

Aus dem Lehrstuhl für
Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr.-Ing. Roger Thull

**Analyse diverser Matrixproteine im Einheilgewebe um medizinische
Implantatwerkstoffe mittels Konfokaler Laserscanning Mikroskopie**

-

Eine tierexperimentelle Untersuchung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Dr. med. Stephan Eulert

aus Paris

Würzburg, Januar 2008

Referent: Prof. Dr.-Ing. R. Thull
Korreferent: Prof. Dr. Dr. A. Kübler
Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 29. September 2008

Der Promovend ist Zahnarzt.

**Meiner bezaubernden Frau Alexandra
in Liebe und Dankbarkeit**

1	Einleitung.....	1
1.1	Einführung	1
1.1.1	Historischer Rückblick.....	1
1.1.2	Stand der Forschung	2
1.1.3	Konfokale Laserscanning Mikroskopie (CLSM).....	4
1.2	Biologische Grundlagen.....	6
1.2.1	Extrazellulärmatrix (EZM)	6
1.2.2	Kollagen.....	7
1.2.3	Fibronectin.....	14
1.3	Physikalisch-werkstofftechnische Grundlagen.....	18
1.3.1	Implantate aus Titan.....	18
1.3.2	Implantate aus Stahl.....	21
1.4	Problemstellung und Zielsetzung.....	24
2	Material und Methoden.....	26
2.1	Implantate.....	26
2.1.1	Rasterelektronenmikroskopie der Implantatoberflächen.....	26
2.1.2	Implantatkonditionierung.....	27
2.1.3	Implantatvermessung	29
2.1.4	Implantatvorbereitung zur Operation.....	29
2.2	Tierexperimentelle Untersuchung	30
2.2.1	Versuchstiere	30
2.2.2	Gruppeneinteilung	30
2.2.3	Versuchsdauer.....	31
2.2.4	Tierhaltung und Fütterung im Experiment.....	31
2.2.5	Entwicklung der Versuchstiere	31
2.2.6	OP-Vorbereitung der Versuchstiere.....	31
2.2.7	Narkose	32
2.2.8	Implantation	32
2.2.9	Opferung	34
2.2.10	Röntgenkontrolle und Probenentnahme	34
2.3	Histologie	35
2.3.1	Vorbereitung der Präparate	35
2.3.2	Immunperoxidase- und Mehrfachfärbungen zur Beurteilung der Kapselqualität mittels konventioneller Mikroskopie	36
2.3.3	Immunfluoreszenzfärbungen zur Erfassung von Kapseldicke und Fluoreszenzprofil mittels Konfokaler Laserscanning Mikroskopie	38
2.3.4	Konfokale Laserscanning Mikroskopie (CLSM).....	39

2.4	Datenerfassung, statistische Auswertung und Darstellung	40
2.4.1	Materialvergleich	42
2.4.2	Lokalisationsvergleich	42
2.4.3	Kapseldicke	42
2.4.4	Fluoreszenzprofile der Matrixproteine	43
2.4.5	Signifikanz-Testung	45
3	Ergebnisse	47
3.1	Implantate	47
3.1.1	Implantatdaten	47
3.2	Tierentwicklung	47
3.3	Röntgenkontrolle und Probenentnahme	49
3.4	Histologie	52
3.4.1	Kapselqualität	52
3.4.2	Kapseldicke	57
3.4.3	Fluoreszenzprofile der Matrixproteine	67
4	Diskussion	87
5	Zusammenfassung	102
6	Literaturverzeichnis	104
7	Anhang	122
7.1	Ätzlösungen für Implantate	122
7.2	Färbungen	122
7.3	Daten-Tabellen	128
7.4	SPSS-Programmierung	140
	Danksagung	151
	Lebenslauf	153

1 Einleitung

1.1 Einführung

Als Biomaterial bezeichnet die European Society of Biomaterials ein nicht lebendes Material, welches, in medizinischer Anwendung genutzt, mit einem biologischen System in Interaktion tritt (WILLIAMS 1987). Für das biologische System des menschlichen Körpers ergibt sich, dass ein Biomaterial nach dessen Implantation spezifische Reaktionen bezüglich Einheilung und Gewebeverträglichkeit hervorruft und folglich seine Biokompatibilität definiert (WILLIAMS 1982). Die Kompatibilität des Biomaterials hängt von der chemischen Zusammensetzung und den physikalischen Eigenschaften des Werkstoffes sowie dessen mechanischen und elektrochemischen Oberflächeneigenschaften ab (THULL 1994, THULL 2003). Die Wechselwirkungen zwischen Biomaterial und menschlichem Körper vollziehen sich in dem als Interface bezeichneten Kontaktraum von Implantatoberfläche und angrenzenden Gewebestrukturen (KASEMO und LAUSMAA 1986; IVARSSON und LUNDSTRÖM 1986; THULL 1994, THULL 2002, THULL 2005). Diese angrenzenden, periimplantären Gewebestrukturen sind im Wesentlichen der Extrazellulärmatrix (EZM) zuzuordnen. Die Biokompatibilität eines Implantates hängt infolgedessen auch von der Interaktion zwischen Implantatoberfläche und EZM ab. Die Erforschung der Reaktionsabläufe und Interaktionen im Interface und die hieraus zu gewinnenden Erkenntnisse stellen die Voraussetzung zur Entwicklung moderner Biomaterialien und Implantatoberflächen dar (THULL 2005).

1.1.1 Historischer Rückblick

VROMAN untersuchte 1964 die Wechselwirkung von Blutplasma-Proteinen und Implantatoberflächen. Er konnte zeigen, dass die Proteinadsorption an hydrophilen, glasähnlichen Oberflächen in einer charakteristischen Reihenfolge abläuft. Beginnend mit Albumin, welches die höchste Konzentration im Plasma aufweist, fand er im chronologischen Verlauf Adsorptionsmaxima für IgG, Fibronectin, Fibrinogen und zuletzt hochmolekularem Kininogen (HMWK, high molecular weight kininogen),

welches nur in sehr geringen Mengen im Blutplasma enthalten ist. Diese Ergebnisse legten den Grundstein für weitere Untersuchungen zur Proteinadsorption an künstlichen Oberflächen (BRASH 1987, CUYPERS et al. 1987, ELWING et al. 1987, SLACK et al. 1987).

Die ersten reproduzierbaren mikroskopischen Untersuchungen zum Einheilungsverhalten von Implantaten führten LOECHLER und MÜLLER 1952 durch. Sie stellten fest, dass das periimplantäre Lagergewebe und die umgebende Gingiva eines transgingival in den Kiefer eingebrachten subperiostalen Vitalliumimplantates grundsätzlich parodontalem Gewebe ähneln.

BODINE und MOHAMMED (1970) untersuchten histologisch ein subperiostal eingebrachtes Implantat nach 12 Jahren Funktionsdauer. Sie fanden in dem von Epithel begrenzten Saum um das Implantat Plasmazellen und Lymphozyten und beschrieben im angrenzenden Lagergewebe flache, komprimierte Fasern und Zellen mit länglichen Zellkernen. Diese Gewebeformation bezeichneten sie als „typical implant connective tissue“.

JAMES (1972 und 1973) erbrachte einen indirekten Beweis für die Wechselwirkung zwischen periimplantärem Einheilgewebe und Implantatoberfläche. Er wies 21 Tage nach Insertion eines Vitalliumimplantates bei Hunden im Implantatsulkus Mukopolysaccharide als Andeutung eines epithelialen Attachments nach.

GOULD et al. (1981) ließen erstmals in vitro Epithelzellen aus oralen Epithelien auf Titanfilmen wachsen und konnten mittels Licht- und Elektronenmikroskopie Attachments zwischen Epithelzellen und der metallischen Titanoberfläche nachweisen.

1.1.2 Stand der Forschung

Die Fragestellungen und Zielsetzungen aktueller Studien sind vielfältig. Neben immunologisch-molekularbiologischen und physikalisch-werkstofftechnischen Ansätzen konzentrieren sich gegenwärtige Untersuchungen unter anderem auf die strukturelle Darstellung des Interface mit periimplantärem Einheilgewebe.

WOODWARD und SALTHOUSE (1986) postulierten, dass Implantate mit hoher Biokompatibilität dünne Kapselbildungen hervorrufen und weniger biokompatible Materialien von einer dickeren entzündlichen Gewebekapsel umschlossen werden.

VON RECUM et al. (1993) nahmen an, dass eine dünnere Kapsel, vergleichbar zu gesundem und stabilem Bindegewebe, mehr Kollagen Typ I enthält, wohingegen dickere Kapseln, kennzeichnend für eine verstärkte Granulationsbildung, mehr Kollagen Typ III, enthalten. Sie belegten ihre Auffassung mit einer tierexperimentellen Untersuchung des Interface verschiedener Biomaterialien. Nur der Werkstoff Titan wies, in Ratten subkutan implantiert, einen deutlich höheren Anteil an Kollagen Typ I gegenüber Typ III in der umgebenden Kapsel auf. Damit widersprachen sie HERING et al. (1983), die auch um Stahlimplantate Kollagen vom Typ I, III und V nachgewiesen hatten. Dies verstanden sie als Ausdruck der hohen Biokompatibilität des Werkstoffes Titan. In einer Folgeuntersuchung von SHANNON et al. (1997) mit Reintitan und rostfreiem Stahl (316L) konnten diese Ergebnisse allerdings nicht bestätigt werden. Die Einheilkapseln um Titanimplantate waren hier dicker als um rostfreien Stahl.

BERGER-GORBET et al. (1996) verglichen die Biokompatibilität von Nickel-Titan mit Reintitan und rostfreiem Stahl (316L) nach intraossärer Implantation. Der immunhistochemische Nachweis einer gesteigerten Anreicherung von Osteonektin und Kollagen Typ III wurde, entgegen der subkutanen Ergebnisse, von VON RECUM (1993) als positives Gradmaß der Osteoneogenese und Biokompatibilität festgesetzt.

Die mikroskopisch-immunhistochemische Untersuchungen erfolgten bisher mittels konventioneller Mikroskopie oder Rasterelektronenmikroskopie. Zur weiterführenden mikroskopischen Aufarbeitung dieser Fragestellungen kann jedoch auch die CLSM herangezogen werden, die in aktueller Vergangenheit zunehmend an Bedeutung gewonnen hat. Besondere Vorteile bietet diese digitale und 3-dimensionale Mikroskopiertechnik durch die Möglichkeit der räumlichen Darstellung von Gewebearchitekturen (BIRCH et al. 1997, CAMPAGNOLA und LOEW 2003, SAHAR et al. 2005). Darüber hinaus wurde sie auch bei vielzähligen molekularbiologisch-implantologischen Fragestellungen erfolgreich eingesetzt (SHAH et al. 1999, BASCHONG 2004, JONES et al. 2005, SCHÜPBACH et al. 2005 und WOLFRAM et al. 2005).

1.1.3 Konfokale Laserscanning Mikroskopie (CLSM)

Die ersten histopathologischen Untersuchungen mittels Konfokalmikroskop Anfang der 50'er Jahre scheiterten an insuffizienten Lichtquellen. SHEPPARD und WILSON (1978) sowie BRAKENHOFF et al. (1978) gelang es mit stärkeren Lichtquellen erstmals, durch nacheinander angeordnete Objektive mit hoher numerischer Apertur eine extrem hohe Auflösung im Transmissionsstrahlengang zu erzielen. Auf diesen Grundlagen aufbauend, beschrieben WIJNAENDTS VAN RESANDT et al. 1985 erstmals die Möglichkeit des optischen Schneidens mit Abbildungen entlang der optischen Achse (xz-Ebene) an fluoreszierenden Objekten. Somit war die Technik der Konfokalmikroskopie soweit entwickelt, dass mit ausgereifter Optik und sensiblen Detektoren sowie neuartigen Fluoreszenzmarkern die ersten Strahlscanner mit integriertem Computersystem zur Kontrolle der Scanmechanik bei hohen Bildraten kommerziell verfügbar wurden. Heute ermöglicht die CLSM berührungslos und weitgehend zerstörungsfrei eine sekundenschnelle Berechnung, Vermessung und räumliche Charakterisierung beliebiger Ansichten eines Objektes über eine reale 3-dimensionale Auflösung in allen Ebenen des Raumes.

Bei der konventionellen mikroskopischen Darstellung eines Objektes ergibt sich besonders in der Fluoreszenzmikroskopie aufgrund des hohen Streulichtanteils das Problem einzelne Ebenen des Präparates scharf zu trennen und die vielen sich überlagernden Strukturelemente gegeneinander aufzulösen. Die Technik der CLSM basiert auf dem Prinzip der Konfokalität. Hierbei werden durch eine vorgegebene optische Anordnung so genannter „Pinholes“ nur Strahlen der einfokussierten Brennebene dargestellt. Dies ermöglichen spezielle Blenden, die je eine Punklichtquelle und einen Punktlichtdetektor einander zuordnen. Hierdurch wird nicht das ganze Objekt beleuchtet und abgebildet, sondern jeweils nur ein Punkt. Die Detektionsblende hält Strahlen, die von außerhalb des Fokus kommen zurück. Somit werden Strukturen die außerhalb des Fokus liegen in ihrer Abbildung unterdrückt und das Streulicht, welches in der Darstellung fluoreszierender Präparate zu einem Schleier führt, ausgeblendet.

Um ein mehrdimensionales Bild des untersuchten Objektes zu erhalten, muss eine relative Bewegung zwischen dem Lichtpunkt und dem Objekt stattfinden. Dies wird über das computergesteuerte Scanverfahren ermöglicht, welches das Präparat nacheinander in den 3 Raumrichtungen abtastet und so einen 3-dimensionalen Datensatz erzeugt. Hierbei können die Schnitte für den Bildstapel in der xy- und der xz-Ebene aufgenommen werden. Die Datensätze ähneln hierbei denen der Computer- und der Magnetresonanztomographie.

Als Lichtquelle dient ein Laser, von dem bestimmte Anregungswellenlängen ausgewählt werden und über ein Glasfasersystem in das Scanmodul geleitet werden. Im Scanmodul befindet sich die konfokale „Pinholeanordnung“ und der Strahlteiler, der das Anregungslicht reflektiert und das Fluoreszenzlicht zum Detektor weiterleitet. Durch einen beweglichen Spiegel wird das Anregungslicht rasterförmig über das zu mikroskopierende Objekt bewegt um das gewünschte mehrdimensionale Bild zu erhalten. Die abgetasteten Werte werden in den Datenverarbeitungscomputer überführt, der sie in ein Bild überträgt.

Für quantitative Auswertungen mittels Fluoreszenzmikroskopie spielt die Beleuchtungsintensität eine entscheidende Rolle. Durch stärkere Laser sind theoretisch sehr hohe Leuchtdichten möglich, die aber so hoch sein können, dass es am Objekt zu Sättigungseffekten kommt und damit die Differenzierungsmöglichkeit und Auflösung reduziert wird. Daher sind bei der Fluoreszenzmikroskopie die Bildraten oftmals auf weniger als ein Bild pro Sekunde begrenzt. Die Bilder werden typischerweise mit variablem Bildraster bis zu 1042 x 1024 Punkten aufgezeichnet. Die Verarbeitung der Bilddaten am Computer ermöglicht es, wichtige Parameter über die Ausdehnung, das Volumen und Nachbarschaftsbeziehungen bestimmter Strukturen zu erhalten.

1.2 Biologische Grundlagen

1.2.1 Extrazellulärmatrix (EZM)

Bereits 1978 postulierten BORNSTEIN et al., dass die EZM, über die zuvor angenommene rein amorphe Stützfunktion hinaus, proteinvermittelte Interaktionen ausüben kann. Mittlerweile verfügen wir über profunde Einblicke in die komplexe Architektur sowie die mannigfaltigen Aufgaben und Fähigkeiten der EZM. Es besteht eine konstante, wechselseitige Beeinflussung zwischen Zellen und EZM (HAY 1981 und 1991). Die EZM ist somit nicht statisch, sondern befindet sich auf molekularer Ebene in einem fortwährenden Fließgleichgewicht.

Neben den Strukturproteinen, allen voran Kollagen, sind die Adhäsionsmatrixproteine, wie beispielsweise Fibronectin, ebenso Hauptbestandteile der EZM wie auch Proteoglykane und Glykosaminoglykane. Wesentlicher Vertreter der Glykosaminoglykane ist die Hyaluronsäure, die neben Ihrer Funktion als Strukturelement der Grundsubstanz auch als Botenstoff und Adhäsionspromotor fungiert (ZAIDEL-BAR et al. 2004). Auf diesen Erkenntnissen aufbauend wurden zur Adhäsionsverbesserung und Modifikation von Biomaterialoberflächen diese mit Hyaluronsäure beschichtet (MORRA 2005). Die Anbindung solcher und weiterer Adhäsionspromotoren über extrazelluläre Brückenmoleküle an oberflächlich gelegene Zellrezeptoren reguliert beispielsweise auch die Expression von Genen in den Zellen. Zelladhäsion, Migration, Proliferation sowie Aufbau, Umbau und Abbau von Gewebe resultieren somit aus deren wechselseitiger Beeinflussung. Die verschiedenen Komponenten der EZM können dabei von Zellen synthetisiert und sezerniert werden und diese Komponenten entweder extrazellulär oder auch nach Endozytose intrazellulär wieder abgebaut werden (ALBERTS et al. 2002).

Der Abbau und Umbau der EZM erfolgt vornehmlich durch Matrix Metalloproteinasen und deren korrespondierenden Inhibitoren "Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases". Sie hemmen die Aktivität der Matrix Metalloproteinasen durch spezifische Bindung an deren katalytische Zentren (ALBERTS et al. 2002).

Eine Vielzahl von Zytokinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren treten hier in Regulatorfunktion in Aktion. IL-1 β , IL-6, Tumornecrosisfactor- α (TNF- α), Epidermal Growth Factor (EGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Transforming Growth Factor- β (TGF- β) und basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) sind hier von

entscheidender Bedeutung (GALIS et al. 1995, SIWIK et al. 2000, FEINBERG et al. 2000, UZUI et al. 2002).

Nach heutiger Definition stellt die EZM die Gesamtheit aller Makromoleküle dar, die sich außerhalb der Zellen befinden. Sie dient nicht nur als Verbindungselement der darin enthaltenen Zellen sondern vielmehr als übergreifendes Kommunikationselement (ALBERTS et al. 2002). Neben physikalischen Funktionen, wie Wasserspeicher, Formgebung, Elastizität, Zugfestigkeit und Stabilität von Geweben und Organen lassen sich ebenso biochemische und molekularbiologische Funktionen wie Zytokinreservoir, Signaltransduktion und Beeinflussung von Wundheilungsprozessen von körpereigenem und körperfremden Gewebe definieren (HODDE und JOHNSON 2007).

1.2.2 Kollagen

Kollagen gehört zu den Strukturproteinen der EZM und ist das im Körper am meisten verbreitete Protein. Es repräsentiert ca. 30% aller Proteine im menschlichen, erwachsenen Organismus. Kollagen ist als fibrilläre Interzellulärsubstanz in Kollagenfasern, Retikulinfasern und elastischen Fasernetzen zu finden und ist im Wesentlichen für die Stützfunktion im Gewebe verantwortlich.

Weitere Aufgaben der Kollagene sind chemotaktisch vermittelte Einflüsse bei der Zelldifferenzierung, Antigenpräsentation, immunologischen Abwehrreaktionen und als Reparaturbestandteil bei den unterschiedlichsten pathologischen Gewebeprozessen (LINSENMAYER 1991).

1.2.2.1 Molekularstruktur und Kollagentypen

Der Hauptbestandteil des Kollagens ist das Tropokollagenmolekül. Es besteht aus drei rechtsläufig zur Tripelhelix umwundenen Polypeptidketten, α - Ketten genannt. Diese α - Ketten sind aus ca. 1000 Aminosäuren zusammengesetzt, die wiederum zu einer linkshändigen Helix in sich verdreht und miteinander über Wasserstoffbrückenbindungen verbunden sind. Die Wasserstoffbrückenbindungen können durch thermale oder

chemische Reize denaturiert und gelöst werden. Hierdurch kommt es zu einem Auseinanderfallen des Moleküls.

Die Enden des Tropokollagenmoleküls sind nicht spiralisiert und tragen eine N-terminale und eine C-terminale Gruppe, die als Telopeptide bezeichnet werden. Es gibt ein N-terminales Ende und ein C-terminales Ende. Das aus den spiralig verbundenen Polypeptidketten aggregierte Tropokollagenmolekül hat eine Länge von 300 nm bei einem Durchmesser von 1,5 nm und einem Molekulargewicht von ca. 140000 Dalton (GAY und MILLER 1978).

Zurzeit sind 27 verschiedene Proteine aus der Familie der Kollagene bekannt (Kollagen Typ I - Kollagen XXVII). Die jeweiligen Kollagentypen werden durch den individuell unterschiedlichen Zusammenschluss der drei Polypeptidketten zur Tripelhelix und der Assoziation mit anderen Komponenten bestimmt.

Dabei ist die Nomenklatur in einem Punkt missverständlich: Nur die Fasern aus Kollagen Typ I bezeichnet man als Kollagenfasern; andere Strukturen, z.B. retikuläre Fasern, sind zwar auch aus einem Protein aus der Familie der Kollagene aufgebaut (in diesem Beispiel Kollagen Typ III), werden aber nicht als Kollagenfasern bezeichnet. Kollagen Typ IV bildet zusammen mit den Lamininen, Entactin und dem Proteoglykan Perlecan Basalmembranen.

Kollagenfasern verleihen dem Gewebe Zugfestigkeit. Die bis zu 2-20 µm dicken Fasern bestehen aus Kollagenfibrillen (Durchmesser bis 130 nm), die wiederum aus Molekülen des Kollagen Typ I aufgebaut sind.

Die Kollagenfasern sind in ihrer Längsrichtung zugfest und lassen sich so gut wie nicht dehnen. Jedes entsprechend auf Zug beanspruchte Bindegewebe enthält Kollagenfasern, die in Richtung der Belastung ausgerichtet sind. Ist ein Gewebe in jede Richtung beansprucht, liegen die Fasern geflechtartig vor (Dermis, Sklera, Kornea, Muskelfaszien, Dura mater, Stratum fibrosum der Gelenkkapseln), bei Beanspruchung in nur eine

Richtung sind die Fasern parallel ausgerichtet (besonders Sehnen, Bänder). Auch im Knochen und im Dentin (Zahnbein) sorgen Kollagenfasern für die Zugfestigkeit.

Retikuläre Fasern bestehen aus dünnen Bündeln (1 μm) von Fibrillen des Kollagen Typ III, das dünnere Fibrillen als das Kollagen Typ I bildet. Diese Bündel bilden mikroskopische Netze oder Gitter. Retikuläre Fasern sind weit verbreitet, sie bilden Netze unter vielen Basallaminae, so um alle Kapillaren, Muskelfasern, periphere Nervenfasern, Fettzellen und jede Zelle der glatten Muskulatur.

Elastische Fasern besitzen eine außerordentliche Eigenschaft, nämlich reversible Dehnbarkeit. Sie sind aus dünnen Fibrillen des Proteins Fibrillin und der daran ausgerichteten amorphen Substanz aus dem Protein Elastin. Eine Faser hat ungefähr einen Durchmesser von 2 μm . Elastische Fasern sind immer mit Kollagenfasern vergesellschaftet, um nicht selbst überdehnt zu werden und umgekehrt um die Kollagenfasern wieder in die ursprüngliche Lage zurückzubringen. Speziell kommen elastische Fasern im elastischen Bindegewebe und im elastischen Knorpel vor, aber auch je nach Grad der benötigten Elastizität in vielen anderen Geweben.

Die fibrillären Kollagene werden über eine Vorform des Kollagenmoleküls synthetisiert, das so genannte Prokollagen. Dieses unterscheidet sich vom Tropokollagen durch Überlängen an den α - Ketten (Propeptide), die jeweils beiden Enden der Ketten anhängen und dadurch auch das höhere Molekulargewicht des Prokollagens von ca. 200000 Dalton bedingen (GAY und MILLER 1978). So hängt dem Molekül zusätzlich zur zentralen Tripelhelixstruktur das N-terminale Propeptid und das C-terminale Propeptid an. Prokollagen in dieser Form ist noch löslich und wird erst im Extrazellularraum durch Abspaltung der Propeptide in das unlösliche Tropokollagen umgewandelt.

Kollagen wird hauptsächlich aus den Aminosäuren Glycin (33,5 %), Prolin (12 %) und Hydroxyprolin (10 %) zusammengesetzt. Hydroxyprolin stabilisiert die Tripelhelixstruktur und ist ein einzigartiges Charakteristikum für das Kollagenmolekül (ROSSERT

und CROMBRUGGHE 1996). Eine weitere, für Kollagen kennzeichnende Aminosäure ist Hydroxylysin. Der Aminosäure Glycin kommt im Aufbau der α -Kette eine zentrale Bedeutung zu. Sie muss an jeder dritten Position der Aminosäuresequenz vorhanden sein und ermöglicht die eng anliegende rechtsläufige Umschlingung der α -Ketten zur Tripelhelixstruktur. Je nach Aminosäuresequenz können verschiedene α -Ketten ($\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette) vorliegen.

Die Typen I, II, III, V und XI gehören zu den fibrillären Kollagenen. Sie bestehen alle aus einer langen Tripelhelix, die sich in der funktionell benötigten Struktur anordnet. Ihnen gemein ist ein sehr großes Elastizitätsmodul. Hierdurch sind sie, im Gegensatz zu den elastischen Fasern, kaum dehnbar. Die fibrillären Kollagene sind im faserigen Bindegewebe sowie in Knochen und Knorpel, in inneren Organen und Blutgefäßen zu finden und bilden hier das Gerüstwerk zur Stützfunktion für das Gewebe (ROSSERT und CROMBRUGGHE 1996).

Kollagen Typ I macht 90% allen vorhandenen Kollagens aus und ist als Hauptbestandteil in Knochen, Dentin, Sehnen, Bändern, Faszien, Haut sowie in vielen Organkapseln zu finden. Kollagen Typ I ist aus den zwei verschiedenen Polypeptidketten $\alpha 1(I)$ und $\alpha 2(I)$ zusammengesetzt (BUCHER und WARTENBERG 1989). Die organische Knochenmatrix besteht zu über 90% aus kollagenen Proteinen, wobei Kollagen Typ I den Hauptbestandteil bildet. Des Weiteren können geringe Mengen an Kollagen Typ V und minimale Anteile an Kollagen Typ III gefunden werden (TERMINE 1985). Im Rahmen der Knochenheilung verändern sich der Kollagengehalt und die Verteilung der einzelnen Kollagentypen (GAY und MILLER 1978). Kollagen Typ III tritt meist in Verbindung mit Kollagen Typ I auf, jedoch nicht in mineralisiertem Gewebe wie beispielsweise Knochen, Dentin oder Sehnen (MILLER 1988). Kollagen Typ III besteht aus drei identischen $\alpha 1(I)$ -Peptidketten.

Beide Kollagen Typen unterscheiden sich in Ihrer N-terminalen Sequenz, da das pro- $\alpha 2(I)$ -Molekül des Kollagen Typ I um circa 90 Sequenzen kürzer ist als das pro- $\alpha 1(I)$ -

Molekül. Weiterhin weist Kollagen Typ III vermehrt Glykosylierungen und Disulfidbrückenbindungen gegenüber Kollagen Typ I auf (MILLER 1988).

1.2.2.2 Biosynthese des Kollagens

NIMNI et al. (1988) unterteilen die Biosynthese des Kollagens in zehn Zwischenschritte. Der erste Schritt der Kollagenbiosynthese ist die Bildung der mRNA (Transkription) für die verschiedenen Prokollagen- α - Ketten. Die Translation der mRNA erfolgt nach ihrer Abgabe in das Zellplasma an den Ribosomen des rauhen endoplasmatischen Retikulums. Nach Synthese der Polypeptidkette werden die Aminosäuren Prolin und Lysin hydroxyliert und im Golgi-Apparat die Kohlenhydrate Galactose und Glycosylgalactose an das C-terminale Ende angehängt. Die verschiedenen α - Ketten zeigen unterschiedliche Kohlenhydratanteile. Im weiteren Verlauf wird das N-terminale Propeptid der α - Kette enzymatisch abgespalten und die C-terminalen Propeptide von drei α - Ketten in der Initialphase der Helixbildung über Disulfidbrücken verbunden. Dem C-terminalen Propeptid gilt somit eine entscheidende Rolle in der Anordnung der α - Ketten zur Ausbildung der Tripelhelixstruktur (GAY und MILLER 1978). Anschließend erfolgt die Faltung der α - Ketten zur Tripelhelix des Prokollagenmoleküls. Die Prokollagenmoleküle werden hiernach mittels Exozytose in den Extrazellularraum abgegeben. Im Extrazellularraum wird die noch anhängende Überlänge des C-terminalen Peptids durch eine spezielle Prokollagenpeptidase abgespalten und die Umwandlung des Prokollagenmoleküls in das unlösliche und zur Aggregation befähigte Tropokollagenmolekül vollzogen.

Die Kollagenfaserbildung findet in der extrazellulären Flüssigkeit nahe der Zelloberfläche statt. Die Tropokollagenmoleküle aggregieren zunächst zu Primärfilamenten, die aus fünf gebündelten, jeweils um $\frac{1}{4}$ ihrer Länge gegeneinander versetzten, parallel angeordneten Einheiten bestehen. Diese Primärfilamente lagern sich dann parallel aneinander und bilden Mikrofibrillen, die sich jeweils Ende an Ende verbinden, so dass die Kollagenfibrille an Länge gewinnt. Jede einzelne Fibrille kann unterschiedliche Kollagentypen enthalten (MCDONALD 1988). Die hohe Zugfestigkeit der Kollagenfibrille entsteht durch

elektrostatische Kräfte und quervernetzte kovalente Bindungen, die die Moleküle untereinander verknüpfen.

Die Kollagenbiosynthese wird durch verschiedenste Wachstumsfaktoren und Zytokine reguliert, wie beispielsweise durch TGF- β / Transforming Growth Factor- β (NODA und RODAN 1989).

1.2.2.3 Aufgabe des Kollagens bei der Geweberegeneration

Der Wundheilungsprozess als sehr komplexer Vorgang beginnt unverzüglich nach der Verletzung des Gewebes mit der Aktivierung der Blutgerinnungskaskade. Es folgt ein verstärktes Auftreten von Entzündungszellen und Fibroblasten. Die Fibroblasten bilden zunächst ein feines retikuläres Netzwerk, welches vorwiegend aus Fibrillen vom Typ III besteht. Die anhaltende Fibroblastenaktivierung dient vornehmlich der Synthese von Typ I Kollagenmolekülen. Durch Ab- und Umbauvorgänge werden retikuläre Fasernetze von zunehmend größeren, Kollagen Typ I reichen Fasern durchsetzt (HUNT und VAN WINKLE 1979). Das letztendlich entstehende, zellarme aber faserreiche Reparationsgewebe enthält somit zu wesentlichen Anteilen Kollagenfasern vom Typ I. Die hier geschilderten Wundheilungsabläufe entsprechen den physiologischen Reparationsprozessen in Haut und Weichgewebe (GAY und MILLER 1978). Die Verteilung der Kollagene ändert sich demzufolge über den zeitlichen Verlauf der Wundheilung (CLORE et al. 1979 und HAYAKAWA et al. 1979). Typ I und Typ III sind hierbei die Hauptkollagentypen, die am Wundheilungsprozess beteiligt sind (BAILEY et al. 1975). Bei Beginn der Wundheilung ist der Anteil von Kollagen Typ III am höchsten und wird dann nach und nach durch eine erhöhte Kollagen Typ I Produktion von diesem ersetzt (BAILEY et al. 1975). Kollagen Typ III lässt sich in nahezu jedem Regenerationsgewebe, so auch subkutan und intramuskulär, im Überfluss nachweisen (MULTIMAKI et al. 1987).

Die essentiellen Aufgaben des Kollagens bei der Regeneration von Weichgewebe sind die Bereitstellung und Organisation des vorübergehenden und definitiven Ersatzgewebes.

Dieses Ersatzgewebe, als Narbe bezeichnet, ermöglicht die Restitutio ad partem mit weitestgehender Gewährleistung einer wieder hergestellten Gewebefunktion. Hierbei obliegt dem Kollagen wesentlich die Koordination zellulärer und struktureller Faktoren. Bei Fremdkörperimplantation in Weichgewebe besteht die Aufgabe der verschiedenen Kollagen Typen in der Bereitstellung eines Einheilungsgewebes, welches den eingebrachten Fremdkörper ummantelt und somit einen biologischen Übergang zum Empfängergewebe schafft.

Die Wundheilung nach Traumatisierung von Knochengewebe beginnt mit der Resorption des primären Blutkoagulums durch Phagozyten. Die nachstehende Proliferation von Zellen und Kapillaren aus Periost und Knochenmark ermöglicht die Bildung eines lockeren Bindegewebes, welches Fasern aus Typ I und Typ III Kollagenmolekülen enthält. Die Kollagensynthese beginnt unverzüglich nach Auftreten des Defektes, wobei die Syntheserate mit der Menge an Bindegewebe korreliert (SHIEH et al. 1985). Mit zunehmender Organisation des einwachsenden Bindegewebes in die verschiedenen Kallusformen mit nachfolgender Mineralisierung und knöcherner Durchbauung entlang der kollagenen Leitstrukturen erhöht sich der Anteil an Kollagen Typ I. Kollagen Typ III ist nach Ausheilung der Knochenwunde, wie auch in gesundem Knochengewebe, kaum noch nachweisbar (SHIEH et al. 1985). Bei verzögerter Heilung oder Pseudoarthrosenbildung jedoch ist Kollagen Typ III in deutlich höherem Maße nachzuweisen (ANDERSON et al. 1986).

Die grundlegenden Aufgaben des Kollagens bei der Regeneration von Knochengewebe sind die Bereitstellung und Organisation eines lediglich vorübergehenden Ersatzgewebes. Dieses Ersatzgewebe, Kallus genannt, ermöglicht als Leitstruktur für zelluläre Regenerationsfaktoren, wie Osteoblasten, die knöcherne Restitutio ad integrum ohne definitives Ersatz- oder Narbengewebe. Bei Fremdkörperimplantation in Knochengewebe besteht die Aufgabe der verschiedenen Kollagen Typen in der Bereitstellung eines Einheilungsgewebes, welches den eingebrachten Fremdkörper ummantelt und somit einen biologischen Übergang zum Empfängergewebe schafft. Je nach Biokompatibilität des Fremdkörpers und Heilungsverlauf kann, analog zur Knochenheilung ohne Fremdkörper,

im Idealfall eine Kontaktheilung in Form der Osseointegration ohne Interposition von Ersatzgewebe eintreten.

Unter Zusammenschau der Literatur kann davon ausgegangen werden, dass das Auftreten von Kollagen Typ I als Langzeitkollagen besonders in Verbindung mit dünnem Einheilgewebe ein Zeichen höherer Biokompatibilität eines eingebrachten Werkstoffes darstellt. Ein vermehrtes Auftreten von Kollagen Typ III hingegen kann als chronisches Reizindiz bei geringerer Biokompatibilität verstanden werden. Folglich können die grundlegenden Abläufe der Reparationsprozesse von Weich- und Knorpelgewebe bezüglich des Kollagenauftretens durchaus miteinander verglichen werden (HAYAKAWA et al. 1979 und 1982, KURITA et al. 1985).

1.2.3 Fibronectin

Fibronectin ist ein Glykoprotein und neben Proteoglykanen wesentlicher Bestandteil der adhäsiven interstrukturellen Grundsubstanz der EZM. Glykoproteine allgemein sind im Körper weit verbreitet und kommen als Bausteine biologischer Membranen, als Enzyme und als Hormone vor. Fibronectin ermöglicht die Verbindung zwischen Zellen, Strukturelementen der EZM, körpereigenen Proteinen, Fremdkörpern und auch Mikroorganismen wie Bakterien (ALBERTS et al. 2002). Es spielt infolgedessen eine entscheidende Rolle in der Wundheilung, beim Einheilungsprozess von Fremdkörpern und bei Infektionsgeschehen (HAY 1991).

1.2.3.1 Molekularstruktur und Fibronectintypen

Das Fibronectinmolekül ist in seiner häufigsten Form als Dimer aus zwei Polypeptidketten zusammengesetzt, die über Disulfidbrückenbindungen an ihrem C-terminalen Ende verbunden sind. Die Polypeptidketten bestehen aus drei Grundtypen sich exakt wiederholender Untereinheiten. Diese Untereinheiten sind der Grundbaustein für die Bildung verschiedener Domänen im Fibronectinmolekül. Typ I - Einheiten bilden

Domänen, die an Heparin, Fibrin oder Kollagen binden (MOSHER 1989). Typ II - Einheiten bilden die Dömänen, die nur an Kollagen binden (INGHAM et al. 1989). Typ III - Einheiten bilden die Domänen, die an Zellen oder an Heparin binden, nicht jedoch an Kollagen (MOSHER 1989, HYNES 1990). Zwischen den Domänen liegen biegsame Bereiche der Polypeptidkette (ALBERTS et al. 2002).

Fibronectin gehört zu den Glykoproteinen, die als funktionelle Gruppe die Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD) enthalten. Dies ermöglicht dem extrazellulären Matrixprotein, Bindungen mit Zelloberflächenrezeptoren einzugehen (ROBEY 1996). KARLSON et al. (1994) fanden eine sehr hohe Affinität des Fibronectins zu Zelloberflächen insbesondere von Fibroblasten und Kollagenfasern. Das Fibronectinmolekül enthält mindestens sechs Peptidformationen, die diese Zelladhäsion ermöglichen. Die Peptidformationen sind unterteilt in einen zentralen Bindungsbereich, eine IIICS Region und den Heparin-Bindungsbereich (YAMADA 1991). Mit zunehmender Ionenbindung an diesen Bindungsbereichen entfaltet sich das Fibronectinmolekül zu einer linearen Struktur. Auch die Bindung von Fibronectin an künstliche Substrate oder eine mögliche Bindung an einen Liganden können diese Formveränderung verursachen, zumal das Molekül in der linearen Form offener und freier für weitere Bindungen ist (SJÖBERG et al. 1989, WOLFF und LAY 1989).

Fibronectin kann sowohl in einer unlöslichen „zellulären“ Form als auch in der löslichen Plasmaform vorliegen. In beiden Formen kann es Fibronectinfibrillen bilden, wobei in diesen Fibrillen das Fibronectin durch Disulfidbrücken und durch Transglutaminase zur definitiven Stabilisierung kreuzvernetzt wird. Fibronectin in seiner Form als lösliches Plasmafibronectin liegt gewöhnlich in Scheibenform vor und misst ungefähr 30 nm Durchmesser bei 2 nm Höhe. Aufgrund der vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten der Polypeptidketten, deren Untereinheiten sowie der funktionellen Liganden ist eine Einteilung in verschiedene Fibronectintypen nicht möglich oder gar sinnvoll.

1.2.3.2 Biosynthese des Fibronektins

Die Biosynthese des Fibronektin findet unter anderem in Hepatozyten, Fibroblasten, Myoblasten, Chondrozyten, Epithelzellen, Schwann-Zellen, Astrogliazellen und Endothelien statt (LEONHARDT 1990).

Der erste Schritt in der Fibronektinbiosynthese ist die Bildung der mRNA für die verschiedenen Fibronektinmodule Typ I - III. Das Fibronektin-Gen enthält mehr als 50 Exons, von denen die meisten die Variationen der drei Fibronektinmodule kodieren. Nach Abgabe der mRNA in das Zellplasma erfolgt die Translation der Polypeptidketten an den Ribosomen des rauhen endoplasmatischen Retikulums. Durch unterschiedliches Spleißen des RNA-Primärtranskripts werden die verschiedenen Fibronektinformen, wie das Zelloberflächenfibronektin oder das Plasmafibronektin gebildet und mittels Exozytose in den Extrazellularraum abgegeben.

Verschiedenste Wachstumsfaktoren und Zytokine wie auch der TGF- β / Transforming Growth Factor- β regulieren die Fibronektinsynthese (YAMADA 1989).

1.2.3.3 Aufgabe des Fibronektins bei der Geweberegeneration

Die Aufgabe des Fibronektins besteht in der Verbindung zellulärer und nicht-zellulärer Regenerationsfaktoren. Voraussetzung hierzu ist die Fähigkeit des sehr langstreckigen Fibronektinmoleküls in linearer Entfaltung vielzählige Bindungsdomänen zu bieten, von denen jede in spezifischer Weise bestimmte Verbindungen sowohl zu Zelloberflächen, als auch zu extrazellulären Bestandteilen und freien Proteinen eingehen kann (z.B. Fibrin, Kollagen und Heparin). Folglich stellt das vermehrte Auftreten von Fibronektin die Grundvoraussetzung zur Wirksamkeit der Kollagenfunktionen dar.

Durch die hohe Affinität der aminoterminalen und carboxyterminalen Domänen zu Fibrin wird Fibronectin im letzten Schritt der Gerinnungskaskade, durch die Faktor-XIII-Transamidase katalysiert, mit Fibrin quervernetzt und kovalent gebunden. Somit erfolgt die Stabilisierung des Fibrinnetzes. Fibroblasten und andere Reparaturzellen bleiben durch die Wechselwirkungen mit der Zellbindungsregion der Fibronectinmoleküle im Fibrinnetz des Blutgerinnsels haften. Fibronectin ermöglicht somit die Verbindung zwischen Zellen, Anteilen der EZM und auch Implantatoberflächen (PARK et al. 1998) oder auch von Fibroblasten untereinander (JANSEN et al. 1999). Das vermehrte Auftreten von Fibronectin als Kittsubstanz und Gerüstprotein ist somit als essentielles Begleitbild eines Reparatonsstoffwechsels zu verstehen. MOURSI et al. (1996) haben nachgewiesen, dass Fibronectin über die Steuerung der Osteoblastenbildung und Osteoblastenanhäufung ebenfalls bei der Knochenbildung beteiligt ist. Fibronectin vermittelt darüber hinaus die Bindung von Mikroorganismen an Implantatoberflächen.

In der Gewebezüchtung wird es zur Vermittlung der Zelladhäsion auf künstlichen Unterlagen eingesetzt. Implantatbeschichtungen mit Fibronectin ermöglichten eine verbesserte Fibroblastenadhäsion an Implantatoberflächen (TRUSKEY und PIRONE 1990).

1.3 Physikalisch-werkstofftechnische Grundlagen

Die physikalischen und werkstofftechnischen Eigenschaften eines Implantates bestimmen die Interaktion mit dem menschlichen Organismus und stehen in direktem Bezug zu dessen Einheilungserfolg (KASEMO 1983, TOTH et al. 1985, THULL 1994). Das Interface von Implantatoberfläche und menschlichem Empfängergewebe stellt hierbei die Interaktionsprozesse und Reaktionsschritte des Körpers auf das Implantat respektive seine Oberfläche dar (IVARSSON und LUNDSTRÖM 1986, KASEMO und LAUSMAA 1986, SPENCER und TEXTOR 1989, THULL 1994).

Unter Sauerstoffkontakt bilden alle Metalle, mit Ausnahme der Edelmetalle, auf ihrer Oberfläche eine Oxidschicht aus. Diese Oxidschicht ist hydrophober als der Werkstoff selbst und lässt eine erhöhte Adsorption von Proteinen zu. Sind Oxidschichten sehr stabil, können sie den eigentlichen Werkstoff passivieren und hierdurch ein bioinertes Einheilungsverhalten, vergleichbar zu keramischen Werkstoffen, ermöglichen (SUNNY und SHARMA 1990). Folglich kann ein Metallwerkstoff vollkommen unterschiedliche physikalische, mechanische und chemische Eigenschaften vorweisen als sein oberflächlich gebildetes Oxid.

1.3.1 Implantate aus Titan

Reintitan und Titanlegierungen heilen langfristig nach Insertion in Hart- und Weichgewebe nahezu ohne Entzündungsreaktion und ohne Reparationskapsel ein (LAING et al. 1967, ADELL et al. 1981, GOULD et al. 1981, SCHROEDER et al. 1981, BRÅNEMARK und ALBREKTSSON 1982, HANSSON et al. 1983, TJELLSTROM et al. 1983, DOBBS und SCALES 1986, THOMSEN et al. 1986, THULL 1994). Dieses bioinerte Einheilungsverhalten (EMNÉUS und STENRAM 1960, EMNÉUS 1967) ermöglicht beispielsweise die als Osseointegration bezeichnete direkte Kontaktheilung zwischen Implantat und Knochen (BRÅNEMARK et al. 1969).

Entscheidende Vorteile zeichnen den Werkstoff Titan gegenüber anderen metallischen, keramischen und auf Kunststoff basierten Werkstoffen aus. Titan ist ein mechanisch solider Werkstoff mit einer sehr hohen Bruch- und Zugfestigkeit. Das Elastizitätsmodul von Titan kommt im Vergleich zu anderen Werkstoffen dem Elastizitätsmodul des Knochens am nächsten (BRÈME 1989). Unter Sauerstoffkontakt bildet Titan auf seiner Oberfläche unverzüglich und spontan eine Oxidschicht auf, die eine extrem niedrige Korrosionsanfälligkeit bei sehr guter Biokompatibilität aufweist (SIMON und FABRY 1991).

Diese Vorteile bewirkten den zunehmenden Einsatz des Werkstoffes Titan in der dentalen Implantologie, in der hohe Anforderungen an Knochen- und Weichgewebeheilung sowie an die Korrosionsbeständigkeit des Werkstoffes gestellt werden. Neben der zahnmedizinischen Anwendung hat auch der Einsatz in zahlreichen medizinischen Bereichen deutlich zugenommen. Nahezu alle medizinisch genutzte Metallimplantate bestehen heutzutage aus Titan oder titanhaltigen Legierungen in unterschiedlichen Formen und Oberflächenmodifikationen (SPIEKERMANN 1994).

1.3.1.1 Oberflächenbeschreibung

Titan bildet an seiner Oberfläche unter Sauerstoffkontakt innerhalb von Sekunden eine sehr stabile Titan-Oxidschicht mit einer Dicke von 50 bis 100 Å aus. Diese Oxidschicht bestimmt die chemisch-physikalischen Vorgänge im Interface um das Implantat deutlich stärker als der Implantatwerkstoff selbst (KASEMO 1983). Titan kann verschiedene Oxide, wie TiO, TiO₂ und Ti₂O₃ ausbilden. TiO₂ (Titandioxid) kommt hierbei am häufigsten vor (KASEMO 1983).

Die Titan-Oxid-Oberflächenschicht ist sehr korrosionsfest (THULL 1977, WILLIAMS 1981). Sie verhindert die Ausbildung hoher Ladungsunterschiede an der Oberfläche und weist eine Dielektrizitätskonstante ähnlich der von Wasser auf (SIMON und FABRY 1991). Diese Oberflächeneigenschaften sorgen dafür, dass angrenzende Proteine der EZM nicht denaturiert werden, sondern nur sehr geringe Wechselwirkungen zwischen

Oberfläche und Protein auftreten (GLANTZ 1998, SPENCER und TEXTOR 1989, THULL 1982). Die Oberflächeneigenschaften dieser Titan-Oxidschicht sind als fundamentale Grundvoraussetzung für die hohe Biokompatibilität des Werkstoffes Titan einzustufen. Die mechanische Stabilität der Titan-Oxidschicht gegenüber Scherkräften und Verletzungen ist gering. Dies könnte das Auftreten von Titan-Korrosionsprodukten in periimplantären Geweben und Körperflüssigkeiten erklären (HEALY und DUCHEYNE 1992). THULL (1994) entwickelte Beschichtungen aus Titanlegierungen mit Niob und Zirkon, die bei entsprechenden physikalischen und elektrochemischen Eigenschaften eine deutlich überlegene mechanische Stabilität gegenüber der Titanoxid-Passivierungsschicht boten. Folglich konnte mit mechanisch stabilerer Oberfläche eine vergleichbare Biokompatibilität gewährleistet werden (THULL 1994).

1.3.1.2 Reaktionen im Interface von Gewebe und Titan

Sofort nach der Implantation eines Metalls in den Organismus findet die erste Interaktion zwischen der Körperflüssigkeit und der Metalloberfläche statt. Mineralionen diffundieren zur Titanoxid-Passivierungsschicht und Hydroxide werden gebildet (KASEMO und LAUSMAA 1986). Proteine, Lipide und andere Biomoleküle werden an der Oberfläche absorbiert. Die Adsorption von Glykosaminoglykanen und Proteinen wird über anionische Bereiche auf deren Oberfläche vermittelt und dazu Kalzium-Ionen benötigt (ELLINGSEN 1991). Nach Vorbehandlung von Titanoberflächen mit Kalzium-Ionen können signifikant höhere Proteinadsorptionen nachgewiesen werden. SCHMIDT und STEINEMANN (1991) stellten bei Untersuchungen zur Adsorption von Aminosäuren an Titanoberflächen heraus, dass die Adsorption durch den Austausch von Hydroxyl-Gruppen des Titandioxids mit Carboxyl-Gruppen der Aminosäuren ermöglicht wird.

Zellen jedoch können grundsätzlich nur über ein extrazelluläres Glykoprotein wie Fibronectin in seiner Funktion als Anheftvermittler an der Oberfläche anbinden (SYKARAS et al. 2000). Diese Anheftvermittler bilden infolgedessen eine zellfreie Zone zwischen periimplantären Zellverbänden oder Faserformationen und der Implantatoberfläche selbst. Infolgedessen ist, von dem verwendeten Implantatmaterial

unabhängig, der Implantatoberfläche direkt anliegend eine afibrilläre interfaciale Zone zu finden (PULEO und NANJI 1999). Um Titandioxid-Oberflächen ist diese Zone ca. 20 - 40 nm breit und mit Glykoproteinen, Proteoglykanen und Flüssigkeit gefüllt. Im Anschluss an diese Zone bildet sich ein bis zu 30 µm breiter, mit Flüssigkeit angefüllter Raum, der neben Entzündungszellen auch ein lockeres proteinähnliches Material beinhaltet (ROSENGREN et al. 1994). Hier können neben Makrophagen und vereinzelt Lymphozyten eine Vielzahl großer Fibroblasten mit ausgeprägtem endoplasmatischen Retikulum und großen Golgi-Apparaten, als Zeichen einer hohen Proteinbiosyntheserate gesehen werden (ROSENGREN et al. 1994).

Das Knochen-Implantat-Interface ist dynamisch mit katabolischer wie auch metabolischer Aktivität (STEFLIK et al. 1998). Es besteht aus einem dichten, organisierten Bindegewebe mit Fibroblasten und Kollagen nahe der Titanoberfläche. Osseointegrierte Implantate weisen oft eine mineralisierte Matrix von Kollagenfasern an der Oberfläche auf. In anderen Anteilen des gleichen Implantates können aber auch nicht mineralisiertes Kollagenfaserstroma, welches Osteoblasten enthält, gefunden werden (STEFLIK et al. 1998).

1.3.2 Implantate aus Stahl

Rostfreier Stahl (316L) besteht aus einer Eisen-basierten Legierung mit Zusätzen von Chrom, Nickel und Molybdän zur Verbesserung der Korrosionsresistenz (SEAH und CHEN 1993). Im Sprachgebrauch hat sich die Bezeichnung VA-Stahl als Oberbegriff für diese Legierungsgruppe durchgesetzt. Der Zusatz Molybdän erhöht sehr effektiv die Widerstandskraft des Stahls gegen Grübchen- und Risskorrosion. Außerdem stabilisiert es in Kombination mit Chrom die passive Schicht des Stahls in einem chlorhaltigen Medium (SEAH und CHEN 1993). Stahl und Stahllegierungen eignen sich aufgrund der schlechteren chemischen und physikalischen Eigenschaften dennoch nicht wie Titan zur dauerhaften Implantation. Aus diesen Gründen wird es in der medizinischen Implantologie nur noch selten, wie beispielsweise für kurzfristige Frakturfixierungen, verwendet (SIMON und FABRY 1991).

1.3.2.1 Oberflächenbeschreibung

Auch Stahl bildet ähnlich wie Titan sehr rasch eine Oxidschicht an der Oberfläche des Implantates aus. Hauptsächlicher Bestandteil dieser Oberflächenschicht auf Stahl ist Chromoxid (HANAWA 1991). Chromoxid kann die Passivschicht nicht so lange erhalten wie Titandioxid, was zu einer deutlich geringeren Korrosionsfestigkeit führt (SEAH und CHEN 1993). Im Oberflächenfilm auf 316L Stahlimplantaten ist Sauerstoff, Kalzium, Phosphat und Chlor nachzuweisen, wobei die Gesamtmenge an enthaltenem Kalzium und Phosphat, vergleichbar mit Titanoberflächen, relativ groß ist (HANAWA 1991). Die Chromoxidschicht ist dennoch, im Gegensatz zum Titandioxid, nicht in Lage Kalzium-Ionen zu adsorbieren (HANAWA 1991). Hieraus resultiert eine geringere Proteinadsorption an Stahloberflächen gegenüber Titanoberflächen. Auch WILLIAMS et al. (1987) berichten von Unterschieden in der Adsorptionsfähigkeit von Stahl und Titan. Sie fanden heraus, dass Stahl Fibrinogen und Albumin in geringeren Mengen adsorbiert als Titan.

1.3.2.2 Reaktionen im Interface von Gewebe und Stahl

Die allgemeinen Grundsätze zur Diffusion von Mineralionen, Adsorption von Proteinen, Lipiden und anderen Biomolekülen nach Implantation, die zuvor für Titan beschrieben wurden, können in ihren elementaren Zügen auf VA-Stahl übertragen werden. Die Zelladhäsion an Stahloberflächen geschieht analog zu Titanoberflächen über extrazelluläre Glykoproteine wie Fibronectin (SYKARAS et al. 2000). Hieraus resultiert auch für VA-Stahl eine der Implantatoberfläche direkt anliegende afibrilläre interfaciale Zone (PULEO und NANCI 1999).

Stahl wird nach der Klassifizierung von OSBORN (1979) als biotoleranter Werkstoff eingestuft. Wird ein solches Material in den Knochen implantiert, kommt es in aller Regel zu einer Distanzosteogenese mit unterschiedlich dicken, faserreichen Bindegewebskapseln

zwischen Implantat und Knochen (LINDER und LUNDSKOG 1975). Nach Implantation in Weichgewebe heilt VA-Stahl ohne ausgeprägte Gewebereaktion ein (ESCALAS et al. 1975). Auf zellulärer Ebene finden sich in den ersten Monaten unauffällige Zellzahlen mit zahlreichen Makrophagen. Nach 12 Monaten nimmt die Zellzahl ab wobei vermehrt reifere Fibrozyten auftreten. Die entzündliche Gewebeantwort im lockeren Bindegewebe ist in den ersten Monaten nach Implantation sehr gering und kann mit der Zeit minimal zunehmen (ESCALAS et al. 1975). Wenngleich Stahl eine stärkere Gewebeantwort als Titan hervorruft (ESCALAS et al. 1975, GOULD et al. 1981) sind die Unterschiede nicht signifikant (MCGEACHIE et al. 1992). LINDER und LUNSKOG (1975) machten die Korrosionsrate des Implantatmaterials Stahl für die Stärke der Gewebeantwort verantwortlich, da sie im Implantat umgebenden Gewebe viele Korrosionsprodukte nachweisen konnten. Neuere Legierungen von Stahl konnten deutlich bessere Gewebeverträglichkeiten zeigen (TSCHON et al. 2005).

1.4 Problemstellung und Zielsetzung

Ziel der vorliegenden tierexperimentellen Studie war es, Unterschiede im Einheilverhalten der Werkstoffe Titan und VA-Stahl (316L) anhand der Matrixproteine Kollagen Typ I (C1), Kollagen Typ III (C3) und Fibronectin im implantatumgebenden Interface zu untersuchen und darzustellen. Hierzu wurden die Einheilkapseln der oberflächenkonditionierten Implantate in verschiedenen Zeitabständen nach subkutaner, intramuskulärer und intraossärer Implantation nach den Bewertungskriterien Kapselqualität, Kapseldicke und Verteilungsmuster der Matrixproteine im Lokalisations- und Materialvergleich mittels konventioneller Mikroskopie von Mehrfach- und Immunperoxidasefärbungen und Konfokaler Laserscanning Mikroskopie (CLSM) von Immunfluoreszenzfärbungen analysiert.

Folgende Fragestellungen sollten erörtert werden:

- Ergeben sich im Materialvergleich der Werkstoffe Titan vs. VA-Stahl unterschiedliche Kapselqualitäten bezüglich Vorkommen und Orientierung des Kollagens sowie der zellulären Begleitreaktion nach Implantation in Weichgewebe. Verändern sich diese Kapselqualitäten im Materialvergleich mit zunehmender Implantationsdauer?
- Ergeben sich im Lokalisationsvergleich des jeweiligen Implantatwerkstoffes subkutan (s.c.) vs. intramuskulär (i.m.) unterschiedliche Kapselqualitäten bezüglich Vorkommen und Orientierung des Kollagens sowie der zellulären Begleitreaktion. Verändern sich diese Kapselqualitäten im Lokalisationsvergleich mit zunehmender Implantationsdauer?

- Ergeben sich im Materialvergleich der Werkstoffe Titan vs. VA-Stahl unterschiedliche Kapseldicken nach Weichgewebeimplantation? Verändern sich die Kapseldicken im Materialvergleich mit zunehmender Implantationsdauer?
- Ergeben sich im Lokalisationsvergleich des jeweiligen Implantatwerkstoffes subkutan (s.c.) vs. intramuskulär (i.m.) unterschiedliche Kapseldicken? Verändern sich die Kapseldicken im Lokalisationsvergleich mit zunehmender Implantationsdauer?
- Ergeben sich im Materialvergleich der Werkstoffe Titan vs. VA-Stahl unterschiedliche Dicken der Kallusformation nach intraossärer Implantation? Verändern sich die Kallusdicken im Materialvergleich mit zunehmender Implantationsdauer?
- Ist die Verteilung der Matrixproteine Kollagen Typ I und Typ III sowie Fibronectin im umgebenden Einheilgewebe bezüglich deren Ausrichtung implantatnah und implantatfern spezifisch für den jeweiligen Werkstoff Titan oder VA-Stahl (Materialvergleich)? Sind mit zunehmender Implantationsdauer im Materialvergleich Veränderungen im Verteilungsmuster nachweisbar?
- Ist die Verteilung der Matrixproteine Kollagen Typ I und Typ III sowie Fibronectin in der Einheilkapsel bezüglich deren Ausrichtung implantatnah und implantatfern spezifisch für die jeweilige Implantationslokalisierung subkutan (s.c.), intramuskulär (i.m.) (Lokalisationsvergleich)? Sind mit zunehmender Implantationsdauer im Lokalisationsvergleich Veränderungen im Verteilungsmuster nachweisbar?

2 Material und Methoden

2.1 Implantate

Die verwendeten Implantate aus den Werkstoffen Titan (Abbildung 1) und medizinischer VA-Stahl (316L) wurden von der Fa. Leibinger, Freiburg im Breisgau, wie folgt bestellt. Alle Implantate sollten zylindrisch geformt mit abgerundeten Ecken in drei unterschiedlichen Dimensionen geliefert werden: die subkutan einzubringenden Implantate (Gruppe 2) in 10,0 mm Länge und 2,0 mm Durchmesser; die intramuskulär einzubringenden Implantate (Gruppe 3) in 5,0 mm Länge und 1,6 mm Durchmesser; die intraossär einzubringenden Implantate in 2,8 mm Länge und 1,2 mm Durchmesser (Gruppe 4).

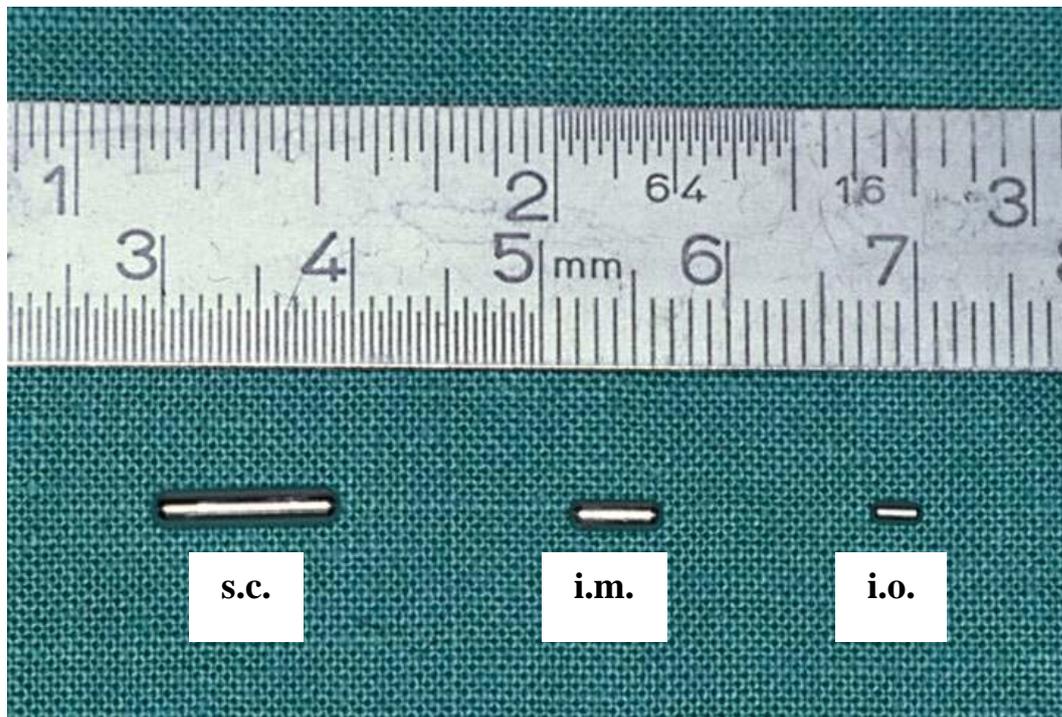


Abbildung 1 Titan-Implantate

2.1.1 Rasterelektronenmikroskopie der Implantatoberflächen

Zur Beurteilung der Oberflächenstruktur der Implantate erfolgte die Darstellung mittels Rasterelektronenmikroskop (Digital Scanning Microscope DSM 940) der Fa. Zeiss, Jena.

Bei 2000-facher Vergrößerung war deutlich zu sehen, dass die Implantatoberflächen durch den Herstellungsprozess ausgeprägte Schleiffrillen aufwiesen (Abbildung 2 und Abbildung 4). Um eine möglichst homogene Implantatoberfläche zu erhalten (Kasemo und Lausmaa 1991), mussten die Implantatoberflächen infolgedessen mittels Ätzlösung konditioniert werden.

2.1.2 Implantatkonditionierung

Die Implantatoberflächen wurden mittels Ätzlösungen konditioniert. Die Rezepturen der Ätzlösungen sind dem Kapitel 7.1 des Anhangs beigelegt. Nach Abschluss der Konditionierung wurden die Implantatoberflächen erneut rasterelektronen-mikroskopiert. Abbildung 3 und Abbildung 5 ist zu entnehmen, dass durch die Oberflächenkonditionierung mittels Ätzlösung werkstoffspezifisch eine homogene Oberflächenstruktur geschaffen wurde.

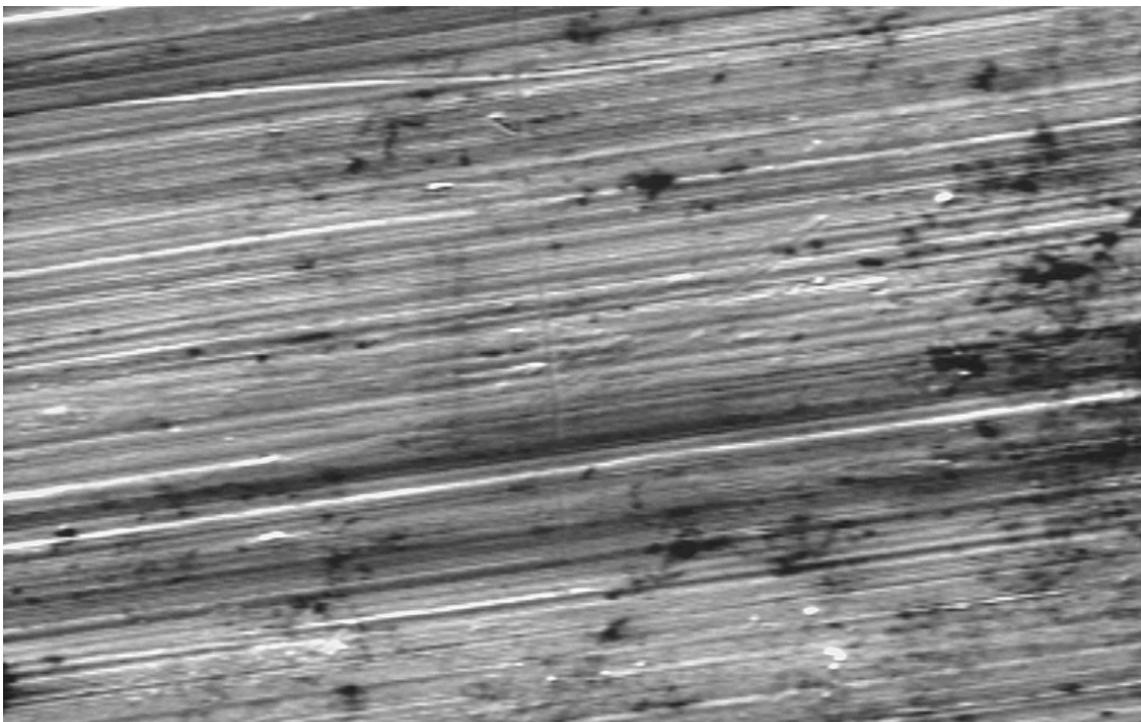


Abbildung 2 REM-Aufnahme Titan ungeätzt (4000-x Vergrößerung)

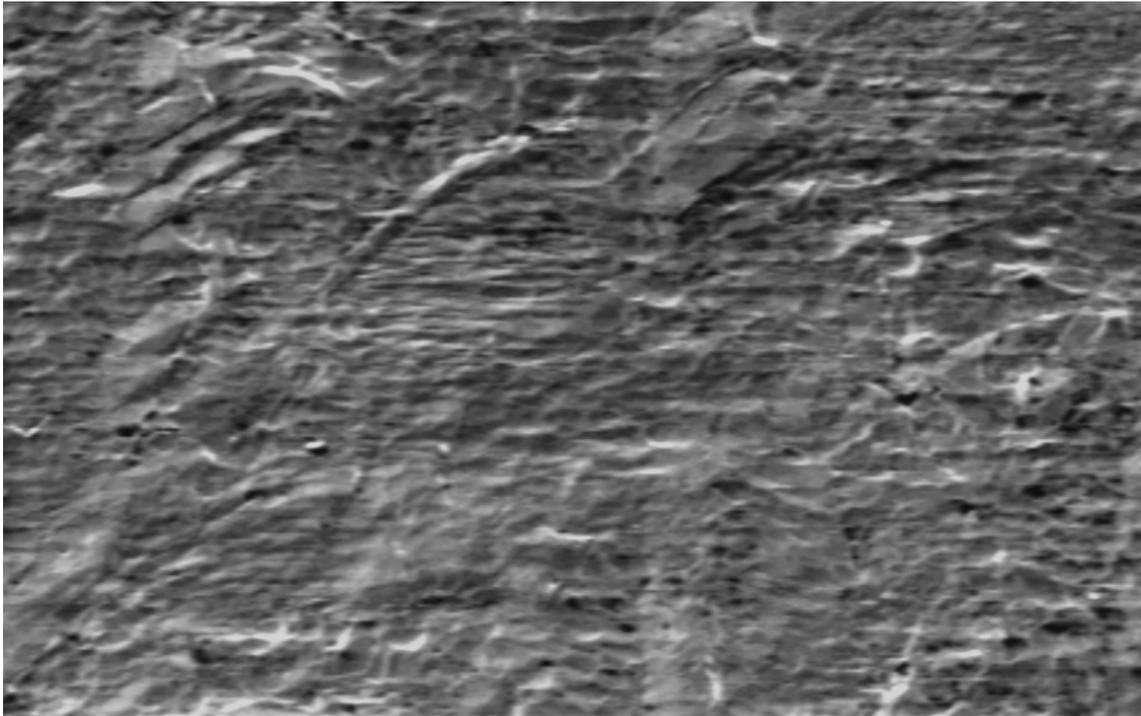


Abbildung 3 REM-Aufnahme Titan geätzt (4000-x Vergrößerung)

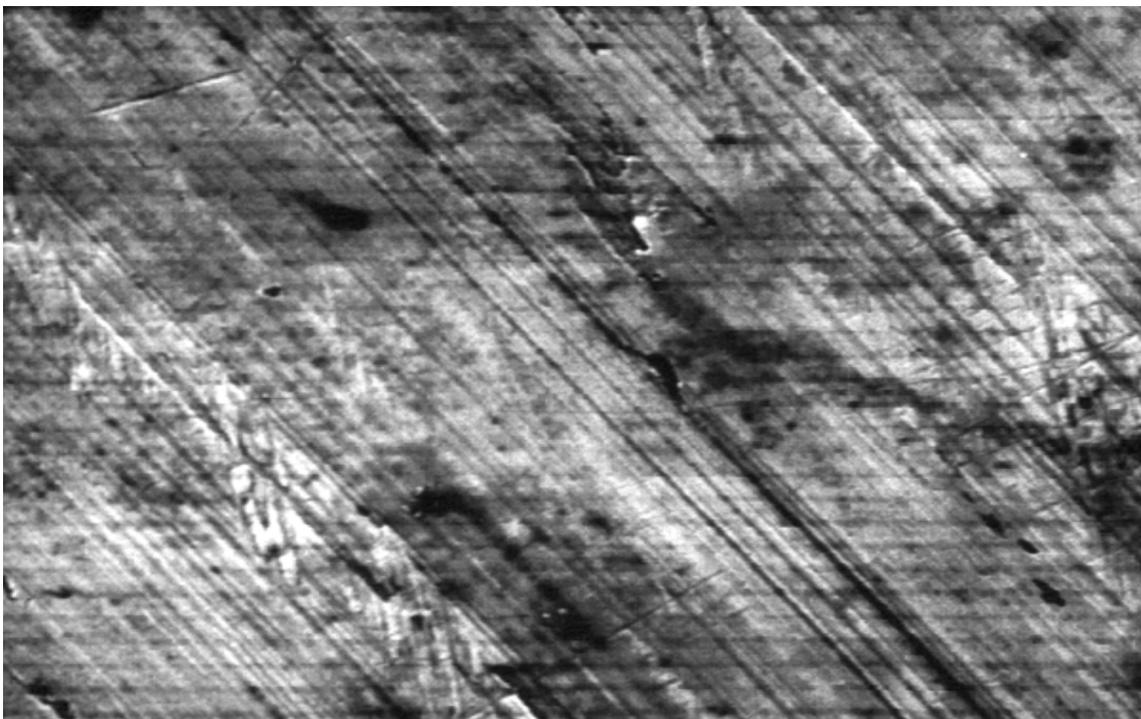


Abbildung 4 REM-Aufnahme VA-Stahl ungeätzt (4000-x Vergrößerung)

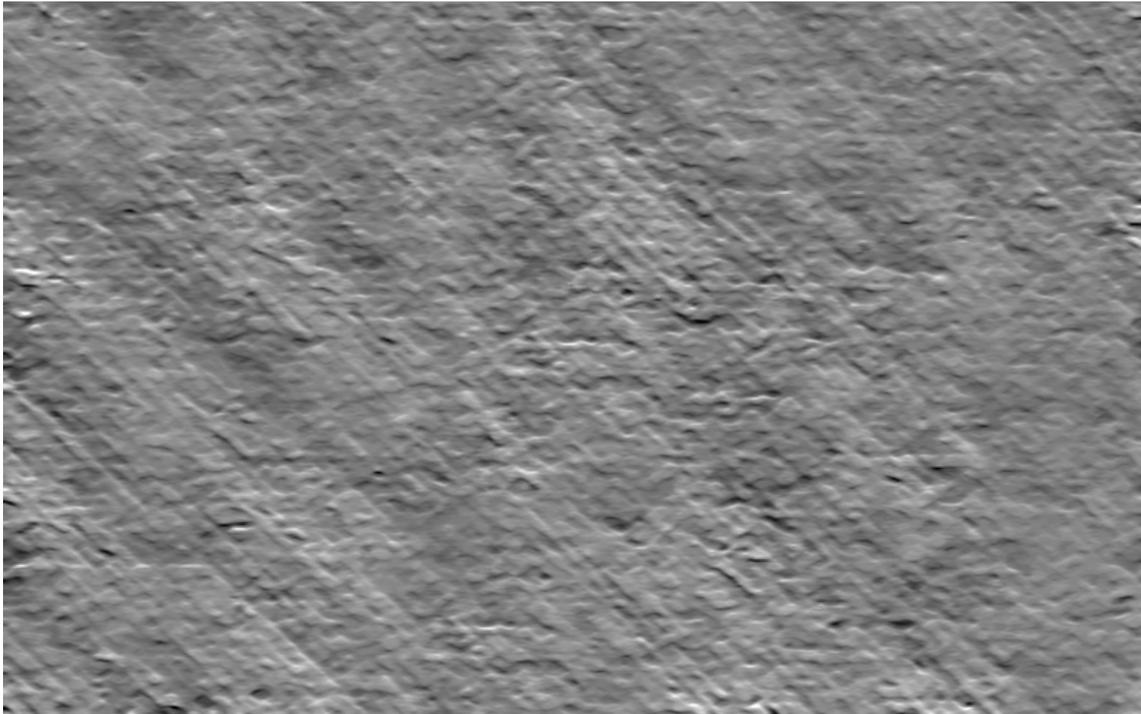


Abbildung 5 REM-Aufnahme VA-Stahl geätzt (4000-x Vergrößerung)

2.1.3 Implantatvermessung

Im Anschluss wurden alle Implantatkörper mit Hilfe einer Feinwaage gewogen und mittels Mikrometer-Schraube vermessen. Hierbei wurden die Implantatmaße auf die Erfüllung der Produktionsvorgaben hin kontrolliert.

2.1.4 Implantatvorbereitung zur Operation

Nach der Implantatvermessung erfolgte die makroskopische Fotodokumentation. Zur Operationsvorbereitung wurden alle Implantate einer Reinigung im Ultraschallbad und anschließend mit Alkohol (70%) unterzogen. Abschließend wurden alle Implantate eingetütet und bei 134°C über 10 min. thermosterilisiert. Bis zur Operation wurden die Implantate steril eingetütet belassen.

2.2 Tierexperimentelle Untersuchung

2.2.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es um 45 männliche Cara-Ratten aus eigener Koloniezucht. Zu Versuchsbeginn waren alle Tiere ca. 5 Monate (± 1 Woche) alt und wogen im Durchschnitt ca. 380g. Die Ratten wurden unter hygienischen Schutzvorkehrungen und mit zusätzlichem Barriere-System während der gesamten Versuchsdauer einzeln gehalten. Die Klimaverhältnisse waren auf ca. 22°C Raumtemperatur und 40-55 % relative Luftfeuchtigkeit eingestellt. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug 12 zu 12 Stunden.

2.2.2 Gruppeneinteilung

Die Einteilung der 45 Ratten erfolgte in 7 unterschiedliche Gruppen. Gruppe 1 diente als Kontrollgruppe und bestand aus 6 Tieren. Die Gruppe 2 wurde von 8 Tieren gebildet, die jeweils für die subkutane Implantation vorgesehen waren. Auch die Gruppe 3 bestand aus 8 Tieren, bei denen die Implantate intramuskulär inseriert wurden. Die intraossäre Implantation erfolgte an 9 Tieren der Gruppe 4. Für die Scheinoperationen mit Präparation einer Implantationskavität ohne den Einsatz von Implantatkörpern wurden die Gruppen 5,6 und 7 gebildet. Hierbei wurde die Gruppe 5 mit 4 Tieren subkutan, die Gruppe 6 mit 4 Tieren intramuskulär und die Gruppe 7 mit 6 Tieren intraossär operiert.

Gruppe 1 - 6 Tiere - Kontrollgruppe ohne Operation

Gruppe 2 - 8 Tiere - subkutane Implantation (s.c.)

Gruppe 3 - 8 Tiere - intramuskuläre Implantation (i.m.)

Gruppe 4 - 9 Tiere - intraossäre Implantation (i.o.)

Gruppe 5 - 4 Tiere - Schein-Operation ohne Implantation subkutan

Gruppe 6 - 4 Tiere - Schein-Operation ohne Implantation intramuskulär

Gruppe 7 - 6 Tiere - Schein-Operation ohne Implantation intraossär

2.2.3 Versuchsdauer

Es erfolgte eine sukzessive Opferung der Versuchstiere nach 3, 6 und 12 Wochen nach folgendem Schema. In der Gruppe 1 wurden jeweils 2 Tiere nach 3, 6 und 12 Wochen geopfert. In der Gruppe 2 und 3 waren es jeweils 4 Tiere nach 3 und 6 Wochen. Aus der Gruppe 4 wurden jeweils 3 Tiere nach 3, 6 und 12 Wochen geopfert. Jeweils 2 Tiere nach 3 und 6 Wochen wurden der Gruppe 5 und 6 entnommen. Die Tiere der Gruppe 7 wurden jeweils paarweise nach 3, 6 und 12 Wochen geopfert. Alle Tiere mit Implantaten wurden nach ihrer Opferung geröntgt.

2.2.4 Tierhaltung und Fütterung im Experiment

Präoperativ fanden Makrolon-Käfige Typ 3 Anwendung, postoperativ Makrolon-Käfige Typ M5. Als Einstreu diente keimfreies Weichholzgranulat. Zur Fütterung wurden Altromin Haltungsdiät 1342 (gereinigte Komponenten) und kommunales Leitungswasser mit neutralem pH-Wert, beides ad libitum, verwendet. Die Trinkflaschen und die Einstreu wurden zweimal wöchentlich gewechselt. Bei der täglichen Inspektion der Tiere wurde der Futter- und Wasserkonsum vermerkt.

2.2.5 Entwicklung der Versuchstiere

Es erfolgte eine wöchentliche Gewichtskontrolle aller Tiere. Besonderes Augenmerk galt dem postoperativen Gewichtsverlust und der anschließenden Gewichtsentwicklung. Die tabellarische Darstellung der Gewichtsentwicklung ist dem nachfolgenden Ergebnisteil (Kapitel 3.2) zu entnehmen.

2.2.6 OP-Vorbereitung der Versuchstiere

Den Tieren wurde 16 Stunden vor Narkose jegliches Futter entzogen. Je nach Implantationslokalisation wurden Rücken, Bauch, bzw. Oberschenkel mit lauwarmem

Wasser und Seife gewaschen, gut abgespült und abgetrocknet. Anschließend erfolgten eine Rasur und eine zweimalige Desinfektion des Operationsgebietes mit Kodan® Tinktur Forte farblos Spray der Fa. Schülke & Mayr GmbH, 22840 Norderstedt. Hiernach wurden die Tiere auf dem gewärmten OP-Tisch fixiert und steril abgedeckt.

2.2.7 Narkose

Die Narkose bestand aus einer leichten Isofluran Inhalationsnarkose im Stephens-Narkose-Gerät. Danach erfolgte eine kombinierte Ketanest-Rompun-Injektionsnarkose mit Hilfe einer Mischspritze intramuskulär in den Musculus quadriceps femoris. Die jeweilige Dosis betrug 5 mg Rompun pro Kilogramm Körpergewicht und 100 mg Ketanest pro Kilogramm Körpergewicht.

2.2.8 Implantation

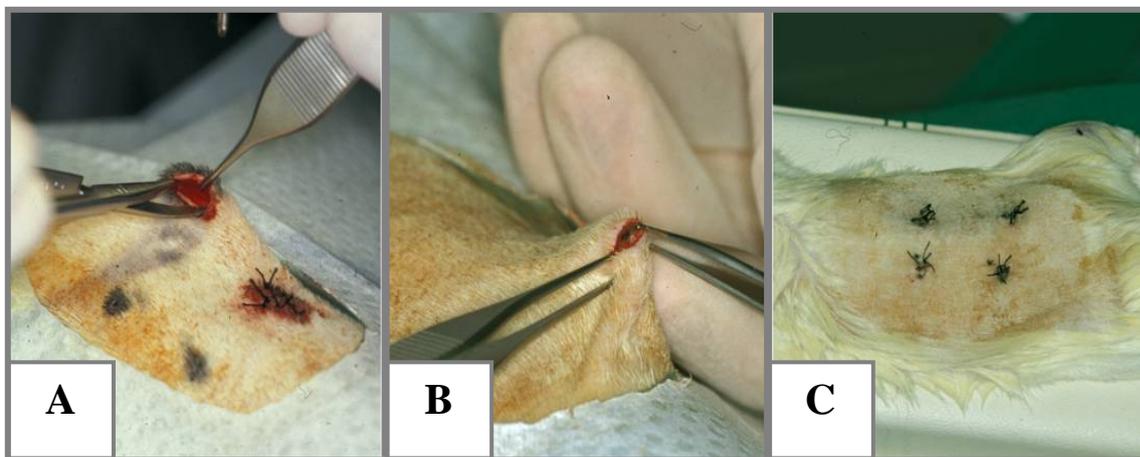


Abbildung 6 subkutane Implantation: A – Taschenpräparation, B - Implantatinsertion, C - Wundverschluss

Abbildung 6 zeigt den operativen Ablauf der Implantation bei den Tieren der Gruppe 2. Nach paravertebralem Hautschnitt erfolgte die stumpfe Präparation einer subkutanen Tasche (A), in die die Probekörper nach folgendem Schema eingebracht wurden (B): Tiere

1-4 cranial beidseits paravertebral je ein Titan-Implantat, caudal je ein VA-Stahl-Implantat inseriert, Tiere 5-8 in umgekehrter Anordnung. Abschließend einschichtiger Wundverschluss der Haut mit Seide 3,0 (C).

Bei Gruppe 3 (Abbildung 7) verlief der Hautschnitt abdominal. Die stumpfe Präparation einer Tasche erfolgte bei dieser Gruppe im Musculus rectus abdominis (A). Die Probekörper wurden analog dem Schema der Gruppe 2 inseriert (B). Der abschließende, zweischichtige Wundverschluss wurde subkutan mit Vicrylfäden der Stärke 5,0 (C) und an der Haut mit Seidennähten der Stärke 3,0 durchgeführt.

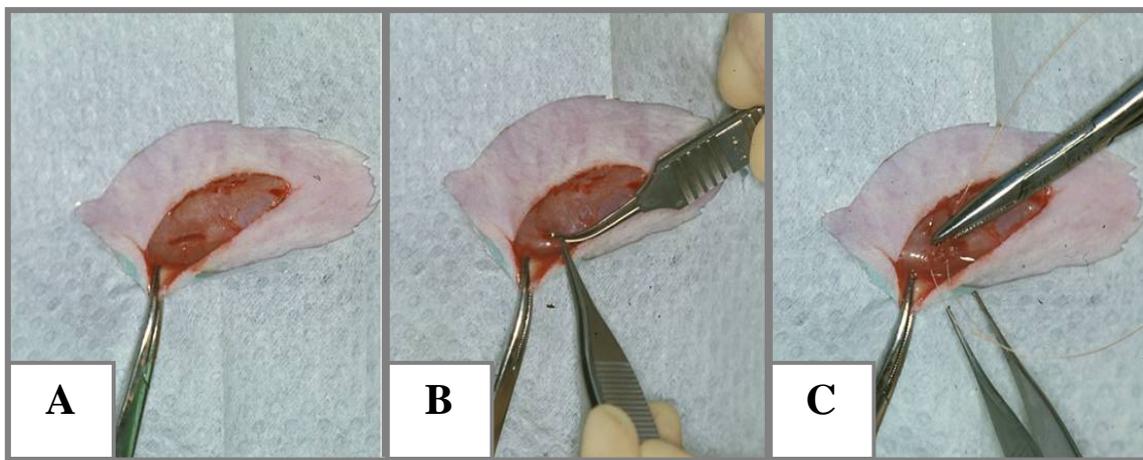


Abbildung 7 intramuskuläre Implantation: A - Taschenpräparation, B - Implantatinsertion, C - Wundverschluss

Für die intraossäre Implantationsgruppe (Gruppe 4 – Abbildung 8), wurde die Haut im medialen Oberschenkel vertikal eröffnet und stumpf zwischen Musculus biceps femoris und Musculus vastus lateralis bis auf den Femur präpariert. Das Periost wurde unterhalb des Trochanter tertius durchtrennt und bis 5 mm oberhalb des Condylus lateralis abpräpariert. Es erfolgten die Bohrungen mit einem Rosenbohrer Nr. 12 unter ständiger Kühlung und Spülung (0,9% phys. NaCl). In die Bohrlöcher wurden die Implantate monocortical nach folgendem Schema eingesetzt: Bei Tier 1-4 wurde proximal intramedullär ein Titan-Implantat und distal ein VA-Stahl-Implantat inseriert, bei Tier 5-8 erfolgte die Implantation in umgekehrter Anordnung. Die Muskelnnaht wurde wiederum mit Vicrylnähten der Stärke 5,0 und die Hautnaht mit Seidenfäden der Stärke 3,0

durchgeführt. Abschließend erhielten die Tiere einen Verband und es erfolgte eine Schmerzbekämpfung mit Novalgin nach Bedarf.

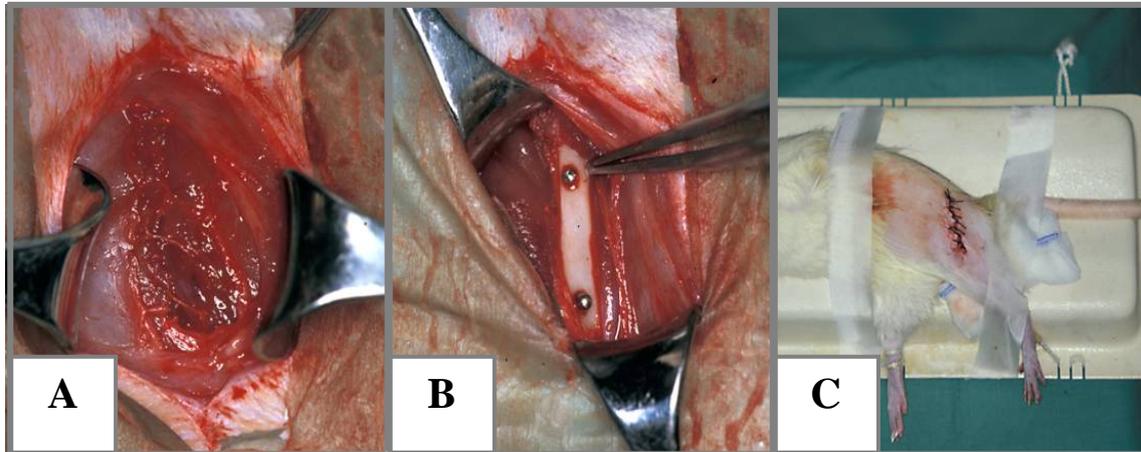


Abbildung 8 intraossäre Implantation: A – transmuskuläre Präparation, B - Implantatinsertion, C - Wundverschluss

An den Tieren der Gruppen 5, 6 und 7 wurden die Operationen analog zu den Tieren der Gruppen 2, 3 und 4 ohne Probekörper durchgeführt.

2.2.9 Opferung

Die Opferung der Versuchstiere erfolgte in einer konventionellen CO₂-Box. Alle Tiere wurden nach Opferung gewogen.

2.2.10 Röntgenkontrolle und Probenentnahme

Nach Opferung wurden die Tiere mit Implantaten zur Lagekontrolle der Implantate geröntgt (Abbildung 20, Abbildung 21, Abbildung 19 und Abbildung 22). Die Implantationsstellen mit Implantat und umliegendem Gewebe und die scheinoperierten Regionen wurden hiernach großzügig reseziert und abschließend alle Tiere einer explorativen Obduktion unterzogen um Begleiterkrankungen und Malignomformationen auszuschließen.

2.3 Histologie

2.3.1 Vorbereitung der Präparate

Alle Weichgewebepreparate (Gruppe 2 / s.c., 3 / i.m., 5 und 6 / Schein-Op) wurden in gefriergeeigneten Polythylen-Probengefäßen nativ in das Tissue-Tek OCT-Cryo Einbettmedium der Fa. DIATEK, Hallstadt, eingebettet, mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren und in Gefrierfächern bei -80 C eingelagert. Vor Einbettung wurden die Implantatkörper der Gruppen 2 (s.c.) und 3 (i.m.) unter äußerster Sorgfalt aus Ihrer Einheilkapsel ausgelöst. Hierbei wurde strengstens darauf geachtet, dass über einen kleinstmöglichen Schnitt und mittels minimaler Traumatisation die Implantatauslösung ohne größere Verletzung der Einheilkapsel durchgeführt wurde.

Die Knochenpräparate der Gruppe 4 und 7 wurden zunächst mit 4% Paraformaldehyd und Picrinsäure bei 4°C im Kühlschrank über 12 Stunden fixiert. Hiernach wurden die Präparate mittels EDTA-Lösung langsam entkalkt. Hierzu wurde EDTA-Lösung (20%) verwendet und der pH mittels Zitronensäure auf 7,2 auftitriert. Die Entkalkungsdauer belief sich auf einen Zeitraum von ca. 2 Wochen. Währenddessen erfolgte der regelmäßige Wechsel der Entkalkungslösung. Nach ausreichender Entkalkung konnten mittels scharfer Präparation die Implantate unter größter Sorgfalt und atraumatischer Präparation entfernt werden. Hiernach wurden sämtliche Proben in Saccharoselösung (30%) im PBS mittels Magnetprüher für 4 Stunden ausgewaschen. Anschließend erfolgte auch hier die Einbettung der Präparate mittels Tissue-Tek OCT-Cryo Einbettmedium der Fa. DIATEK, Hallstadt, Schockgefrierung mit flüssigem Stickstoff und Lagerung in Gefrierfächern bei -80°C. Alle Präparate wurden mit dem Cryostat HM 500 OM der Fa. Microm, Walldorf, in 10 µm starke Schnitte geschnitten, auf gelatinebeschichteten Objektträgern aufgebracht und über Nacht luftgetrocknet. Die Rezeptur der Gelatinelösung und Verfahrensweise zur Objektträgerbeschichtung sind im Anhang angefügt (Kapitel 7.2.1 und 7.2.2).

2.3.2 Immunperoxidase- und Mehrfachfärbungen zur Beurteilung der Kapselqualität mittels konventioneller Mikroskopie

Die Rezepturen aller Färbungen sind dem Anhang zu entnehmen (Kapitel 7.2). Zur histologischen Beurteilung der zellulären und kollagenen Kapselqualität wurden Mehrfach- (HE, v. Giesson und Azan) und Immunperoxidasefärbungen angewendet. Die Mehrfachfärbungen wurden konventionel mikroskopiert. Mittels Immunperoxidasefärbung konnten die nachzuweisenden Proteine Kollagen Typ I, Kollagen Typ III und Fibronectin selektiv dargestellt werden. Hierzu wurden die über Nacht auf Objektträgern getrockneten Präparate nach nochmaliger Acetonfixierung getrocknet, mit Tris NaCl pH 7,4 ausgewaschen und mit 100µl des jeweiligen Primärantikörpers bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Es wurden folgende Primärantikörper verwendet:

Kollagen Typ I

Rabbit-Anti-Rat, C1, Polyclonal AB, AB755, Fa. Chemicon International, Temecula California USA, 1:20 mit BSA (0,5%)

Kollagen Typ III

Rabbit-Anti-Rat, C3, Polyclonal AB, AB757, Fa. Chemicon International, Temecula California USA, 1:40 mit BSA (0,5%)

Fibronectin

Rabbit-Anti-Rat, Fibronectin, Polyclonal AB, AB1942, Fa. Chemicon International, Temecula California USA, 1:50 mit BSA (0,5%)

Zur Ausschaltung gewebeeigener Peroxidase wurden die Präparate mit Albuminserum des Spender-Tieres des Sekundärantikörpers und H₂O₂-Lösung (12 ml PBS mit 60µl H₂O₂-Lösung / 30%) inkubiert. Die Detektion von Kollagen Typ I und III erfolgte mit Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper (Chicken Anti-Rabbit IGG H&L, Horseradish Peroxidase Affin purif AB, AP 169P, Fa. Chemicon International, Temecula California USA, 1: 50 mit BSA 0,5%). Zur Farbdarstellung diente das Chromogen DAB

(3,3 Diaminobenzilline, D 5905, Fa. Sigma Bioscience, München). Die Darstellung von Fibronectin erfolgte ebenfalls mit Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper (Goat-Anti-Rabbit IGG, Horseradish Peroxidase Affinity puffered AB, L 42007, Fa. Caltag Laboratories, Burlingame California USA, 1:50 mit Plasma und PPS). Aufgrund der starken Hintergrundfärbung des DAB bei Fibronectinfärbung wurde AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazole, Tbl. 20 mg A 6926, Fa. Sigma Biosciences, München) als Chromogen eingesetzt. Nach Eindeckeln der Präparate erfolgte die histologische Auswertung der Kapselqualität und photographische Darstellung am M 35 W-Mikroskop und Belichtungsautomat MC 63 der Fa. Zeiss, Jena.

Die Einstufung der Kapselqualität erfolgte in Anlehnung an SHANNON et al. (1997) in fünf verschiedene Grade. Grundlage hierzu war die Feststellung, dass mit zunehmender zellulärer Entzündungsreaktion die Dichte und Orientierung der Kollagenfasern abnimmt.

- Grad I: dicht gepackte, streng parallel ausgerichtete Kollagenfasern mit geringem Zellaufkommen an Fibroblasten und Makrophagen
- Grad II: parallel ausgerichtete Kollagenfasern mit erhöhtem Zellaufkommen an Fibroblasten und Makrophagen
- Grad III: locker angeordnete Kollagenfasern mit erhöhtem Zellaufkommen an Fibroblasten und Makrophagen
- Grad IV: nur vereinzelte Kollagenfasern ohne Ausrichtung mit ausgeprägtem Zellaufkommen an Makrophagen
- Grad V: keine zusätzlichen Kollagenfasern, keine Kapselbildung, unveränderter Kollagenanteil, nur vereinzelt Makrophagen

Die Kapselqualität Grad V wurde somit der Situation zugeordnet, in der das Untersuchungsgewebe vernachlässigbare Veränderungen im Kollagengehalt und Makrophagenanteil gegenüber dem nicht operierten Ursprungsgewebe aufwies. Die Einstufung der verschiedenen Kapselqualitäten erfolgte unter Zusammenschau der auswertbaren Dauerfärbungen des jeweiligen Präparates mittels konventioneller Mikroskopie.

2.3.3 Immunfluoreszenzfärbungen zur Erfassung von Kapseldicke und Fluoreszenzprofil mittels Konfokaler Laserscanning Mikroskopie

Die Immunfluoreszenzfärbungen zur Auswertung mittels Konfokaler Laserscanning Mikroskopie erfolgten analog zur Immunperoxidasefärbung mit Vorbehandlung und Primärantikörper. Zum Ausschluss von Kreuzreaktionen des Sekundärantikörpers wurde eine 10% Verdünnung des Primärantikörpers mit Goat-Serum versetzt und inkubiert. Hierdurch wurde ein neutraler Hintergrund ohne falsch positive Anfärbungen gewährleistet. Als Sekundärantikörper wurde ein FITC-konjugierter Goat-Anti-Rabbit IGG H+L Antikörper der Fa. Dako, Hamburg, verwendet. FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) ist ein fluoreszierender Triphenylmethan-Farbstoff (Xanthen-Farbstoff) aus der Gruppe der Phthalsäurefarbstoffe. Er wird maximal bei 492 nm angeregt und hat ein Emissionsmaximum bei 520 nm (grün). Die Verdünnung erfolgte nach folgendem Schema. 300 µl humanes Blutplasma der Blutgruppe AB wurde mit 700 µl PPS (Ph 7,4) und 20 µl des entsprechenden Antikörpers versetzt. Der Sekundärantikörper wurde somit 1:50 verdünnt für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit PBS ausgewaschen. Zum Schutz gegen zu schnelles Ausbleichen wurde als Anti-Fading-Agens p-Phenylendiamin in gepuffertem Glycerol eingesetzt. Hierzu erfolgte die Eindeckung mit einem Fluoreszenz-Eindeckmittel in folgender Rezeptur. Zu 10 ml PBS wurden 100 mg p-Phenylendiamin, (Fa. Merck, Darmstadt, Nr. 7243) und 90 ml Glyzerin hinzugefügt und mittels Basenlösung (3,7 g NaHCO₃ mit 0,6 g Na₂CO₃ ad 100 ml aqua dest.) auf einen pH von 9,0 auftitriert. Das Eindeckmittel wurde im Dunkeln bei -20 °C aufbewahrt, die Präparate im Dunkeln bei +3 °C bis zur Auswertung mittels Konfokaler Laserscanning Mikroskopie.

2.3.4 Konfokale Laserscanning Mikroskopie (CLSM)

Die CLSM wurde am DMRB/E-Mikroskop der Fa. Leica Microscopy and Scientific Instruments Group, Schweiz, durchgeführt. Das DMRB/E-Mikroskop kann zur Fluoreszenzanwendung mit integrierter Auflichtachse vier verschiedene Fluoreszenzfilter bedienen und eignet sich zur Darstellung des in dieser Studie eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffes FITC mit p-Phenylendiamin.

Abbildung 9 zeigt exemplarisch den Snap-Shot der Einheilkapsel eines subkutan eingebrachten Titan-Implantates nach 3 Wochen Implantationsdauer gegen das Matrixprotein Fibronectin gefärbt.

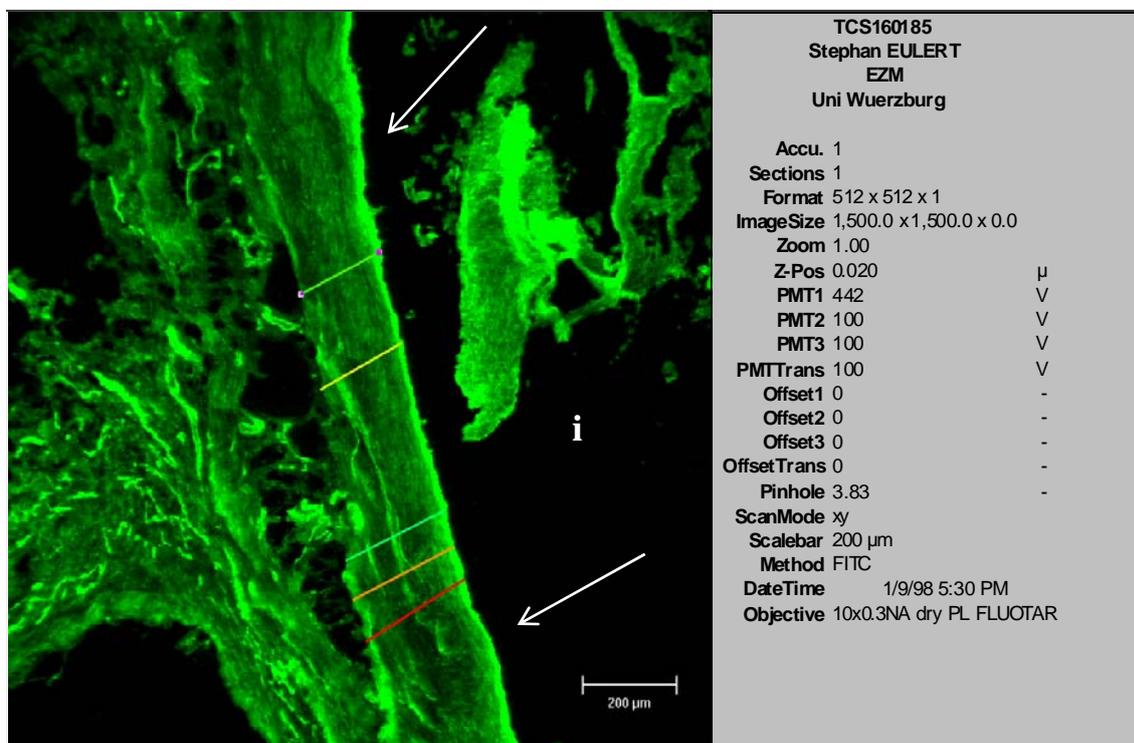


Abbildung 9 Fluoreszenzmessung mit Messbalken durch die Einheilkapsel (weiße Pfeile), i - ehemaliges Implantatlager, 3 Wochen nach subkutaner Titan-Implantation, Fibronectin-Färbung

Die Präparate wurden in der xy-Ebene, parallel zum Objektträger, mikroskopiert. Es konnten keine dreidimensionalen Darstellungen generiert werden, da die Präparate in Cryoschnitten auf den Objektträgern aufgebracht waren. Durch Objektiv- und

Öffnungseinstellung der Pinholes konnte die Schichtdicke in der Z-Achse beliebig festgelegt werden. Hierdurch konnte eine Optimierung der Präparatdarstellung erzielt, und Artefakte durch Unschärfe oder Überlagerungen vermieden werden. Als optimale Schichtdicke wurde nach Exploration an Vorpräparaten eine Schichtdicke von 3,0 μm Z-Dicke mittels konstanter Objektiv- (25x) und Pinhole-Einstellung (3.83) festgelegt. Um Sättigungsphänomene zu vermeiden und die Reproduzierbarkeit der Ausleuchtung zu gewährleisten, wurden Laserleistung und Detektions-Sensibilität ebenfalls fest eingestellt. Die Photodokumentation der Präparate am DRMB/E Mikroskops erfolgte als Snap-Shot (Abbildung 9) mit einer Auflösung von 512 x 512 Bildpunkten, der über Makro-Funktionen im Tabellenkalkulationsprogramm Excel 97 (Fa. Microsoft, Redwood, USA) als Grafik hinterlegt wurde.

2.4 Datenerfassung, statistische Auswertung und Darstellung

Die Datenerfassung am DRMB/E Mikroskop erfolgte in zwei Serien. In der ersten Serie wurde die Dicke der Einheilkapsel, in der zweiten Serie der Intensitätsverlauf der Matrixproteine von implantatnah nach implantatfern gemessen. Hierzu wurden in beiden Serien je fünf Messstrecken individuell über die Einheilkapsel gezogen. Zur Ausmessung der Kapseldicke in der ersten Serie wurden die Endpunkte jeder Messstrecke präzise den Begrenzungen der Einheilkapsel zugeordnet. Anhand der eingezogenen Strecken errechnete die Mikroskopsoftware die entsprechenden Distanzen (xy-Ebene) in μm und importierte die Messwerte über eine Makro-Funktion in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel 97. Die Messstrecken der zweiten Serie wurden über die Begrenzungen der Einheilkapseln hinaus gezogen, um eine bessere Darstellung des Grenzbereiches der Einheilkapsel zu erhalten. Abbildung 10 zeigt exemplarisch ein Snap-Shot einer Einheilkapsel eines subkutan eingebrachten Titan-Implantates nach 3 Wochen Implantationsdauer. Die Fluoreszenzfärbung erfolgte hier gegen das Matrixprotein Kollagen Typ III (C3).

Die Fluoreszenz-Messwerte entlang der Messstrecken wurden als Profil in 8-Bit-Graustufenwerten von minimal 0 bis zu maximal 256 hinterlegt und über eine Makro-

Funktion als Tabelle in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel 97 importiert. Die Tabellen wurden in Form von Spread-Sheets abgelegt.

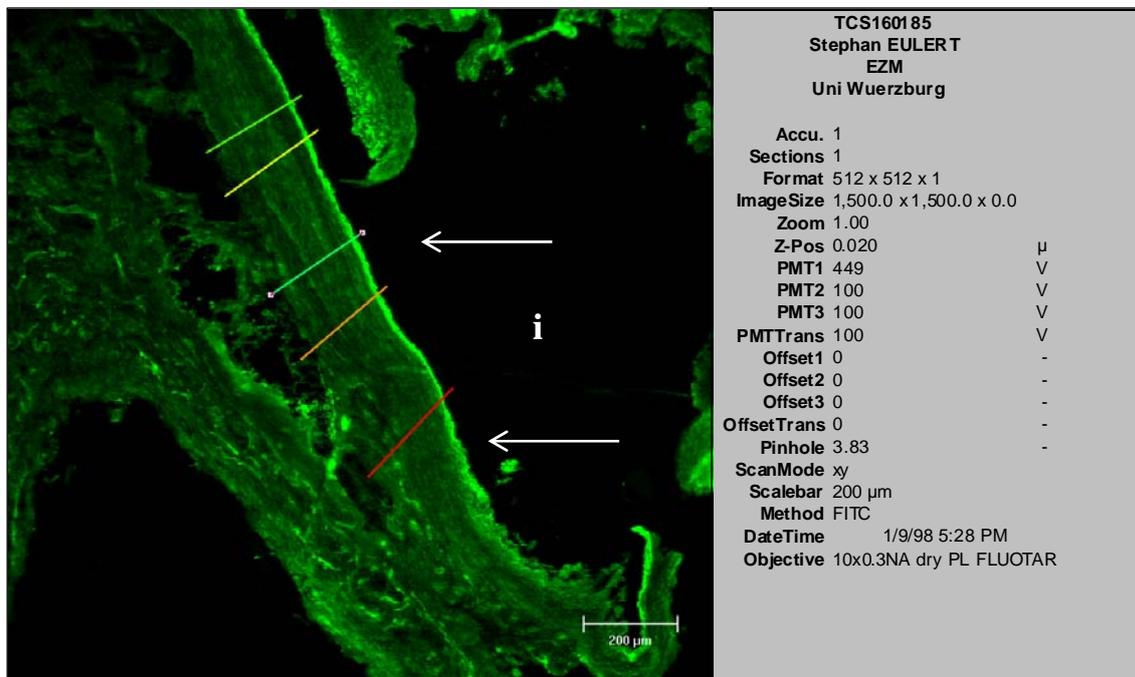


Abbildung 10 Fluoreszenzmessung mit Messbalken durch die Einheilkapsel (weiße Pfeile), i - ehemaliges Implantatlager, 3 Wochen nach subkutaner Titan-Implantation, Kollagen Typ III (C3)

Die generierten Spread-Sheets konnten über einen ODBC-Treiber in SPSS (Version 7.5, SPSS Inc., Chicago, USA) eingelesen werden. In SPSS wurden die eingelesenen Spread-Sheets über ein File-Add-Menue zu einem Gesamtdatensatz zusammengefasst, der in einer ersten Plausibilitätskontrolle auf Vollständigkeit geprüft wurde. Die statistische Auswertung des Datensatzes erfolgte mit SPSS. Die hierzu notwendigen SPSS-Programmierungen sind dem Anhang zu entnehmen (Kapitel 7.4). Die graphische und tabellarische Darstellung der statistisch errechneten Ergebnisse erfolgte nach Rücktransfer der Daten mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel 97. Gemäß Fragestellung und Zielsetzung der hier vorgestellten Studie wurden die gewonnenen Daten zu Kapseldicke und Fluoreszenzprofil der Matrixproteine im Materialvergleich und im Lokalisationsvergleich graphisch gegenüber gestellt.

2.4.1 Materialvergleich

Der Materialvergleich diente der Gegenüberstellung der beiden Implantatwerkstoffe Titan vs. VA-Stahl. Hierbei wurde jede Implantationslokalisierung (subkutan, intramuskulär und intraossär) in Abhängigkeit zum jeweiligen Matrixprotein Kollagen Typ I (C1), Typ III (C3) und Fibronectin einzeln dargestellt.

2.4.2 Lokalisationsvergleich

Der Lokalisationsvergleich diente der Gegenüberstellung der beiden Weichgewebe-Implantationslokalisierungen subkutan vs. intramuskulär eines Implantatwerkstoffes. Die graphische Darstellung berücksichtigte beide Werkstoffe (Titan und VA-Stahl) in Abhängigkeit zum Matrixprotein Kollagen Typ I (C1), Typ III (C3) und Fibronectin.

2.4.3 Kapseldicke

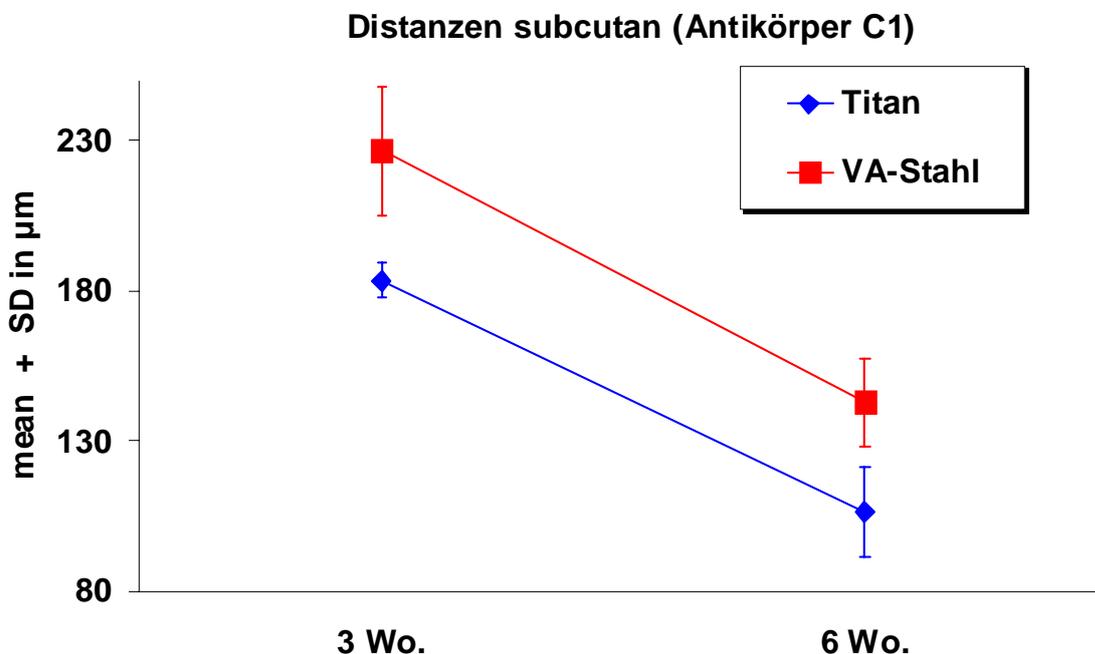


Abbildung 11 Kapseldicke (= Distanz) in μm , Materialvergleich im Zeitverlauf nach subkutaner Implantation, Kollagen Typ I (C1)

Die Ermittlung der Dicke der Einheilkapsel erfolgte anhand des Mess-Parameters Distanz in μm jeder einzelnen Kapsel. Hierbei wurde den jeweiligen Messstrecken jeder einzelnen Probe der gemessene Maximalwert zugeordnet und das arithmetische Mittel mit Standardabweichung gebildet. Die graphische Darstellung der Kapseldicken beinhaltete den Materialvergleich der beiden Werkstoffe (s. 3.4.2.1, 3.4.2.2 und 3.4.2.3) und den Lokalisationsvergleich subkutan vs. intramuskulär (s. 03.4.2.4 und 3.4.2.5). Abbildung 11 zeigt exemplarisch einen graphischen Materialvergleich. Abbildung 12 zeigt exemplarisch einen graphischen Lokalisationsvergleich.

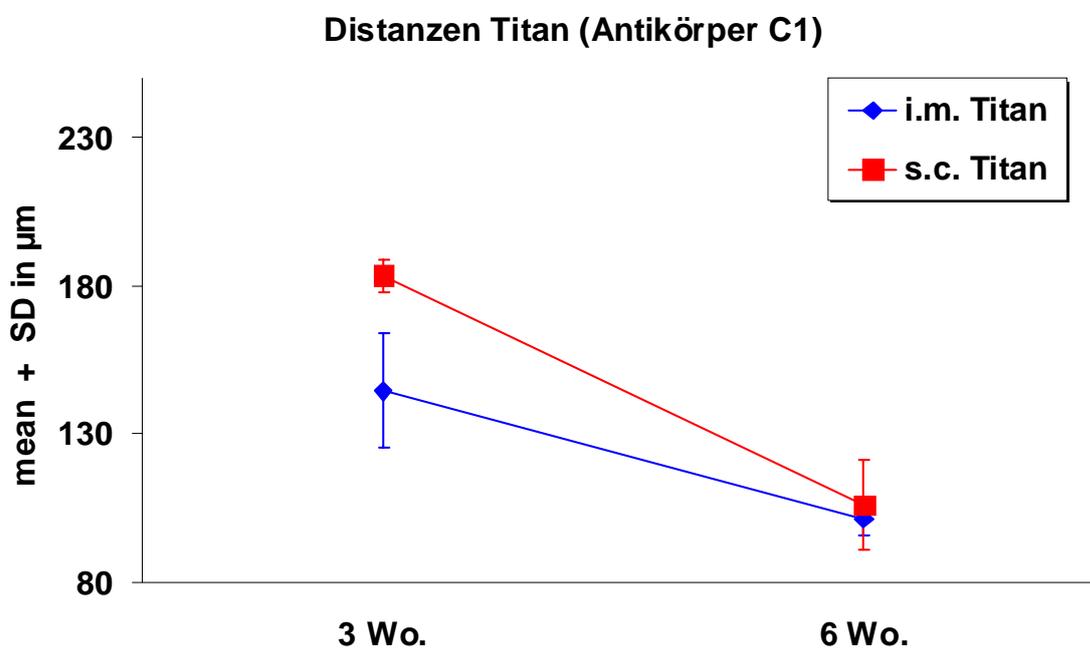


Abbildung 12 Kapseldicke (= Distanz) in μm , im Lokalisationsvergleich und Zeitverlauf nach Titan-Implantation, Kollagen Typ I (C1)

2.4.4 Fluoreszenzprofile der Matrixproteine

Zur Beurteilung der Intensitätsprofile mussten die Messparameter Distanz und Intensität, hier erneut als 8-Bit Graustufenwert von 0 bis 256 miteinander verknüpft werden. Um den Material- und Lokalisationsvergleich durchführen zu können, wurden die einzelnen

Profilmessstrecken jeder Probe zu einem Mittelwert-Profil aggregiert. Hierzu wurden die Einzelprofile über einen Prozentmaßstab standardisiert und innerhalb des jeweiligen Prozentwertebereiches der Distanzskala gemittelt. Zur Hervorhebung von Fokuszonem im implantat- und gewebe-nahen Randbereich der Einheilkapsel wurde das Auflösungsvermögen der Mittelwertprofile in diesen Bereichen erhöht und die Intervallschritte der Skalierung der x-Achse unterschiedlich fokussiert. Implantatnah (0 - 30 %) und gewebe-nah (80 - 100 %) wurde die Skalierung der x-Achse in 5%-Stufen unterteilt. Im mittleren Kapselbereich wurden 10%- beziehungsweise 15%-Schritte eingeteilt. Die graphische Darstellung der Fluoreszenzprofile der Matrixproteine beinhaltete den Materialvergleich der beiden Werkstoffe (s. 3.4.3.1, 3.4.3.2 und 3.4.3.3) und den Lokalisationsvergleich subkutan vs. intramuskulär (s. 3.4.3.4.3.4 und 3.4.3.5). Im Materialvergleich wurden die gewonnenen Mittelwertprofile der periimplantären Einheilkapseln beider Werkstoffe mit Proteinprofilen der scheinoperierten Tiere ohne Implantation und denen der nicht operierten Kontrollgruppe verglichen. Abbildung 13 zeigt exemplarisch den graphischen Materialvergleich. Im Lokalisationsvergleich wurden keine scheinoperierten Tiere und Kontrollgruppen berücksichtigt. Abbildung 14 zeigt exemplarisch den graphischen Lokalisationsvergleich.

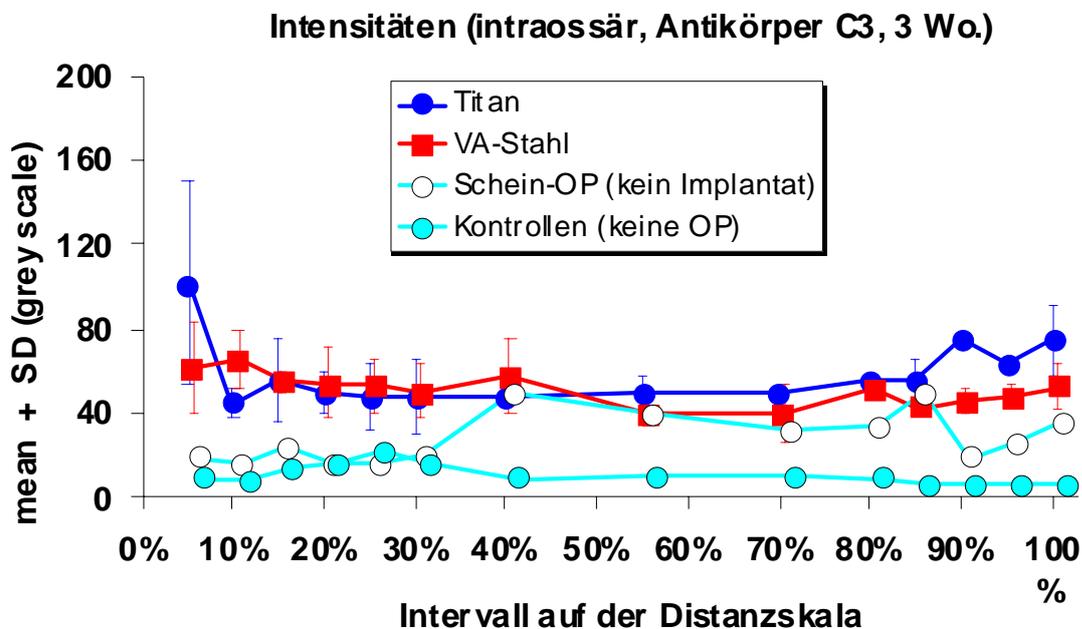


Abbildung 13 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256), Materialvergleich 3 Wochen nach intraossärer Implantation, Kollagen Typ III (C3)

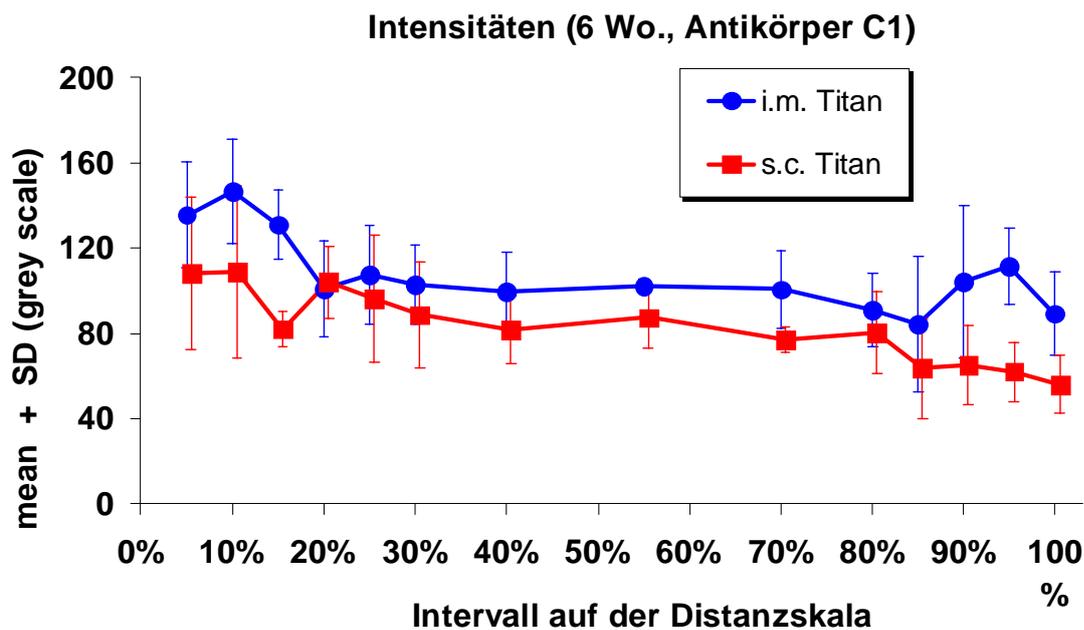


Abbildung 14 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256), Lokalisationsvergleich für Titan, 6 Wochen nach Implantation, Kollagen Typ I (C1)

2.4.5 Signifikanz-Testung

Die Signifikanz-Testung erfolgte zur Meßwiederholungsveränderungsprüfung innerhalb einer Gruppe mittels Wilcoxon-Sign-Rank-Tests (5Mehta, 3Bortz). Die Gruppenunterschiedsprüfung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Tests (5Mehta, 3Bortz). Hierbei wurden die Unterschiede von jeweils zwei unabhängigen Gruppen über die Zeitachse gegeneinander geprüft. Als Grundvoraussetzung zur Anwendbarkeit dieses Testes zählte die Tatsache der vernichtenden Messung. Die Signifikanztests wurden initial für die Signifikanzprüfung von Unterschieden eingesetzt. Allerdings konnte aufgrund der Fallzahl von maximal $n=4$ Tieren je Untergruppe nicht definitiv ausgesagt werden, ob das Ausbleiben einer Signifikanz lediglich der Fallzahl oder tatsächlich Messunterschieden zuzuordnen sind. Daher musste auf eine konsequente Signifikanzprüfung verzichtet werden. Ein Beispiel für die Anwendung und Darstellung des Signifikanztests zeigt Abbildung 15.

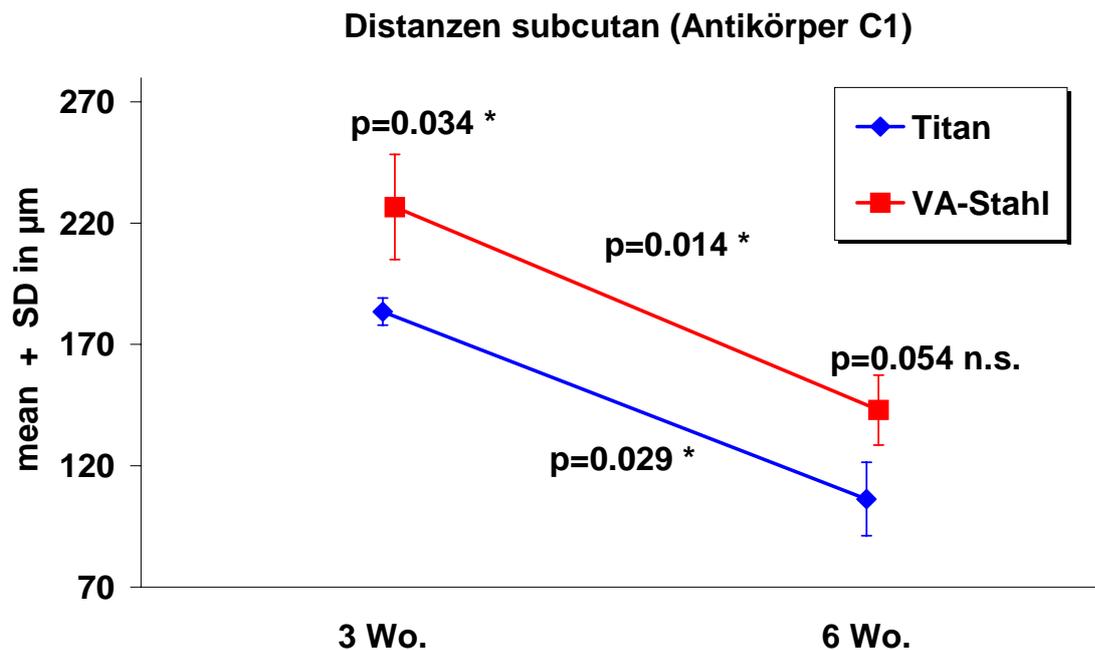


Abbildung 15 Signifikanzprüfung zur Kapseldicke nach subkutaner Implantation im Materialvergleich (alle p-Werte: exakte Tests)

In der SPSS-Gesamtprogrammierung der statistischen Auswertung, dargestellt in Kapitel 7.4 des Anhangs, wurde nach jedem Datentransformationsschritt eine Datenvalidierung anhand eines Daten-Listings und einer Fallzahlkontrolle durchgeführt. Nach Abschluss und Durchlauf der Gesamtprogrammierung konnten die gewonnenen Daten mittels Datentransfer über das D-base-4-Format in Matrizen des Tabellenkalkulationsprogramms Excel 97 überführt werden. Dem schloss sich die Darstellung in Form von Liniendiagrammen an.

In Kapitel 7.3 des Anhangs finden sich alle Datentabellen zu Kapseldicke und Fluoreszenzprofilen der Matrixproteine, die nach statistischer Auswertung mit SPSS im Tabellenkalkulationsprogramm Excel 97 erstellt wurden. Die graphische Umsetzung in Liniendiagramme wird im Ergebnisteil dieser Arbeit präsentiert.

3 Ergebnisse

3.1 Implantate

3.1.1 Implantatdaten

Zur Implantation wurden die Werkstoffe Titan und medizinischer VA-Stahl (316L) verwendet. Gewicht und Abmessungen der Titan- und VA-Stahl-Implantate nach Oberflächenätzung sind im Mittelwert (\emptyset) mit Standardabweichung (+/-) Tabelle 1 und Tabelle 2 zu entnehmen.

Titan	Länge		Breite		Gewicht	
	\emptyset	+/-	\emptyset	+/-	\emptyset	+/-
subkutan	10,20	0,08	2,02	0,03	135,25	2,17
intramuskulär	5,02	0,02	1,60	0,02	42,16	1,52
intraossär	2,80	0,03	1,21	0,02	12,91	0,14

Tabelle 1 Implantatdaten für Titan

VA-Stahl	Länge		Breite		Gewicht	
	\emptyset	+/-	\emptyset	+/-	\emptyset	+/-
subkutan	10,21	0,08	2,02	0,04	238,83	4,30
intramuskulär	5,02	0,01	1,59	0,01	71,39	1,21
intraossär	2,84	0,01	1,20	0,02	22,80	0,23

Tabelle 2 Implantatdaten für VA-Stahl

3.2 Tierentwicklung

Alle Tiere erholten sich komplikationslos von der Operation und zeigten im gesamten Versuchsverlauf keine gesundheitlichen Einschränkungen oder Erkrankungen. Nach initialem postoperativen Gewichtsverlust zeigten die wöchentlichen Verlaufskontrollen in allen implantierten Gruppen nahezu vergleichbare Gewichtszunahmen zur Gruppe der entsprechenden Schein-Op ohne Implantation. Im Lokalisationsvergleich zeigte sich, dass

die subkutan (Abbildung 16) und intramuskulär (Abbildung 17) operierten Gruppen nicht zur Kontrollgruppe wieder aufschließen konnten. Lediglich die Gruppen der intraossär operierten Versuchstiere konnten mit der Kontrollgruppe wieder aufschließen (Abbildung 18).

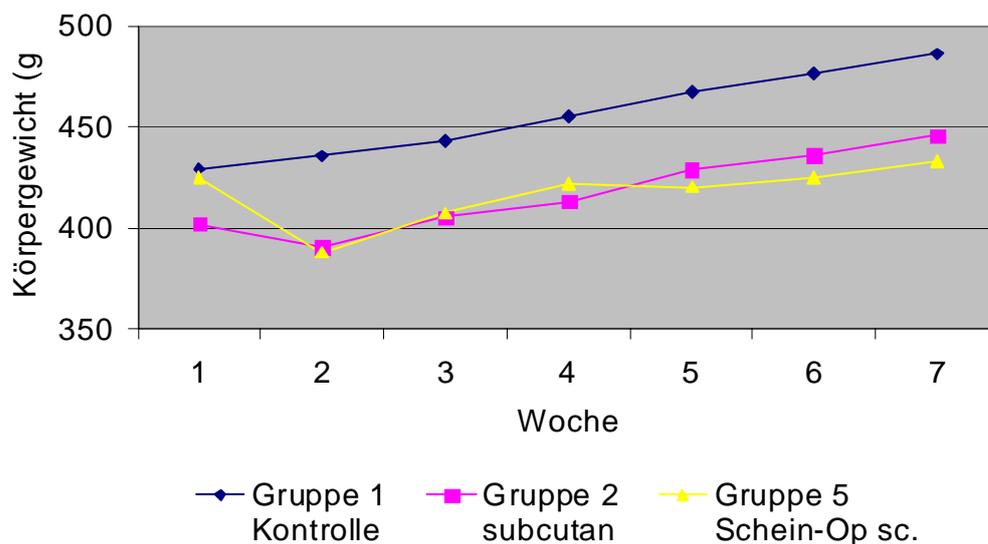


Abbildung 16 Körpergewichtsentwicklung nach subkutaner Operation im Vergleich zur Kontrollgruppe

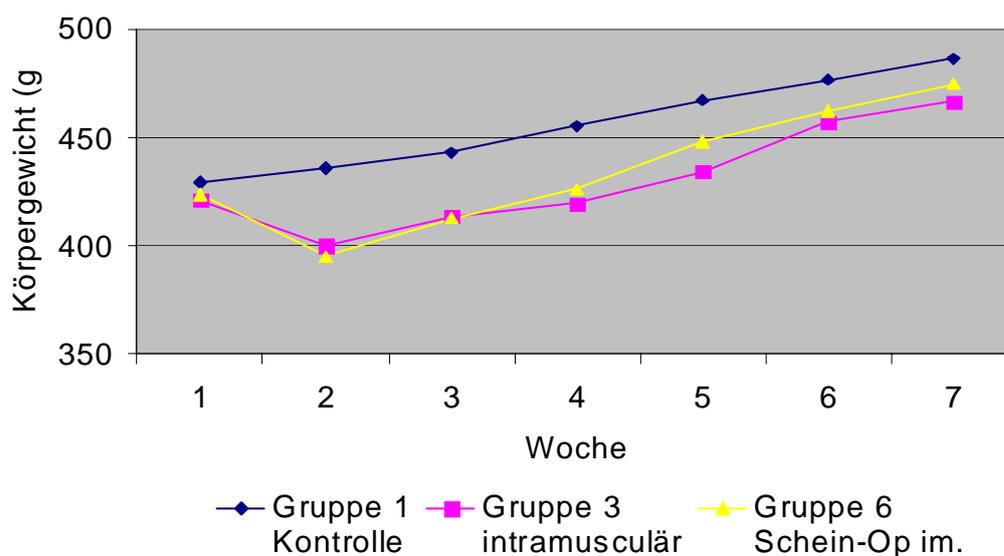


Abbildung 17 Körpergewichtsentwicklung nach intramuskulärer Operation im Vergleich zur Kontrollgruppe

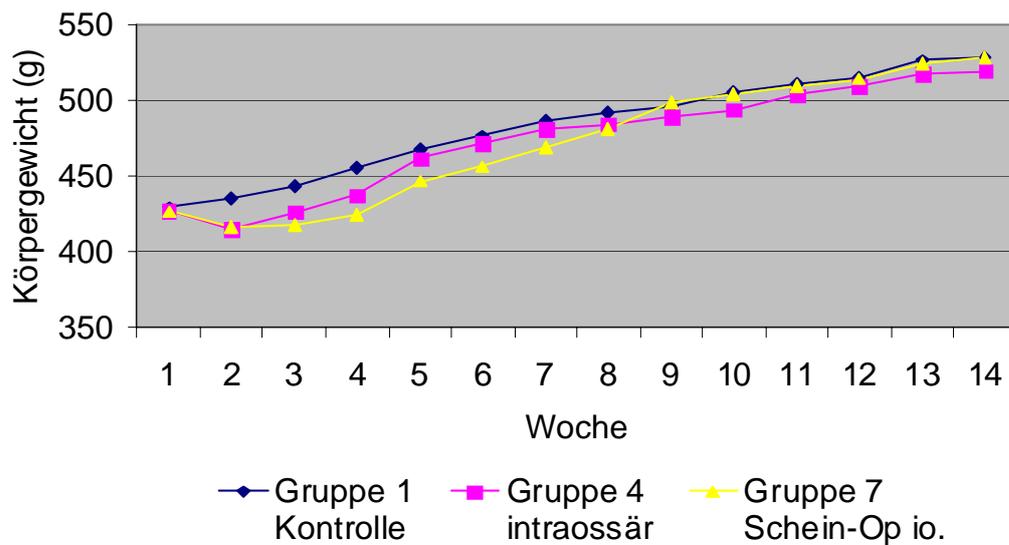


Abbildung 18 Körpergewichtsentwicklung nach intraossärer Operation im Vergleich zur Kontrollgruppe

3.3 Röntgenkontrolle und Probenentnahme

Die Röntgenuntersuchung nach Opferung ergab bei einem Tier 3 Wochen nach intramuskulärer Implantation eine Implantatmigration des caudalen Implantates (Ti) in das Skrotum (Abbildung 19).



Abbildung 19 Implantatanordnung 3 Wochen nach intramuskulärer Implantation, mit einer Implantatabwanderung in das Skrotum

Alle weiteren Implantate waren am ursprünglichen Implantationsort zu finden. Abbildung 20, Abbildung 21 und Abbildung 22 zeigen exemplarisch die jeweiligen Implantatanordnungen an ursprünglicher Insertionslokalisation.



Abbildung 20 Implantatanordnung an ursprünglicher Insertionslokalisation, 6 Wochen nach intramuskulärer Implantation



Abbildung 21 Implantatanordnung an ursprünglicher Insertionslokalisation, 6 Wochen nach subkutaner Implantation



Abbildung 22 Implantatanordnung an ursprünglicher Insertionslokalisierung, 12 Wochen nach intraossärer Implantation

Bei Implantatentfernung fanden sich an keinem Implantat Auffälligkeiten bezüglich entzündlicher Begleitreaktionen, Einblutungen oder Infektionsgeschehen. Die abschließende explorative Obduktion aller Tiere ergab keinen Hinweis auf Begleiterkrankungen oder Malignomformationen.

3.4 Histologie

3.4.1 Kapselqualität

Die histologische Beurteilung der zellulären und kollagenen Kapselqualität anhand der Mehrfach- und Immunperoxidasefärbungen der Weichgewebepräparate der Gruppen 2, 3, 5 und 6 wurde wie folgt eingestuft (Tabelle 3 und Tabelle 4):

subkutan (n)	Grad I	Grad II	Grad III	Grad IV	Grad V
Titan 3 Wo / n = 8	--	3	5	--	--
Titan 6 Wo / n = 8	--	4	4	--	--
VA-Stahl 3 Wo / n = 8	2	4	2	--	--
VA-Stahl 6 Wo / n = 8	2	5	1	--	--
Schein-Op 3 Wo / n = 8	--	--	--	--	8
Schein-Op 6 Wo / n = 8	--	--	--	--	8

Tabelle 3 Kapselqualität nach subkutaner Implantation

intramuskulär	Grad I	Grad II	Grad III	Grad IV	Grad V
Titan 3 Wo / n = 8	2	4	2	--	--
Titan 6 Wo / n = 7	4	2	1	--	--
VA-Stahl 3 Wo / n = 8	1	4	3	--	--
VA-Stahl 6 Wo / n = 8	2	3	3	--	--
Schein-Op 3 Wo / n = 8	--	--	--	--	8
Schein-Op 6 Wo / n = 8	--	--	--	--	8

Tabelle 4 Kapselqualität nach intramuskulärer Implantation

Die Reduktion von ursprünglich n = 8 intramuskulär inserierten Titan-Implantaten auf n = 7 (gelbe Markierung in Tabelle 4) erklärte sich durch die zuvor beschriebene Implantatmigration eines Implantates (Abbildung 19).

3 Wochen nach subcutaner Titan-Implantation (Abbildung 23) zeigten sich vermehrt locker und teils parallel orientierte Kollagenfasern, mit erhöhtem Aufkommen an Fibroblasten und Makrophagen in der Färbung nach Azan (A). Fibronektin zeigte in der Immunperoxidasefärbung eine deutlich erhöhte Anfärbung im implantatnahen Interface (B). Das ehemalige Implantatlager ist mit i gekennzeichnet.

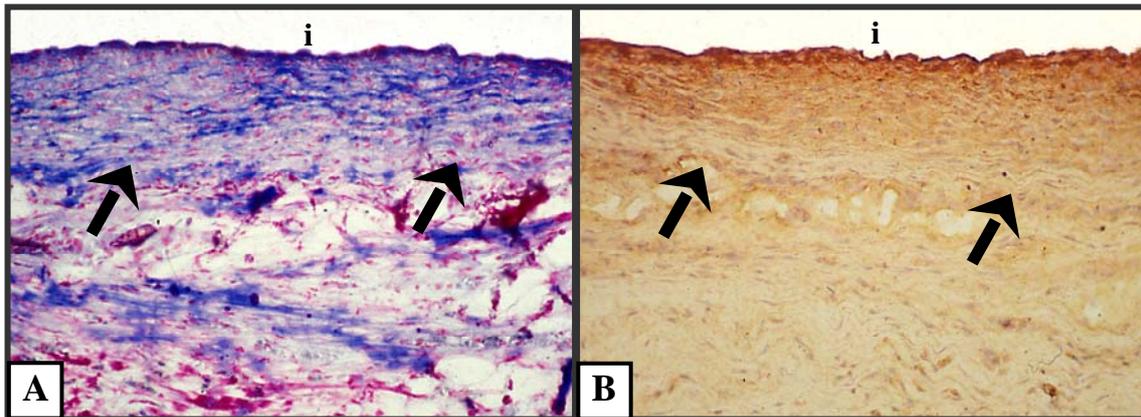


Abbildung 23 Einheilkapsel (Pfeile) 3 Wochen nach subcutaner Titan-Implantation (Vergr. 1:50); i - ehemaliges Implantatlager; A - Azan, B - Immunperoxidase gegen Fibronektin

6 Wochen nach subcutaner Titan-Implantation (Abbildung 24) waren locker und teils parallel orientierte Kollagenfasern, mit erhöhtem Zellaufkommen an Fibroblasten und Makrophagen in der Färbung nach v. Giesson darzustellen (A). Fibronektin konnte mittels Immunperoxidase im implantatnahen Interface verstärkt angefärbt werden (B). Das ehemalige Implantatlager ist mit i gekennzeichnet.

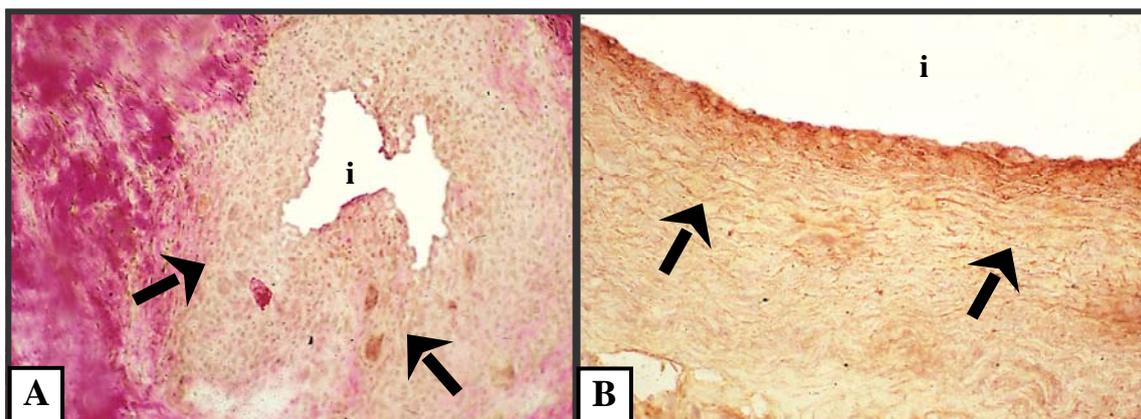


Abbildung 24 Einheilkapsel (Pfeile) 6 Wochen nach subcutaner Titan-Implantation (Vergr. 1:50); i - ehemaliges Implantatlager; A - v. Giesson, B - Immunperoxidase gegen Fibronektin

3 Wochen nach subkutaner VA-Stahl-Implantation (Abbildung 25) konnten vermehrt locker und teils parallel orientierte Kollagenfasern, mit erhöhtem Aufkommen an Fibroblasten und Makrophagen in der Färbung nach v. Giesson (A) nachgewiesen werden. Fibronectin kam deutlich abgeschwächt zur Anfärbung durch die Immunperoxidase (B). Das ehemalige Implantatlager ist mit i gekennzeichnet.

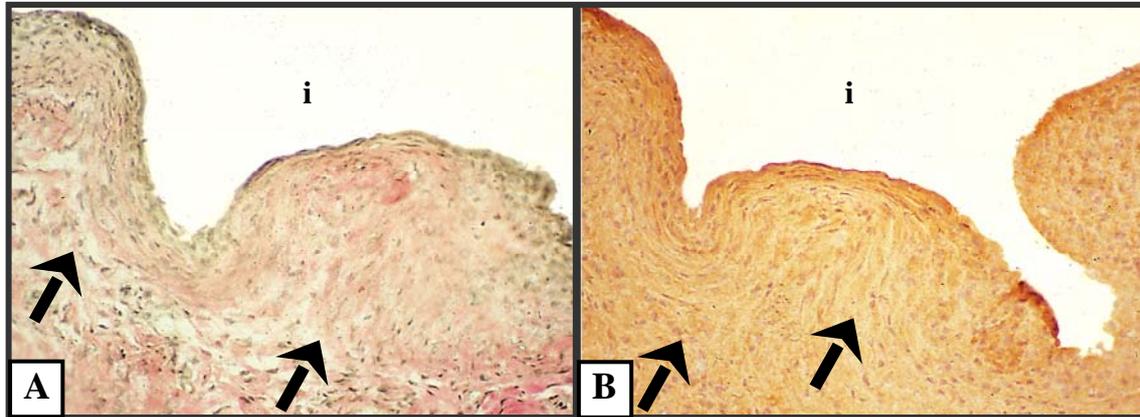


Abbildung 25 Einheilkapsel (Pfeile) 3 Wochen nach subkutaner VA-Stahl-Implantation (Vergr. 1:50); i - ehemaliges Implantatlager; A - v. Giesson, B - Immunperoxidase gegen Fibronectin

6 Wochen nach subkutaner VA-Stahl-Implantation (Abbildung 26) zeigte sich viel parallel angeordnetes Kollagen, mit abnehmendem Aufkommen an Fibroblasten und Makrophagen in der Detektion von Kollagen Typ I mittels Immunperoxidase (A) und einer zunehmenden Immunperoxidasefärbung von Fibronectin (B).

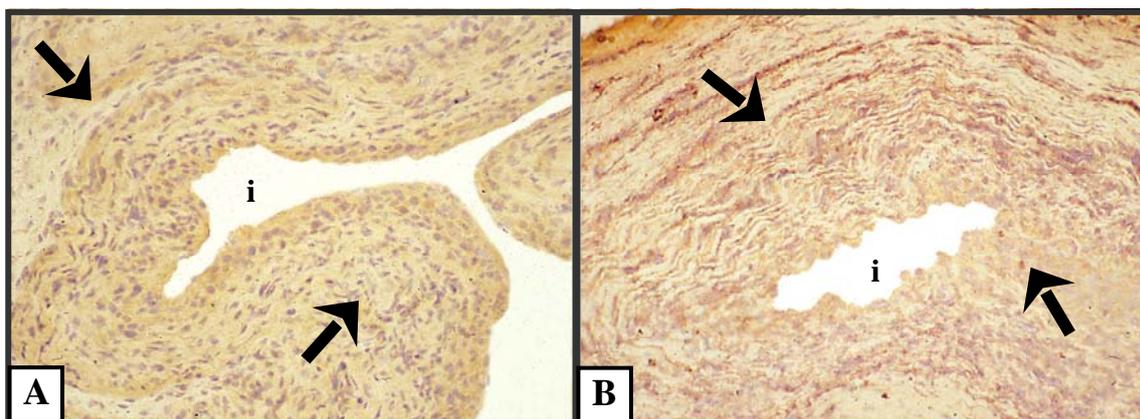


Abbildung 26 Einheilkapsel (Pfeile) 6 Wochen nach subkutaner VA-Stahl-Implantation (Vergr. 1:50); i - ehemaliges Implantatlager; A - Immunperoxidase Kollagen Typ I, B - Immunperoxidase gegen Fibronectin

3 Wochen nach intramuskulärer Titan-Implantation (Abbildung 27) kam ein dichtes, paralleles Kollagenfasergerüst, vorwiegend mit erhöhtem Aufkommen an Fibroblasten in der Anfärbung nach Azan zur Darstellung (A). Fibronektin zeigte eine deutlich verstärkte Immunperoxidasefärbung im implantatnahen Interface (B). Das ehemalige Implantatlager ist mit i gekennzeichnet.

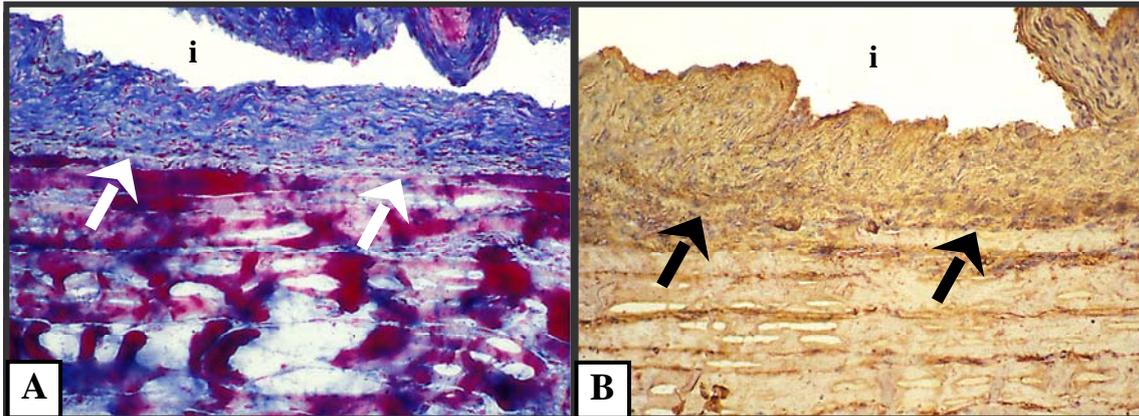


Abbildung 27 Einheilkapsel (Pfeile) 3 Wochen nach intramuskulärer Titan-Implantation (Vergr. 1:50); i - ehemaliges Implantatlager; A - Azan, B - Immunperoxidase gegen Fibronektin

6 Wochen nach intramuskulärer Titan-Implantation (Abbildung 28) zeigte sich in der Anfärbung nach Azan (A) eine dichte, parallele Kollagenkapsel mit geringem Zellanteil und deutlichem Fibronektinnachweis mittels Immunperoxidase (B). Das ehemalige Implantatlager ist mit i gekennzeichnet.

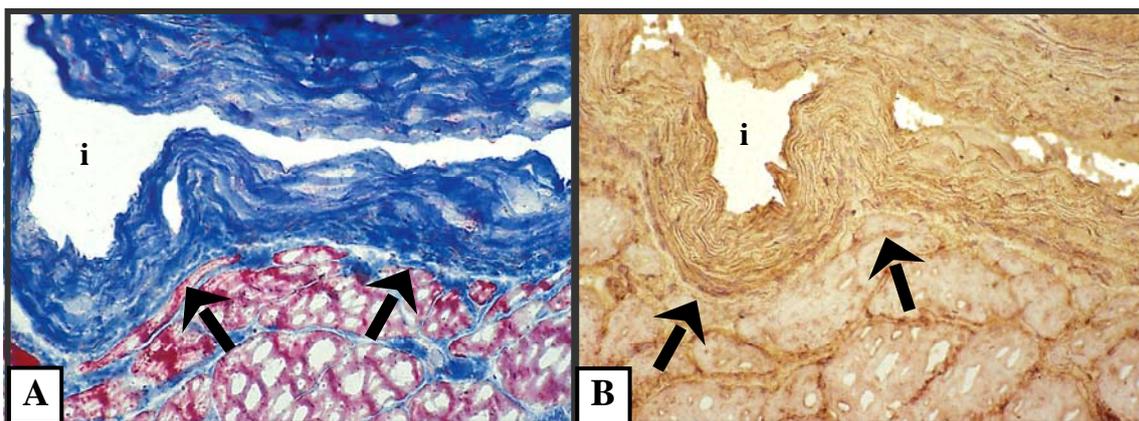


Abbildung 28 Einheilkapsel (Pfeile) 6 Wochen nach intramuskulärer Titan-Implantation (Vergr. 1:50); i - ehemaliges Implantatlager; A - Azan, B - Immunperoxidase gegen Fibronektin

3 Wochen nach intramuskulärer im VA-Stahl-Implantation (Abbildung 29) war reichlich, teils parallel, teils ungeordnetes Kollagen mit hohem Zellanteil in der Azan Färbung (A) bei geringer Fibronektinanfärbung durch Immunperoxidase (B) nachzuweisen. Das ehemalige Implantatlager ist mit i gekennzeichnet.

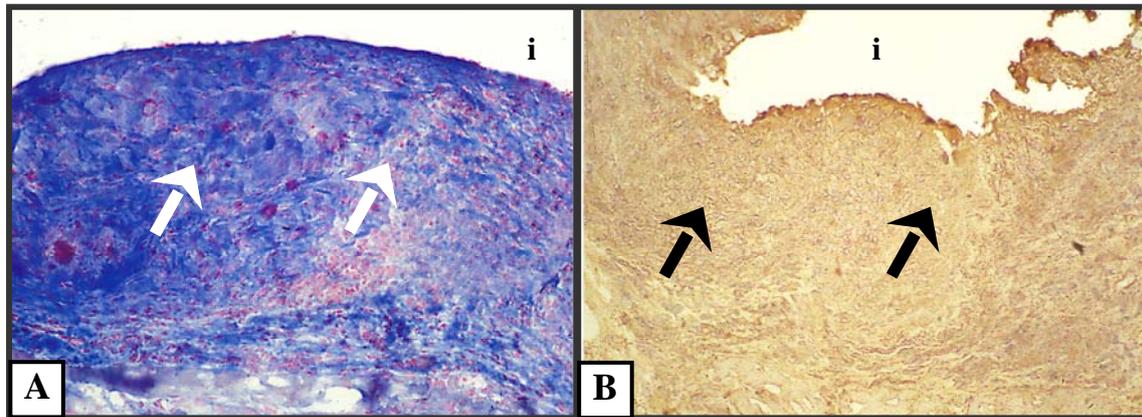


Abbildung 29 Einheilkapsel (Pfeile) 3 Wochen nach intramuskulärer VA-Stahl-Implantation (Vergr. 1:50); i - ehemaliges Implantatlager; A - Azan, B - Immunperoxidase gegen Fibronektin

6 Wochen nach intramuskulärer VA-Stahl-Implantation (Abbildung 30) war viel dicht gepacktes Kollagen mit einem erhöhten Aufkommen an Fibroblasten mittels Färbung nach Azan (A) und eine deutliche Anfärbung der Immunperoxidase gegen Fibronektin (B) darzustellen. Das ehemalige Implantatlager ist mit i gekennzeichnet.

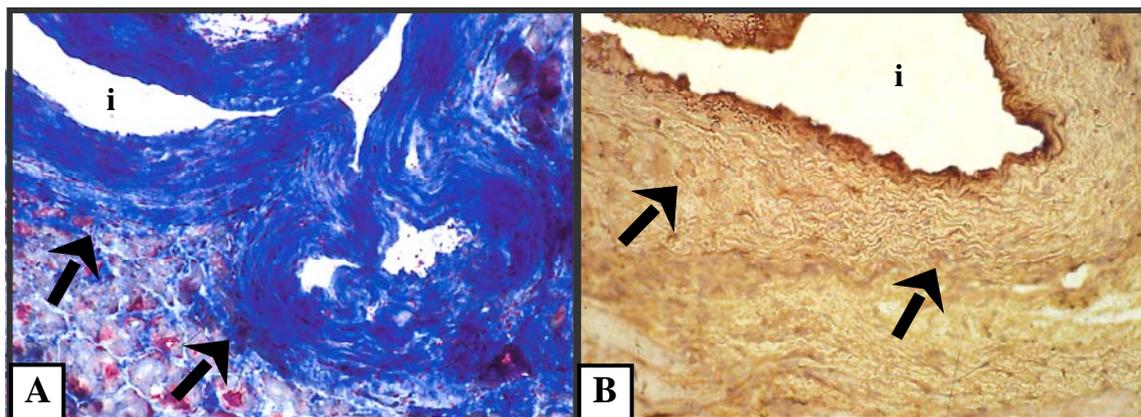


Abbildung 30 Einheilkapsel (Pfeile) 6 Wochen nach intramuskulärer VA-Stahl-Implantation (Vergr. 1:50); i - ehemaliges Implantatlager; A - Azan, B - Immunperoxidase gegen Fibronektin

3.4.2 Kapseldicke

3.4.2.1 Materialvergleich subkutan

Abbildung 31 bis 33 zeigen die Dicke der periimplantären Einheilkapseln im Materialvergleich der Werkstoffe Titan vs. VA-Stahl bei subkutaner Implantation. Alle subkutan eingebrachten Implantate wiesen für Kollagen Typ I, Typ III und Fibronectin abnehmende Kapseldicken im Verlauf von 3 zu 6 Wochen Implantationsdauer auf. Im Materialvergleich beider Werkstoffe waren die Einheilkapseln um subkutan eingebrachte Titanimplantate bei Antikörperfärbung gegen Kollagen Typ I und Typ III über beide Implantationszeiträume dünner als die Einheilkapseln um VA-Stahl. Es ergab sich keine Korrelationen zu den ermittelten Kapselqualitäten aus Kapitel 3.4.1. Die Absolutwerte der Kapseldicken sind Tabelle 5 des Anhangs zu entnehmen.

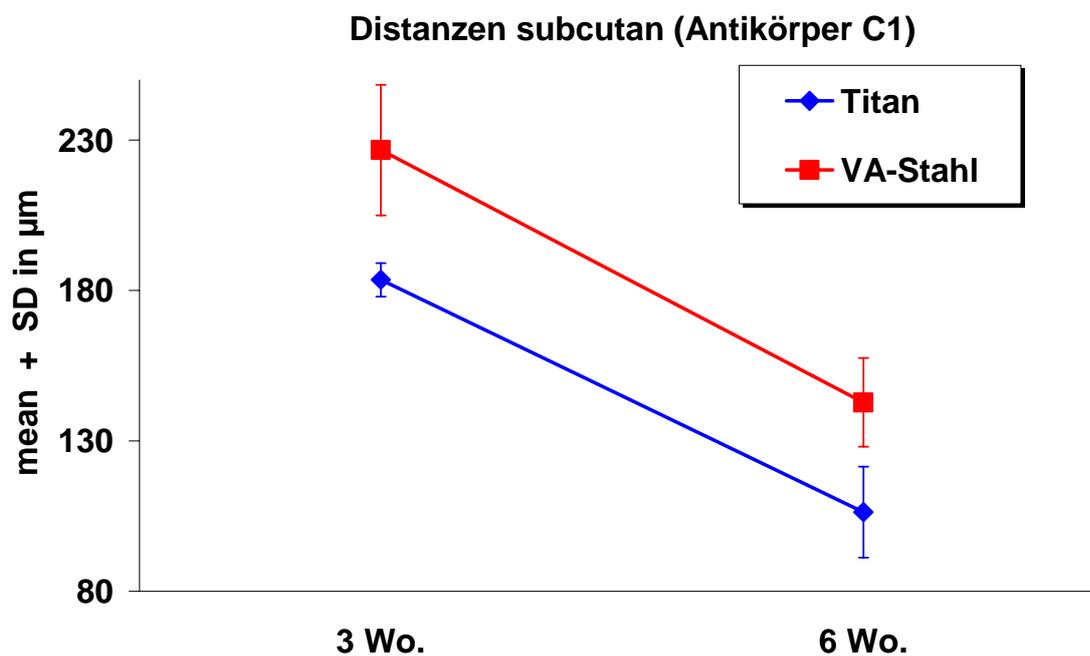


Abbildung 31 Kapseldicke (= Distanz) in μm , im Materialvergleich nach subkutaner Implantation, Kollagen Typ I (C1)

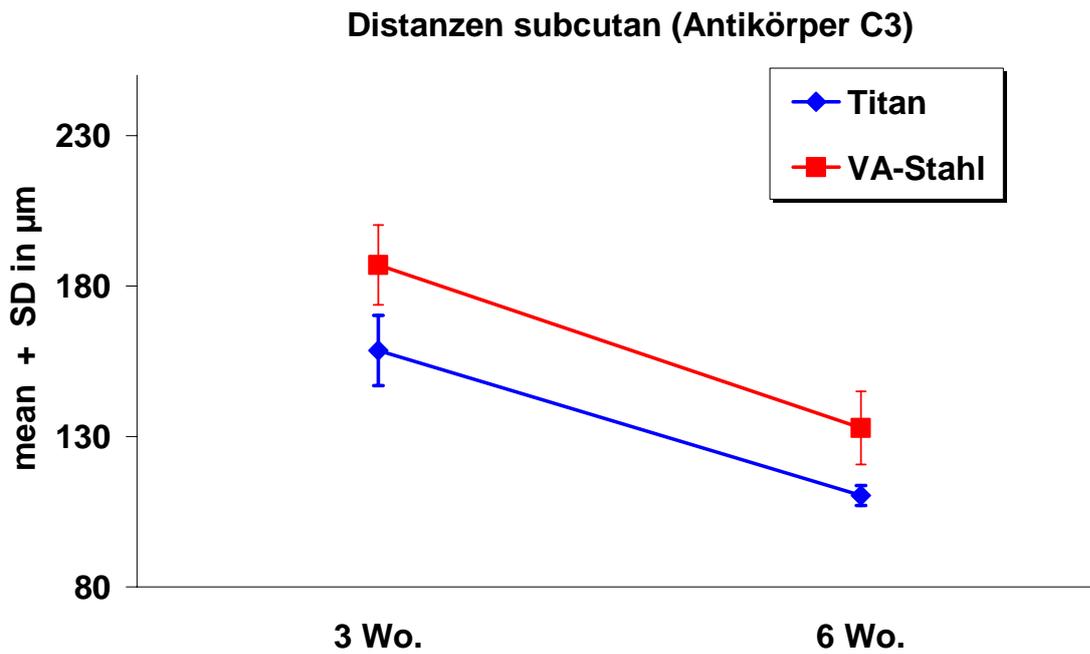


Abbildung 32 Kapseldicke (= Distanz) in μm , im Materialvergleich nach subkutaner Implantation, Kollagen Typ III (C3)

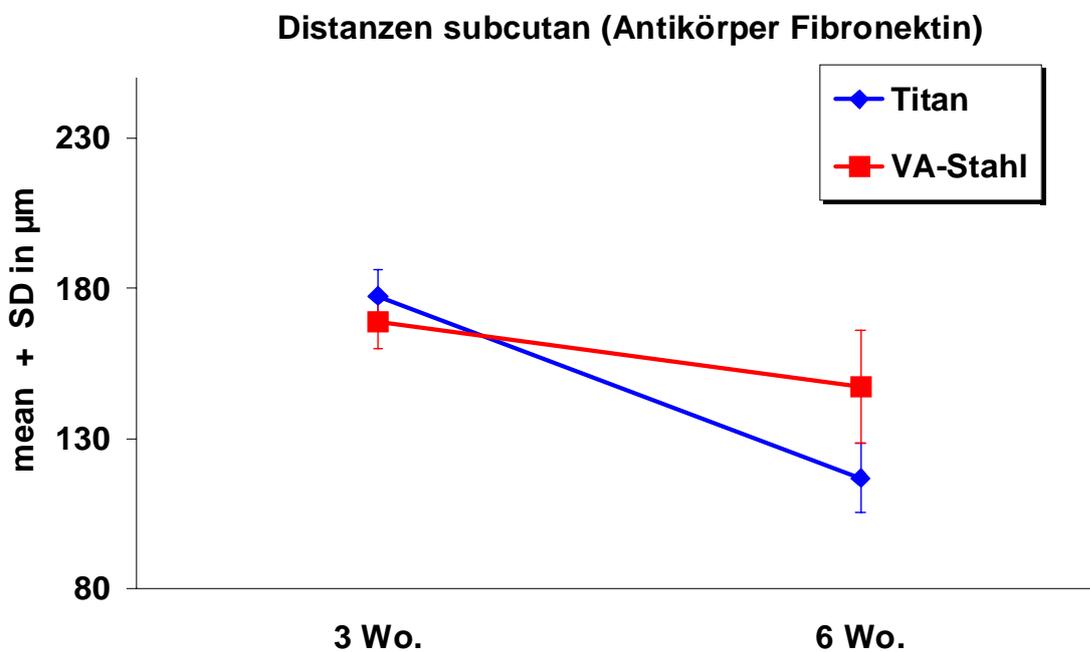


Abbildung 33 Kapseldicke (= Distanz) in μm , im Materialvergleich nach subkutaner Implantation, Fibronectin

3.4.2.2 Materialvergleich intramuskulär

Abbildung 34 bis 36 zeigen die Dicke der periimplantären Einheilkapseln im Materialvergleich der Werkstoffe Titan vs. VA-Stahl bei intramuskulärer Implantation. Alle intramuskulär eingebrachten Implantate wiesen für Kollagen Typ I (C1), Kollagen Typ III (C3) und Fibronectin abnehmende Kapseldicken im Verlauf von 3 zu 6 Wochen Implantationsdauer vor. Im Materialvergleich beider Werkstoffe waren die Dicken der Einheilkapseln unter Berücksichtigung der Standardabweichung vergleichbar und darüber hinaus inkonstant. Lediglich bei Antikörperfärbung gegen Kollagen Typ III über 3 und 6 Wochen waren etwas dünnere Einheilkapseln um VA-Stahl auszumessen. Es ergab sich keine Korrelation zu den ermittelten Kapselqualitäten aus Kapitel 3.4.1. Die Absolutwerte der Kapseldicken sind der Tabelle 5 des Anhangs zu entnehmen.

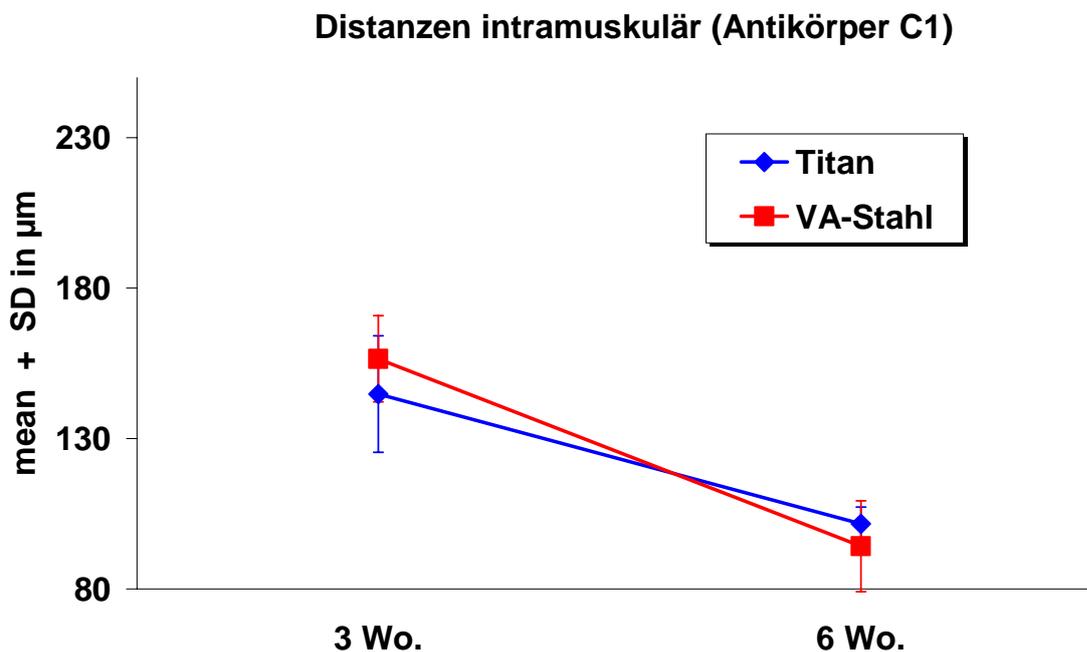


Abbildung 34 Kapseldicke (= Distanz) in μm , im Materialvergleich nach intramuskulärer Implantation, Kollagen Typ I (C1)

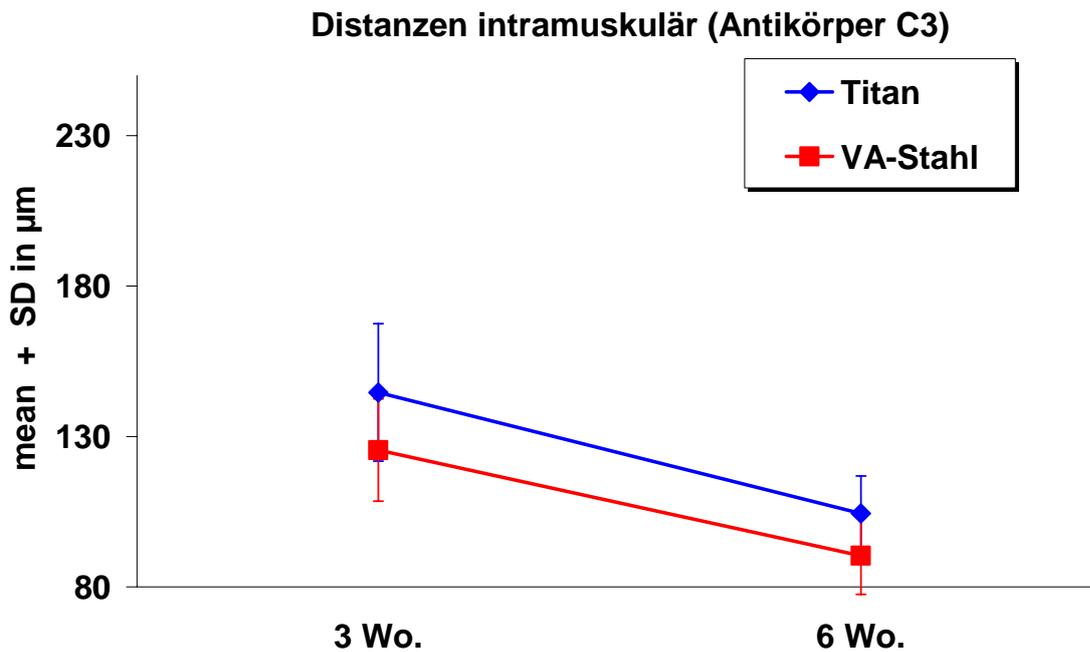


Abbildung 35 Kapseldicke (= Distanz) in μm , im Materialvergleich nach intramuskulärer Implantation, Kollagen Typ III (C3)

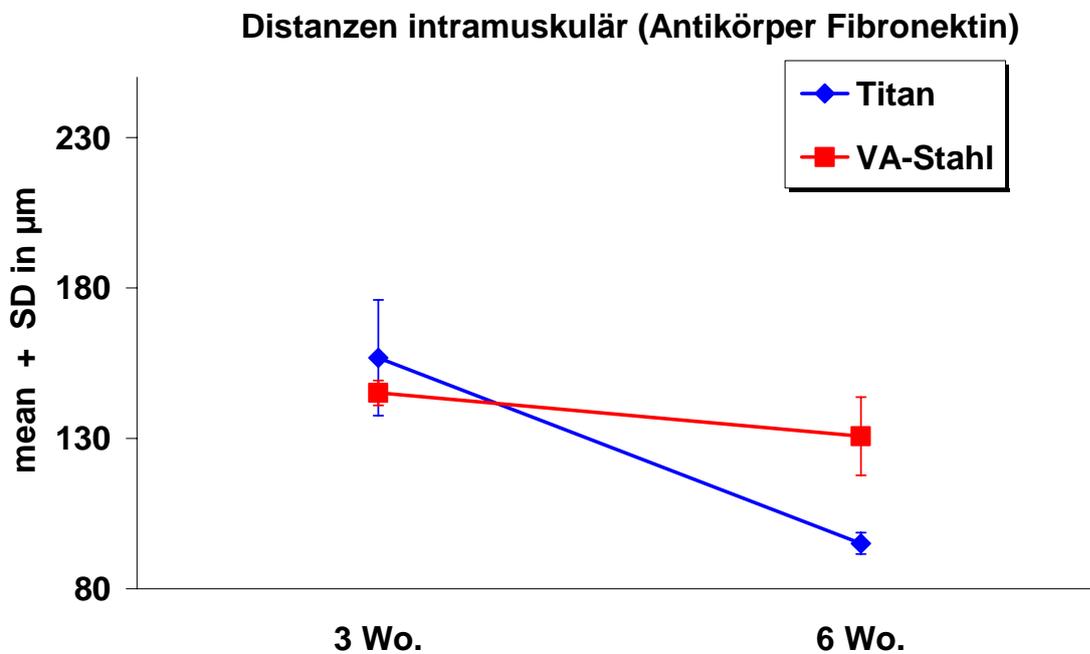


Abbildung 36 Kapseldicke (= Distanz) in μm , im Materialvergleich nach intramuskulärer Implantation, Fibronectin

3.4.2.3 Materialvergleich intraossär

Abbildung 37 bis 39 zeigen im Materialvergleich Titan vs. VA-Stahl die Dicke der Kallusformation um intraossär inserierte Implantate. Die Distanzmessungen intraossär ergaben im Materialvergleich deutlich dünnere Kallusformationen für VA-Stahl in allen Proteinfluoreszenzen. Im zeitlichen Verlauf von 3 zu 6 sowie 12 Wochen Implantationsdauer kam es zu vernachlässigbaren Verbreiterungen sowie auch Verschmälerungen der Kallusdicke. Die Absolutwerte der Kallusdicken sind Tabelle 5 des Anhangs zu entnehmen.

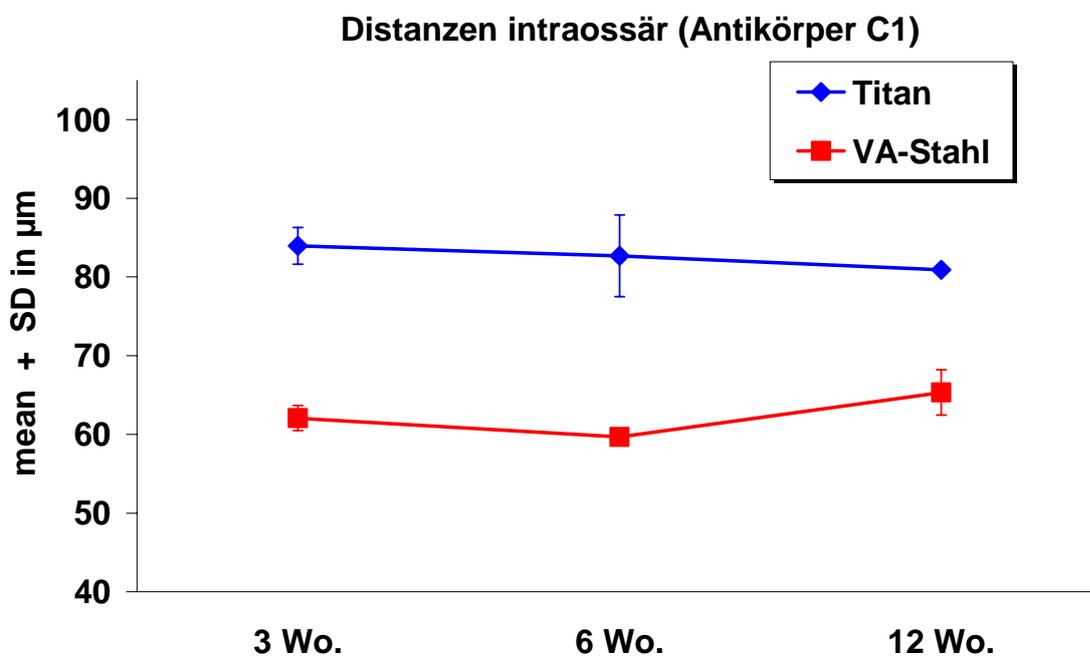


Abbildung 37 Kallusdicken (= Distanz) in µm, im Materialvergleich nach intraossärer Implantation, Kollagen Typ I (C1)

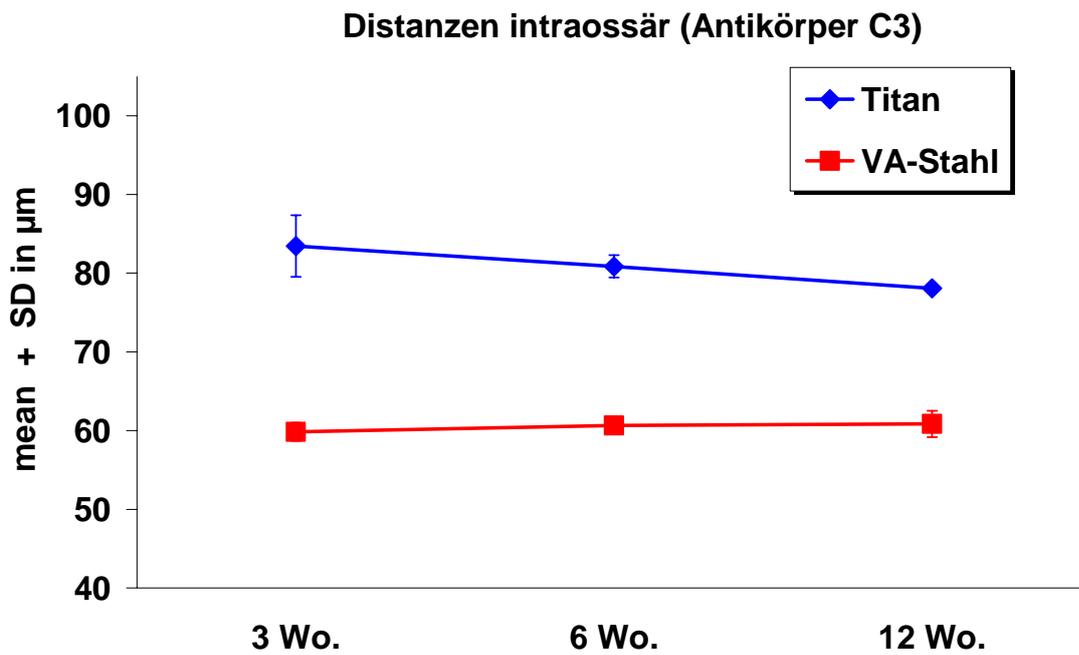


Abbildung 38 Kallusdicken (= Distanz) in μm , im Materialvergleich nach intraossärer Implantation, Kollagen Typ III (C3)

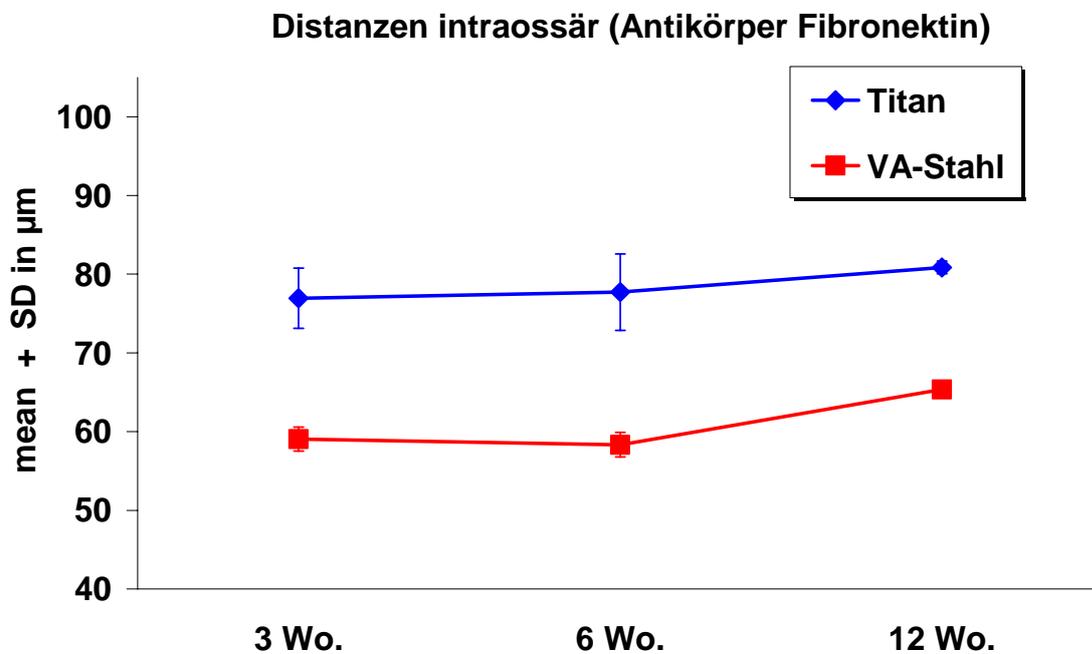


Abbildung 39 Kallusdicken (= Distanz) in μm , im Materialvergleich nach intraossärer Implantation, Fibronectin

3.4.2.4 Lokalisationsvergleich für Titan

Abbildung 40 bis 42 zeigen die Kapseldicke für Titan-Implantate im Lokalisationsvergleich subkutan vs. intramuskulär bei Proteindarstellung von Kollagen Typ I (C1), Typ III (C3) und Fibronectin. In allen Proteindarstellungen heilten intramuskulär eingebrachte Titan-Implantate in dünneren Kapseln ein, als subkutan eingebrachte Implantate. Über beide Implantationszeiträume blieb dieses Verhältnis konstant. Es ergab sich keine Korrelation zu den ermittelten Kapselqualitäten aus Kapitel 3.4.1. Die Absolutwerte der Kapseldicken sind der Tabelle 5 des Anhangs zu entnehmen.

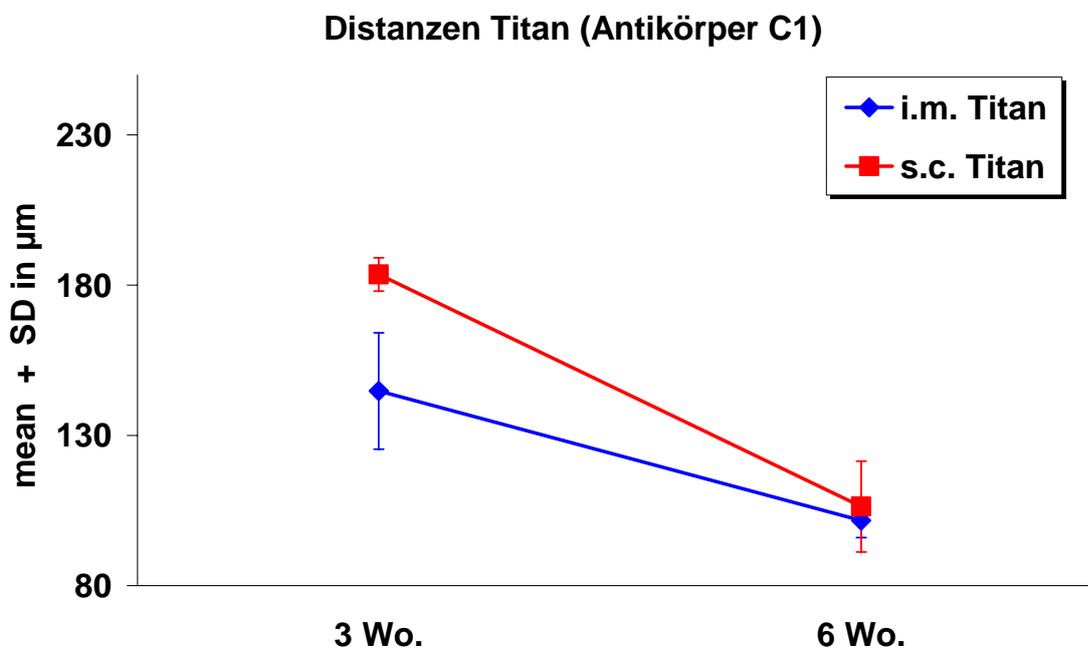


Abbildung 40 Kapseldicke (= Distanz) in μm , im Lokalisationsvergleich nach Titan-Implantation, Kollagen Typ I (C1)

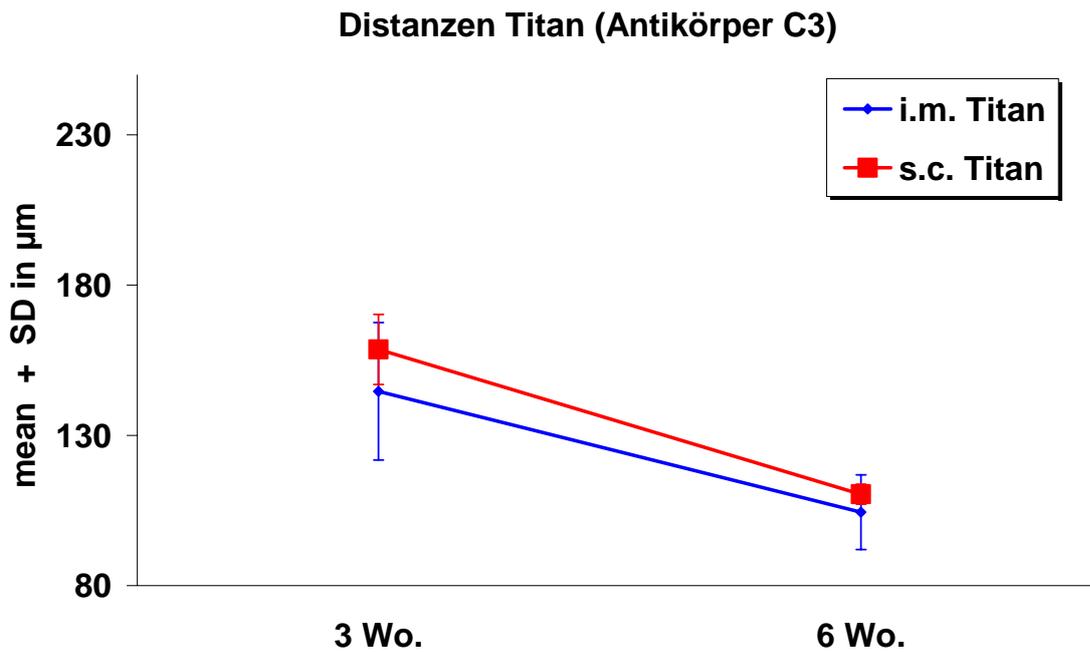


Abbildung 41 Kapseldicke (= Distanz) in μm , im Lokalisationsvergleich nach Titan-Implantation, Kollagen Typ III (C3)

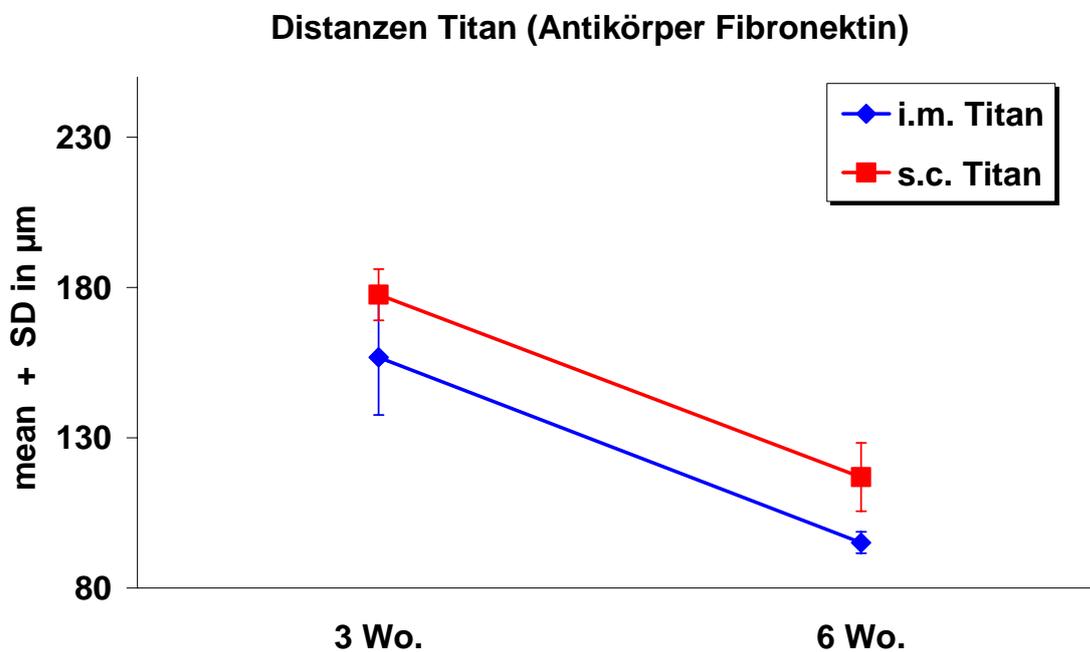


Abbildung 42 Kapseldicke (= Distanz) in μm , im Lokalisationsvergleich nach Titan-Implantation, Fibronectin

3.4.2.5 Lokalisationsvergleich für VA-Stahl

Abbildung 43 bis 45 zeigen die Kapseldicke für VA-Stahl-Implantate im Lokalisationsvergleich subkutan vs. intramuskulär bei Proteindarstellung von Kollagen Typ I (C1), Typ III (C3) und Fibronectin. Alle intramuskulär eingebrachten VA-Stahl-Implantate ergaben dünnere periimplantäre Einheilkapseln, als subkutan eingebrachte VA-Stahl-Implantate. Dies konnte über beide Implantationsdauern beobachtet werden. Die deutlichsten Unterschiede der Kapseldicken ergaben sich im Lokalisationsvergleich subkutan vs. intramuskulär für VA-Stahl-Implantate bei Detektion von Kollagen Typ I und Typ III. Es ergab sich keine Korrelation zu den ermittelten Kapselqualitäten aus Kapitel 3.4.1 Die Absolutwerte der Kapseldicken sind der Tabelle 5 des Anhangs zu entnehmen.

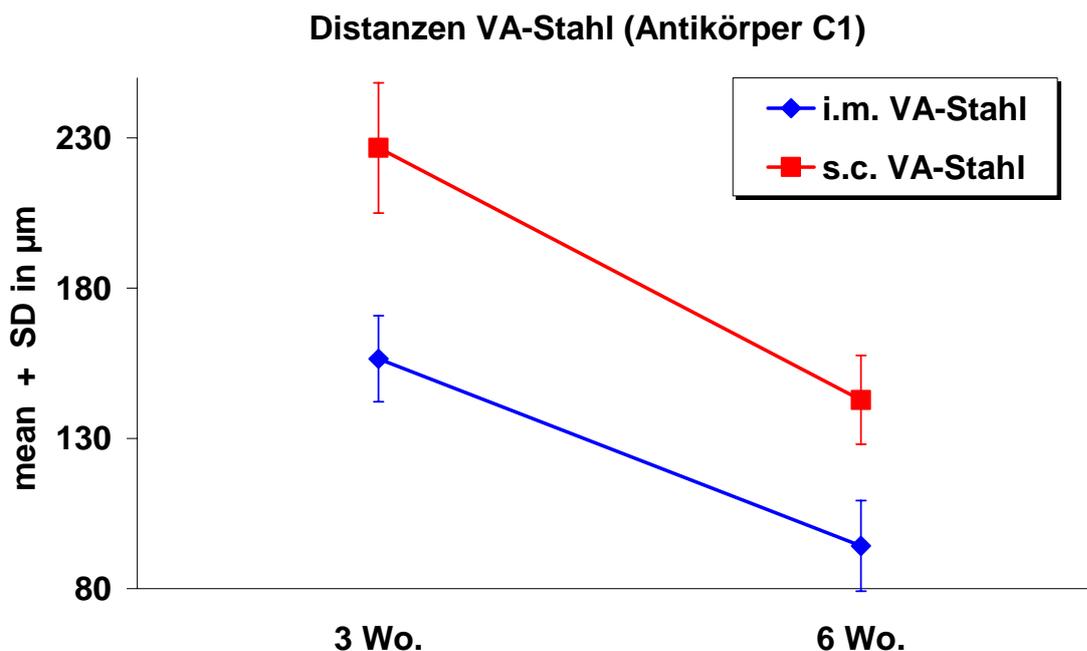


Abbildung 43 Kapseldicke (= Distanz) in μm , im Lokalisationsvergleich nach VA-Stahl-Implantation, Kollagen Typ I (C1)

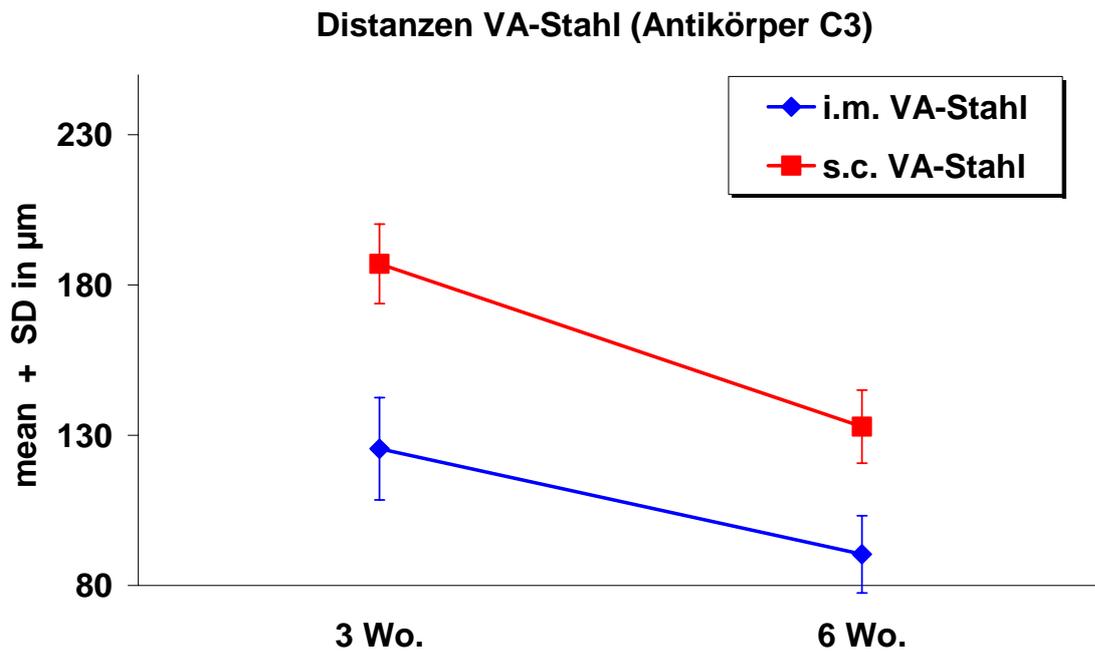


Abbildung 44 Kapseldicke (= Distanz) in μm , im Lokalisationsvergleich nach VA-Stahl-Implantation, Kollagen Typ III (C3)

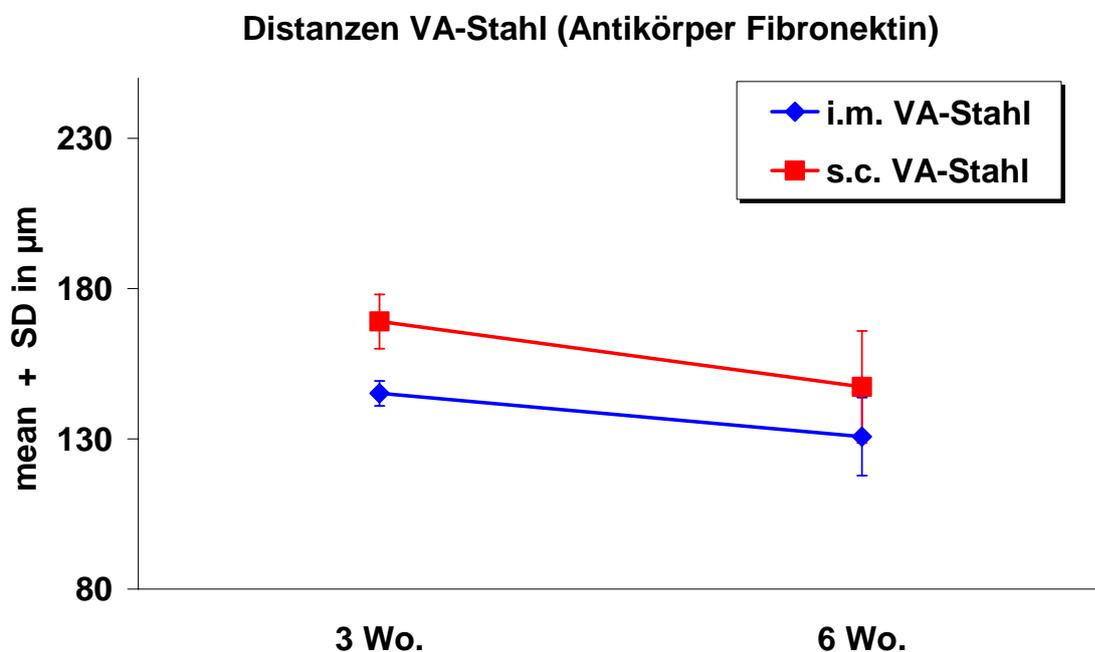


Abbildung 45 Kapseldicke (= Distanz) in μm , im Lokalisationsvergleich nach VA-Stahl-Implantation, Fibronectin

3.4.3 Fluoreszenzprofile der Matrixproteine

3.4.3.1 Materialvergleich subkutan

Abbildung 46 zeigt die Implantatkapsel (Pfeile) 3 Wochen nach subkutaner Titan-Implantation mit ehemaligem Implantatlager (i) gegen alle drei Matrixproteine.

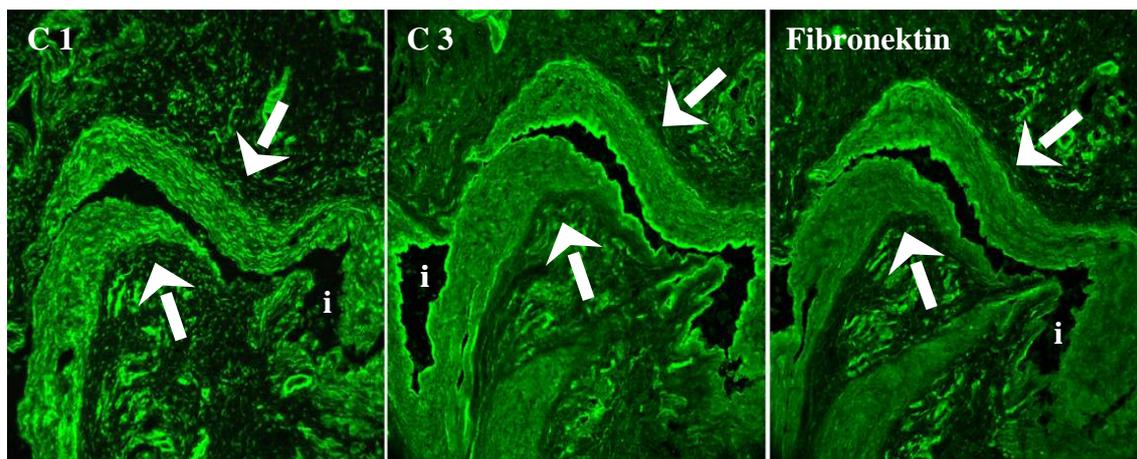


Abbildung 46 Implantatkapsel (Pfeile) 3 Wochen nach subkutaner Titan-Implantation (Vergr. ca. 1:50); i - ehemaliges Implantatlager; C1 - Kollagen Typ I, C3 - Kollagen Typ III, Fibronectin

Abbildung 47 bis 52 zeigen im Materialvergleich Titan vs. VA-Stahl die Fluoreszenzprofile der subkutanen, periimplantären Einheilkapseln bei Färbung gegen Kollagen Typ I (C1), Kollagen Typ III (C3) und Fibronectin. Als Vergleichskollektive sind die subkutan scheinoperierten Präparate ohne Implantation und nicht operierten Kontrollpräparate aufgeführt. Die Absolutwerte der subkutanen Fluoreszenzprofile sind den Tabelle 6 bis Tabelle 11 des Anhangs zu entnehmen. In den implantatnahen Kapselanteilen (0 - 30 %) konnten trotz deutlicher Standardabweichungen für beide Werkstoffe erhöhte Fluoreszenz-Intensitäten in allen Proteinfärbungen im 3- und 6-Wochen-Intervall dargestellt werden. In den mittleren (30 - 70 %) und den implantatfernen Kapselabschnitten (70 - 100 %) zeigten beide Werkstoffe nur für Kollagen Typ I (C1) in beiden Zeitintervallen höhere Fluoreszenzwerte als scheinoperierte und nicht operierte subkutane Gewebe. Kollagen Typ III (C3) und Fibronectin zeigten hier keine deutlichen Fluoreszenzunterschiede zu den Vergleichskollektiven.

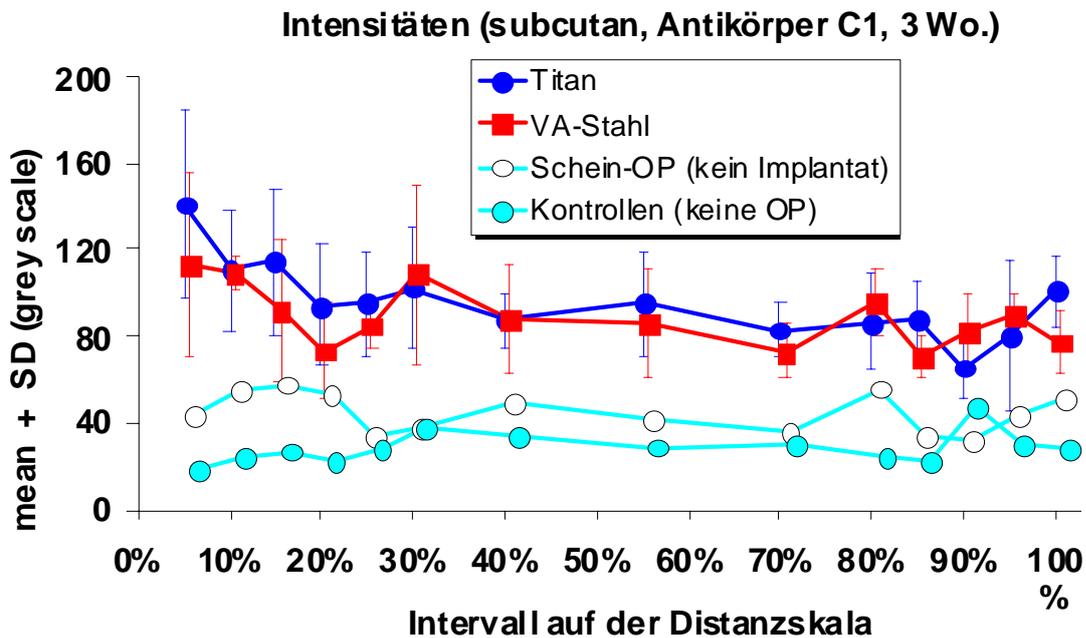


Abbildung 47 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256), im Materialvergleich, 3 Wochen nach subkutaner Implantation, Kollagen Typ I (C1)

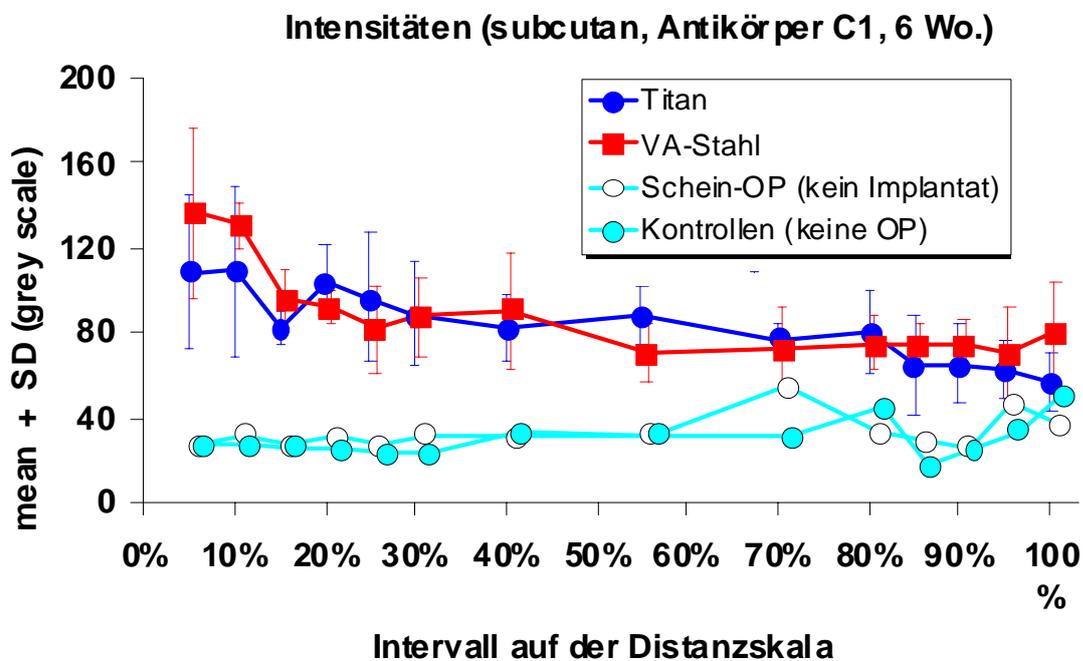


Abbildung 48 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256), im Materialvergleich, 6 Wochen nach subkutaner Implantation, Kollagen Typ I (C1)

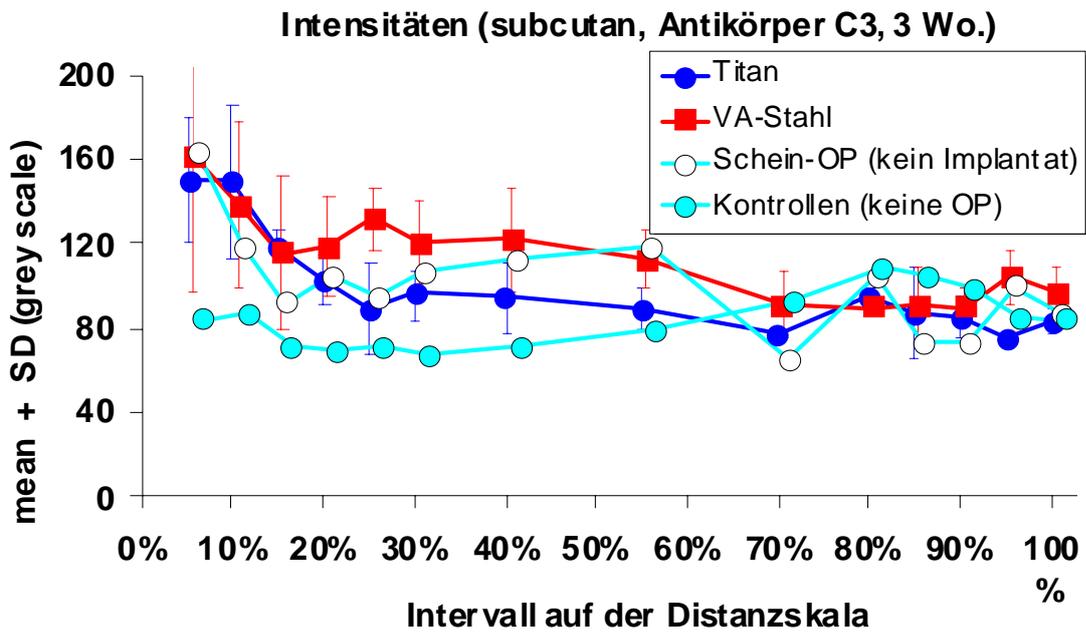


Abbildung 49 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256), im Materialvergleich, 3 Wochen nach subkutaner Implantation, Kollagen Typ III (C3)

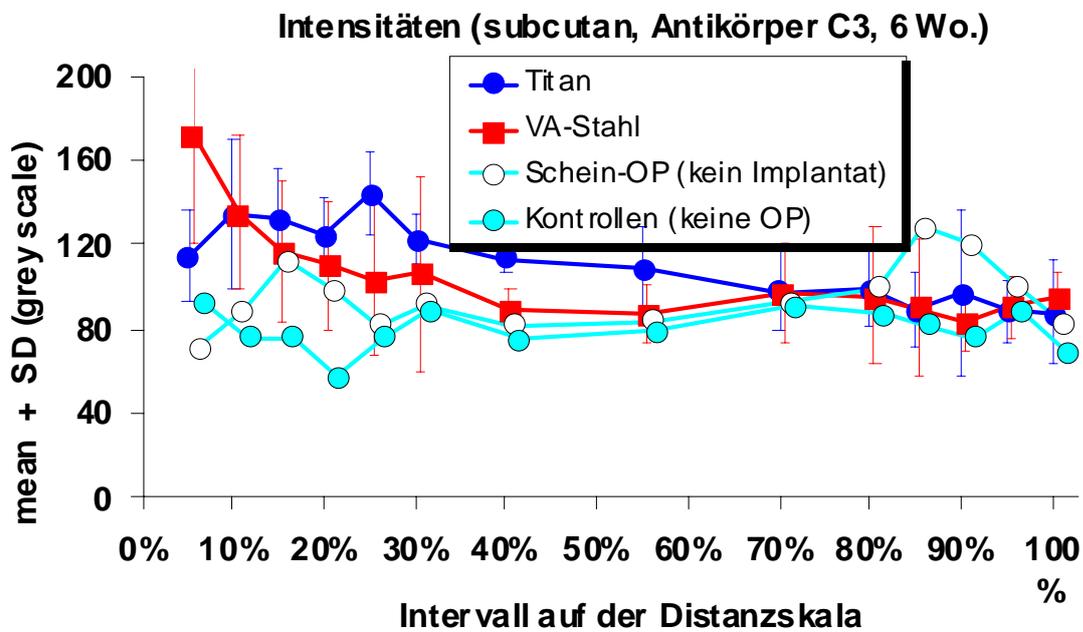


Abbildung 50 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256), im Materialvergleich, 6 Wochen nach subkutaner Implantation, Kollagen Typ III (C3)

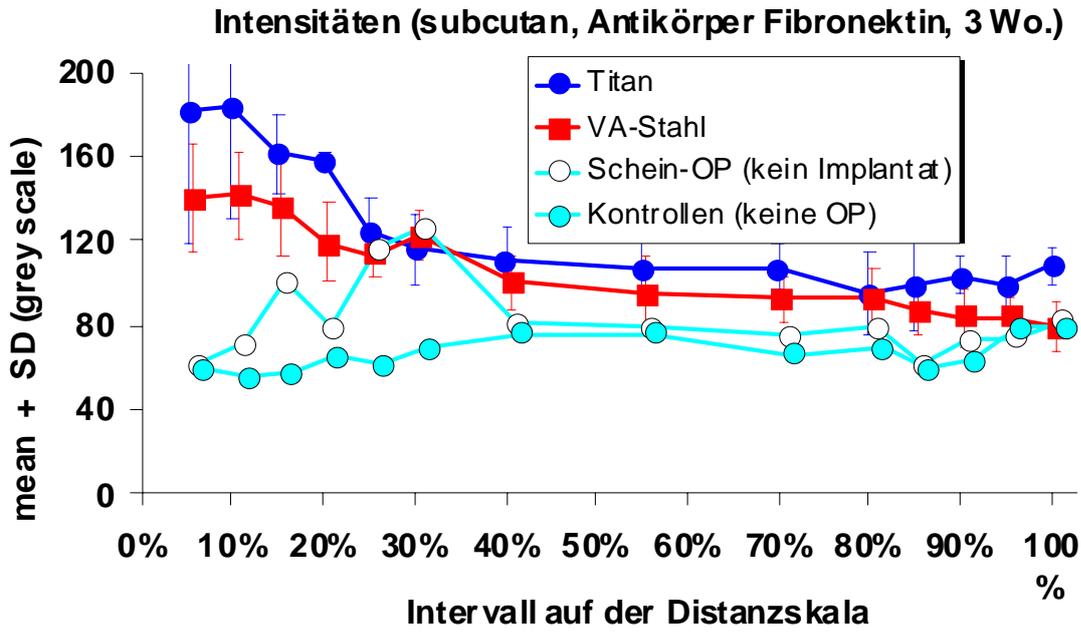


Abbildung 51 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256), im Materialvergleich, 3 Wochen nach subkutaner Implantation, Fibronectin

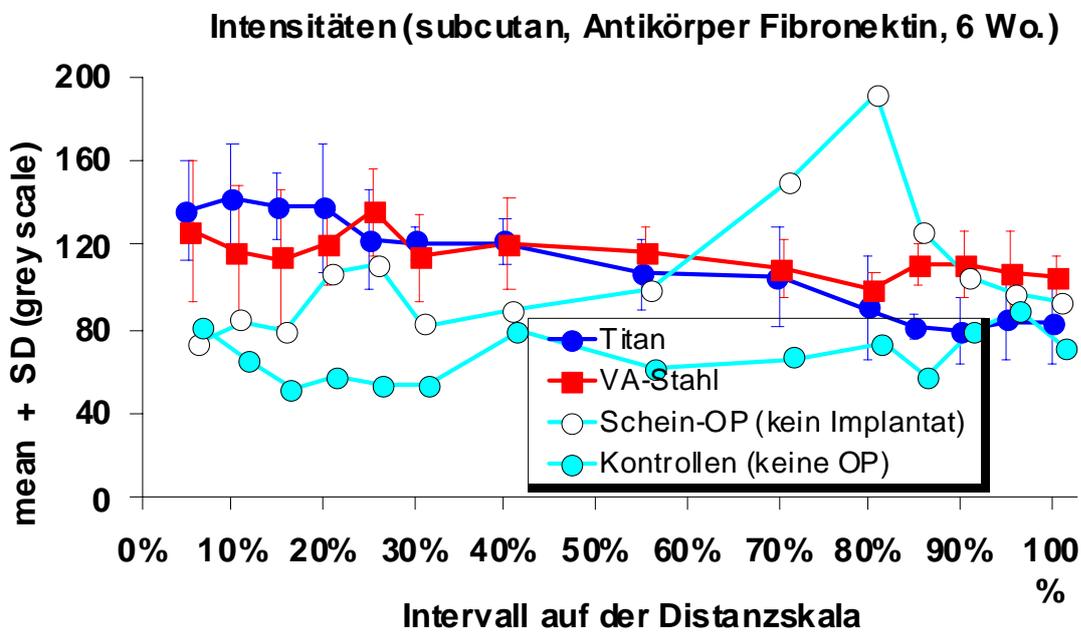


Abbildung 52 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256), im Materialvergleich, 6 Wochen nach subkutaner Implantation, Fibronectin

3.4.3.2 Materialvergleich intramuskulär

Abbildung 53 zeigt die Implantatkapsel (Pfeile) 3 Wochen nach intramuskulärer Titan-Implantation mit ehemaligem Implantatlager (i) gegen alle drei Matrixproteine.

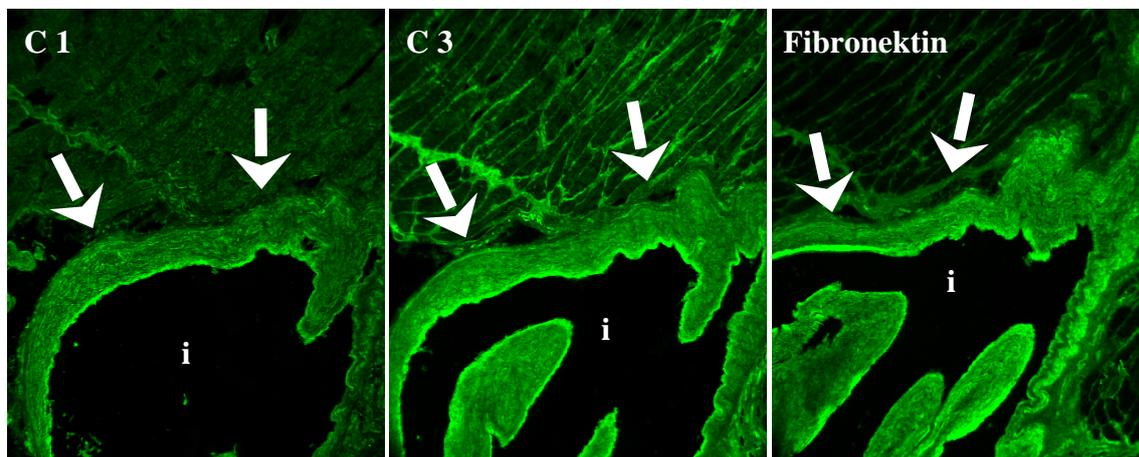


Abbildung 53 Implantatkapsel (Pfeile) 6 Wochen nach intramuskulärer VA-Stahl-Implantation, (Vergr. ca. 1:50), i - ehemaliges Implantatlager; C1 - Kollagen Typ I, C3 - Kollagen Typ III, Fibronektin

Abbildung 54 bis 59 zeigen im Materialvergleich Titan vs. VA-Stahl die Fluoreszenzprofile der periimplantären intramuskulären Einheilkapseln bei Färbung gegen Kollagen Typ I (C1), Typ III (C3) und Fibronektin. Als Vergleichskollektive sind die subkutan scheinoperierten Präparate ohne Implantation und nicht operierten Kontrollpräparate aufgeführt. Die Absolutwerte der intramuskulären Fluoreszenzprofile sind den Tabelle 12 bis Tabelle 17 des Anhangs zu entnehmen. In den implantatnahen Kapselanteilen (0 - 30 %) konnten trotz deutlicher Standardabweichungen für beide Werkstoffe erhöhte Fluoreszenz-Intensitäten in allen Proteinfärbungen im 3- und 6-Wochen-Intervall dargestellt werden. In den mittleren Kapselabschnitten (30 - 70 %) konnten reproduzierbare Fluoreszenzverstärkungen nur bei Detektion von Kollagen Typ I (C1) nach 3 Wochen und Kollagen Typ III (C3) nach 3 und 6 Wochen gesehen werden. In den implantatfernen Kapselabschnitten (70 - 100 %) ergab Kollagen Typ III (C3) stärkere Fluoreszenzdifferenzen zu den Vergleichskollektive.

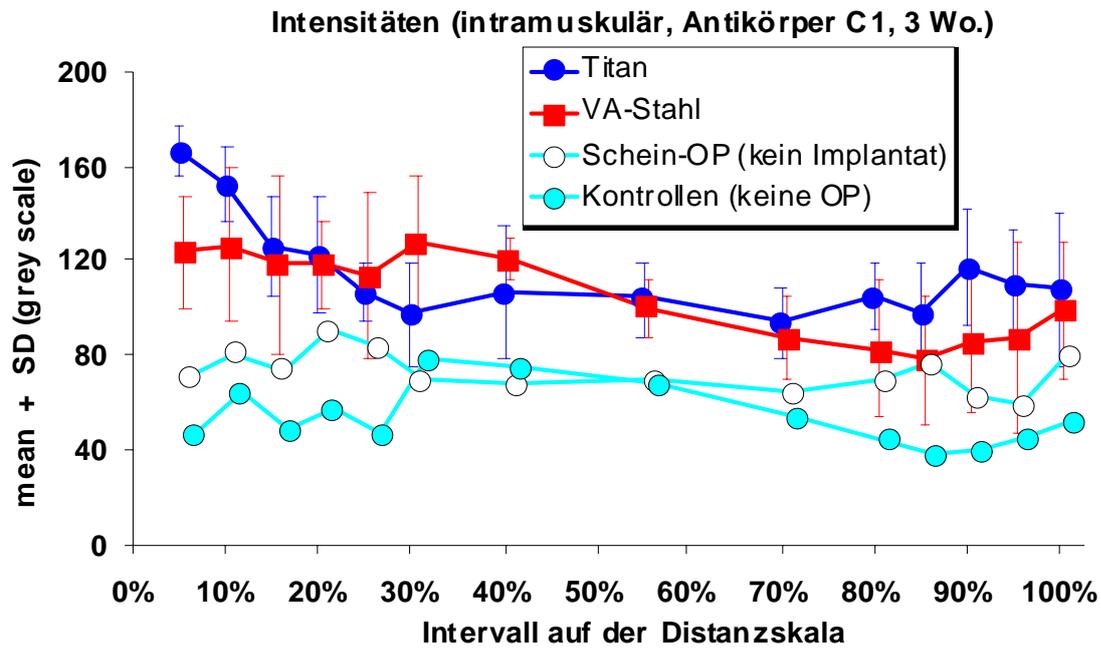


Abbildung 54 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256), im Materialvergleich, 3 Wochen nach intramuskulärer Implantation, Kollagen Typ I (C1)

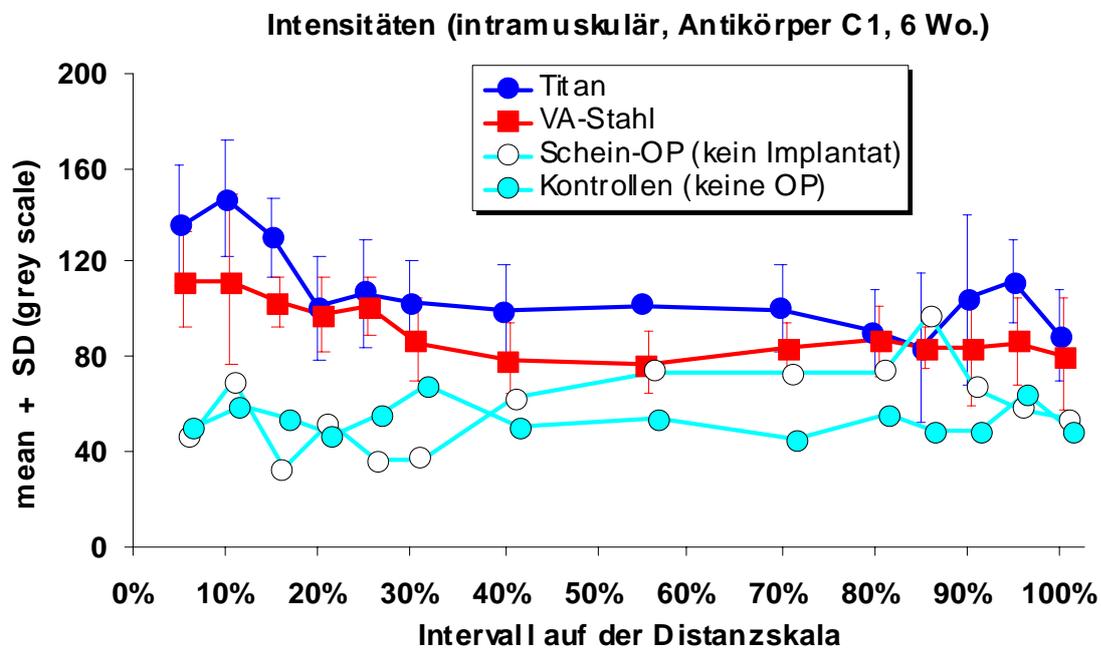


Abbildung 55 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256), im Materialvergleich, 6 Wochen nach intramuskulärer Implantation, Kollagen Typ I (C1)

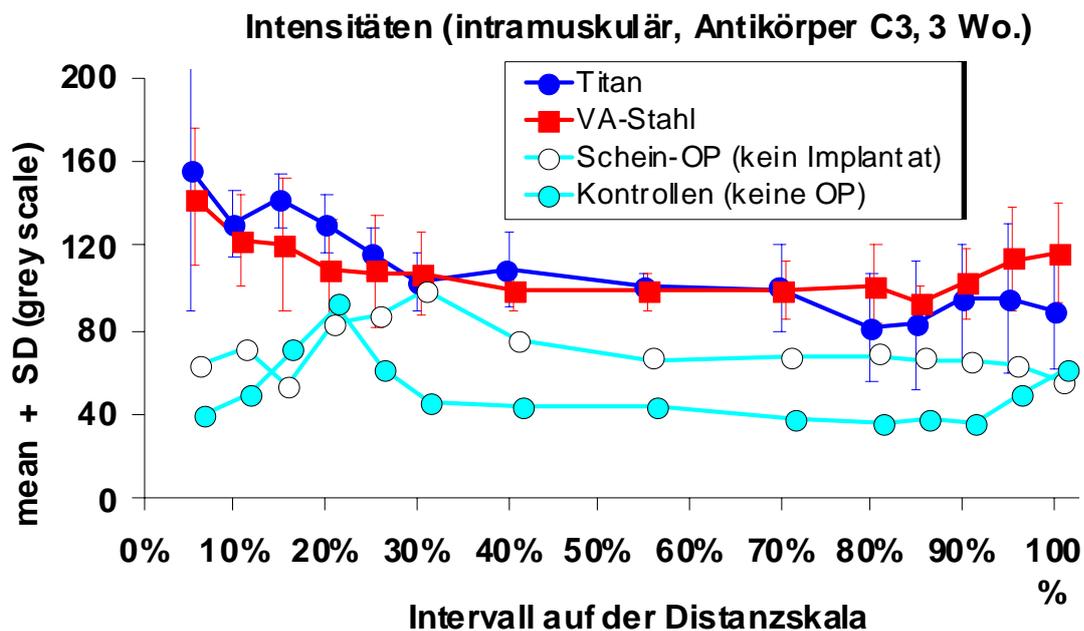


Abbildung 56 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256), im Materialvergleich, 3 Wochen nach intramuskulärer Implantation, Kollagen Typ III (C3)

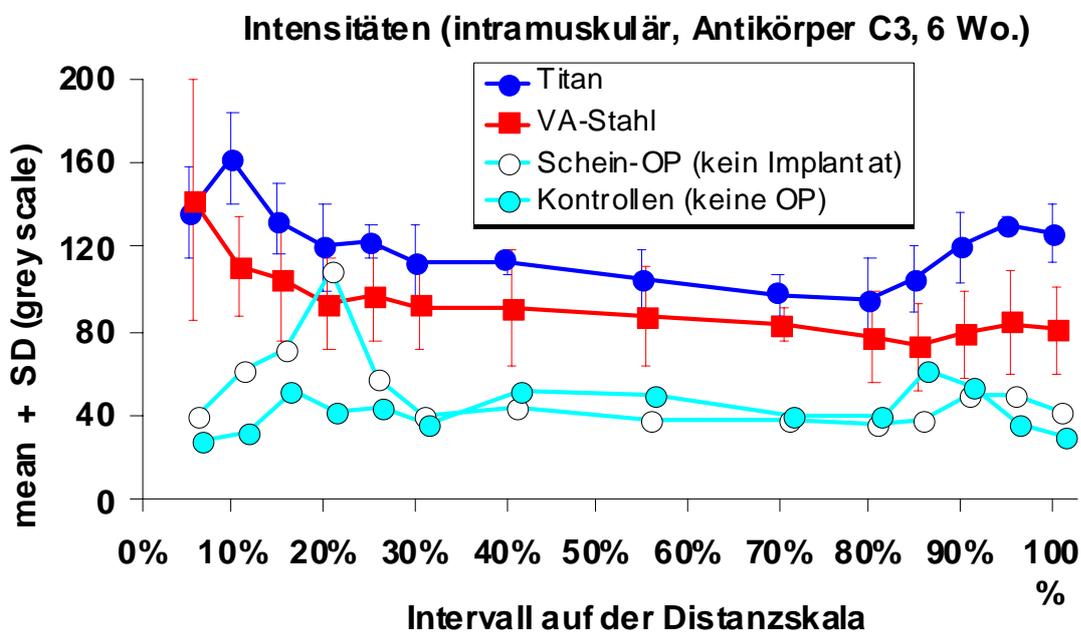


Abbildung 57 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256), im Materialvergleich, 6 Wochen nach intramuskulärer Implantation, Kollagen Typ III (C3)

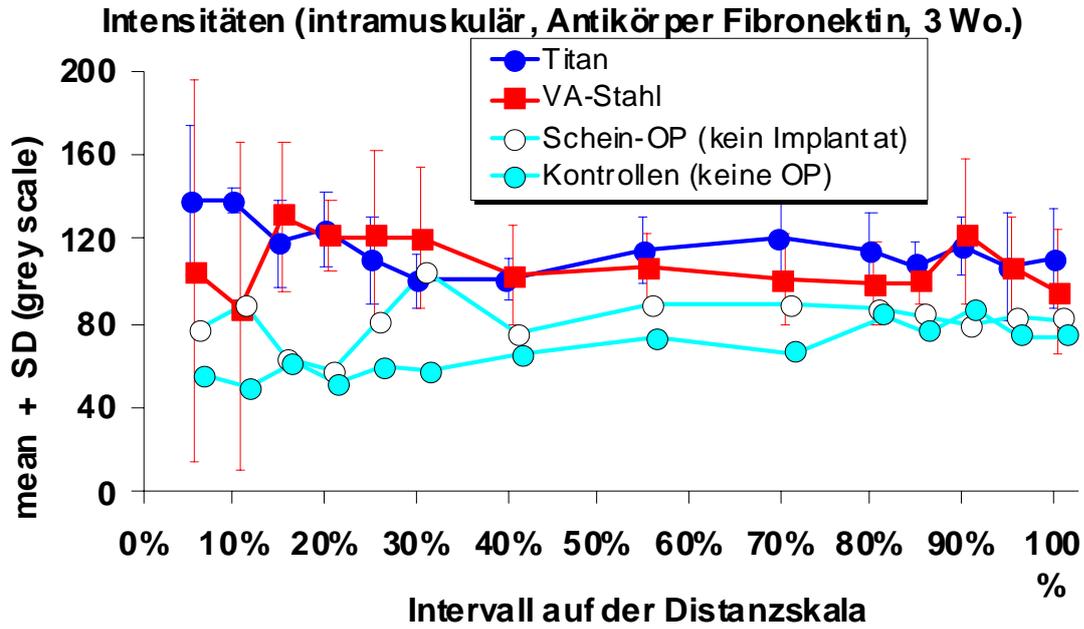


Abbildung 58 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256), im Materialvergleich, 3 Wochen nach intramuskulärer Implantation, Fibronectin

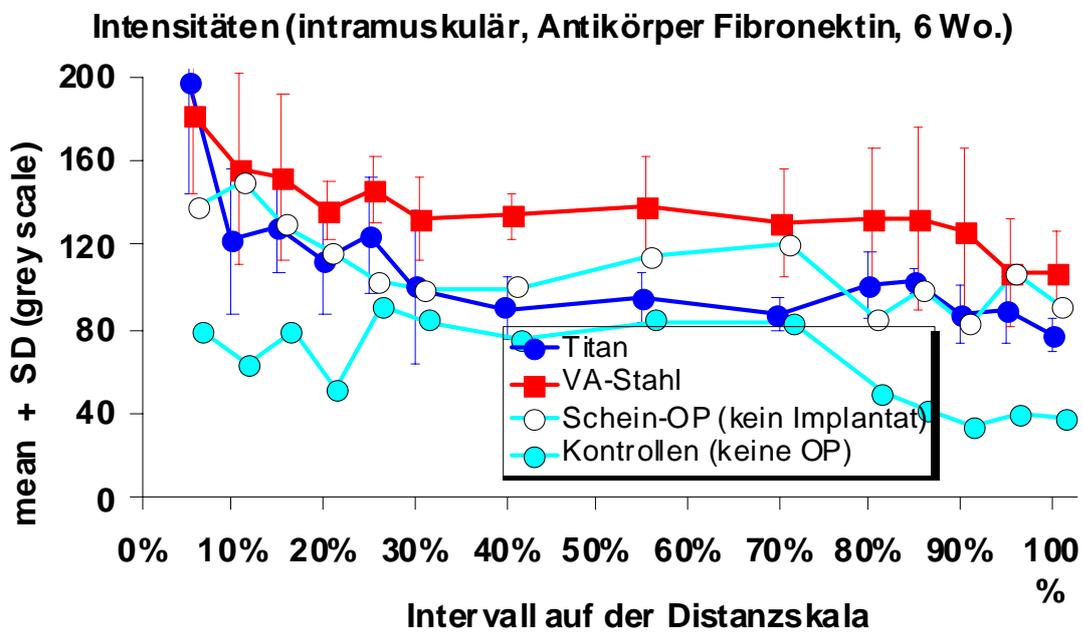


Abbildung 59 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256), im Materialvergleich, 6 Wochen nach intramuskulärer Implantation, Fibronectin

3.4.3.3 Materialvergleich intraossär

Insgesamt zeigte der intraossäre Materialvergleich implantatnahe (0 - 30 %) und implantatferne (70 - 100 %) Fluoreszenzmaxima für alle hier dargestellten Matrixproteine, die mit zunehmender Implantationsdauer abfallen. Reproduzierbare materialspezifische Unterschiede ergaben sich nicht. Abbildung 60 zeigt exemplarisch die Messungen in farbigen Balken mittels Konfokaler Laserscanning Mikroskopie.

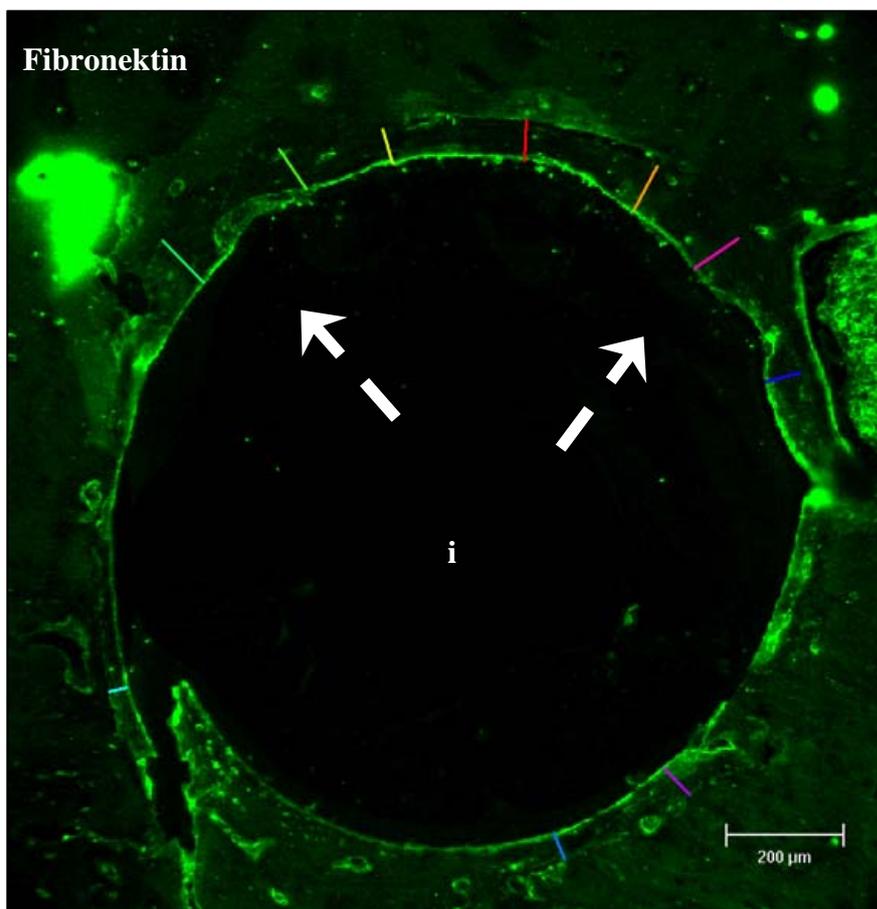


Abbildung 60 Kallusformation, 6 Wochen nach intraossärer Implantation VA-Stahl-Implantat, Fibronectin, (100-fache Vergrößerung)

Abbildung 61 bis 69 zeigen im Materialvergleich Titan vs. VA-Stahl die Fluoreszenzprofile der periimplantären intraossären Kallusformationen bei Färbung gegen Kollagen Typ I (C1), Typ III (C3) und Fibronectin. Als Vergleichskollektive sind die subkutan scheinoperierten Präparate ohne Implantation und nicht operierten Kontrollpräparate aufgeführt. Die Absolutwerte der subkutanen Fluoreszenzprofile sind

den Tabelle 18 bis Tabelle 26 des Anhangs zu entnehmen. In implantatnahen Kallusanteilen (0 - 30 %) ergaben beide Werkstoffe erhöhte Fluoreszenz-Intensitäten aller Matrixproteine im 3- und 6-Wochen-Intervall gegenüber den Vergleichskollektiven. Nach 12 Wochen kam es bis auf Kollagen Typ I (C1) in allen Proteindarstellungen zu einem nahezu vollständigen Angleichen der Fluoreszenzintensitäten. In den mittleren Kallusabschnitten (30 - 70 %) konnten reproduzierbare Fluoreszenzunterschiede bei Detektion von Kollagen Typ I (C1) in allen Zeitintervallen gesehen werden. Die Fluoreszenzwerte für Kollagen Typ III (C3) und Fibronektin lagen hier über den gesamten Implantationszeitraum höher und nahezu auf dem Niveau der periimplantären Werte. In den implantatfernen Kallusabschnitten (70 - 100 %) ergaben alle Matrixproteine nach 3 und 6 Wochen deutliche Fluoreszenzerhöhungen jedoch nur gegenüber den scheinoperierten Präparaten. Im Zeitverlauf zu 12 Wochen Implantationsdauer kam es mit Ausnahme von Kollagen Typ I (C1) zu einem nahezu vollständigen Angleichen der Fluoreszenzwerte gegenüber den intraossär scheinoperierten und nicht operierten Kontrollpräparaten.

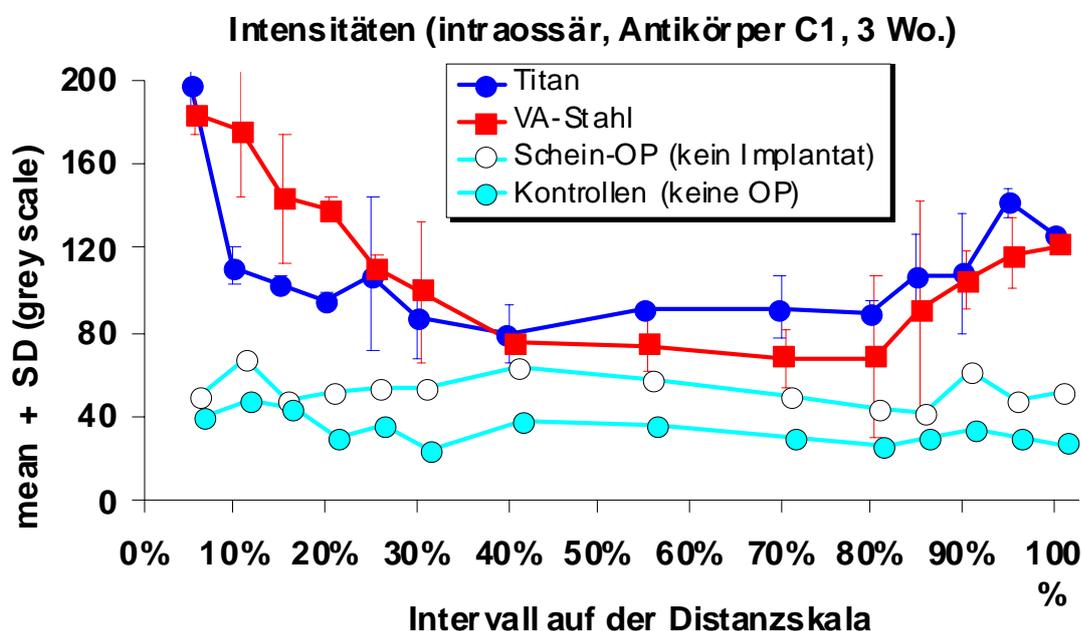


Abbildung 61 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256), im Materialvergleich, 3 Wochen nach intraossärer Implantation, Kollagen Typ I (C1)

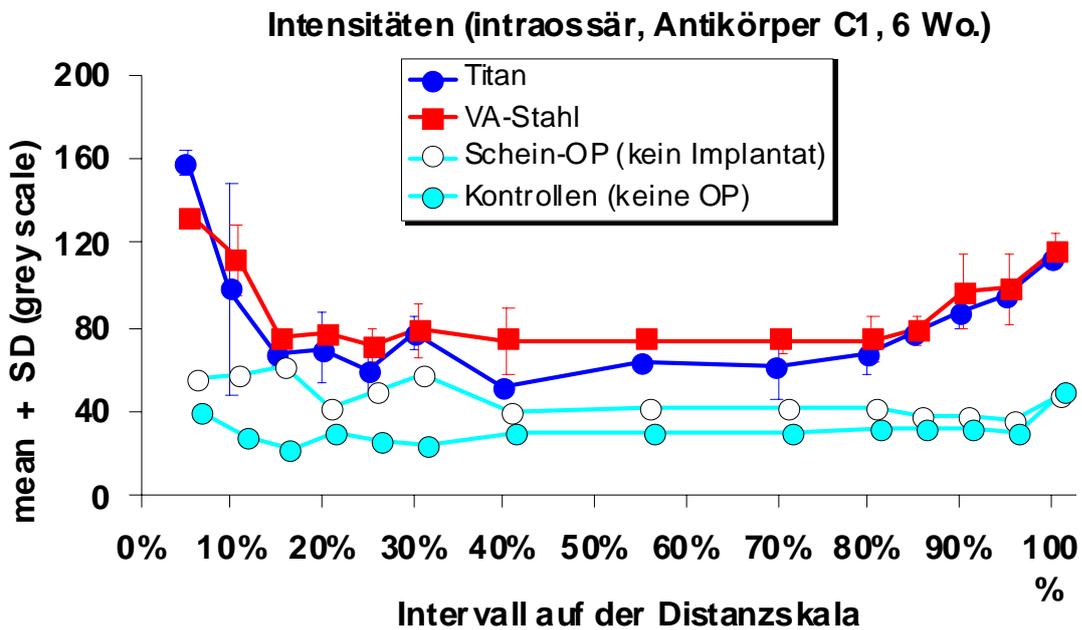


Abbildung 62 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256), im Materialvergleich, 6 Wochen nach intraossärer Implantation, Kollagen Typ I (C1)

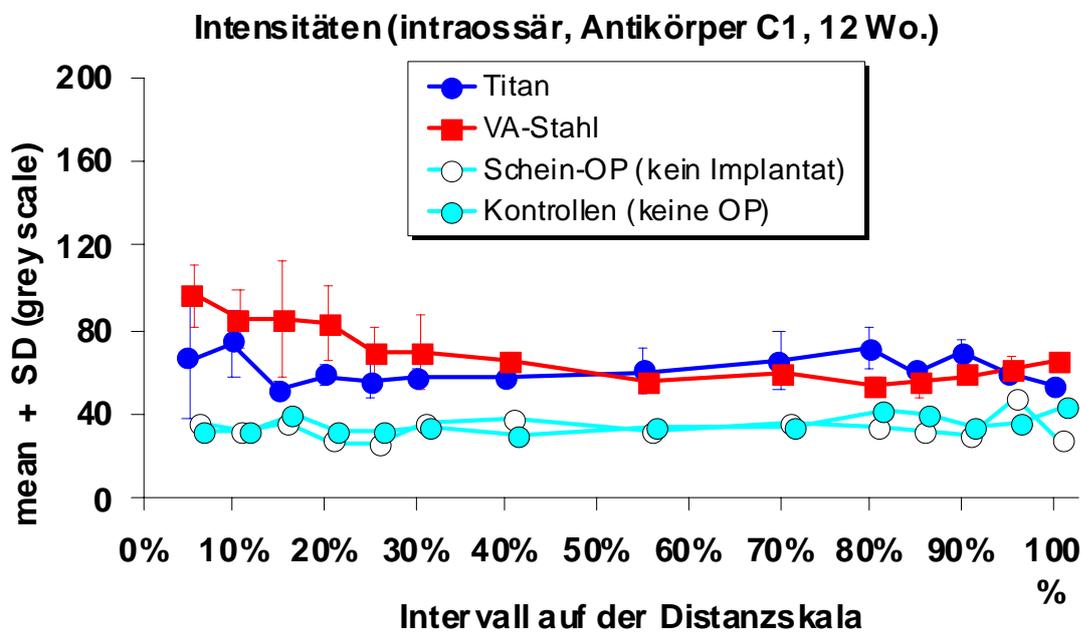


Abbildung 63 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256), im Materialvergleich, 12 Wochen nach intraossärer Implantation, Kollagen Typ I (C1)

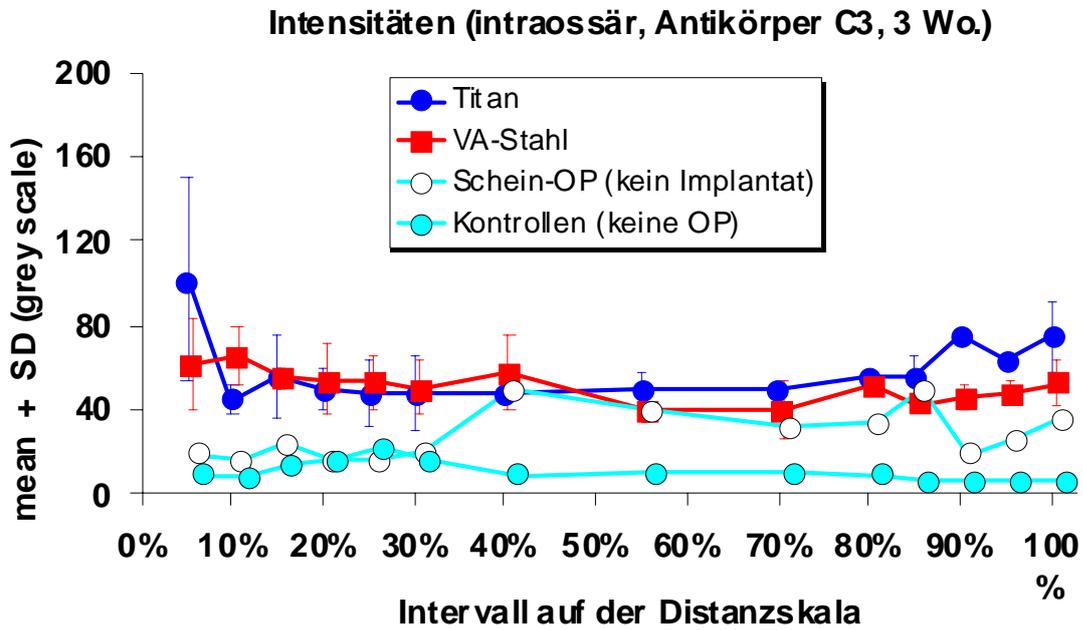


Abbildung 64 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256), im Materialvergleich, 3 Wochen nach intraossärer Implantation, Kollagen Typ III (C3)

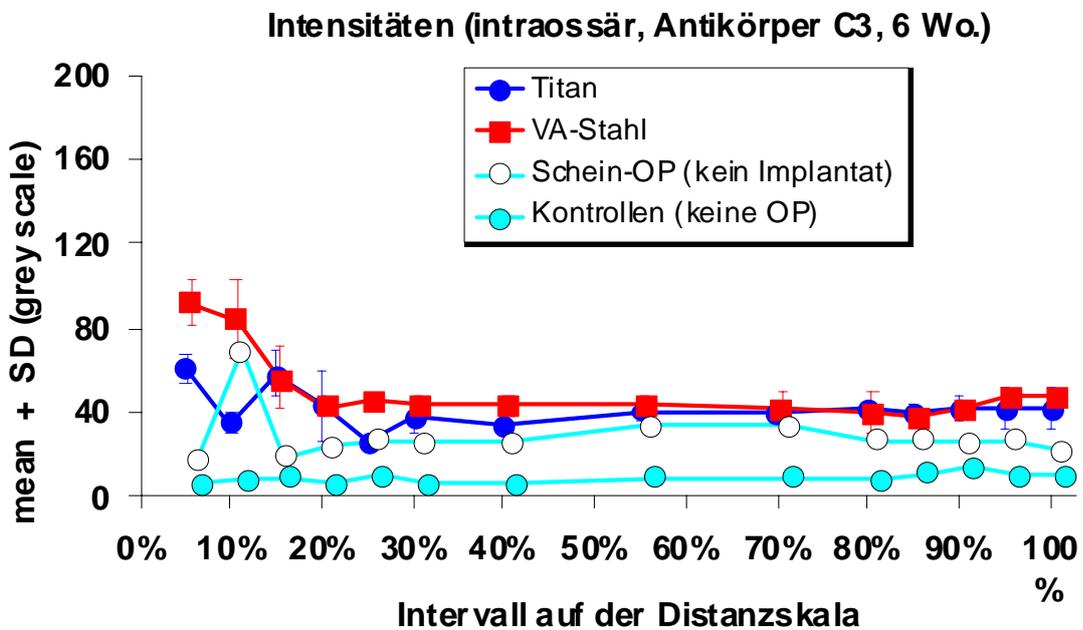


Abbildung 65 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256), im Materialvergleich, 6 Wochen nach intraossärer Implantation, Kollagen Typ III (C3)

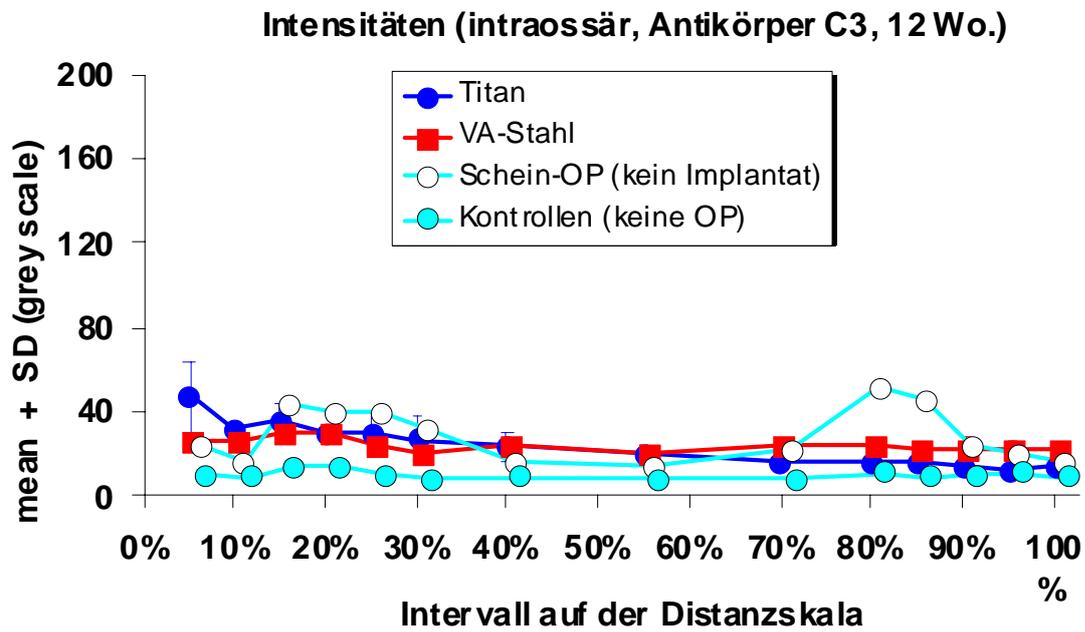


Abbildung 66 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256), im Materialvergleich, 12 Wochen nach intraossärer Implantation, Kollagen Typ III (C3)

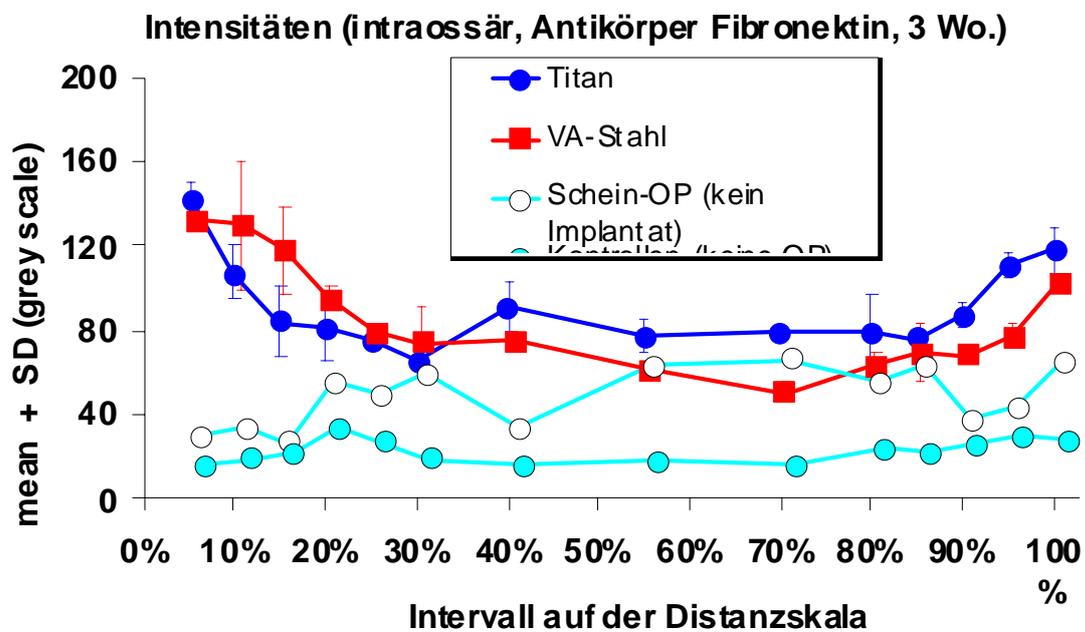


Abbildung 67 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256), im Materialvergleich, 3 Wochen nach intraossärer Implantation, Fibronektin

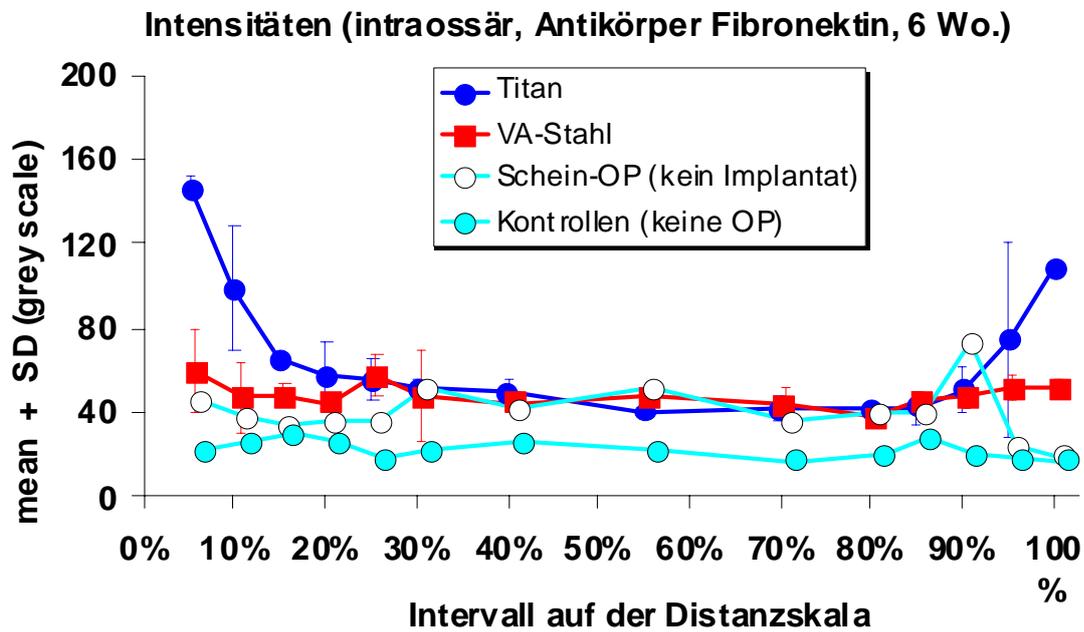


Abbildung 68 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256), im Materialvergleich, 6 Wochen nach intraossärer Implantation, Fibronectin

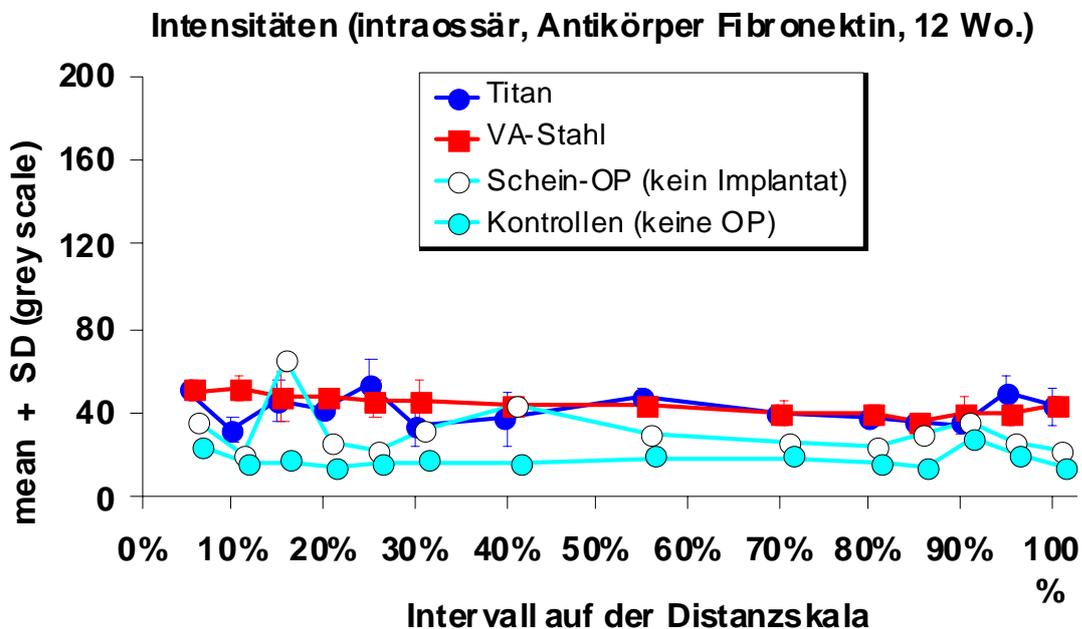


Abbildung 69 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256), im Materialvergleich, 12 Wochen nach intraossärer Implantation, Fibronectin

3.4.3.4 Lokalisationsvergleich Titan

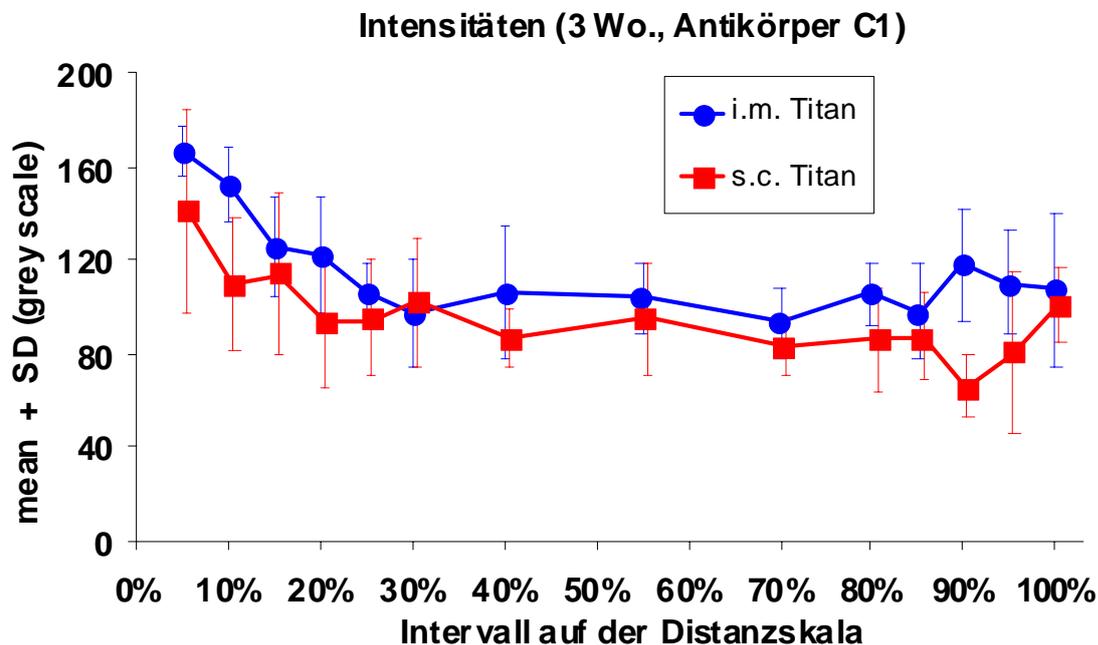


Abbildung 70 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256) im Lokalisationsvergleich, 3 Wochen nach Titan-Implantation, Kollagen Typ I (C1)

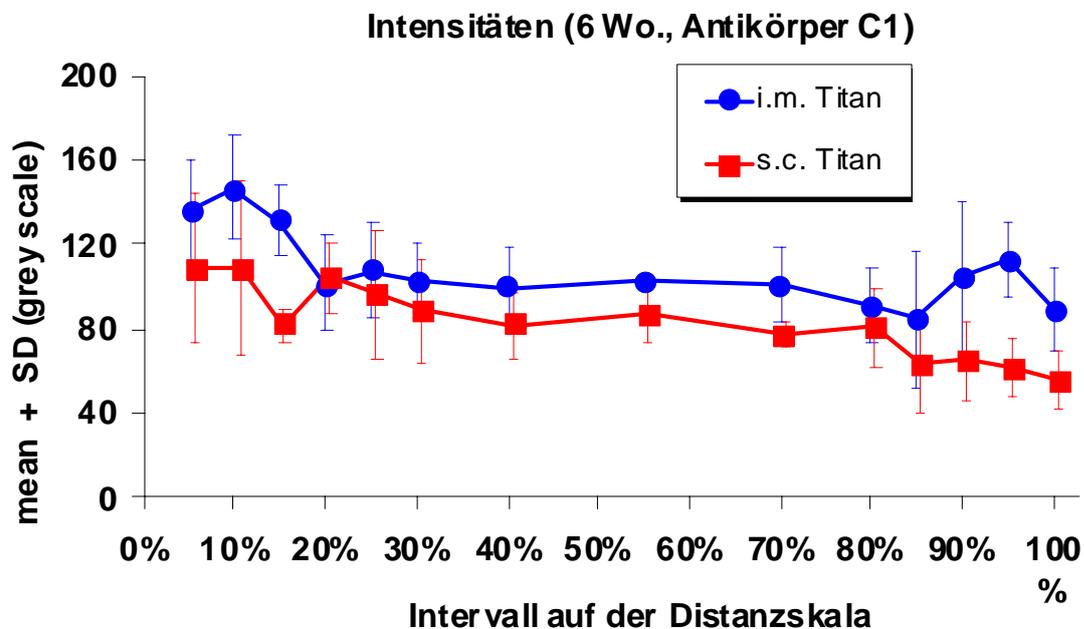


Abbildung 71 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256) im Lokalisationsvergleich, 6 Wochen nach Titan-Implantation, Kollagen Typ I (C1)

Abbildung 70 bis 75 zeigen im Lokalisationsvergleich subkutan vs. intramuskulär die Fluoreszenzprofile der periimplantären Einheilkapseln um Titan-Implantate bei Färbung gegen Kollagen Typ I (C1), Typ III (C3) und Fibronektin.

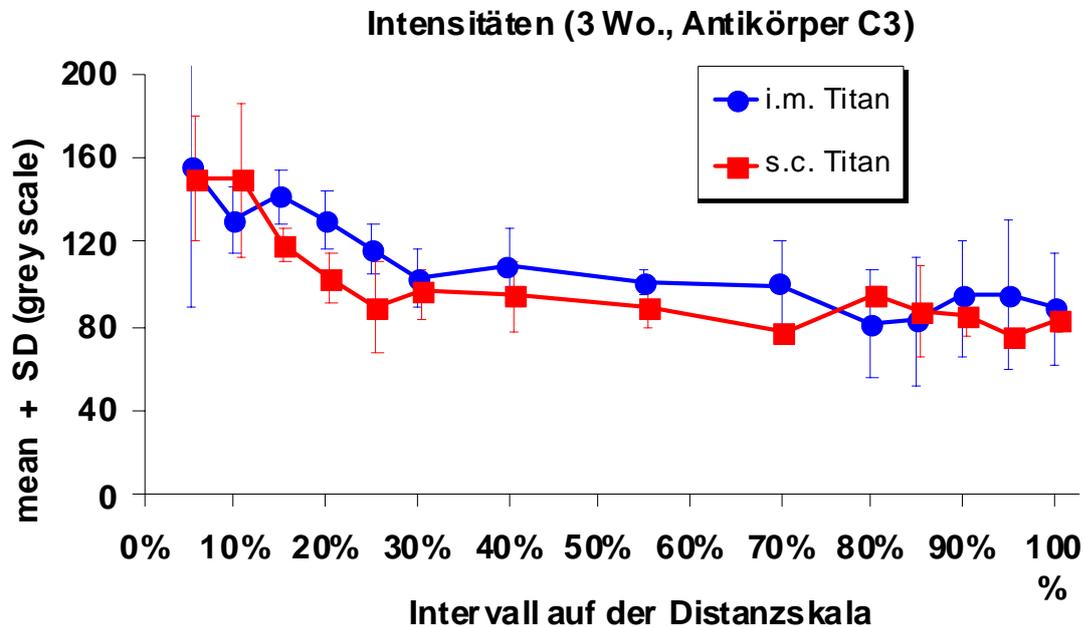


Abbildung 72 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256) im Lokalisationsvergleich, 3 Wochen nach Titan-Implantation, Kollagen Typ III (C3)

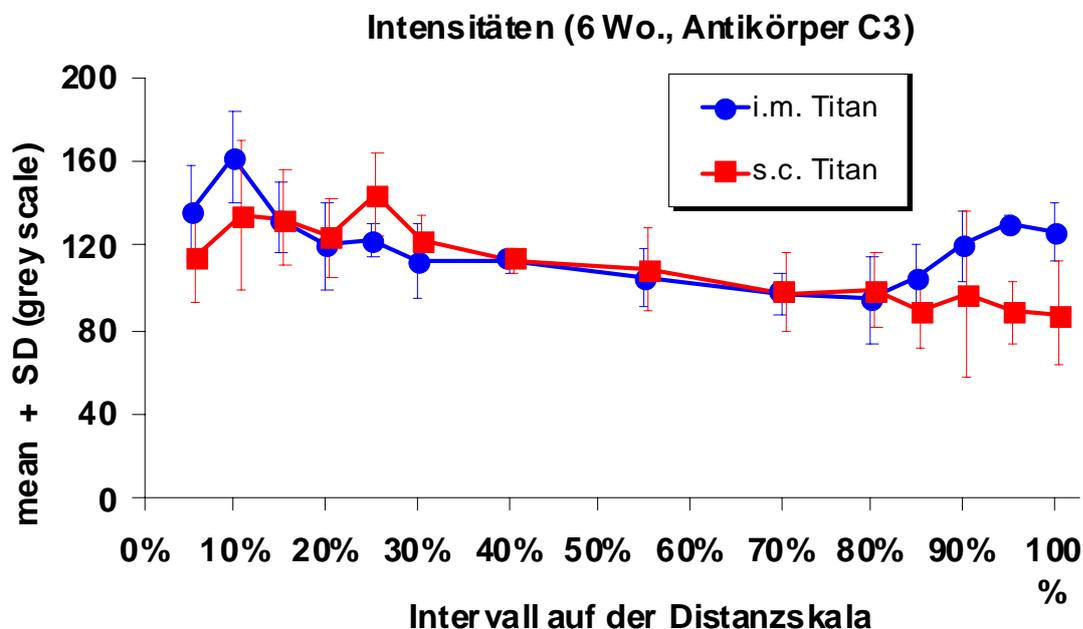


Abbildung 73 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256) im Lokalisationsvergleich, 6 Wochen nach Titan-Implantation, Kollagen Typ III (C3)

Es sind keine Vergleichsgraphen aufgeführt. Die Absolutwerte der subkutanen und intramuskulären Fluoreszenzprofile sind Tabelle 6 bis 17 des Anhangs zu entnehmen. Unter Berücksichtigung der teilweise deutlichen Standardabweichungen zeigte keine Proteindetektion Unterschiede der Fluoreszenzprofile im Lokalisationsvergleich intramuskulär vs. subkutan für Titan-Implantate.

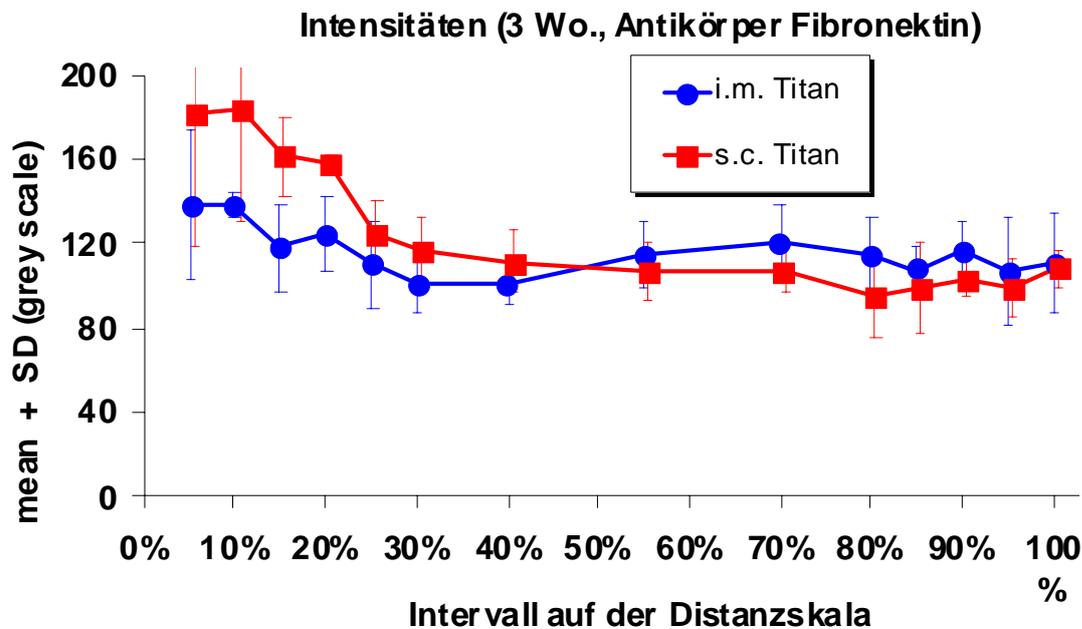


Abbildung 74 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256) im Lokalisationsvergleich, 3 Wochen nach Titan-Implantation, Fibronectin

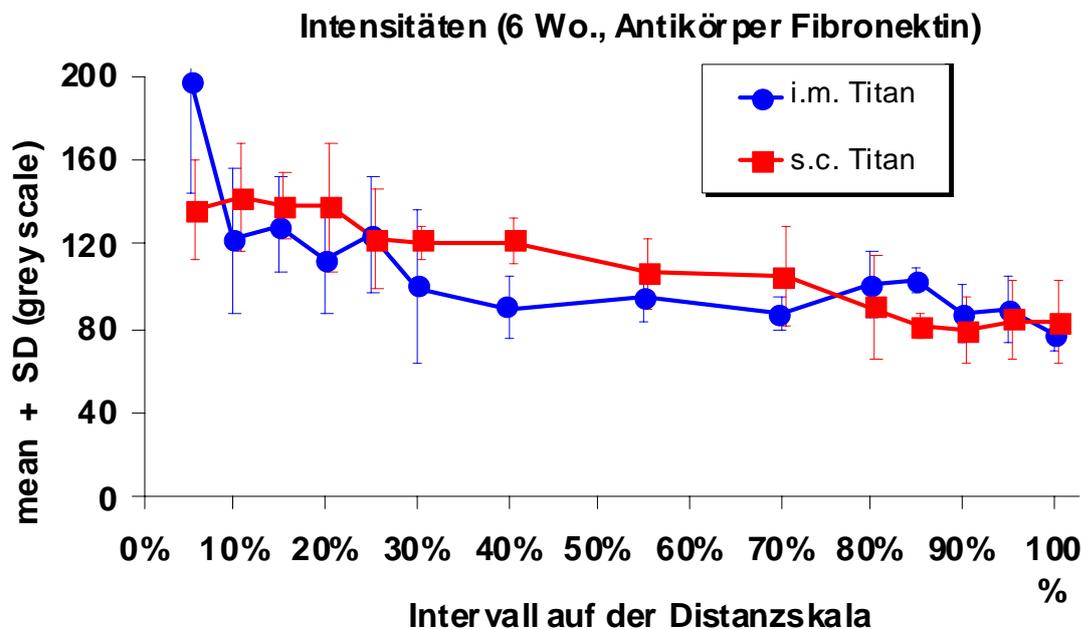


Abbildung 75 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256) im Lokalisationsvergleich, 6 Wochen nach Titan-Implantation, Fibronectin

3.4.3.5 Lokalisationsvergleich VA-Stahl

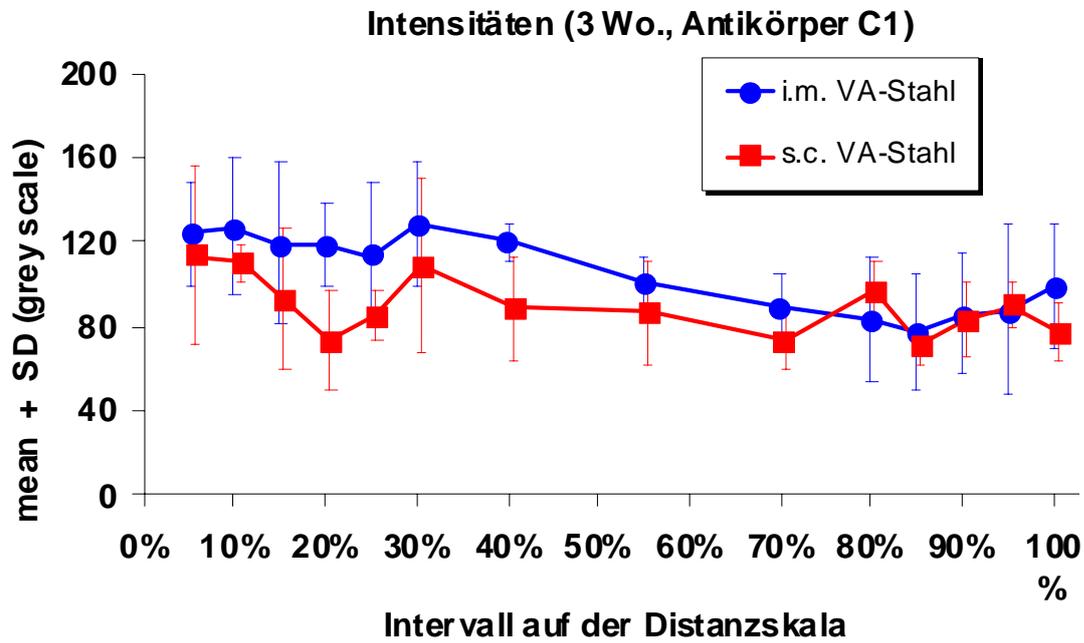


Abbildung 76 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256) im Lokalisationsvergleich, 3 Wochen nach VA-Stahl-Implantation, Kollagen Typ I (C1)

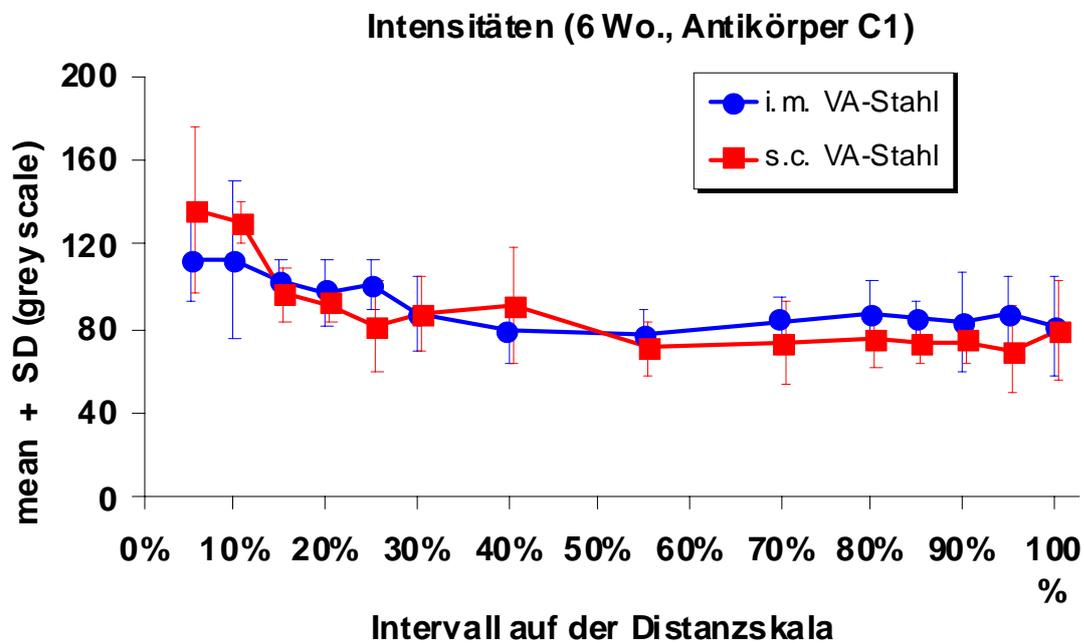


Abbildung 77 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256) im Lokalisationsvergleich, 6 Wochen nach VA-Stahl-Implantation, Kollagen Typ I (C1)

Abbildung 76 bis 81 zeigen im Lokalisationsvergleich subkutan vs. intramuskulär die Fluoreszenzprofile der periimplantären Einheilkapseln um VA-Stahl-Implantate bei Färbung gegen Kollagen Typ I (C1), Typ III (C3) und Fibronektin. Es sind keine Vergleichsgraphen aufgeführt.

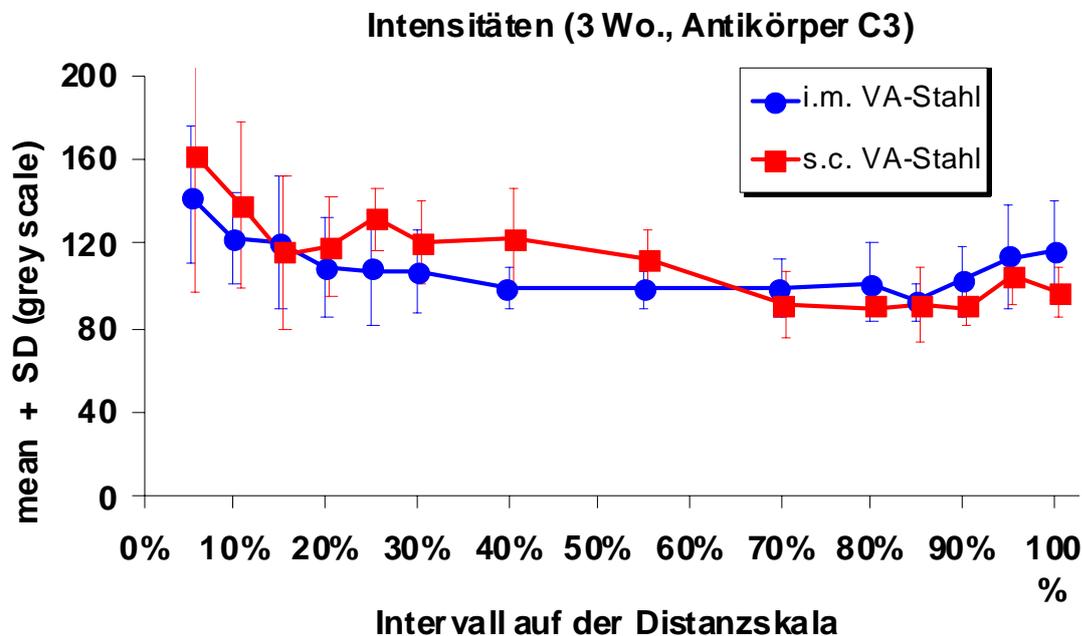


Abbildung 78 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256) im Lokalisationsvergleich, 3 Wochen nach VA-Stahl-Implantation, Kollagen Typ III (C3)

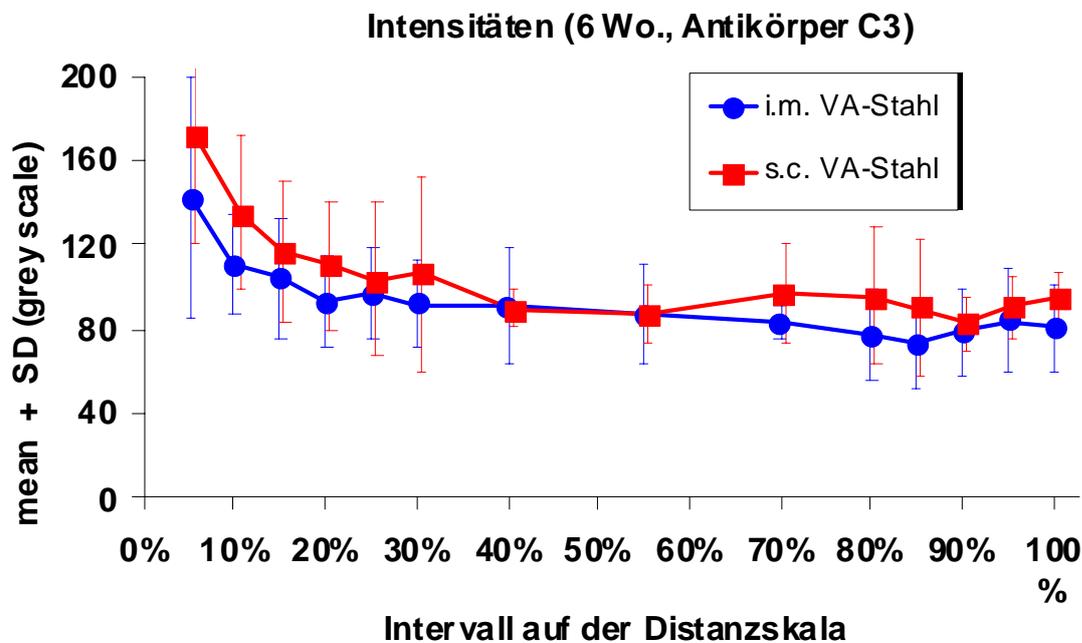


Abbildung 79 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256) im Lokalisationsvergleich, 6 Wochen nach VA-Stahl-Implantation, Kollagen Typ III (C3)

Die Absolutwerte der subkutanen und intramuskulären Fluoreszenzprofile sind Tabelle 6 bis 17 des Anhangs zu entnehmen. Unter Berücksichtigung der teils sehr deutlichen Standardabweichungen zeigte keine Proteindetektion Unterschiede der Fluoreszenzprofile im Lokalisationsvergleich intramuskulär gegenüber subkutan für VA-Stahl-Implantate.

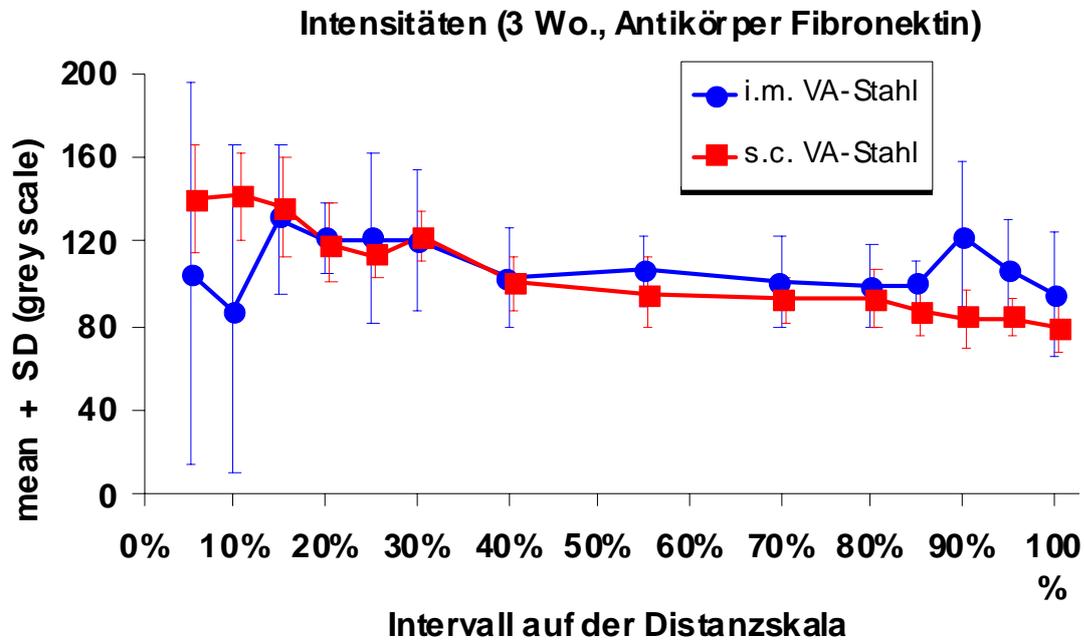


Abbildung 80 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256) im Lokalisationsvergleich, 3 Wochen nach VA-Stahl-Implantation, Fibronectin

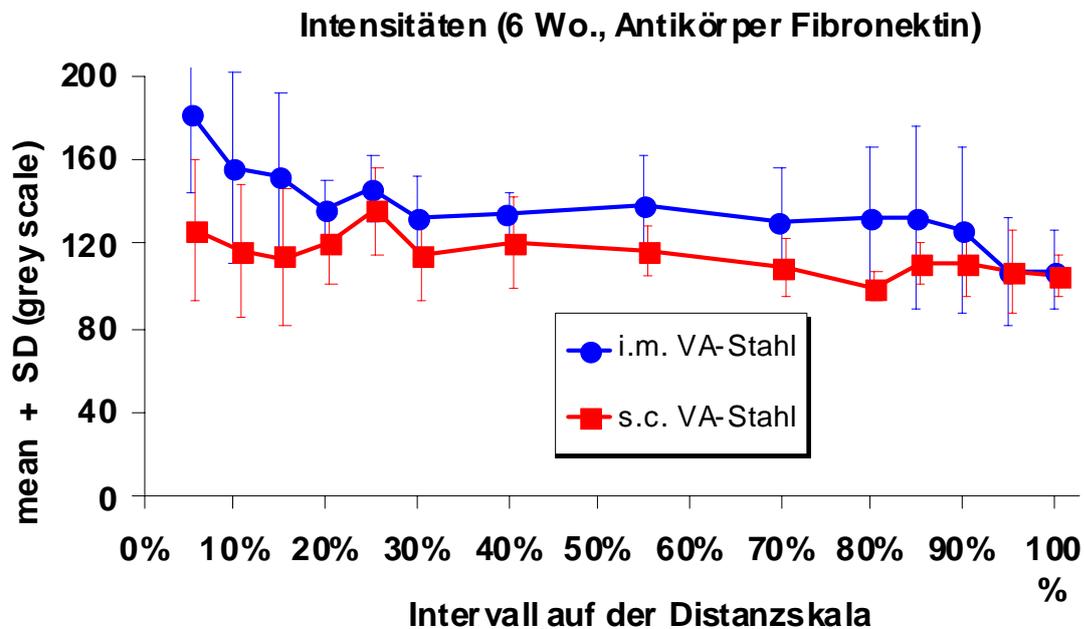


Abbildung 81 Fluoreszenzprofil als Grauwert (0-256) im Lokalisationsvergleich, 6 Wochen nach VA-Stahl-Implantation, Fibronectin

4 Diskussion

Das Einbringen eines Biomaterials in menschliches Gewebe löst eine komplexe Folge verschiedenster Reaktionsprozesse aus, die in ihrer Gesamtheit als Fremdkörperreaktion und Sonderform der Wundheilung bezeichnet wird (ADAMS 1976, COHEN 1959, KASEMO und LAUSMAA 1986, WILLIAMS 1981). Diese Reaktionsabläufe werden durch die Eigenschaften des Biomaterials selbst und die operative Traumatisierung ebenso beeinflusst (WILLIAMS 1981, HENCH 1991, THOMSEN et al. 1986) wie durch funktionelle Belastung im Empfängerareal (BRUNSKI 1988) und mikrobiologische Faktoren. Die Beurteilung der Eigenschaften des Biomaterials umfasst dessen chemische Zusammensetzung und physikalische Eigenschaften sowie mechanische und elektrochemische Oberflächeneigenschaften (THULL 2005). Die Summe all dieser Faktoren definiert die Gewebeverträglichkeit und Biokompatibilität des Biomaterials (KASEMO und LAUSMAA 1986).

Die Reaktionsprozesse nach Insertion eines Biomaterials vollziehen sich auf zellulärer und molekularer Ebene in dem als Interface bezeichneten Kontaktraum von Biomaterialoberfläche und umgebendem Gewebe (IVARSSON und LUNDSTRÖM 1986, KASEMO und LAUSMAA 1986, SPENCER und TEXTOR 1989, THULL 1994). Es gibt in der Literatur keinen abschließenden Konsens über definierte Begrenzungen des Interface, sodass unter diesem Oberbegriff unterschiedliche Dimensionsräume im Übergang von Implantat und Empfängergewebe zusammengefasst werden. Die eigentliche Bedeutung des Wortes Interface als Kontaktfläche berücksichtigend, wurden in der hier vorgestellten Studie die Bezeichnung der Einheilkapsel nach Implantation in Weichgewebe und die Bezeichnung der Kallusformation nach Implantation in Knochen vergleichend eingesetzt.

Die Abfolge der Reaktionsprozesse nach Implantation beginnt mit der Adsorption von Wasser, Ionen, niedermolekularen organischen Teilchen, Lipiden, Proteinen, Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen (BREEMHAAR et al. 1984, HORBETT und SCHWAY 1988, KASEMO und LAUSMAA 1991). Die Adsorption dieser Biomoleküle wird, unter Verwendung von Kalzium-Ionen, über anionische Bereiche

ermöglicht (ELLINGSEN 1991). Die sodann adsorbierte Schicht enthält adhäsive Proteine und Proteoglykane der EZM, wie beispielsweise Fibronectin und ermöglicht neben Adhäsion, Attachment und Verankerung die Ausbreitung, und Migration von Zellen, die ihrerseits in die nachfolgenden Reaktionsprozesse eingreifen. Diese Prozesse werden von der Interaktion des Fibronectins auf der Zelloberfläche mit dem Aktin des Cytoskeletts gesteuert (BAGAMBISA et al. 1994). Die Anbindungsstrukturen zur Fibronectinbindung auf der Zelloberfläche werden der Gruppe der Integrine zugeordnet. Auf Fibroblasten sind alpha-V und beta-I Integrine zur Anbindung an Fibronectin beschrieben (GAILIT und CLARK 1996). Osteoblasten können hingegen je nach Exposition und Kontakt-Protein ebenfalls Oberflächen-Integrine modulieren, so auch für Fibronectin als beta-I Integrin (SCHNEIDER und BURRIDGE 1994). GRONOWICZ und McCARTHY (1996) postulierten, dass Integrine als Oberflächenstrukturelemente darüber hinaus in der Lage zu sein scheinen, direkt Bindungen mit metallischen Implantaten einzugehen.

Die Aufgaben der EZM in Physiologie und Pathologie des menschlichen Gewebes werden dank aktueller Forschungsergebnisse zunehmend erklärbar. Wesentlichen Anteil an den Aufgaben der EZM nehmen, neben den interstrukturellen Proteoglykanen und Glykoproteinen, die strukturellen Anteile der Matrix, allen voran das Kollagen. Bei der Fremdkörperreaktion sowie der Wundheilung kommt Kollagen Typ I und Kollagen Typ III eine besondere Bedeutung zu (LINSENMAYER 1991). Sowohl in Hart- als auch Weichgewebe sind charakteristische Verteilungsmuster beider Kollagen Typen bei Fremdkörperreaktion und Wundheilung beschrieben. Kollagen Typ III wird als Indikator eines aktiven Reaktionsniveaus gesehen, wie es beispielsweise zu Beginn der Wundheilung und Fremdkörperreaktion zu finden ist. Bei längerfristigem Auftreten von Kollagen Typ III im Einheilgewebe um Biomaterialien wird eine chronische Reizantwort postuliert. Kollagen Typ I hingegen wird als Strukturkollagen in zahlreichen physiologischen Gewebeformationen gefunden. Der längerfristige Nachweis wird hierbei als Indikator einer reizfreien Einheilung des Biomaterials gesehen (v. RECUM et al. 1993).

Ziel der vorliegenden Studie

Ziel der vorliegenden Studie war es, Unterschiede im Einheilverhalten der Werkstoffe Titan und VA-Stahl nach unterschiedlichen Einheilungszeiträumen histologisch zu untersuchen und darzustellen. Hierzu wurden die drei Implantationslokalisationen subkutan, intramuskulär und intraossär gewählt und die Größen der Einheilkapseln, sowie die Verteilungsmuster der Matrixproteine Kollagen Typ I (C1) und Typ III (C3) sowie Fibronektin darin ausgewertet.

Implantate und deren Werkstoffe

Die zur Untersuchung verwendeten Implantatwerkstoffe Titan und VA-Stahl wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen physikalischen und elektrochemischen Eigenschaften ausgewählt. Während VA-Stahl, bei Implantation in den lebenden Organismus eine leitende Oxidschicht ausbildet, bildet Titan im Gegensatz dazu eine halbleitende Oxidschicht aus, die einen Ionen- und Elektronentransfer nur eingeschränkt ermöglicht. Die Oxidschicht, wie sie auf Titanoberflächen zu finden ist, verhindert einen Elektronentransfer zwischen Metall und Gewebe, womit den Proteinen die Adhäsion an die Oberfläche in ihrer ursprünglichen Konformation erleichtert wird. Die leitende Stahloberfläche, die den Elektronentransfer zulässt, ruft im Gegensatz dazu vermehrt Anpassungsvorgänge der Proteine hervor. Hohe Feldstärken können somit auch Konformationsänderungen der Proteine hervorrufen (THULL 1982). Unter der Voraussetzung, dass Konformationsänderungen der adsorbierten Proteine eine stärkere Fremdkörperreaktion auslösen, ist zu erklären, dass Titandioxid die biokompatiblere Gewebeantwort hervorruft (THULL 1982).

Die Oberflächenbeschaffenheit der Implantate ist von sehr großer Bedeutung für die Einheilreaktion im Gewebe (LINDER und LUNDSKOG 1975). Die Auswirkungen der Oberflächenmikrostruktur werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Makrophagen spielen eine entscheidende Rolle bei der Fremdkörperreaktion und der allgemeinen Wundheilung. Werden Implantatkörper mit rauher Oberfläche inseriert, finden sich Makrophagen mit Riesenzellen über mehrere Monate im angrenzenden Gewebe mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einer chronisch granulomatösen Reaktion. Glatte, weich

konturierte Oberflächen erzielen bessere Gewebereaktionen (SALTHOUSE 1984). COCHRAN (1999) stellte in seiner Literaturrecherche dem entgegen fest, dass raue Implantatoberflächen höhere Erfolgsraten aufwiesen als glatte Implantatoberflächen, außer im Falle des Einzelzahnersatzes, bei dem die Erfolgsquoten vergleichbar hoch waren. NÖTH et al. (1999) untersuchten in vitro Osteoblastenkulturen auf unterschiedlich präparierten Oberflächen an Titanimplantaten. Sie stellten fest, dass eine Vergrößerung der Oberfläche durch Anrauen in der Anfangsphase die Zellproliferation etwas verzögert, dann aber verlängert. Dieses Ergebnis bestätigte ihre Favorisierung von Implantaten mit rauher Oberfläche bei Knochenkontakt (NÖTH et al. 1999).

CHEHROUDI et al. (1997) wiesen einen Zusammenhang zwischen der Größe der oberflächlichen Vertiefungen und der Knochenbildung und Mineralisation auf. Je größer die Vertiefungen in der Oberflächenbeschichtung desto weniger Knochenformationen wurden gefunden. BAGAMBISA et al. (1994) konnten auf rauhen Oberflächen weniger Fibronectin nachweisen. VON RECUM et al. (1993) nahmen an, dass das Vorhandensein von Kollagen Typ I in der Kapsel um Titan von den chemischen oder elektrochemischen Eigenschaften der Oberfläche abhängt, nicht jedoch von der Oberflächenrauigkeit. Der Energiestatus und die Art der Reinigung und Sterilisation der Oberfläche nehmen bei ihrem ersten Kontakt mit dem Lagergewebe auf die Heilung und Zellproliferation des angrenzenden Gewebes Einfluss. Ein hoher Energiestatus des Implantatmaterials und eine entsprechend gereinigte Oberfläche korrelieren mit einer verbesserten Zelladhäsion und Implantatstabilität (DOUNDOULAKIS 1987). WENNERBERG et al. (1991) hingegen stellten in ihrer Untersuchung fest, dass eine erhöhte Oberflächenladung nicht unbedingt die Adhäsion bestimmter Zellen oder Gewebe steigert und auch nicht den Zusammenhalt des Knochen-Implantat-Interface verbessert. Andere Autoren wiederum belegen, dass sowohl positiv, wie auch negativ geladene Oberflächen die Knochenbildung nicht stören. Die Charakterisierung der physikalischen Oberflächeneigenschaften und der Oberflächengeometrie in den oben aufgeführten Studien sind jedoch sehr unterschiedlich. Diese inhomogenen Oberflächenparameter schränken die Wertigkeit vergleichender Aussagen zu Literaturangaben auch bei identischem Werkstoff durchaus ein (SHANNON 1995).

In der vorliegenden Studie wurden zur Herstellung einer einheitlichen Mikrostruktur alle Implantatoberflächen innerhalb einer Werkstoffgruppe durch entsprechende Ätzrezepturen vorbehandelt. Werkstoffspezifisch konnten hierdurch durchaus homogene Oberflächenmikrostrukturen geschaffen werden. Aufgrund der unterschiedlichen Materialeigenschaften und Ätzrezepturen ergaben sich im rasterelektronenmikroskopischen Vergleich von Titan und VA-Stahl darstellbare Unterschiede.

Histologie und mikroskopische Techniken

Die Quantifizierung der Proteinadsorption und -desorption an Oberflächen erfolgt für gewöhnlich über eine Markierung der Proteine mit Radioisotopen. Der Nachteil dieser Methode neben den sehr hohen Kosten für die technische Ausrüstung ist, dass nur ausgewählte Proteine mit geeigneten Radioisotopen für Markierung und Gammadetektion auswertbar sind. Eine weitere Möglichkeit zur Proteinquantifikation bietet das ELISA-Verfahren (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). MERRITT et al. (1988) stellten mittels ELISA-Verfahren fest, dass auf Titanoberflächen mehr Proteine adsorbiert werden als auf rostfreiem Stahl. Zur semiquantitativen Proteindarstellung eignen sich die Rasterelektronenmikroskopie (SEM) und die Konfokale Laserscanning Mikroskopie (CLSM). Maßgeblichen Anteil an der Entwicklung der CLSM nahmen OLDENBOURG et al. 1993. Sie wurde auch zur Erarbeitung der unterschiedlichsten molekularbiologisch-implantologischen Fragestellungen erfolgreich herangezogen (BERNACCA et al. 1994, BIRCH et al. 1997, SHAH et al. 1999, CAMPAGNOLA und LOEW 2003, BASCHONG 2004, JONES et al. 2005, SCHÜPBACH et al. 2005 und WOLFRAM et al. 2005).

In der vorliegenden Studie wurde zur Untersuchung der Präparate die CLSM gewählt, um neben der genauen Ausmessung der Einheilkapseln und Kallusformationen das Verteilungsmuster der Matrixproteine Kollagen Typ I (C1) Kollagen Typ III (C3) und Fibronectin semiquantitativ zu evaluieren. Die Auswertung der untersuchten Präparate erfolgte nach Implantatexplantation an Cryoschnitten. Wenngleich die Explantation unter kleinstmöglicher Traumatisierung durchgeführt wurde, kann eine wenn auch nur minimale Veränderung des Interface und der umgebenden Gewebeanteile abschließend nicht

ausgeschlossen werden. An vielen Präparaten konnten aufgeworfene und inhomogene Kapsel- und Kallusformationen gesehen werden. Dies erschwerte die Auswahl der auswertbaren Präparate, da hierbei besonders darauf geachtet wurde, nur homogen angeschnittene und somit gut auswertbare Cryoschnitte zu berücksichtigen. Dennoch sind die hier gewonnenen Ergebnisse und Schlussfolgerungen vorbehaltlich nicht zu beeinflussender methodisch bedingter Artefakte durch die Implantatexplantation zu sehen.

Die homogene Anfärbung dickerer Gewebeblöcke nach Methacrylateinbettung ist nach aktuellen Verfahrensanweisungen noch nicht möglich. Hinzu kommt, dass die immunhistochemische Auswertung an Methacrylatpräparaten nach wie vor kontrovers diskutiert wird (BERGER-GORBET et al. 1996, ROSENGREN et al. 1994). Aus eigenen Erfahrungen treten bei der Methacrylatpolymerisation Temperaturen über 50°C auf, die eine Denaturierung der antigenen Strukturen nach sich ziehen kann. RAMSHAW und Parums (1994) postulierten trotz guter immunhistochemischer Darstellung bei guter Antikörper-Penetration, dass quantitative Auswertungen äußerst delikate und fraglich zu diskutieren sind. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass die quantitative Mikroskopie auf Basis von Immunfluoreszenzfärbungen nach wie vor noch nicht standardisiert ist. Dies ist darin begründet, dass zur Vermeidung von Sättigungseffekten für jeden einzelnen Antikörper und das verwendete Fluoreszenzagens individuelle Verdünnungsstufen ermittelt und inkubiert werden. Die zu ermittelnden Verdünnungsstufen können je nach Charge trotz identischer Herstellungsverfahren bei ein und demselben Hersteller variieren. Ein quantitativer Vergleich verschiedener Antigene ist demzufolge aufgrund der Heterogenität der unterschiedlichen Antikörper nicht in absoluten Zahlen durchzuführen. In Anbetracht der kleinen Gruppengrößen, mit $n \leq 4$, der hier dargebotenen Studie und der zuvor beschriebenen Einschränkungen zur quantitativen Auswertung wurde auf eine Berechnung von Korrelationen und Signifikanzniveau verzichtet.

Tierexperimentelle Untersuchung

Das Versuchsprotokoll der hier durchgeführten Untersuchung entspricht den Richtlinien tierexperimenteller Versuchsanordnungen. Die jeweils beschriebenen Operationsmethoden wurden mit dem Ziel der minimalen Traumatisierung ausgewählt. Die regelmäßigen, postoperativen Gewichtskontrollen der Versuchstiere ergaben keinen

Hinweis auf Komplikationen oder pathologische Operationsfolgen. Im Vergleich der Implantationslokalisationen konnten nur die Versuchstiere nach intraossärer Implantation und Scheinoperation gleichermaßen zur unoperierten Kontrollgruppe wieder aufschließen. Dies erklärt sich jedoch durch den doppelt längeren Beobachtungszeitraum der intraossären Gruppe von 12 Wochen gegenüber 6 Wochen der subkutanen und intramuskulären Gruppe. Es kann davon ausgegangen werden, dass die subkutan und intraossär operierten Tiere bei längerer Beobachtung gleichermaßen mit den unoperierten Kontrolltieren wieder aufgeschlossen hätten. Der Vergleich aller Versuchstiere nach Implantation zur entsprechenden Scheinoperation ergab keine Unterschiede, sodass eine negative Einflussnahme durch das Implantat ausgeschlossen werden kann.

Die Röntgenkontrollen post mortem zeigten eine Implantatmigration nach intramuskulärer Implantation, ohne dass dieses Tier Infektionsprobleme oder Gewichtsverlust aufwies. SHANNON et al. (1997) fanden in ihrer Vergleichsstudie ebenfalls eine Implantatmigration, hier jedoch nach subkutaner Implantation.

Kapselqualität und zelluläre Gewebereaktion

Die zelluläre und kollagene Kapselqualität der Einheilkapseln nach Implantatinserion in Weichgewebe wurde histologisch mittels Immunperoxidase- und konventioneller Mehrfachfärbungen (HE, v. Giesson und Azan) beurteilt.

Nach subkutaner Titan-Implantation zeigten sich vermehrt locker angeordnete, teils parallel orientierte Kollagenfasern mit erhöhtem Zellaufkommen an Fibroblasten und Makrophagen. Diese lockere Kapselqualität konnte über beide Implantationszeiträume von 3 und 6 Wochen gleichermaßen gesehen werden. Nach subkutaner Implantation der VA-Stahl-Implantate konnten ebenfalls vermehrt locker und teils parallel orientierte Kollagenfasern mit erhöhtem Zellaufkommen an Fibroblasten und Makrophagen beobachtet werden. Nach 6 Wochen jedoch wiesen die Einheilkapseln vermehrt parallel orientierte teils dicht gepackte Kollagenfasern mit abnehmender zellulärer Begleitreaktion auf.

Im Materialvergleich unterschied sich dieser Entwicklungsverlauf der zunehmend orientierten Einheilkapsel nach subkutaner VA-Stahl-Implantation grundsätzlich vom Einheilungsverlauf nach subkutaner Titan-Implantation.

Nach intramuskulärer Titan-Implantation zeigten sich vorwiegend parallel angeordnete, teils dicht gepackte Kollagenfasern mit mäßig erhöhtem Zellaufkommen an Fibroblasten und Makrophagen. Im Verlauf von 3 zu 6 Wochen nahm der Anteil dicht gepackter Kollagenfasern mit minimalem Zellaufkommen deutlich zu. Nach intramuskulärer Implantation der VA-Stahl-Implantate war 3 Wochen nach Implantation reichlich paralleles teils ungeordnetes Kollagen mit meist erhöhtem Zellaufkommen zu beobachten. Im Verlauf von 3 zu 6 Wochen nahm auch bei VA-Stahl der Anteil dicht gepackter Kollagenfasern bei rückläufigem Zellaufkommen zu.

Im Vergleich der beiden Werkstoffe konnte bei zunächst orientierterer Kapselstruktur um Titan eine vergleichbare Entwicklung nach 6 Wochen gesehen werden. Auf zellulärer Ebene konnten weder nach subkutaner noch nach intramuskulärer Implantation oder im Materialvergleich reproduzierbare und ausgeprägte Unterschiede festgestellt werden. Dies erstaunt umso mehr, da unter der fortwährenden funktionellen Beanspruchung der intramuskulären Implantate im Bereich der Bauchmuskulatur gegenüber der statischeren Platzierung im subkutanen Rücken Fett eine erhöhte Zell- und Matrixreaktion zu erwarten war.

SHANNON (1995) fand in ihrer Vergleichsuntersuchung nach subkutaner Implantation der identischen Implantate für beide Werkstoffe eine moderate zelluläre Begleitreaktion mit ausgeglichenem Verhältnis von Fibroblasten und Makrophagen. Sie konnte auf zellulärer Ebene ebenfalls keine reproduzierbaren Unterschiede im Materialvergleich beider Werkstoffe darstellen. Vorausgegangene Studien (UNGERSBÖCK et al. 1994) hingegen fanden eine stärkere Entzündungsreaktion mit vermehrt dicht gepackten Makrophagen um VA-Stahl im Vergleich zu Titan. Einen möglichen Erklärungsansatz sehen SHANNON et al. (1997) in der höheren Oberflächenrauigkeit der von UNGERSBÖCK und PERREN (1994) verwendeten Implantate. Aufgrund der nicht einheitlichen Auswertungsmethodik der getrennten zellulären Auszählung von

Fibroblasten und Makrophagen ist ein Vergleich der verschiedenen Untersuchungen jedoch nur eingeschränkt möglich.

Fibronectin konnte im implantatnahen Interface um subkutan inserierte Titan-Implantate nach 3 und 6 Wochen wesentlich deutlicher angefärbt werden als um VA-Stahl. Nach intramuskulärer Implantation zeigten sich im Materialvergleich reproduzierbar geringere Unterschiede als subkutan. In den implantatnahen Kapselanteilen um die intramuskulär eingebrachten Titan-Implantate konnte ein deutlich erhöhtes Fibronectinaufkommen dargestellt werden. Im Lokalisationsvergleich um VA-Stahl-Implantate ergab sich intramuskulär ein eindeutig erhöhtes Aufkommen an Fibronectin und hier besonders im Intervall von 6 Wochen vergleichbar zu Titan.

Diese Beobachtungen könnten darauf hinweisen, dass das periimplantäre Einheilgewebe in Unterhautfettgewebe und Muskulatur eine bessere Adhäsion zu Titan mit Hilfe des Adhäsionsproteins Fibronectin eingehen kann. Des Weiteren könnte das erhöhte Aufkommen von Fibronectin im intramuskulären Einheilgewebe um VA-Stahl auf die zuvor schon erwähnte erhöhte Stoffwechselaktivität und funktionelle Belastung im Muskelgewebe zurückgeführt werden. ROSENGREN et al. (1994) inserierten Titanimplantate in die Bauchmuskulatur von Ratten und lokalisierten nach einer Woche die Proteine im Interface um die Implantate mittels immunhistochemischem Nachweis. Sie fanden heraus, dass Fibronectin meist zusammen mit Fibrinogen im implantatnahen Interface als eine Art Netzwerk vorhanden war, nicht aber an der Implantatoberfläche adsorbierte. Diese implantatnahe Fibronectinanreicherung konnte mittels Immunperoxidase an den hier untersuchten Präparaten ebenfalls dargestellt werden. Die Auswertung mittels CLSM konnte diese Befunde im Lokalisationsvergleich bestätigen, zeigte im Materialvergleich jedoch keine reproduzierbaren Unterschiede von Titan und VA-Stahl.

Kapseldicke

Die Dicke der Einheilkapseln um Implantate wird als Indikator der Biokompatibilität des Implantatwerkstoffes gewertet, wobei eine dünnere Einheilkapsel mit einer höheren Biokompatibilität verbunden wird (MCGEACHIE 1992).

Alle subkutan eingebrachten Implantate wiesen für Kollagen Typ I, Typ III und Fibronectin abnehmende Kapseldicken im Verlauf von 3 zu 6 Wochen Implantationsdauer auf. Im Materialvergleich beider Werkstoffe waren die Einheilkapseln um subkutan eingebrachte Titanimplantate bei Antikörperfärbung gegen Kollagen Typ I und Typ III über beide Implantationszeiträume dünner als die Einheilkapseln um VA-Stahl. Die Immunperoxidase-Anfärbung von Fibronectin bestätigte dies jedoch nur im Intervall nach 6 Wochen. Dies könnte als Folge des geringeren Fibronectinaufkommens um subkutan eingebrachte VA-Stahl-Implantate interpretiert werden. Es ergab sich keine Korrelation zu den ermittelten Kapselqualitäten.

Alle intramuskulär eingebrachten Implantate wiesen für Kollagen Typ I (C1), Kollagen Typ III (C3) und Fibronectin abnehmende Kapseldicken im Verlauf von 3 zu 6 Wochen Implantationsdauer vor. Im Materialvergleich beider Werkstoffe waren die Dicken der Einheilkapseln unter Berücksichtigung der Standardabweichung vergleichbar und darüber hinaus inkonstant. Lediglich bei Antikörperfärbung gegen Kollagen Typ III über 3 und 6 Wochen waren etwas dünnere Einheilkapseln um VA-Stahl auszumessen. Es ergab sich keine Korrelation zu den ermittelten Kapselqualitäten.

Im Lokalisationsvergleich heilten intramuskulär eingebrachte Titan-Implantate in dünneren Kapseln ein, als subkutan eingebrachte Implantate. Über beide Implantationszeiträume blieb dieses Verhältnis, vorbehaltlich der ermittelten Standardabweichung, konstant. Alle intramuskulär eingebrachten VA-Stahl-Implantate ergaben ebenfalls dünnere periimplantäre Einheilkapseln, als subkutan eingebrachte VA-Stahl-Implantate. Dies konnte über beide Implantationszeiträume beobachtet werden. Die deutlichsten Unterschiede der Kapseldicken ergaben sich im Lokalisationsvergleich subkutan vs. intramuskulär für VA-Stahl-Implantate bei Detektion von Kollagen Typ I (C1) und Kollagen Typ III (C3). Für Fibronectin fiel der Unterschied im Lokalisationsvergleich wesentlich geringer aus, welches auf die subkutan geringere Fibronectindichte zurückgeführt werden könnte.

Der Vergleich mit Angaben der Literatur zeigt, dass die Kapseldicken der hier untersuchten Präparate subkutan und intramuskulär deutlich größer waren. JOHANSSON et al. (1992) fanden nach intramuskulärer Titan-Implantation mittlere Kapseldicken von 50 - 70 μm , UNGERSBÖCK und PERREN (1994) nach subkutaner Titan-Implantation 50 - 95 μm . SHANNON (1995) gab ein mittlere Kapseldicke von 54 μm nach subkutaner Titan-Implantation an und führte die in Literaturangaben variierenden Werte auf die unterschiedlichen Oberflächenrauigkeiten zurück. In einer Vergleichsstudie an Implantaten der identischen Produktionscharge der Fa. Leibinger, Freiburg i. Breisgau, fanden SHANNON et al. (1997) jedoch keinen Zusammenhang zwischen Oberflächenstruktur, Oberflächenleitfähigkeit, Oberflächenrauigkeit und der Kapseldicke.

Die Kapseldicken um VA-Stahl-Implantate werden in der Literatur mit bis zu 156 μm deutlich dicker angegeben und sind mit den Kapseldicken der hier untersuchten Präparate durchaus vergleichbar. Wenngleich Stahl eine stärkere Gewebeantwort als Titan hervorruft (GOULD et al. 1981), konnten MCGEACHIE et al. (1992) in ihrer Untersuchung an Stahl- und Titanimplantaten in Muskelgewebe keinen statistisch signifikanten quantitativen Unterschied aufzeigen. Die Bedeutung der Kapseldicke im Weichgewebe, bei mangelnder Korrelation zwischen entzündlicher zellulärer Begleitreaktion und Kapseldicke, ist fraglich zu diskutieren.

Nach intraossärer Insertion hingegen bedeutet die Bildung einer periimplantären Weichgewebekapsel eine kapitale Einschränkung der Implantatfunktion. Die Osseointegration ist gleichermaßen die Voraussetzung zur Gewährleistung einer langfristigen Funktionsfähigkeit des Implantates. Alle hier untersuchten, intraossär eingebrachten Implantate heilten im Sinne einer Osseointegration ein. Es ergab sich weder klinisch bei Explantation noch histologisch ein Hinweis auf bindegewebiges Periimplantärgewebe. Unter der Fragestellung der Bemessung der periimplantären Reaktionszone wurde in der hier vorgestellten Untersuchung die Dicke der periimplantären Kallusformation aufgrund der einheitlichen Methodik herangezogen. Durch die einheitliche Methodik der Insertion mit gleichem Bohrer, identischer Drehzahl und Kühlung sollte die Einflussnahme auf die Dicke der Kallusformation vermieden

werden. Die Distanzmessungen intraossär ergaben im Materialvergleich dünnere Kallusformationen für VA-Stahl ($58 \pm 2 \mu\text{m}$ - $65 \pm 3 \mu\text{m}$) gegenüber Titan ($77 \pm 4 \mu\text{m}$ - $84 \pm 2 \mu\text{m}$) in allen Proteinfluoreszenzen. VIROLAINEN et al. (1997) beschrieben eine Reaktionszone von bis zu $48 \mu\text{m}$ 56 Tage nach intraossärer Insertion von Keramikkkugeln und somit insgesamt dünnere Reaktionszonen. Im zeitlichen Verlauf von 3 zu 6 sowie 12 Wochen Implantationsdauer kam es zu vernachlässigbaren Verbreiterungen sowie auch Verschmälerungen der Kallusdicke. Die Qualität der Kallusformation und die histologische Kallusstruktur glichen sich mit zunehmender Implantationsdauer der regulären Knochenstruktur an.

Fluoreszenzprofile der Matrixproteine

Die Beurteilung von Vorkommen und Verteilung der Matrixproteine Kollagen Typ I (C1), Kollagen Typ III (C3) und Fibronectin mittels Konfokaler Laserscanning Mikroskopie in den implantatnahen Kapselanteilen (0 - 30 %) zeigte bei deutlichen Standardabweichungen für beide Werkstoffe erhöhte Fluoreszenz-Intensitäten in allen Proteinfärbungen im 3- und 6-Wochen-Intervall. In den mittleren (30 - 70 %) und den implantatfernen Kapselabschnitten (70 - 100 %) zeigten beide Werkstoffe nur für Kollagen Typ I (C1) in beiden Zeitintervallen höhere Fluoreszenzwerte. Kollagen Typ III (C3) und Fibronectin zeigten hier keine deutlichen Fluoreszenzunterschiede zu den Vergleichskollektiven.

Analog zur subkutanen Implantatinsertion waren auch intramuskulär trotz deutlicher Standardabweichungen vorwiegend in den implantatnahen Kapselanteilen für beide Werkstoffe erhöhte Fluoreszenz-Intensitäten in allen Proteindetektionen im 3- und 6-Wochen-Intervall nachzuweisen. In den mittleren Kapselabschnitten (30 - 70 %) konnten reproduzierbare Fluoreszenzverstärkungen nur bei Detektion von Kollagen Typ I (C1) nach 3 Wochen und Kollagen Typ III (C3) nach 3 und 6 Wochen gesehen werden. In den implantatfernen Kapselabschnitten (70 - 100 %) ergab Kollagen Typ III (C3) stärkere Fluoreszenzdifferenzen als die Vergleichskollektive. Die Fibronectinprofile der Implantatkapseln zeigten keine eindeutigen Unterschiede zu scheinoperierten Präparaten.

Im Materialvergleich beider Werkstoffe waren bei durchaus vergleichbaren und nahezu analogen Fluoreszenzprofilen nach subkutaner und intramuskulärer Implantation keine reproduzierbaren Unterschiede festzustellen.

Der Lokalisationsvergleich für Titan- und VA-Stahl-Implantate ergab unter Berücksichtigung der teilweise deutlichen Standardabweichungen für keine der durchgeführten Proteindetektionen reproduzierbare Unterschiede der Fluoreszenzprofile.

Nach intraossärer Insertion waren für beide Werkstoffe in implantatnahen Kallusanteilen (0 - 30 %) erhöhte Fluoreszenz-Intensitäten aller Matrixproteine im 3- und 6-Wochen-Intervall gegenüber den Vergleichskollektiven nachweisbar. Nach 12 Wochen kam es bis auf Kollagen Typ I (C1) in allen Proteindarstellungen zu einem nahezu vollständigen Angleichen der Fluoreszenzintensitäten. In den mittleren Kallusabschnitten (30 - 70 %) konnten reproduzierbare Fluoreszenzunterschiede bei Detektion von Kollagen Typ I (C1) in allen Zeitintervallen gesehen werden. Die Fluoreszenzwerte für Kollagen Typ III (C3) und Fibronectin lagen hier über den gesamten Implantationszeitraum höher und nahezu auf dem Niveau der periimplantären Werte. Insgesamt zeigte der intraossäre Materialvergleich implantatnahe (0 - 30 %) und implantatferne (70 - 100 %) Fluoreszenzmaxima für alle hier dargestellten Matrixproteine, die mit zunehmender Implantationsdauer abfielen. Reproduzierbare materialspezifische Unterschiede ergaben sich nicht. Im Vergleich zur aktuellen Literatur konnte die von VIROLAINEN et al. (1997) beschriebene biphasische Proteinhäufung um intraossär eingebrachte Implantate nicht nachvollzogen werden. Ebenso konnten die Ergebnisse von LINDHOLM et al. (1996) im zeitlichen Verlauf abnehmende Proteinaufkommen an Kollagen Typ III und zunehmende Proteinaufkommen an Kollagen Typ I nach intraossärer Implantation in der hier vorgestellten Studie nicht vergleichbar gesehen werden.

Unter physiologischen Bedingungen ist in der organischen Knochenmatrix kein Fibronectin nachweisbar. Nach Hydroxylapatitimplantation in Knochen jedoch konnten LINDHOLM et al. (1996) Fibronectin im Interface nachweisen. In Übereinstimmung hiermit ergaben die hier vorgestellten Ergebnisse Fibronectinanreicherungen in den

Kallusformationen nach intraossärer Implantatinsertion. Es zeigten sich hier des Weiteren materialspezifische Unterschiede zwischen Titan- und VA-Stahl-Implantaten. Die Kollagen detektionen hingegen ergaben im Materialvergleich Titan vs. VA-Stahl, wie auch schon von BERGER-GORBET et al. (1996) festgestellt, keine reproduzierbaren Unterschiede.

Die Fluoreszenzprofile der intraossär scheinoperierten Präparate zeigten im mittleren Kallusbereich für alle nachgewiesenen Matrixproteine erhöhte Werte, die dem Niveau der periimplantären Werte entsprach. Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass die lokale, intraossäre Anreicherung von Matrixproteinen, unabhängig von Implantatinsertion oder gar Werkstoffeigenschaften, nach jeglicher Traumatisierung von Knochengewebe den knöchernen Reparatursprozess begleitet. Unter dem Aspekt der Restitutio ad Integrum von Knochenwunden können diese Beobachtungen auf das implantatnahe und das implantatferne, heißt knochen-nahe, Restitutionszentrum übertragen werden. Die Aktivität dieser Restitutionszentren hält bis zum Abschluss der knöchernen Remodellierung an. Den hier vorgestellten Beobachtungen zu Folge sind diese Remodellierungsvorgänge nach 12 Wochen noch nicht abgeschlossen. Dies deckt sich mit Aussagen von STEFLIK et al. (1998), wonach der periimplantäre Knochenumbau langfristig dynamisch bestehen bleibt.

Ein direkter Vergleich der hier dargestellten Studienergebnisse mit der aktuell verfügbaren Literatur war nicht möglich, da bisher keine vergleichbaren Untersuchungen mit der Konfokalen Laserscanning Mikroskopie (CLSM) durchgeführt wurden.

Ausblick

In den letzten drei Jahrzehnten hat der klinische Einsatz von Implantaten im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich sehr stark zugenommen. Die Anzahl der Implantationen in Deutschland stieg von 200000 im Jahr 2001 auf über 600000 im Jahr 2006. Jährlich werden weltweit über 1,5 Millionen Zahn-Implantate gesetzt. Trotz dieser enorm zunehmenden Verbreitung sind grundsätzliche Prinzipien des Designs und der klinischen Anwendung von Biomaterialien noch nicht abschließend entschlüsselt. Um dieses Ziel erreichen zu können, muss ein besseres Verständnis der Kommunikationswege zwischen Implantaten und Biosystemen gewonnen werden. Dies bedeutet für die Herstellung und

Entwicklung von Implantaten, die in Kommunikation mit der Implantatumgebung stehen sollen, dass nicht nur die Werkstoffauswahl und die hiervon abgeleitete Einstellung von Deckschichten auf deren Oberfläche wichtig ist, sondern auch die funktionell erforderliche Oberflächenstrukturierung auf die gewünschte Wechselwirkung mit Bestandteilen der EZM und den Zellen angepasst sein sollte (THULL 2005).

Die Konfokale Laserscanning Mikroskopie (CLSM) könnte, den apparativen Möglichkeiten zufolge, ganze Gewebeblöcke um metallische Implantate 3-dimensional abscannen und rekonstruieren. Hierdurch bestünde die Möglichkeit, das Implantat in situ zu belassen und das Interface von Biomaterial und Empfängergewebe nativ zu untersuchen. Die hierzu erforderlichen Verfahrenswege für nativ behandelte, größere Gewebeblöcke mit Implantat sind zu erarbeiten um reproduzierbare Ergebnisse erzielbar zu machen.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden tierexperimentellen Studie war es, Unterschiede im Einheilverhalten der Werkstoffe Titan und VA-Stahl (316L) anhand der Matrixproteine Kollagen Typ I (C1), Kollagen Typ III (C3) und Fibronectin im implantatumgebenden Interface zu untersuchen und darzustellen. Hierzu wurden die Einheilkapseln der Implantate nach subkutaner, intramuskulärer und intraossärer Implantation nach den Bewertungskriterien Kapselqualität, Kapseldicke und Verteilungsmuster der Matrixproteine mittels konventioneller Mikroskopie und Konfokaler Laserscanning Mikroskopie (CLSM) analysiert.

Nach subkutaner Implantation zeigten beide Werkstoffe in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von SHANNON et al. (1997) vermehrt locker angeordnete, teils parallel orientierte Kollagenfasern mit erhöhtem Zellaufkommen an Fibroblasten und Makrophagen. Nach intramuskulärer Implantation jedoch fanden sich vorwiegend parallel angeordnete, teils dicht gepackte Kollagenfasern mit nur mäßig erhöhtem Zellaufkommen. Intramuskulär eingebrachte Implantate heilten in dünneren Kapseln ein, als subkutan eingebrachte Implantate. Es ergab sich keine Korrelation zu den ermittelten Kapselqualitäten. Dies erstaunt umso mehr, da unter der fortwährenden funktionellen Beanspruchung der intramuskulären Implantate im Bereich der Bauchmuskulatur gegenüber der statischeren Platzierung im subkutanen Rückenfett eine erhöhte Zell- und Matrixreaktion erwartet worden war. Im Lokalisationsvergleich zeigte sich intramuskulär für beide Werkstoffe ein erhöhtes Aufkommen an Fibronectin. Dies könnte auf die erhöhte Stoffwechselaktivität und funktionelle Belastung im Muskelgewebe zurückgeführt werden (ROSENGREN et al. 1994). Nach intraossärer Implantation konnten dünnere Kallusformationen für VA-Stahl gegenüber Titan in allen Proteinfluoreszenzen nachgewiesen werden. Die Qualität der Kallusformation und die histologische Kallusstruktur glichen sich mit zunehmender Implantationsdauer der regulären Knochenstruktur an.

Die semiquantitativ beurteilte Verteilung der Matrixproteine mittels CLSM zeigte bei deutlichen Standardabweichungen für beide Werkstoffe erhöhte Fluoreszenz-Intensitäten nur in den implantatnahen Kapselanteilen. In den mittleren und den implantatfernen

Kapselabschnitten waren für beide Werkstoffe inkonstant höhere Fluoreszenzwerte gegenüber den Vergleichskollektiven messbar. Der intraossäre Materialvergleich ergab implantatnahe und implantatferne Fluoreszenzmaxima für alle Matrixproteine, die mit zunehmender Implantationsdauer abfielen. Reproduzierbare, materialspezifische Unterschiede waren in Analogie zu BERGER-GORBET et al. (1996) nicht zu finden. In den mittleren Kallusabschnitten konnten reproduzierbare Fluoreszenzunterschiede nur bei Detektion von Kollagen Typ I (C1) in allen Zeitintervallen gesehen werden. Im Vergleich zur Literatur konnte die von VIROLAINEN et al. (1997) beschriebene biphasische Proteinanhäufung, wie auch ein wechselndes Proteinaufkommen (LINDHOLM et al. 1996) nach intraossärer Implantation nicht nachvollzogen werden. Ergänzende Beobachtungen der hier vorgestellten Studie verdeutlichen, dass die lokale, intraossäre Anreicherung von Matrixproteinen, unabhängig von Implantatinsertion oder gar Werkstoffeigenschaften, nach jeglicher Traumatisierung von Knochengewebe den knöchernen Reparatursprozess begleitet. Unter dem Aspekt der Restitutio ad Integrum von Knochenwunden können diese Beobachtungen auf das implantatnahe und das implantatferne Restitutionszentrum übertragen werden. Die Aktivität dieser Restitutionszentren hält bis zum Abschluss der knöchernen Remodellierung über 12 Wochen hinaus an. Dies deckt sich mit Aussagen von STEFLIK et al. (1998), wonach der periimplantäre Knochenumbau langfristig dynamisch bestehen bleibt.

Um der zunehmenden Verbreitung nicht nur dentaler Implantate gerecht zu werden, muss auch zukünftig ein besseres Verständnis der Kommunikationswege zwischen Implantaten und Biosystemen gewonnen werden. Dies bedeutet für die Herstellung und Weiterentwicklung von Implantaten, dass nicht nur die Werkstoff- und Oberflächenauswahl wichtig ist, sondern auch die funktionell erforderliche Oberflächenstrukturierung auf die gewünschte Wechselwirkung mit Bestandteilen der EZM und den Zellen angepasst sein sollte (THULL 2005).

Die CLSM kann hierbei aufgrund der Möglichkeit der 3-dimensionalen in-situ-Darstellung des Implantatinterface biologisch-strukturelle und molekularbiologisch-immunologische Fragestellungen beantworten.

6 Literaturverzeichnis

Adams DO:

The granulomatous inflammatory response.

Amer J Pathol 84: 164-91, 1976

Adell R, Lekholm U, Rockler B, Brånemark PI:

A 15 year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw.

Int J Oral Surg 10: 387-416, 1981

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P:

Molecular Biology of the Cell - 4th ed.

Garland Science, London UK, 2002

Anderson AM, Hastings GW, Fisher TR, Ross ERS:

Collagen types present at human fracture sites – a preliminary report.

Injury 17: 78-80, 1986

Bagambisa FB, Kappert HF, Schilli W:

Cellular and molecular biological events at the implant interface.

J Craniomaxillofac Surg 22: 12-7, 1994

Bailey AJ, Basin S, Sims TJ:

Characterization of the Collagen of Human and Normal Scars.

Biochem Biophys Acta 415: 412-21, 1975

Baschong W, Lambrecht JT:

Influence of the implant surface on the early phase of osteogenesis in vitro].

Schweiz Monatsschr Zahnmed 114: 792-9, 2004

Berger-Gorbet M, Broxup B, Rivard C, Yahia L'H:

Biocompatibility testing of NiTi screws using immunohistochemistry on sections containing metallic implants.

J Biomed Mater Res 32: 243-8, 1996

Bernacca GM, Gibson SA, Wilkinson R, Wheatley DJ:

Confocal laser scanning microscopy of calcified bioprosthetic heart valves.

J Heart Valve Dis 3: 205-11, 1994

Birch M, Brotchie D, Roberts N, Grierson I:

The three-dimensional structure of the connective tissue in the lamina cribrosa of the human optic nerve head.

Ophthalmologica 211: 183-91, 1997

Bodine RL, Mohammed CI:

Implant denture histology: Gross and microscopic studies of a human mandible with a 12-year subperiosteal implant denture.

Dent Clin North Am 14: 145-59, 1970

Bornstein P, Duksin D, Balian G, Davidson JM, Crouch E:

Organization of extracellular proteins on the connective tissue cell surface: relevance to cell-matrix interactions in vitro and in vivo.

Ann N Y Acad Sci 312: 93-105, 1978

Brakenhoff GJ, Blom P, Bakker C:

Confocal scanning light microscopy.

Proc ICO 11: 215-8, 1978

Brånemark PI, Albrektsson T:

Titanium implants permanently penetrating human skin.

Scand J Plast Reconstr Surg 16: 17-21, 1982

Brånemark PI, Breine U, Adell R:

Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies.

Scand J Plast Reconsgr Surg.3: 81-100, 1969

Brash JL:

In: Leonard F.E., Turitto V.T., Vroman L. (eds): Blood in contact with natural and artificial surfaces.

Ann N Y Acad Sci 516: 206-22, 1987

Breemhaar W, Brinkman E, Ellens DJ, Beugeling T, Bantjes A:

Preferential adsorption of high density lipoprotein from blood plasma onto biomaterial surfaces.

Biomaterials. 5: 269-74, 1984

Brème J:

Titanium and Titanium Alloys, Biomaterials of Preference.

Memoires et Études Scientifiques de la Revue de Métallurgie, October 1989

Brunski JB:

Biomaterials and biomechanics in dental implant design

Int J Oral Maxillofac Implants 3: 85-97, 1988

Bucher O, Wartenberg H:

Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 11. Aufl.

Hans Huber, Stuttgart, 153-9, 1989

Campagnola PJ, Loew LM:

Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms.

Nat Biotechnol 21: 1356-60, 2003

Chehroudi B, McDonnell D, Brunette DM:

The effects of micromachined surfaces on formation of bonelike tissue on subcutaneous implants as assessed by radiography and computer image processing.

J Biomed Mater Res 34: 279-90, 1997

Clore JN, Cohen IK, Diegelmann RF:

Quantitation of collagen types I and III during wound healing in rat skin.

Proc Soc Exp Biol Med 161: 337-40, 1979

Cochran DL:

A comparison of endosseous dental implant surfaces.

J Periodontol 70: 1523-39, 1999

Cohen J:

Assay of foreign-body reactions.

J Bone Jt Surg 41 A: 152-66, 1959

Cuypers P, Willems GM, Kop JMM, Corsel JW, Jansen MP, Hermens WTh:

Protein at interfaces.

ACS Symposium Series, Washington DC 343: 208-21, 1987

Dobbs HS, Scales JT:

Behaviour of Commercially Pure Titanium and Ti-318 (Ti-6Al-4V) in Orthopaedic Implants.

In: Luckey HA, Kubli F (eds.): Titanium Alloys in Surgical Implants, ASTM STP 796.

Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials: 173-86, 1986

Doundoulakis JH:

Surface analysis of titanium after sterilization: role in implant-tissue interface and bioadhesion.

J Prosthet Dent 58: 471-8, 1987

Ellingsen JE:

A study on the mechanism of protein adsorption to TiO₂.

Biomaterials 12: 593-6, 1991

Elwing H, Askendal A, Lundström I:

Competition between fibrinogen and high molecular weight kininogen on solid surfaces incubated in human plasma (The Vroman effect): Influence of solid surface wettability.

J Biomed Mater Res 21: 1023-28, 1987

Emnéus H, Stenram U:

Reaction of tissues to alloys used in osteosynthesis. Experimental, histological examination of soft tissue in animals.

Acta Orthop Scand 29: 315-30, 1960

Emnéus H:

Some aspects of osteosynthetic materials as a foreign body.

Acta Orthop Scand 38: 368-418, 1967

Escalas F:

Biocompatibility of materials for total joint replacement.

Proc Inst Med Chic 30: 198-9, 1975

Feinberg MW, Jain MK, Werner F, Sibinga NE, Wiesel P, Wang H, Topper JN, Perrella MA, Lee ME:

Transforming growth factor-beta 1 inhibits cytokine-mediated induction of human metalloelastase in macrophages.

J Biol Chem 275: 25766-73, 2000

Gailit J, Clark RA

Studies in vitro on the role of alpha v and beta 1 integrins in the adhesion of human dermal fibroblasts to provisional matrix proteins fibronectin, vitronectin, and fibrinogen.

J Invest Dermatol 106: 102-8, 1996

Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Libby P:

Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induced in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerotic lesions.

Ann N Y Acad Sci 748: 501-7, 1995

Gay S, Miller EJ:

Collagen in the physiology and pathology of connective tissue.

Gustav Fischer, Stuttgart: 47-62, 1978

Glantz PO:

The Choice of Alloplastic Materials for Oral Implants: Does it Really Matter?

Int J Prosthodont 11: 402-7, 1998

Gould T, Brunett D, Westbury L:

The attachment mechanism of epithelial cells to titanium in vitro.

J Periodont Res 16: 611-6, 1981

Gronowicz G, McCarthy MB:

Response of human osteoblasts to implant materials: integrin-mediated adhesion.

J Orthop Res 14:878-87, 1996

Hanawa T:

Titanium and Its Oxide Film: A Substrate for Formation of Apatite.

in: Hanawa T: The Bone Biomaterial Interface.

University Toronto Press, Toronto, 49-61, 1991

Hansson H, Albrektsson T, Brånemark PI:

Structural aspects of the interface between tissue and titanium implants.

J Prosth Dent 50: 108-13, 1983

Hay ED:

Cell Biology of Extracellular Matrix. 2nd ed.

Plenum Press, New York, 1991

Hay ED:

Extracellular matrix.

J Cell Biol. 91: 205-23, 1981

Hayakawa T, Hashimoto Y, Myokei Y, Aoyama H, Izawa Y:

Changes in type of collagen during the development of human post-burn hypertrophic scars.

Clin Chim Acta 93: 119-25, 1979

Hayakawa T, Hashimoto Y, Myokei Y, Aoyama H, Izawa Y:

The effect of skin grafts on the ratio of collagen types in human post-burn wound tissues.

Connective tissue Res 9: 249-52, 1982

Healy KE, Ducheyne P:

The Mechanisms of Passive Dissolution of Titanium in a Model Physiological Environment.

J Biomed Mater Res 26: 319-38, 1992

Hering TM, Marchant RE, and Anderson JM:

Type V collagen during granulation tissue development.

Exp. Molec. Pathol. , 39, 219-229, 1983

Hodde JP, Johnson CE:

Extracellular matrix as a strategy for treating chronic wounds.

Am J Clin Dermatol 8: 61-6, 2007

Horbett TA, Schway MB:

Correlations between mouse 3T3 cell spreading and serum fibronectin adsorption on glass and hydroxyethylmethacrylate-ethylmethacrylate copolymers.

J Biomed Mater Res 22: 763-93, 1988

Hunt TK, van Winkle WJr:

Normal repair.

In: Dumphy JE, Hunt TK (eds): Fundamentals of wound management.

Appelton-Century Crofts, New York, 1979

Hynes RO:

Fibronectins.

Springer, Berlin, 1990

Ingham KC, Brews SA, Migliorini MM:

Further localization of the gelatin-binding determinants within fibronectin. Active fragments devoid of type II homologous repeat modules.

J Biol Chem 264: 16977-80, 1989

Ivarsson B, Lundström I:

Physical characterization of protein adsorption on metal and metal oxide surfaces.

CRC Crit Rev Biocomp 2:1-96, 1986

James R:

A histopathological study of the nature of epithelium surrounding implant posts. Part I
J Oral Implantol 3: 105-22, 1972

James R:

A histopathological study of the nature of epithelium surrounding implant posts. Part II
J Oral Implantol 3: 137-59, 1973

Jansen JA, den Braber ET, Walboomers XF, de Ruijter JE:

Soft Tissue and Epithelial Models.
Adv Dent Res 13: 57-66, 1999

Johansson CB, Albrektsson T, Ericson LE, Thomsen P:

A Quantitative Comparison of the Cell Response to Commercially Pure Titanium and Ti-6-Al-4V Implants in the Abll of Rats.
J MaterSci Mater Med 3: 126-36, 1992

Jones CW, Smolinski D, Keogh A, Kirk TB, Zheng M:

Confocal laser scanning microscopy in orthopaedic research.
Prog Histochem Cytochem 40: 1-71, 2005

Karlson P, Doenecke D, Koolmann J:

Biochemie. 14. Auflage.
Georg Thieme, Stuttgart, 1994

Kasemo B, Lausmaa J:

Surface science aspects on inorganic biomaterials.
CRC Crit Rev Biocomp 2:335-80, 1986

Kasemo B:

Biocompatibility of titanium implants: Surface science aspects.
J Prosthet Dent 49: 832-7, 1983

- Kurita K, Hashimoto Y, Takei T, Kawai T, Hayakawa T:
Changes in collagen types during the healing of rabbit tooth extraction wounds.
J Dent Res 64: 28-32, 1985
- Laing PJ, Ferguson AB, Hodge ES:
Tissue reaction in rabbit muscle exposed to metallic implants.
J Biomed Mater Res 1: 135-49, 1967
- Leonhardt H:
Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen.
Georg Thieme, Stuttgart, 1990
- Linder L, Lundskog J:
Incorporation of stainless steel, titanium and Vitallium in bone.
Injury 6:277-85, 1975
- Lindholm TC, Gao TJ, Lindholm TS:
Time related deviations of fibronectin and type I, II and III collagen on the interface
between a hydroxyapatite disc and the rim of a calvarial trephine defect in rabbits.
Biomaterials 17: 1515-20, 1996
- Linsenmayer TF:
Collagen.
In: Hay E.D. (ed): Cell Biology of Extracellular Matrix, 2nd ed.
Plenum, New York, 1991
- Loechler PS, Mueller MW:
Successful implant dentures.
Northwest Dent 31: 134-9, 1952
- McDonald JA:
Extracellular matrix assembly.
Ann Rev Cell Biol 4: 183-207, 1988

McGeachie J, Smith E, Roberts P, Grounds M:

Reaction of skeletal muscle to small implants of titanium or stainless steel: a quantitative histological and autoradiographic study.

Biomaterials 13:562-8, 1992

Merritt K, Edwards CR, Brown SA:

Use of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for quantification of proteins on the surface of materials.

J Biomed Mater Res 22: 99-109, 1988

Miller EJ:

Collagen Types: Structure, Distribution and Functions. Collagen. Volume I Biochemistry.

CRC, Boca Raton Florida, 139-55, 1988

Morra M:

Engineering of biomaterials surfaces by hyaluronan.

Biomacromolecules 6: 1205-23, 2005

Mosher DF:

Fibronectin.

Academic, New York, 1989

Moursi AM, Damsky CH, Lull J, Zimmerman D, Doty SB, Aota S, Globus RK:

Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation.

J Cell Sci 109:1369-80, 1996

Multimaki A, Aro H, Vurio E:

Differential expression of fibrillar collagen genes during callus formation.

Biochem Biophys Res Commun 142: 536-41, 1987

Nimni ME:

Collagen. Volume I Biochemistry.

CRC, Boca Raton Florida, 1-77, 1988

Noda M, Rodan GA:

Transcriptional regulation of osteopontin production in rat osteoblast-like cells by parathyroid hormone.

J Cell Biol.108:713–8, 1989

Nöth U, Hendrich C, Merklein F, Altvater T, Rader CP, Schutze N, Eulert J, Thull R:

Standardized testing of bone implant surfaces with an osteoblast cell culture system. II. Titanium surfaces of different degrees of roughness.

Biomed Tech (Berl) 44: 6-11, 1999

Oldenbourg R, Terada H, Tiberio R, Inoue S:

Image sharpness and contrast transfer in coherent confocal microscopy.

J Microsc 172: 31-9, 1993

Osborn JF:

Biomaterials and their application to implantation.

SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd. 89: 1138-9, 1979

Park J-C, Kim H-M, Ko JS:

Effects of Extracellular Matrix Constituents on the Attachment of Human Oral Epithelial Cells at the Titanium Surface.

Int J Oral Maxillofac Implants 13: 826-36, 1998

Puleo DA, Nanci A:

Understanding and controlling the bone-implant interface.

Biomaterials 20:2311-21, 1999

Ramshaw AL, Parums DV:

The distribution of adhesion molecules in chronic periaortitis.

Histopathology 24: 23-32, 1994

Recum von A.F., Opitz H., Wu E.:

Collagen types I and III at the implant/tissue interface.

J Biomed Mater Res 27: 757-61, 1993

Robey PG:

Bone Matrix Proteglycans and Glycoproteins.

In: Bilezikian J, Raisz L, Rodan G (eds): Principles of Bone Biology, 2nd ed..

Academic, New York, 1996

Romeis B:

Mikroskopische Technik, 17. Auflage.

Urban & Schwarzenberg, München, 1989.

Rosengren A, Johansson BR, Thomsen P, Ericson LE:

Method for immunolocalisation of extracellular proteins in association with the implant-soft tissue interface.

Biomaterials 15: 17-24, 1994

Rossert J, de Crombrughe B:

Type I Collagen: Structure, Synthesis and Regulation.

In: Bilezikian J, Raisz L, Rodan G(eds): Principles of Bone Biology, 2nd ed.

Academic, New York, 1996

Sahar ND, Hong SI, Kohn DH:

Micro- and nano-structural analyses of damage in bone.

Micron 36: 617-29, 2005

Salthouse TN:

Some aspects of macrophage behavior at the implant interface.

J Biomed Mater Res 18: 395-401, 1984

Schmidt M, Steinemann M:

XPS Studies of Amino Acids Adsorbed on Titaniumdioxide Surfaces.

Fresenius J Anal Chem 341: 412-5, 1991

Schneider G, Burr ridge K:

Formation of focal adhesions by osteoblasts adhering to different substrata.

Exp Cell Res 214: 264-9, 1994

Schroeder A, Zypen E, Stich H, Sutter F:

The reactions of bone, connective tissue and epithelium to endosteal implants with titanium sprayed surfaces.

J Maxillofac Surg 9: 15-25, 1981

Schüpbach P, Glauser R, Rocci A, Martignoni M, Sennerby L, Lundgren A, Gottlow J:

The human bone-oxidized titanium implant interface: A light microscopic, scanning electron microscopic, back-scatter scanning electron microscopic, and energy-dispersive x-ray study of clinically retrieved dental implants

Clin Implant Dent Relat Res 7 Suppl 1: 36-43, 2005

Seah K, Chen X:

A Comparison Between the Corrosion Characteristics of 316 Stainless Steel, Solid Titanium and Porous Titanium.

Corr Sci 34: 1841-51, 1993

Shah AK, Sinha RK, Hickok NJ, Tuan RS:

High-resolution morphometric analysis of human osteoblastic cell adhesion on clinically relevant orthopedic alloys.

Bone 24: 499-506, 1999

Shannon C, Thull R, Recum v. AF:

Types I and III collagen in the tissue capsules of titanium and stainless steel implants.

J Biomed Mater Res 34: 401-408, 1997

Sheppard CJR, Wilson T:

Depth of field in the scanning microscope.

Optics Letters 3, 3: 115-21, 1978

Shieh T, Hashimoto Y, Hayakawa T:

Changes in collagen content and collagen types during repair of mandibular defects.

Aichi – Gakuin Daigaku Nagoya Shigakkai Shi. 23: 763-72, 1985

Simon JP, Fabry G:

An overview of Implant materials.

Acta Orthopaedica Belgica 57: 1-5, 1991

Siwik DA, Chang DL, Colucci WS:

Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro.

Circ Res 86: 1259-65, 2000

Sjöberg B, Eriksson M, Osterlund E, Pap S, Osterlund K:

Solution structure of human plasma fibronectin as a function of NaCl concentration determined by small-angle X-ray scattering.

Eur Biophys J 17: 5-11, 1989

Slack SM, Bohnert JL, Horbett TA:

In: Leonard FE, Turitto VT, Vroman L (eds): Blood in contact with natural and artificial surfaces.

Ann N Y Acad Sci 516: 223-43, 1987

Spencer ND, Textor M:

Surface Modification, Surface Analysis, and Biomaterials.

www.suface.mat.ethz.ch/Lsst/Schlieren/Cd/Papers/NDS1989b.pdf, 1998

Spiekermann H:

Implantologie.

In: Rateitschak K.H. und Wolf H.F. (Hrsg): Farbatlanten der Zahnmedizin Band 10.

Georg Thieme, Stuttgart, 1994

Steflik DE, Corpe RS, Lake FT, Young TR, Sisk AL, Parr GR, Hanes PJ, Berkery DJ:

Ultrastructural analyses of the attachment (bonding) zone between bone and implanted biomaterials.

J Biomed Mater Res 39: 611-20, 1998

Sunny MC, Sharma CP:

Fibrinogen-aluminium interaction: Changes with oxide layer thickness onto metal surface.

J Biomed Mater Res 24: 455-62, 1990

Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, Triplett RG, Woody RD:

Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review.

Int J Oral Maxillofac Implants, 15:675-90, 2000.

Termine JD:

The tissue-specific proteins of the bone matrix.

In: Butler, W.T. (ed): The chemistry and biology of mineralized tissues.

Ebsco Media Inc., Birmingham Alabama: 94-7, 1985

Thomsen P, Bjursten LM, Ericson LE:

Implants in the abdominal wall of the rat.

Scand J Plast Reconstr Surg 20: 173-82, 1986

Thull R :

The long-term stability of metallic materials for use in joint endoprotheses.

Med Prog Technol. 29: 103-12, 1977

Thull R:

Kommunikation zwischen strukturierten Oberflächen und Biosystemen.

Galvanotechnik 7: 1580-8, 2005

Thull R:

Oberflächenmodifikationen zur Verbesserung von Biokompatibilität und mechanischen Eigenschaften von orthopädischen Implantaten.

Orthopäde 32: 51-9, 2003

Thull R:

Physicochemical principles of tissue material interactions.

Biomol Eng 19: 43-50, 2002

Thull R:

Scientific aspects of raw materials in medicine.

Naturwissenschaften 81: 481-8, 1994

Thull R:

Surface Processes in Artificial Organs - an Overview.

Med Prog Technol 9: 119-128, 1982

Tjellstrom A, Rosenhall U, Lindstrom J, Hallen O, Albrektsson T, Brånemark PI:

Five year experience with skin penetrating bone anchored implants in the temporal bone.

Acta Otolaryngol 95: 568-75, 1983

Toth RW, Parr GR, Gardner LK:

Soft tissue response to endosseous titanium oral implants.

J Prosthet Dent 54: 564-7, 1985

Truskey GA, Pirone JS:

The effect of fluid shear stress upon cell adhesion to fibronectin-treated surfaces.

J Biomed Mat Res 24: 1333-53, 1990

Tschon M, Fini M, Giavaresi G, Borsari V, Lenger H, Bernauer J, Chiesa R, Cigada A,

Chiusoli L, Giardino R:

Soft tissue response to a new austenitic stainless steel with a negligible nickel content.

Int J Artif Organs 28: 1003-11, 2005

Ungersbock A, Pohler O, Perren SM:

Evaluation of the soft tissue interface at titanium implants with different surface treatments: experimental study on rabbits.

Biomed Mater Eng 4: 317-25, 1994

Uzui H, Harpf A, Liu M, Doherty TM, Shukla A, Chai NN, Tripathi PV, Jovinge S, Wilkin DJ, Asotra K, Shah PK, Rajavashisth TB:

Increased expression of membrane type 3-matrix metalloproteinase in human atherosclerotic plaque: role of activated macrophages and inflammatory cytokines
Circulation 106: 3024-30, 2002

Vroman L:

Effects of hydrophobic surfaces upon blood coagulation.

Thromb Diath Haemorrh 10: 455-93, 1964

Wennerberg A, Bolind P, Albrektsson T

Glow-discharge pretreated implants combined with temporary bone tissue ischemia.

Swed Dent J 15: 95-101, 1991

Wijnaendts van Resandt RW, Marsman HJB, Kaplan R, Davoust J, Stelzer EHK, Stocker R:

Optical fluorescence microscopy in three dimension: Microtomoscopy.

J Microscopy 138: 29-34 1985

Williams DF:

Biocompatibility of Clinical Implant Materials, Vols. 1-11.

CRC, Boca Raton Florida, 1982

Williams DF:

Definitions in biomaterials.

In: Proceedings of a Consensus Conference of the European Society of Biomaterials (ESB); Chester (England), 3.-5. March 1986.

Elsevier, Amsterdam: 60, 1987

Williams DF:

The properties and medical uses of material. Part III: The reactions of tissues to materials.

Biomed Engng 6: 152-6, 1981

Wolff C, Lay CS:

Fluorescence energy transfer detects changes in fibronectin structure upon surface binding.

Arch Biochem Biophys 268: 536-45, 1989

Wolfram D, Rainer C, Niederegger H, Piza H, Wick G:

Cellular and molecular composition of fibrous capsules formed around silicone breast implants with special focus on local immune reactions.

J Autoimmun 23:81-91, 2004

Erratum in: J Autoimmun Jun 24: 361, 2005

Woodward SC, Salthouse T:

The tissue response to implants and its evaluation by light microscopy.

In: von Recum AF (ed): Handbook of Biomaterials Evaluation.

Macmillan, New York, 1986

Yamada KM:

Fibronectin structure functions and receptors.

Curr Opin Cell Biol 1: 956-63, 1989

Yamada KM:

Fibronectin and other Cell interactive Glycoproteins.

In: Hay, ED (ed): Cell Biology of Extracellular Matrix, 2nd ed.

Plenum, New York, 1991

Zaidel-Bar R, Cohen M, Addadi L, Geiger B:

Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes.

Biochem Soc Trans 32: 416-20, 2004

7 Anhang

7.1 Ätzlösungen für Implantate

7.1.1 Titan

20 Teile Aqua dest.
3 Teile H₂O₂ (Wasserstoffperoxid 30 %)
1 Teil HF (Flusssäure 32 %)

7.1.2 Stahl

30 Teile Aqua dest.
7 Teil HF (Flusssäure 32 %)
7 Teile HNO₃ (Salpetersäure 65 %)

7.2 Färbungen

7.2.1 Gelatinebeschichtung von Objektträgern

Gereinigte Objektträger in Farbkörbchen 3x in Aqua dest. tauchen, auf Zellstoff ablaufen lassen; danach 3x im Abstand von 15 min. in die auf 40°C erwärmte Gelatinelösung eintauchen. Gelatinelösung im Wasserbad erwärmt. Beschichtete Objektträger senkrecht mit Mattrand nach unten auf einer Kunststoffplatte zum trocknen aufstellen. Getrocknete Objektträger werden im Präparatekasten aufbewahrt. Die Gelatinelösung muß nach dem Gebrauch filtriert werden und ist für ca. 4 Wochen bei 4°C haltbar;

7.2.2 Gelatinelösung für HRP (1%)

2,5 g Gelatine gepulvert in 125 ml Aqua dest. bei ca. 40°C auflösen, 0,25 mg Chromalaun (Chrom-3-Kaliumsulfat) zugeben und abschließend auf 250 ml mit Aqua dest. auffüllen.

7.2.3 Hämatoxylin – Eosin

7.2.3.1 Herstellung der Färbelösung Hämalaun

1 g Hämatoxylin in 1000 ml Aqua dest. auflösen, Zugabe von 0,2 g Natriumjodat (NaJO_3); hierzu 50 g chemisch reines Kaliumaluminiumsulfat unter Umschütteln auflösen (blauvioletter Farbton) 50 g Chloralhydrat sowie 1 g krist. Zitronensäure hinzugeben und abschließend vor Gebrauch filtrieren;

7.2.3.2 Herstellung der Färbelösung Eosin

0,1 g Eosin gelblich in 1000 ml Aqua dest. auflösen;

7.2.3.3 Färbung der Präparate

Fixierung in Aceton	3 x 5 min.
Hämalaun nach Mayer	8 – 10 min.
Aqua dest.	spülen
Leitungswasser, fließend	10 min.
Aqua dest.	spülen
Eosin, 0,1 % wässrig	5 – 10 min.
Aqua dest.	kurz spülen
Aufsteigende Alkoholreihe:	
Alkohol 96 %	3 x 2 min.
Alkohol abs.	3 x 2 min.
Xylol.....	3 x 2 min

Eindecken mit Entellan (da Eosin wasserlöslich)

7.2.4 Azan

7.2.4.1 Herstellung der Färbelösung Azokarmin

0,1 g Azokarmin G in 100 ml Aqua dest. aufschwemmen, kurz aufkochen, abkühlen, filtrieren, zusetzen von 1ml Eisessig, Azokarmin B in 0,25 - 1 % iger Lösung anwenden und 1 ml Eisessig zusetzen;

7.2.4.2 Herstellung der Färbelösung Anilinblau-Orange G

0,5 g Anilinblau wasserlöslich und 2 g Orange G in 100 ml Aqua dest. lösen, 8 ml Eisessig zusetzen, aufkochen und nach dem Erkalten filtrieren; zur Färbung diese Stammlösung 1:2 mit Aqua dest. verdünnen;

7.2.4.3 Färbung der Präparate

Fixierung in Aceton	3 x 5 min.
Azokarminlösung (56°C vorgewärmt).....	10 - 15 min.
Aqua dest.	spülen
Anilin-Alkohol.....	nur noch Zellkerne gefärbt
(1 ml Anilin auf 1000 ml Alkohol 96 %)	
Eisessigsäure-Alkohol	30 - 60 sec
(1 ml Eisessig auf 100 ml Alkohol 96 %)	
5 % ige wässrige Phosphorwolframsäure	1 - 3 Stunden
Aqua dest.	spülen
Anilinblau Orange G Lösung.....	1 - 3 Stunden
Aqua dest.	spülen
Aufsteigende Alkoholreihe:	
Alkohol 96 %	3 x 2 min.
Alkohol abs.	3 x 2 min.
Xylol.....	3 x 2 min
Eindecken mit Entellan	

7.2.5 van Gieson (modifiziert nach Hansen)

7.2.5.1 Herstellung der Färbelösung Eisenhämatoxylin nach Weigert:

Lösung A: 1 g Hämatoxylin in 100 ml Äthanol 96 % (einige Tage reifen lassen);

Lösung B: 4 ml wässrige Eisendreichloridlösung 29 % mit 1 ml Salzsäure 25 % und 95 ml Aqua dest.; beide Lösungen unmittelbar vor dem Benutzen zu gleichen Teilen mischen;

7.2.5.2 Herstellung der Färbelösung van Gieson modifiziert nach Hansen:

500 ml filtrierte Pikrinsäure (gesättigt, wässrig) mit 25 ml 2 % Säurefuchsinlösung (wässrig) ansetzen und die Lösung anschließend mit 2,625 ml 2 % Essigsäure ansäuern.

7.2.5.3 Färbung der Präparate

Fixierung in Aceton 3 x 5 min.
Eisenhämatoxylin-Lösung 2 - 5 min.
Aqua dest. kurz spülen
unter fliessendem Leitungswasser bläuen..... 15 min.
(Mikroskopische Kontrolle, im Notfall 0,1 % HCl-Alkohol für Sekunden)
mit Filterpapier trocknen
van Gieson Lösung 3 min.
mit Filterpapier trocknen
Aufsteigende Alkoholreihe:
Alkohol 96 % 3 x 2 min.
Alkohol abs. 3 x 2 min.
Xylol..... 3 x 2 min
Eindecken mit Entellan

7.2.6 Immunperoxidase an Cryoschnitten

1. Fixierung: 10 min Aceton , abgiessen
15 min trocknen lassen
2. Waschen: 3x mit TrisNaCl pH 7,4
3. Absättigen: 5 min Inkubation
Albuminserum des Ak-Spender-Tieres des Sek.-Ak
zum Absättigen der endogenen Peroxidasen des Gewebes
4. Waschen: 3x mit TrisNaCl pH 7,4
5. "Pre-do": 15 min mit Lsg. aus 12 ml PBS und 60 ml H₂O₂ (30%)
6. Waschen: 3x mit TrisNaCl pH 7,4
7. Primär-Ak: 30 min Inkubation bei individueller Verdünnung
RABBIT Anti-RAT „Matrix-Protein“ polyklonal Antibody
8. Waschen: 3x mit TrisNaCl pH 7,4
9. Sek.-Ak.: 30 min Inkubation;
CHICKEN Anti-RABBIT-IgG (H&L) horseradish peroxidase
affinity purified Antibody, Verdünnung 1:50
10. Waschen: 3x mit TrisNaCl pH 7,4
11. Tertiär-Ak.: 30 min Inkubation
RABBIT Anti- CHICKEN -IgG (H&L) horseradish peroxidase
affinity purified Antibody, Verdünnung 1:50
12. Waschen: 3x mit TrisNaCl pH 7,4
13. Puffern: mit PBS pH 7,4 bis zu Schritt 14
14. DAB-Reakt.: 10 ml PBS pH 7,4
6 mg DAB (3,3 Diaminobenzidintetrahydrochloridacid)
10 ml H₂O₂ (30%)
10 min Inkubation
15. Puffern: mit PBS pH 7,4 bis zu Schritt 14
16. Waschen: 5x mit Aqua dest. (ausgiebig !!!)
17. Gegenfärbung: 5 min mit Hämalaun nach Meyer inkubieren
18. Waschen: 15 min fliessend wässern, 3x mit Aqua dest.
19. Eindecken: mit 20 min zuvor bei 60°C verflüssigter Kaisers
Glyceringelatine danach aufbringen des Deckglases

7.2.7 Immunfluoreszenz an Cryoschnitten

1. Fixierung: 10 min Aceton , abgiessen
15 min trocknen lassen
2. Waschen: 3x mit TrisNaCl pH 7,4
3. Absättigen: 5 min Inkubation
Albuminserum des Ak-Spender-Tieres des Sek.-Ak
zum Absättigen der endogenen Peroxidasen des Gewebes
4. Waschen: 3x mit TrisNaCl pH 7,4
5. "Pre-do": 15 min mit Lsg. aus 12 ml PBS und 60 ml H₂O₂ (30%)
6. Waschen: 3x mit TrisNaCl pH 7,4
7. Primär-Ak: 30 min Inkubation bei individueller Verdünnung
RABBIT Anti-RAT „Matrix-Protein“ polyklonal Antibody
8. Waschen: 3x mit TrisNaCl pH 7,4
9. Sek.-Ak.: 60 min Inkubation;
GOAT Anti-RABBIT-IgG (H&L) FITC-konjugiert
affinity purified Antibody, Verdünnung 1:50
10. Waschen: 3x mit TrisNaCl pH 7,4
11. Puffern: mit PBS pH 7,4 bis zu Schritt 14
12. Anti-Fading
mit Eindeckmittel
10 ml PBS
100 mg p-Phenylendiamin
90 ml Glycerin
auf pH 9.0 auftitriert
13. Eindecken: mit vorgekühltem (+3°C) Deckglass
14. Lagerung im Dunkeln bei +3°C

7.3 Daten-Tabellen

7.3.1 Kapseldicken aller periimplantären Einheilkapseln und Kallusformationen

Dicke der Einheilkapseln			subcutan		intramuskulär		intraossär	
			Titan	VA-Stahl	Titan	VA-Stahl	Titan	VA-Stahl
Antikörper C1	3 Wo.	Dicke (μm)	184	227	145	156	84	62
		SD (μm)	6	22	19	14	2	2
		N	4	4	4	4	2	2
	6 Wo.	Dicke (μm)	106	143	102	94	83	60
		SD (μm)	15	15	6	15	5	0
		N	3	4	3	4	2	2
	12 Wo.	Dicke (μm)	-	-	-	-	81	65
		SD (μm)	-	-	-	-	0	3
		N	-	-	-	-	2	2
Antikörper C3	3 Wo.	Dicke (μm)	159	187	145	125	83	60
		SD (μm)	12	13	23	17	4	1
		N	3	4	4	4	2	2
	6 Wo.	Dicke (μm)	110	133	104	90	81	61
		SD (μm)	3	12	12	13	1	0
		N	4	4	3	4	2	2
	12 Wo.	Dicke (μm)	-	-	-	-	78	61
		SD (μm)	-	-	-	-	0	2
		N	-	-	-	-	2	2
Antikörper Fibronectin	3 Wo.	Dicke (μm)	178	169	157	145	77	59
		SD (μm)	9	9	19	4	4	2
		N	4	4	4	4	2	2
	6 Wo.	Dicke (μm)	117	147	95	131	78	58
		SD (μm)	11	19	4	13	5	2
		N	4	4	3	4	2	2
	12 Wo.	Dicke (μm)	-	-	-	-	81	65
		SD (μm)	-	-	-	-	1	1
		N	-	-	-	-	2	2

Tabelle 5 arithmetische Mittelwerte der Dicken aller periimplantären Einheilkapseln und Kallusformationen

7.3.2 Intensitätsprofile

Intervall auf der Distanzskala	Intensitäten (subcutan, Antikörper C1, 3 Wo.)												Gesamt
	Titan	SD	N	VA-Stahl	SD	N	Schein-OP (kein Implantat)	SD	N	Kontrollen (keine OP)	SD	N	
5%	141	44	4	113	43	4	44	-	1	19	-	1	108
10%	111	29	4	110	8	4	55	-	1	24	-	1	96
15%	114	34	4	92	33	4	58	-	1	27	-	1	91
20%	95	28	4	74	23	4	54	-	1	23	-	1	75
25%	95	25	4	85	11	4	34	-	1	28	-	1	78
30%	103	28	4	109	42	4	38	-	1	37	-	1	92
40%	87	12	4	88	25	4	50	-	1	34	-	1	79
55%	96	24	4	86	25	4	41	-	1	29	-	1	80
70%	83	13	4	73	13	4	36	-	1	30	-	1	69
80%	87	22	4	96	15	4	56	-	1	24	-	1	81
85%	88	18	4	70	9	4	34	-	1	22	-	1	69
90%	66	14	4	83	18	4	32	-	1	47	-	1	67
95%	81	35	4	90	11	4	43	-	1	30	-	1	76
100%	101	17	4	77	14	4	51	-	1	28	-	1	79
Gesamt	96	29	56	89	25	56	45	9	14	29	7	14	81

Tabelle 6 Fluoreszenzprofil subcutan, Kollagen Typ I (C1), 3 Wochen

Intervall auf der Distanzskala	Intensitäten (subcutan, Antikörper C1, 6 Wo.)												Gesamt
	Titan	SD	N	VA-Stahl	SD	N	Schein-OP (kein Implantat)	SD	N	Kontrollen (keine OP)	SD	N	
5%	108	36	3	136	40	4	28	-	1	28	-	1	103
10%	109	41	3	130	10	4	32	-	1	28	-	1	101
15%	82	8	3	96	13	4	28	-	1	26	-	1	76
20%	104	17	3	92	8	4	31	-	1	25	-	1	82
25%	96	30	3	81	21	4	27	-	1	23	-	1	74
30%	89	25	3	87	18	4	32	-	1	23	-	1	74
40%	82	16	3	91	27	4	31	-	1	33	-	1	75
55%	87	14	3	71	13	4	32	-	1	32	-	1	68
70%	77	6	3	73	20	4	55	-	1	31	-	1	68
80%	80	19	3	75	13	4	33	-	1	45	-	1	69
85%	64	23	3	74	10	4	29	-	1	17	-	1	59
90%	65	19	3	74	11	4	26	-	1	25	-	1	60
95%	62	14	3	70	21	4	47	-	1	34	-	1	61
100%	56	14	3	80	24	4	36	-	1	50	-	1	64
Gesamt	83	25	42	88	27	56	33	8	14	30	9	14	74

Tabelle 7 Fluoreszenzprofil subcutan, Kollagen Typ I (C1), 6 Wochen

Intervall auf der Distanzskala	Intensitäten (subcutan, Antikörper C3, 3 Wo.)												Gesamt
	Titan	SD	N	VA-Stahl	SD	N	Schein-OP (kein Implantat)	SD	N	Kontrollen (keine OP)	SD	N	
5%	150	30	3	161	65	4	164	-	1	84	-	1	149
10%	149	37	3	139	39	4	119	-	1	87	-	1	134
15%	119	8	3	115	37	4	92	-	1	71	-	1	109
20%	102	12	3	119	24	4	104	-	1	69	-	1	106
25%	89	21	3	132	15	4	94	-	1	72	-	1	107
30%	96	12	3	120	20	4	106	-	1	67	-	1	105
40%	94	16	3	122	24	4	112	-	1	72	-	1	106
55%	88	10	3	112	14	4	119	-	1	80	-	1	101
70%	77	3	3	92	16	4	65	-	1	93	-	1	84
80%	95	4	3	90	1	4	104	-	1	108	-	1	95
85%	87	22	3	91	18	4	73	-	1	104	-	1	89
90%	84	10	3	90	9	4	73	-	1	99	-	1	87
95%	75	2	3	104	12	4	100	-	1	85	-	1	92
100%	84	6	3	97	12	4	87	-	1	84	-	1	90
Gesamt	99	27	42	113	31	56	101	25	14	84	13	14	104

Tabelle 8 Fluoreszenzprofil subcutan, Kollagen Typ III (C3), 3 Wochen

Intervall auf der Distanzskala	Intensitäten (subcutan, Antikörper C3, 6 Wo.)												Gesamt
	Titan	SD	N	VA-Stahl	SD	N	Schein-OP (kein Implantat)	SD	N	Kontrollen (keine OP)	SD	N	
5%	115	21	4	172	51	4	72	-	1	93	-	1	131
10%	135	36	4	135	36	4	88	-	1	76	-	1	124
15%	133	23	4	117	33	4	113	-	1	76	-	1	119
20%	124	19	4	110	30	4	98	-	1	57	-	1	109
25%	144	19	4	103	37	4	82	-	1	76	-	1	115
30%	123	12	4	106	46	4	92	-	1	89	-	1	110
40%	113	6	4	89	9	4	82	-	1	75	-	1	97
55%	109	19	4	87	14	4	84	-	1	80	-	1	95
70%	98	19	4	97	24	4	93	-	1	91	-	1	96
80%	99	18	4	95	33	4	100	-	1	86	-	1	96
85%	89	18	4	90	32	4	128	-	1	82	-	1	93
90%	97	40	4	83	13	4	120	-	1	76	-	1	91
95%	88	15	4	91	14	4	101	-	1	88	-	1	90
100%	88	24	4	95	12	4	83	-	1	69	-	1	88
Gesamt	111	27	56	105	35	56	95	16	14	80	10	14	104

Tabelle 9 Fluoreszenzprofil subcutan, Kollagen Typ III (C3), 6 Wochen

Intervall auf der Distanzskala	Intensitäten (subcutan, Antikörper Fibronektin, 3 Wo.)												Gesamt
	Titan	SD	N	VA-Stahl	SD	N	Schein-OP (kein Implantat)	SD	N	Kontrollen (keine OP)	SD	N	
5%	182	64	4	140	26	4	61	-	1	60	-	1	141
10%	183	53	4	141	20	4	72	-	1	56	-	1	143
15%	161	18	4	135	24	4	101	-	1	57	-	1	134
20%	159	3	4	119	18	4	80	-	1	65	-	1	126
25%	125	15	4	114	10	4	116	-	1	61	-	1	113
30%	116	17	4	123	12	4	127	-	1	69	-	1	115
40%	111	14	4	100	13	4	81	-	1	76	-	1	100
55%	106	14	4	96	17	4	80	-	1	76	-	1	96
70%	107	11	4	92	11	4	75	-	1	66	-	1	94
80%	95	20	4	93	14	4	78	-	1	69	-	1	90
85%	99	21	4	88	12	4	62	-	1	59	-	1	87
90%	104	9	4	84	14	4	73	-	1	64	-	1	89
95%	98	14	4	84	9	4	74	-	1	79	-	1	88
100%	109	9	4	79	11	4	82	-	1	80	-	1	91
Gesamt	125	38	56	106	26	56	83	19	14	67	8	14	108

Tabelle 10 Fluoreszenzprofil subcutan, Fibronektin, 3 Wochen

Intervall auf der Distanzskala	Intensitäten (subcutan, Antikörper Fibronektin, 6 Wo.)												Gesamt
	Titan	SD	N	VA-Stahl	SD	N	Schein-OP (kein Implantat)	SD	N	Kontrollen (keine OP)	SD	N	
5%	136	24	4	126	33	4	73	-	1	81	-	1	120
10%	143	26	4	116	32	4	84	-	1	65	-	1	119
15%	138	16	4	113	33	4	78	-	1	52	-	1	114
20%	138	30	4	120	19	4	106	-	1	57	-	1	119
25%	123	23	4	135	21	4	110	-	1	54	-	1	120
30%	121	8	4	114	21	4	82	-	1	53	-	1	108
40%	121	11	4	120	22	4	88	-	1	79	-	1	113
55%	106	17	4	117	12	4	98	-	1	62	-	1	105
70%	105	24	4	109	14	4	150	-	1	66	-	1	107
80%	90	25	4	99	7	4	192	-	1	73	-	1	102
85%	81	6	4	110	10	4	126	-	1	58	-	1	95
90%	79	17	4	111	16	4	105	-	1	78	-	1	94
95%	84	18	4	106	19	4	96	-	1	88	-	1	94
100%	83	20	4	105	10	4	93	-	1	72	-	1	91
Gesamt	111	29	56	114	20	56	106	32	14	67	12	14	107

Tabelle 11 Fluoreszenzprofil subcutan, Fibronektin, 6 Wochen

Intervall auf der Distanzskala	Intensitäten (intramuskulär, Antikörper C1, 3 Wo.)												Gesamt
	Titan	SD	N	VA-Stahl	SD	N	Schein-OP (kein Implantat)	SD	N	Kontrollen (keine OP)	SD	N	
5%	167	11	4	124	24	4	71	-	1	47	-	1	128
10%	153	15	4	127	33	4	81	-	1	65	-	1	126
15%	127	21	4	119	38	4	74	-	1	49	-	1	110
20%	123	25	4	119	19	4	90	-	1	57	-	1	111
25%	107	12	4	113	35	4	83	-	1	47	-	1	101
30%	98	22	4	128	29	4	69	-	1	79	-	1	105
40%	106	28	4	120	9	4	68	-	1	75	-	1	105
55%	104	16	4	100	13	4	70	-	1	68	-	1	96
70%	94	15	4	88	18	4	65	-	1	53	-	1	85
80%	106	14	4	83	29	4	69	-	1	44	-	1	87
85%	99	20	4	78	28	4	76	-	1	38	-	1	82
90%	118	24	4	86	29	4	63	-	1	39	-	1	92
95%	111	22	4	87	40	4	59	-	1	45	-	1	90
100%	108	33	4	99	30	4	80	-	1	52	-	1	96
Gesamt	116	27	56	105	30	56	73	9	14	54	13	14	101

Tabelle 12 Fluoreszenzprofil intramuskulär, Kollagen Typ I (C1), 3 Wochen

Intervall auf der Distanzskala	Intensitäten (intramuskulär, Antikörper C1, 6 Wo.)												Gesamt
	Titan	SD	N	VA-Stahl	SD	N	Schein-OP (kein Implantat)	SD	N	Kontrollen (keine OP)	SD	N	
5%	136	25	3	113	20	4	46	-	1	50	-	1	106
10%	147	25	3	113	37	4	69	-	1	59	-	1	113
15%	131	16	3	103	10	4	32	-	1	53	-	1	99
20%	101	23	3	98	16	4	52	-	1	47	-	1	88
25%	108	23	3	102	12	4	36	-	1	55	-	1	91
30%	103	18	3	87	18	4	37	-	1	68	-	1	84
40%	100	19	3	79	15	4	62	-	1	50	-	1	81
55%	102	3	3	77	13	4	74	-	1	54	-	1	83
70%	101	18	3	84	11	4	73	-	1	45	-	1	84
80%	91	17	3	87	15	4	74	-	1	56	-	1	83
85%	84	32	3	85	9	4	98	-	1	49	-	1	82
90%	104	36	3	83	23	4	67	-	1	49	-	1	84
95%	112	18	3	87	18	4	58	-	1	64	-	1	89
100%	89	20	3	81	24	4	53	-	1	48	-	1	77
Gesamt	108	25	42	91	20	56	59	18	14	53	7	14	89

Tabelle 13 Fluoreszenzprofil intramuskulär, Kollagen Typ I (C1), 6 Wochen

Intervall auf der Distanzskala	Intensitäten (intramuskulär, Antikörper C3, 3 Wo.)												Gesamt
	Titan	SD	N	VA-Stahl	SD	N	Schein-OP (kein Implantat)	SD	N	Kontrollen (keine OP)	SD	N	
5%	157	67	4	143	32	4	63	-	1	39	-	1	130
10%	131	17	4	123	21	4	71	-	1	50	-	1	113
15%	141	13	4	120	31	4	54	-	1	72	-	1	117
20%	130	14	4	109	24	4	83	-	1	92	-	1	113
25%	117	12	4	108	27	4	87	-	1	62	-	1	105
30%	102	14	4	106	20	4	98	-	1	45	-	1	98
40%	108	17	4	99	9	4	75	-	1	44	-	1	95
55%	101	7	4	99	9	4	66	-	1	44	-	1	91
70%	100	21	4	99	13	4	67	-	1	37	-	1	90
80%	81	25	4	101	18	4	68	-	1	35	-	1	83
85%	83	30	4	93	9	4	66	-	1	38	-	1	81
90%	94	28	4	102	17	4	65	-	1	36	-	1	88
95%	95	36	4	114	24	4	64	-	1	49	-	1	95
100%	89	27	4	117	24	4	56	-	1	61	-	1	94
Gesamt	109	33	56	109	23	56	70	12	14	50	16	14	99

Tabelle 14 **Fluoreszenzprofil intramuskulär, Kollagen Typ III (C3), 3 Wochen**

Intervall auf der Distanzskala	Intensitäten (intramuskulär, Antikörper C3, 6 Wo.)												Gesamt
	Titan	SD	N	VA-Stahl	SD	N	Schein-OP (kein Implantat)	SD	N	Kontrollen (keine OP)	SD	N	
5%	136	22	3	143	58	4	39	-	1	28	-	1	116
10%	162	22	3	110	23	4	61	-	1	32	-	1	113
15%	133	16	3	104	29	4	72	-	1	52	-	1	104
20%	120	21	3	92	22	4	108	-	1	42	-	1	98
25%	122	8	3	97	22	4	58	-	1	44	-	1	95
30%	113	17	3	92	21	4	39	-	1	35	-	1	87
40%	113	6	3	91	27	4	44	-	1	51	-	1	89
55%	105	14	3	87	24	4	38	-	1	50	-	1	84
70%	98	10	3	83	8	4	37	-	1	40	-	1	78
80%	94	21	3	77	22	4	35	-	1	40	-	1	74
85%	105	16	3	73	21	4	38	-	1	61	-	1	78
90%	120	17	3	79	21	4	50	-	1	54	-	1	87
95%	130	4	3	84	24	4	49	-	1	36	-	1	90
100%	126	14	3	81	21	4	41	-	1	30	-	1	86
Gesamt	120	22	42	92	29	56	51	20	14	43	10	14	91

Tabelle 15 **Fluoreszenzprofil intramuskulär, Kollagen Typ III (C3), 6 Wochen**

Intervall auf der Distanzskala	Intensitäten (intramuskulär, Antikörper Fibronectin, 3 Wo.)												
	Titan	SD	N	VA-Stahl	SD	N	Schein-OP (kein Implantat)	SD	N	Kontrollen (keine OP)	SD	N	Gesamt
5%	138	35	4	105	91	4	77	-	1	56	-	1	110
10%	138	6	4	88	78	4	88	-	1	49	-	1	104
15%	118	21	4	131	36	4	64	-	1	62	-	1	112
20%	124	18	4	121	16	4	58	-	1	51	-	1	109
25%	110	20	4	122	41	4	81	-	1	60	-	1	107
30%	100	13	4	121	33	4	104	-	1	58	-	1	105
40%	102	10	4	103	24	4	75	-	1	65	-	1	96
55%	114	16	4	106	16	4	89	-	1	73	-	1	104
70%	121	17	4	101	21	4	89	-	1	66	-	1	104
80%	114	19	4	99	20	4	87	-	1	84	-	1	102
85%	108	11	4	100	10	4	84	-	1	76	-	1	99
90%	117	14	4	123	35	4	78	-	1	86	-	1	112
95%	107	26	4	107	24	4	83	-	1	74	-	1	101
100%	111	24	4	95	29	4	82	-	1	74	-	1	98
Gesamt	116	20	56	109	37	56	81	11	14	67	12	14	105

Tabelle 16 Fluoreszenzprofil intramuskulär, Fibronectin, 3 Wochen

Intervall auf der Distanzskala	Intensitäten (intramuskulär, Antikörper Fibronectin, 6 Wo.)												
	Titan	SD	N	VA-Stahl	SD	N	Schein-OP (kein Implantat)	SD	N	Kontrollen (keine OP)	SD	N	Gesamt
5%	197	53	3	181	38	4	138	-	1	80	-	1	170
10%	122	35	3	157	45	4	149	-	1	63	-	1	134
15%	129	23	3	152	39	4	129	-	1	78	-	1	134
20%	112	25	3	136	13	4	116	-	1	52	-	1	116
25%	124	28	3	146	16	4	102	-	1	91	-	1	127
30%	100	36	3	132	19	4	99	-	1	84	-	1	112
40%	90	15	3	133	11	4	100	-	1	75	-	1	109
55%	95	11	3	138	24	4	114	-	1	84	-	1	115
70%	87	8	3	131	25	4	120	-	1	83	-	1	110
80%	100	16	3	132	33	4	85	-	1	49	-	1	107
85%	103	6	3	132	43	4	99	-	1	41	-	1	109
90%	88	14	3	127	39	4	82	-	1	33	-	1	98
95%	89	16	3	107	26	4	106	-	1	39	-	1	93
100%	77	8	3	107	18	4	91	-	1	38	-	1	88
Gesamt	108	35	42	136	32	56	109	20	14	64	21	14	116

Tabelle 17 Fluoreszenzprofil intramuskulär, Fibronectin, 6 Wochen

Intervall auf der Distanzskala	Intensitäten (intraossär, Antikörper C1, 3 Wo.)												
	Titan	SD	N	VA-Stahl	SD	N	Schein-OP (kein Implantat)	SD	N	Kontrollen (keine OP)	SD	N	Gesamt
5%	198	18	2	184	11	2	50	-	1	39	-	1	142
10%	112	9	2	176	32	2	67	-	1	48	-	1	115
15%	103	4	2	144	30	2	48	-	1	44	-	1	98
20%	96	4	2	139	6	2	52	-	1	30	-	1	92
25%	107	37	2	111	6	2	54	-	1	35	-	1	87
30%	87	19	2	100	33	2	54	-	1	23	-	1	75
40%	80	13	2	75	1	2	63	-	1	38	-	1	68
55%	91	1	2	74	13	2	58	-	1	35	-	1	70
70%	92	15	2	68	14	2	50	-	1	29	-	1	66
80%	90	5	2	69	39	2	44	-	1	25	-	1	64
85%	107	21	2	91	51	2	41	-	1	30	-	1	78
90%	108	29	2	105	13	2	62	-	1	34	-	1	87
95%	141	7	2	117	17	2	48	-	1	29	-	1	99
100%	126	2	2	122	1	2	52	-	1	27	-	1	96
Gesamt	109	32	28	112	41	28	53	7	14	33	7	14	88

Tabelle 18 Fluoreszenzprofil intraossär, Kollagen Typ I (C1), 3 Wochen

Intervall auf der Distanzskala	Intensitäten (intraossär, Antikörper C1, 6 Wo.)												
	Titan	SD	N	VA-Stahl	SD	N	Schein-OP (kein Implantat)	SD	N	Kontrollen (keine OP)	SD	N	Gesamt
5%	158	6	2	132	2	2	55	-	1	40	-	1	112
10%	98	50	2	112	17	2	58	-	1	28	-	1	84
15%	68	6	2	75	3	2	61	-	1	22	-	1	61
20%	70	17	2	77	2	2	42	-	1	29	-	1	61
25%	59	11	2	71	8	2	49	-	1	25	-	1	56
30%	77	8	2	78	13	2	57	-	1	23	-	1	65
40%	52	2	2	74	16	2	40	-	1	29	-	1	53
55%	63	1	2	74	1	2	41	-	1	30	-	1	57
70%	62	16	2	74	6	2	42	-	1	29	-	1	57
80%	68	9	2	74	11	2	42	-	1	32	-	1	60
85%	77	4	2	78	7	2	37	-	1	31	-	1	63
90%	87	7	2	97	18	2	38	-	1	31	-	1	73
95%	95	2	2	98	17	2	36	-	1	29	-	1	75
100%	113	4	2	117	8	2	48	-	1	49	-	1	93
Gesamt	82	29	28	88	21	28	46	8	14	31	7	14	69

Tabelle 19 Fluoreszenzprofil intraossär, Kollagen Typ I (C1), 6 Wochen

Intervall auf der Distanzskala	Intensitäten (intraossär, Antikörper C1, 12 Wo.)												
	Titan	SD	N	VA-Stahl	SD	N	Schein-OP (kein Implantat)	SD	N	Kontrollen (keine OP)	SD	N	Gesamt
5%	66	28	2	96	14	2	36	-	1	31	-	1	65
10%	74	16	2	85	14	2	32	-	1	31	-	1	64
15%	52	4	2	86	28	2	36	-	1	40	-	1	58
20%	59	5	2	83	18	2	27	-	1	31	-	1	57
25%	56	8	2	69	11	2	25	-	1	32	-	1	51
30%	58	3	2	70	18	2	35	-	1	33	-	1	54
40%	57	1	2	65	2	2	38	-	1	30	-	1	52
55%	61	11	2	55	3	2	31	-	1	33	-	1	49
70%	65	14	2	59	4	2	36	-	1	34	-	1	53
80%	72	10	2	54	3	2	33	-	1	41	-	1	54
85%	61	2	2	55	8	2	32	-	1	39	-	1	50
90%	69	6	2	59	5	2	30	-	1	33	-	1	53
95%	60	3	2	62	5	2	48	-	1	36	-	1	55
100%	54	1	2	65	0	2	27	-	1	43	-	1	51
Gesamt	62	10	28	69	16	28	33	6	14	35	4	14	55

Tabelle 20 Fluoreszenzprofil intraossär, Kollagen Typ I (C1), 12 Wochen

Intervall auf der Distanzskala	Intensitäten (intraossär, Antikörper C3, 3 Wo.)												
	Titan	SD	N	VA-Stahl	SD	N	Schein-OP (kein Implantat)	SD	N	Kontrollen (keine OP)	SD	N	Gesamt
5%	102	47	2	62	22	2	19	-	1	9	-	1	59
10%	45	6	2	66	13	2	16	-	1	8	-	1	41
15%	56	19	2	56	5	2	24	-	1	13	-	1	43
20%	49	10	2	54	17	2	16	-	1	15	-	1	40
25%	48	15	2	53	13	2	16	-	1	21	-	1	40
30%	48	18	2	50	13	2	20	-	1	15	-	1	39
40%	48	4	2	57	18	2	49	-	1	9	-	1	45
55%	50	8	2	40	7	2	39	-	1	10	-	1	38
70%	50	1	2	40	13	2	31	-	1	10	-	1	37
80%	55	2	2	51	3	2	34	-	1	9	-	1	42
85%	56	10	2	43	1	2	49	-	1	7	-	1	42
90%	75	1	2	46	6	2	19	-	1	7	-	1	45
95%	63	3	2	49	5	2	26	-	1	7	-	1	43
100%	75	17	2	53	11	2	35	-	1	7	-	1	50
Gesamt	58	19	28	51	11	28	28	12	14	11	4	14	43

Tabelle 21 Fluoreszenzprofil intraossär, Kollagen Typ III (C3), 3 Wochen

Intervall auf der Distanzskala	Intensitäten (intraossär, Antikörper C3, 6 Wo.)												Gesamt
	Titan	SD	N	VA-Stahl	SD	N	Schein-OP (kein Implantat)	SD	N	Kontrollen (keine OP)	SD	N	
5%	61	6	2	92	10	2	17	-	1	7	-	1	55
10%	35	5	2	84	18	2	70	-	1	8	-	1	53
15%	58	11	2	56	14	2	19	-	1	9	-	1	43
20%	43	17	2	43	1	2	24	-	1	5	-	1	33
25%	26	1	2	45	0	2	27	-	1	10	-	1	30
30%	37	7	2	44	4	2	26	-	1	7	-	1	33
40%	34	0	2	44	5	2	26	-	1	7	-	1	31
55%	41	5	2	44	5	2	33	-	1	9	-	1	35
70%	40	4	2	42	8	2	34	-	1	9	-	1	34
80%	42	2	2	39	10	2	27	-	1	8	-	1	33
85%	40	3	2	38	1	2	27	-	1	11	-	1	32
90%	42	6	2	42	1	2	26	-	1	14	-	1	35
95%	42	10	2	47	1	2	27	-	1	10	-	1	36
100%	42	11	2	48	1	2	22	-	1	10	-	1	35
Gesamt	41	10	28	50	17	28	29	13	14	9	2	14	37

Tabelle 22 Fluoreszenzprofil intraossär, Kollagen Typ III (C3), 6 Wochen

Intervall auf der Distanzskala	Intensitäten (intraossär, Antikörper C3, 12 Wo.)												Gesamt
	Titan	SD	N	VA-Stahl	SD	N	Schein-OP (kein Implantat)	SD	N	Kontrollen (keine OP)	SD	N	
5%	47	17	2	27	2	2	24	-	1	10	-	1	30
10%	32	3	2	25	1	2	15	-	1	9	-	1	23
15%	36	8	2	29	0	2	43	-	1	14	-	1	31
20%	29	3	2	30	4	2	40	-	1	13	-	1	29
25%	30	11	2	24	4	2	39	-	1	10	-	1	26
30%	27	11	2	21	2	2	31	-	1	8	-	1	22
40%	23	7	2	24	3	2	15	-	1	9	-	1	20
55%	20	4	2	21	2	2	14	-	1	8	-	1	17
70%	17	1	2	24	1	2	22	-	1	8	-	1	18
80%	16	1	2	23	1	2	52	-	1	11	-	1	23
85%	16	4	2	21	0	2	46	-	1	9	-	1	22
90%	14	4	2	21	7	2	24	-	1	10	-	1	17
95%	12	0	2	22	4	2	20	-	1	11	-	1	16
100%	14	5	2	22	3	2	16	-	1	9	-	1	16
Gesamt	24	11	28	24	4	28	29	13	14	10	2	14	22

Tabelle 23 Fluoreszenzprofil intraossär, Kollagen Typ III (C3), 12 Wochen

Intervall auf der Distanzskala	Intensitäten (intraossär, Antikörper Fibronektin, 3 Wo.)												Gesamt
	Titan	SD	N	VA-Stahl	SD	N	Schein-OP (kein Implantat)	SD	N	Kontrollen (keine OP)	SD	N	
5%	142	7	2	133	4	2	29	-	1	16	-	1	99
10%	107	13	2	130	30	2	34	-	1	19	-	1	88
15%	84	17	2	118	21	2	27	-	1	22	-	1	76
20%	81	16	2	96	5	2	56	-	1	33	-	1	74
25%	76	1	2	80	4	2	49	-	1	27	-	1	64
30%	66	1	2	74	17	2	60	-	1	19	-	1	60
40%	92	12	2	76	4	2	33	-	1	16	-	1	64
55%	78	8	2	62	1	2	63	-	1	18	-	1	60
70%	80	2	2	51	5	2	66	-	1	16	-	1	57
80%	80	18	2	63	7	2	56	-	1	23	-	1	61
85%	76	1	2	69	14	2	63	-	1	21	-	1	62
90%	87	6	2	68	3	2	38	-	1	25	-	1	62
95%	111	6	2	77	6	2	43	-	1	29	-	1	75
100%	118	11	2	104	2	2	65	-	1	28	-	1	89
Gesamt	91	22	28	86	27	28	49	14	14	22	5	14	71

Tabelle 24 Fluoreszenzprofil intraossär, Fibronektin, 3 Wochen

Intervall auf der Distanzskala	Intensitäten (intraossär, Antikörper Fibronektin, 6 Wo.)												Gesamt
	Titan	SD	N	VA-Stahl	SD	N	Schein-OP (kein Implantat)	SD	N	Kontrollen (keine OP)	SD	N	
5%	147	5	2	60	21	2	45	-	1	22	-	1	80
10%	99	30	2	47	18	2	38	-	1	26	-	1	59
15%	65	3	2	49	5	2	34	-	1	29	-	1	48
20%	58	15	2	45	4	2	35	-	1	25	-	1	44
25%	56	9	2	58	9	2	35	-	1	18	-	1	47
30%	52	4	2	48	21	2	52	-	1	21	-	1	46
40%	50	6	2	45	5	2	41	-	1	25	-	1	43
55%	41	2	2	48	1	2	51	-	1	21	-	1	42
70%	42	6	2	44	9	2	36	-	1	17	-	1	37
80%	42	1	2	37	1	2	40	-	1	20	-	1	36
85%	43	8	2	46	4	2	39	-	1	28	-	1	41
90%	51	11	2	48	6	2	73	-	1	20	-	1	48
95%	74	47	2	52	6	2	24	-	1	18	-	1	49
100%	109	2	2	51	4	2	19	-	1	17	-	1	59
Gesamt	66	33	28	48	9	28	40	13	14	22	4	14	48

Tabelle 25 Fluoreszenzprofil intraossär, Fibronektin, 6 Wochen

Intervall auf der Distanzskala	Intensitäten (intraossär, Antikörper Fibronectin, 12 Wo.)												Gesamt
	Titan	SD	N	VA-Stahl	SD	N	Schein-OP (kein Implantat)	SD	N	Kontrollen (keine OP)	SD	N	
5%	51	1	2	51	5	2	35	-	1	24	-	1	44
10%	32	6	2	52	6	2	20	-	1	16	-	1	34
15%	46	9	2	49	12	2	65	-	1	17	-	1	45
20%	41	1	2	48	3	2	26	-	1	14	-	1	36
25%	54	12	2	46	8	2	22	-	1	16	-	1	40
30%	33	10	2	46	11	2	32	-	1	17	-	1	34
40%	37	13	2	44	2	2	44	-	1	16	-	1	37
55%	48	4	2	44	2	2	30	-	1	19	-	1	39
70%	39	1	2	40	6	2	26	-	1	19	-	1	34
80%	37	1	2	39	4	2	23	-	1	16	-	1	32
85%	35	3	2	36	4	2	29	-	1	14	-	1	31
90%	35	5	2	41	6	2	36	-	1	28	-	1	36
95%	50	8	2	39	4	2	25	-	1	20	-	1	37
100%	44	9	2	44	4	2	22	-	1	14	-	1	35
Gesamt	41	9	28	44	6	28	31	12	14	18	4	14	37

Tabelle 26 Fluoreszenzprofil intraossär, Fibronectin, 12 Wochen

7.4 SPSS-Programmierung

7.4.1 SPSS-Hauptprozedur

'Begin Description

'This file is the default global procedure file. A number of sample scripts that were installed

'with SPSS make use of the procedures in this file.

'To change the global procedure file, go to the Scripts tab in the Options dialog.

'End Description

Option Explicit

'Module (file) level constants

Const cNONAVMSG As String = "No navigator document found."

Const cNOPIVSELMSG As String = "Select a pivot table before running this script."

Const cNOITEMSEL As String = "Select an Item before running this script."

Const cCOLMINREQ As String = "Columns are only made narrower if there are more than 8 columns."

Sub GetFirstSelectedPivot(objSelectedPivot As Object, objItem As ISpssItem, bolFoundOutput As Boolean, bolFoundPivot As Boolean)

'Purpose: Find the first selected Pivot Table

'Assumptions: A Pivot Table is selected in the Output Doc (Navigator)

'Effects: Activates the selected Pivot Table

'Inputs: PivotTable object, Item object that contains selected PivotTable

'Return Values: Selected PivotTable, Item in the Navigator

' bolFoundOutput(True If an Output Doc exists), bolFoundPivot(True If found a selected PivotTable)

Dim objDocuments As ISpssDocuments ' SPSS documents.

Dim objOutputDoc As ISpssOutputDoc ' Output document

Dim objItems As ISpssItems ' Output Navigator items

Dim intItemCount As Integer

Dim intItemType As Integer

Dim bolSelected As Boolean ' True if an item is selected.

Dim i As Integer

' We have not found an output navigator yet (Set flag)

bolFoundOutput = False

'Get list of documents in SPSS.

Set objDocuments = objSpssApp.Documents

' Get designated document only if there is at least one output document.

If objDocuments.OutputDocCount > 0 Then

'Get the currently designated output document.

Set objOutputDoc = objSpssApp.GetDesignatedOutputDoc

bolFoundOutput = True

Else

'If no navigator window exists.

MsgBox(cNONAVMSG)

Exit Sub

End If

' Check if we found the designated document.

If bolFoundOutput = True Then

' We have not found a pivot table.(Set flag)

bolFoundPivot = False

' Get the outline tree and the number of items:

Set objItems = objOutputDoc.Items

intItemCount = objItems.Count

' Get the first selected pivot table.

For i = 0 To intItemCount - 1

Set objItem = objItems.GetItem(i)

intItemType = objItem.SPSSType

bolSelected = objItem.Selected

If intItemType = SPSSPivot And bolSelected = True Then

Set objSelectedPivot = objItem.Activate() 'Activate the pivot table.

bolFoundPivot = True ' We did find a pivot table.

```

        Exit For                ' Exit the loop.
    End If
    Next i
End If

If bolFoundPivot = False Then
    'If no pivot table has been selected.
    MsgBox(cNoPIVSELMSG)
    Exit Sub
End If

End Sub

Sub InsertPageBreak (objItem As ISpssItem)
'Purpose: Inserts a page break above the first selected Item in the Navigator
'Assumptions: Something is selected in the Output Doc (Navigator)
'Effects: Inserts a page break before the selected item.
'Inputs: Item object in the Navigator
'Return Values: Selected Item in Navigator will now have page break before it

    Dim bolFoundOutputDoc As Boolean
    Dim bolItemSelected As Boolean
    Dim intItemType As Integer
    Dim i As Integer

    i = 1
    If objItem Is Nothing Then 'The item hasn't been set
        'get the first selected item in the Navigator
        Call GetFirstSelectedItem(objItem, intItemType, bolFoundOutputDoc, bolItemSelected)

        If (bolFoundOutputDoc = False) Or (bolItemSelected = False) Then
            'either there wasn't an output doc or an item wasn't selected
            Exit Sub
        End If
    End If

    objItem.PageBreak = True

End Sub

Sub GetFirstSelectedItem(objItem As ISpssItem, intSellItemType As Integer, bolFoundOutput As Boolean, bolFoundItem As Boolean)
'Purpose: Find the first selected Item in the Navigator
'Assumptions: An Item is selected in the Output Doc (Navigator)
'Effects: None
'Input: Item object
'Return Values: Item in the Navigator, intSellItemType(contains value for what type of item objItem is),
'                bolFoundOutput(True If an Output Doc exists), bolFoundItem(True If found a selected Item)

    Dim objDocuments As ISpssDocuments ' SPSS documents.
    Dim objOutputDoc As ISpssOutputDoc ' Output document
    Dim objItems As ISpssItems ' Output Navigator items
    Dim intItemCount As Integer
    Dim intItemType As Integer
    Dim bolSelected As Boolean ' True if an item is selected.
    Dim i As Integer

    ' We have not found an output navigator yet (Set flag)
    bolFoundOutput = False

    'Get list of documents in SPSS.
    Set objDocuments = objSpssApp.Documents

    ' Get designated document only if there is at least one output document.
    If objDocuments.OutputDocCount > 0 Then
        'Get the currently designated output document.
        Set objOutputDoc = objSpssApp.GetDesignatedOutputDoc
        bolFoundOutput = True
    Else
        'If no navigator window exists.
        MsgBox(cNONAVMSG)
        Exit Sub
    End If
End Sub

```

```

' Check if we found the designated document.
If bolFoundOutput = True Then
    ' We have not found a pivot table.(Set flag)
    bolFoundItem = False

    ' Get the outline tree and the number of items:
    Set objItems = objOutputDoc.Items
    intItemCount = objItems.Count

    ' Get the first selected Item.
    For i = 0 To intItemCount - 1
        Set objItem = objItems.GetItem(i)
        bolSelected = objItem.Selected
        If bolSelected = True Then
            intSelItemType = objItem.SPSSSType
            bolFoundItem = True
            Exit Sub
        End If
    Next i
End If

If bolFoundItem = False Then
    ' If no Item has been selected.
    MsgBox(cNOITEMSEL)
    Exit Sub
End If

```

End Sub

Sub GetLastNavItem(objItem As ISpssItem, lngIndex As Long, bolOutputDocExists As Boolean)

'Purpose: Get the Index(lngIndex) and Item object(objItem) for the last Item in the Navigator

'Assumptions: There must be an Output Document window.

'Effects: None

'Inputs: None

'Return Values: Index to the last Item in the Designated OutputDoc, the Item object for the last Navigator Item

'bolOutputDocExists(True if there is >=1, False if 0)

```

Dim objOutputDoc As ISpssOutputDoc
Dim objItems As ISpssItems
Dim objDocuments As ISpssDocuments

bolOutputDocExists = False

Set objDocuments = objSpssApp.Documents
If objDocuments.OutputDocCount > 0 Then
    'Get the currently designated output document.
    Set objOutputDoc = objSpssApp.GetDesignatedOutputDoc
    bolOutputDocExists = True
Else
    'If no navigator window exists.
    MsgBox(cNONAVMSG)
    Exit Sub
End If
bolOutputDocExists = True

Set objItems = objOutputDoc.Items
lngIndex = objItems.Count - 1
Set objItem = objItems.GetItem(lngIndex)

```

End Sub

Sub SetDefColWidth(objPivotTable As Object, intDataCellWidth As Integer)

'Purpose: Set default width of columns

'Assumptions: The selected Pivot Table in the Navigator has been activated (by the script)

'Effects: Sets the width for all of the columns in the selected Pivot Table

'Inputs: PivotTable object (that was previously activated in another sub), intDataCellWidth(width to make data cells)

'Return Values: Modified PivotTable

```

objPivotTable.SelectTable
objPivotTable.DataCellWidths = intDataCellWidth
objPivotTable.ClearSelection

```

End Sub

Sub MakeWideTablesNarrow(objPivotTable As Object)

'Purpose: Make Pivot Tables that don't fit on the screen narrower.

'Assumptions: The Pivot Table that is to be modified is activated

'Effects: Makes the columns in the Pivot Table narrow based on information in labels and data cells

'Inputs: PivotTable object that is already activated

'Return Values: Modified Pivot Table

'Global Variables Used: objPivotTable, objColumnLabels, objRowLabels, objFootnotes, objOptions, objDataCells

```
Dim objColumnLabels As ISpssLabels
Dim objRowLabels As ISpssLabels
Dim objFootnotes As ISpssFootnotes
Dim objOptions As ISpssOptions
Dim objDataCells As ISpssDataCells
```

```
Dim lngCols As Long
Dim lngRows As Long
Dim intSize As Integer
Dim intMinSize As Integer
Dim lngLastRowIndex As Long
Dim i As Long
Dim j As Long
Dim bolFootnoteFound As Boolean
Dim auto
Dim intMargin As Integer
```

'Determine if table is wide, if so modify column widths

```
Set objDataCells = objPivotTable.DataCellArray
```

```
If (objDataCells.NumColumns > 8) Then
```

```
    objPivotTable.ClearSelection
```

```
    Set objColumnLabels = objPivotTable.ColumnLabelArray
```

```
    lngCols = objColumnLabels.NumColumns
```

```
    lngLastRowIndex = objColumnLabels.NumRows - 1
```

```
    Set objDataCells = objPivotTable.DataCellArray
```

```
    lngRows = objDataCells.NumRows
```

```
intMinSize = objColumnLabels.TextSizeAt(lngLastRowIndex, 0)
```

```
For j = 0 To (lngCols - 1)
```

```
    intSize = objColumnLabels.TextSizeAt(lngLastRowIndex, j)
```

```
    If (intSize < intMinSize) Then
```

```
        intMinSize = intSize
```

```
    End If
```

```
bolFootnoteFound = False
```

```
For i = 0 To (lngRows - 1)
```

```
    Set objFootnotes = objDataCells.GetReferredFootnotesAt(i, j)
```

```
    If (objFootnotes.Count > 0) Then
```

```
        bolFootnoteFound = True
```

```
        Exit For
```

```
    End If
```

```
Next i
```

'if there are no footnotes then even out margins

```
If (Not bolFootnoteFound) Then
```

```
    objPivotTable.ClearSelection
```

```
    objColumnLabels.SelectLabelDataAt lngLastRowIndex, j
```

```
    intMargin = objDataCells.LeftMarginAt(0, 0)
```

```
    objPivotTable.RightMargin = intMargin
```

```
    objPivotTable.LeftMargin = intMargin
```

```
End If
```

```
Next j
```

'Lower the font size of all the lowest level columns

```
intMinSize = intMinSize - 1
```

```
For j = 0 To (lngCols - 1)
```

```
    objColumnLabels.TextSizeAt(lngLastRowIndex, j) = intMinSize
```

```
Next j
```

```
Set objOptions = objSpssApp.Options
```

```
objOptions.Autofit = 1
```

```
objPivotTable.Autofit
```

```
objPivotTable.ClearSelection
```

```
Else
```

```
    MsgBox(cCOLMINREQ)
```

End If

End Sub

```
*****
'Purpose: Use this script if you want to put the text in the
' COLUMN labels in a pivot table on a
' single line (not wrapping to a second line).
'
'Inputs: The pivot table is passed as a parameter.
'
'Return Values: Modified Pivot Table
'
'Author: David S. Angulo
'
'Date: April 14, 1997
'
'Copyright @ 1997 by SPSS, Inc.
'
*****
```

Sub SetPivotTableColumnLabelsToNoWrap (objPivotTable As Object)

```
'Declare SPSS object variables
Dim objColumnLabels As ISpssLabels ' Column label arrays

'Declare other variables used in this procedure
Dim intCol As Integer ' Number of columns in COLUMN label array.
Dim intRow As Integer ' Number of rows in COLUMN label array
Dim intR As Integer ' Loop Counter
Dim intC As Integer ' Loop Counter
Dim intRealWidth As Integer ' Text Width Variable

*****
'This section deals with changing the width of the column labels

' Get the column labels object
Set objColumnLabels = objPivotTable.ColumnLabelArray

' ColumnLabelArray is a 2-dimensional array. Loop through the cells to
' find the label text that matches the target text (strText)
intCol = objColumnLabels.NumColumns
intRow = objColumnLabels.NumRows

For intR = 0 To intRow - 1
    For intC = 0 To intCol - 1
        If Not IsNull(objColumnLabels.ValueAt(intR,intC)) Then
            Dim strVal As String ' the string at intR, intC
            strVal = objColumnLabels.ValueAt(intR,intC)
            If Len(strVal) > 0 Then
                intRealWidth = objColumnLabels.TextWidthAt(intR,intC)
                objColumnLabels.ColumnLabelWidthAt(intR,intC) = intRealWidth
            End If
        End If
    Next intC
Next intR

' end of sub SetPivotTableColumnLablesToNoWrap
End Sub
```

```
*****
'Purpose: Use this script if you want to put the text in the
' ROW labels in a pivot table on a
```

```
' single line (not wrapping to a second line).
'
'Inputs: The pivot table is passed as a parameter.
'
'Return Values: Modified Pivot Table
'
'Author: David S. Angulo
'
'Date: April 14, 1997
'
'Copyright @ 1997 by SPSS, Inc.
'
*****
```

Sub SetPivotTableRowLabelsToNoWrap (objPivotTable As Object)

```
'Declare SPSS object variables
Dim objRowLabels As ISpssLabels      ' Row label array

'Declare other variables used in this procedure
Dim intCol As Integer                ' Number of columns in ROW label array.
Dim intRow As Integer                ' Number of rows in ROW label array
Dim intR As Integer                  ' Loop Counter
Dim intC As Integer                  ' Loop Counter
Dim intRealWidth As Integer           ' Text Width Variable
Dim intMaxWidthInThisColumn As Integer

*****
'This section deals with changing the width of the row labels

' Get the row labels object
Set objRowLabels = objPivotTable.RowLabelArray

' RowLabelArray is a 2-dimensional array. Loop through the cells to
' find the label text that matches the target text (strText)
intCol = objRowLabels.NumColumns
intRow = objRowLabels.NumRows

For intC = 0 To intCol - 1

' we're starting another column so the max width must be reset
intMaxWidthInThisColumn = 0

    For intR = 0 To intRow - 1
        If Not IsNull(objRowLabels.ValueAt(intR,intC)) Then
            Dim strVal As String      ' the string at intR, intC
            strVal = objRowLabels.ValueAt(intR,intC)
            If Len(strVal) > 0 Then
                intRealWidth = objRowLabels.TextWidthAt(intR,intC)
                If (intRealWidth > intMaxWidthInThisColumn) Then
                    ' only change the label to make it wider (all of the labels will
                    ' be in the same column
                    objRowLabels.RowLabelWidthAt(intR,intC) = intRealWidth
                    intMaxWidthInThisColumn = intRealWidth
                End If
            End If
        End If
    Next intR

Next intC

' end of sub SetPivotTableRowLablesToNoWrap
End Sub
```

7.4.2 Unterprozedur

Sub Main

```

zn=Chr(10)
p$="c:\stats\Eulert A12399\dat\dat\"
fi$ = Dir(p$+"*.dat")
z=0
While fi$ <> ""
    z=z+1
    EinlesenSpeichern p$,fi$,z
    fi$ = Dir$(z)
Wend
AddFiles p$,84,"!Daten"

```

End Sub

Sub EinlesenSpeichern(p\$,fi\$,z)

```

n$=Mid(fi$,1,InStr(fi$,".")-1)
zn=Chr(10)
With objSpssApp
    .ExecuteCommands _
        "Get trans file '"+p$+fi$+" /type tab /field /Keep Tier d1 i1 d2 i2 d3 i3 d4 i4 d5 i5
knd ki1 ki2.'" + zn + _
        "Do rep in=d1 d2 d3 d4 d5 i1 i2 i3 i4 i5 knd ki1 ki2 / out = dn1 to dn5 in1 to in5 kndn
kin1 kin2.'" + zn + _
        " if index(in,'K')>0 or in='Distanz' or in='Intens' or index(in,'_')>0 or index(in,'=')>0
in='.'" + zn + _
        " if index(in,',')>0 in = concat(substr(in,1,index(in,',')-
1),!,substr(in,index(in,',')+1))." + zn + _
        " Comp out = number(in,f14)." + zn + _
        "End rep.'" + zn + _
        "String Code (A50)." + zn + _
        "Comp Code = '"+CStr(n$)+"'" + zn + _
        "Save out '"+p$ + CStr(z) + ".sav' /Keep code tier dn1 to dn5 in1 to in5 kndn kin1
kin2.',True

```

End With

End Sub

Sub AddFiles(p\$,t,d\$)

```

Dim v()
For i=1 To t
    z=z+1
    s$=s$+"/File '"+p$+CStr(i)+".sav"+"""+Chr(10)
    If z=49 Or i=t Then
        s$ = "Add files "+Chr(10)+s$+"."
        With objSpssApp
            .ExecuteCommands s$, True
            If i<t Then .ExecuteCommands "Save out '"+p$+"tmp.sav'.",True
        End With
        z=0
        s$="/File '"+p$+"tmp.sav"+"""+Chr(10)
    End If
Next
objSpssApp.ExecuteCommands "Save out '"+p$+d$+".sav'.",True

```

End Sub

7.4.3 SPSS-Syntax

```

*1.*****
Get file 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\dat\daten.sav'.
Sel if index(Tier,"_")=0 and Tier<>"".
Do if substr(Tier,1,1)="A" or substr(Tier,1,1)="B" or substr(Tier,1,1)="L".
    Comp Tier=substr(Tier,2,2).
else.
    Comp Tier=substr(Tier,1,2).
End if.
Comp nr = number(substr(Tier,1,2),f14).
Autorecode nr /into lfn.
*Aggreg /out * /break nr /zahl = n(nr).

Comp Code = upcase(code).
if index(Code,"C1")>0 a=1.
if index(Code,"C3")>0 a=2.
if index(Code,"FIB")>0 a=3.

if index(Code,"TI")>0 m=1.
if index(Code,"VA")>0 m=2.
if index(Code,"KTR")>0 m=3.
if index(Code,"SO")>0 m=4.

if index(Code,"IM")>0 l=1.
if index(Code,"IO")>0 l=2.
if index(Code,"SC")>0 l=3.

if index(Code," 3 ")>0 zeit=1.
if index(Code," 6 ")>0 zeit=2.
if index(Code," 12")>0 zeit=3.
Formats l m a zeit (f2.0).

Comp kndn2 = kndn.
Ren Vars (dn1 to dn5 kndn kndn2 in1 to in5 kin1 kin2 = d1 to d7 i1 to i7).
Recode d1 to d5 d6 d7 (sysmis=sysmis) into i1 to i5 i6 i7.
Recode i1 to i5 i6 i7 (sysmis=sysmis) into d1 to d5 d6 d7.

Vector di1_di2_(7,a7) / d = d1 to d7 / i = i1 to i7 / di_(7).
loop j=1 to 7.
    Comp di1_(j) = concat("9",string(d(j),f3.0),string(i(j),f3.0)).
    Loop i=1 to len(di1_(j)).
        Do if index(di1_(j),".")=0.
            if substr(di1_(j),i,1) = " " di2_(j)=concat(rtrim(di2_(j)), "0").
            if substr(di1_(j),i,1) <> " " di2_(j)=concat(rtrim(di2_(j)),substr(di1_(j),i,1)).
        End if.
    end loop.
    if index(di1_(j),".")=0 di_(j) = number(di2_(j),f14).
end loop.
Rank di_1 to di_7 by nr l m a zeit /ntiles(20) into r1 to r7 /print no.
Save out 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\daten.sav' /Keep tier nr lfn l m a zeit d1 to d5 d6 d7 i1 to i5 i6 i7 r1 to r7 di_1 to di_7.

Get file 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\daten.sav'.
Aggreg /out * /break tier l m a zeit /InfoZahl = n(nr).
Save trans out 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\daten1.dbf' /Keep tier l m a zeit /type db4 /repla.

*2.*****
Get file 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\daten.sav'.
Aggregate /out * /break lfn zeit l m a /d1 to d7 = max(d1 to d7).
Comp dmax = mean(d1 to d5).
Comp kmax = mean(d6,d7).
Aggregate /out * /break lfn zeit l m a /dmax kmax d1 to d7 = max(dmax kmax d1 to d7).
Comp lm = number(concat(string(l,f1),string(m,f1)),f14).
recode lm (21,22,23,24=sysmis).
Save trans out 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\daten2.dbf' /type db4 /repla.

sel if m<=2.
vector dm (2).

```

```

Comp dm(m)=dmax.
Aggregate /out * /break lfn zeit l a /dm1 to dm2 = max(dm1 to dm2).

vector dm1 dm2l (3).
Comp dm1(l)=dm1.
Comp dm2l(l)=dm2.
Aggregate /out * /break lfn zeit a /dm1l1 to dm1l3 dm2l1 to dm2l3 = max(dm1l1 to dm1l3 dm2l1 to dm2l3).

vector dm1l1a dm1l2a dm1l3a dm2l1a dm2l2a dm2l3a (3).
Comp dm1l1a(a)=dm1l1.
Comp dm1l2a(a)=dm1l2.
Comp dm1l3a(a)=dm1l3.

Comp dm2l1a(a)=dm2l1.
Comp dm2l2a(a)=dm2l2.
Comp dm2l3a(a)=dm2l3.

Aggregate /out * /break lfn zeit /
dm1l1a1 to dm1l1a3
dm1l2a1 to dm1l2a3
dm1l3a1 to dm1l3a3
dm2l1a1 to dm2l1a3
dm2l2a1 to dm2l2a3
dm2l3a1 to dm2l3a3 = max(
dm1l1a1 to dm1l1a3
dm1l2a1 to dm1l2a3
dm1l3a1 to dm1l3a3
dm2l1a1 to dm2l1a3
dm2l2a1 to dm2l2a3
dm2l3a1 to dm2l3a3).
Save trans out 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\daten3.dbf' /type db4 /repla.

*3.*****

Get file 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\daten.sav'.
sel if sysmis(r1)=0.
Aggregate /out * /break nr lfn r1 zeit l m a /di_1 = max(di_1).
Save out 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\sav\1.sav' /ren (r1=r).

Get file 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\daten.sav'.
sel if sysmis(r2)=0.
Aggregate /out * /break nr lfn r2 zeit l m a /di_2 = max(di_2).
Save out 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\sav\2.sav' /ren (r2=r).

Get file 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\daten.sav'.
sel if sysmis(r3)=0.
Aggregate /out * /break nr lfn r3 zeit l m a /di_3 = max(di_3).
Save out 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\sav\3.sav' /ren (r3=r).

Get file 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\daten.sav'.
sel if sysmis(r4)=0.
Aggregate /out * /break nr lfn r4 zeit l m a /di_4 = max(di_4).
Save out 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\sav\4.sav' /ren (r4=r).

Get file 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\daten.sav'.
sel if sysmis(r5)=0.
Aggregate /out * /break nr lfn r5 zeit l m a /di_5 = max(di_5).
Save out 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\sav\5.sav' /ren (r5=r).

Get file 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\daten.sav'.
sel if sysmis(r6)=0.
Aggregate /out * /break nr lfn r6 zeit l m a /di_6 = max(di_6).
Save out 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\sav\6.sav' /ren (r6=r).

Get file 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\daten.sav'.
sel if sysmis(r7)=0.
Aggregate /out * /break nr lfn r7 zeit l m a /di_7 = max(di_7).
Save out 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\sav\7.sav' /ren (r7=r).

Match Files /File 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\sav\1.sav'

```

```
/File 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\sav\2.sav'  
/File 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\sav\3.sav'  
/File 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\sav\4.sav'  
/File 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\sav\5.sav'  
/File 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\sav\6.sav'  
/File 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\sav\7.sav'  
/by nr lfn r zeit l m a.  
  
**neue Zusammenfassung**.  
Formats r (f6.3).  
Recode r (7,8=8)(9,10,11=11)(12,13,14=14)(15,16=16).  
  
vector i (7) /di_ = di_1 to di_7.  
loop j=1 to 7.  
    if sysmis(di_(j))=0 i(j) = number(substr(string(di_(j)),f7.0),5,3),f14).  
end loop.  
Formats nr lfn i1 to i7 (f3.0).  
  
Comp i=mean(i1 to i5).  
Comp k=mean(i6,i7).  
Aggregate / out = * /break nr lfn r zeit l m a /i k =mean(i,k).  
Formats i (f3.0).  
**Maßstab in %**  
Comp r = r/100 * 5.  
  
Comp lm = number(concat(string(l,f1),string(m,f1)),f14).  
Save trans out 'c:\Stats\Eulert A12399\dat\daten4.dbf' /type db4 /repla.
```


Danksagung

Prof. Dr.-Ing. R. Thull für die Überlassung der überaus interessanten Dissertationsthemen und die konsequenten langjährigen Vollendungsermahnungen.

Fr. Dr. E.J. Karle für die intensive Betreuung und fortwährende Hilfsbereitschaft bei Planung, Vorbereitung und Durchführung des Tierversuches.

Fr. J. Pfeuffer für die ausnehmend hilfsbereite und zeitaufwendige Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen Präparate.

Fr. Dr. A. Berden für die unermüdliche Unterstützung bei der Anfertigung der Trenndünnschliffpräparate.

Dr. H. Petzold für die hilfreiche Unterstützung bei den Implantationen.

Prof. Dr. Dr. Ulrich Scheer, Vorstand des Lehrstuhls für Zell- und Entwicklungs-biologie (Zoologie I) am Theodor Boveri Institut für Biowissenschaften der Universität Würzburg und seinen Mitarbeitern für die Bereitstellung des Konfokalen Lasermikroskops und die Hilfestellungen bei der Durchführung der Mikroskopie.

Fr. R. Schmid für die freundliche Unterstützung im Labor im Rahmen der langwierigen Vorversuche und der Implantatvorbereitungen.

Hr. V. Doan für die eingehende Betreuung der Versuchstiere.

Prof. Dr. Dr. A. Kübler für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Fr. Dr. Ewald für die abschließende Betreuung bei Wiederbelebung und Vollendung.

Meiner Familie für die fortwährende und tatkräftige Unterstützung.

Lebenslauf

Name	Stephan, Christophe, Olivier EULERT
Geburtsdatum	29.07.1970
Geburtsort	Paris / Frankreich
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Prof. Dr. med. Jochen Eulert Anne-Marie Eulert, geb. Bernard
Familienstand	verheiratet, 3 Kinder
1976-1979	Grundschule in Ammerbuch
1979-1980	Grundschule in Tübingen
1980-1986	Uhland-Gymnasium in Tübingen
1986-1989	Riemenschneider-Gymnasium und Abitur in Würzburg
1989-1995	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg und Approbation als Arzt
1995-1999	Studium der Zahnmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg und Approbation als Zahnarzt
seit 1989	wiss. Assistent in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie der JMU Würzburg - Emeritus: Prof. Dr. Dr. Jürgen F. Reuther - - Direktor: Prof. Dr. Dr. Alexander Kübler -
Juli 2002	Dr. med.: „Die Behandlung von Gelenkfortsatzfrakturen des Unterkiefers unter besonderer Berücksichtigung der Würzburger Zugschrauben-Platte.“
Januar 2004	Facharzt für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie
Juli 2006	Zusatzbezeichnung: Plastische Operationen Ernennung zum Oberarzt
15.01.2008	Dr. med. Stephan Eulert