetzungstemperatur (2949 °C) und einer goldgelben Farbe auszeichnet (Toth 1971). Für die Herstellung dieser Beschichtung kommen verschiedene Verfahren zum Einsatz, beispielsweise die physikalische Abscheidung aus der Gasphase PVD (physical vapour deposition) oder das Plasmanitrieren (Maurer et al. 1993). Aufgrund seiner guten mechanischen Eigenschaften zeigen TiN beschichtete Materialien eine höhere Resistenz gegen Abrieb und Korrosion (Gordin et al. 2012, Zhao et al. 2016). Des Weiteren weist diese Beschichtung eine gute Biokompatibilität auf (Annunziata et al. 2008, Annunziata et al. 2011, Gordin et al. 2012). Als Beschichtung für orthopädische Implantate kann TiN die mechanische Stabilität erhöhen und die Korrosionsresistenz steigern (Jehn und Baumgärtner 1992, Griepentrog et al. 1995).

TiAgN – Beschichtungen

Um eine Implantatbeschichtung zu erhalten, die sowohl der mechanischen Beanspruchung standhält als auch antimikrobielle Eigenschaften aufweist, wurde zunächst eine TiAg – Beschichtung entwickelt. Diese wurde mittels des PVD Prozesses hergestellt und weist signifikante antibakterielle Eigenschaften auf. Des Weiteren konnten keine zytotoxischen Eigenschaften festgestellt werden (Ewald et al. 2006).

Durch Sputtern in reaktiver Atmosphäre mit Stickstoff wurde eine TiAgN – Beschichtung erzeugt, welche die positiven mechanischen Eigenschaften des

TiN mit den guten antimikrobiellen Eigenschaften des Silbers vereinigt. Durch die kontinuierliche Silberabgabe weist diese Beschichtung ebenfalls gute bakterizide Eigenschaften auf und die Zytokompatibilität ist ebenfalls gegeben (Moseke et al. 2011). Neben Moseke et. al. beschäftigte sich auch die Arbeitsgruppe um Zhao et al. (2009) mit den Eigenschaften einer TiAgN – Beschichtung. Auch sie konnten in ihrer Studie die bakteriziden Eigenschaften bei gleichzeitiger guter Biokompatibilität nachweisen (Zhao et al. 2009).

Auf Grundlage der vielversprechenden Ergebnisse der oben genannten in vitro Studien wurde anhand dieser Arbeit, das Einwachsen von TiAgN – beschichteten Titanimplantaten in das Kaninchenfemur im Vergleich zu unbeschichteten Titanimplantaten untersucht.

2 Material und Methoden

Aufgrund des ausgedehnten Umfangs dieses Tierversuchs, wurden die Prüfkörper im Vorfeld von Mitarbeitern des Lehrstuhls für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde (Leitung Prof. Dr. Groll) hergestellt und operativ in die Kaninchen eingebracht. Der Autorin wurden die Präparate zur Aufarbeitung und Auswertung zur Verfügung gestellt.

2.1 Prüfkörper und Beschichtung

Es wurden pro Kaninchen insgesamt zwei Kontrollen und vier Proben implantiert. In die rechten und linken Femora je eine Kontrolle und zwei Proben, um anschließend die Osseointegration der Proben mit den Kontrollen vergleichen zu können.

Die verwendeten Prüfkörper waren hantelförmig, hatten eine Länge von 6 mm und einen Durchmesser im Bereich des Stegs von 1 mm und 2 mm im Bereich der Hantelköpfe. Der Grundwerkstoff der Implantate war sowohl für die verwendeten Kontrollen als auch für die Proben Titan. Die Proben wiesen zusätzlich eine TiAgN – Beschichtung auf. Die technischen Daten des Beschichtungsverfahrens wurden der Autorin von Mitarbeitern des Lehrstuhls für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde (Leitung Prof. Dr. Groll) zur Verfügung gestellt.

Das Verfahren, welches zur Beschichtung dieser Implantate zum Einsatz kam, war das PVD (physical vapour deposition) System. Der Beschichtungsvorgang erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie bei Schmitz et al. (2014) beschrieben. Zunächst wurde in der Vakuumkammer (Pfeiffer Vakuum, Aslar, Germany) ein Vakuum von $1,0 \times 10^{-6}$ mbar erzeugt. Das Target bestand aus einem konventionellen scheibenförmigen Titantarget, welches mit vier kleinen Silbermodulen von je 5 mm Durchmesser ausgestattet war. Nach 15 Stunden wurde im ersten Schritt zunächst reines Argon-Gas Ar 100 sccm eingeleitet, um eine dünne Titanschicht zu erzeugen. Dabei arbeitete der Generator für das

Magnetron mit einer Leistung von 500 W und die Vorspannung am Target betrug 25 V. Die Beschichtungszeit der ersten Phase lag bei 5 Minuten.

In einem zweiten Schritt wurde in die Vakuumkammer ein Gasgemisch aus Argon und Stickstoff (Ar 100 sccm und N_2 3 sccm) eingeleitet, um die TiAgN Schicht auf die Prüfkörper abzuscheiden. Die Generatorleistung betrug weiterhin 500 W und die Vorspannung 25 V. Die Beschichtungszeit umfasste 5,5 Stunden. Die durch den Argon – Aufprall aus dem Target gelösten Titan – und Silberionen schieden sich zusammen mit Stickstoffionen an der Implantatoberfläche ab. Um eine ringsum gleichmäßige Beschichtung zu erlangen, befanden sich die Proben in einer Halterung, die eine beständige Rotation der Implantate gewährleistete. Zur Verbesserung der Oberfläche wurde an die Implantate eine Spannung angelegt, die freie Argonionen in Richtung der Implantate beschleunigte und durch den Aufprall der Argonionen lose auf der Beschichtung aufliegende Ionen entfernte. Eine Erhitzung der Proben war aus technischen Gründen nicht möglich. Nach Beendigung des Beschichtungsverfahrens wurden die Proben ca. drei Stunden zur Abkühlung im Vakuum belassen, um eine Verschmutzung der Beschichtung durch Einlagerung von, in der Luft befindlichen, Partikeln zu verhindern. Der Silbergehalt der Beschichtung betrug ungefähr 2 %.

2.2 Tierversuch

2.2.1 Versuchsaufbau

Der Tierversuch erfolgte nach den Kriterien der Normen DIN EN ISO 10993-2, DIN EN ISO 10993-6 und DIN EN ISO 10993-11. Die Ethik – Kommission der Regierung von Unterfranken hat die Studie zugelassen und die Genehmigung mit dem Aktenzeichen 55.2-2531.01-90/11 liegt vor.

Bei den Versuchstieren handelte es sich um drei weibliche Kaninchen der Rasse „New Zealand White Rabbits“ (Herkunft: Charles River, Kißleg, Deutschland).

Die Haltung der Tiere erfolgte paarweise oder einzeln bei einer Temperatur von 18 °C +/- 2 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 50 % - 60 %. Der Tagesrhythmus wurde mit Kunstlicht, 12 Stunden Hell/Dunkel vorgegeben, bei einer Intensität von 300 Lux 1 m über dem Boden. Der Luftwechsel erfolgte 12 – fach pro Stunde. Die Nahrung bestand aus keimfreier, standardisierter Labordiät (Fa. Sniff) und kommunalem Leitungswasser, welche den Kaninchen ad libitum zur Verfügung standen. Zur Eingewöhnung der Tiere waren zwei Wochen vorgesehen. Das präoperative Körpergewicht lag bei ca. 3000 g.

Das Tierexperiment war wie folgt aufgebaut. Insgesamt wurden vier Versuchstiere, drei regulär geplante und ein Ersatztier, eingesetzt. Dieses zusätzliche Kaninchen (Nr. 660) musste aufgrund der vorzeitigen Euthansie des Kaninchens Nr. 653, welches sich die Femora frakturiert hatte, nachgezogen werden. Den Tieren wurden jeweils sowohl in das rechte als auch in das linke Femur zwei Proben (TiAgN – beschichtete Titanimplantate) und eine Kontrolle (unbeschichtetes Titanimplantat) im Bereich des proximalen Femurkopfes quer zur Längsachse implantiert. Die Einheilzeit betrug für die Kaninchen Nr. 607, 610 und 660 drei Monate. Da im vorzeitig euthanasierten Tier (Nr. 653) die Implantate lediglich einen Monat einwachsen konnten, wurde dieses Tier nicht mit in die Auswertung einbezogen.

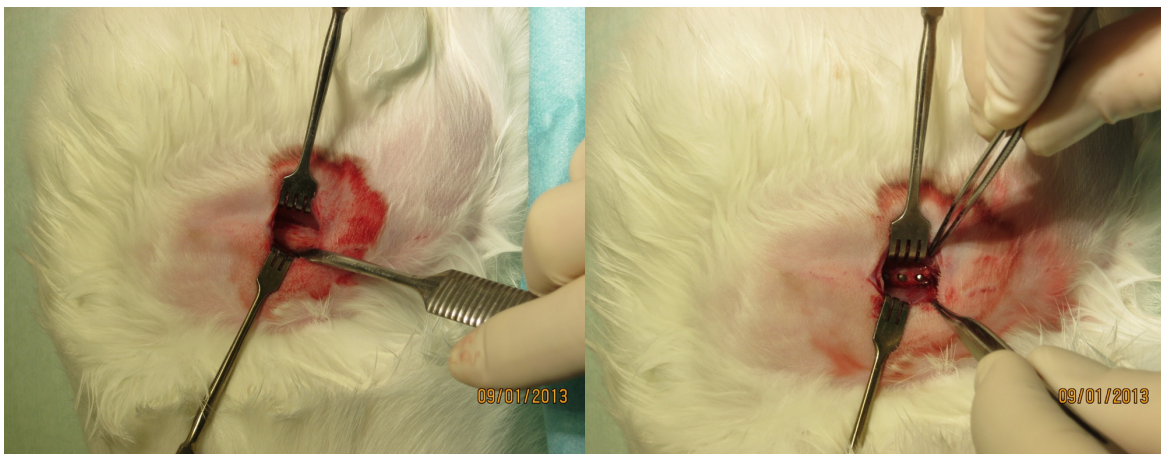
2.2.2 Operation der Versuchstiere

Zur korrekten Dosierung der Narkotika wurden die wachen Kaninchen am Vortag gewogen.

Am Beginn der Operation stand die Narkotisierung der Tiere mit den Wirkstoffen Ketamin 120 mg/Kg Körpergewicht und Rompun 5 mg/Kg Körpergewicht intramuskulär in den Oberschenkelmuskel. Innerhalb weniger Minuten nach Applikation trat die Wirkung ein. Anschließend wurde das Operationsgebiet rasiert, abgewaschen, desinfiziert und mit einer sterilen Abdeckung versehen.

Die Hautinzision verlief beginnend von der lateralen Oberschenkel – Streckseite bis zur Streckmuskulatur, Musculus quadriceps femoris. Innerhalb der Muskelsepten erfolgte die Präparation in Richtung Femur und das Periost wurde vom Knochen gelöst (Abb. 1A). Anschließend wurden im Diaphysenbereich, sowohl des rechten als auch des linken Femurs, drei zylindrische Bohrlöcher mit 2 mm Durchmesser und 6 mm Tiefe angelegt. Hierfür kam ein kieferchirurgischer Trepanbohrer zum Einsatz. Die Kühlung erfolgte durch kontinuierliches Spülen mit steriler, physiologischer Kochsalz – Lösung. Nach der ausgiebigen Spülung der Bohrlöcher, erfolgte das formschlüssige Einbringen der hantelförmigen Implantate (Abb. 1B). Durch den zweischichtigen Wundverschluss mittels Vicryl 3-0 Einzelknopfnähten und einem Sprühverband wurde das Operationsgebiet gedeckt. Die Dauer der Operation betrug ungefähr 45 Minuten.

Zur postoperativen Analgesie wurde den Kaninchen Metacam (Wirkstoff Meloxicam) direkt per os verabreicht. Des Weiteren wurden sie zweimal pro Woche gewogen, um den postoperativen Gewichtsverlauf zu dokumentieren sowie das Operationsgebiet täglich visuell kontrolliert.



A

B

Abb. 1: ***Intraoperativer Situs.** Abbildung 1A zeigt das zur Implantataufnahme freipräparierte Femur. In Abbildung 1B ist das Femur mit den drei eingebrachten Implantaten (eine Kontrolle und zwei Proben) vor Wundverschluss dargestellt. Die beiden Fotografien wurden der Autorin vom Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde (Leitung Prof. Dr. J. Groll) zur Verfügung gestellt.*

2.2.3 Euthanasie und Probenentnahme

Zur Euthanasie der Tiere, die eine Einheildauer von drei Monaten vorweisen konnten (Nr. 607, 610, 660), kamen die Wirkstoffe Medetomidin, Midazolam, Fentanyl und Pentobarbital zum Einsatz.

Nachdem die Kaninchen euthanasiert wurden, erfolgte die Entfernung der kompletten Femora aus den Tieren. Das umgebende Weichgewebe wurde abgeschabt und die Knochen für mindestens sieben Tage in 4 % gepufferte Formaldehydlösung gelagert.

2.3 Herstellung histologischer Schnitte mittels Trenn - Dünnschliff - Technik

2.3.1 Entwässerung und Fixierung

Die, der Autorin vom Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde (Leitung Prof. Dr. J. Groll) zur Verfügung gestellten, Proben lagerten 2,5 Jahre unter Lichtausschluss in einer Technovit 7200 VCL Lösung (Proben der Kaninchen Nr. 607, 610) bzw. in 4 % gepuffter Formaldehyd – Lösung (Proben des Kaninchens Nr. 660). Um das Einbetten in Kunstharz zu ermöglichen, mussten die Präparate des nachgezogenen Kaninchens Nr. 660 von der Autorin entwässert werden. Alle anderen Proben waren bereits entwässert gelagert.

Hierzu wurden zunächst die Knochenanteile, die Implantate enthielten, vom restlichen Femur abgetrennt. Die Unterscheidung zwischen Proben und Kontrollen innerhalb eines Kaninchenfemurs erfolgte durch eine Markierung des Knochens vor der Röntgenaufnahme mittels eines röntgenopaken Drahtes im proximalen Anteil. Durch das Röntgen der Femora konnte die genaue Lage der Implantate im Knochen ermittelt werden. Die Implantationsreihenfolge, die im Voraus festgelegt worden war, entsprach von proximal nach distal Probe 1, Probe 2 und Kontrolle. Die Abtrennung implantattragender Knochenanteile vom restlichen Gewebe und die Trennung von Knochenbereichen mit Probeimplantaten von solchen mit Kontrollimplantat erfolgte an der Trennbandsäge (Exakt Apparatebau GmbH & Co. KG, Norderstedt).

Anschließend wurde die Entwässerung der Proben, wie in Tabelle 3 dargestellt, durchgeführt.

Tabelle 3: Entwässerung der Proben

Lagerung	Lösung	Ansatz im Volumenverhältnis
1. Tag	Technovit 7100 VCL/Dest. Wasser	50/50
2. Tag	Technovit 7100 VCL/Dest. Wasser	70/30
3. Tag	Technovit 7100 VCL/Dest. Wasser	90/10
4. Tag	Technovit 7100 VCL	100
5. Tag	Technovit 7100 VCL/Technovit 7200 VCL	50/50
6. Tag	Technovit 7200 VCL	100
7. Tag	Technovit 7200 VCL	100
8. Tag	Technovit 7200 VCL	100
9. Tag	Technovit 7200 VCL	100
10. Tag	Technovit 7200 VCL	100

Die Intervalle der einzelnen Entwässerungsschritte wurden auf 2 bis maximal 3 Tage (über das Wochenende) ausgedehnt. Ab Tag 6 erfolgte die Lagerung der Proben unter Lichtausschluss.

Anschließend wurden alle Proben, mit der zu untersuchenden Seite nach unten, mittels des Klebers Technovit 7230 VCL (Fa. Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim) in die Einbettformen geklebt. Es folgte ein 10 – minütiges Aushärten mit UV – Licht in der Präzisions – Vakuum – Presse (Exakt Apparatebau GmbH & Co. KG, Norderstedt). Nach dieser initialen Fixierung wurde die Einbettform bis zum Rand mit Technovit 7200 VCL aufgefüllt und im HISTOLUX – Lichtpolymerisator (Exakt Apparatebau GmbH & Co. KG, Norderstedt) insgesamt 10 Stunden (2 Stunden Zeit 1, 8 St. Zeit 2) polymerisiert.

2.3.2 Herstellung der Trenn – Dünnschliffe

Zur Anfertigung der Schliffpräparate wurde die Trenn – Dünnschliff – Technik nach Donath herangezogen (Donath 1988). Diese ermöglicht die Herstellung dünner Schliffe unter 10 µm von nicht schneidbaren Geweben:

Die Kunstharzblöckchen wurden dazu zunächst mit Technovit 4000 (Fa. Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim) auf den Plexiglas – Objektträger (Exakt Apparatebau GmbH & Co. KG, Norderstedt) OT1 geklebt. Nach 10 – minütiger Aushärtezeit konnte das überschüssige Technovit 7200 (Exakt Apparatebau GmbH & Co. KG, Norderstedt) mittels Sandpapier, Körnung 800, (Schmitz Metallographie, GmbH Herzogenaurach) am EXAKT – Mikrometerschleifsystem (Exakt Apparatebau GmbH & Co. KG, Norderstedt) bis zum ersten Anschliff der Implantatfläche abgetragen werden. Es folgte die Politur der angeschliffenen Fläche mit dem Sandpapier, Körnung 1200, für 2 – 3 Oszillationsbewegungen, gefolgt von der Körnung 2400 für 10 Minuten und zuletzt der Körnung 4000 für ebenfalls 10 Minuten. Die Trocknungszeit im Brutschrank betrug 30 Minuten bei 37 °C. Anschließend wurde das Präparat A (Abb. 2) an zwei Stellen mit der EXAKT – Mikrometerschraube (Exakt Apparatebau GmbH & Co. KG, Norderstedt) gemessen und der kleinere Wert notiert, um im weiteren Verlauf

den Endschliffwert zu berechnen. Alle weiteren Messungen wurden ebenfalls mit der EXAKT – Mikrometerschraube durchgeführt.

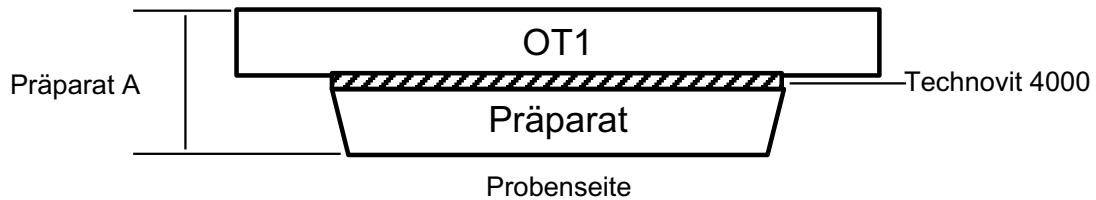


Abb. 2: Skizze Präparat A

Zur Herstellung des „Sandwiches“ D (A+OT2) (Abb. 3) wurde zunächst der beschriftete und mittels Ethanol und Zellstofftuch gereinigte Objektträger OT2 gemessen.

Aus den vier Messpunkten wurde der kleinste Wert notiert. Die Befestigung des OT2 an der Deckplatte der Präzisionsklebepresse erfolgte vakuumunterstützt. Auf die Bodenplatte wurde das mit 1 – 2 Tropfen Technovit 7210 (Fa. Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim) beschickte Präparat A gelegt und langsam ohne Luft einschüsse gegen den, an der Deckplatte befestigten, OT2 gedrückt. Die Polymerisation erfolgte zunächst 2 Minuten ohne, darauf 15 Minuten mit UV – Licht. Zur Aushärtung des Klebers lagerte das „Sandwich D“ 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank. Zur Berechnung der Klebefläche wurde dessen Dicke ebenfalls gemessen und der höhere Wert notiert.

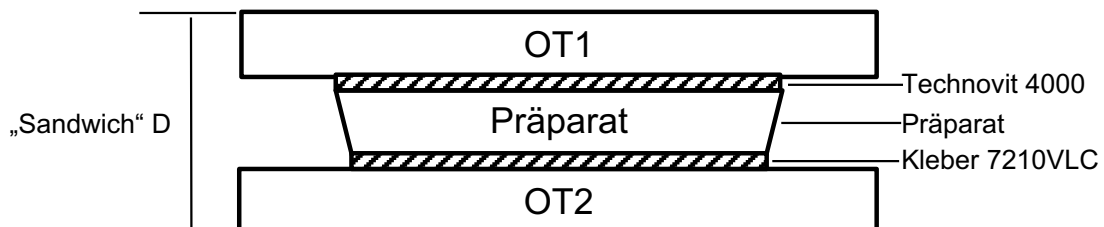


Abb. 3: „Sandwich“ D

Die Formel zur Berechnung der Dicke der Klebefläche KL lautete:

$$KL = D - (A+OT2)$$

Zur Herstellung des Trennschnittes mit Hilfe der EXAKT – Bandsäge (Exakt Apparatebau GmbH & Co. KG, Norderstedt) wurde die OT1 Seite des „Sandwiches“ an die Vakuumpalte der Säge angebracht. Das Sägeblatt (0,1mm Diamant, Exakt Apparatebau GmbH & Co. KG, Norderstedt) lag an der Probe an und wurde mittels der Mikrometerschraube solange von OT2 wegbewegt, bis kein Schleifgeräusch mehr hörbar war. Anschließend wurden an der Mikrometerschraube weitere 300 µm zugegeben. Das Ergebnis nach dem ersten Sägevorgang war Präparat A und der erste abgetrennte Dünnschliff OT2. Die Schnittdicke betrug ca. 400 µm. Anschließend musste die Schliffdicke auf ca. 30 µm reduziert werden.

Hierzu erfolgte, am dafür verwendeten EXAKT – Mikro – Schleifsystem (EMS), zunächst die Nullpunkteinstellung. Dazu wurde die Mikrometerschraube so eingestellt, dass sich die Kontakte gerade noch nicht berührten und der Schleifvorgang gestartet. Der erste Motorenstopp gab den ungefähren Nullpunkt vor. Den exakten Nullpunkt erhielt man, indem man 20 Mikrometer zugab und den Schleifvorgang erneut startete, bis die Motoren stoppten. Des Weiteren erfolgte vor dem Start des Schleifvorgangs eine Messung des OT2 mit dem aufgeklebten Präparat sowie die Errechnung der Endschliffdicke (E), die sich aus der Summe der Schichtdicke des jeweiligen Objektträgers, der Klebeschicht und der geforderten Präparatdicke (PD) ergab.

Die Formel zur Berechnung der Endschliffdicke (E) lautete wie folgt:

$$E = OT2 + KL + PD$$

Für die gewünschte Endschliffdicke wurden zunächst 30 µm angenommen. Der Abtrag während des Schleifvorgangs richtete sich nach der Dicke des Trennschliffs. Das Ziel war der Endschliffwert + ca. 10 - 20 µm.

Zunächst reduzierte man am EXAKT – Mikro – Schleifsystem (EMS) das Andruckgewicht auf 100 g und polierte das Präparat in zwei Stufen, 3 – 5 Minuten mit Politurpapier Körnung 2400 und 5 - 10 Minuten mit Politurpapier Körnung 4000. Nach der Fertigstellung der Dünnschliffe, wurden diese zur besseren Unterscheidbarkeit der Gewebe histologisch eingefärbt.

2.4 Masson – Trichrom – Goldner Färbung

Um die histologischen Dünnschliffe mikroskopisch beurteilen zu können, wurden die unterschiedlichen Gewebeanteile nach der Masson – Trichrom – Goldner Methode selektiv angefärbt. Dazu wurden, wie nachfolgend beschrieben, die Färbelösungen zunächst hergestellt und anschließend die Präparate darin eingelegt.

2.4.1 Herstellung der Lösungen

Aus folgenden Substanzen wurden die Färbelösungen angesetzt (Tabelle 4):

Tabelle 4: Für die Färbelösungen verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Weigerts Eisenhaematoxylin (Lösung A und B)	Fa. Chroma GmbH & Co. KG, Münster
Säurefuchsin	Fa. Chroma GmbH & Co. KG, Münster
Xylidin-Panceau	Fa. Chroma GmbH & Co. KG, Münster
Azophloxin	Fa. Chroma GmbH & Co. KG, Münster
Orange G	Fa. Chroma GmbH & Co. KG, Münster
Molybdätophosphorsäure	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
Lichtgrün, gelblich	Fa. Fluka GmbH, Deisenhofen
100 % Essigsäure	Fa. Merck KGaA, Darmstadt

Die genauen Zusammensetzungen der einzelnen Lösungen waren, wie folgt:

Weigerts Eisenhaematoxylin:

Lösungen „A“ und „B“ wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Haltbarkeit war auf eine Woche beschränkt.

Masson – Lösung (Goldner1):

1 g Säurefuchsin wurde in 100 ml destilliertem Wasser gelöst und mit 1 ml 100 % Essigsäure versetzt.

1 g Xylidin – Ponceau wurde ebenfalls in 100 ml destilliertem Wasser gelöst und 1 ml 100 % Essigsäure dazugegeben.

0,5 g Azophloxin wurde in 100 ml destilliertem Wasser gelöst jedoch mit 0,2 ml 100 % Essigsäure versetzt.

33,5 ml der Säurefuchsin – Lösung wurden mit 66,5 ml Xylidin – Ponceau – Lösung gemischt und anschließend mit 20 ml Azophloxin – Lösung und 880 ml der 0,2 % Essigsäure versetzt.

Orange G – Lösung:

10 g Orange G wurden in 500 ml destilliertem Wasser gelöst und mit 15 g Molybdätophosphorsäure versetzt.

Lichtgrün – Lösung:

0,5 g Lichtgrün und 1 ml 100 % Essigsäure wurden in 500 ml destilliertem Wasser gelöst.

Aufgrund der langen Haltbarkeit einiger Färbelösungen, konnten die drei Letztgenannten für diese Studie gebrauchsfertig genutzt werden. Lediglich das Eisenhaematoxylin musste wöchentlich neu angemischt werden.

2.4.2 Durchführung der Färbung

Die nachfolgend dargestellten Arbeitsschritte wurden zur Färbung der Schliffe durchgeführt.

- 15 min. Färbung der Trenn – Dünnschliffe in Weigerts Eisenhaematoxylin
- 5 min. Spülung unter fließendem Leitungswasser
- 7 min. Färbung in Masson – Lösung (Goldner 1)
- kurze Spülung mit destilliertem Wasser
- kurze Spülung mit 2 % Essigsäure
- kurze Spülung mit destilliertem Wasser
- 5 min. Färbung in Orange G – Lösung
- kurze Spülung mit destilliertem Wasser
- kurze Spülung mit 2 % Essigsäure
- kurze Spülung mit destilliertem Wasser
- 15 min. Färbung in vorgewärmter Lichtgrün – Lösung bei 60 °C im Brutschrank
- kurze Spülung mit destilliertem Wasser
- kurze Spülung mit 2 % Essigsäure
- kurze Spülung mit destilliertem Wasser

Im Anschluss wurden die gefärbten Schnitte an der Luft getrocknet. Auf das Deckglas wurde, aufgrund der Gefahr der Blasenbildung, verzichtet.

2.4.3 Markierung des Gewebes

Die Färbung der Dünnschliffe nach Masson – Trichrom – Goldner ermöglichte die Differenzierung des Gewebes. Das mineralisierte Knochengewebe stellte sich leuchtend grün, die verkalkte Knochenmatrix hellgrün und das Osteoid rot dar (Tabelle 5).

Tabelle 5: Trichrom – Gewebeeinfärbung nach Masson und Goldner

Gewebe	Farbe
Mineral. Knochengewebe und Kollagen	leuchtend grün
verkalkte Knochenmatrix	hellgrün
Osteoid	rot
Zellkerne	blau – schwarz
Zytoplasma	rötlich – braun
Erythrozyten	orange

2.5 Mikroskopische Aufnahmen für die Datenerhebung

Um die Osseointegration der Implantate objektivieren zu können, wurden die 42 Dünnschliffpräparate zunächst mikroskopiert. Mittels des Stereomikroskops (Zeiss Discovery. V20, Stereo Axio Cam ICc5) wurden von jedem Präparat je ein Übersichtsbild angefertigt. Anschließend erfolgte die Erstellung von Abschnittsbildern der Implantatoberfläche mit dem Mikroskop Keyence BZ – 9000E (invertiertes Fluoreszenz – Phasenkontrast – Mikroskop), lichtmikroskopisch in 40 – facher Vergrößerung. Hierbei war darauf zu achten, dass die Aufnahmen überlappend angefertigt wurden. Die Überschneidung von Bildanteilen war notwendig, um anhand dieser Einzelbilder mit dem Programm Hugin (2014.0.0 © Pablo d’Angelo) den ursprünglichen Implantatanschnitt

rekonstruieren zu können. Mittels des Programms ImageJ (1.50 g National Institutes of Health, USA) wurde das Implantat – Gewebe – Interface vermessen. Die gemessenen Abschnitte wurden für jeden Untersuchungsparameter (Knochen – Implantat – Kontakt, Osteoid, Bindegewebe, Spalten und Artefakte) pro Implantatanschnitt addiert und mit dem Gesamtumfang des jeweiligen Abschnittes ins Verhältnis gesetzt. Es wurde der Anteil an Knochen – Implantat – Kontakt gemessen, bestehend aus kortikalem und spongiösem Knochen, das Osteoid, als Knochenvorstufe, sowie der Anteil an Spalten, als Bereiche, an denen die Implantate keinen Kontakt zum Gewebe aufwiesen. Bindegewebe konnte an den untersuchten Implantatanschnitten nicht nachgewiesen werden. Einzelne Bereiche, an denen sich durch die Bearbeitung der Proben das Gewebe von den Implantaten löste, wurden als Artefakte angesehen und als nicht beurteilbarer Bereich aus der Statistik ausgenommen, um Verfälschungen zu vermeiden. Nach der Datenerhebung erfolgte die statistische Auswertung.

2.6 Statistische Auswertung

Alle während der Datenanalyse erhobenen und berechneten Messgrößen wurden in Excel – Tabellen (Microsoft Excel, Version 15.33) gespeichert. Die nachfolgende statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels des Programmes SPSS Statistics (Version 23) der Firma IBM. Beratende Unterstützung bezüglich der Statistik erhielt die Autorin von Frau Carolin Malsch (Lehrstuhl für klinische Epidemiologie und Biometrie der Julius – Maximilians – Universität Würzburg). Aufgrund der Tatsache, dass je zwei Kontrollen und vier Proben in ein Kaninchen implantiert wurden und damit eine Abhängigkeit innerhalb der Subjekte besteht, die einzelnen Kaninchen jedoch zueinander unabhängig sind, wurde die verallgemeinerte Schätzgleichung zur Auswertung herangezogen. Durch die beiden TiAgN – beschichteten Proben je Kaninchenfemur ergab sich eine Messwertwiederholung, die in diesem Verfahren Berücksichtigung findet. Die Subjektvariablen waren dabei die Kaninchen und die Innersubjektvariablen die Femurseiten sowie die Beschichtung und die Messwertwiederholung. Die abhängigen Variablen bildeten jeweils die zu untersuchenden Parameter Knochen – Implantat – Kontakt, Osteoid, Bindegewebe, Spalten und Artefakte. Innerhalb dieses Modells wurden der Mittelwert, der Standardfehler, der Regressionskoeffizient, das 95 % Wald – Konfidenzintervall und die statistische Signifikanz eruiert. Als statistisch signifikant galt $p \leq 0,05$. Die Messgrößen wurden zunächst auf Gruppenebene ermittelt, sodass je alle TiAgN – beschichteten Proben mit allen unbeschichteten Kontrollen der Kaninchen verglichen wurden. In einem zweiten Schritt stand der Vergleich der Daten der Probe – und Kontrollimplantate für jedes einzelne Kaninchen und die Analyse der interindividuellen Unterschiede der Tiere im Mittelpunkt. Zur Veranschaulichung erfolgt die Darstellung der Ergebnisse grafisch mittels Balken – und Punktdiagrammen sowie mit Hilfe von Boxplots zur Verdeutlichung der Verteilung.

3 Ergebnisse

Im vorliegenden Tierversuch wurde die ossäre Integration von TiAgN – beschichteten Titanimplantaten im Vergleich zu unbeschichteten Kontrollimplantaten in Kaninchenfemora untersucht. Im ersten Schritt wurden, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, die Femora aus den drei Kaninchen entnommen und für die Präparatherstellung vorbereitet. Im zweiten Schritt erfolgte die Herstellung der Dünnschliffe, woraus insgesamt 64 Implantatanschnitte ausgewertet wurden. Diese Dünnschliffe wurden nach der Trenn – Dünnschliff – Technik nach Donath erstellt und wiesen im Mittel einen Endschliffwert von 31,8 µm auf (Tabelle 6) (Donath 1988). Je nach Lage der Implantate im Knochen, wurden die hantelförmigen Proben längs – bzw. quer angeschnitten, wodurch die Anzahl der Einzelschnitte pro Implantat zwischen zwei und sechs variierte. Vereinzelt haben sich während des Schleifvorgangs Implantate aus dem Präparat gelöst, für die keine Werte ermittelt werden konnten (Tabelle 4: Schnitt 1: 660 R Pr. 1 u. 2.). Insgesamt wurden von den sechs Kontrollen und 12 Proben aller drei Kaninchen 64 Implantatanschnitte ausgewertet, die sich auf 42 Dünnschliffpräparate verteilten. Diese wiederum zeigten jeweils einen Anschnitt von einem bis drei Implantaten (Kontrolle, Probe 1 u. 2, Kontrolle/Probe 1 u. 2) (Tabelle 6). Von diesen 64 Implantatanschnitten wurden 2006 Einzelbilder aufgenommen und für die Auswertung mit Hilfe des Programms Hugin wieder zu 64 Quer – bzw. Längsschnittbildern zusammengesetzt. Um Aussagen über die Anteile der Untersuchungsparameter Knochen, Osteiod, Spalten, Artefakte und Bindegewebe am Gesamtumfang des Implantatquerschnitts treffen zu können, wurden diese Parameter mittels des Programmes Image J vermessen und zum Gesamtumfang des Anschnittes ins prozentuale Verhältnis gesetzt. Zunächst wurde dabei der Anteil an Artefakten gemessen. Diese Artefaktanteile wurden vom jeweiligen Gesamtumfang abgezogen und der restliche beurteilbare Bereich als 100 % definiert, um Verfälschungen zu vermeiden. Dieser Bereich wurde anschließend auf Knochen – Implantat – Kontakt, Osteoid, Spalten und Bindegewebe hin untersucht.

Für die statistische Auswertung wurde der jeweilige Mittelwert der Einzelschnitte pro Implantat für die jeweiligen Untersuchungsparameter Knochen – Implantat – Kontakt, Osteoid, Spalten, Artefakte und Bindegewebe herangezogen.

In den nachfolgenden Kapiteln werden zunächst die Bilder der histologischen Präparate, von den Übersichtsbildern, über die Abschnittsbilder bis zu den rekonstruierten Bildern vorgestellt. Anschließend wird der prozentuale Anteil an Knochen – Implantat – Kontakt, Osteoid und Spalten beschrieben. Bindegewebe konnte bei den untersuchten Implantatanschnitten nicht nachgewiesen werden. Artefakte wurden als nicht beurteilbarer Bereich aus der Statistik ausgenommen. Schließlich werden die Ergebnisse in Kapitel 4 interpretiert und in die Diskussion, soweit sinnvoll, einbezogen.

Tabelle 6: Endschliffdicke der Präparate in μm

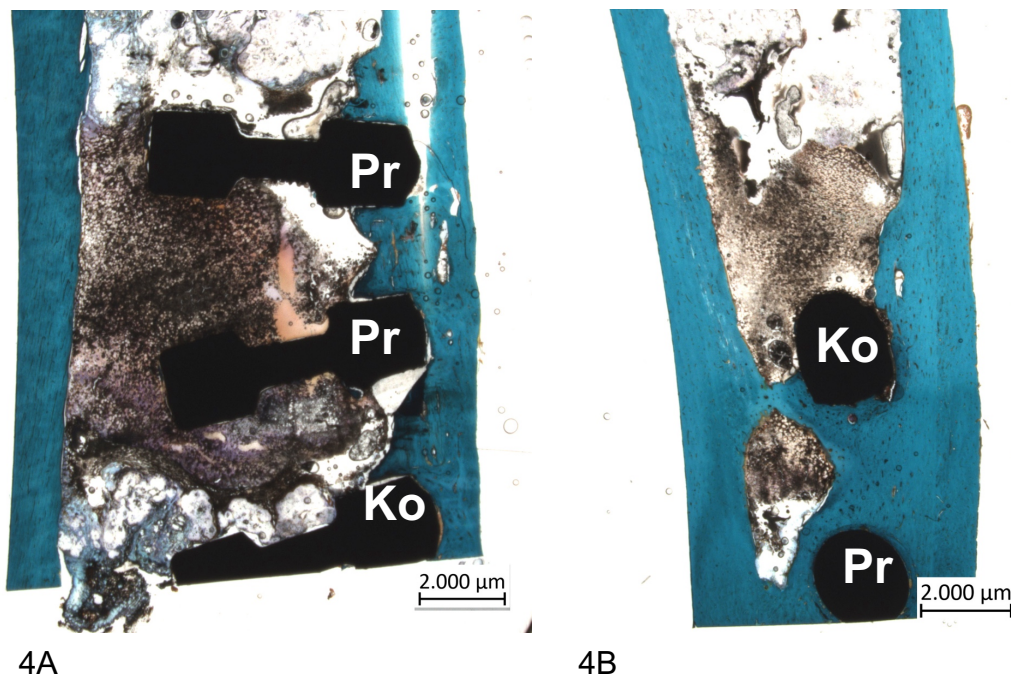
Kaninchen	Schnitt 1	Schnitt 2	Schnitt 3	Schnitt 4	Schnitt 5	Schnitt 6
607 L Ko.	37	47				
607 L Pr. 1 u. 2	14	22	29	27	33	
607 R Ko.	23	49	27	14	31	
607 R Pr. 1 u. 2	32	37	34	29		
610 L Ko. / Pr. 1 u. 2	26	32	12	24	20	
610 R Ko. / Pr. 1 u. 2	35	25				
660 L Ko.	42	30	37	22		
660 L Pr. 1 u. 2	20	21	16	35	34	16
660 R Ko.	35	39	32	37		
660 R Pr. 1 u. 2	-	22	28	39	26	33

3.1 Mikroskopische Aufnahmen

3.1.1 Übersichtsbilder

Zur Darstellung der Dünnschliffpräparate wurden mit dem Stereomikroskop Übersichtsbilder aufgenommen. Abbildung 4A zeigt ein Dünnschliffpräparat, indem die hantelförmigen Implantate längs angeschnitten sind. Sowohl die Probe als auch die beiden Kontrollen, die in das rechte Femur des Kaninchens Nr. 610 implantiert wurden, sind in diesem Präparat enthalten. Zur

Differenzierung zwischen den beschichteten Proben und der unbeschichteten Kontrolle wurden die Femora proximal röntgendicht markiert. Die Implantationsreihenfolge von proximal nach distal lautete zweimal Probe anschließend Kontrolle. Um die Trennschnitte korrekt zu platzieren, wurden die Femora zunächst geröntgt und die Lage der Implantate angezeichnet. In diesem Präparat (Abb. 4A) ist das untere, angeschnittene Implantat die Kontrolle, bei den beiden darüberliegenden handelt es sich um die Proben. Die Kortikalis stellt sich grün dar, die Spongiosa rötlich, braun und etwas verwaschen. Das mittlere Implantat zeigt rechts unten, im Bereich der Kortikalis ein teilweises Ablösen des Gewebes. Dies ist durch die Präparatherstellung bedingt und wird als Artefakt gewertet. Das Präparat in Abbildung 4B enthält zwei Implantate, die quer angeschliffen wurden. In diesem Fall wurde bei der Durchtrennung des Femurs die Probe angeschnitten, welche sich in dieser Schicht komplett von Kortikalis umgeben darstellt. Die Kontrolle ist teilweise von Spongiosa umgeben.



4A 4B
Abb. 4: *Dünnschliffpräparate in 6 facher Vergrößerung. Masson – Trichrom – Goldner Färbung.* 4A: (Kaninchen Nr. 610, rechtes Femur) Anschliff in der Längsachse - die beiden oberen Implantate entsprechen den Proben (Pr, Implantate mit TiAgN – Beschichtung), das untere der Kontrolle (Ko, Titanimplantat ohne Beschichtung). 4B: (Kaninchen Nr. 607, linkes Femur) Anschliff im Querschnitt - das obere Implantat entspricht der Kontrolle (Ko, Titanimplantat ohne Beschichtung), das untere der Probe (Pr, Implantat mit TiAgN – Beschichtung). (Eichstrich 2000 µm)

3.1.2 Abschnittsbilder

Zur genaueren Beurteilung des Einwachsens der Implantate wurden Abschnittsbilder in 40 – facher Vergrößerung angefertigt.

Die Abbildungen 5A und 5B zeigen das direkte Anwachsen der Kortikalis an die Implantatoberfläche. Sowohl die Kontrolle als auch die Probe weisen einen direkten Knochenkontakt auf. In dieser Vergrößerung ist die Struktur des Lamellenknochens mit den Osteonen und den Havers'schen Kanälen deutlich erkennbar.

Das Heranwachsen der Spongiosa an die Implantatoberfläche zeigen die Abbildungen 6A und 6B. Dabei ist hervorzuheben, dass sich auch im Bereich des Markraums eine kortikale Knochenlamelle an der Implantatoberfläche bildet. Das rot gefärbte Osteoid ist in den Abbildungen 7A und 7B zu erkennen. Das Nichtanwachsen von Gewebe an die Implantatoberfläche stellt sich in den Abbildungen 8A und 8B als Spaltbildung dar. Ein teilweises Ablösen von ehemals angewachsenem Gewebe, das vermutlich durch den Prozess der Präparatherstellung auftrat, wird als Artefakt deklariert und aus der Statistik ausgenommen. Im Gegensatz zu den Bereichen, an denen das Gewebe nicht an die Implantatoberfläche herangewachsen ist, sind hier Gewebereste auf der Implantatoberfläche erkennbar (Abb. 9A, B).

Kortikalis

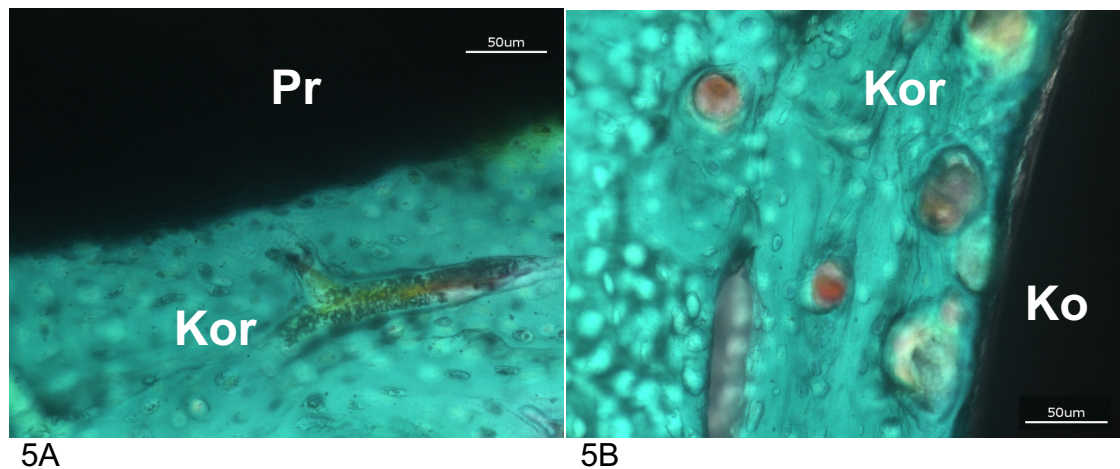


Abb. 5: Abschnittsbilder Kortikalis. Sowohl Probe (5A: Implantat mit TiAgN – Beschichtung, Kaninchen Nr. 607, rechtes Femur, Pr.) als auch Kontrolle (5B: Titanimplantat ohne Beschichtung, Kaninchen Nr. 610, linkes Femur, Ko.) zeigen ein direktes Anwachsen der Kortikalis (K) an die Implantatoberfläche. (Eichstrich 50 µm)

Spongiosa

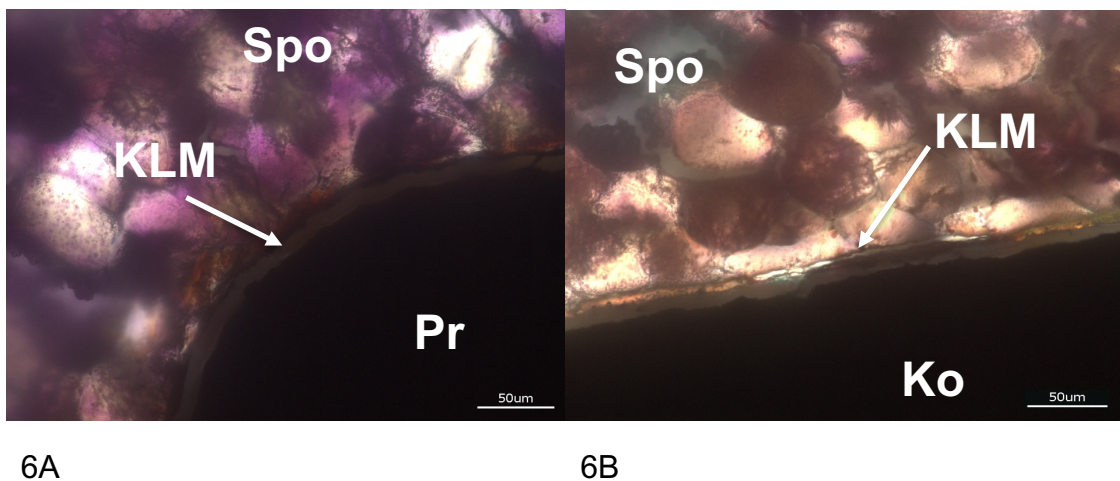


Abb. 6: Abschnittsbilder Spongiosa. Kaninchen Nr. 610, rechtes Femur, Probe (Pr.) mit TiAgN – Beschichtung (6A) und Kontrolle (Ko), unbeschichtet (6B). Im Bereich der Spongiosa (Spo) bildet sich im Kontakt mit der Implantatoberfläche eine kortikale Knochenlamelle (KLM) aus. (Eichstrich-50-µm)

Osteoid

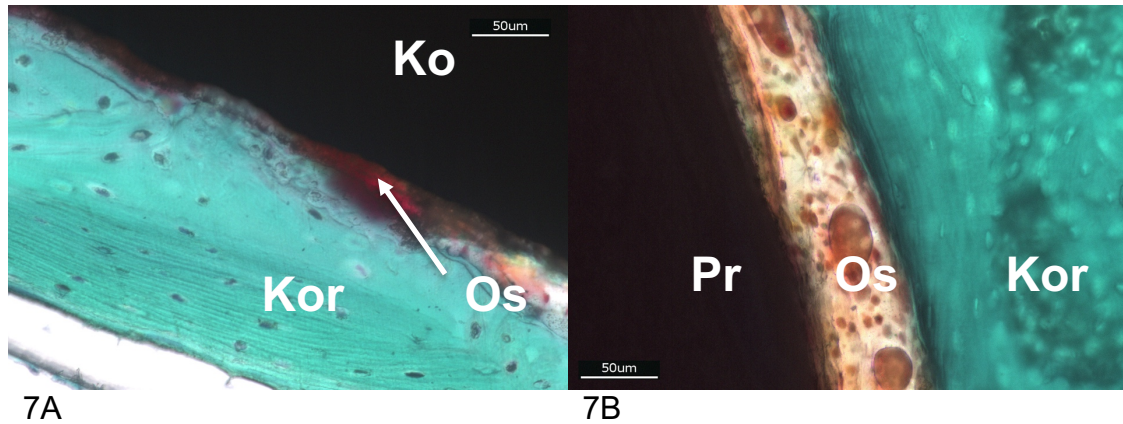


Abb. 7: Abschnittsbilder Osteoid. Einige Abschnitte der Implantatoberflächen weisen zum Zeitpunkt der Präparatentnahme noch nicht mineralisierte Knochenanteile auf. Der direkte Kontakt zwischen Osteoid (Os) und Implantatoberfläche lässt sich sowohl bei den unbeschichteten Kontrollen (7A: Kaninchen Nr. 610, rechtes Femur, Ko.), als auch bei den mit TiAgN – Beschichteten Proben (7B: Kaninchen Nr. 610, rechtes Femur, Pr.) nachweisen. (Eichstrich 50 µm)

Spalten

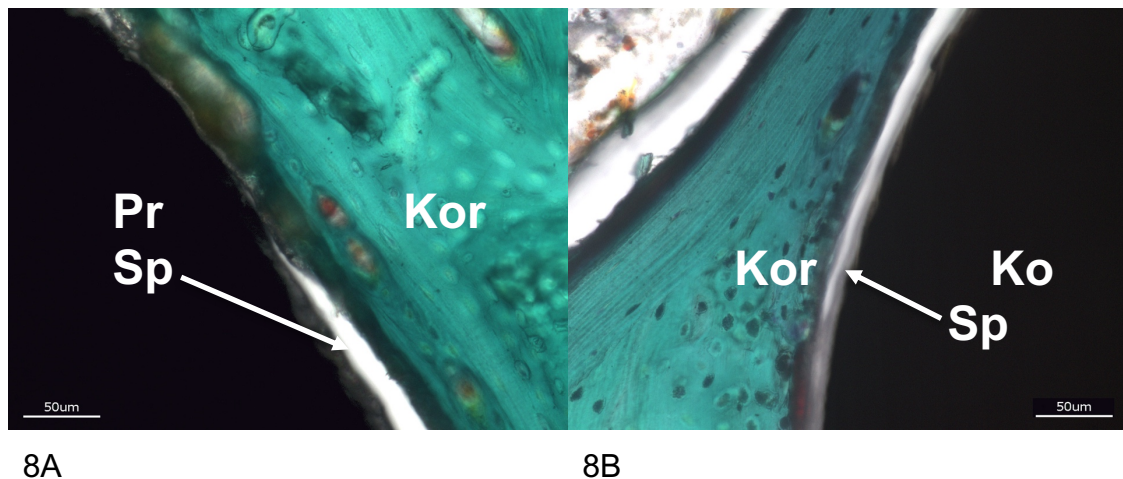


Abb. 8: Abschnittsbilder Spalten. Bereiche, in denen die Implantatoberfläche keinen direkten Kontakt zum Gewebe aufweist, werden als Spalten (Sp) deklariert. Sowohl TiAgN – beschichtete (8A: Kaninchen Nr. 607, rechtes Femur, Pr.), als auch unbeschichtete Implantate (8B: Kaninchen 610, linkes Femur, Ko.) zeigen einen geringen Anteil an Spalten. (Eichstrich 50 µm)

Artefakte

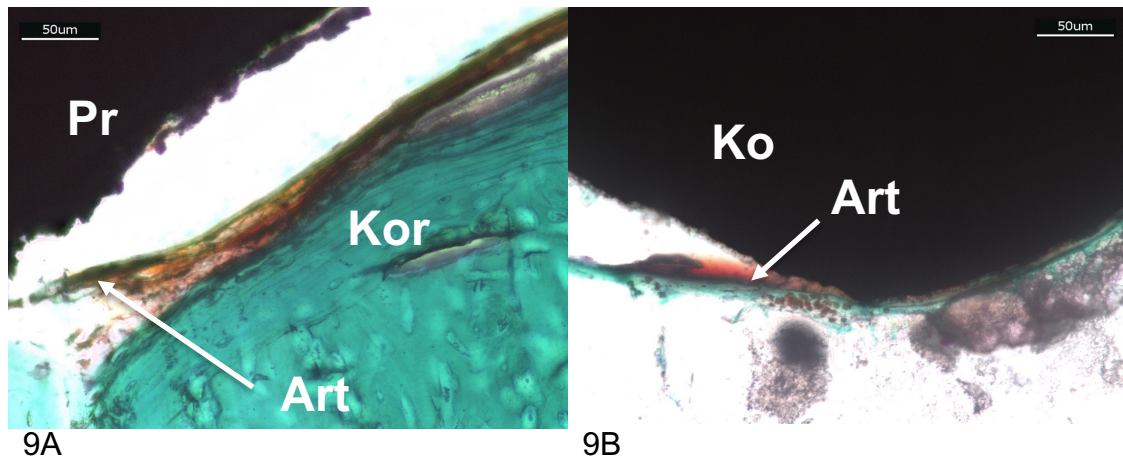
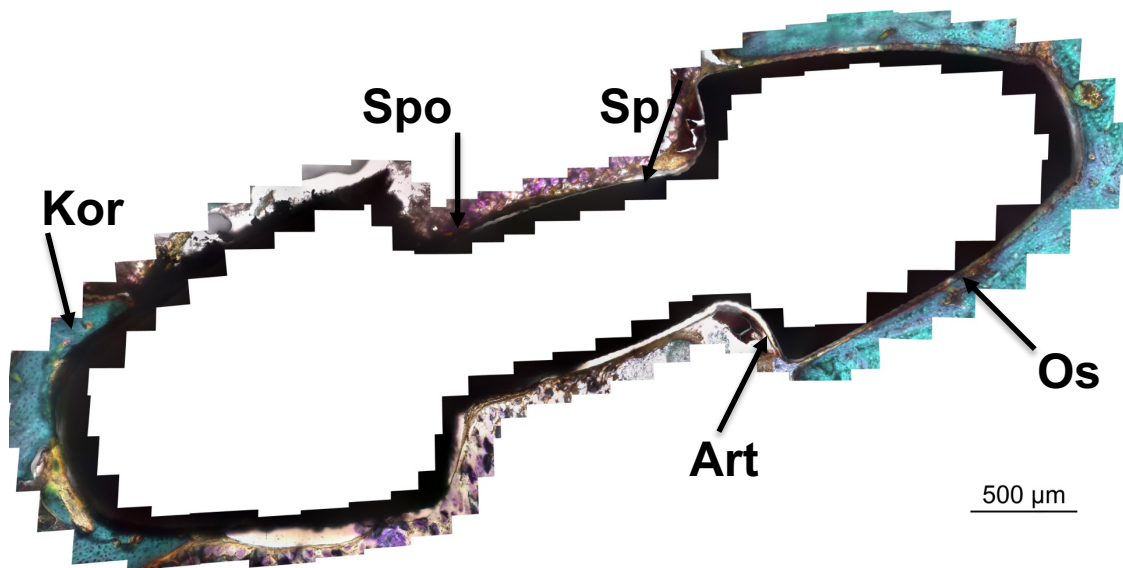


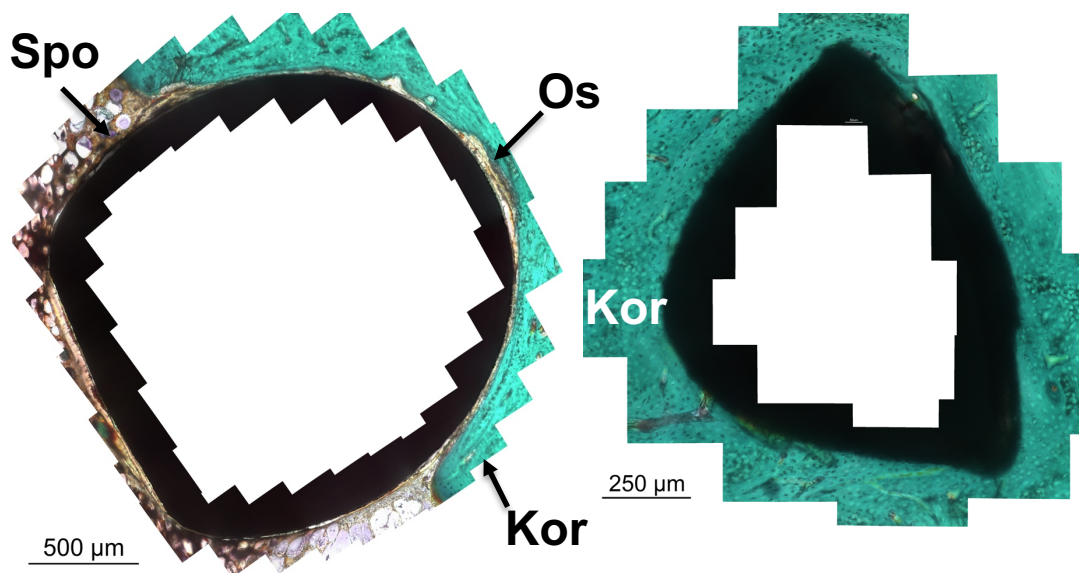
Abb. 9: Abschnittsbilder Artefakte. Artefakte (Art), die durch die Ablösung des Gewebes von der Implantatoberfläche im Rahmen der Präparatherstellung entstanden sind, werden aus der Statistik ausgeschlossen. Auf der Implantatoberfläche sind einzelne Gewebereste erkennbar, jedoch kann hier nicht beurteilt werden um welche Art Gewebe es sich handelt (9A: Kaninchen Nr. 607, rechtes Femur, Pr., 9B: Kaninchen Nr. 610, linkes Femur, Ko.). (Eichstrich 50 µm)

3.1.3 Zusammengesetzte Bilder

Um die Anteile der Untersuchungsparameter Knochen – Implantat – Kontakt, Osteoid, Spalten, Bindegewebe und Artefakte an der Implantatoberfläche messen zu können, wurden die Einzelbilder mit Hilfe des Programms Hugin wieder zu einem Gesamtbild zusammengesetzt. Die Voraussetzung für die Rekonstruktion war die Aufnahme der Einzelbilder mit überlappenden Bereichen. Mit dem Programm ImageJ wurden anschließend die jeweiligen Abschnitte entlang des Implantatumfangs gemessen und mit dem jeweiligen Gesamtumfang des Präparatanschnittes ins Verhältnis gesetzt. Die Abbildungen 10A – C zeigen exemplarisch zusammengesetzte Bilder, sowohl längs als auch quer angeschnitten. In diesen Schnitten sind Anteile an grün gefärbter Kortikalis, rot gefärbtem Osteoid, rötlich – braun gefärbter Spongiosa, sowie Spalten und Artefakte zu erkennen.



10A



10B

10C

Abb. 10: Rekonstruierte Implantate im Längs - und Querschnitt.

(10A: Längsschnitt: Kaninchen Nr. 607, rechtes Femur, Pr. / 10B/C: Querschnitt: Kaninchen Nr. 607, linkes Femur, Pr. und Nr. 607, rechtes Femur, Pr.) Die Einzelbilder wurden mittels des Programmes Hugin fusioniert. Diese dienten als Basis für die Messung der Parameter Knochen – Implantat – Kontakt, der in Kortikalis (Kor) grün gefärbt und Spongiosa (Spo) bräunlich – rot unterteilt wurde, Osteoid (Os) rot gefärbt, Spalten (Sp) weiß und Artefakte (Art). (Eichstrich 10A und B 500 µm, 10C 250 µm)

3.2 Auswertung

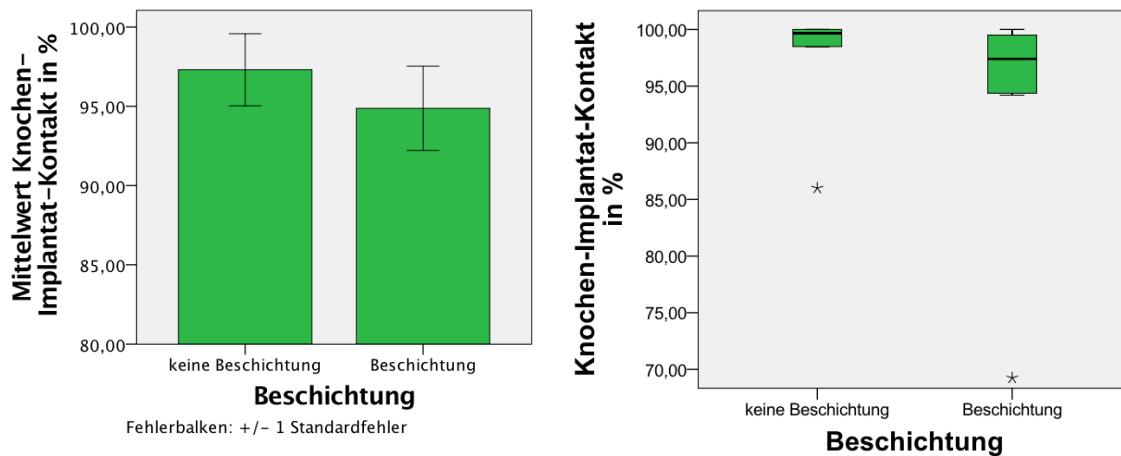
Die Auswertung basiert auf den 64 rekonstruierten Bildern von insgesamt drei Kaninchen (Nr. 607, 610, 660). Pro Kaninchen wurden je zwei Kontrollimplantate (ohne Beschichtung) und vier Proben (mit TiAgN – Beschichtung) untersucht. Für Kaninchen Nr. 610 gingen jedoch lediglich drei Proben in die Auswertung ein, da während der Herstellung der Knochenblöckchen, welche anschließend für die Dünnschliffpräparation vorbereitet wurden (Kapitel 2), eine Implantatprobe des Kaninchens Nr. 610 zu Verlust ging.

Im Folgenden werden zunächst die prozentualen Anteile an Knochen – Implantat – Kontakt, Osteoid und Spalten am Gesamtumfang der Implantatanschnitte der Kaninchen Nr. 607, 610, 660 dargestellt. Bindegewebe konnte bei diesen Kaninchen nicht nachgewiesen werden.

3.2.1 Knochen – Implantat – Kontakt

Im Vergleich der beschichteten zu den unbeschichteten Implantaten bezogen auf den Knochen – Implantat – Kontakt ergibt sich ein Standardfehler von 1,63 % für die Proben und 1,76 % für die Kontrollimplantate. Des Weiteren liegen beide Mittelwerte mit 94,8 % für die Proben und 97,31 % für die Kontrollen innerhalb des 95 % Wald – Konfidenzintervalls. Trotz des tendenziell besseren Einwachsens der Kontrollen, kann kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beschichteten und den unbeschichteten Implantaten bei der Analyse des Knochen – Implantat – Kontaktes nachgewiesen werden ($p = 0,304$). Die grafische Darstellung des knöchernen Einwachsens TiAgN – beschichteter Implantate, verglichen mit den unbeschichteten Kontrollen, erfolgt als Balkendiagramm mit Fehlerbalken (Abb. 11A). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Die Verteilung des prozentualen Anteils an Knochen – Implantat – Kontakt differenziert nach Beschichtung wird in Abbildung 11B anhand eines Boxplot – Diagrammes verdeutlicht. Bei den beschichteten Implantaten ist die Verteilung etwas größer als bei den

Kontrollen, zudem liegt ein Ausreißer bei 68 %. Für die Kontrollimplantate ist ein Ausreißer bei 86 % zu verzeichnen.

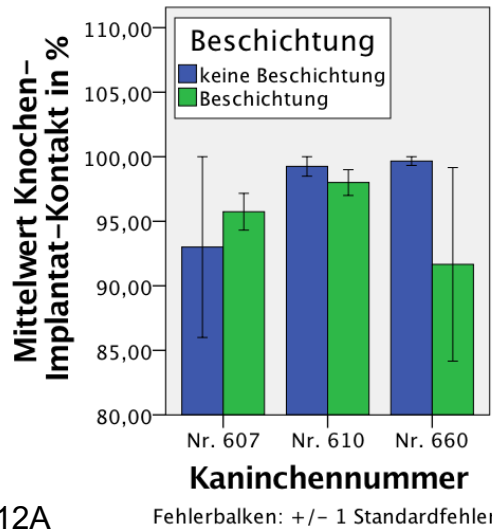


11A

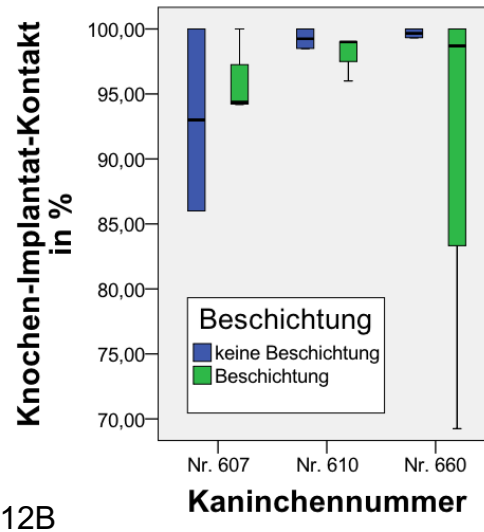
11B

Abb. 11: Balkendiagramm mit Fehlerbalken (A) und Boxplot (B) zur Darstellung der Mittelwerte bzw. der Verteilung des Knochen – Implantat – Kontaktes in %, differenziert nach Beschichtung (Kaninchen Nr. 607, 610, 660). Das Balkendiagramm zeigt den prozentualen Anteil des Knochen – Implantat – Kontaktes am gemessenen Gesamtumfang der Implantate für die unbeschichteten Kontrollen und TiAgN – beschichteten Proben im Vergleich. Der Fehlerbalken entspricht dem Standardfehler. Dieser beträgt für die beschichteten Implantate 1,36 % und für die unbeschichteten 1,76 %. Das Boxplot – Diagramm veranschaulicht die breitere Verteilung der Werte für die TiAgN – beschichteten Proben im Vergleich zu den unbeschichteten Kontrollimplantaten. Einzelne Ausreißer treten sowohl bei den Proben (68 %) als auch den Kontrollen (86 %) auf. Mit $p = 0,304$ zeigt sich für den Knochen – Implantat – Kontakt kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Probe – und Kontrollimplantaten.

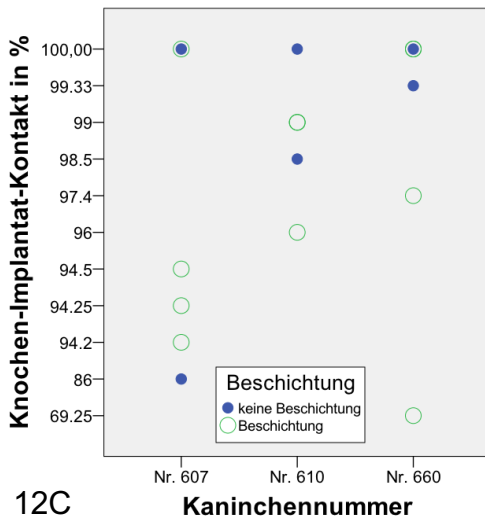
Um das Einwachsverhalten der Implantate in den einzelnen Kaninchen zu analysieren und diese miteinander zu vergleichen, werden ein Balkendiagramm (Abb. 12A), ein Boxplot – Diagramm (Abb. 12B) und ein Punktdiagramm (Abb. 12C) sowohl nach Kaninchen als auch nach Beschichtung differenziert, herangezogen.



12A



12B



12C

Abb. 12: Diagramme zur differenzierten Betrachtung des Knochen – Implantat – Kontaktes nach Kaninchen und Beschichtung. 12A: Balkendiagramm mit Fehlerbalken. 12B: Boxplot. 12C: Punktdiagramm. Dargestellt wird das knöchernerne Einwachsen der Implantate in Abhängigkeit von der Beschichtung bei Kaninchen Nr. 607, 610 und 660. 12A: Mittelwerte des KIK in % - der Fehlerbalken entspricht dem Standardfehler. 12B: Boxplot zur Darstellung der Werteverteilung. 12C: Prozentualer Anteil des KIK für jedes Einzelimplantat als Punkt/Kreis. Pro Kaninchen wurden zwei Kontrollen (blau) und drei (Nr. 610) bis vier (Nr. 607, 660) Proben (grün) ausgewertet. Zwei Proben des Kaninchens Nr. 660 sind, neben der Kontrolle, bei knapp 100,00 % überlagert dargestellt, ebenso überlagern sich zwei Proben des Kaninchens Nr. 610 bei 99,00 %. Eine Kontrolle und Probe des Kaninchens Nr. 607 weisen ebenfalls den gleichen Wert von 100 % auf.

Das Balkendiagramm (Abb. 12A) stellt die Mittelwerte des Knochen – Implantat – Kontaktes in Abhängigkeit vom Kaninchen und der Beschichtung dar. Für die Kaninchen Nr. 610 und Nr. 660 zeigt sich, dass die Kontrollen im Vergleich zu

den Proben einen etwas höheren Knochen – Implantat – Kontakt aufweisen. Besonders deutlich wird dies bei Nr. 660 (Kontrolle 99,67 %, Probe 91,66 %). Bei Kaninchen Nr. 610 liegen die Werte bei 98 % für die Proben und bei 99,25 % für die Kontrollen. Im Gegensatz dazu kann für Nr. 607 bei den Proben ein höherer Knochenkontakt nachgewiesen werden. Dieser liegt bei 95,74 %, im Vergleich, die Kontrollimplantate dieses Kaninchens Nr. 607 bei 93 %. Der Fehlerbalken (Abb. 12A) entspricht dem Standardfehler. Dieser fällt für die Kontrollen von Kaninchen Nr. 607 und die Proben von Kaninchen Nr. 660 mit 7 % am größten aus. Wie aus den Abbildungen 12A – C hervorgeht, streuen die prozentualen Anteile des Knochen – Implantat – Kontaktes bei Betrachtung der Einzelimplantate zwischen knapp 70 % und 100 %. Dabei trifft diese Streubreite sowohl auf die Proben (Kaninchen Nr. 660) als auch auf die Kontrollen (Kaninchen Nr. 607) zu. Die geringste Streubreite weist das Kaninchen Nr. 610 auf, wobei die Proben mit 96 % - 99 % einen etwas geringeren Knochenkontakt aufweisen als die Kontrollen mit 98,5 % - 100 %. Die Verteilung des Knochen – Implantat – Kontaktes, der für jedes Kaninchen separat nach Kontrollen und Proben differenziert dargestellt wird, verdeutlicht sich besonders im Boxplot (Abb. 12B) und im Punkt – Diagramm (Abb. 12C). Es gehen je die Mittelwerte aus den beiden Kontrollen und den drei bis vier Proben eines Kaninchens in die Analyse ein. Die Mittelwerte für die Kontrollen liegen zwischen 93 % und knapp 100 %, die für die Proben zwischen 94 % - 98 %. Die größte Verteilung bezüglich der Kontrollen weist Kaninchen Nr. 607 auf (87 % - 100 %), bezüglich der Proben Kaninchen Nr. 660 (82 % - 100 %). Zusammenfassend lassen die Ergebnisse der Auswertung der Knochen – Implantat – Kontakte den Schluss zu, dass für die Proben verglichen mit den unbeschichteten Kontrollen zwar ein um 2,7 Prozentpunkte geringerer Knochenkontakt zu verzeichnen ist, hierfür aber keine statistische Signifikanz ($p = 0,304$) vorliegt.

3.2.2 Osteoid

Des Weiteren wurde das an die Implantatoberflächen angrenzende Gewebe, neben dem mineralisierten Knochenkontakt, auch auf Anteile des noch nicht mineralisierten Osteoids hin analysiert. Der Anteil an Osteoid liegt im Mittel bei 45,15 % für die beschichteten und bei 60,12 % für die unbeschichteten Implantate bezogen auf den Knochenkontakt. Dabei kann ein Standardfehler von 4,04 % für die Proben beziehungsweise 7,82 % für die Kontrollen angegeben werden. Dieser tendenziell höhere Anteil an Osteoid bei den Kontrollimplantaten von 14,97 Prozentpunkten zeigt mit $p = 0,195$ keine statistische Signifikanz. Anhand des Balkendiagrammes mit Fehlerbalken (Abb.13A) wird der Anteil an Osteoid für die Proben, verglichen mit den Kontrollen, grafisch veranschaulicht. Der Fehlerbalken entspricht dem Standardfehler. Die Verteilungseigenschaften des Osteoidanteils werden mit Hilfe des Boxplot – Diagrammes in Abbildung 13B verdeutlicht. Wobei sich bei den unbeschichteten Kontrollen einzelne Ausreißer von unter 40 % und weit über 80 % zeigen, bei einem Mittelwert von 60,12 %. Die Variationsbreite ist für die beschichteten Proben mit knapp über 20 % und bis zu 67 %, bei einem Mittelwert von 45,15 %, ebenfalls hoch.

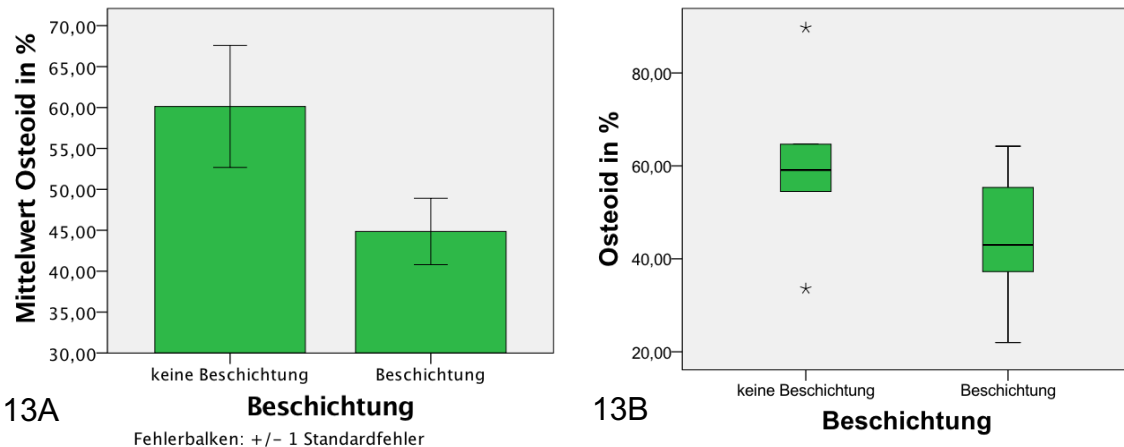
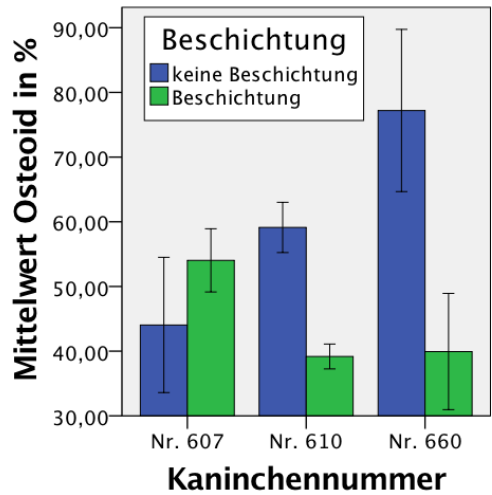


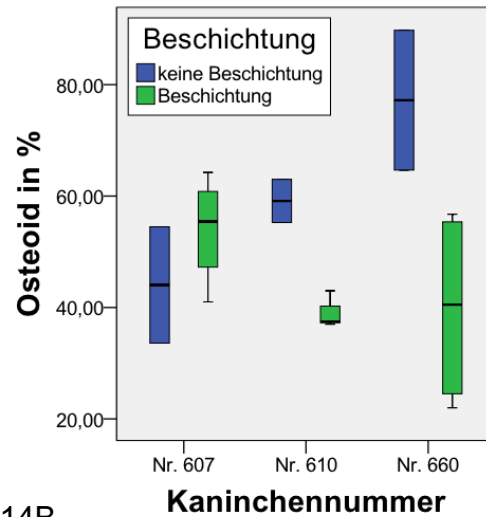
Abb. 13: Balkendiagramm mit Fehlerbalken (A) und Boxplot (B) zur Darstellung des Mittelwertes bzw. der Verteilung des Osteoidanteils in %, differenziert nach Beschichtung (Kaninchen Nr. 607, 610, 660). Die Mittelwerte für den Osteoidanteil bewegen sich zwischen 60,12 % für die unbeschichteten und 45,15 % für die beschichteten Implantate. Der Unterschied ist mit $p = 0,195$ statistisch nicht signifikant. Der Fehlerbalken entspricht dem Standardfehler. Der Boxplot veranschaulicht die Verteilung des Osteoids in %. Einzelne Ausreißer sind bei den Kontrollen zu verzeichnen, 90 % und 34 %.

Die interindividuellen Unterschiede zwischen den Kaninchen Nr. 607, Nr. 610 und Nr. 660 bezüglich des Osteoid – Anteils an der Implantatoberfläche werden anhand der Abbildungsreihe 14A – C deutlich. Das Balkendiagramm vergleicht die Anteile an Osteoid der Kaninchen, differenziert nach Beschichtung. Der Fehlerbalken entspricht dem Standardfehler. Dieser ist für Kaninchen Nr. 660 mit 12 % für die Kontrollen und 8 % für die TiAgN – beschichteten Proben am größten. Der kleinste Standardfehler zeigt sich für die beschichteten Implantate des Kaninchens Nr. 610 mit 2 %. Es lässt sich feststellen, dass der Osteoid – Anteil an den unbeschichteten Implantatoberflächen mit im Mittel 77 % bei Kaninchen Nr. 660 am größten und bei Kaninchen Nr. 607 mit 44 % am geringsten ausfällt. Bei den beschichteten Proben weist Kaninchen Nr. 607 mit 54 % den größten Anteil auf, wobei Nr. 610 (39 %) und Nr. 660 (40 %) nahezu identische Mittelwerte aufweisen.

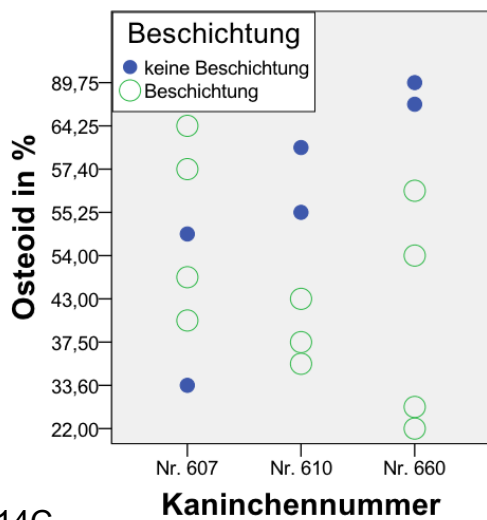
Das Verteilungsmuster der Mittelwerte ist im Boxplot – Diagramm (Abb. 14B) grafisch dargestellt. Dabei zeigt sich eine große Variabilität der Mittelwerte. Es gibt sowohl zwischen den Kaninchen starke Unterschiede des Osteoid – Anteils an den Implantatoberflächen von Proben und Kontrollen, als auch innerhalb der Kaninchen. Die größte Verteilung ist bei Kaninchen Nr. 660 zu erkennen. Die Werte bewegen sich hier zwischen 22 % und 56,75 % für die Proben und zwischen 64,66 % und 89,75 % für die Kontrollen. Für Kaninchen Nr. 607 liegen die Werte mit 33,60 % bzw. 54,50 % für die unbeschichteten und zwischen 41 % und 64,25 % für die TiAgN – beschichteten Implantate näher zusammen. Die geringste Verteilung weist Kaninchen Nr. 610 auf, mit Werten zwischen 37 % und 43 % für die Proben und 55,25 % bzw. 63 % für die Kontrollimplantate. Zur Veranschaulichung der Streuung ist im Punktdiagramm (Abb. 14C) der Mittelwert des Osteoids für jedes Implantat separat aufgetragen. Die Mittelwerte bewegen sich für alle Kaninchen in einem Wertebereich zwischen 22 % und 89,75 %, wobei bei den Kaninchen Nr. 610 und Nr. 660 die Werte für die unbeschichteten Kontrollen deutlich über denen der beschichteten Proben liegen. Lediglich bei Kaninchen Nr. 607 liegt der Anteil an Osteoid bei den beschichteten Implantaten über dem der unbeschichteten.



14A



14B



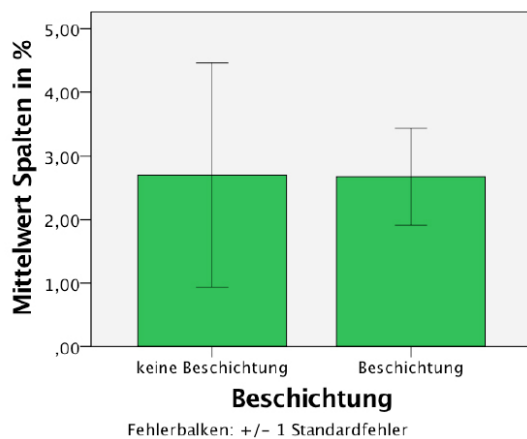
14C

Abb. 14: Diagramme zur differenzierten Betrachtung des Osteoid – Anteils nach Kaninchen und Beschichtung. 14A: Balkendiagramm mit Fehlerbalken. 14B: Boxplot. 14C: Punktdiagramm. Diese Abbildung stellt für die Kaninchen Nr. 607, 610 und 660 den Anteil an Osteoid am Implantat angrenzenden Gewebe, differenziert nach Beschichtung, dar. Die Fehlerbalken (14A) entsprechen dem Standardfehler. Der Boxplot (14B) und das Punktdiagramm (14C) veranschaulichen die Verteilung der Werte. Im Punktdiagramm ist der Osteoidanteil in % für jedes Einzelimplantat aufgetragen. Die unbeschichteten Kontrollen sind als blaue Punkte, die beschichteten Proben als grüne Kreise dargestellt.

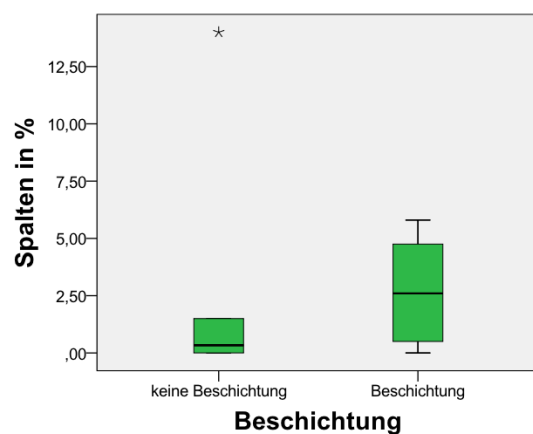
3.2.3 Spalten

Die im Rahmen der mikroskopischen Auswertung festgestellten Bereiche der Implantatoberfläche, an denen kein Gewebe nachweisbar war, wurden als Spalten definiert. Es lässt sich feststellen, dass bei der Betrachtung der Mittelwerte zwischen den beschichteten Proben mit 2,81 % und den unbeschichteten Kontrollen mit 2,69 % eine vergleichsweise geringe Differenz besteht. Dennoch liegt der Spaltanteil bei den Proben um 0,12 Prozentpunkte tendenziell höher als bei den unbeschichteten Kontrollen. Für diesen Unterschied besteht jedoch mit $p = 0,911$ keine statistische Signifikanz. Die Standardfehler liegen für die Proben bei 0,77 %, für die Kontrollen bei 1,76 %. Die Werte liegen innerhalb des 95 % Wald – Konfidenzintervalls. Dabei reicht das Intervall der Kontrollen von -0,75 % bis 6,14 % und das der Proben von 1,30 % bis 4,32 %.

Zur grafischen Darstellung der Spaltanteile bei beschichteten und unbeschichteten Implantatoberflächen wird ein Balkendiagramm mit Fehlerbalken herangezogen (Abb. 15A). Der geringe Unterschied zwischen den Proben und Kontrollen wird hier besonders deutlich. Der Fehlerbalken entspricht dem Standardfehler, der mit 0,77 % für die Proben und 1,76 % für die Kontrollen angegeben werden kann. Die Verteilung der Spaltanteile wird anhand des Boxplot – Diagramms in Abbildung 15B, differenziert nach Beschichtung, veranschaulicht. Es zeigt sich, dass bei den beschichteten Implantaten im Vergleich zu den unbeschichteten eine breitere Streuung zu verzeichnen ist. Die Werte liegen hier zwischen 0 % und 1,5 %, mit einem Ausreißer (14 %) für die Kontrollen und zwischen 0 % und 5,8 % für die Proben.



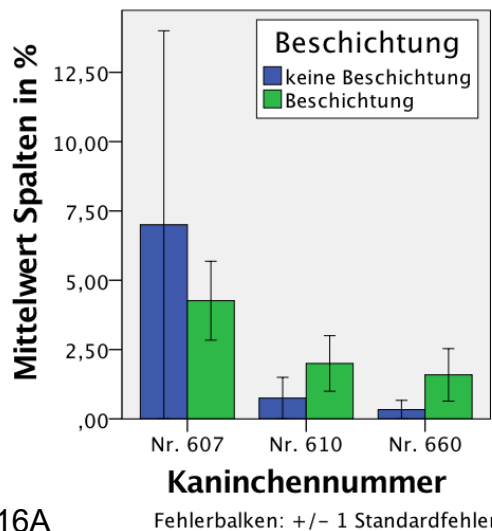
15A



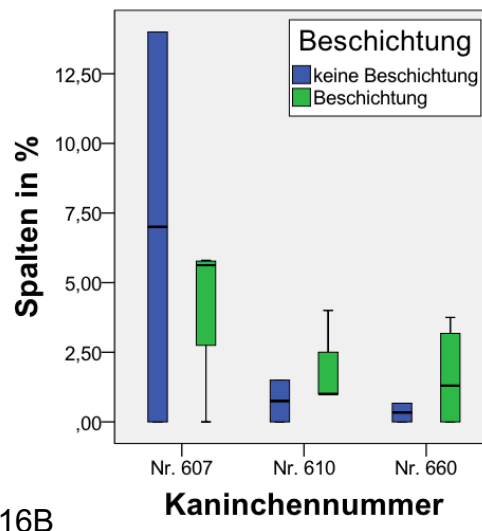
15B

Abb. 15: Balkendiagramm mit Fehlerbalken (A) und Boxplot (B) zur Darstellung der Mittelwerte bzw. der Verteilung des Spaltanteils in %, differenziert nach Beschichtung (Kaninchen Nr. 607, 610, 660). Dargestellt sind die Mittelwerte des Spaltanteils am gemessenen Gesamtumfang. Der Fehlerbalken entspricht dem Standardfehler. Mit $p = 0,911$ ist hinsichtlich des Spaltanteils für die TiAgN – beschichteten Implantate im Vergleich zu den unbeschichteten Kontrollen ebenfalls kein signifikanter Unterschied feststellbar. Das Boxplot – Diagramm veranschaulicht die Verteilung der Spalten in %. Bei den beschichteten Implantaten ist im Vergleich zu den unbeschichteten Kontrollen eine größere Wertestreuung zu verzeichnen. Der Ausreißer auf Seite der Kontrollen liegt bei 14 %.

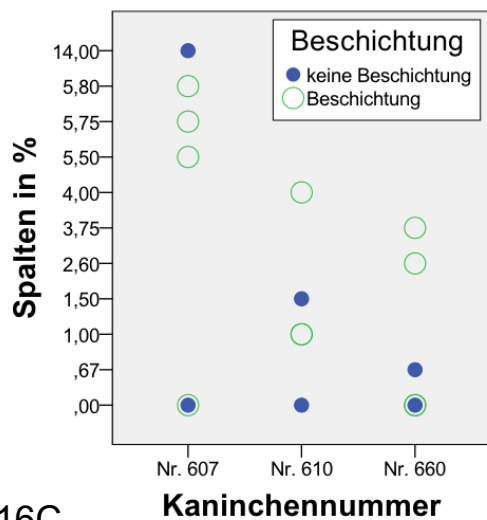
Die Abbildungsreihe 16A – C fasst den Anteil an Spalten im individuellen Vergleich der Kaninchen zusammen. Im Balkendiagramm (Abb. 16A), welches die Spaltanteile differenziert nach Kaninchen und Beschichtung darstellt, zeigt sich bei den Kaninchen Nr. 610 und Nr. 660 für die beschichteten Proben (2 % bzw. 1,7 %) ein tendenziell aber nicht signifikant größerer Anteil an Spalten im Vergleich zu den unbeschichteten Kontrollen (1 % bzw. 0,5 %). Bei Kaninchen Nr. 607 weisen jedoch die Kontrollen (7 %) einen höheren Spaltanteil auf als die Proben (4,5 %). Zudem lässt sich hier für die Kontrollen ein ausgeprägter Fehlerbalken, der dem Standardfehler entspricht, verzeichnen (7 %). Es zeigt sich bei diesem Kaninchen (Nr. 607) insgesamt ein leicht erhöhter Anteil an gewebefreien Oberflächenabschnitten verglichen mit den beiden anderen Kaninchen. Dies wird auch aus dem Boxplot – Diagramm (Abb. 16B) deutlich. So bewegt sich bei diesem Kaninchen der prozentuale Spaltanteil für die Kontrollen zwischen 0 % und 14 %, wobei die Proben mit 0 % bis 5,8 % eine wesentlich geringere Streuung aufweisen. Bei den Kaninchen Nr. 610 und Nr. 660 fällt die Verteilung sowohl für die Proben als auch die Kontrollen geringer aus. Die Streuung der durchschnittlichen Spaltanteile ist im Punktdiagramm (Abb. 16C), für jedes Implantat einzeln, dargestellt. Auch hier wird besonders deutlich, dass die Kontrollimplantate des Kaninchens Nr. 607 mit 0 % bis 14 % eine sehr große Streuung zeigen. Für die TiAgN – beschichteten Implantate dieses Kaninchens liegt der Spaltanteil zwischen 0 % und 5,8 %. Bei den Kaninchen Nr. 610 und Nr. 660 liegen die Werte mit 0 % und 1,5 % (Nr. 610) bzw. 0 % und 0,76 % (Nr. 660) für die unbeschichteten Kontrollen sowie zwischen 1 % und 4 % (Nr. 610) bzw. 0 % und 3,75 % (Nr. 660) für die beschichteten Proben näher zusammen.



16A



16B

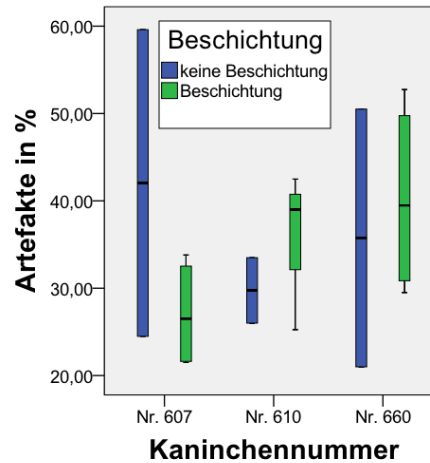
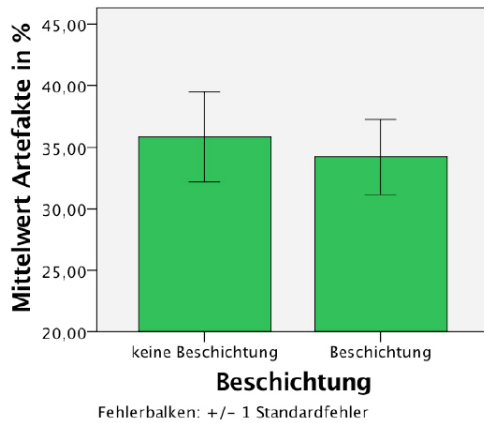


16C

Abb. 16: Diagramme zur differenzierten Betrachtung des Spaltanteils nach Kaninchen und Beschichtung. 16A: Balkendiagramm mit Fehlerbalken. 16B: Boxplot. 16C: Punktdiagramm. Dargestellt ist für die Kaninchen Nr. 607, 610 und 660 der Spaltanteil in Abhängigkeit von der Beschichtung. Abb. 16A zeigt die Mittelwerte des Spaltanteils in % - der Fehlerbalken entspricht dem Standardfehler. Im Boxplot (16B) und Punktdiagramm (16C) wird die Werte Verteilung deutlich. Abb. 16C stellt den Anteil an Spalten für jedes Implantat einzeln als Punkt/Kreis dar: Pro Kaninchen wurden zwei Kontrollen (blau) und drei (Nr. 610) bis vier (Nr. 607, 660) Proben (grün) ausgewertet. Die vierte Probe des Kaninchens 607 ist bei 0 % mit der Kontrolle überlagert dargestellt, ebenso die dritte Probe des Kaninchens Nr. 660 bei 0 %. Des Weiteren überlagern sich zwei Proben des Kaninchens Nr. 660 bei 0 %. Bei Kaninchen Nr. 610 zeigt sich eine Überlagerung der Proben bei 1 %.

3.2.4 Artefakte

Bereiche der Implantatoberflächen, an denen sich nach Ablösen des Gewebes noch Gewebsreste nachweisen ließen, wurden als nicht zu beurteilender Bereich aus der Statistik ausgenommen. Um jedoch eine Aussage darüber treffen zu können, ob bei unbeschichteten und TiAgN – beschichteten Implantaten die Artefakte in gleicher Weise auftraten, wurden die Mittelwerte für die Kontrollen und Proben verglichen. Abbildung 17A veranschaulicht die Anteile an Artefakten der Proben verglichen mit den Kontrollen in einem Balkendiagramm. Der Mittelwert für die unbeschichteten Kontrollen der Kaninchen Nr. 607, Nr. 610 und Nr. 660 ist mit 35,85 % um 1,7 Prozentpunkte größer als für die beschichteten Proben mit 34,15 %. Dieser minimale Unterschied ist mit $p = 0,768$ statistisch nicht signifikant. Der Standardfehler beträgt für die Proben 3,60 % und für die Kontrollen 2,90 %. Jedoch ergibt sich eine große Streuung der Artefakt – Anteile wie das Boxplot – Diagramm (Abb. 17B) verdeutlicht. Diese ist für die Kontrollen der Kaninchen Nr. 607 und Nr. 660 deutlich größer als für die TiAgN – beschichteten Proben. Lediglich Kaninchen Nr. 610 zeigt sowohl insgesamt eine geringere Streubreite der Werte als auch für die Kontroll – und Probeimplantate im Vergleich.



17A

17B

Abb. 17: Balkendiagramm mit Fehlerbalken (A) und Boxplot (B) zur Darstellung des Anteils an Artefakten bzw. dessen Verteilung in %, differenziert nach Beschichtung für Kaninchen Nr. 607, 610 und 660. Das Diagramm 17A zeigt den prozentualen Anteil an Artefakten am gemessenen Gesamtumfang der Implantate für die unbeschichteten Kontrollen und TiAgN – beschichteten Proben im Vergleich. Der Fehlerbalken entspricht dem Standardfehler. Mit $p = 0,768$ ist der Unterschied zwischen den Proben und Kontrollen statistisch nicht signifikant. Der Boxplot (17B) veranschaulicht die Artefakt - Verteilung für unbeschichtete und beschichtete Implantate für die Kaninchen Nr. 607, 610 u. 660 im Vergleich.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Osseointegration von TiAgN – beschichteten Titanimplantaten im Kaninchenknochen untersucht. In jedes Femur, von insgesamt drei Kaninchen, wurde jeweils ein unbeschichtetes Kontrollimplantat und zwei TiAgN – beschichtete Implantate (Proben) eingebracht. Die Hypothese, dass TiAgN – beschichtete Titanimplantate kein schlechteres Einwachsverhalten zeigen, verglichen mit unbeschichteten Titanimplantaten, konnte in dieser Studie verifiziert werden.

In der klinischen Anwendung stehen ossäre Implantate mit unterschiedlichen Knochenanteilen in Kontakt. Ein, wie in der vorliegenden Studie, in die Diaphyse eines Knochens inseriertes Implantat steht sowohl mit kortikalem als auch spongiösem Knochen in Kontakt. Diese Knochenstrukturen unterscheiden sich in ihren mechanischen Eigenschaften, ihrem osteogenen Potential, der Remodeling – Aktivität und reagieren in der Konsequenz unterschiedlich auf ein eingebrachtes Implantat (Galante et al. 1991, Pazzaglia et al. 1991, Head et al. 1995, Branemark et al. 1997, Jinno et al. 1998, Lu et al. 1998, Rossi et al. 2014, Li et al. 2015).

Die histologischen Dünnschliffe, der in dieser Studie verwendeten Präparate, wurden nach der Donath – Methode so angefertigt, dass der Kontakt der eingebrachten Implantate zu den unterschiedlichen Knochenstrukturen beurteilt werden konnte. Da aber keine Unterschiede bezüglich des Einwachsens zwischen spongiösem und kortikalem Knochen ersichtlich waren, wurden beide unter dem Untersuchungsparameter „Knochen – Implantat – Kontakt“ zusammengefasst. Hierbei ist zu erwähnen, dass es im Rahmen der knöchernen Einheilung sowohl im kortikalen als auch spongiösen Knochen zur Ausbildung einer, das Implantat umscheidenden, Knochenlamelle kommt, die als physiologische Reaktion des Knochengewebes auf den Titan – Fremdkörper angesehen werden kann (Trindade et al. 2018). Nachfolgend wurden die histologischen Schnitte nach Masson – Trichrom – Goldner eingefärbt und mikroskopiert. Mittels des Programmes Image J wurden die

Anteile von Knochen – Implantat – Kontakt, Osteoid, Spalten, Artefakten und Bindegewebe an den Implantatanschnitten gemessen und zum Gesamtumfang ins Verhältnis gesetzt.

Im vorliegenden Kapitel dieser Arbeit werden die in Abschnitt 3 dargestellten Ergebnisse unter Berücksichtigung des aktuellen Forschungsstandes interpretiert und diskutiert. Zunächst werden dabei die Ergebnisse dieser Studie im Kontext der Fachliteratur dargelegt, um anschließend die Methodik der Studie zu erörtern.

4.1 Interpretation der Ergebnisse im Kontext des aktuellen Forschungsstands

Aufgrund der Tatsache, dass bakterielle Infektionen orthopädischer Implantate auch heute noch zu einer hohen Morbidität der Patienten und zu belastenden Revisionsoperationen führen, wird nach Möglichkeiten gesucht, um postoperative Infektionen zu verhindern. Hierbei wird der Entwicklung neuer antiinfektiver Prothesenmaterialien besondere Aufmerksamkeit beigemessen. Nachfolgend zeigt die Tabelle 7 einen Überblick über einige bisher untersuchte antimikrobiell wirksame Silberbeschichtungen. Tierstudien zur Osseointegration TiN – beschichteter Implantate sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 7: Osseointegration antimikrobiell wirksamer Silberbeschichtungen im Tiermodell

Beschichtung	Tiermodell	Implantatform	Osseointegration	Literatur
AgHA	Hunde	Externe Fixatorschrauben	+	Ruan et al. (2011)
AgHA	Ratten	stabförmig	+	Yonekura et al. (2011)
AgHA	Ratten	stabförmig	+	Akiyama et al. (2013)
Ag – NT	Ratten	stabförmig	+	Cheng et al. (2014)
AgHA	Ratten	stabförmig	+ (3% Ag) - (50% Ag)	Eto et al. (2015)
Ag/SiO _x C _y	Hunde	Prothesenschaft	4 von 9 stabil	Hauschild et al. (2015)
TiAg – NT	Ratten	stabförmig	+	Liu et al. (2019)

„+“ gute Osseointegration ; „-“ schlechtere Osseointegration als Vergleichsproben

Tabelle 8: Osseointegration TiN beschichteter Implantate im Tiermodell

Beschichtung	Tiermodell	Implantatform	Osseointegration	Literatur
TiN	Ratten	stabförmig	+	Sovak et al. (2000)
TiN	Ratten	Schraube	+	Scarano et al. (2003)
TiN	Kaninchen	Implantat mit Schraubgewinde	+	Larsson Wexell et al. (2013)
TiN	Ratten	stabförmig	+	Sovak et al. (2015)

„+“ gute Osseointegration ; „-“ schlechtere Osseointegration als Vergleichsproben

Das für Endoprothesen, neben rostfreiem Stahl und CoCrMo – Legierungen, am häufigsten verwendete Material ist Titan mit seinen Legierungen (Dewidar et al. 2006). Seine gute Biokompatibilität, die vor allem auf der Bildung einer Passivierungsschicht beruht (Zitter und Plenk 1987), erleichtert körpereigenen Zellen die Adhäsion an die Implantatoberfläche (Kieswetter 1996, Damiani et al.

2018). Jedoch können sich aufgrund dieses Merkmales auch pathogene Mikroorganismen leichter anheften (Gristina 1987). Eine weitere nachteilige Eigenschaft des Titans, bzw. hochtitanhaltiger Legierungen als alleiniger Implantatwerkstoff für Endoprothesen, ist das relativ ungünstige Verschleißverhalten (Bischoff et al. 1994, Zhao et al. 2016). Die hierdurch entstehenden Abriebpartikel können in den umliegenden Geweben unterschiedliche entzündliche Reaktionen erzeugen (Kerschbaumer 2006). In zahlreichen Studien wurden Oberflächenbeschichtungen untersucht, die entweder die mechanischen Eigenschaften des Titans verbessern sollen, wie beispielsweise TiN (van Hove et al. 2015, Zhao et al. 2016) oder antimikrobielle Eigenschaften aufweisen (Ewald et al. 2006, Kuehl et al. 2016, Liu et al. 2016, Ueno et al. 2016, Unosson et al. 2016, Kulkarni Aranya et al. 2017, Meininger et al. 2018). Vor allem für Silber enthaltende Beschichtungen konnten in zahlreichen in vitro und in vivo Studien gute antimikrobielle Eigenschaften nachgewiesen werden, ohne zytotoxisch zu wirken (Gosheger et al. 2004, Chen et al. 2006, Ewald et al. 2006, Ruan et al. 2011, Roy et al. 2012, Cheng et al. 2014, Wafa et al. 2015, Kuehl et al. 2016, Ueno et al. 2016). Jedoch besteht für die zytotoxische Wirkung des Silbers eine Dosisabhängigkeit. Sowohl Yonekura (2011) als auch Eto (2015) konnten in ihren Studien, bei einem Anteil von 50 % Silber in den Beschichtungen, eine Inhibition der Knochenbildung beziehungsweise keine lebensfähigen Zellen mehr feststellen.

Für TiN – Beschichtungen wurde in verschiedenen Untersuchungen gezeigt, dass sie die Korrosion (Yatsuzuka et al. 2000, Liu et al. 2003, Paschoal et al. 2003, Wang et al. 2016, Zhao et al. 2016) und die Metallionenabgabe (Ferrari et al. 1993) reduzieren und dabei sowohl in vitro gegenüber Zellkulturen (Zhao et al. 2009) oder Blutzellen (Dion et al. 1993), als auch in vivo keine Toxizität zeigen und gut osseointegrieren (Larsson Wexell et al. 2013, Sovak et al. 2015).

Des Weiteren lässt sich neben der guten Blutverträglichkeit (Dion et al. 1993, Cui et al. 2017) eine Induktion der Thrombozytenaktivierung durch TiN nachweisen (Karagkiozaki et al. 2009). Diese aktivierten Thrombozyten geben Wachstumsfaktoren und andere osteoinduktive Signale ab, die die

Knochenbildung fördern (Puleo und Nanci 1999, Clausen et al. 2006, Brini et al. 2016). Durch die Implantatbettbohrung wird eine iatrogene Wunde erzeugt, die die Blutgerinnungskaskade und damit das frühe Stadium der Wundheilung um das eingebrachte Implantat herum induziert (Davies 1996, Bosshardt et al. 2017). Das, während der Blutgerinnung entstehende, Fibringerüst stellt eine Art Leitfaden für die Migration von Osteozyten und deren Vorläuferzellen dar (Davies 1998). Diese, während der Implantateinheilung gewünschte, gerinnungsfördernde Eigenschaft von TiN – beschichteten – Implantaten geht dadurch prinzipiell auch mit einer erhöhten Thrombosegefahr einher. Dies spielt aber in diesem Zusammenhang eine untergeordnete Rolle, da die in der vorliegenden Studie untersuchten Implantate nur zur Einbringung in knöchernes Gewebe und nicht in Gefäße vorgesehen sind.

Ähnlich gute Ergebnisse bezüglich der Biokompatibilität fanden auch die Arbeitsgruppen um Annunziata und Clem, in deren Studien humane Stammzellen gute biologische Reaktionen auf TiN – beschichtete wie auf unbeschichtete Titanoberflächen zeigten (Annunziata et al. 2008, Clem et al. 2008).

Vor allem Beschichtungen, die Silber (Ag) mit Stickstoff (N) kombinieren, scheinen ein vielversprechender Ansatz zu sein, da sie die antimikrobiellen Eigenschaften von Silber mit der Abriebfestigkeit des TiN kombinieren (Zhao et al. 2009, Moseke et al. 2011, Kang et al. 2014, Kang et al. 2015). Auf Grundlage der positiven in vitro Ergebnisse der TiAgN – Beschichtung bezüglich der antimikrobiellen Wirkung, die auf der kontinuierlichen Abgabe von Ag – Ionen beruht, der guten Zytokompatibilität und der hohen mechanischen Stabilität dieser Beschichtung (Moseke et al. 2011) wurde in der vorliegenden Arbeit das Einwachsen von Implantaten mit dieser Beschichtung in Kaninchen – Femora untersucht.

Während zu TiN und Ag, sowohl als alleinige Implantatbeschichtungen aber auch in Verbindung mit anderen Substanzen, zahlreiche in vitro als auch in vivo Studien vorliegen (Cheng et al. 2014, Hauschild et al. 2015, van Hove et al. 2015, Liu et al. 2019), wurde das knöcherne Einwachsen von TiAgN –

beschichteten Implantaten im Tiermodell bisher nicht analysiert. Für die Osseointegration TiN – beschichteter Titanimplantate zeigt sich in der Fachliteratur kein Unterschied zwischen den beschichteten Implantaten im Vergleich zu den unbeschichteten Kontrollen (Sovak et al. 2000, Scarano et al. 2003, Larsson Wexell et al. 2013, Sovak et al. 2015). Ebenso wird für Implantate mit Ag enthaltenden Beschichtungen ein gutes knöchernes Einwachsverhalten berichtet (Ruan et al. 2011, Yonekura et al. 2011, Akiyama et al. 2013, Cheng et al. 2014, Eto et al. 2015, Hauschild et al. 2015, Liu et al. 2019). Ruan et al. zeigen in ihrer Studie, dass die Silber enthaltenden Hydroxylapatit – beschichteten Implantate gute antimikrobielle und osteogene Eigenschaften aufweisen (Ruan et al. 2011). Auch die Arbeitsgruppe um Yonekura berichtet in ihrer Tierstudie an Ratten für Ag – Hydroxylapatit – beschichtete Implantate von einer guten Osteokonduktivität bei einem Silberanteil von 3 %. Im Gegensatz dazu kam es bei einem 50 %igem Silberanteil in der Beschichtung zur Inhibition der Knochenbildung aufgrund der Toxizität (Yonekura et al. 2011). Diese Abhängigkeit der Osseointegration von der Silberkonzentration in der Beschichtung konnte auch die Arbeitsgruppe um Liu nachweisen. In ihrer Studie zeigten die Ti2%Ag – NT beschichteten Implantate sowohl in vitro eine gute Zytokompatibilität als auch in vivo, im Rattenmodell eine gute Osseointegration. Im Gegensatz dazu wiesen die Proben mit einer Ti4%Ag – NT Beschichtung eine geringere Biokompatibilität auf, verglichen mit Reintitanproben (Liu et al. 2019). In einer, der hier vorliegenden Tierstudie vorgeschalteten, in vitro Studie konnte die Arbeitsgruppe um Moseke (2011) für die TiAgN – Beschichtung, bei einem Silberanteil zwischen 1,4 % und 4,62 %, keine Zelltoxizität feststellen.

Hauschild et al. berichteten von ihren mit PVD – Silber – beschichteten Hüftprothesen im Hundemodell. Vier aus neun Prothesen waren stabil osseointegriert, wobei keine lokalen oder systemischen Nebenwirkungen auftraten. Von den anderen fünf Tieren wies eines eine Diaphysenperforation durch den Prothesenschaft auf und bei einem weiteren war eine Revisionsoperation notwendig. Darüber hinaus waren die Versuchstiere sehr klein und trotz der Anfertigung extra kleiner Schäfte war die Passung nicht

optimal und daher keine ausreichende Primärstabilität gegeben. Die daraus resultierende Mikrobewegung hatte eine schlechtere knöchernen Integration der Implantate zur Folge. Daher gehen die Autoren davon aus, dass die Silberbeschichtung keinen negativen Einfluss auf das Einwachsverhalten hat (Hauschild et al. 2015). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte für Ag – Nanopartikel beschichtete Implantate im Vergleich zu Silber – freien Kontrollen sowohl eine gute antimikrobielle Wirkung gegen MRSA als auch eine gute Osseointegration in die Tibiae von 60 Ratten; nach 12 Wochen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen gefunden werden (Cheng et al. 2014).

Dennoch können die Studien nicht direkt miteinander verglichen werden, da die Beschichtungen unterschiedliche Zusammensetzungen und Strukturen aufweisen sowie verschiedene Herstellungsprozesse zugrunde liegen. Die TiAgN – Beschichtung, deren Einwachsverhalten in dieser Studie untersucht wurde, weist eine relativ homogene geschlossene Struktur mit eingelagerten Ag in der TiN Gitterstruktur auf sowie kleine isolierte Silbertröpfchen an der Oberfläche. Die Schichtstärke beträgt ungefähr 1,27 μm . Die Herstellung dieser Beschichtung erfolgte mittels PVD (Moseke et al. 2011). Hauschild et al. (2015) nutzten für die Herstellung ihrer 300 nm dicken Ag/SiO_xC_y – Beschichtung ebenfalls das PVD Verfahren, wohingegen die Nanotube – Beschichtungen durch Anodisierung erzeugt wurden (Cheng et al. 2014, Liu et al. 2016, Liu et al. 2019). Die amorphen AgHA – Beschichtungen wiederum wurden thermisch aufgespritzt (Akiyama et al. 2013, Eto et al. 2015). Auch für die Titanimplantate, die mit TiN beschichtet wurden, lagen andere Herstellungsprozesse als das PVD Verfahren zu Grunde; hierbei erfolgte der Beschichtungsvorgang durch Plasmanitrieren (Larsson Wexell et al. 2013, Zhao et al. 2016) oder das PIRAC (powder immersion reaction assisted coating) Verfahren (Sovak et al. 2000, Sovak et al. 2015). Die Gemeinsamkeit dieser Studien lag in der guten Osseointegration der jeweils untersuchten Beschichtung. Somit konnte aufgrund der guten in vivo Ergebnisse von Implantaten, die mit TiN – oder Ag – beschichtet waren, auch für die TiAgN – Beschichtung eine gute Osseointegration erwartet werden.

Die vorliegende Studie kann diese Annahme bestätigen. Die Osseointegration der TiAgN – beschichteten Titanimplantate (Proben) entspricht den unbeschichteten Kontrollimplantaten - es kann kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Der Anteil des Knochen – Implantat – Kontaktes am Gesamtumfang ist mit 97,31 % für die unbeschichteten Implantate geringfügig höher als für die beschichteten Proben mit 94,87 % (Abb. 11A). Diese Differenz ist jedoch statistisch nicht signifikant. Auch die Verteilung des Knochen – Implantat – Kontaktes ist für die beschichteten Implantate etwas weiter als für die Kontrollen (Abb. 11B). Einzelne Ausreißer sind bei beiden Gruppen zu verzeichnen. Vergleicht man die Kaninchen bezüglich der Ergebnisse für den Knochen – Implantat – Kontakt untereinander, zeigt sich auch für die unbeschichteten Kontrollimplantate des Kaninchens Nr. 607 eine relativ weite Streuung, zwischen 86 % - 100 % (Abb. 12C). Die relativ großen Streuungen, die sowohl bei den Proben als auch bei den Kontrollimplantaten auftreten, sprechen für die Annahme, dass sich die individuellen Schwankungen der einzelnen Kaninchen aufgrund der kleinen Stichprobe stärker niederschlagen.

Ähnlich verhält es sich mit dem Anteil der Knochenvorstufe „Osteoid“ am Knochen – Implantat – Kontakt. Es kann an den reinen Titanimplantaten ein etwas höherer Osteoid – Anteil (60,12 %) als an den TiAgN – beschichteten Implantaten (45,15 %) gemessen werden (Abb. 13A). Dieser Sachverhalt zeigt zwar keine statistische Signifikanz, dennoch wäre es möglich, dass die TiAgN – Beschichtung die Kalzifizierung des Knochens fördert. Das Boxplot – Diagramm (Abb. 13B) veranschaulicht die Breite der Verteilung, die für die Kontrollimplantate größer ist. Im direkten Vergleich der Kaninchen untereinander (Abb. 14A – C) weisen die Proben des Kaninchens Nr. 607 einen etwas höheren Osteoid – Anteil auf als dessen Kontrollen. Im Gegensatz dazu werden an den Kaninchen Nr. 610 und 660 an den Kontrollen tendenziell höhere Osteoid – Werte gemessen. Die Streuung ist bei allen Kaninchen und Implantaten relativ breit, wie Abbildung 14C verdeutlicht. Die individuellen Unterschiede in der Osseointegration scheinen sich auch hier deutlich zu manifestieren.

Darüber hinaus ergibt die Untersuchung von nicht osseointegrierten Bereichen (Spalten) ebenfalls einen statistisch nicht signifikanten Unterschied zwischen den Proben und Kontrollen. Die Mittelwerte belaufen sich auf 2,69 % für die unbeschichteten und 2,81 % für die TiAgN – beschichteten Implantate (Abb.15A). Abbildung 15B verdeutlicht, dass auch für diesen Untersuchungsparameter die Verteilung der Proben etwas breiter ist, als die der Kontrollen. Die größte Streuung des Spaltanteils ist jedoch für die Kontrollen des Kaninchens Nr. 607 zu verzeichnen (Abb. 16A – C).

Offensichtlich wird im direkten Vergleich der Einzelindividuen deutlich, dass die Werteverteilung für die Kontrollimplantate des Kaninchens Nr. 607 am größten ausfällt. Wohingegen bei der Betrachtung aller Kaninchen die beschichteten Implantate eine etwas größere Streuung zeigen, verglichen mit den unbeschichteten. Höchstwahrscheinlich nivelliert sich diese insgesamt relativ starke Streuung der Werte bei einer größeren Stichprobe, bei der einzelne Ausreißer nicht so stark ins Gewicht fallen. Zusammenfassend kann jedoch festgehalten werden, dass die TiAgN – beschichteten Implantate keine signifikant schlechtere Osseointegration zeigen, als die unbeschichteten Titanimplantate.

In einigen klinischen und Tierstudien wird die Anwesenheit von Bindegewebe am Implantat – Knochen – Interface beschrieben, die auf zu frühe Bewegung, Belastung oder Implantat – Instabilität zurückgeführt wird (Rao et al. 1998, Viceconti et al. 2000). In der vorliegenden Tierstudie kann für die Kaninchen Nr. 607, 610 und 660 kein Bindegewebe an den Implantatoberflächen nachgewiesen werden, trotz früher Bewegung der Tiere. Ebenso konnten Sovak und Gotman et al. (2015) in ihrer Studie an Ratten kein fibröses Gewebe am Implantat – Knochen – Übergang feststellen. Auch diese Tiere durften sich postoperativ bewegen und die Implantate direkt belasten (Sovak et al. 2015). Der Grad der Bewegung und der Belastung wurde in der vorliegenden Studie nicht erfasst, wobei die Tiere in ihrer Bewegungsfreiheit nicht eingeschränkt waren.

Darüber hinaus sollte in diesem Zusammenhang auch darauf hingewiesen werden, dass die Osseointegration der Implantate von vielen verschiedenen Faktoren abhängig ist, wie beispielsweise der Materialzusammensetzung und Struktur der Implantate. Auch die Implantat – Vorbereitung, Sterilisation, Implantatbett Präparation und der Implantationsort spielen eine Rolle. Des Weiteren ist die Einheilung von der Art, dem Alter und dem Geschlecht der Tiere abhängig und die postoperative Belastung nimmt ebenfalls Einfluss (Sovak et al. 2015). Aus diesem Grund ist diese Studie schwer direkt mit anderen Studien vergleichbar, zumal für TiAgN – beschichtete Titanimplantate die Osseointegration bisher nicht untersucht wurde. Einzig Scoccianti und Frenos et al. (2016) untersuchten an 33 Patienten Endoprothesen mit einer antiinfektiösen Beschichtung, die zweischichtig, aus einer reinen Ag und darüberliegenden TiAgN – Schicht, aufgebaut war. Sie konnten keine lokalen oder systemischen Nebenwirkungen nachweisen und die Infektionsrate war mit dieser Beschichtung geringer. Jedoch wurden nur die Oberflächen von Weichteilkomponenten mit dieser Beschichtung modifiziert (Scoccianti et al. 2016). Zur Osseointegration der TiAgN – Beschichtung liegen daher bislang keine Vergleichswerte vor. Somit ist lediglich der Vergleich des Einwachsens mit reinen TiN – oder anderen Ag – enthaltenden Beschichtungen möglich, für die sich ebenfalls keine schlechtere Osseointegration im Vergleich zu den unbeschichteten Kontrollen ergab (Sovak et al. 2000, Scarano et al. 2003, Ruan et al. 2011, Yonekura et al. 2011, Akiyama et al. 2013, Larsson Wexell et al. 2013, Cheng et al. 2014, Eto et al. 2015, Hauschild et al. 2015, Sovak et al. 2015).

4.2 Limitationen der Methode und Überlegungen für weiterführende Studien

Die Herstellung histologischer Präparate unter Verwendung der Trenn – Dünnschliff – Technik nach Donath hat sich vor allem für die histologische Aufbereitung von Knochengewebe etabliert. Die Grenzfläche zwischen Knochen und Implantat ist mit dieser Methode sehr gut beurteilbar, da eine Entkalkung der Knochenproben nicht notwendig ist und daher das Gewebe

seine ursprüngliche Struktur beibehält (Donath 1988). Es muss jedoch beachtet werden, dass bei dieser Technik immer nur einige Abschnitte der Grenzfläche zwischen Implantat und Knochen untersucht werden können und nicht die gesamte Oberfläche. Durch das Trennen und Dünnschleifen der Präparate ergibt sich ein nicht unerheblicher Materialverlust. Daher erhält man eine genauere Aussage bezüglich der Osseointegration, je mehr Schnitte pro Implantat angefertigt werden können. In der vorliegenden Studie lag die Anzahl der Schnitte zwischen 2 und 6 (Tabelle 6), je nachdem ob die Implantate längs oder quer angeschnitten wurden. Aufgrund dieser unterschiedlichen Anzahl an Dünnschliffen wurde zur besseren Vergleichbarkeit für jedes einzelne Implantat bezüglich der Untersuchungsparameter Knochen – Implantat – Kontakt, Osteoid und Spalten der Mittelwert gebildet. In diesem Zusammenhang ist auch zu erwähnen, dass es bei einigen wenigen Schnitten während des Säge – oder Dünnschliffvorgangs zu einer Ablösung des Implantates kam. Dies trat bei den unbeschichteten und TiAgN – beschichteten Implantaten in gleicher Häufigkeit auf, sodass nicht davon ausgegangen werden kann, dass die Beschichtung einen Einfluss auf die Verbundfestigkeit zwischen Implantatoberfläche und Knochen hat. Diese Ablösung dürfte eher auf eine zu geringe Präparatdicke zurückzuführen sein. Als Alternative zur Herstellung der Dünnschliffe für die Auswertung des Knochen – Implantat – Kontaktes ist das μ CT eine gängige Methode. Das μ CT ist ein radiologisches Bildgebungsverfahren, welches sowohl ex vivo als auch in vivo zur Rekonstruktion dreidimensionaler Bilder im Mikrometerbereich eingesetzt wird, beispielsweise zur Rekonstruktion der Knochenmikroarchitektur. Nachteile dieses Verfahrens sind zum einen die hohen Kosten, zum anderen bei guter Auflösung die lange Scandauer und die steigende Strahlendosis (Bouxsein et al. 2010, Bissinger et al. 2016).

Ein weiterer Punkt, der diskutiert werden kann, ist, dass die Anzahl der Versuchstiere mit drei relativ klein war im Vergleich zu klinischen Studien mit einem großen Patientenpool. Die Femora der drei Kaninchen (Nr. 607, 610 und 660) wurden nach einem Einheilzeitraum von drei Monaten entnommen und untersucht. Da jedes Kaninchen sowohl im rechten wie im linken Femur je eine Probe und zwei Kontrollen enthielt, ergibt sich für die vorliegende Studie eine

Stichprobenanzahl von $n = 6$ für die Kontrollen und $n = 12$ für die Proben. Diese relativ geringe Stichprobengröße ist jedoch bei derartigen Tierversuchen ein gängiges und ethisch akzeptables Vorgehen (Rossi et al. 2014, Roze et al. 2014, Mainetti et al. 2015, Favero et al. 2016, Favero et al. 2016, Mainetti et al. 2016). Eine Erhöhung der Anzahl an Versuchstieren ist daher aus ethischen Gründen nicht ohne weiteres möglich. Die Berechnung der Stichprobenzahlen für Tierversuche erfolgt anhand von Apriori – Analysen mit einer Effektstärke, die man aus vorherigen Studien gewinnt. Im hier vorliegenden Tierversuch wurden die Zahlen herangezogen, die in DIN EN ISO 10996 – 6 vorgeschlagen werden (DIN 2016).

Zudem muss beachtet werden, dass Ergebnisse aus Tiermodellen nicht grundsätzlich direkt auf den Menschen übertragen werden können.

Hinsichtlich des gegebenenfalls unterschiedlichen Einheilverhaltens von beschichteten und unbeschichteten Implantaten wären außerdem weitere Zeitpunkte im Einheilverlauf interessant. So wären z.B. auch Beurteilungen des Einheilzustands nach einem, zwei oder gar 6 Monaten aufschlussreich.

Auch wenn die oben genannten Faktoren die Aussagekraft der vorliegenden Studie etwas limitieren, wurde erstmals erfolgreich die Osseointegration von TiAgN – beschichteten Titanimplantaten im Vergleich mit unbeschichteten Kontrollimplantaten untersucht und es zeigten sich diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede. Daher deuten die Befunde auf ein ebenso gutes Einwachsen von TiAgN - beschichteten wie für unbeschichtete Implantate hin. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse sollten weiterführende Studien angelegt werden.

Ein weiterer Punkt, den es neben der Qualität des knöchernen Einwachsens zu untersuchen gilt, ist der Effekt der Infektionsprophylaxe in vivo. Während Scocciati et al. (2016) lediglich die Weichgewebskomponente ihrer Implantate mit TiAgN beschichteten, sollte die antiinfektiöse Wirkung dieser Beschichtung auf der Hartgewebskomponente ebenfalls getestet werden. Zudem sind weitere biomechanische Untersuchungen, wie die Prüfung der Festigkeit des Knochen – Implantat – Kontaktes, erforderlich. Darüber hinaus gilt es durch geeignete

Untersuchungen sicher zu stellen, dass die Verbundfestigkeit sowohl zwischen Implantat und Beschichtung als auch zwischen Beschichtung und Knochen ein ausreichend hohes Niveau erreicht, um funktionellen Belastungen dauerhaft standzuhalten. Sollten weiterführende Studien die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung untermauern, stellt diese Art der TiAgN – Beschichtung eine hervorragende Möglichkeit dar die Infektionsgefahr in der Endoprothetik zukünftig zu minimieren.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Infektionen von Endoprothesen sind auch heute noch, obgleich aufgrund aktueller Hygienestandards seltener, eine schwerwiegende Komplikation. Die Folgen können risikoreiche Revisionsoperationen bis hin zum kompletten Prothesenverlust sein. Um die Gefahr bakterieller Protheseninfektionen zu minimieren, rückten unter anderem Oberflächenbeschichtungen mit antimikrobieller Wirkung in den Fokus der Forscher. Eine Kombination aus dem antimikrobiell wirksamen Metall Silber und dem die Härte verbessernden Stickstoff – als TiAgN – Beschichtung – zeigte bereits gute in vitro Ergebnisse (Moseke et al. 2011).

Auf Grundlage dieser positiven in vitro Studie wurde die TiAgN – Beschichtung in der hier vorliegenden Arbeit in vivo im Tiermodell untersucht. Ziel der Studie war es das Einwachsen TiAgN – beschichteter Titanimplantate im Kaninchenknochen mit unbeschichteten Titanimplantaten zu vergleichen. Hierzu wurden bei insgesamt drei Kaninchen jeweils zwei TiAgN – beschichtete Proben und eine unbeschichtete Kontrolle in beide Femora implantiert. Der Einheilzeitraum betrug drei Monate.

Nach der Entnahme der Femora wurde zunächst durch Röntgenaufnahmen die genaue Lage der Implantate festgesellt. Nach der Anfertigung von Dünnschliffen nach Donath und der Trichrom – Färbung nach Masson – Goldner wurden für die histologische Auswertung lichtmikroskopische Bilder in 40 – facher Vergrößerung angefertigt. Um den gesamten Umfang der Implantatanschnitte vermessen zu können, wurden die aufgenommen Einzelbilder zu den ursprünglichen Gesamtbildern zusammengesetzt. Die Vermessung der Implantatumfänge erfolgte hinsichtlich der Untersuchungsparameter Knochen – Implantat – Kontakt (KIK), nicht mineralisierter Knochen (Osteoid), Bindegewebe und Spalten – Implantatoberflächenbereiche an denen kein Gewebe angewachsen ist. Für die drei regulär beobachteten Kaninchen ergab sich für die TiAgN – beschichteten Probeimplantate ein KIK von 94,87 %, ein Osteoidanteil am KIK von 45,15 %

und ein Spaltanteil von 2,82 % verglichen mit den unbeschichteten Kontrollen von 97,31 % für den KIK, 60,12 % für den Osteoid – sowie 2,69 % für den Spaltanteil. Bindegewebe konnte lediglich bei dem vorzeitig euthanasierten und nicht bei den drei regulär untersuchten Tieren nachgewiesen werden. Somit zeigt sich für TiAgN – beschichtete Titanimplantate kein signifikant schlechteres Einwachsen im Vergleich zu unbeschichteten Titanimplantaten.

Nach der guten antimikrobiellen Wirksamkeit und Zytokompatibilität in vitro (Moseke et al. 2011) sowie der guten Osseointegration in vivo präsentiert sich diese Beschichtung sehr vielversprechend. Dennoch sind weitere Untersuchungen erforderlich, wie beispielsweise die Überprüfung der Haftfestigkeit zwischen Beschichtung und Implantat sowie die antimikrobielle Wirksamkeit in vivo. Ergeben sich für diese Beschichtung weiterhin gute Ergebnisse, kann eine Studie am Menschen in Erwägung gezogen werden.

6 Literaturverzeichnis

- Abrahamsson, I., Berglundh, T., Linder, E., Lang, N. P. und Lindhe, J. (2004). Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 15(4): 381-392.
- Akiyama, T., Miyamoto, H., Yonekura, Y., Tsukamoto, M., Ando, Y., Noda, I., Sonohata, M. und Mawatari, M. (2013). Silver oxide-containing hydroxyapatite coating has in vivo antibacterial activity in the rat tibia. *J Orthop Res* 31(8): 1195-1200.
- Albrektsson, T. und Johansson, C. (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 10 Suppl 2: S96-101.
- Alt, V., Bitschnau, A., Osterling, J., Sewing, A., Meyer, C., Kraus, R., Meissner, S. A., Wenisch, S., Domann, E. und Schnettler, R. (2006). The effects of combined gentamicin-hydroxyapatite coating for cementless joint prostheses on the reduction of infection rates in a rabbit infection prophylaxis model. *Biomaterials* 27(26): 4627-4634.
- Annunziata, M., Guida, L., Perillo, L., Aversa, R., Passaro, I. und Oliva, A. (2008). Biological response of human bone marrow stromal cells to sandblasted titanium nitride-coated implant surfaces. *J Mater Sci Mater Med* 19(12): 3585-3591.
- Annunziata, M., Oliva, A., Basile, M. A., Giordano, M., Mazzola, N., Rizzo, A., Lanza, A. und Guida, L. (2011). The effects of titanium nitride-coating on the topographic and biological features of TPS implant surfaces. *J Dent* 39(11): 720-728.
- Antoci, V., Jr., Adams, C. S., Parvizi, J., Davidson, H. M., Composto, R. J., Freeman, T. A., Wickstrom, E., Ducheyne, P., Jungkind, D., Shapiro, I. M. und Hickok, N. J. (2008). The inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by vancomycin-modified titanium alloy and implications for the treatment of periprosthetic infection. *Biomaterials* 29(35): 4684-4690.
- Antoci, V., Jr., Adams, C. S., Parvizi, J., Ducheyne, P., Shapiro, I. M. und Hickok, N. J. (2007). Covalently attached vancomycin provides a nanoscale antibacterial surface. *Clin Orthop Relat Res* 461: 81-87.

- Antoci, V., Jr., King, S. B., Jose, B., Parvizi, J., Zeiger, A. R., Wickstrom, E., Freeman, T. A., Composto, R. J., Ducheyne, P., Shapiro, I. M., Hickok, N. J. und Adams, C. S. (2007). Vancomycin covalently bonded to titanium alloy prevents bacterial colonization. *J Orthop Res* 25(7): 858-866.
- Arciola, C. R., Bustanji, Y., Conti, M., Campoccia, D., Baldassarri, L., Samori, B. und Montanaro, L. (2003). Staphylococcus epidermidis-fibronectin binding and its inhibition by heparin. *Biomaterials* 24(18): 3013-3019.
- Arciola, C. R., Campoccia, D. und Montanaro, L. (2018). Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nat Rev Microbiol* 16: 397-409.
- Arciola, C. R., Campoccia, D., Speziale, P., Montanaro, L. und Costerton, J. W. (2012). Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials* 33(26): 5967-5982.
- Berglundh, T., Abrahamsson, I., Lang, N. P. und Lindhe, J. (2003). De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clin Oral Implants Res* 14(3): 251-262.
- Bischoff, U. W., Freeman, M. A., Smith, D., Tuke, M. A. und Gregson, P. J. (1994). Wear induced by motion between bone and titanium or cobalt-chrome alloys. *J Bone Joint Surg Br* 76(5): 713-716.
- Bissinger, O., Kirschke, J. S., Probst, F. A., Stauber, M., Wolff, K. D., Haller, B., Gotz, C., Plank, C. und Kolk, A. (2016). Micro-CT vs. Whole Body Multirow Detector CT for Analysing Bone Regeneration in an Animal Model. *PLoS One* 11(11): e0166540.
- Bosshardt, D. D., Chappuis, V. und Buser, D. (2017). Osseointegration of titanium, titanium alloy and zirconia dental implants: current knowledge and open questions. *Periodontol* 2000 73(1): 22-40.
- Bouxsein, M. L., Boyd, S. K., Christiansen, B. A., Guldberg, R. E., Jepsen, K. J. und Muller, R. (2010). Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 25(7): 1468-1486.

- Bovenkamp, G. L., Zanzen, U., Krishna, K. S., Hormes, J. und Prange, A. (2013). X-ray absorption near-edge structure (XANES) spectroscopy study of the interaction of silver ions with *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 79(20): 6385-6390.
- Bragg, P. D. und Rainnie, D. J. (1974). The effect of silver ions on the respiratory chain of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* 20(6): 883-889.
- Branemark, R., Ohnert, L. O., Nilsson, P. und Thomsen, P. (1997). Biomechanical characterization of osseointegration during healing: an experimental in vivo study in the rat. *Biomaterials* 18(14): 969-978.
- Brini, A. T., Ceci, C., Taschieri, S., Niada, S., Lolato, A., Giannasi, C., Mortellaro, C. und Del Fabbro, M. (2016). Effect of an Activated Platelet Concentrate on Differentiated Cells Involved in Tissue Healing. *J Craniofac Surg* 27(3): 656-661.
- Bunetel, L., Segui, A., Cormier, M., Percheron, E. und Langlais, F. (1989). Release of gentamicin from acrylic bone cement. *Clin Pharmacokinet* 17(4): 291-297.
- Caro, A., Humblot, V., Methivier, C., Minier, M., Salmain, M. und Pradier, C. M. (2009). Grafting of lysozyme and/or poly(ethylene glycol) to prevent biofilm growth on stainless steel surfaces. *J Phys Chem B* 113(7): 2101-2109.
- Chen, W., Liu, Y., Courtney, H. S., Bettenga, M., Agrawal, C. M., Bumgardner, J. D. und Ong, J. L. (2006). In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating. *Biomaterials* 27(32): 5512-5517.
- Chen, W., Oh, S., Ong, A. P., Oh, N., Liu, Y., Courtney, H. S., Appleford, M. und Ong, J. L. (2007). Antibacterial and osteogenic properties of silver-containing hydroxyapatite coatings produced using a sol gel process. *J Biomed Mater Res A* 82(4): 899-906.
- Cheng, H., Li, Y., Huo, K., Gao, B. und Xiong, W. (2014). Long-lasting in vivo and in vitro antibacterial ability of nanostructured titania coating incorporated with silver nanoparticles. *J Biomed Mater Res A* 102(10): 3488-3499.

- Clausen, C., Hermund, N. U., Donatsky, O., Nielsen, H. und Ooster, K. (2006). Homologous activated platelets stimulate differentiation and proliferation of primary human bone cells. *Cells Tissues Organs* 184(2): 68-75.
- Clem, W. C., Chowdhury, S., Catledge, S. A., Weimer, J. J., Shaikh, F. M., Hennessy, K. M., Konovalov, V. V., Hill, M. R., Waterfeld, A., Bellis, S. L. und Vohra, Y. K. (2008). Mesenchymal stem cell interaction with ultra-smooth nanostructured diamond for wear-resistant orthopaedic implants. *Biomaterials* 29(24-25): 3461-3468.
- Collinge, C. A., Goll, G., Seligson, D. und Easley, K. J. (1994). Pin tract infections: silver vs uncoated pins. *Orthopedics* 17(5): 445-448.
- Cui, W., Qin, G., Duan, J. und Wang, H. (2017). A graded nano-TiN coating on biomedical Ti alloy: Low friction coefficient, good bonding and biocompatibility. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 71: 520-528.
- Damiati, L., Eales, M. G., Nobbs, A. H., Su, B., Tsimbouri, P. M., Salmeron-Sanchez, M. und Dalby, M. J. (2018). Impact of surface topography and coating on osteogenesis and bacterial attachment on titanium implants. *J Tissue Eng* 9: 1-16.
- Davies, J. E. (1996). In vitro modeling of the bone/implant interface. *Anat Rec* 245(2): 426-445.
- Davies, J. E. (1998). Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont* 11(5): 391-401.
- Davies, J. E. (2003). Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ* 67(8): 932-949.
- Delmi, M., Vaudaux, P., Lew, D. P. und Vasey, H. (1994). Role of fibronectin in staphylococcal adhesion to metallic surfaces used as models of orthopaedic devices. *J Orthop Res* 12(3): 432-438.
- Deshpande, L. M. und Chopade, B. A. (1994). Plasmid mediated silver resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Biometals* 7(1): 49-56.
- Dewidar, M. M., Yoon, H.-C. und Lim, J. K. (2006). Mechanical properties of metals for biomedical applications using powder metallurgy process: A review. *Metals and Materials International* 12(3): 193.

- Dibrov, P., Dzioba, J., Gosink, K. K. und Hase, C. C. (2002). Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag(+) in *Vibrio cholerae*. *Antimicrob Agents Chemother* 46(8): 2668-2670.
- DIN (2016). Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 6: Prüfungen auf lokale Effekte nach Implantationen (ISO 10993-6:2016); Deutsche Fassung EN ISO 10993-6:2016 Beuth-Verlag.
- Dion, I., Rouais, F., Trut, L., Baquey, C., Monties, J. R. und Havlik, P. (1993). TiN coating: surface characterization and haemocompatibility. *Biomaterials* 14(3): 169-176.
- Donath, K. (1988). Die Trenn-Dünnschliff-Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien. *Der Präparator* 34: 197-206.
- Ebner, v. (1875). Ueber den feineren Bau der Knochensubstanz. *S.-B. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., Abt. III(72)*: 49-183.
- Eto, S., Miyamoto, H., Shobuike, T., Noda, I., Akiyama, T., Tsukamoto, M., Ueno, M., Someya, S., Kawano, S., Sonohata, M. und Mawatari, M. (2015). Silver oxide-containing hydroxyapatite coating supports osteoblast function and enhances implant anchorage strength in rat femur. *J Orthop Res* 33(9): 1391-1397.
- Ewald, A., Gluckermann, S. K., Thull, R. und Gbureck, U. (2006). Antimicrobial titanium/silver PVD coatings on titanium. *Biomed Eng Online* 5: 22.
- Favero, R., Botticelli, D., Antunes, A. A., Martinez Sanchez, R., Caroprese, M. und Salata, L. A. (2016). Sequential Healing at Calcium- versus Calcium Phosphate-Modified Titanium Implant Surfaces: An Experimental Study in Dogs. *Clin Implant Dent Relat Res* 18(2): 369-378.
- Favero, R., Lang, N. P., Salata, L. A., Martins Neto, E. C., Caroprese, M. und Botticelli, D. (2016). Sequential healing events of osseointegration at UnicCa((R)) and SLActive((R)) implant surfaces: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 27(2): 203-210.
- Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N. und Kim, J. O. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res* 52(4): 662-668.

- Ferrari, F., Miotello, A., Pavloski, L., Galvanetto, E., Moschini, G., Galassini, S., Passi, P., Bogdanović, S., Fazinić, S., Jaksić, M. und Valković, V. (1993). Metal-ion release from titanium and TiN coated implants in rat bone*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms 79(1): 421-423.
- Franz, S., Rammelt, S., Scharnweber, D. und Simon, J. C. (2011). Immune responses to implants - a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. Biomaterials 32(28): 6692-6709.
- Fu, J., Ji, J., Fan, D. und Shen, J. (2006). Construction of antibacterial multilayer films containing nanosilver via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan-silver ions complex. J Biomed Mater Res A 79(3): 665-674.
- Fu, J., Ji, J., Yuan, W. und Shen, J. (2005). Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan. Biomaterials 26(33): 6684-6692.
- Gabriel, M., Nazmi, K., Veerman, E. C., Nieuw Amerongen, A. V. und Zentner, A. (2006). Preparation of LL-37-grafted titanium surfaces with bactericidal activity. Bioconjug Chem 17(2): 548-550.
- Galante, J. O., Lemons, J., Spector, M., Wilson, P. D., Jr. und Wright, T. M. (1991). The biologic effects of implant materials. J Orthop Res 9(5): 760-775.
- Gerstenfeld, L. C., Alkhiary, Y. M., Krall, E. A., Nicholls, F. H., Stapleton, S. N., Fitch, J. L., Bauer, M., Kayal, R., Graves, D. T., Jepsen, K. J. und Einhorn, T. A. (2006). Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. J Histochem Cytochem 54(11): 1215-1228.
- Ghiasi, M. S., Chen, J., Vaziri, A., Rodriguez, E. K. und Nazarian, A. (2017). Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods. Bone Rep 6: 87-100.
- Gispert, M. P., Serro, A. P., Colaço, R., Pires, E. und Saramago, B. (2007). Wear of ceramic coated metal-on-metal bearings used for hip replacement. Wear 263(7-12): 1060-1065.

- Gollwitzer, H. und Gerdesmeyer, L. (2006). Antiinfektiöse Oberflächenbeschichtung.
in: Gradinger, R. und Gollwitzer, H. (Hrsg.): Ossäre Integration, Heidelberg: Springer. 62-68.
- Gong, P., Li, H., He, X., Wang, K., Hu, J., Tan, W., Zhang, S. und Yang, X. (2007). Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄@Ag nanoparticles.
Nanotechnology 18(28).
- Gordin, D. M., Gloriant, T., Chane-Pane, V., Busardo, D., Mitran, V., Hoche, D., Vasilescu, C., Drob, S. I. und Cimpean, A. (2012). Surface characterization and biocompatibility of titanium alloys implanted with nitrogen by Hardion+ technology.
J Mater Sci Mater Med 23(12): 2953-2966.
- Gosheger, G., Harges, J., Ahrens, H., Streitburger, A., Buerger, H., Erren, M., Gonsel, A., Kemper, F. H., Winkelmann, W. und Von Eiff, C. (2004). Silver-coated megaendoprostheses in a rabbit model--an analysis of the infection rate and toxicological side effects.
Biomaterials 25(24): 5547-5556.
- Griepentrog, M., Mackrodt, B., Mark, G., Linz, T., Stals, L., Rie, K. T., Schram D, C. und Wolf G, K. (1995). Properties of TiN hard coatings prepared by unbalanced magnetron sputtering and cathodic arc deposition using a uni- and bipolar pulsed bias voltage.
Surface & coatings technology 74-75(1-3): 326-332.
- Gristina, A. G. (1987). Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration.
Science 237(4822): 1588-1595.
- Hadrup, N., Sharma, A. K. und Loeschner, K. (2018). Toxicity of silver ions, metallic silver, and silver nanoparticle materials after in vivo dermal and mucosal surface exposure: A review.
Regul Toxicol Pharmacol 98: 257-267.
- Hauschild, G., Harges, J., Gosheger, G., Stoeppler, S., Ahrens, H., Blaske, F., Wehe, C., Karst, U. und Holl, S. (2015). Evaluation of osseous integration of PVD-silver-coated hip prostheses in a canine model.
Biomed Res Int 2015: 292406.
- Head, W. C., Bauk, D. J. und Emerson, R. H., Jr. (1995). Titanium as the material of choice for cementless femoral components in total hip arthroplasty.
Clin Orthop Relat Res(311): 85-90.

- Herman-Bausier, P., Labate, C., Towell, A. M., Derclaye, S., Geoghegan, J. A. und Dufrene, Y. F. (2018). Staphylococcus aureus clumping factor A is a force-sensitive molecular switch that activates bacterial adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(21): 5564-5569.
- Hickok, N. J. und Shapiro, I. M. (2012). Immobilized antibiotics to prevent orthopaedic implant infections. *Adv Drug Deliv Rev* 64(12): 1165-1176.
- Hollinger, J. und Wong, M. E. (1996). The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 82(6): 594-606.
- Holt, K. B. und Bard, A. J. (2005). Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of Escherichia coli: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag⁺. *Biochemistry* 44(39): 13214-13223.
- Hwang, P. M. und Vogel, H. J. (1998). Structure-function relationships of antimicrobial peptides. *Biochem Cell Biol* 76(2-3): 235-246.
- Ivanova, E. P., Truong, V. K., Wang, J. Y., Berndt, C. C., Jones, R. T., Yusuf, II, Peake, I., Schmidt, H. W., Fluke, C., Barnes, D. und Crawford, R. J. (2010). Impact of nanoscale roughness of titanium thin film surfaces on bacterial retention. *Langmuir* 26(3): 1973-1982.
- Jehn, H. A. und Baumgärtner, M. E. (1992). Corrosion studies with hard coating-substrate systems. *Surface and Coatings Technology* 54: 108-114.
- Jinno, T., Goldberg, V. M., Davy, D. und Stevenson, S. (1998). Osseointegration of surface-blasted implants made of titanium alloy and cobalt-chromium alloy in a rabbit intramedullary model. *J Biomed Mater Res* 42(1): 20-29.
- Kang, B.-M., Lim, Y.-S., Jeong, W.-J., Kang, B.-W. und Ahn, H.-G. (2014). Antibacterial Properties of TiAgN and ZrAgN Thin Film Coated by Physical Vapor Deposition for Medical Applications. *Transactions on Electrical and Electronic Materials* 15(5): 275-278.
- Kang, B. M., Jeong, W. J., Park, G. C., Yoon, D. J., Ahn, H. G. und Lim, Y. S. (2015). The Characteristics of an Antibacterial TiAgN Thin Film Coated by Physical Vapor Deposition Technique. *J Nanosci Nanotechnol* 15(8): 6020-6023.

- Karagkiozaki, V., Logothetidis, S., Kalfagiannis, N., Lousinian, S. und Giannoglou, G. (2009). Atomic force microscopy probing platelet activation behavior on titanium nitride nanocoatings for biomedical applications. *Nanomedicine* 5(1): 64-72.
- Kazemzadeh-Narbat, M., Lai, B. F., Ding, C., Kizhakkedathu, J. N., Hancock, R. E. und Wang, R. (2013). Multilayered coating on titanium for controlled release of antimicrobial peptides for the prevention of implant-associated infections. *Biomaterials* 34(24): 5969-5977.
- Kelly, P. J., Li, H., Benson, P. S., Whitehead, K. A., Verran, J., Arnell, R. D. und Iordanova, I. (2010). Comparison of the tribological and antimicrobial properties of CrN/Ag, ZrN/Ag, TiN/Ag, and TiN/Cu nanocomposite coatings. *Surface and Coatings Technology* 205(5): 1606-1610.
- Kelly, P. J., Li, H., Whitehead, K. A., Verran, J., Arnell, R. D. und Iordanova, I. (2009). A study of the antimicrobial and tribological properties of TiN/Ag nanocomposite coatings. *Surface and Coatings Technology* 204(6-7): 1137-1140.
- Kerschbaumer, S. (2006). Histologische Untersuchungen von Implantaten. in: (Hrsg.): *Ossäre Integration*, Heidelberg: Springer. 38-45.
- Kieswetter, K., Schwartz, Z., Dean, D.D., Boyan, B.D., (1996). The role of implant surface characteristics in the healing of bone. *Crit Rev Oral Biol Med* 7/4:329–345 7(4): 329–345.
- Klekamp, J., Dawson, J. M., Haas, D. W., DeBoer, D. und Christie, M. (1999). The use of vancomycin and tobramycin in acrylic bone cement: biomechanical effects and elution kinetics for use in joint arthroplasty. *J Arthroplasty* 14(3): 339-346.
- Kuehl, R., Brunetto, P. S., Woischnig, A. K., Varisco, M., Rajacic, Z., Vosbeck, J., Terracciano, L., Fromm, K. M. und Khanna, N. (2016). Preventing Implant-Associated Infections by Silver Coating. *Antimicrob Agents Chemother* 60(4): 2467-2475.
- Kulkarni Aranya, A., Pushalkar, S., Zhao, M., LeGeros, R. Z., Zhang, Y. und Saxena, D. (2017). Antibacterial and bioactive coatings on titanium implant surfaces. *J Biomed Mater Res A* 105(8): 2218-2227.

- Kumar, R. und Munstedt, H. (2005). Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites.
Biomaterials 26(14): 2081-2088.
- Lansdown, A. B. (2002). Silver. I: Its antibacterial properties and mechanism of action.
J Wound Care 11(4): 125-130.
- Lansdown, A. B. (2006). Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use.
Curr Probl Dermatol 33: 17-34.
- Larsson Wexell, C., Thomsen, P., Aronsson, B. O., Tengvall, P., Rodahl, M., Lausmaa, J., Kasemo, B. und Ericson, L. E. (2013). Bone response to surface-modified titanium implants: studies on the early tissue response to implants with different surface characteristics.
Int J Biomater 2013: 412482.
- Lew, D. P. und Waldvogel, F. A. (2004). Osteomyelitis.
Lancet 364(9431): 369-379.
- Li, X. Z., Nikaido, H. und Williams, K. E. (1997). Silver-resistant mutants of Escherichia coli display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins.
J Bacteriol 179(19): 6127-6132.
- Li, Z., Kuhn, G., von Salis-Soglio, M., Cooke, S. J., Schirmer, M., Muller, R. und Ruffoni, D. (2015). In vivo monitoring of bone architecture and remodeling after implant insertion: The different responses of cortical and trabecular bone.
Bone 81: 468-477.
- Lim, P. N., Chang, L., Tay, B. Y., Guneta, V., Choong, C., Ho, B. und Thian, E. S. (2014). Proposed mechanism of antibacterial action of chemically modified apatite for reduced bone infection.
ACS Appl Mater Interfaces 6(19): 17082-17092.
- Liu, C., Bi, Q. und Matthews, A. (2003). Tribological and electrochemical performance of PVD TiN coatings on the femoral head of Ti-6Al-4V artificial hip joints.
Surface and Coatings Technology 163-164(Supplement C): 597-604.
- Liu, X., Chen, C., Zhang, H., Tian, A., You, J., Wu, L., Lei, Z., Li, X., Bai, X. und Chen, S. (2019). Biocompatibility evaluation of antibacterial Ti-Ag alloys with nanotubular coatings.
Int J Nanomedicine 14: 457-468.

- Liu, X., Tian, A., You, J., Zhang, H., Wu, L., Bai, X., Lei, Z., Shi, X., Xue, X. und Wang, H. (2016). Antibacterial abilities and biocompatibilities of Ti-Ag alloys with nanotubular coatings.
Int J Nanomedicine 11: 5743-5755.
- Loh, J. V., Percival, S. L., Woods, E. J., Williams, N. J. und Cochrane, C. A. (2009). Silver resistance in MRSA isolated from wound and nasal sources in humans and animals.
Int Wound J 6(1): 32-38.
- Lu, J. X., Gallur, A., Flautre, B., Anselme, K., Descamps, M., Thierry, B. und Hardouin, P. (1998). Comparative study of tissue reactions to calcium phosphate ceramics among cancellous, cortical, and medullar bone sites in rabbits.
J Biomed Mater Res 42(3): 357-367.
- Lüllmann-Rauch, R. (2015). Binde- und Stützgewebe - Knochen.
in: Lüllmann-Rauch, R. (Hrsg.): Taschenlehrbuch Histologie, 5. Auflage. Georg Thieme Verlag. 157-183.
- Mainetti, T., Lang, N. P., Bengazi, F., Favero, V., Soto Cantero, L. und Botticelli, D. (2016). Sequential healing at implants installed immediately into extraction sockets. An experimental study in dogs.
Clin Oral Implants Res 27(1): 130-138.
- Mainetti, T., Lang, N. P., Bengazi, F., Sbricoli, L., Soto Cantero, L. und Botticelli, D. (2015). Immediate loading of implants installed in a healed alveolar bony ridge or immediately after tooth extraction: an experimental study in dogs.
Clin Oral Implants Res 26(4): 435-441.
- Marambio-Jones, C. und Hoek, E. M. V. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment.
Journal of Nanoparticle Research 12(5): 1531-1551.
- Marks, S. C. und Odgren, P. R. (2002). Structure and Development of the Skeleton.
in: Bilezikian JP, R. L., Rodan GA (Hrsg.): Principles of Bone Biology, 2. San Diego: Academic Press. 3-15.
- Marsell, R. und Einhorn, T. A. (2011). The biology of fracture healing.
Injury 42(6): 551-555.
- Marx, D. E. und Barillo, D. J. (2014). Silver in medicine: the basic science.
Burns 40 Suppl 1: S9-S18.

- Maurer, A. M., Brown, S. A., Payer, J. H., Merritt, K. und Kawalec, J. S. (1993). Reduction of fretting corrosion of Ti-6Al-4V by various surface treatments.
J Orthop Res 11(6): 865-873.
- McAdow, M., Kim, H. K., Dedent, A. C., Hendrickx, A. P., Schneewind, O. und Missiakas, D. M. (2011). Preventing Staphylococcus aureus sepsis through the inhibition of its agglutination in blood.
PLoS Pathog 7(10): e1002307.
- McKibbin, B. (1978). The biology of fracture healing in long bones.
J Bone Joint Surg Br 60-B(2): 150-162.
- McShan, D., Ray, P. C. und Yu, H. (2014). Molecular toxicity mechanism of nanosilver.
J Food Drug Anal 22(1): 116-127.
- Meininger, M., Meininger, S., Groll, J., Gbureck, U. und Moseke, C. (2018). Silver and copper addition enhances the antimicrobial activity of calcium hydroxide coatings on titanium.
J Mater Sci Mater Med 29(5): 61.
- Merola, M. und Affatato, S. (2019). Materials for Hip Prostheses: A Review of Wear and Loading Considerations.
Materials (Basel) 12(3).
- Mitik-Dineva, N., Wang, J., Truong, V. K., Stoddart, P., Malherbe, F., Crawford, R. J. und Ivanova, E. P. (2009). Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, and Staphylococcus aureus attachment patterns on glass surfaces with nanoscale roughness.
Curr Microbiol 58(3): 268-273.
- Moreillon, P., Entenza, J. M., Francioli, P., McDevitt, D., Foster, T. J., Francois, P. und Vaudaux, P. (1995). Role of Staphylococcus aureus coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis.
Infect Immun 63(12): 4738-4743.
- Moseke, C., Gbureck, U., Elter, P., Drechsler, P., Zoll, A., Thull, R. und Ewald, A. (2011). Hard implant coatings with antimicrobial properties.
J Mater Sci Mater Med 22(12): 2711-2720.
- Naik, K. und Kowshik, M. (2017). The silver lining: towards the responsible and limited usage of silver.
J Appl Microbiol 123(5): 1068-1087.
- Neoh, K. G. und Kang, E. T. (2011). Combating bacterial colonization on metals via polymer coatings: relevance to marine and medical applications.
ACS Appl Mater Interfaces 3(8): 2808-2819.

- Osborn und Newesely (1980). Dynamic aspects of the implant-bone interface. in: Heimke, G. (Hrsg.): Dental implants: materials and systems, München: Carl Hanser Verlag. 111-123.
- Otto, M. (2009). Staphylococcus epidermidis--the 'accidental' pathogen. Nat Rev Microbiol 7(8): 555-567.
- Otto-Lambertz, C., Yagdiran, A., Wallscheid, F., Eysel, P. und Jung, N. (2017). Periprosthetic infection in joint replacement—diagnosis and treatment. Dtsch Arztebl Int (114): 347-353.
- Pan, C., Zhou, Z. und Yu, X. (2018). Coatings as the useful drug delivery system for the prevention of implant-related infections. J Orthop Surg Res 13(1): 220.
- Pappas, M. J., Makris, G. und Buechel, F. F. (1995). Titanium nitride ceramic film against polyethylene. A 48 million cycle wear test. Clin Orthop Relat Res(317): 64-70.
- Park, J. Y. und Davies, J. E. (2000). Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. Clin Oral Implants Res 11(6): 530-539.
- Paschoal, A. L., Vanancio, E. C., Canale Lde, C., da Silva, O. L., Huerta-Vilca, D. und Motheo Ade, J. (2003). Metallic biomaterials TiN-coated: corrosion analysis and biocompatibility. Artif Organs 27(5): 461-464.
- Pavluhkina, S. V., Kaplan, J. B., Xu, L., Chang, W., Yu, X., Madhyastha, S., Yakandawala, N., Mentbayeva, A., Khan, B. und Sukhishvili, S. A. (2012). Noneluting enzymatic antibiofilm coatings. ACS Appl Mater Interfaces 4(9): 4708-4716.
- Pazzaglia, U. E., Zatti, G., Cherubino, P., Frick, W. und Koch, R. (1991). Bone reaction to the implant of intramedullary pins of three different metals in rat femur. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2(2): 77-81.
- Peng, Z., Ao, H., Wang, L., Guo, S. und Tang, T. (2015). Quaternised chitosan coating on titanium provides a self-protective surface that prevents bacterial colonisation and implant-associated infections. RSC Advances 5(67): 54304-54311.
- Peng, Z., Ni, J., Zheng, K., Shen, Y., Wang, X., He, G., Jin, S. und Tang, T. (2013). Dual effects and mechanism of TiO₂ nanotube arrays in reducing bacterial colonization and enhancing C3H10T1/2 cell adhesion. Int J Nanomedicine 8: 3093-3105.

- Persson, C., Baleani, M., Guandalini, L., Tigani, D. und Viceconti, M. (2006). Mechanical effects of the use of vancomycin and meropenem in acrylic bone cement. *Acta Orthop* 77(4): 617-621.
- Popat, K. C., Eltgroth, M., Latempa, T. J., Grimes, C. A. und Desai, T. A. (2007). Decreased Staphylococcus epidermis adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes. *Biomaterials* 28(32): 4880-4888.
- Puleo, D. A. und Nanci, A. (1999). Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* 20(23-24): 2311-2321.
- Rabea, E. I., Badawy, M. E., Stevens, C. V., Smagghe, G. und Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4(6): 1457-1465.
- Ramesh, S., Govender, T., Kruger, H. G., de la Torre, B. G. und Albericio, F. (2016). Short AntiMicrobial Peptides (SAMPs) as a class of extraordinary promising therapeutic agents. *J Pept Sci* 22(7): 438-451.
- Rao, R. R., Sharkey, P. F., Hozack, W. J., Eng, K. und Rothman, R. H. (1998). Immediate weightbearing after uncemented total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*(349): 156-162.
- Repenning, D. (2006). Oberflächenbeschichtung - Beschichtungen auf Implantaten. in: Grading, R. und Gollwitzer, H. (Hrsg.): *Ossäre Integration*, Heidelberg: Springer. 53-61.
- Riggs, B. L. und Parfitt, A. M. (2005). Drugs used to treat osteoporosis: the critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling. *J Bone Miner Res* 20(2): 177-184.
- Rossi, F., Lang, N. P., De Santis, E., Morelli, F., Favero, G. und Botticelli, D. (2014). Bone-healing pattern at the surface of titanium implants: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 25(1): 124-131.
- Rothbauer, F., Zerwes, Ute, Bleß, Hans-Holger, Kip, Miriam (2017). Häufigkeit endoprothetischer Hüft- und Knieoperationen. in: (Hrsg.): *Weißbuch Gelenkersatz*, Berlin: Springer. 17-41.

- Roy, M., Fielding, G. A., Beyenal, H., Bandyopadhyay, A. und Bose, S. (2012). Mechanical, in vitro antimicrobial, and biological properties of plasma-sprayed silver-doped hydroxyapatite coating. *ACS Appl Mater Interfaces* 4(3): 1341-1349.
- Roze, J., Hoornaert, A. und Layrolle, P. (2014). Correlation between primary stability and bone healing of surface treated titanium implants in the femoral epiphyses of rabbits. *J Mater Sci Mater Med* 25(8): 1941-1951.
- Ruan, H., Fan, C., Liu, S. und Zheng, X. (2011). [In vivo experimental study on antibacterial and osteogenic capabilities of hydroxyapatite antimicrobial coating with silver]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 25(6): 668-672.
- Russell, A. D. und Hugo, W. B. (1994). Antimicrobial activity and action of silver. *Prog Med Chem* 31: 351-370.
- Sahariah, P. und Masson, M. (2017). Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship. *Biomacromolecules* 18(11): 3846-3868.
- Salvi, G. E., Bosshardt, D. D., Lang, N. P., Abrahamsson, I., Berglundh, T., Lindhe, J., Ivanovski, S. und Donos, N. (2015). Temporal sequence of hard and soft tissue healing around titanium dental implants. *Periodontol* 2000 68(1): 135-152.
- Sánchez-López, J. C., Abad, M. D., Carvalho, I., Escobar Galindo, R., Benito, N., Ribeiro, S., Henriques, M., Cavaleiro, A. und Carvalho, S. (2012). Influence of silver content on the tribomechanical behavior on Ag-TiCN bioactive coatings. *Surface and Coatings Technology* 206(8-9): 2192-2198.
- Saulou-Berion, C., Gonzalez, I., Enjalbert, B., Audinot, J. N., Fourquaux, I., Jamme, F., Coccagn-Bousquet, M., Mercier-Bonin, M. und Girbal, L. (2015). *Escherichia coli* under Ionic Silver Stress: An Integrative Approach to Explore Transcriptional, Physiological and Biochemical Responses. *PLoS One* 10(12): e0145748.
- Scarano, A., Piattelli, M., Vrespa, G., Petrone, G., Iezzi, G. und Piattelli, A. (2003). Bone healing around titanium and titanium nitride-coated dental implants with three surfaces: an experimental study in rats. *Clin Implant Dent Relat Res* 5(2): 103-111.
- Schaldach, M., Hubmann, M., Hardt, R. und Weikl, A. (1989). [Titanium nitride cardiac pacemaker electrodes]. *Biomed Tech (Berl)* 34(7-8): 185-190.

- Schenk, R. und Willenegger, H. (1964). [on the Histology of Primary Bone Healing].
Langenbecks Arch Klin Chir Ver Dtsch Z Chir 308: 440-452.
- Schindeler, A., McDonald, M. M., Bokko, P. und Little, D. G. (2008). Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture.
Semin Cell Dev Biol 19(5): 459-466.
- Schmitz, T., Warmuth, F., Werner, E., Hertl, C., Groll, J., Gbureck, U. und Moseke, C. (2014). Physical and chemical characterization of Ag-doped Ti coatings produced by magnetron sputtering of modular targets.
Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 44: 126-131.
- Scoccianti, G., Frenos, F., Beltrami, G., Campanacci, D. A. und Capanna, R. (2016). Levels of silver ions in body fluids and clinical results in silver-coated megaprotheses after tumour, trauma or failed arthroplasty.
Injury 47 Suppl 4: S11-S16.
- Shah, F. A., Thomsen, P. und Palmquist, A. (2019). Osseointegration and current interpretations of the bone-implant interface.
Acta Biomater 84: 1-15.
- Shi, Z., Neoh, K. G., Kang, E. T., Poh, C. und Wang, W. (2009). Titanium with surface-grafted dextran and immobilized bone morphogenetic protein-2 for inhibition of bacterial adhesion and enhancement of osteoblast functions.
Tissue Eng Part A 15(2): 417-426.
- Siddiqi, K. S., Husen, A. und Rao, R. A. K. (2018). A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties.
J Nanobiotechnology 16(1): 14.
- Slawson, R. M., Lee, H. und Trevors, J. T. (1990). Bacterial interactions with silver.
Biol Met 3(3-4): 151-154.
- Solar, R. J., Pollack, S. R. und Korostoff, E. (1979). In vitro corrosion testing of titanium surgical implant alloys: an approach to understanding titanium release from implants.
J Biomed Mater Res 13(2): 217-250.
- Song, W. H., Ryu, H. S. und Hong, S. H. (2009). Antibacterial properties of Ag (or Pt)-containing calcium phosphate coatings formed by micro-arc oxidation.
J Biomed Mater Res A 88(1): 246-254.

- Sovak, G., Gotman, I. und Weiss, A. (2015). Osseointegration of Ti-6Al-4V alloy implants with a titanium nitride coating produced by a PIRAC nitriding technique: a long-term time course study in the rat. *Microsc Microanal* 21(1): 179-189.
- Sovak, G., Weiss, A. und Gotman, I. (2000). Osseointegration of Ti6Al4V alloy implants coated with titanium nitride by a new method. *J Bone Joint Surg Br* 82(2): 290-296.
- Sundfeldt, M., Carlsson, L. V., Johansson, C. B., Thomsen, P. und Gretzer, C. (2006). Aseptic loosening, not only a question of wear: a review of different theories. *Acta Orthop* 77(2): 177-197.
- Swartjes, J. J. T. M., Das, T., Sharifi, S., Subbiahdoss, G., Sharma, P. K., Krom, B. P., Busscher, H. J. und van der Mei, H. C. (2013). A Functional DNase I Coating to Prevent Adhesion of Bacteria and the Formation of Biofilm. *Advanced Functional Materials* 23(22): 2843-2849.
- Tan, H., Ma, R., Lin, C., Liu, Z. und Tang, T. (2013). Quaternized chitosan as an antimicrobial agent: antimicrobial activity, mechanism of action and biomedical applications in orthopedics. *Int J Mol Sci* 14(1): 1854-1869.
- Tan, H., Peng, Z., Li, Q., Xu, X., Guo, S. und Tang, T. (2012). The use of quaternised chitosan-loaded PMMA to inhibit biofilm formation and downregulate the virulence-associated gene expression of antibiotic-resistant staphylococcus. *Biomaterials* 33(2): 365-377.
- Terheyden, H., Lang, N. P., Bierbaum, S. und Stadlinger, B. (2012). Osseointegration--communication of cells. *Clin Oral Implants Res* 23(10): 1127-1135.
- Teughels, W., Van Assche, N., Sliepen, I. und Quirynen, M. (2006). Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res* 17 Suppl 2: 68-81.
- Thomas, P. und Summer, B. (2006). Metallimplantatallergie. in: Grading, R. und Gollwitzer, H. (Hrsg.): *Ossäre Integration*, Heidelberg: Springer. 75-80.
- Toth, L. E. (1971). *Transition Metal Carbides and Nitrides*. New York, London: Academic Press. *Refractory Materials*.

- Trindade, R., Albrektsson, T., Galli, S., Prgomet, Z., Tengvall, P. und Wennerberg, A. (2018). Osseointegration and foreign body reaction: Titanium implants activate the immune system and suppress bone resorption during the first 4 weeks after implantation. *Clin Implant Dent Relat Res* 20(1): 82-91.
- Truong, V. K., Lapovok, R., Estrin, Y. S., Rundell, S., Wang, J. Y., Fluke, C. J., Crawford, R. J. und Ivanova, E. P. (2010). The influence of nano-scale surface roughness on bacterial adhesion to ultrafine-grained titanium. *Biomaterials* 31(13): 3674-3683.
- Ueno, M., Miyamoto, H., Tsukamoto, M., Eto, S., Noda, I., Shobuike, T., Kobatake, T., Sonohata, M. und Mawatari, M. (2016). Silver-Containing Hydroxyapatite Coating Reduces Biofilm Formation by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* In Vitro and In Vivo. *Biomed Res Int* 2016: 8070597.
- Ullah Khan, S., Saleh, T. A., Wahab, A., Khan, M. H. U., Khan, D., Ullah Khan, W., Rahim, A., Kamal, S., Ullah Khan, F. und Fahad, S. (2018). Nanosilver: new ageless and versatile biomedical therapeutic scaffold. *Int J Nanomedicine* 13: 733-762.
- Unosson, E., Morgenstern, M., Engqvist, H. und Welch, K. (2016). In vitro antibacterial properties and UV induced response from *Staphylococcus epidermidis* on Ag/Ti oxide thin films. *J Mater Sci Mater Med* 27(3): 49.
- Vaananen, H. K., Zhao, H., Mulari, M. und Halleen, J. M. (2000). The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 113 (Pt 3): 377-381.
- van Hove, R. P., Sierevelt, I. N., van Royen, B. J. und Nolte, P. A. (2015). Titanium-Nitride Coating of Orthopaedic Implants: A Review of the Literature. *Biomed Res Int* 2015: 485975.
- Viceconti, M., Muccini, R., Bernakiewicz, M., Baleani, M. und Cristofolini, L. (2000). Large-sliding contact elements accurately predict levels of bone-implant micromotion relevant to osseointegration. *J Biomech* 33(12): 1611-1618.
- Wafa, H., Grimer, R. J., Reddy, K., Jeys, L., Abudu, A., Carter, S. R. und Tillman, R. M. (2015). Retrospective evaluation of the incidence of early periprosthetic infection with silver-treated endoprostheses in high-risk patients: case-control study. *Bone Joint J* 97-B(2): 252-257.

- Wagner, D. R., Karnik, S., Gunderson, Z. J., Nielsen, J. J., Fennimore, A., Promer, H. J., Lowery, J. W., Loghmani, M. T., Low, P. S., McKinley, T. O., Kacena, M. A., Clauss, M. und Li, J. (2019). Dysfunctional stem and progenitor cells impair fracture healing with age. *World J Stem Cells* 11(6): 281-296.
- Wang, M. und Tang, T. (2019). Surface treatment strategies to combat implant-related infection from the beginning. *J Orthop Translat* 17: 42-54.
- Wang, T., Zhang, X. und Bikle, D. D. (2017). Osteogenic Differentiation of Periosteal Cells During Fracture Healing. *J Cell Physiol* 232(5): 913-921.
- Wang, X., Bai, S., Li, F., Li, D., Zhang, J., Tian, M., Zhang, Q., Tong, Y., Zhang, Z., Wang, G., Guo, T. und Ma, C. (2016). Effect of plasma nitriding and titanium nitride coating on the corrosion resistance of titanium. *J Prosthet Dent* 116(3): 450-456.
- Ward, L. P., Subramanian, C., Strafford, K. N. und Wilks, T. P. (1998). Sliding wear studies of selected nitride coatings and their potential for long-term use in orthopaedic applications. *Proc Inst Mech Eng H* 212(4): 303-315.
- Wilson, C. J., Clegg, R. E., Leavesley, D. I. und Pearcy, M. J. (2005). Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Eng* 11(1-2): 1-18.
- Yala, J. F., Thebault, P., Hequet, A., Humblot, V., Pradier, C. M. und Berjeaud, J. M. (2011). Elaboration of antibiofilm materials by chemical grafting of an antimicrobial peptide. *Appl Microbiol Biotechnol* 89(3): 623-634.
- Yan, X., He, B., Liu, L., Qu, G., Shi, J., Hu, L. und Jiang, G. (2018). Antibacterial mechanism of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*: proteomics approach. *Metallomics* 10(4): 557-564.
- Yang, Y., Ao, H., Wang, Y., Lin, W., Yang, S., Zhang, S., Yu, Z. und Tang, T. (2016). Cytocompatibility with osteogenic cells and enhanced in vivo anti-infection potential of quaternized chitosan-loaded titania nanotubes. *Bone Res* 4: 16027.
- Yang, Y., Yang, S. B., Wang, Y. G., Zhang, S. H., Yu, Z. F. und Tang, T. T. (2017). Bacterial inhibition potential of quaternised chitosan-coated VICRYL absorbable suture: An in vitro and in vivo study. *J Orthop Translat* 8: 49-61.

- Yatsuzuka, M., Miki, S., Morita, R., Azuma, K., Fujiwara, E. und Uchida, H. (2000). Enhanced corrosion resistance of TiN prepared by plasma-based ion implantation. *Vacuum* 59(1): 330-337.
- Yonekura, Y., Miyamoto, H., Shimazaki, T., Ando, Y., Noda, I., Mawatari, M. und Hotokebuchi, T. (2011). Osteoconductivity of thermal-sprayed silver-containing hydroxyapatite coating in the rat tibia. *J Bone Joint Surg Br* 93(5): 644-649.
- Zhang, B. G., Myers, D. E., Wallace, G. G., Brandt, M. und Choong, P. F. (2014). Bioactive coatings for orthopaedic implants-recent trends in development of implant coatings. *Int J Mol Sci* 15(7): 11878-11921.
- Zhao, G. H., Aune, R. E. und Espallargas, N. (2016). Tribocorrosion studies of metallic biomaterials: The effect of plasma nitriding and DLC surface modifications. *J Mech Behav Biomed Mater* 63: 100-114.
- Zhao, J., Cai, X. M., Tang, H. Q., Liu, T., Gu, H. Q. und Cui, R. Z. (2009). Bactericidal and biocompatible properties of TiN/Ag multilayered films by ion beam assisted deposition. *J Mater Sci Mater Med* 20 Suppl 1: S101-105.
- Zhao, L., Wang, H., Huo, K., Cui, L., Zhang, W., Ni, H., Zhang, Y., Wu, Z. und Chu, P. K. (2011). Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with silver nanoparticles. *Biomaterials* 32(24): 5706-5716.
- Zhou, W., Jia, Z., Xiong, P., Yan, J., Li, M., Cheng, Y. und Zheng, Y. (2018). Novel pH-responsive tobramycin-embedded micelles in nanostructured multilayer-coatings of chitosan/heparin with efficient and sustained antibacterial properties. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 90: 693-705.
- Zimmerli, W., Trampuz, A. und Ochsner, P. E. (2004). Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 351(16): 1645-1654.
- Zitter, H. und Plenk, H., Jr. (1987). The electrochemical behavior of metallic implant materials as an indicator of their biocompatibility. *J Biomed Mater Res* 21(7): 881-896.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Intraoperativer Situs.....	22
Abb. 2:	Skizze Präparat A.....	26
Abb. 3:	„Sandwich“ D.....	26
Abb. 4:	Dünnschliffpräparate in 6 facher Vergrößerung.....	37
Abb. 5:	Abschnittsbilder Kortikalis.....	39
Abb. 6:	Abschnittsbilder Spongiosa.....	39
Abb. 7:	Abschnittsbilder Osteoid.....	40
Abb. 8:	Abschnittsbilder Spalten.....	40
Abb. 9:	Abschnittsbilder Artefakte.....	41
Abb. 10:	Rekonstruierte Implantate im Längs - und Querschnitt.....	43
Abb. 11:	Balkendiagramm mit Fehlerbalken (A) und Boxplot (B) zur Darstellung der Mittelwerte bzw. der Verteilung des Knochen – Implantat – Kontaktes in %, differenziert nach Beschichtung.....	45
Abb. 12:	Diagramme zur differenzierten Betrachtung des Knochen – Implantat – Kontaktes nach Kaninchen und Beschichtung.....	46
Abb. 13:	Balkendiagramm mit Fehlerbalken (A) und Boxplot (B) zur Darstellung des Mittelwertes bzw. der Verteilung des Osteoidanteils in %, differenziert nach Beschichtung.....	48
Abb. 14:	Diagramme zur differenzierten Betrachtung des Osteoid – Anteils nach Kaninchen und Beschichtung.....	50
Abb. 15:	Balkendiagramm mit Fehlerbalken (A) und Boxplot (B) zur Darstellung der Mittelwerte bzw. der Verteilung des Spaltanteils in %, differenziert nach Beschichtung.....	52
Abb. 16:	Diagramme zur differenzierten Betrachtung des Spaltanteils nach Kaninchen und Beschichtung.....	54
Abb. 17:	Balkendiagramm mit Fehlerbalken (A) und Boxplot (B) zur Darstellung des Anteils an Artefakten bzw. dessen Verteilung in %, differenziert nach Beschichtung.....	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Materialien für Endoprothesen modifiziert nach Merola und Affatato (2019)	9
Tabelle 2: antiinfektiöse Beschichtungen	12
Tabelle 3: Entwässerung der Proben	24
Tabelle 4: Für die Färbelösungen verwendete Chemikalien	29
Tabelle 5: Trichrom – Gewebeeinfärbung nach Masson und Goldner	32
Tabelle 6: Endschliffdicke der Präparate in μm	36
Tabelle 7: Osseointegration antimikrobiell wirksamer Silberschichtungen im Tiermodell	59
Tabelle 8: Osseointegration TiN beschichteter Implantate im Tiermodell	59

7 Anhang

7.1 Übersichtsbilder der Dünnschliffpräparate und zusammengesetzte Bilder

Im Folgenden sind ergänzend zu den Präparaten in Abbildung 2 (Kapitel 3.1.1) die restlichen Übersichtsbilder der Dünnschliffpräparate in 6 – facher Vergrößerung dargestellt. Der Eichstrich beträgt jeweils 2000 µm.

Anschließend erfolgt die Darstellung der übrigen zusammengesetzten Bilder, ergänzend zu den Abbildungen 10A-C (Kapitel 3.1.3). Der Eichstrich beträgt hier 500 µm. Die Implantate sind in den jeweiligen Abbildungen schwarz dargestellt. Transluzente Hantelkopf – förmige Bereiche in den Präparaten entsprechen herausgelösten Implantatanteilen. Die Kortikalis stellt sich leuchten grün und die Spongiosa rötlich – braun dar. Noch nicht mineralisierte Knochenmatrix (Osteoid) ist als roter Saum auf einigen Implantatoberflächen erkennbar. Durchsichtig/weiß stellen sich die Bereiche dar, in denen kein Gewebe vorhanden ist.

Übersichtsbilder der Dünnschliffpräparate

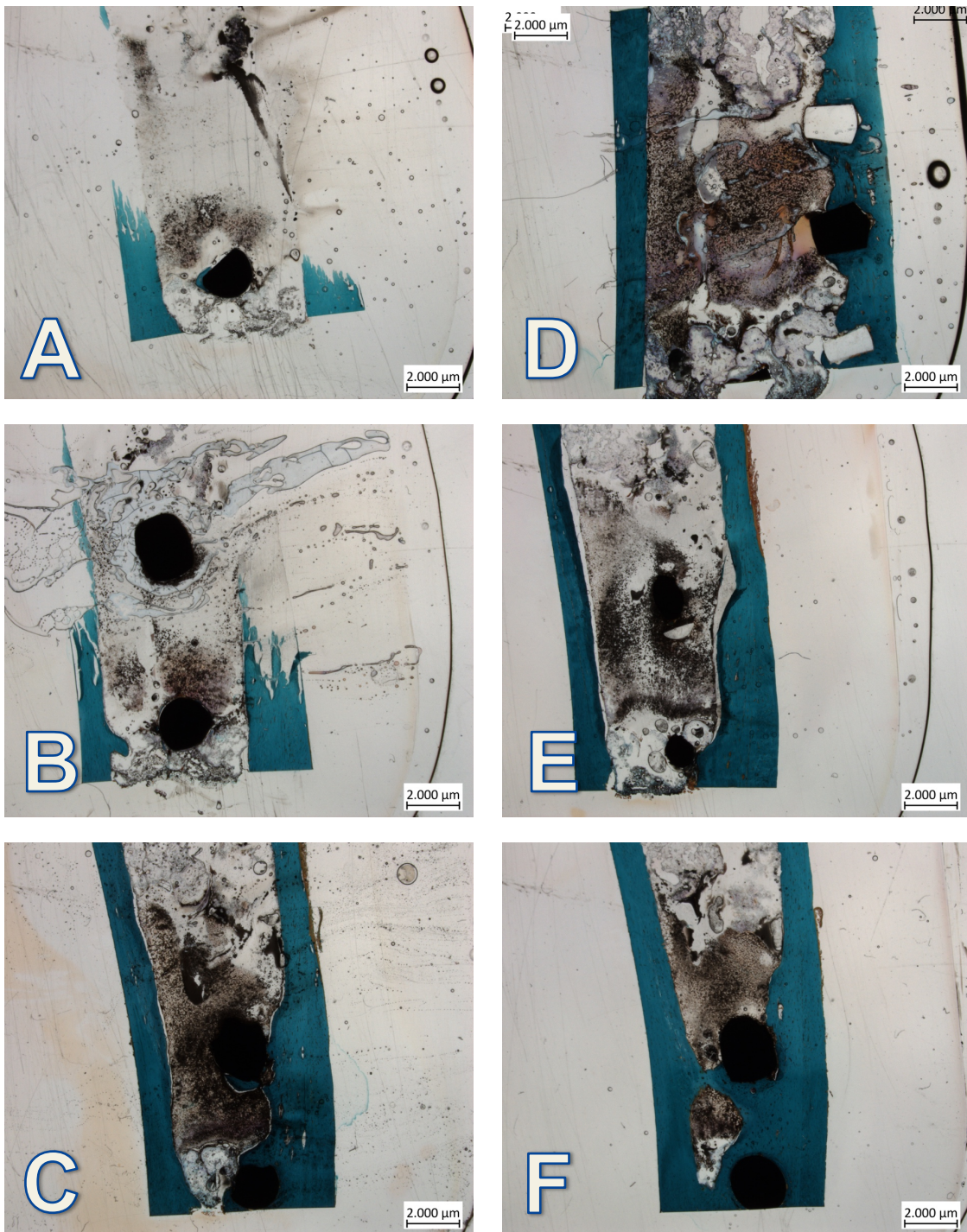


Abb. 18: Dünnschliffpräparate des Kaninchens Nr. 610

A Pr. 1 linkes Femur auf OT2

B Ko. u. Pr. (unten) linkes Femur auf OT2

C Ko. u. Pr. (unten) linkes Femur auf OT4

D Pr.1/2/Ko. (unten) rechtes Femur (OT2)

E Ko. u. Pr. (unten) linkes Femur auf OT3

F Ko. u. Pr. (unten) linkes Femur auf OT5

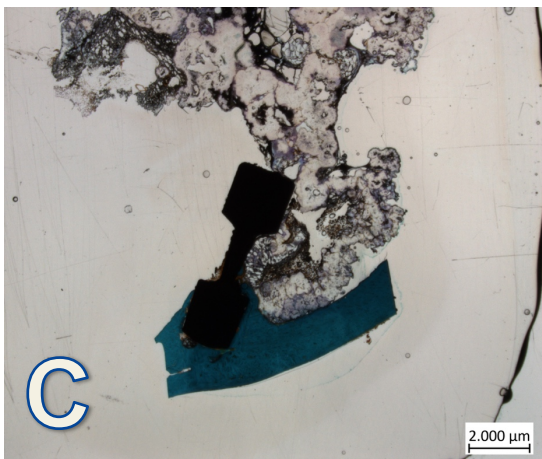
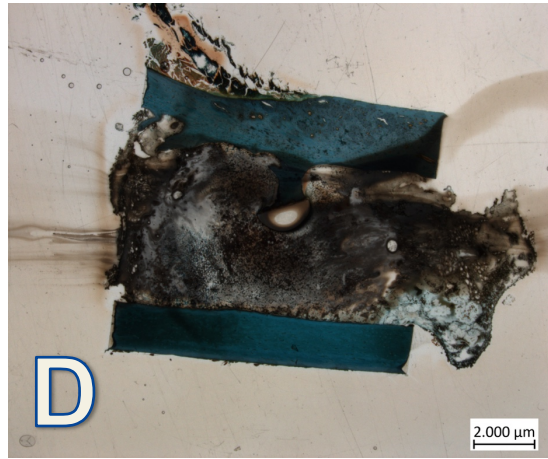
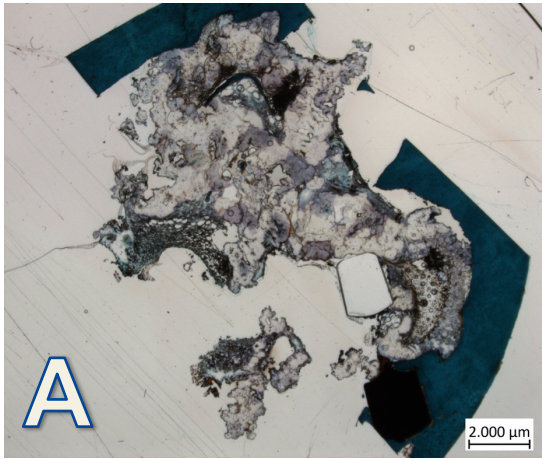


Abb. 19: Dünnschliffpräparate des Kaninchens Nr. 607

A Ko. linkes Femur auf OT2

D Pr. 1 linkes Femur auf OT2

B Ko. rechtes Femur auf OT2

E Pr. 2 rechtes Femur auf OT2

C Ko. linkes Femur auf OT3

F Pr. 1 u. 2 linkes Femur auf OT3

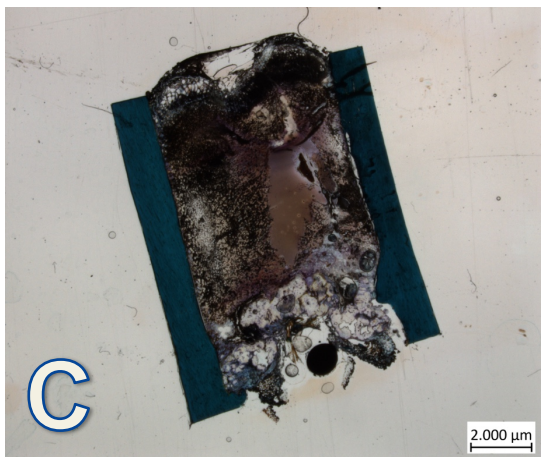
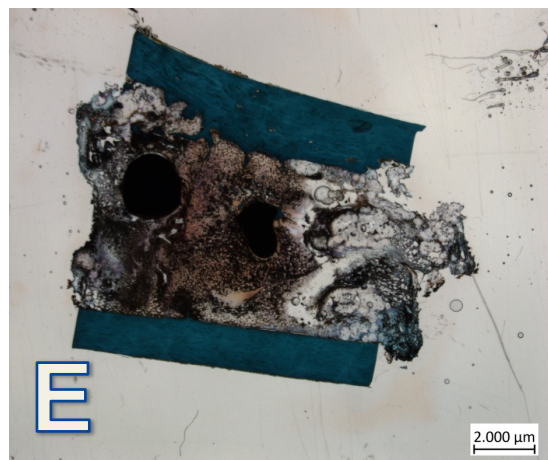
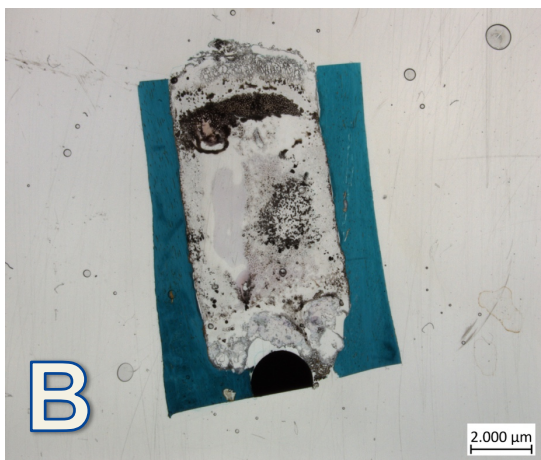
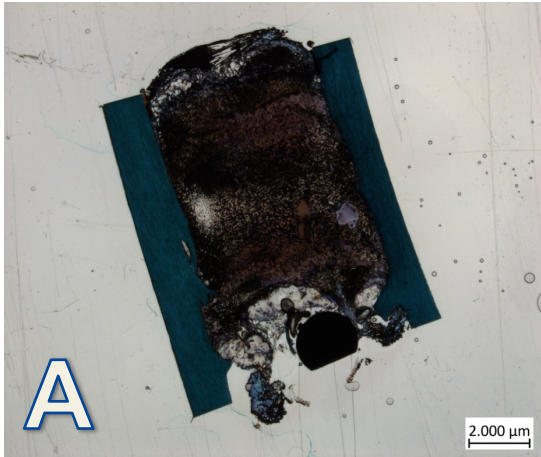


Abb. 20: Dünnschliffpräparate des Kaninchens Nr. 607

A Ko. rechtes Femur auf OT3

B Ko. rechtes Femur auf OT6

C Ko. rechtes Femur auf OT4

D Pr. 1 u. 2 rechtes Femur auf OT3

E Pr. 1 u. 2 linkes Femur auf OT4

F Pr. 1 u. 2 rechtes Femur auf OT4

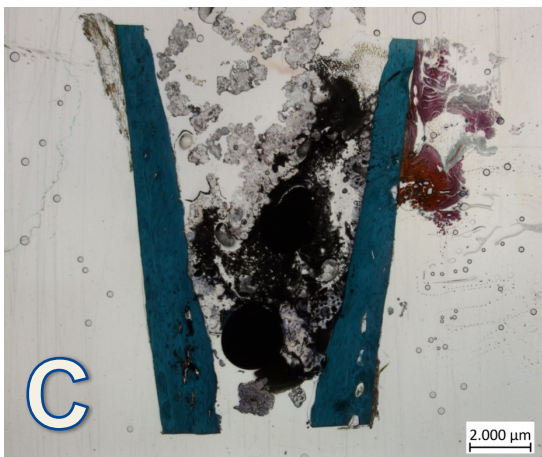


Abb. 21: Dünnschliffpräparate des Kaninchens Nr. 607 u. 660

A Pr. 1 u. 2 linkes Femur auf OT5 (607)

D Ko. rechtes Femur auf OT5 (607)

B Pr. 1 u. 2 rechtes Femur auf OT5 (607)

E Pr. 1 u. 2 linkes Femur auf OT6 (607)

C Pr.1 u. 2 rechtes Femur auf OT7 (660)

F Pr. 1 linkes Femur auf OT2 (660)

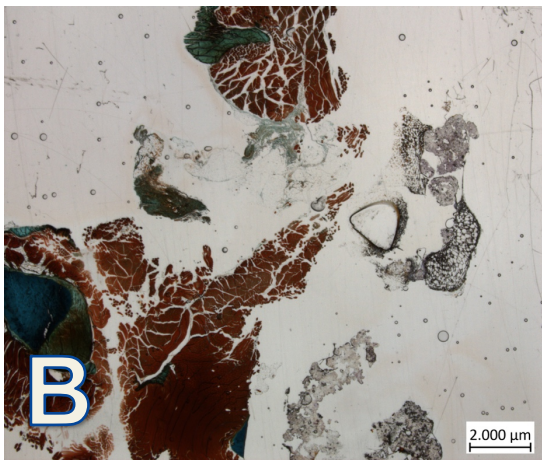
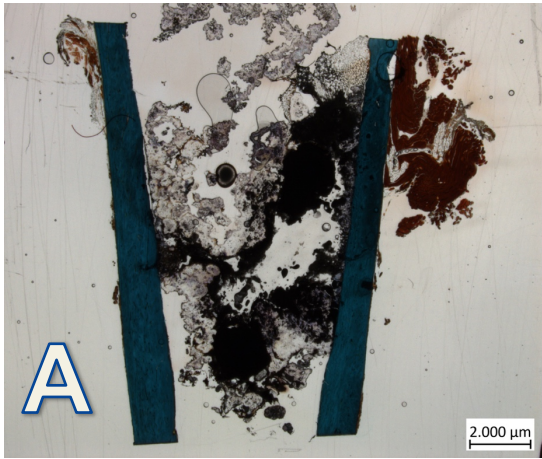


Abb. 22: Dünnschliffpräparate des Kaninchens Nr. 660

A Pr. 1 u. 2 rechtes Femur auf OT6

B Ko. rechtes Femur auf OT2

C Pr. 1 linkes Femur auf OT3

D Ko. linkes Femur auf OT2

E Ko. Linkes Femur auf OT3

F Ko. rechtes Femur auf OT3

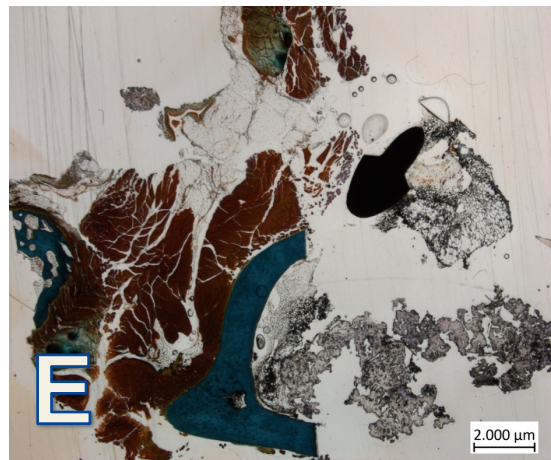
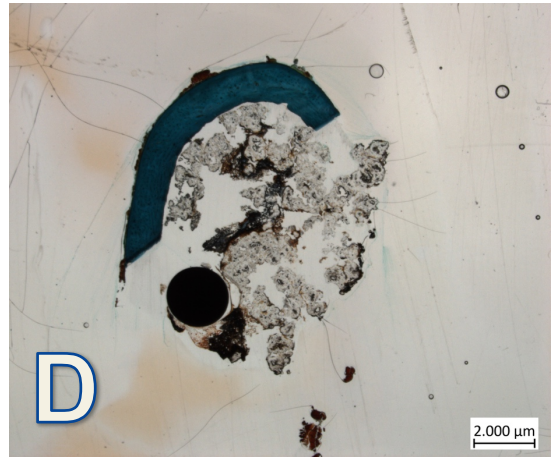
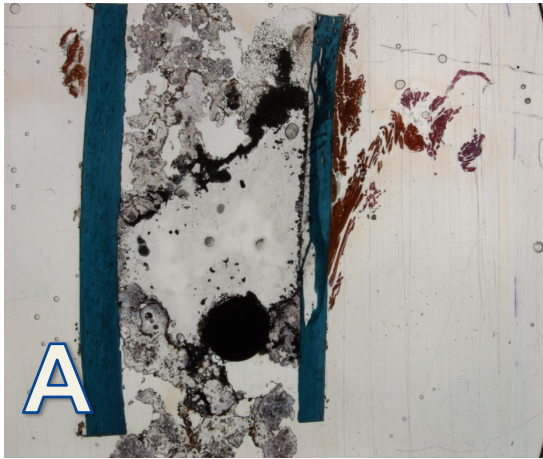


Abb. 23: Dünnschliffpräparate des Kaninchens Nr. 660

A Pr. 2 rechtes Femur auf OT3

B Pr. 1 u. 2 linkes Femur auf OT4

C Pr. 1 u. 2 rechtes Femur auf OT4

D Ko. linkes Femur auf OT4

E Ko. rechtes Femur auf OT4

F Pr.1 u. 2 rechtes Femur auf OT4

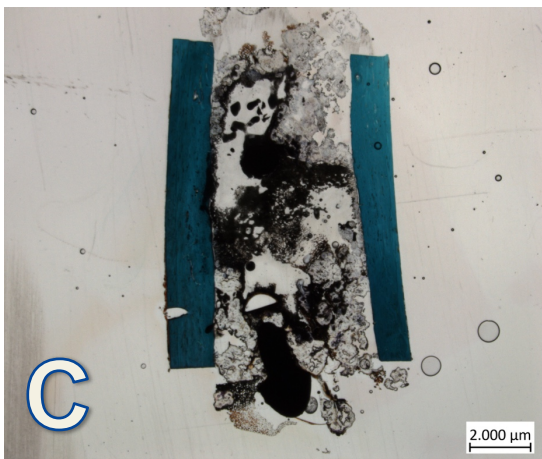
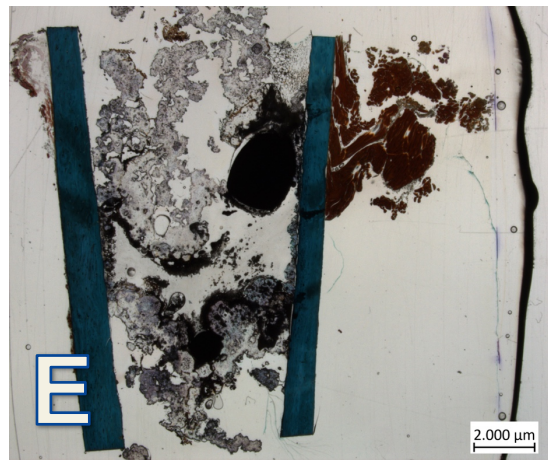
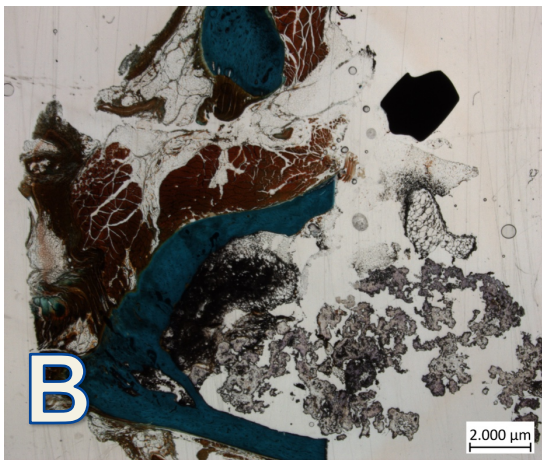
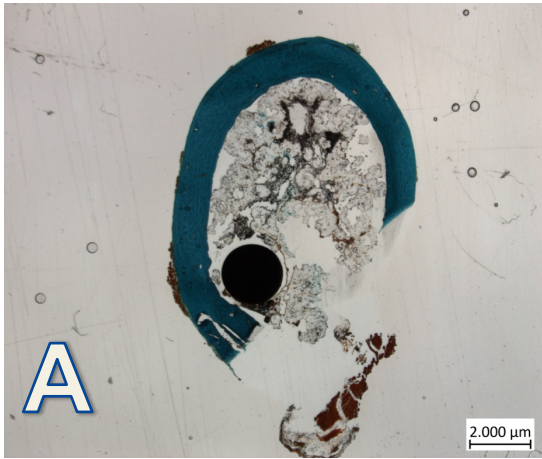


Abb. 24: Dünnschliffpräparate des Kaninchens Nr. 660

A Ko. linkes Femur auf OT5 (660)

D Pr. 1 u. 2 linkes Femur auf OT5 (660)

B Ko. rechte Femur auf OT5 (660)

E Pr. 1 u. 2 rechtes Femur auf OT5 (660)

C Pr. 1 u. 2 linkes Femur auf OT6 (660)

Zusammengesetzte Bilder



Abb. 25: Rekonstruierte Bilder Kaninchen Nr. 610

A Pr. 1 linkes Femur auf OT 2

B Ko. linkes Femur auf OT 3

C Ko. linkes Femur auf OT 4

D Pr. 1 linkes Femur auf OT 3

E Pr. 1 linkes Femur auf OT 4

F Ko. linkes Femur auf OT 5

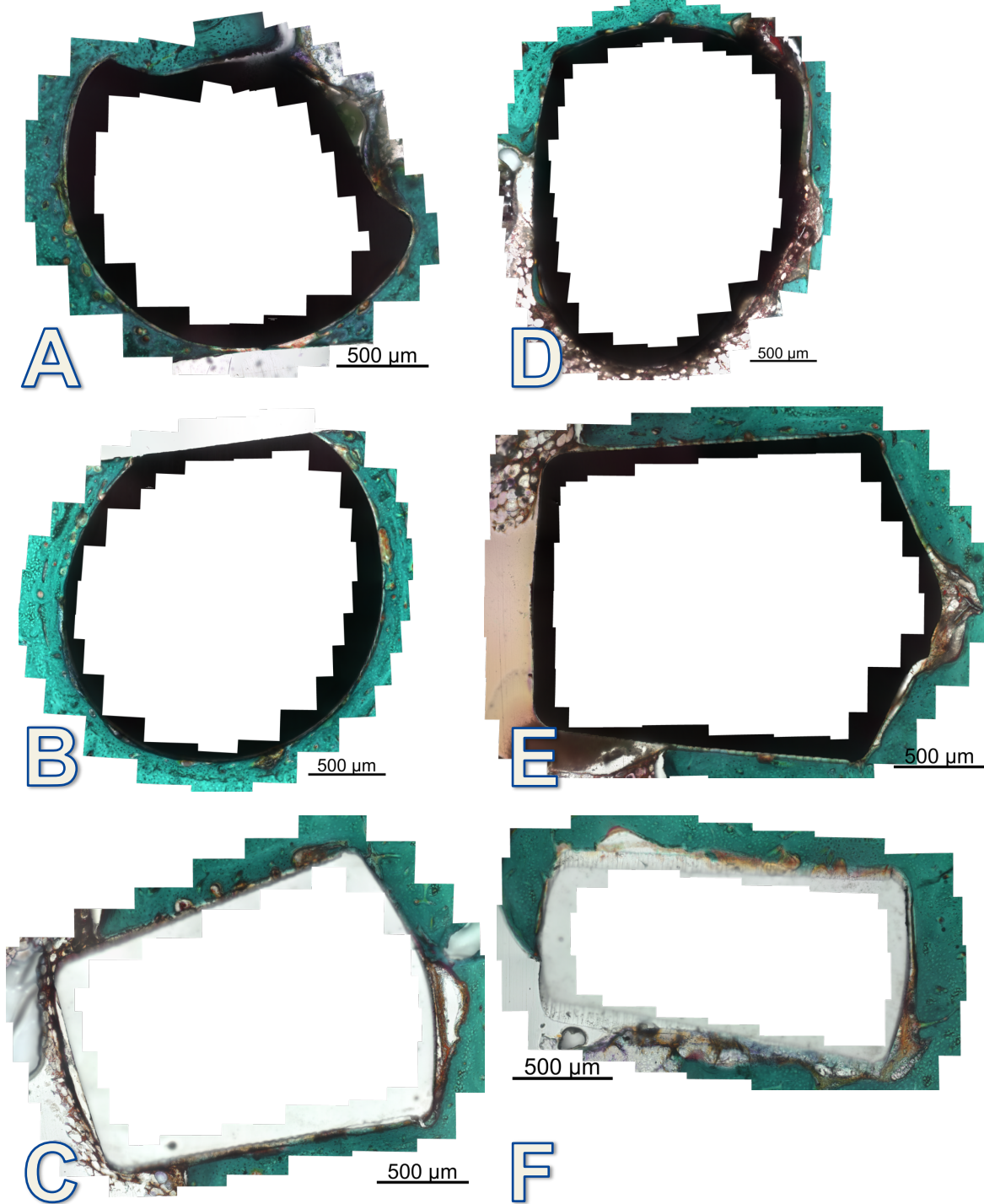


Abb. 26: Rekonstruierte Bilder Kaninchen Nr. 610

A Pr. 1 linkes Femur auf OT 5

B Pr. 1 linkes Femur auf OT 6

C Pr. 1 rechtes Femur auf OT 2

D Ko. linkes Femur auf OT 6

E Pr. 2 rechtes Femur auf OT 2

F Ko. rechtes Femur auf OT 2

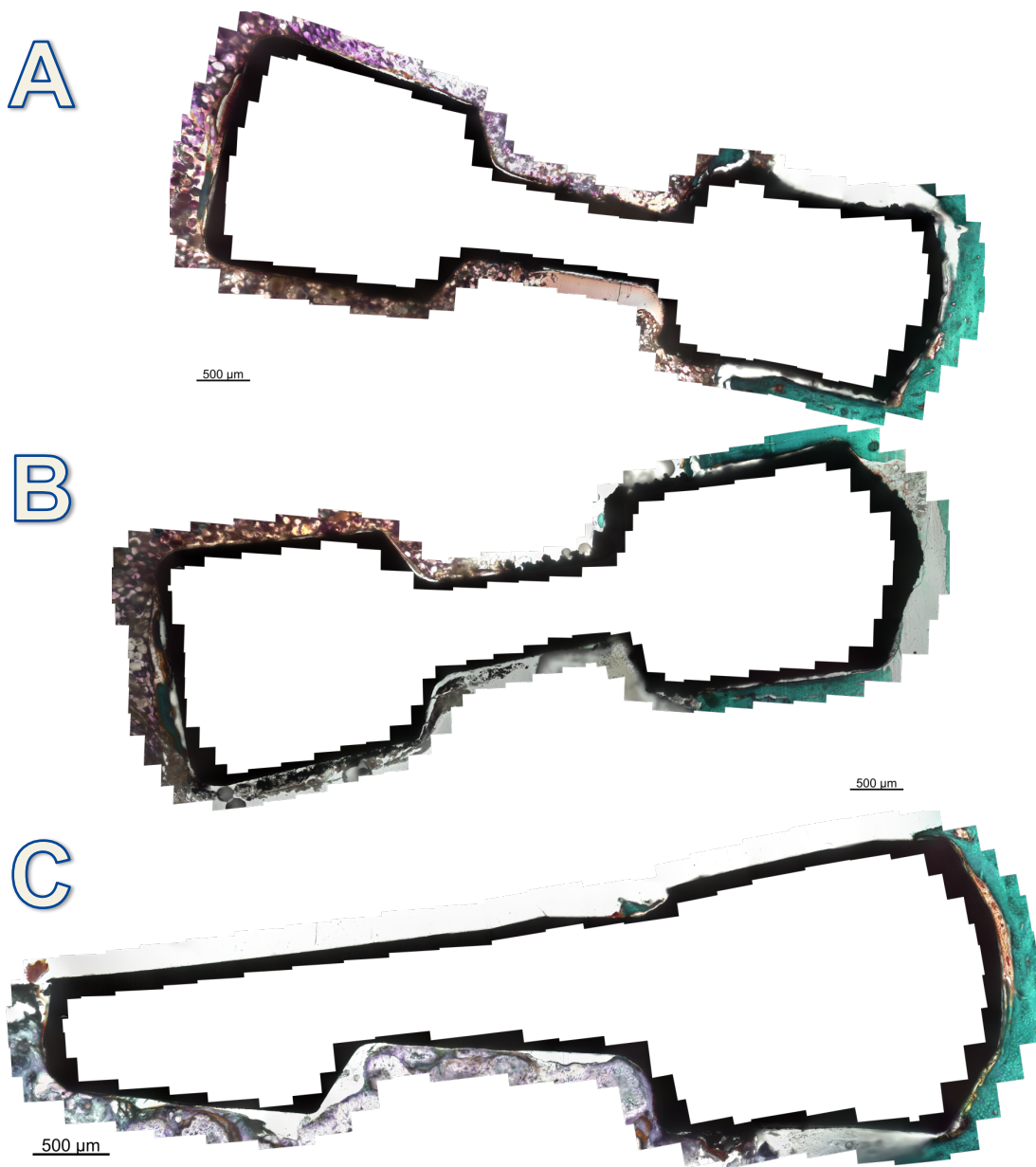


Abb. 27: Rekonstruierte Bilder Kaninchen Nr. 610

A Pr. 1 rechtes Femur auf OT 3

B Pr. 2 rechtes Femur auf OT 3

C Ko. rechtes Femur auf OT 3

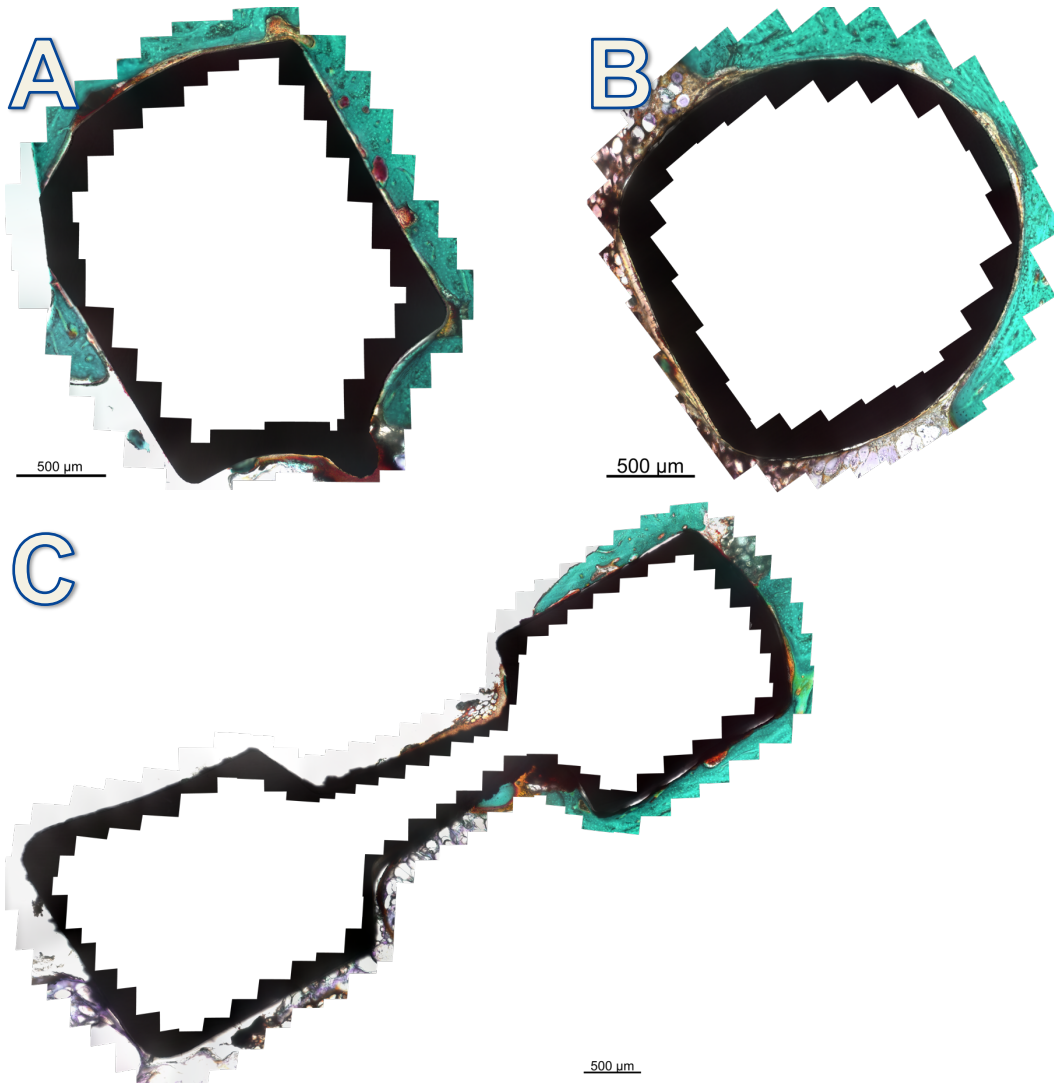
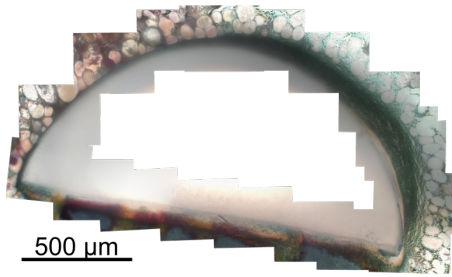


Abb. 28: Rekonstruierte Bilder Kaninchen Nr. 607

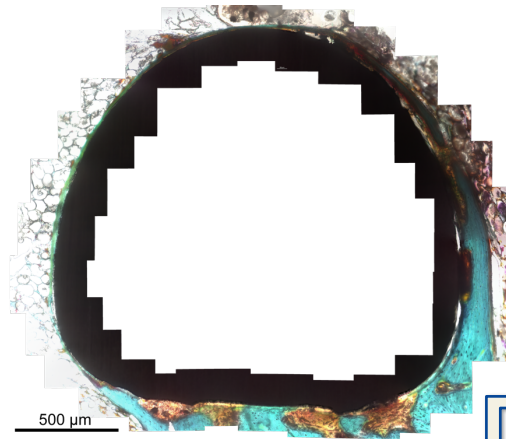
A Ko. linkes Femur auf OT 2

B Pr. 1 linkes Femur auf OT 6

C Ko. linkes Femur auf OT 3



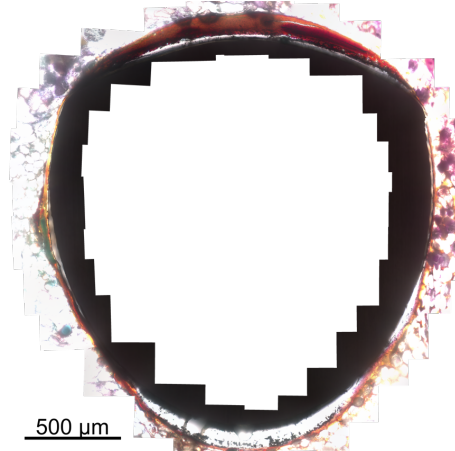
A



D



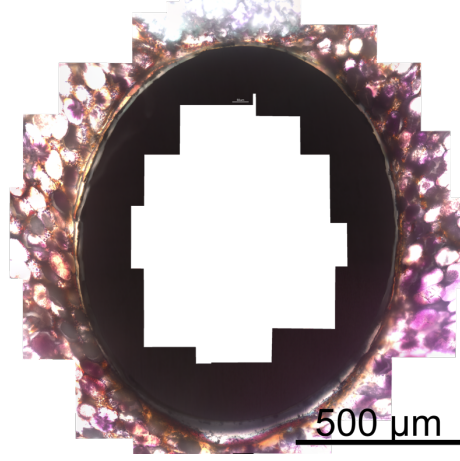
B



E



C



F

Abb. 29: Rekonstruierte Bilder Kaninchen Nr. 607

A Pr. 1 linkes Femur auf OT 2

B Pr. 1 linkes Femur auf OT 3

C Pr. 2 linkes Femur auf OT 5

D Pr. 2 linkes Femur auf OT 2

E Pr. 2 linkes Femur auf OT 4

F Pr. 1 linkes Femur auf OT 5



Abb. 30: Rekonstruierte Bilder Kaninchen Nr. 607

A Pr. 2 linkes Femur auf OT 6

B Ko. rechtes Femur auf OT 3

C Ko. rechtes Femur auf OT 5

D Ko. rechtes Femur auf OT 2

E Ko. rechtes Femur auf OT 4

F Ko. rechtes Femur auf OT 6

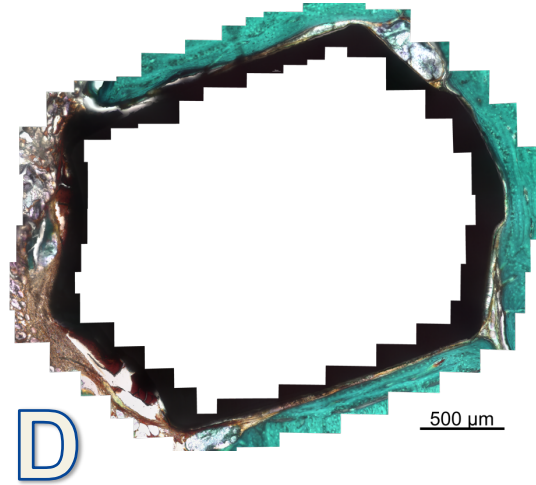
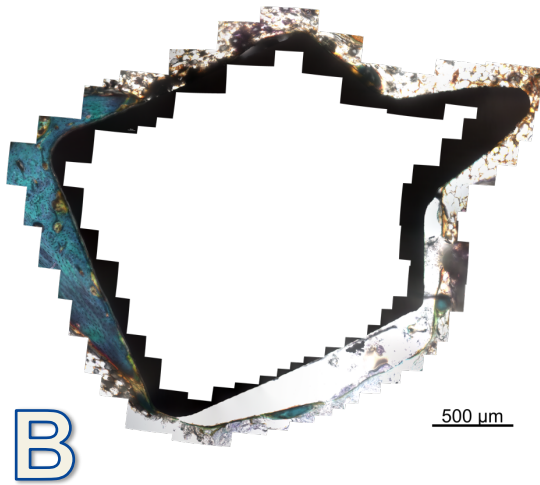
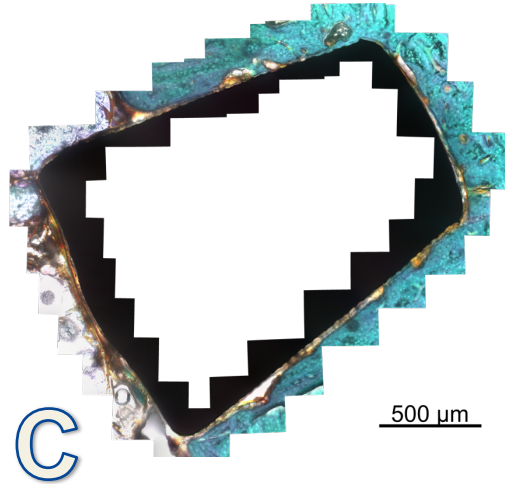
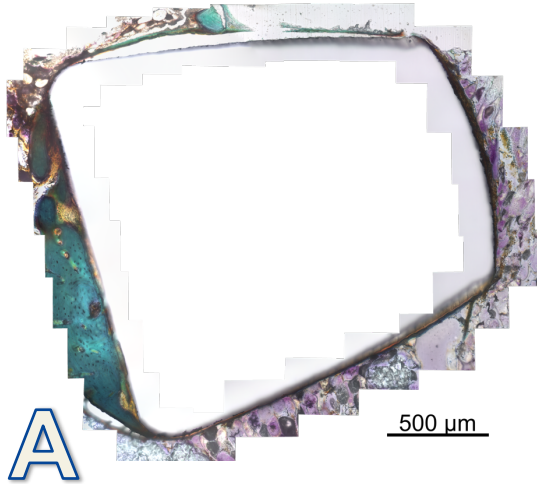


Abb. 31: Rekonstruierte Bilder Kaninchen Nr. 607

A Pr. 1 rechtes Femur auf OT 2

C Pr. 1 rechtes Femur auf OT 3

B Pr. 1 rechtes Femur auf OT 3

D Pr. 1 rechtes Femur auf OT 4

A



B



Abb. 32: Rekonstruierte Bilder Kaninchen Nr. 607

A Pr. 2 rechtes Femur auf OT 3

B Pr. 2 rechtes Femur auf OT 4

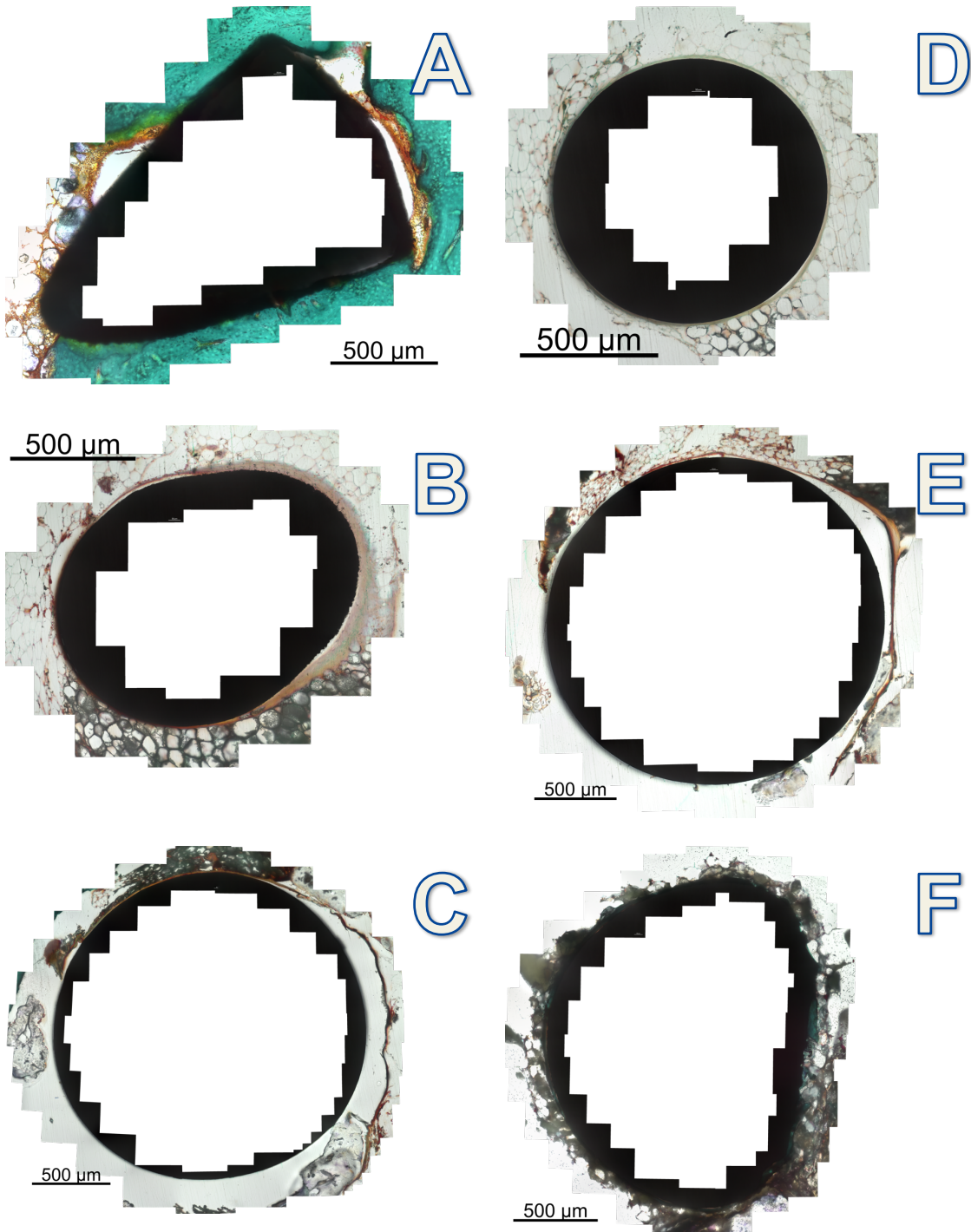


Abb. 33: Rekonstruierte Bilder Kaninchen Nr. 607 u. 660

A Pr. 1 rechtes Femur auf OT 5

B Ko. linkes Femur auf OT 3 (Nr. 660)

C Ko. linkes Femur auf OT 5 (Nr. 660)

D Ko. linkes Femur auf OT 2 (Nr. 660)

E Ko. linkes Femur auf OT 4 (Nr. 660)

F Pr. 1 linkes Femur auf OT 2 (Nr. 660)

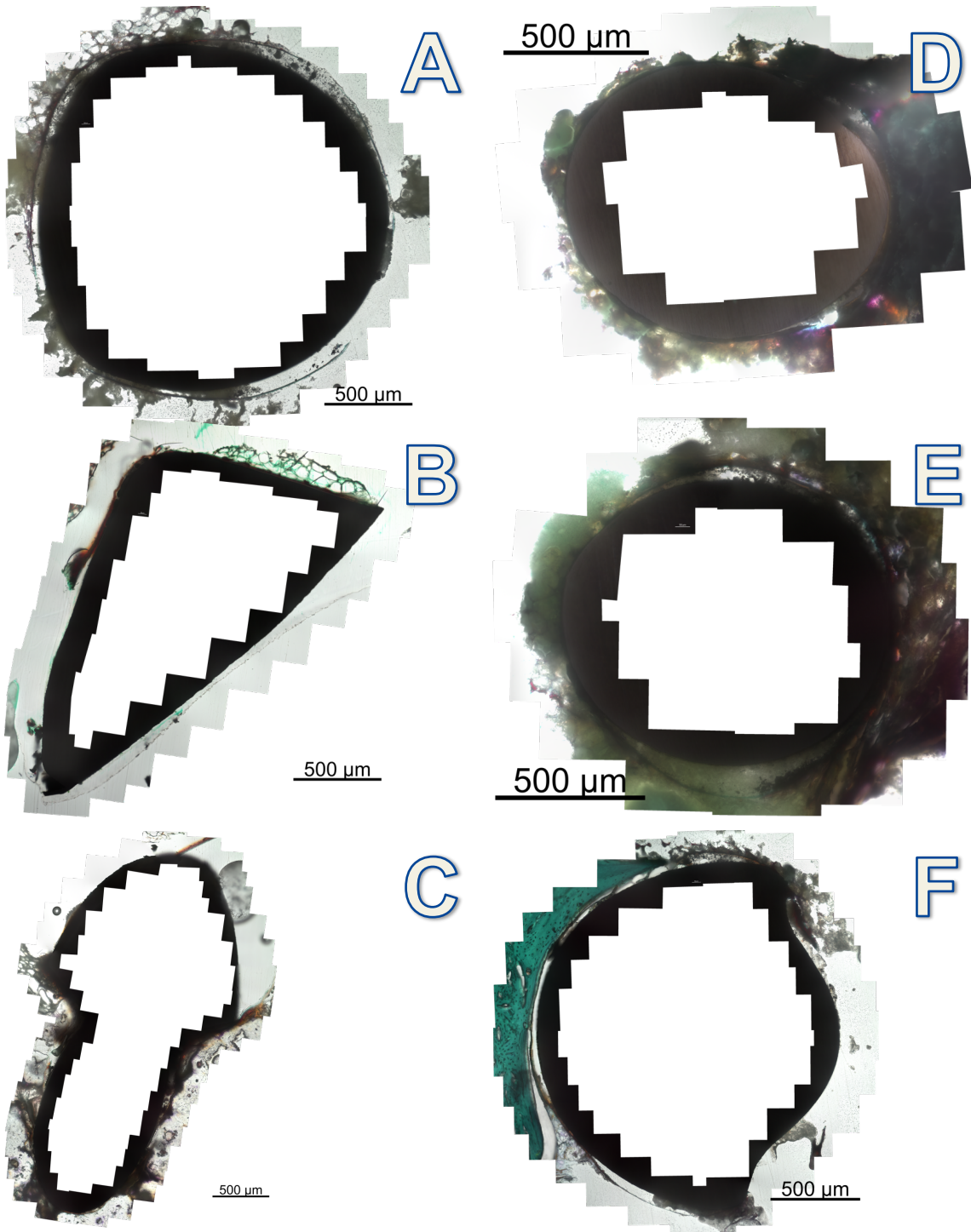


Abb. 34: Rekonstruierte Bilder Kaninchen Nr. 660

A Pr. 1 linkes Femur auf OT 4

B Pr. 1 linkes Femur auf OT 5

C Pr. 1 linkes Femur auf OT 6

D Pr. 2 linkes Femur auf OT 5

E Pr. 2 linkes Femur auf OT 6

F Pr. 1 linkes Femur auf OT 7



Abb. 35: Rekonstruierte Bilder Kaninchen Nr. 660

A Pr. 2 linkes Femur auf OT 7

B Ko. rechtes Femur auf OT 3

C Pr. 1 rechtes Femur auf OT 3

D Ko. rechtes Femur auf OT 2

E Ko. rechtes Femur auf OT 4

F Pr. 1 rechtes Femur auf OT 4

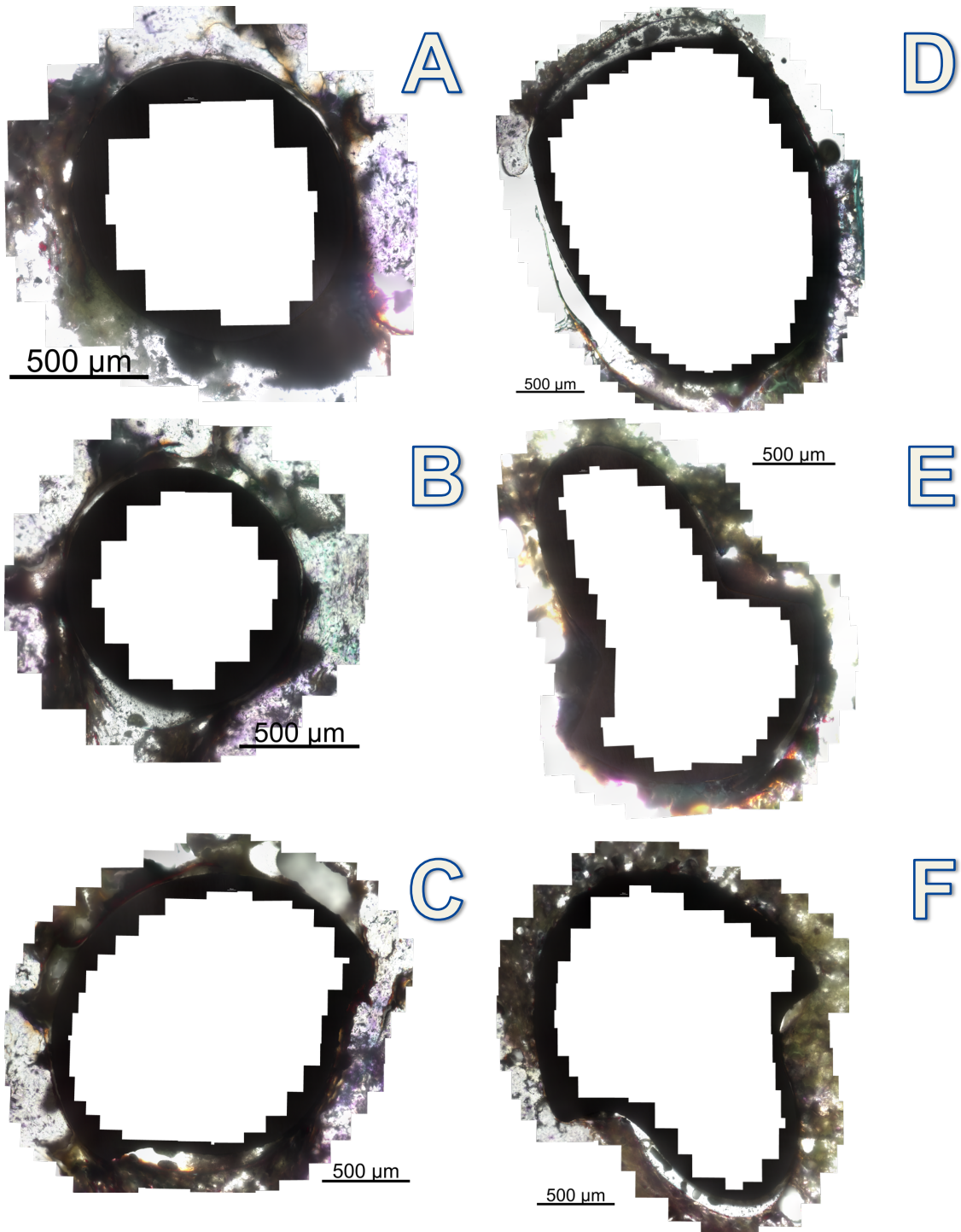


Abb. 36: Rekonstruierte Bilder Kaninchen Nr. 660

A Pr. 2 rechtes Femur auf OT 4

B Pr. 1 rechtes Femur auf OT 5

C Pr. 1 rechtes Femur auf OT 6

D Pr. 2 rechtes Femur auf OT 5

E Pr. 2 rechtes Femur auf OT 6

F Pr. 2 rechtes Femur auf OT 7

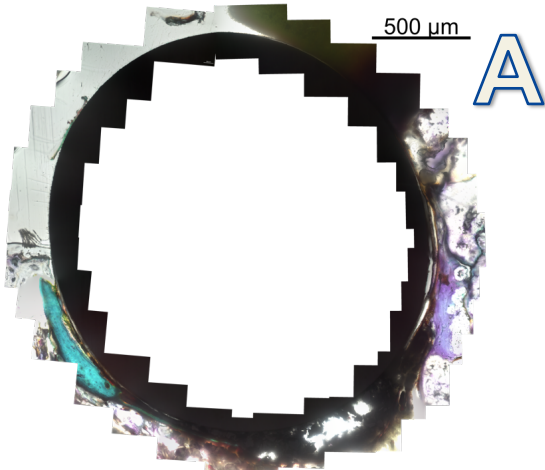


Abb. 37: Rekonstruierte Bilder Kaninchen Nr. 660

A Pr. 1 rechtes Femur auf OT 7

7.2 Messergebnisse

In den nachfolgend dargestellten Tabellen sind alle Messergebnisse aufgelistet. Für jeden Implantatanschnitt ist der gemessene Gesamtumfang, der Artefaktanteil, der Gesamtumfang ohne Artefakte, der Anteil des Knochen – Implantat – Kontaktes und der Spaltanteil jeweils in μm und % eingetragen. Ab Tabelle 10 beziehen sich die prozentualen Anteile der Untersuchungsparameter auf den jeweiligen Gesamtumfang ohne Artefakte.

Tabelle 9: Messwerte der Artefakte aller Dünnschliffpräparate

Schliffnummer	Gesamtumfang in μm	Artefakt in μm	Artefakt in %	Gesamtumfang ohne Artefakt in μm
607 L Ko. OT2	18904,253	2373,445	12	16530,808
607 L Ko. OT3	51160,901	19202,382	37	31958,519
607 L Pr. OT2	11807,861	1809,503	16	9998,358
607 L Pr. OT3 L.I.	16603,05	2121,008	13	14482,042
607 L Pr. OT3 r.I.	18371,94	3415,402	19	14956,538
607 L Pr. OT4 L.I.	17370,015	9139,883	53	8230,132
607 L Pr. OT5 L.I.	14174,584	7567,107	53	6607,477
607 L Pr. OT5 r.I.	8547,223	2858,279	33	5688,944
607 L Pr. OT6 L.I.	14793,159	5125,757	34	9667,402
607 L Pr. OT6 r.I.	18833,414	3100,625	17	15732,789
607 R Ko. OT2	10495,224	6422,385	61	4072,839
607 R Ko. OT3	13866,303	7480,869	54	6385,434
607 R Ko. OT4	8420,708	4645,746	55	3774,962
607 R Ko. OT5	7905,069	5984,506	76	1920,263
607 R Ko. OT6	10301,054	5348,207	52	4952,847
607 R Pr. OT2	18453,251	4459,272	24	13993,979
607 R Pr. OT3 o.I. rechter Hantelkopf	16178,675	1643,313	10	14535,362
607 R Pr. OT3 o.I. Linker Hantelkopf	22742,863	6495,799	29	16247,064
607 R Pr. OT3 u.I.	43940,752	18663,792	42	25276,96
607 R Pr. OT4 o.I.	45318,923	15918,119	35	29400,803

Schliffnummer	Gesamtumfang in μm	Artefakt in μm	Artefakt in %	Gesamtumfang ohne Artefakt in μm
607 R Pr. OT4 u.l.	22775,256	4587,74	20	18187,516
607 R Pr. OT5 o.l.	13051,608	1738,118	13	11313,49
607 R Pr. OT5 u.l.	9437,814	0	0	9437,814
610 L Pr. OT2	15125,999	6782,234	45	8343,765
610 L Ko. OT3	19704,833	10563,349	54	9141,484
610 L Pr. OT3	16195,739	6285,198	39	9910,541
610 L Ko. OT4	11013,526	0	0	11013,526
610 L Ko. OT5	18873,921	6271,356	33	12602,565
610 L Pr. OT5	14834,12	2481,707	17	12352,413
610 L Ko. OT6	19982,334	3433,705	17	16548,629
610 L Pr. OT6	15051,247	0	0	15051,247
610 r Pr. OT2 m.l.	18916,06	6349,821	34	12266,239
610 r Pr. OT2 o.l.	16520,737	2912,808	18	13607,929
610 r Ko. OT2 u.l.	13783,652	2708,666	20	11074,986
610 r Pr. OT3 m.l.	47795,838	24599,402	51	23196,436
610 r Pr. OT3 o.l.	51020,959	30495,142	60	20525,817
610 r Ko. OT3	24324,437	11382,76	47	12941,677
660 L Ko. OT2	8204,682	665,424	9	7539,258
660 L Ko. OT3	9466,464	1875,966	20	7590,498
660 L Ko. OT4	16735,947	15643,161	94	1092,786
660 L Ko. OT5	16721,823	13249,521	79	3472,302
660 L Pr. OT2	14697,499	0	0	14697,499
660 L Pr. OT3 o.l.	17719,867	10955,469	62	6764,398
660 L Pr. OT5 o.l.	8662,166	2416,361	27	6245,805
660 L Pr. OT5 u.l.	9290,405	3828,642	41	5461,763
660 L Pr. OT6 o.l.	8526,479	5179,838	61	3346,641
660 L Pr. OT6 u.l.	21764,226	10968,155	50	10796,071
660 L Pr. OT7 o.l.	15148,084	9202,533	61	5945,551
660 L Pr. OT7 u.l.	21740,437	5899,25	27	15841,187
660 r Ko. OT2	13212,895	0	0	13212,895
660 r Ko. OT3	19734,156	3736,493	18	15997,663
660 r Ko. OT4	23871,296	10704,769	45	14262,157
660 r Pr. OT3	16716,572	5088,638	30	11627,934
660 r Pr. OT4 o.l.	13632,547	4100,89	30	9531,657
660 r Pr. OT4 u.l.	8309,127	1284,422	15	7024,705
660 r Pr. OT5 o.l.	19667,187	8770,966	45	10896,221
660 r Pr. OT5 u.l.	8265,154	3803,14	46	4462,014
660 r Pr. OT6 o.l.	16336,004	3807,452	23	12528,552

Schliffnummer	Gesamtumfang in μm	Artefakt in μm	Artefakt in %	Gesamtumfang ohne Artefakt in μm
660 r Pr. OT6 u.l.	14807,606	8670,005	59	6137,601
660 r Pr. OT7 o.l.	17482,912	5714,55	33	11768,362
660 r Pr. OT7 u.l.	16566,4	11027,748	67	5538,652

Tabelle 10: Messwerte des Knochen – Implantat – Kontaktes am beurteilbaren Gesamtumfang aller Dünnschliffpräparate in μm

Schliffnummer	KIK in μm	Kortikalis in μm	Mark/ Spongiosa in μm	Osteoid in μm
607 L Ko. OT2	14061,449	3250,791	0	10810,658
607 L Ko. OT3	27798,953	4845,986	8824,024	14128,943
607 L Pr. OT2	9998,358	2407,775	5324,323	2266,26
607 L Pr. OT3 L.l.	13409,327	5490,852	0	7918,475
607 L Pr. OT3 r.l.	11960,799	0	3732,779	8228,02
607 L Pr. OT4 L.l.	6376,967	0	0	6376,967
607 L Pr. OT5 L.l.	6607,477	1059,22	2889,883	2658,374
607 L Pr. OT5 r.l.	5688,944	0	1752,512	3936,432
607 L Pr. OT6 L.l.	9667,402	833,14	0	8834,262
607 L Pr. OT6 r.l.	15385,456	986,669	3975,384	10423,403
607 R Ko. OT2	4072,839	2898,62	0	1174,219
607 R Ko. OT3	6385,434	0	4942,413	1443,021
607 R Ko. OT4	3774,962	502,735	1318,367	1953,86
607 R Ko. OT5	1920,263	0	1534,788	385,775
607 R Ko. OT6	4952,847	1253,096	1542,168	2157,583
607 R Pr. OT2	13993,979	864,664	637,519	12491,796
607 R Pr. OT3 o.l. rechter Hantelkopf	14535,362	2574,762	357,916	11602,684
607 R Pr. OT3 o.l. Linker Hantelkopf	16247,064	3798,267	5786,293	6662,504
607 R Pr. OT3 u.l.	25276,96	4571,7	2982,875	17722,385
607 R Pr. OT4 o.l.	2616,559	6628,693	13074,55	6466,312
607 R Pr. OT4 u.l.	18187,516	1489,644	0	16697,872
607 R Pr. OT5 o.l.	9976,793	5724,628	1882,036	2370,129
607 R Pr. OT5 u.l.	9437,814	8881,049	0	556,765
610 L Pr. OT2	7373,539	1007,902	2490,393	3875,244
610 L Ko. OT3	9141,484	0	1144,893	7996,591

Schliffnummer	KIK in μm	Kortikalis in μm	Mark/ Spongiosa in μm	Osteoid in μm
610 L Pr. OT3	9502,119	464,113	2633,659	6404,347
610 L Ko. OT4	11013,526	0	6097,656	4915,87
610 L Ko. OT5	11907,153	2578,151	4623,569	4705,433
610 L Pr. OT5	12352,413	6357,996	0	5994,417
610 L Ko. OT6	16548,629	2213,435	5711,588	8623,606
610 L Pr. OT6	15051,247	13172,748	0	1870,499
610 r Pr. OT2 m.l.	12266,239	6147,094	0	6119,145
610 r Pr. OT2 o.l.	13607,929	4505,906	2596,765	6505,258
610 r Ko. OT2 u.l.	11074,986	2110,841	0	8964,145
610 r Pr. OT3 m.l.	22644,041	2127,776	14853,387	5662,878
610 r Pr. OT3 o.l.	20127,132	2136,556	12391,579	5595,997
610 r Ko. OT3	12941,677	0	7120,199	5821,478
660 L Ko.OT2	7539,258	0	3073,868	4465,36
660 L Ko. OT3	7590,498	0	0	7590,498
660 L Ko. OT4	1092,786	0	0	1092,786
660 L Ko. OT5	3472,302	0	0	3472,302
660 L Pr. OT2	14697,499	11188,674	0	3548,625
660 L Pr. OT3 o.l.	6764,398	2630,598	1662,151	2471,649
660 L Pr. OT5 o.l.	6245,805	0	6028,29	217,515
660 L Pr. OT5 u.l.	5461,763	0	0	5461,763
660 L Pr. OT6 o.l.	3346,641	0	2687,458	659,183
660 L Pr. OT6 u.l.	10796,071	0	3690,426	7105,645
660 L Pr. OT7 o.l.	5945,551	692,108	3572,488	1680,955
660 L Pr. OT7 u.l.	13487,975	0	7666,168	5821,807
660 r Ko. OT2	12956,252	0	813,558	12142,654
660 r Ko. OT3	15997,663	0	6204,773	9792,89
660 r Ko. OT4	14262,157	0	8421,424	5840,733
660 r Pr. OT3	11627,934	0	8337,266	3290,668
660 r Pr. OT4 o.l.	9531,657	0	3870,241	5661,416
660 r Pr. OT4 u.l.	7024,705	0	4238,603	2786,102
660 r Pr. OT5 o.l.	9896,452	0	9483,358	413,094
660 r Pr. OT5 u.l.	4462,014	0	2081,331	2380,683
660 r Pr. OT6 o.l.	12347,889	0	10511,674	1836,215
660 r Pr. OT6 u.l.	6137,601	0	611,709	5533,892
660 r Pr. OT7 o.l.	11513,663	0	8245,714	3267,947
660 r Pr. OT7 u.l.	5538,652	700,776	2967,623	1870,253

Tabelle 11: Messwerte des Knochen – Implantat – Kontaktes am beurteilbaren Gesamtumfang aller Dünnschliffpräparate in %

Schliffnummer	KIK %	Kortikalis %	Mark/Spongiosa %	Osteoid %
607 L Ko. OT2	85	20	0	65
607 L Ko. OT3	87	15	28	44
607 L Pr. OT2	100	24	53	23
607 L Pr. OT3 L.I.	93	38	0	55
607 L Pr. OT3 r.l.	80	0	25	55
607 L Pr. OT4 L.I.	78	0	0	78
607 L Pr. OT5 L.I.	100	16	44	40
607 L Pr. OT5 r.l.	100	0	31	69
607 L Pr. OT6 L.I.	100	9	0	91
607 L Pr. OT6 r.l.	98	6	25	67
607 R Ko. OT2	100	71	0	29
607 R Ko. OT3	100	0	77	23
607 R Ko. OT4	100	13	35	52
607 R Ko. OT5	100	0	80	20
607 R Ko. OT6	100	25	31	44
607 R Pr. OT2	100	6	5	89
607 R Pr. OT3 o.l. rechter Hantelkopf	100	18	2	80
607 R Pr. OT3 o.l. linker Hantelkopf	100	23	36	41
607 R Pr. OT3 u.l.	100	18	12	70
607 R Pr. OT4 o.l.	89	23	44	22
607 R Pr. OT4 u.l.	100	8	0	92
607 R Pr. OT5 o.l.	88	50	17	21
607 R Pr. OT5 u.l.	100	94	0	6
610 L Pr. OT2	88	12	30	46
610 L Ko. OT3	100	0	13	87
610 L Pr. OT3	96	5	26	65
610 L Ko. OT4	100	0	55	45
610 L Ko. OT5	94	20	37	37
610 L Pr. OT5	100	51	0	49
610 L Ko. OT6	100	14	34	52
610 L Pr. OT6	100	88	0	12
610 r Pr. OT2 m.l.	100	50	0	50
610 r Pr. OT2 o.l.	100	33	19	48
610 r Ko. OT2 u.l.	100	19	0	81

Schliffnummer	KIK %	Kortikalis %	Mark/Spongiosa %	Osteoid %
610 r Pr. OT3 m.l.	98	9	65	24
610 r Pr. OT3 o.l.	98	10	61	27
610 r Ko. OT3	100	0	55	45
660 L Ko. OT2	100	0	41	59
660 L Ko. OT3	100	0	0	100
660 L Ko. OT4	100	0	0	100
660 L Ko. OT5	100	0	0	100
660 L Pr. OT2	100	76	0	24
660 L Pr. OT3 o.l.	100	39	25	36
660 L Pr. OT5 o.l.	100	0	96	4
660 L Pr. OT5 u.l.	100	0	0	100
660 L Pr. OT6 o.l.	100	0	80	20
660 L Pr. OT6 u.l.	100	0	34	66
660 L Pr. OT7o.l.	100	12	60	28
660 L Pr. OT7 u.l.	85	0	48	37
660 r Ko. OT2	98	0	6	92
660 r Ko. OT3	100	0	39	61
660 r Ko. OT4	100	0	59	41
660 r Pr. OT3	100	0	71	29
660 r Pr. OT4 o.l.	100	0	41	59
660 r Pr. OT4 u.l.	100	0	60	40
660 r Pr. OT5 o.l.	91	0	87	4
660 r Pr. OT5 u.l.	100	0	47	53
660 r Pr. OT6 o.l.	98	0	83	15
660 r Pr. OT6 u.l.	100	0	10	90
660 r Pr. OT7 o.l.	98	0	70	28
660 r Pr. OT7 u.l.	100	13	54	33

Tabelle 12: Messwerte des Spaltanteils am beurteilbaren Gesamtumfang aller Dünnschliffpräparate

Schliffnummer	Spaltlänge in μm	Spalt %
607 L Ko. OT2	2469,359	15
607 L Ko. OT3	4159,566	13
607 L Pr. OT2	0	0
607 L Pr. OT3 L.I.	1082,715	7
607 L Pr. OT3 r.I.	2995,739	20
607 L Pr. OT4 L.I.	1853,165	22
607 L Pr. OT5 L.I.	0	0
607 L Pr. OT5 r.I.	0	0
607 L Pr. OT6 L.I.	0	0
607 L Pr. OT6 r.I.	347,333	2
607 R Ko. OT2	0	0
607 R Ko. OT3	0	0
607 R Ko. OT4	0	0
607 R Ko. OT5	0	0
607 R Ko. OT6	0	0
607 R Pr. OT2	0	0
607 R Pr. OT3 o.I. rechter Hantelkopf	0	0
607 R Pr. OT3 o.I. linker Hantelkopf	0	0
607 R Pr. OT3 u.I.	0	0
607 R Pr. OT4 o.I.	3231,244	11
607 R Pr. OT4 u.I.	0	0
607 R Pr. OT5 o.I.	1336,697	12
607 R Pr. OT5 u.I.	0	0
610 L Pr. OT2	970,226	12
610 L Ko. OT3	0	0
610 L Pr. OT3	408,422	4
610 L Ko. OT4	0	0
610 L Ko. OT5	695,412	6
610 L Pr. OT5	0	0
610 L Ko. OT6	0	0
610 L Pr. OT6	0	0
610 r Pr. OT2 m.I.	0	0
610 r Pr. OT2 o.I.	0	0
610 r Ko. OT2 u.I.	0	0

Schliffnummer	Spaltlänge in μm	Spalt %
610 r Pr. OT3 m.l.	552,395	2
610 r Pr. OT3 o.l.	401,685	2
610 r Ko. OT3	0	0
660 L Ko. OT2	0	0
660 L Ko. OT3	0	0
660 L Ko. OT4	0	0
660 L Ko. OT5	0	0
660 L Pr. OT2	0	0
660 L Pr. OT3 o.l.	0	0
660 L Pr. OT5 o.l.	0	0
660 L Pr. OT5 u.l.	0	0
660 L Pr. OT6 o.l.	0	0
660 L Pr. OT6 u.l.	0	0
660 L Pr. OT7 o.l.	0	0
660 L Pr. OT7 u.l.	2353,212	15
660 r Ko. OT2	256,643	2
660 r Ko. OT3	0	0
660 r Ko. OT4	0	0
660 r Pr. OT3	0	0
660 r Pr. OT4 o.l.	0	0
660 r Pr. OT4 u.l.	0	0
660 r Pr. OT5 o.l.	899,769	9
660 r Pr. OT5 u.l.	0	0
660 r Pr. OT6 o.l.	210,663	2
660 r Pr. OT6 u.l.	0	0
660 r Pr. OT7 o.l.	254,699	2
660 r Pr. OT7 u.l.	0	0

7.3 Auswertung

Tabelle 13: Anteil der abhängigen Variablen Knochen – Implantat – Kontakt in %, differenziert nach Beschichtung

Beschichtung	Mittelwert	Standardfehler	95 % Wald – Konfidenzintervall	
			unterer Wert	Oberer Wert
Beschichtung	94,87	1,36	91,89	97,25
Keine Beschichtung	97,31	1,76	93,85	100,75

Tabelle 14: Anteil der abhängigen Variablen Osteoid in %, differenziert nach Beschichtung

Beschichtung	Mittelwert	Standardfehler	95 % Wald – Konfidenzintervall	
			Unterer Wert	Oberer Wert
Beschichtung	45,15	4,04	37,23	53,06
Keine Beschichtung	60,12	7,82	44,78	75,46

Tabelle 15: Anteil der abhängigen Variablen Spalten in %, differenziert nach Beschichtung

Beschichtung	Mittelwert	Standardfehler	95 % Wald - Konfidenzintervall	
			Unterer Wert	Oberer Wert
Beschichtung	2,81	0,77	1,30	4,32
Keine Beschichtung	2,69	1,76	-0,75	6,14

Tabelle 16: Anteil der abhängigen Variablen Artefakte in %, differenziert nach Beschichtung (Kaninchen Nr. 607, Nr. 610, Nr. 660)

Beschichtung	Mittelwert	Standardfehler	95 % Wald – Konfidenzintervall	
			Unterer Wert	Oberer Wert
Beschichtung	34,15	3,60	27,09	41,21
Keine Beschichtung	35,85	2,90	30,17	41,53

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Uwe Gbureck und Frau Dr. Andrea Ewald für die Überlassung meines Dissertationsthemas und die sehr kompetente und immer freundliche Betreuung.

Bedanken möchte ich mich auch bei Maria Aniolek für ihre Unterstützung im Labor, sowie bei Frau Carolin Malsch für ihre Hilfestellung bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse.

Vielen Dank auch an Tobias Schmitz für die Überlassung der Daten bezüglich des Beschichtungsverfahrens.

Ein großes Dankeschön geht auch an Michi. Vielen Dank fürs Korrekturlesen.

Zu guter Letzt vielen Dank an meine Eltern, die immer hinter mir standen und mich unterstützt haben.

Vielen Dank!