

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie
Direktor: Univ. Prof. Dr. Dr. Dr. h. c. U. Joos

**“Elektronenmikroskopische Untersuchung des Implantat/Knochen-
Interface von sofortbelastbaren Implantaten”**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms - Universität Münster

vorgelegt von Läkamp, Julia

aus Osnabrück

2006

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie
Direktor: Univ. Prof. Dr. Dr. Dr. h. c. U. Joos

**“Elektronenmikroskopische Untersuchung des Implantat/Knochen-
Interface von sofortbelastbaren Implantaten”**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms - Universität Münster

vorgelegt von Läkamp, Julia

aus Osnabrück

2006

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der westfälischen Wilhelms -Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. H.-P. Wiesmann

2. Berichterstatter: Univ-Prof. Dr. Dr. U. Meyer

Tag der mündlichen Prüfung: 29.08.2006

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie
-Direktor: Univ. Prof. Dr. Dr. Dr. h. c. U. Joos
Koreferent: Prof. Dr. Dr. U. Meyer
Referent: PD Dr. H.-P. Wiesmann

Zusammenfassung

Elektronenmikroskopische Untersuchung des Implantat/Knochen-Interface von
sofortbelastbaren Implantaten
von Julia Läkamp

Ein aktuelles Problem in der klinischen Implantologie ist die Frage nach der Möglichkeit einer Sofortbelastung von Implantaten direkt nach der Insertion, während übliche Protokolle eine ungestörte Einheilung der Implantate verlangen. Ziel dieser Studie war es, die Grundlagen der bisher wenig bekannten frühen Osseointegration von Implantaten unter Belastung auf ultrastruktureller Ebene zu untersuchen. Es wurden von daher 32 speziell für die Sofortbelastung designte Implantate in den Unterkiefer von 8 Göttinger Minischweinen (G90/99) implantiert. Nach sofortiger Belastung vs. Nicht-Belastung in der Kontrollgruppe wurden zu frühen und verzögerten Zeitpunkten (1., 3., 14., 21. und 28. Tag post implantationem) die Tiere getötet. Die perl-implantären Knochenstücke wurden anschließend explantiert und die Proben histologisch und ultrastrukturell aufgearbeitet. Es wurden rasterelektronen- und transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt, um das Implantat/Knochen-Interface beurteilen zu können. Es konnte durch unsere Untersuchung gezeigt werden, dass eine Osseointegration zu sehr frühen Zeitpunkten bereits vorhanden ist. Dabei konnte in den beiden Untersuchungsgruppen ein direkter Zellkontakt zwischen Implantat und Knochen bereits am 1. Tag festgestellt werden. Lichtmikroskopisch war eine dünne Toulidin-Blau angefärbte Gewebeschicht zu erkennen, die den Nachweis vitaler Zellen liefert. Elektronenmikroskopisch waren aktive Osteoblasten zu erkennen. Die Zellen zeigten eine ausgeprägte Ausbildung endoplasmatischen Retikulums, Golgi-Bläschen und damit verbunden eine extrazelluläre Matrixproteinsynthese. Eine Mineralisation des Interfaces war vom ersten Tag an über den gesamten Untersuchungszeitraum detektierbar. Unsere Ergebnisse bestätigen, dass das Implantat/Knochen-Interface eine Sofortbelastung bei speziell entwickelten Implantaten durchaus ausgeliefert werden kann.

Tag der mündlichen Prüfung: 29.08.2006

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
1.1 Geschichte der Implantate	9
1.2 Implantatsysteme	10
1.3 Zu untersuchendes Implantatsystem	16
1.4 Knochenzellen	17
1.5 Implantateinheilung	18
1.6 Zielsetzung	20
2. Material und Methode	22
2.1 Material	22
2.1.1 Implantate	22
2.1.2 Versuchstiere	23
2.1.3 Geräte	24
2.1.4. Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	25
2.1.4.1. Narkotika und Anästhetika	25
2.1.4.2 Verbrauchsmaterial	26
2.1.4.3 Chemikalien	27
2.2 Methode	29
2.2.1 Anästhesieverfahren	29
2.2.2 Chirurgisches Vorgehen	30
2.2.3 Probengewinnung	32
2.2.4 Präparation des Gewebes	34
2.2.5 Probenfixierung	35
2.2.5.1 Transmissionselektronenmikroskopie	36
2.2.5.2 Rasterelektronenmikroskopie	36

3. Ergebnis	37
4. Diskussion	47
5. Zusammenfassung	53
6. Abbildungsverzeichnis	54
7. Literaturverzeichnis	56
8. Abkürzungen	65
9. Danksagung	66
10. Lebenslauf	67
11. Genehmigungsbescheid der Bezirksregierung Münster	Anhang

Meiner Familie in großer Dankbarkeit gewidmet

Elektronenmikroskopische Untersuchung des Implantat/Knochen-Interface von sofortbelastbaren Implantaten

1. Einleitung

1.1 Geschichte der Implantate

Die ersten ernst zu nehmenden enossalen Implantationsversuche waren vom Prinzip her Sofortimplantate. Nach Extraktion eines Zahnes wurden alloplastische Materialien in die leere Extraktionsalveole eingebracht und *Jourdan und Magiolo* beschrieben 1807 in ihrem Buch *Manual d`art dentaire* [1], wie sie ein konisches Goldrohr in die Alveole versenken, es mit einer vierarmigen Krallen fixieren und einen Stiftzahn aufbringen.

1891 berichtete *Hartmann* [2] über die Indikation zum Implantat über den Einzelzahnersatz hinaus. Die Misserfolgsrate dieser wurzelförmig ausgeformten Implantate stellte dieses Verfahren jedoch schnell wieder in den Hintergrund.

1939 änderte *Stock* [3] die Formgebung der Implantate. Diese ähnelten jetzt nicht mehr der Form der Zahnwurzel, sondern einer Gewindeform einer Holzschraube, sie wurden aus einer Chrom-Kobalt-Molybdän-Legierung (Vitallium) hergestellt. Er setzte als einer der Ersten eine korrekte Okklusion als Langzeiterfolg voraus.

Die von *Stock* entwickelte Idee, die Formgebung der enossalen Implantate nicht der Zahnwurzel nachzuahmen, wurde 1947 von *Formigini* [4] aufgegriffen und es begann eine neue Ära der Implantologie.

Es wurden verschiedene Arten eingeführt und empfohlen. Der Franzose *Scialom* (1962) empfahl Nadelimplantate, *Heinrich* (1971) [5] z.B. entwickelte Schraubenimplantate und *Linkow* [6] stellte 1968 erstmals Blattimplantate aus dem Werkstoff Titan vor.

Per-Ingvar Branemark [7] prägte die moderne Implantologie. Er beschäftigte sich mit der

Grundlagenforschung und entdeckte die hohe Akzeptanz von Titan im menschlichen Knochengewebe und prägte somit den Begriff der Osseointegration. Hierunter verstand er den "lichtmikroskopisch direkten funktionellen und strukturellen Verbund zwischen dem organisierten lebenden Knochen und der Oberfläche eines körperfremden alloplastischen Materials". Leider konnten in den 70er Jahren noch keine Schnitte von Knochen und Metall durchgeführt werden, so dass viele Wissenschaftler von der Osseointegration nicht überzeugt waren. Doch *A. Schroeder* konnte als erster Mitte der 70er Jahre unabhängig von Branemark die Osseointegration, also den direkten Kontakt zwischen Implantat und Knochen durch eine neue Schnitttechnik von nichtentkalktem Knochen und Implantat nachweisen.

1.2 Implantatsysteme

Es gibt zahlreiche Implantatsysteme mit verschiedenen Implantatformen. Die heute am häufigsten verwendeten Formen sind die der zylindrischen und der schraubenförmigen Implantate. Die zylindrischen Implantate erhalten ihre Primärstabilität durch Klemmpassung, indem das Implantatlager minimal zu klein vorpräpariert wird. Die schraubenförmigen Implantate hingegen, deren Form der Zahnwurzel nachgeahmt ist, erhalten ihre Primärstabilität durch genau geschaffene Implantatlager, die mit Hilfe von rotierenden Instrumenten und Gewindeschneidern geschaffen werden.

Implantate bestehen heute meist nur noch aus Reintitan oder Titanlegierungen mit oder ohne spezielle Beschichtungen. Titan hat die besondere Eigenschaft, dass sich bei Kontakt mit Luft und Gewebsflüssigkeiten eine stabile Oxidschicht bildet, was zur Korrosionsverminderung führt. Die klinischen Untersuchungen von *Adell et. al.*[8] konnten 1990 belegen, dass der Werkstoff Titan sich besonders gut bei endossalen Implantaten eigne.

In manchen Ländern sind Dentalimplantate nicht zulassungspflichtig, so dass sie keinen strengen Zulassungskriterien unterliegen.

Deswegen werden hier nur Implantatsysteme vorgestellt die als "acceptable bzw.

provisionally acceptable” eingestuft werden [9,10]. Um diese Bewertung zu erhalten, müssen die verschiedene Implantatsysteme von implantologisch erfahrenen Fachkollegen und dem CDMIE (Council on Dental Materials, Instruments and Equipment) geprüft und angenommen werden.

Branemark-Implantatsystem:

Hierbei handelt es sich um ein zylindrisches Schraubenimplantat, auch Fixtur genannt, im Durchmesser 3,75 mm und 4 mm, in der Länge von 7-20 mm erhältlich. Das Implantat besteht aus Reintitan und ist nicht beschichtet. Es sollte subgingival, teilweise transgingival einheilen [1].

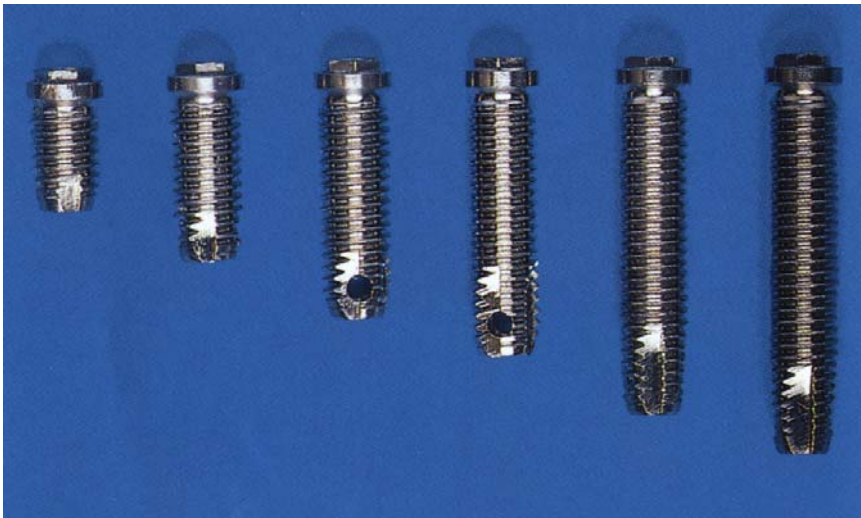


Abbildung 1: Branemark- Implantate (Fixturen) in verschiedenen Längen

IMZ-Implantatsystem:

Das intramobile Zylinderimplantat zeichnet sich dadurch aus, dass sich zwischen dem osseointegrierten Implantat und der prothetischen Suprakonstruktion ein elastisches Ausgleichselement befindet. Es besteht aus hochreinem Titan, ist mit Titanplasma oder Hydroxylapatit beschichtet oder hat keine Beschichtung. Der Durchmesser beträgt 3,3 mm und 4mm und ist in vier verschiedenen Längen erhältlich, 8mm, 10mm, 13mm und 15mm. Es heilt subgingival ein [1].



Abbildung 2: IMZ Implantate in verschiedenen Längen, Durchmessern und Beschichtungen

Frialit-2-Implantat:

Ein Stufenzylinder aus Reintitan, mit Titanplasma oder Hydroxylapatit beschichtet. Die Einheilung erfolgt subgingival.

Eignet sich aufgrund seiner Stufenform als Sofortimplantat [1].



Abbildung 3: Frialit- 2- Implantat mit Titanplasma

ITI-Bonefit-Implantatsystem:

Dieses Implantatsystem besteht aus drei verschiedenen Grundtypen:

- Hohlzylinderimplantat
- Hohlschraubenimplantat
- Kompaktschraubenimplantat

Es gibt diese Grundtypen als einteilige oder zweiteilige Version. Die Implantate sind in zwei verschiedenen Durchmessern und verschiedenen Längen erhältlich. Sie heilen sub- oder transgingival ein [1].

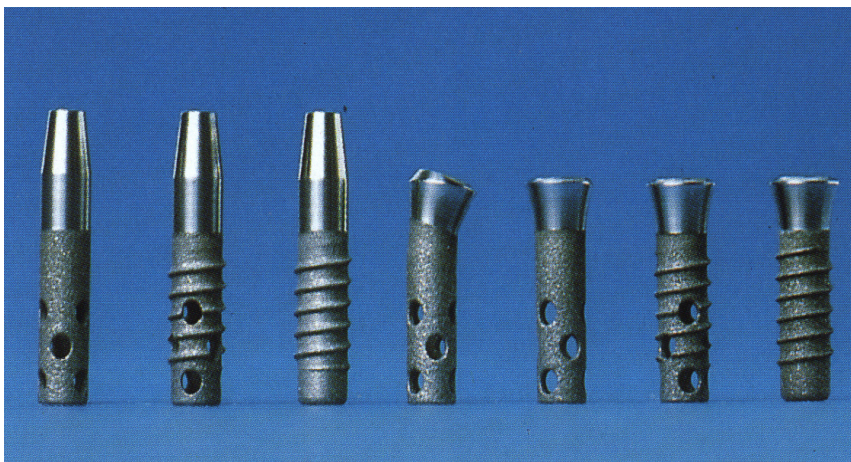


Abbildung 4: ITI- Bonefit- Implantate, 7 Implantattypen mit 3 verschiedenen Formen

Schraubenimplantate nach Ledermann:

1977 entwickelte die Firma Straumann mit Ph. Ledermann ein neues Schraubenimplantat aus dem einteiligen ITI-Schraubenimplantat. Es handelt sich um ein einzeitiges Implantationsverfahren, es kann sofort mit der definitiven prothetischen Versorgung begonnen werden [1].



Abbildung 5: links: altes einteiliges ITI- Schraubenimplantat (TPS- Schrauben-
Implantat)
rechts: Ledermann- Schraubenimplantat

1.3 Zu untersuchendes Implantatsystem

Das in dieser Studie zu untersuchende Implantat unterscheidet sich hinsichtlich der Form und Oberflächenbeschaffenheit von den üblichen Implantatsystemen. Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, ähnelt die Form wieder mehr der Wurzelform, ist also konisch.



Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Implantats, Länge 10mm

Der Durchmesser im Schulterbereich beträgt 4,1mm, die Länge 10mm der hier verwendeten Implantate.

Es handelt sich um eine maschinell behandelte mikrostrukturierte Oberfläche. Es wurden Mikrorillen einer Tiefe von 20µm und einer Breite von 40µm im Bereich der Implantatshoulder und der Implantatspitze eingebracht. Dieses Implantat ist ein zweiteiliges Implantatsystem.

Abbildung 7 zeigt diese Bereiche an der Implantatschulter und - spitze.

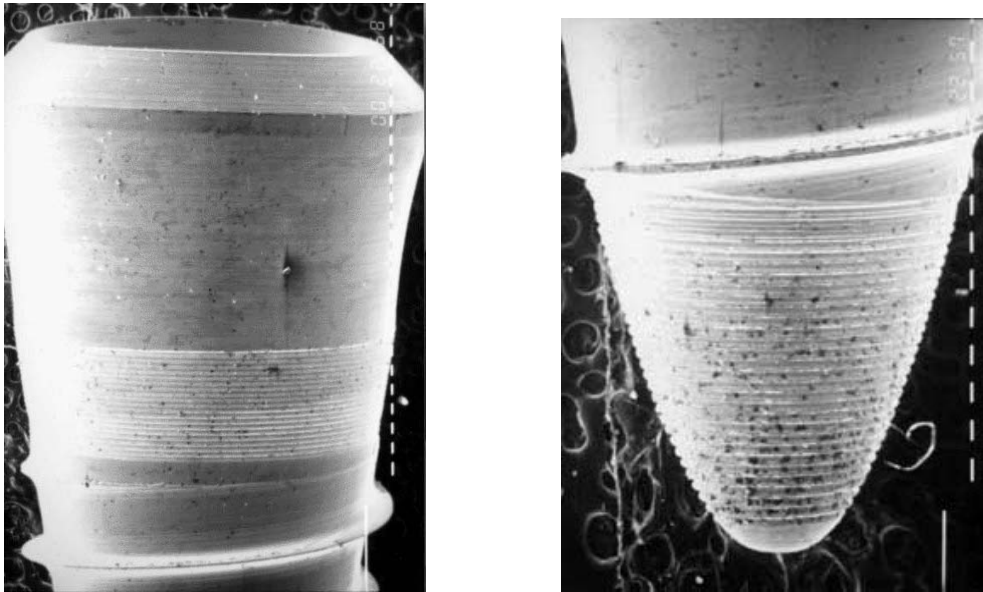


Abbildung 7: Elektronenmikroskopische Bilder der Implantatschulter, 4,1mm im Durchmesser und der Implantatspitze mit den Mikrorillen

1.4 Knochenzellen

Osteoblasten sind knochenbildende Zellen, die sich aus undifferenzierten Mesenchymzellen entwickeln. Sie haben einen runden Kern, sind basophil und haben sekretionsaktive Organellen, endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Lysosomen. Osteoblasten synthetisieren die organischen Bestandteile der Knochenmatrix. Nach Mineralisierung wandeln sie sich zu Osteozyten um.

Der Osteozyt ist die reife Knochenzelle, er wird komplett von verkalkter Knochengrundsubstanz umgeben und dient der Erhaltung des Knochens. Sie stellen den dominierenden Zelltyp des reifen Knochens dar. Durch dünne Fortsätze stehen sie untereinander in Kontakt, wodurch ein Stoffaustausch möglich ist.

Osteklasten bauen Knochengewebe ab. Der Osteoklast ist eine vielkernige Riesenzelle. Sie

bilden proteolytische Enzyme, die die Knochengrundsubstanz zersetzen.

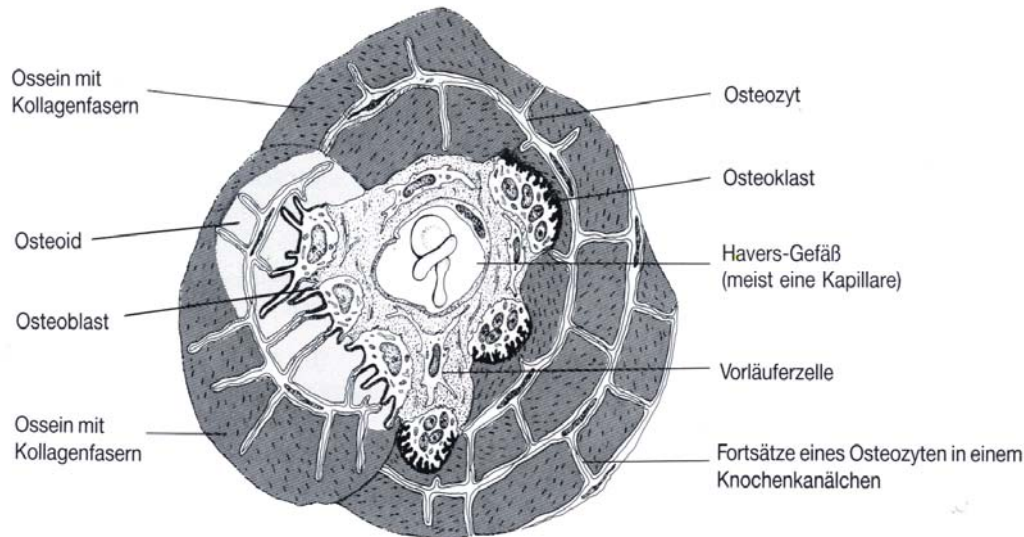


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Havers-System im Stadium des Umbaus

1.5 Implantateinheilung

In der Frühphase der knöchernen Einheilung geht die Blutung und die Bildung eines Blutkoagulums voraus. Es bildet das Leitgewebe für das Reparationsgewebe. Das Koagulum wird durch einwachsende Kapillaren und beigleitende Präosteoblasten organisiert. Dieses nennt man zentripetales Knochenwachstum. Durch mitotische Teilung können sich aus Präosteoblasten Osteoblasten, knochenbildende Zellen differenzieren.

In der Spätphase der knöchernen Einheilung kann es in Abhängigkeit von der Spaltbreite zwischen Implantat und Knochen direkt zur Bildung von Lamellenknochen oder zunächst zur Bildung von Geflechtknochen kommen.

Bei der Implantation von Titan in den Knochen kann es zur bindegewebigen oder knöchernen Einheilung kommen. Der direkte Kontakt des Knochens mit dem Implantat bezeichnet man als Osseointegration.

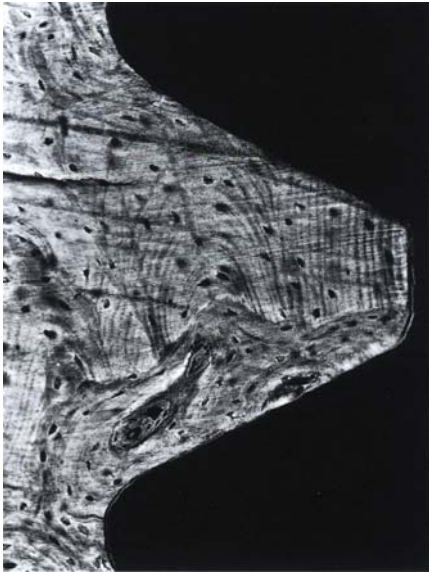


Abbildung 9: lichtmikroskopisch sichtbare Osseointegration, direkter Kontakt zwischen Knochen und Implantat

Für eine erfolgreiche Osseointegration sind nach Albrektsson et al.[11] verschiedene Faktoren erforderlich:

- Biokompatibilität
- Design
- Oberfläche
- Empfängerstelle
- chirurgische Technik
- Belastung

1.6 Zielsetzung

Eine große Anzahl von Untersuchungen beschreibt die Osseointegration konventioneller oraler Implantate nach einer Einheilphase. Dabei zeigte sich, dass die bindegewebige oder knöcherne Einheilung nicht nur vom Biomaterial, sondern auch von der biomechanischen Stabilität in der Einheilphase abhängig ist. Dabei spielt die Knochendichte des Implantatlagers, das Implantatdesign, die Mikromorphologie der Implantatoberfläche und die Kongruenz zwischen Implantat und Knochen eine Rolle [12].

Die knöcherne Einheilungsphase im Unterkiefer beträgt gegenwärtig 3 Monate, im Oberkiefer sollten es 5-6 Monate sein, bevor die Implantate funktionell belastet werden [9]. Nach dieser Einheilungszeit konnte histomorphologisch nachgewiesen werden, dass die knöcherne Einheilungsphase abgeschlossen ist [9,13,14]. Bei einer zu frühen Belastung, kann es zu einer fibrossären Einheilung und damit keiner ausreichenden Stabilität kommen [1].

In dieser experimentellen Studie wurde das Implantat/Knochen-Interface unter Sofortbelastung von oralen Implantaten elektronenmikroskopisch untersucht. Es gab in den letzten Jahren mehrere experimentelle Untersuchungen zur Überprüfung der Knochenheilung bei sofortbelastbaren Implantaten [15-22]. Dabei stellte man fest, dass nicht die Sofortbelastung als ausschlaggebende Größe, sondern das Ausmaß an Mikrobewegungen im Interface zwischen Implantat und Knochen in der Einheilphase die ausschlaggebende Größe ist und somit Einfluss auf die Osseointegration hat. Zum einen kann die Mikrobewegung zur Unterbrechung des Zellkontakts zwischen Implantat und Knochen führen, und dadurch hat sie Einfluss auf die Zellreaktion. Zum anderen kann es zur Deformation der an der Oberfläche anheftenden Osteoblasten kommen. Ausgehend von Mikrobewegungen in der Belastungszone ist die Osseointegration abhängig von knöchernen Dehnungseffekten, gemessen in der Einheit Strain [23]. Die Einheit Strain ist definiert als relative Verlängerung von Zellen, berechnet als das Verhältnis zwischen initialer Zelllänge und gedehnter Zelllänge.

Ziel dieser Arbeit war es, die Primärkongruenz als auch die initiale Gewebereaktion an der Grenzfläche von sofortbelastbaren Implantaten elektronenmikroskopisch zu evaluieren. Die in dieser Studie verwendeten Implantate wurden, basierend auf Finite Elemente

Analysen (FEM), neuentwickelt. Theoretische Berechnungen der Implantatform versprechen eine Primärkongruenz als auch eine optimierte Belastungsverteilung am Interface zu gewährleisten.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Implantate

Es wurden neue Schrauben-Implantate (Medartis, Basel, Schweiz) in dieser Untersuchung verwendet. Wie in Abbildung 1 zu sehen, haben diese Implantate eine konische Form, einer Zahnwurzel ähnlich. Diese Implantate haben eine Länge von 10 mm und einen Durchmesser von 4,1 mm an der Implantatschulter.

Die ideale Implantatform wurde über eine Finite Elementanalyse (FEM) berechnet [24,25]. Die Relation zwischen Implantatkörper und Implantatlänge sowie die Oberflächenkrümmung wurden so gestaltet, dass eine homogene Stress- und Strainverteilung auf der Implantatoberfläche bei Belastung gegeben war. Die Implantate bestehen aus reinem Titan mit einem fortschrittlich geformten Gewinde. Die Oberfläche an der Implantatschulter und der Implantatspitze ist mit Mikrorillen einer Tiefe von 20 μm und einer Breite von 40 μm hergestellt worden (Abbildung 2). Dies sollte einen optimierten Osteoblasteneinwuchs gewährleisten.

2.1.2 Versuchstiere

Diese Studie wurde an acht Göttinger Minischweinen, männlichen Geschlechts, mit einem Alter von 14 bis 16 Monaten durchgeführt. Das durchschnittliche Gewicht von diesen Versuchstieren betrug 35 kg. Bereits in früheren Implantatstudien wurde dieses Tiermodell erfolgreich verwendet [26].

Genehmigt wurde diese Tierstudie von der Ethikkommission der Universität Münster unter der Bezugsnummer G90/99.

Während der Versuchszeit wurden die Versuchstiere im Tierstall der Westfälischen Wilhelmsuniversität Münster unter gleichen Bedingungen betreut.

Vor Beginn der Implantation wurde jeweils der zweite Prämolare im Unterkiefer der Göttinger Minischweine extrahiert. Es wurde eine knöcherne Abheilungsphase von drei Monaten abgewartet.

In die ausgeheilten Extraktionsalveolen wurden in die rechte und linke Unterkieferhälfte jeweils zwei Implantate mit einer Länge von 10mm und einem Durchmesser von 4,1mm implantiert. Dabei wurden zwei Implantate okklusal belastet und zwei nicht okklusal belastet, um seitengetreunt zwei Vergleichsgruppen untersuchen zu können. Insgesamt sind 32 Implantate eingebracht worden.

2.1.3 Geräte

Implantate	Firma Medartis, Basel, Schweiz
Raspatorium	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Winkelstück mit Wasserkupplung	KaVo, Deutschland
Ratsche	Firma Medartis, Basel, Schweiz
Rosenbohrer	Komet, Lemgo Deutschland
Bohrerset für Implantation	Firma Medartis, Basel, Schweiz
Explantationssset (Säge, Hammer, Meißel)	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Trockenschrank US/UL-Typ	Memmert, Schwabach, Deutschland
Mikroskop Typ 28512	Wild, Heerburg, Schweiz
Fotomikroskop Typ 114	Nikon, Japan

Transmissionselektronenmikroskop TEM CM 10	Philips, Niederlande
Rasterelektronenmikroskop LEO 1530 VP	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Ultramikrotom, U2	Reichert, Österreich

2.1.4 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

2.1.4.1 Narkotika und Anästhetika

Ketamin	Hoechst, Frankfurt a.M., Deutschland
Atropin	Braun, Melsungen, Deutschland
Stresnil	Hoechst, Frankfurt a. M., Deutschland
Articain	Hoechst, Frankfurt a.M., Deutschland
Tötungsmittel T 61	Hoechst, Frankfurt a.M., Deutschland

2.1.4.2 Verbrauchsmaterial

OP-Handschuhe	Biogel, Regent, Broxbourne, England
Skalpelle Nr. 15	Feather Industries, Japan
Stanze	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Einwegspritze	Amefa, Kriffel, Deutschland
Fotofilm, Kodak Color	Kodak, Eastman, Rochester, USA
Objektträger	Superfrost, Dako, Hamburg, Deutschland
Deckgläser Typ 38116; 24*60mm	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Kupfer-Doppelblenden 301	Plano, Wetzlar, Deutschland

2.1.4.3 Chemikalien

Alkohol 100% Isopropanol	Zentralapotheke der Uniklinik Münster
Alkohol 96%	Zentralapotheke der Uniklinik Münster
Alkohol 90%	Zentralapotheke der Uniklinik Münster
Alkohol 70%	Zentralapotheke der Uniklinik Münster
Alkohol 50%	Zentralapotheke der Uniklinik Münster
Aqua dest.	Zentralapotheke der Uniklinik Münster
Braunol-Lösung	Braun, Melsungen, Deutschland
Epoxidharz	Plano, Wetzlar, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg, Deutschland

Fuchsin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid-Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Physiologische Kochsalzlösung	Zentralapotheke der Uniklinik Münster
Toluidinblau	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.2 Methode

2.2.1 Anästhesieverfahren

Zur Anästhesie der Minischweine wurde eine Kombination aus verschiedenen Präparaten gewählt. Sie wurden mit

10 mg/kg Ketamin

0,06 ml/kg Atropin

0,03 ml/kg Stresnil sediert.

Die Spontanatmung blieb bei dieser Art von Narkose stets erhalten. Die Narkose wurde mittels Einwegspritze und Einwegnadel in die Nackenmuskulatur (i.m.) appliziert. Das Spektrum des Ketamins umfasst eine analgetische und sedative Wirkung, das Stresnil verstärkt die sedative Wirkung. Das Atropin hemmt die Speichelsekretion. Das Operationsgebiet wurde zusätzlich mit 2 ml Ultracain® mit dem Wirkstoff Articain (ein Thiophen-Derivat mit 2% Epinephrin-Zusatz) anästhesiert, um ein möglichst blutarmes OP-Gebiet zu bekommen.

Die gewünschte Wirkung der injizierten Anästhetika trat etwa 15-20 Minuten nach der Applikation ein. Die Narkosetiefe wurde anhand des Lidreflextests überprüft. Bei nicht mehr ausreichender Narkosetiefe wurde eine Nachinjektion mittels Ketamin und Stresnil vorgenommen.

2.2.2 Chirurgisches Vorgehen

Die Operation an den Minischweinen wurde in einem speziellen Operationssaal unter aseptischen Bedingungen durchgeführt, die unter anderem auch durch Operationskittel, Mundschutz, Kopfhaube und Handschuhe erreicht wurde.

Nach Eintritt der ausreichenden Narkosetiefe wurde die Mucosa im Bereich der Implantatinsertion ausgestanzt oder ein Mukoperiostlappen präpariert, wobei die Schnittführung mit einem Skalpell, Klinge Nr. 15 erfolgte und der Lappen mit einem Raspatorium mobilisiert wurde. Die Bohrung des Implantatlagers erfolgte mit standardisierten Instrumenten, die vom Hersteller vorgegeben waren. Jede Bohrung erfolgte gemäss Herstelleranleitung und unter ständiger und ausreichender Wasserkühlung. Es wurden insgesamt vier Implantate im Unterkiefer implantiert, zwei im Prämolarenbereich des rechten Unterkiefers und zwei im Prämolarenbereich des linken Unterkiefers. Dabei wurden zwei Implantate je Seite mit Einheilkappen ohne okklusale Belastung versehen, die Schleimhaut mittels Einzelknopfnähten mit Prolene 4.0 vernäht. Die anderen zwei Implantate je Seite wurden mit Kronen, also unter okklusaler Belastung versehen. Die okklusale Belastung beschränkte sich auf einen vertikalen Kontaktpunkt; dieses wurde mit Hilfe von Okklusionsfolie überprüft und entsprechend eingeschliffen. Die Implantatgebiete wurden mit physiologischer Kochsalzlösung abschliessend gesäubert.



Abbildung 10: Zustand nach Implantation im 4. Quadranten

Nach dem Aufwachen aus der Narkose wurden die Tiere regelmäßig gefüttert und hatten freien Wasserzugang. Außerdem wurden die Minischweine kontinuierlich klinisch überwacht, dabei wurde das Implantatgebiet auf Zeichen einer Wundinfektion überprüft.

2.2.3 Probengewinnung

Nach einem Tag und nach drei Tagen post Implantation wurden jeweils ein Tier getötet, zwei weitere Tiere nach 14 Tagen, zwei nach 21 Tagen und schließlich nochmals zwei nach 28 Tagen. Die Tiere wurden in Narkose gelegt und die Tötung erfolgte schließlich mittels intrakardialer Injektion von T61.

Der implantattragende Anteil des Unterkiefers wurde mit einer Säge explantiert. Nun konnten kleinere an den Implantaten gelegene Knochenareale vom Resektat entfernt werden und für die histologischen Untersuchungen aufgearbeitet werden.

Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden Proben präpariert mit einem implantattragenden Anteil und einem nicht am Implantat gelegenen Teil.

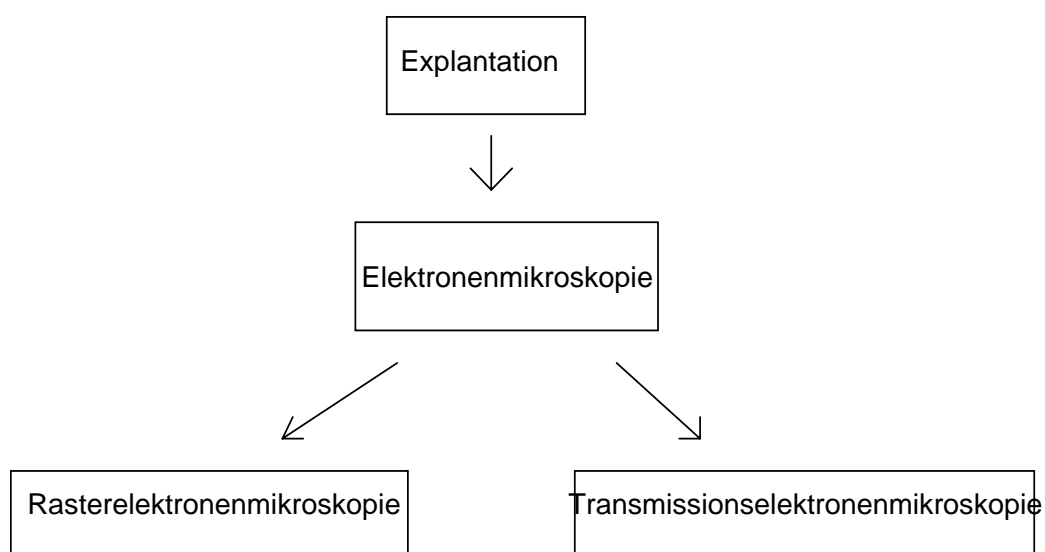
Für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden Gewebeproben aus dem kristallinen, mittleren und apikalen Bereich der angrenzenden Implantatbereiche präpariert.

Schwein	Anzahl Implantate	belastet	nicht belastet	Explantation
I	4	Regio 35, 45	Primatenlücke beidseits UK	nach einem Tag
II	4	Regio 35, 45	Primatenlücke beidseits UK	nach drei Tagen
III	4	Regio 35, 45	Primatenlücke beidseits UK	nach 14 Tagen
IV	4	Regio 35, 45	Primatenlücke beidseits UK	nach 14 Tagen
V	4	Regio 35, 45	Primatenlücke beidseits UK	nach 21 Tagen
VI	4	Regio 35, 45	Primatenlücke beidseits UK	nach 21 Tagen
VII	4	Regio 35, 45	Primatenlücke beidseits UK	nach 28 Tagen
VIII	4	Regio 35, 45	Primatenlücke beidseits UK	nach 28 Tagen

Tab. 1: Implantationsprotokoll

2.2.4 Präparation des Gewebes

In Tabelle 2 sind für die vorliegende Arbeit angewandten Präparations- und Analysemethoden als Übersichtsschema dargestellt. Nach der Explantation wurden die Gewebeprobe für Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie in Glutaraldehydlösung chemisch fixiert.



Tab. 2: Übersicht der verwendeten Präparations- und Analysemethoden

2.2.5 Probenfixierung

2.2.5.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Nachdem die zu untersuchenden Areale präpariert waren, wurden diese sofort in einer mit 0,1 molaren Phosphatpuffer enthaltenen 2,5%igen Glutaraldehydlösung mit einem pH-Wert von 7,4 fixiert. Anschließend wurden die Präparate in Osmiumtetroxid nachfixiert.

Nun wurden die Proben durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert. Begonnen wurde mit 50% Alkohol, nach 24 Stunden gewechselt in 70% Alkohol, und jeweils 24 Stunden später 90%, 96% und schließlich 100%.

Ein geringer Teil der Präparate wurden entkalkt. Hierbei wurden sie in 20% EDTA eingelegt bis eine Entkalkung sichtbar wurde. In dieser Zeit wurde die Lösung wöchentlich erneuert. Auch diese Präparate wurden anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Die Hälfte aller Proben wurden kontrastiert vs. Nicht kontrastiert.

Die Einbettung der aufgearbeiteten Präparate erfolgte in ein Epoxidharz, Epon 812. Die Polymerisation des Kunstharzes erfolgt für je einen Tag bei 40°C und 60°C im Wärmeofen.

Nun wurden Semidünnschnitte angefertigt, die Toluidin-Blau gefärbt wurden. An diesen wurden lichtmikroskopisch Geweberegionen eingegrenzt, an denen Ultradünnschnitte (80nm) vorgenommen wurden. Die Schnitte wurden auf Kupfernetzchen fixiert, auf eine Kontrastierung wurde verzichtet, um Auswaschungen der Mineralkristalle zu vermeiden. Die Ultradünnschnitte wurden für eine Stunde mit 2%igem Uranyl-Acetat und für 10 Minuten in Reynold`s Bleizitrat Lösung inkubiert.

Die Untersuchung der Proben erfolgte mit einem Philips CM10 Elektronenmikroskop bei 60 kV.

2.2.5.2 Rasterelektronenmikroskopie

Auch diese gewonnenen Proben wurden in einer 0,1 Molaren Phosphatpuffer enthaltenen 2,5%igen Glutaraldehydlösung fixiert. Nach Dehydrierung der Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe erfolgte die Trocknung. Zusätzlich wurden die Proben in vom flüssigem Stickstoff gekühltem Propan bei -80°C gefriergetrocknet. Die Gewebeproben wurden anschließend goldmakiert und unter einem LEO 1530 VP Feld Emission Elektronenmikroskop untersucht.

3. Ergebnisse

Die histologischen Ergebnisse bestätigen den klinischen Befund, dass alle Implantate gut in den Knochen integriert waren.

Entlang der Implantatoberfläche befindet sich Lamellenknochen, Spongiosa.

Lamellenknochen ist gekennzeichnet durch eine streng orientierte parallele oder konzentrisch geschichtete Ordnung der Kollagenfasern. Grundlage des Lamellenknochens ist das Havers-System, auch Osteon genannt (siehe auch Abbildung 8). Eine Änderung der statisch-mechanischen Belastung des Knochens führt zu einer funktionellen Anpassung der Knocheninnenstruktur. Haben Osteone keine funktionellen Aufgaben werden sie abgebaut und als Schaltlamellen bezeichnet. Diese permanenten Umbauvorgänge finden besonders intensiv in der Substantia spongiosa statt.

Lichtmikroskopisch ist ein direkter Kontakt zwischen Knochen und dem Titan zu beobachten.

Die histologischen Bilder vom angrenzenden Knochen zum Biomaterial der okklusal belasteten Implantate ergaben vergleichbare Resultate zur nicht okklusal belasteten Kontrollgruppe.

Die verschiedenen histologischen Untersuchungen von der Implantat/Knochen-Grenzfläche zeigen einen direkten Zellkontakt zwischen der Titanoberfläche und dem knöchernen Implantatbett.

Es ließen sich keine Fibrosierungen zwischen der Implantatoberfläche und dem umgebenden Knochen erkennen.

Die Abbildung 11 zeigt einen Ausschnitt von dem Gewindebereich unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Es ist ein direkter Kontakt zwischen Knochen und Implantat zu erkennen. Zwischen Knochen/Titan- Grenzfläche wurde eine dünne Gewebeschicht Toluidin-Blau markiert, was auf direkte Anlagerung von vitalen Zellen schließen lässt, sowohl im Gewindebereich als auch in der Mikrostruktur der Implantate. Osteoblasten sind basophil. Basophile Zellen lassen sich durch basische Farbstoffe gut anfärben.

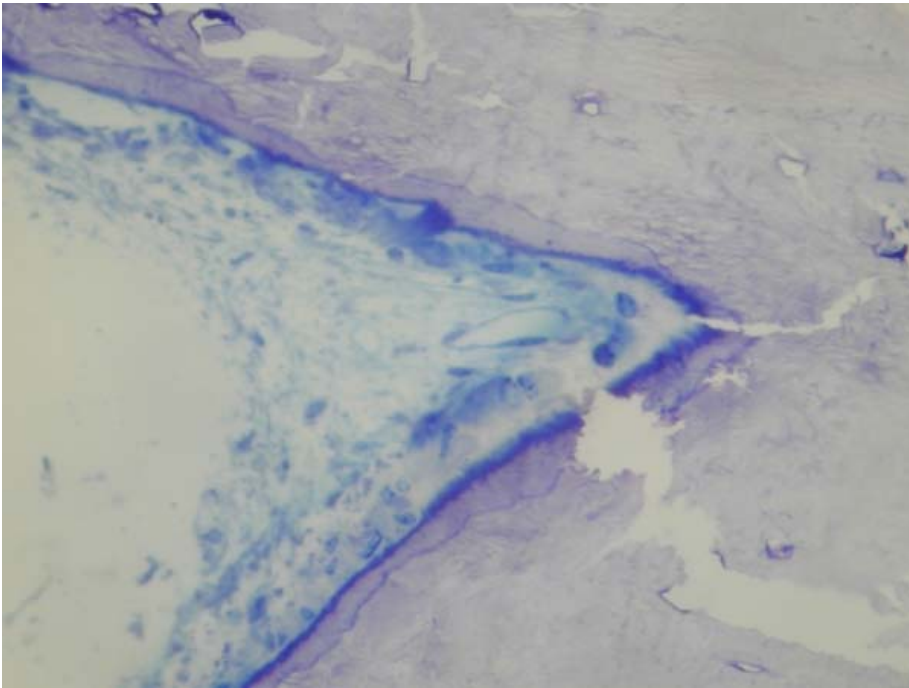


Abbildung 11: Ausschnitt vom Gewindebereich, Semidünnschnitt,
lichtmikroskopisch betrachtet, Färbung Toluidinblau

Auch bei höherer Vergrößerung konnte die Anwesenheit von direkt angrenzenden
Knochenzellen nachgewiesen werden.

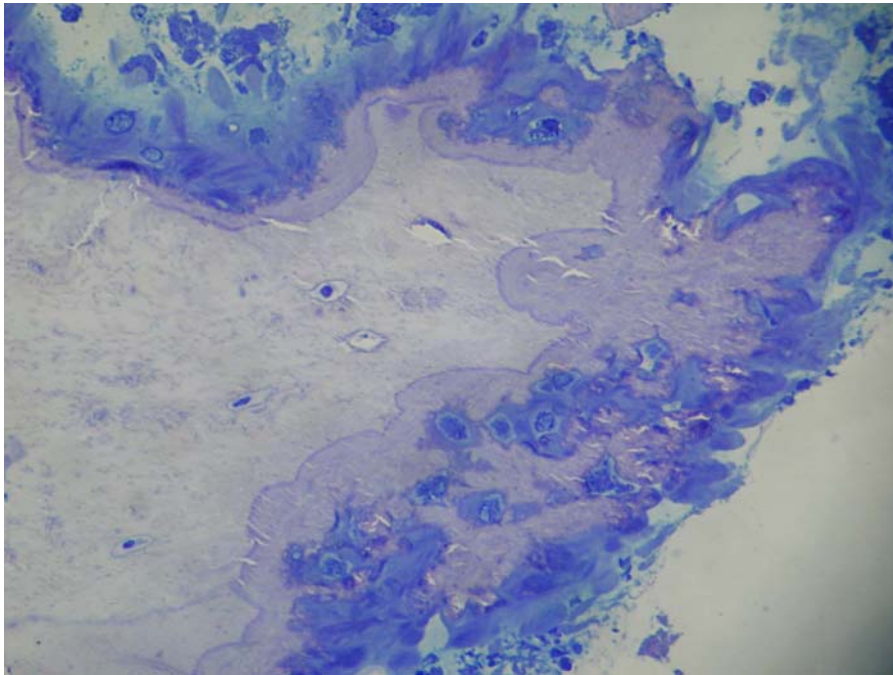


Abbildung 12: Detailausschnitt vom Gewindebereich, Semidünnschnitt, lichtmikroskopisch betrachtet, Färbung Toluidinblau

Es zeigen sich keine Unterschiede in der Zellanheftung und der Bildung extrazellulärer Matrixproteine bei okklusal belasteten Implantaten im Vergleich zu den nicht belasteten Implantaten.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen die zellulären und subzellulären Besonderheiten. Die Knochenproben wurden mit einem scharfen Messer von der Implantatseite getrennt und auseinandergebrochen. Abbildung 13 zeigt, wie eine Knochenprobe vom Implantat getrennt wurde.

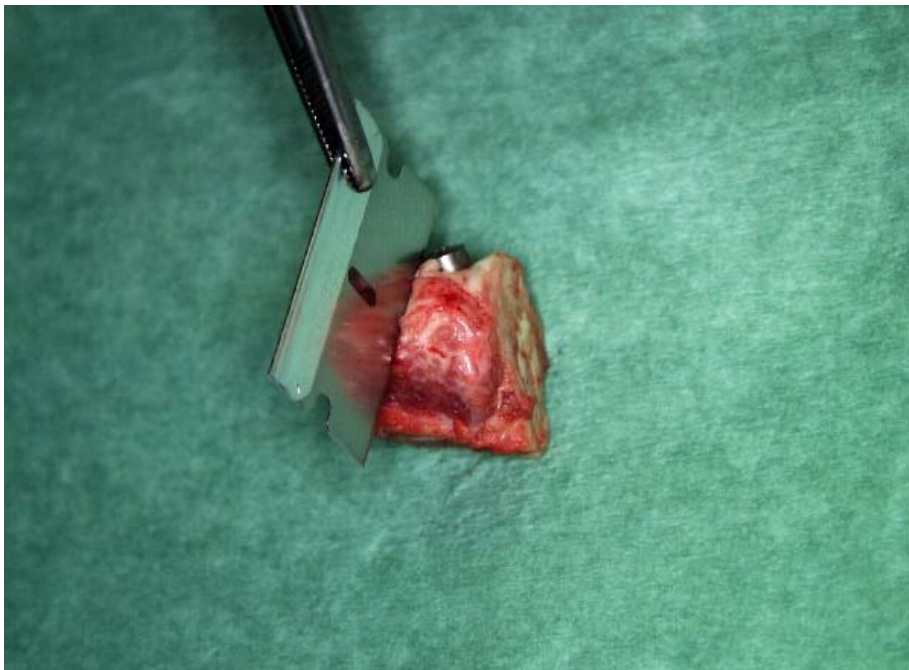


Abbildung 13: Gewinnung der Knochenprobe mittels scharfer Klinge

Die so gewonnenen Proben demonstrieren eine direkte Verbindung zwischen Osteoblasten und der Titanoberfläche. Es besteht also auch ein direkter Implantat/Knochen-Kontakt auf ultrastruktureller Ebene.

Die zu findenden Zellen entsprachen bei höherer Vergrößerung der phänotypischen Morphologie der aktive Osteoblasten. Aktive Osteoblasten sind 20-30 μm groß. Sie bilden einen epithelartigen Verband auf der Oberfläche von Knochenspannen. Sie besitzen einen runden Kern, sind basophil und haben zahlreiche sekretionsaktive Organellen. Inaktive Osteoblasten hingegen sind spindelartig abgeflacht.

Abbildung 14 zeigt einen, unter dem Transmissionselektronenmikroskop betrachteten Osteoblasten.

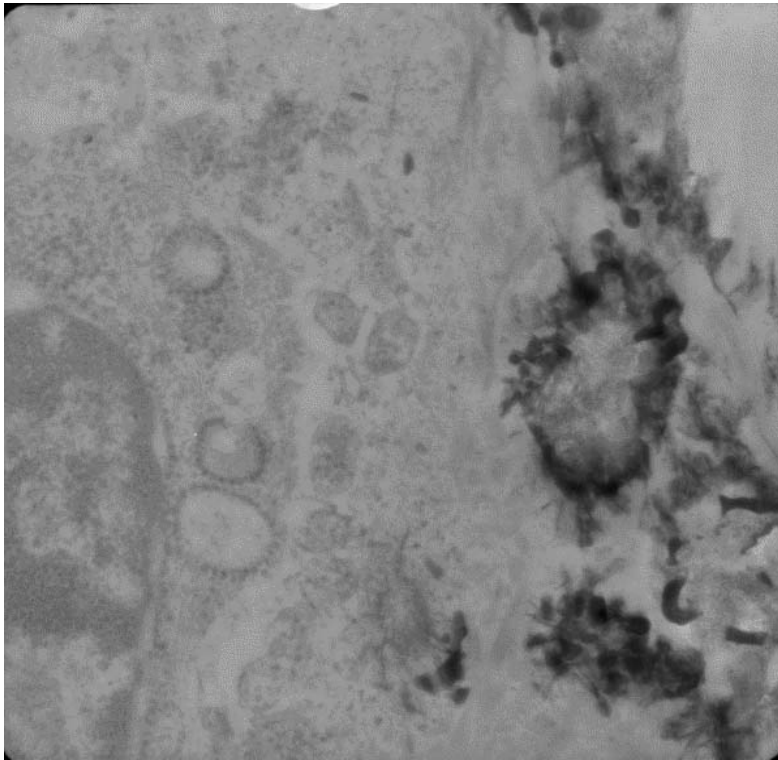


Abbildung 14: TEM Ausschnitt eines aktiven Osteoblasten mit Mineralisationskeimen
(unkontrastierte Probe)

Die Adhäsion von Zellen und extrazellulären Matrixproteinen bestand vom ersten Tag der Insertion an und bestand während der gesamten experimentellen Zeit, unabhängig von der Art der Belastung.

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen verdeutlichten einen zeitabhängigen Mineralisationsprozess. Kleine Kristalle wurden im Proteinlayer gefunden, direkt an der Titanoberfläche angrenzend. Im weiteren Verlauf ergab sich eine vollständige Bedeckung der Implantatoberfläche mit einem Netzwerk aus extrazellulären Matrixproteinen.

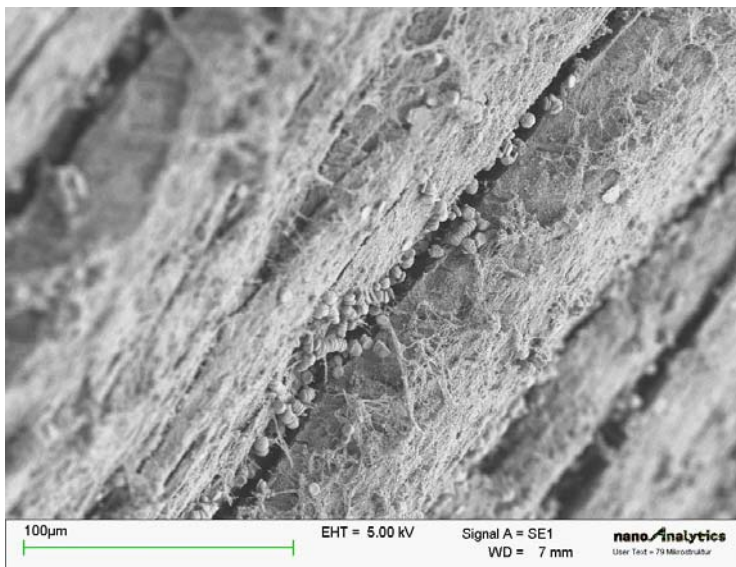
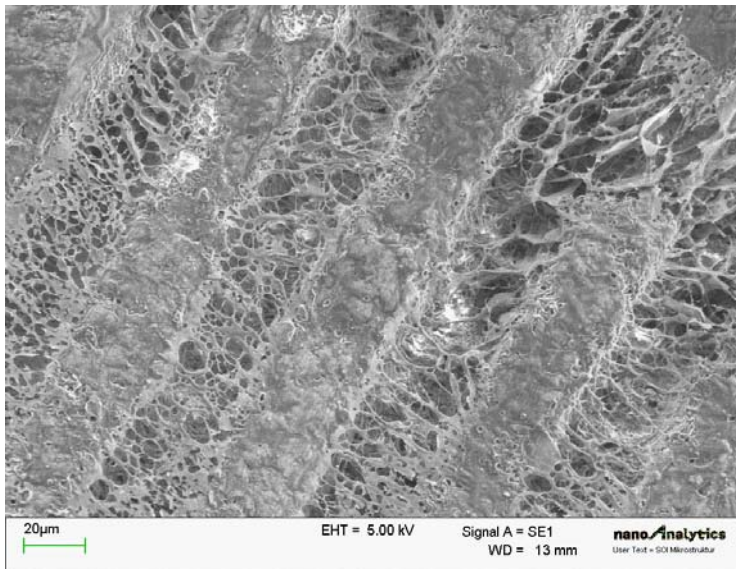


Abbildung 15: rasterelektronenmikroskopische Bilder von unterschiedlichen Knochenstrukturen als Negativabdruck der Implantatrillen.

In den beiden rasterelektronenmikroskopischen Bildern in Abbildung 16 kann man die direkte Verbindung zwischen dem Implantat und dem Knochen erkennen.

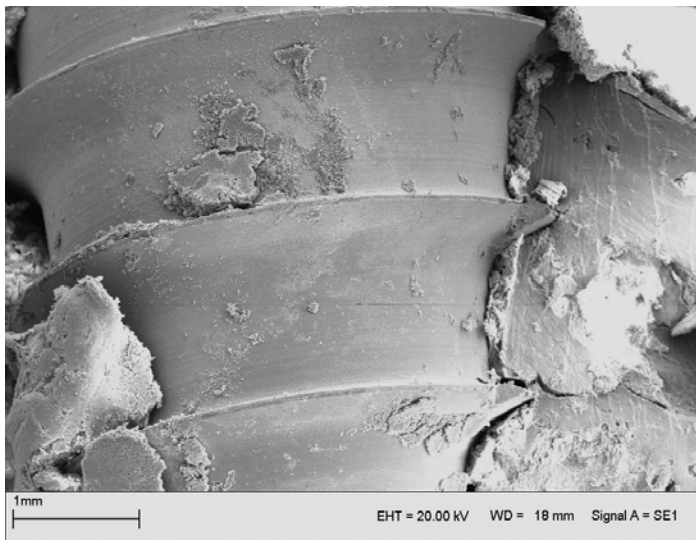
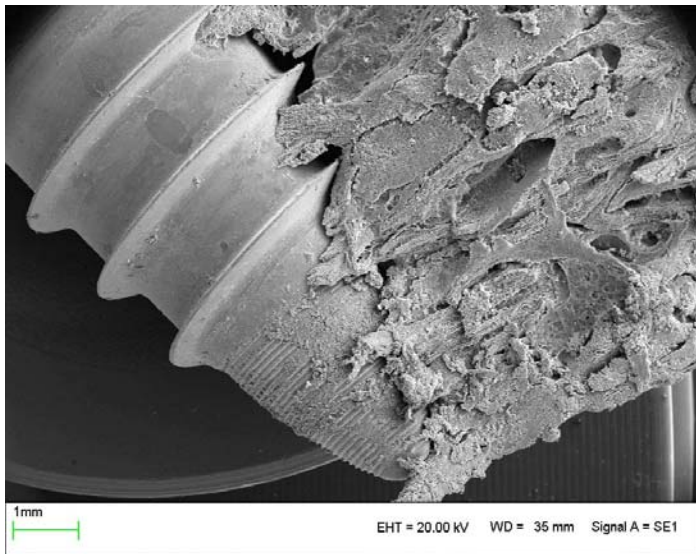


Abbildung 16: rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen vom Implantat mit umgebenden Knochen

Auch in der Transmissionselektronenmikroskopie konnte eine scharfe Grenzfläche mit direkter Apposition von kalzifiziertem Knochengewebe an der Titanoberfläche gefunden werden.

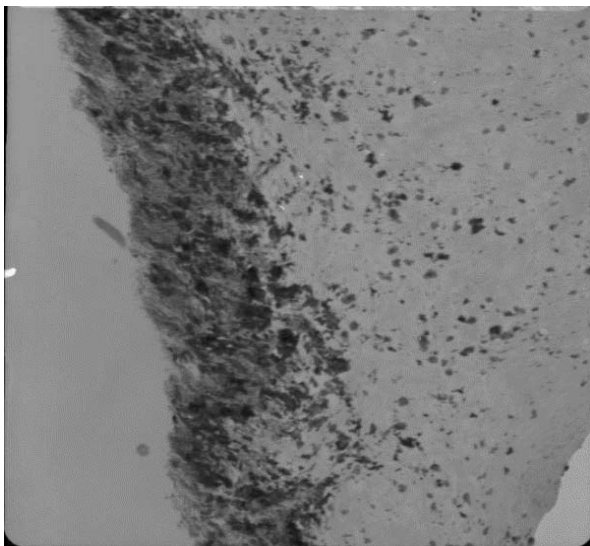
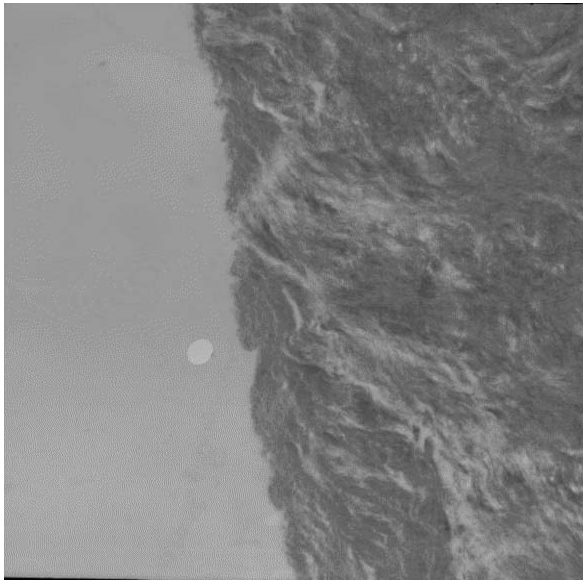


Abbildung 17: TEM Bilder der Mineralisation am Interface (oben kontrastierte Probe, unten unkontrastiert).

Die transmissionselektronenmikroskopischen Bilder bestätigen die Beobachtung von vitalen und funktionstüchtigen Osteoblasten im periimplantären Raum.

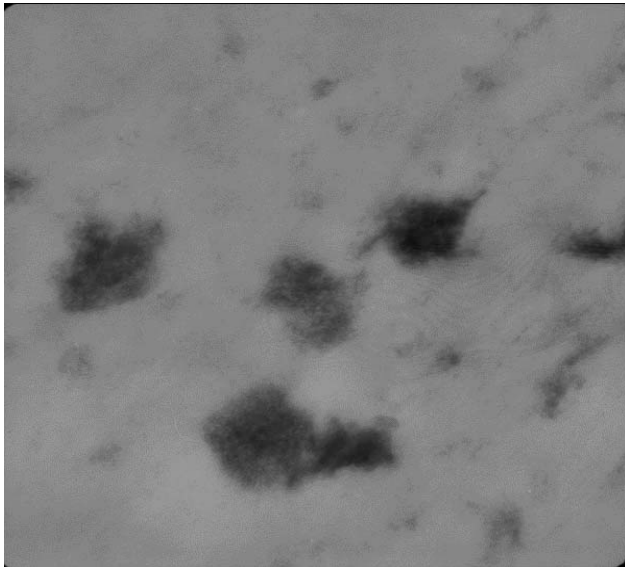


Abbildung 18: Initiale Mineralkeime im perizellulären Bereich.

Die Zellen zeigten eine ausgeprägte Ausbildung endoplasmatischen Retikulums, Golgi-Bläschen und damit verbunden eine extrazelluläre Matrixproteinsynthese.

Osteoblasten bilden täglich einen ca. 1 μm breiten unverkalkten Osteoidsaum. Innerhalb von

3-4 Tagen verkalken 70% des Osteoids, nach ungefähr 6 Wochen ist der Mineralisationsvorgang abgeschlossen.

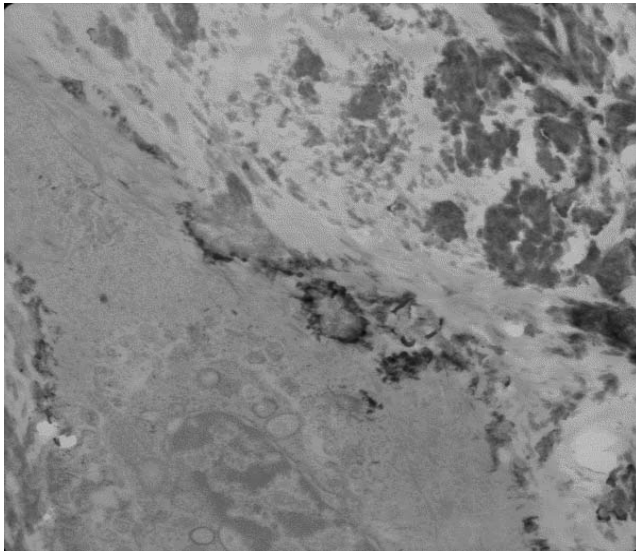


Abbildung 19: vitaler Osteoblast im Bereich der Implantatoberfläche (unkontrastierte Probe)

In den Semidünnschnitten zeigten sich einige geringe Regionen von unmineralisierter Matrix. Genau diese Regionen wurden aber noch elektronenmikroskopisch betrachtet und hier wurden voll funktionstüchtige Zellen gefunden.

Zeichen von Nekrosen und Dedifferenzierungen von Zellen wurden nur selten in den angrenzenden Bereichen zu den Implantaten entdeckt. An keinem Bereich der Implantate (Schulter, Körper, Spitze) wurden Unterschiede in der Morphologie der Zellen gefunden, auch bei den okklusal belasteten Implantaten fand sich kein Unterschied der Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4. Diskussion

Der Langzeiterfolg von Implantaten setzt eine feste Fixierung des Implantats im Knochen voraus, um spezifische Funktionen erfüllen zu können. Dabei spielt die Primärstabilität, die Primärkongruenz und die biologische Knochenbelastung eine wichtige Rolle.

Aber auch auf zelluläre Prozesse an der Grenzfläche zwischen Implantat und Knochen ist zu achten.

Verschiedene Studien, wie z. B. die von *Albrektsson* [11] u. *Carlsson* [27] kamen zu den Ergebnissen, dass die Osseointegration und die Primärstabilität des Implantats von dem geometrischen Implantatdesign abhängig ist.

Aufgrund dieser Überlegungen wurden neu designte makro- und mikrostrukturierte Implantate entwickelt, die einer Sofortbelastung der Implantate standhalten sollen.

Der Werkstoff Titan hat sich aufgrund seiner Biokompatibilität und mechanischer Eigenschaften als Implantatwerkstoff durchgesetzt. In der Entwicklung der Implantatform hat sich zunehmend die konische Form durchgesetzt. Diese Implantate erhalten eine bessere Primärstabilität und eine günstigere Belastungsverteilung an den Knochen. *Spiekermann* [28], *Behneke* [29] und *Dietrich* [30] haben bei Untersuchungen an IMZ-Implantaten festgestellt, dass es durch den kortikalen Eintrittsbereich zu weniger Knochenresorption kommt. *Joos* [31] hat in einer neueren Studie festgestellt, dass die gleichbleibende Spannungsverteilung entlang der zylindrischen Implantate hierfür verantwortlich ist. Die Belastungsweitergabe von der Kortikalis an die Spongiosa wird durch ein progressives Gewinde erreicht, so erhält man eine optimale Primärstabilität laut *Nentwig* und *Moser* [32].

Neben der Implantatform und der Biokompatibilität spielen aber auch die Knochendichte, die Behandlungsplanung, das chirurgische Vorgehen, die Einheilzeit und die Belastungsphase eine wichtige Rolle, [11].

In dieser Studie zeigt der histologische Überblick über den Knochen- Implantatkontakt eine eindeutige Kongruenz von Knochen und Implantat. Die Primärkongruenz spielt eine Rolle für die Kaukräfte. Die entstehenden Kaukräfte werden bei Erreichung einer Primärkongruenz zwischen Implantat und Knochen direkt auf den periimplantären Knochen übertragen und es kommt zu einer periimplantären Knochenformierung und

nicht zu einer relativen Beweglichkeit zwischen Implantat und Knochengewebe. Es ist allerdings darauf zu achten, dass die entstehenden Kräfte eine bestimmte Größe nicht überschreiten. Dieses Implantatsystem wurde mittels FEM- Berechnungen so entwickelt, dass nach Eingliederung eine physiologische Strainverteilung von 1000-4000 μ strain bei einer vertikal-okklusalen Belastung von 300 N auf den Knochen nicht überschritten werden sollte.

Die Implantatoberfläche ist ein wichtiger Faktor für eine optimale Osseointegration. Die osseointegrierte Verbindung ist über physikalische und chemische Kräfte entlang der Kontaktfläche wirksam, [33]. Es stellt jedoch keinen Beweis, dass diese Kräfte eine große Rolle für die Stärke der Osseointegration stellen, wenn sie über den Knochen auf die Titanoberfläche wirken. Die Verbindung ist eher biomechanischer Natur. Es ist bekannt, dass in Räume unter 100 μ m Breite kein Knochen einwächst, [34]. Aber die Grundsubstanz des Knochens dringt in solche Lumina ein. Daraus lässt sich schließen, dass Oberflächenstrukturen einen erheblichen Einfluss auf die Stabilität der Implantate haben, [35].

Hansson et al. [36] untersuchten die Auswirkungen eines glatten und rauhen Implantathalses auf die Stressverteilung im kortikalen Knochenbereich. Eine aufgeraute Oberfläche würde einer Knochenresorption in diesem Areal entgegenwirken. In den Untersuchungen der Oberflächenstrukturen von *Wilke et al.* [37] wurde festgestellt, dass sandgestrahlte, geätzte oder Plasmaspritzbeschichtete Implantate einen 5-7 fach höheren Ausdrehwert hatten als glatte Oberflächen. In einer Studie von *Wennerberg et al.* [38] wurden drei verschiedene Oberflächen verglichen. Es wurden die Ausdrehwerte, der Knochen- Implantatkontakt und die Ionenabgaben untersucht. Die Ausdrehwerte und der Knochen- Implantatkontakt der 250 μ m gestrahlten Oberfläche waren am höchsten, die der glatten Oberfläche am niedrigsten. Die Ionenabgabe jedoch blieb für alle Oberflächen unbeeinflusst. Eine raue Oberfläche hat also eine positive Auswirkung auf die Verankerungsfestigkeit von Implantaten.

Auch *Größner-Schreiber* [39] untersuchte unterschiedliche Titan-Oberflächen auf Beeinflussung der Osseointegration. Die Osteoblasten zeigten auf rauhen und porösen Titanoberflächen eine gesteigerte Mineralisation und Kollagensynthese.

Qu et al. [40] untersuchten das Verhalten von Osteoblasten an verschiedenen rauhen

Oberflächenstrukturen. Dabei kam es zu keiner Zellorientierung an glatten Oberflächen, jedoch hatte die raue Oberfläche einen positiven Einfluss auf das Verhalten der osteogenetischen Zellen und somit auf die Osseointegration. *Ong et al.* [41] hingegen stellten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Zellzahl auf Titanoberflächen oder Calcium-Phosphat beschichteten Oberflächen fest.

Verschiedene Autoren sehen als optimale Voraussetzung für die Osseointegration, die ungestörte Einheilphase, d. h. im Unterkiefer eine Einheilphase von 3-4 Monaten und im Oberkiefer 6 Monate. Nach dieser Zeit konnten *Branemark et al.* [9] und *Donath et al.* [42] histomorphologisch nachweisen, dass die knöchernen Einheilungsvorgänge abgeschlossen waren.

Nach *Brunski* [43] führen Makrobewegungen zu einer fibrossären Einkapselung, während Mikrobewegungen bis zu 100 µm zu keiner nennenswerten Beeinträchtigung der Osseointegration führen. *Hashimoto et al.* [44] führten eine Studie an Affen durch. Die eingesetzten Implantate wurden nach 4 Wochen belastet, die histologische Auswertung erfolgte nach 3 Monaten. Dabei stellte sich heraus, dass alle Implantate osseointegriert waren und keine Anzeichen einer bindegewebigen Einkapselung vorhanden waren. Zu diesen Ergebnissen kamen auch *Deporter et al.* [45]. Sie implantierten bei Hunden konische Implantate und Titanschrauben, die nach 6 Wochen belastet wurden. Auch hier fand eine vollständige Osseointegration statt. In der Studie von *Corigliano et al.* [46] wurde bei Affen Einzelzahnücken mit Implantaten versorgt, die nach 2 Wochen belastet wurden. Die Implantate waren osseointegriert.

Piatelli et al. [21] implantierte ebenfalls bei Affen Schraubenimplantate. Die eine Gruppe wurde nach 30 Tagen belastet, die andere wurde nicht belastet. Er stellte eine kompaktere Knochenstruktur bei der Gruppe der belasteten Implantate fest.

Bei *Salama et al.* [47] wurden zwei Patienten mit Implantaten versorgt, die sofort belastet wurden und erfolgreich osseointegriert waren.

Chiapasco et al. [48] konnten keine entscheidene Beziehung zwischen Verlustrate und Implantattyp feststellen. Für sie waren Implantatlänge und -breite und die Knochendichte wichtigere Faktoren für die Osseointegration. Es besteht laut *Schnitman et al.* [49] eine Abhängigkeit von der Knochendichte und der Beseitigung von extremen Bewegungen bei

Sofortbelastung der Implantate für eine erfolgreiche Osseointegration.

Die Untersuchung der periimplantären Knochenreaktion ist konventionell durchgeführt, histologisch und elektronenmikroskopisch ausgewertet worden.

Die histologische Übersicht von der Implantat/Knochen Grenzfläche zeigt eine Kongruenz zwischen dem Implantat und umgebenden Knochen. Ein direkter Kontakt zwischen Implantat und Knochen war über die gesamte Oberfläche der Implantate direkt nach Insertion und auch während der gesamten experimentellen Zeit gegeben.

Es wurde auf ultrastruktureller Ebene eine ausgezeichnete Adaptation vom Knochen zur Titanoberfläche beobachtet, in vergleichbarer Art, wie es bei *Sowden* und *Schmitz* [50] über die Insertion von selbstschneidenden Schrauben in die Schädelkalotte beschrieben wurde. In mehreren Studien wurde mittels langfristiger histologischer Untersuchungen bewiesen, dass nach Insertion von selbstschneidenden Schrauben, ob mit Belastung oder ohne Belastung das umgebende Knochengewebe aufrechterhalten werden konnte [51].

Die rasterelektronenmikroskopischen Bilder zeigen, dass das mineralisierte Knochengewebe nicht nur die Implantatoberfläche kontaktiert, sondern dass auch die Osteoblasten fest an der Titanoberfläche anheften. Die Entwicklung der Implantat-Knochengrenzfläche ist direkt proportional abhängig von den Interaktionen zwischen der Knochenmatrix und den Osteoblasten mit der Titanoberfläche, so die Ergebnisse aus der Studie von *Jayaraman et al.* [52].

Unsere Untersuchungsergebnisse zeigen Parallelen zu denen von *Lavos-Valero et al.* und *Simmons et al.* [53,54]. Deren Rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen ergaben, dass sowohl im frühen als auch im späteren Postimplantationsstadium ein enger Kontakt zwischen Knochenzellen und Titanoberfläche besteht.

Die ultrastrukturellen Analysen bestätigen, dass Zellen an einer Adhäsionsstelle schon nach einem Tag der Implantation an der Implantatoberfläche anheften. Die Adhäsion ist vergleichbar mit Untersuchungen bei in-vitro Zellkulturen. Die Zellen zeigten das typische Aussehen von gut differenzierten Knochenzellen. Das ultrastrukturelle Aussehen der "Interfacial-Zellen" zeigte auch keinen Unterschied in den beiden verschiedenen Untersuchungsgruppen.

Ohne auf die Eigenschaften der Oberflächenbeschaffenheit Rücksicht zu nehmen, stellten auch *Herman et al.* [55] und *Slot et al.* [56] in ihren Untersuchungen ein gutes

Adhäsionsverhalten von Osteoblasten an der Titanoberfläche fest, sowie auch eine gute Proliferation und Differenzierung im Interface, denn mesenchymale Zellen reagieren besonders empfindlich auf Oberflächeneigenschaften, da sie abhängig von der Lokalisation reifen und sich ortsabhängig zu skelettalen Phänotypen differenzieren [57]. Die Formierung des Zytoskeletts, die Zelladhäsion und die Interaktion mit anderen Zellen sind zelluläre Eigenschaften, die die Fähigkeiten einer Zelle zur Anpassung an einer Oberfläche bestimmen [58]. Die Zellkörper und Zellskelette können sich besser in Mikrorillen der Implantatoberfläche einnisten und anpassen. Wie auch *Qu et al.* [40] und *Anselme et al.* [59,60] schon feststellten, dass sich die Zellen eher in gerillten als in glatten Oberflächen anheften.

Murai et al. haben an der Titanoberfläche eine 20-50 nm dünne netzartige Schicht beschrieben. Diese Schicht lag zwischen Implantat und Knochen und bestand aus einer schlanken Zellschicht und gering mineralisierter Zone [61].

Simons et al. beschrieben ebenso eine frühe Heilung und Mineralisierung vom Knochengewebe in der periimplantären Zone [54].

Die ultrastrukturellen Daten von *Futami et al.* zeigen, dass sich die Mineralstruktur an der Titanoberfläche mit der Zeit vermehrt [62].

Für die Stabilität der Implantate im Knochen ist es von größerer Bedeutung, dass die Osteoblasten nicht nur an der Titanoberfläche anheften, sondern die Matrixmineralisierung in der Umgebung des Implantats anregen. Das Interface sollte sich zu einer Matrix entwickeln, die in ihrer Zusammensetzung, Struktur und biochemischen Charakteristik des normalen Knochens entspricht. Über Kollagenfasern und deren Ausläufern kommunizieren die Osteoblasten mit den Osteozyten der mineralisierten Matrix.

Kanalikuli verbinden die Osteozyten miteinander und reichen bis zur Implantatoberfläche, so dass okklusale Belastung direkt vermittelbar wird. Diese Form lässt Osteoblasten und Osteozyten reagieren und in die Matrix einfließen.

In verschiedenen zahnmedizinischen und orthopädischen Forschungen wurden in frühen Osseointegrationsphasen mineralisierte Matrix gefunden, die einer Belastung standhalten konnten, ohne dass es zum Implantatverlust führte [63].

Die Ausbildung der periimplantären Umgebung ist sicherlich abhängig von der Stärke der Belastung und der Implantat-Knocheninteraktion, aber die Osseointegration kann gewiss

auch vom Implantatdesign gefördert werden. Die mechanische Umgebung um das Implantat herum prä und post implantationem hängt von den einwirkenden Kräften und dem Implantat- Knochenkontakt ab. Bestimmte Implantatformen schaffen günstige mechanische Belastungen für die Knochenentwicklung im periimplantären Raum [64,65].

Wir nehmen an, dass der ungestörte Osseointegrationsprozess auch mit okklusaler Belastung das Ergebnis des Implantatdesigns mit der charakteristischen dreidimensionalen Form ist. Diese Form begünstigt eine optimale mechanische Belastung an der Implantat-Knochengrenzfläche, die positiv auf die Primärstabilität und Osseointegration einwirkt. Von okklusal eintreffende Belastungen werden auf den periimplantären Bereich übertragen, so dass es zu keiner Beweglichkeit zwischen Implantat und Knochen kommt. Die Mikroretentionen schaffen einen optimalen Raum für die Adhäsion von mesenchymalen Zellen. Aus proliferierenden mesenchymalen Zellen differenzieren sich Osteoblasten und die Ausbildung von extrazellulärer Matrix kann folgen. Durch Kapillarisation wird die extrazelluläre Matrix entsprechend der funktionellen Anforderungen umgebaut. Die Osteoblasten bilden durch in Verbindung stehende Fortsätze einen Zellverband. Dieser bildet Osteoid, welches mineralisiert. Charakteristische Anzeichen von primärer Spongiosa lassen sich erkennen.

All dies bietet enorme Vorteile für den Patienten, kürzere Genesungsphasen durch eine optimale Primärstabilität des Implantats.

5. Zusammenfassung

Ein aktuelles Problem in der klinischen Implantologie ist die Frage nach der Möglichkeit einer Sofortbelastung von Implantaten direkt nach der Insertion, während übliche Protokolle eine ungestörte Einheilung der Implantate verlangen. Ziel dieser Studie war es, die Grundlagen der bisher wenig bekannten frühen Osseointegration von Implantaten unter Belastung auf ultrastruktureller Ebene zu untersuchen. Es wurden von daher 32 speziell für die Sofortbelastung designte Implantate in den Unterkiefer von 8 Göttinger Minischweinen (G90/99) implantiert. Nach sofortiger Belastung vs. Nicht-Belastung in der Kontrollgruppe wurden zu frühen und verzögerten Zeitpunkten (1., 3., 14., 21. und 28. Tag post implantationem) die Tiere getötet. Die per-implantären Knochenstücke wurden anschließend explantiert und die Proben histologisch und ultrastrukturell aufgearbeitet. Es wurden rasterelektronen- und transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt, um das Implantat/Knochen-Interface beurteilen zu können. Es konnte durch unsere Untersuchung gezeigt werden, dass eine Osseointegration zu sehr frühen Zeitpunkten bereits vorhanden ist. Dabei konnte in den beiden Untersuchungsgruppen ein direkter Zellkontakt zwischen Implantat und Knochen bereits am 1. Tag festgestellt werden. Lichtmikroskopisch war eine dünne Toulidin-Blau angefärbte Gewebeschicht zu erkennen, die den Nachweis vitaler Zellen liefert. Elektronenmikroskopisch waren aktive Osteoblasten zu erkennen. Die Zellen zeigten eine ausgeprägte Ausbildung endoplasmatischen Retikulums, Golgi-Bläschen und damit verbunden eine extrazelluläre Matrixproteinsynthese. Eine Mineralisation des Interfaces war vom ersten Tag an über den gesamten Untersuchungszeitraum detektierbar. Unsere Ergebnisse bestätigen, dass das Implantat/Knochen-Interface eine Sofortbelastung bei speziell entwickelten Implantaten durchaus ausgeliefert werden kann.

6. Abbildungsverzeichnis

<u>Abbildung 1</u>	Seite 10
Spiekermann H., Donath K, Jovanovic S., Richter J., Implantologie, Farbatlant der Zahnmedizin 10: 1, 1994, 26	
<u>Abbildung 2</u>	Seite 11
Spiekermann H., Donath K, Jovanovic S., Richter J., Implantologie, Farbatlant der Zahnmedizin 10: 1, 1994, 37	
<u>Abbildung 3</u>	Seite 12
Spiekermann H., Donath K, Jovanovic S., Richter J., Implantologie, Farbatlant der Zahnmedizin 10: 1, 1994, 15	
<u>Abbildung 4</u>	Seite 13
Spiekermann H., Donath K, Jovanovic S., Richter J., Implantologie, Farbatlant der Zahnmedizin 10: 1, 1994, 46	
<u>Abbildung 5</u>	Seite 14
Spiekermann H., Donath K, Jovanovic S., Richter J., Implantologie, Farbatlant der Zahnmedizin 10: 1, 1994, 52	
<u>Abbildung 6</u>	Seite 15
Eigenes Bildmaterial	
<u>Abbildung 7</u>	Seite 16
Eigenes Bildmaterial	
<u>Abbildung 8</u>	Seite 17
Liebich, H.-G.: Funktionelle Histologie, Farbatlas und Kurzlehrbuch der mikroskopischen Anatomie der Haussäugetiere, zweite Auflage; 1993, 69	
<u>Abbildung 9</u>	Seite 18
Lindhe, J., Karring, T., Lang, N,P.: Klinische Parodontologie und Implantologie, 1999, 854	
<u>Abbildung 10</u>	Seite 30
Eigenes Bildmaterial	

<u>Abbildung 11</u>	Seite 32
Eigenes Bildmaterial	
<u>Abbildung 12</u>	Seite 38
Eigenes Bildmaterial	
<u>Abbildung 13</u>	Seite 39
Eigenes Bildmaterial	
<u>Abbildung 14</u>	Seite 40
Eigenes Bildmaterial	
<u>Abbildung 15</u>	Seite 41
Eigenes Bildmaterial	
<u>Abbildung 16</u>	Seite 42
Eigenes Bildmaterial	
<u>Abbildung 17</u>	Seite 43
Eigenes Bildmaterial	
<u>Abbildung 18</u>	Seite 44
Eigenes Bildmaterial	
<u>Abbildung 19</u>	Seite 45
Eigenes Bildmaterial	

7. Literaturverzeichnis

- [1] Spiekermann H., Donath K, Jovanovic S., Richter J., Implantologie, Farbatlant der Zahnmedizin 10: 1, 25-58, 1994

- [2] Hartmann, A.J., Gedanken über die Implantation von künstlichen Zähnen. Dtsch. Mschr. Zahnheilk. 9: 371, 1981

- [3] Strock A.E., Experimental work on a method for the replacement of Missing teeth by direct Implantation of a metal Support into the Alveolus. Amer. J. Orthodont. 25: 467, 1939

- [4] Formigini, M. S. Protesi dentaria a Metzoo di infibulazione diretta endoalveolare. Riv. ital. Stomatol. 2: 193, 1947

- [5] Scialom,J., Die "Nadel-Implantate". Zahnärztliche Welt 16: 565, 1962

- [6] Heinrich,B., Schraubenimplantate. Quintess. Zahnärztl. Lit., Ref.-Nr.4431, 1971

- [7] Linkow,L.J., Clinical Evaluation of tue various designed endosseous Implants. J. oral Implantol.12: 35, 1966

- [8] Adell, R., Lekholm, U., Rockler, B. u. Branemark, P.-I.
A 15 years study of osseointegrated implants in tue Treatment of tue edentulous jaw International Journal of Oral Surgery 6, 387-399, 1981

- [9] Branemark, P.I., Hansson, B., Adell, R., Breine, U., Lindström, J., Hallén, O., Öhmann, A., Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw: Experience from a 10-year period. Almquist & Wiksell, Stockholm 1977
- [10] Donovan, T.E., Chee, W.L., ADA-acceptance program for endosseous implants. *Canad. Dent. Ass. J.* 61: 1992
- [11] Albrektsson, T., Branemark, P.I., Hansson, H.-A. u. Lindström, J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone anchorage in man. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 52, 155-170, 1981
- [12] Donath, K., Kirsch, A. Welche Bedeutung hat die primäre Stabilisation von Implantaten für die ossäre Integration während der Einheilphase? *Z. Zahnärztl. Implantol.* 2, 11-17, 1986
- [13] Donath, K., Laaß, M., Günzl, H.-J.: The histopathology of different foreign-body reactions in oral soft tissue and bone tissue. *Virchows Arch. Abt. A* 420: 131-137, 1992
- [14] Donath, K.: Pathogenesis of bony pocket formation around dental implants. *J. dent. Ass. S. Afr.* 47: 204-208, 1992
- [15] Deporter DA, Watson PA, Pilliar RM, Melcher AH, Winslow J, Howley TP, Haisel P, Maniopoulos C, Rogriguez A. A histological assessment of the initial healing response adjacent to porous surfaced Ti alloy dental implants in dogs. *J Dent Res* 1986; 65:1064-1070.

- [16] Hashimoto M, Akagawa Y, Hashimoto N, Nikai H, Tsuru H. Single crystal sapphire endosseous implant loaded with functional stress: Clinical and histological evaluation of peri-implant tissues. *J Oral Rehab* 1988; 15:65-76.
- [17] Lum LB, Beirne OR, Curtis DA. Histological evaluation of Ha-coated vs uncoated titanium blade implants in delayed and immediately loaded applications. *Int J Oral Maxillofac Impl* 1991;6:456-462.
- [18] Akagawa Y, Ichikawa Y, Nikai H, Tsuru H. Interface histology of early loaded partially stabilized zirconia endosseous implant in initial bone healing. *J Prosth Dent* 1993; 69:599-604.
- [19] Piattelli A, Ruggierie A, Franchi M, Romasco N, Trisi P. A histologic and histomorphometric study of bone reactions to unloaded and loaded non-submerged single implants in monkeys: A pilot study. *J Oral Implant* 1993; 19:314-320.
- [20] Sagara M, Akagawa Y, Nikai H, Tsuru H. The effects of early occlusal loading on one-stage titanium implants in beagle dogs: A pilot study. *J Prosth Dent* 1993; 69:281-288.
- [21] Piattelli A, Paoloantonio M, Corigliano M Scarano A. Immediate loading of titanium plasma-sprayed screw-shaped implants in man: A clinical and histological report of 2 cases. *J Periodontol* 1997; 68:591-597.
- [22] Corso M, Sirota C, Fiorelline J, Rasool F, Szmukler-Moncler S, Weber H-P. Evaluation of the osseointegration of early loaded free-standing dental implants with various coatings in the dog model: Periostest and radiographic results. *J Prosth Dent* 1999; 82:428-435.

- [23] Meyer U, Wiesmann HP, Kruse-Lösler B, Handschel J, Stratmann U, Joos U. Strain related bone remodeling in distraction osteogenesis of the mandible. *Plast Reconstr Surg* 1999; 103:800-807.
- [24] Meyer U, Vollmer D, Bourauel C, Joos U. Sensitivity analysis of bone geometries around oral implants upon bone loading using finite element method. *Comp Meth Biomech Biomed Eng* 2001; 3:553-559.
- [25] Joos U, Vollmer D, Kleinheinz J. Effect of implant geometry on strain distribution in peri-implant bone. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2000; 4:143-147.
- [26] Buser D, Nydegger T, Hirt HP, Cochran DL, Nolte LP. Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998; 13:611-619.
- [27] Carlsson, L. On the development of a new Konzept for orthopaedic implant fixation. Ph D-thesis. Göteborg: Biomaterials/Handicap Research, Göteborg University. 1989.
- [28] Spiekermann, H., Jansen, V.K., Richter, E.J.: A 0-years follow-up of IMZ and TPS implants in the edentulous mandible using barretained overdentures. *Int. J. Maxillofac Implants* 10 1995, 231-234.
- [29] Behneke, n.: Klinische Erfahrungen mit endossalen Implantaten im zahnlosen Unterkiefer. Ergebnisse einer Langzeitstudie über 12 Jahre. Med Habil, Mainz 1995.

- [30] Dietrich, U., Wagner, W.: Zur Frage des Knochenabbaus bei IMZ Implantaten. *Z Zahnärztl Implantol* 8, 1992, 240-245
- [31] Joos, U., Vollmer, D., Kleinheinz, J.: Einfluss der Implantatgeometrie auf die Strainverteilung im periimplantären Knochen. *Mund Kiefer Gesichtschir* 4, 2000, 143-147
- [32] Nentwig, G.-H., Moser, W.: Untersuchungen zur periimplantären Knochensituation bei Brückenversorgungen im Seitenzahnggebiet mit dem NM-Implantat. *Z Zahnärztl Implantol* VII, 1991, 100-103.
- [33] Albrektsson, T., Branemark, P.I., Hansson, H.A.; Kasemo, B.; Larsson, K. Lundsström, I., Mc Queen, D. & Skalak, R. The interface Zone of inorganic implants in vivo: Titanium implants in bone, 1983. *Annals of Biomedical Engineering* 11, 1-27
- [34] Albrektsson, T., Healing of bone grafts. In *Vivo studies of tissue reactions at autografting of bone in the rabbit tibia*, 1979. Ph D-thesis, Göteborg: Biomaterials Group, University of Göteborg.
- [35] Wennerberg, A. On surface roughness and implant incorporation, 1996. Ph D-thesis. Göteborg: Biomaterials/Handicap Research, Göteborg University.
- [36] Hansson, S.: The implant neck: smooth or provided with retention elements. A biomechanical approach. *Clin Oral Implants* 10 (5), 1999, 394-405

- [37] Wilke, H.-J., Claes, L., Steinemann, S.: The influence of various titanium surfaces on the interface shear strength between implants and bone. *Advances in Biomaterials* 9, 1990, 309-314.
- [38] Wennerberg, A., Ektessabi, A., Albrektsson, T., Johansson, C., Andersson, B.: A 1-Year follow-up of implants of differing surface roughness placed in Rabbit bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997; 12, 486-494.
- [39] Größner-Schreiber, B., Tuan, R.S.: Die Bedeutung der Oberfläche von Titanimplantaten im Osseointegrationsvorgang, 1991. *Dtsch Zahnärztl. Z* 46 691-693, 10.
- [40] Qu, J., Cheroudi, B., Brunette, D.M.: The use of micromachined surface to investigate the cell behavioural factors essential to osseointegration. *Oral Diseases* 2, 1996, 102-115
- [41] Ong, J.L., Prince, C.W., Lukas, L.C.: Cellular Response to well-characterized calcium phosphate coatings and titanium surface in vitro. *J Biomed Mater Res* Vol. 29, 1995. 165-172
- [42] Donath, K., Laaß, M., Günzl, H.-J.: The histopathology of different foreign-body reactions in oral soft tissue and bone tissue. *Virchows Arch. Abt. A* 420, 1992 a, 131-137.
- [43] Brunski, J.B.: Avoid pitfalls overloading and micromotions of intraosseous implants (interview). *Dental Implantol Update*, 4 (10), 1993, 77-81

- [44] Hashimoto, M., Akagawa, Y, Nikai, H., Tsuru, H.: Single Crystal sapphire endosseus implant loaded with functional stress: clinical and histological Evaluation of peri- implant tissues. *J Oral Rehab* 15, 1988, 65-76.
- [45] Deporter, D.a., Watson, P.A., Pilliar, R.M., Chipman, M.L., Valiquette, N.: A histological comparison in the dog of porous-coated vs threaded dental implants. *J Dent Res* 69, 1990; 1138-1145.
- [46] Corigliano, M., Quaranta, M., Scarano, A., Piatelli, A.: Bone reactions to early loaded plasma-sprayed Titanium implants. *IADR. J Dent Res* 74, 1995; Abstract 275.
- [47] Salama, H., Rose, L.F., Salama, M., Betts, N.J.: Immediate loading of bilaterally splinted titanium root-form implants in fixed prosthodontics - a technique reexamined: two case reports. *Int J of Periodontics & Restorative Dentistry*
- [48] Cahiapasco, M., Gatti C., Rossi, E., Haefliger, W., Markwalder, Th.: Implant-retained mandibular overdentures with immediate loading. *Clin Oral Impl Res* 8, 1997; 48-57.
- [49] Schnitman, P.A., Wöhrle, P.S., Rubenstein, J.E.: Immediate fixed interim protheses supported by two-stage threaded implants: Methodology and results. *The Journal of Oral Implantology* 16, 1990; 96-105.
- [50] Sowden D, Schmitz JP. AO self-drilling and self-tapping screws in rat calvarial bone: an ultrastructural study of the implant interface. *J Oral Maxillofac Surg* 2002; 60:294-299.
- [51] Akin-Nergiz N, Nergiz I, Schulz A, Arpak N, Niedermeier W. Reactions of periimplant tissues to continuous loading of osseointegrated implants. *Am J Orthodont and Dent Orthop* 1998; 114:292-298.

- [52] Jayaraman, M., Meyer, U., Bühner, M., Joos, U., Wiesmann, H.P.: Influence of Titanium Surface on attachment on osteoblast-like Zells in vitro, *Biomaterials* 25, 2004, 625-631.
- [53] Lavos-Valereto IC, Wolyneec S, Deboni MC, Konig B Jr. In vitro and in vivo biocompatibility testing of Ti-6Al-7Nb alloy with and without plasma-sprayed hydroxyapatite coating. *J Biomed Mater Res* 2001; 58:727-733.
- [54] Simmons CA, Valiquette N, Pilliar RM. Osseointegration of sintered porous-surfaced and plasma-spray coated implants: an animal model study of early post-implantation healing response and mechanical stability. *J Biomed Mater Res* 1999; 47:127-138.
- [55] Herman, R., Walther, P., Müller, M.: Immunogold-labeling in scanning Elektron microscopy. *Histochem Cell Biol* 1996; 106, 31-9.
- [56] Slot, J.W., Geuze, H.J. A new method of preparing Gold probes for multiple labelling cytochemistry. *Eur J Cell Biol* 1985; 38, 87-93.
- [57] Cheroudi, B., Mc Donnell, D., Brunette, D.M.: The Effekts of micromachined Surface on Formation of bonelike tissue on subcutaneous implants as assessed by radiography and Computer image processing. *J Biomed Mat Res* 1997; 34: 279-290.
- [58] Clark, P., Connolly, P., Curtis, A.S.G., Dow, J.A.T., Wilkinson, C.D.W.: Topographical control of Zell behaviour: II. Multiple grooved substrata, *Development* 108 [4], 1990; 653-644.

- [59] Qu, J., Cheroudi, B., Brunette, D.M.: The use of micromachined surfaces to investigate the cell behavioural factors essential to osseointegration. *Oral Dis* 1996; 2 (1), 102-15
- [60] Anselme, K., Bigerelle, M., Noel, B., Iost, A., Hardouin, P.: Effect of grooved Titanium substratum on human osteoblastic cell growth. *J Biomed Mater Res* 2002; 60 (4), 529- 40
- [61] Murai K, Takeshita F, Ayukawa Y, Kiyoshima T, Suetsugu T, Tanaka T. Light and electron microscopic studies of bone-titanium interface in the tibiae of young and mature rats. *J Biomed Mater Res* 1996; 30:523-533.
- [62] Futami T, Fujii N, Ohnishi H, Taguchi N, Kusakari H, Ohshima H, Maeda T. Tissue response to titanium implants in the rat maxilla: ultrastructural and histochemical observations of the bone-titanium interface. *J Periodontol* 2000; 71:287-298.
- [63] Röser K, Johansson CB, Donath K, Albrektsson T. A new approach to demonstrate cellular activity in bone formation adjacent to implants. *J Biomed Mater Res* 2000; 51:280-291.
- [64] Misch, C.E., Bidez, M.W., Sharawy, M.: A bioengineering implant for a pretermine bone cellular Response to loading Forces. A literature review and case report. *J Periodontal* 2001; 72: 1276- 1286.
- [65] Simmons C.A., Meguid, S.A., Pilliar R.M.: Mechanical Regulation of localized and appositional bone formation around bone- interfacing implants. *J Biomed Mater Res* 2001; 55: 63-71.

8. Abkürzungen

°C	Grad Celsius
d.h.	das heißt
dest.	destilliert
et al.	und andere
i.m.	intra muskulär
kg	Kilogramm
mg	Milligramm
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
ml	Milliliter
kV	Kilovolt
pH	Säure-/Basenwert
%	Prozent
®	eingetragene Marke
Nr.	Nummer
Tab.	Tabelle
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. U. Meyer danke ich für die Überlassung des Themas, für die Betreuung dieser Arbeit sowie für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten.

An dieser Stelle bedanke ich mich sehr herzlich bei den Mitarbeitern der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie (Direktor der Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. U. Joos) für die Unterstützung bei der vorliegenden Arbeit.

Für die sorgfältige Betreuung der Tiere möchte ich Prof. Dr. Richter, Dr. Lücke und den Mitarbeitern aus dem Tierstall danken.

Frau K. Cebulla, Institut für Anatomie, danke ich für die Hilfestellung bei der Aufbereitung der histologischen Präparate und bei der Anfertigung der Probenschnitte.
Prof. Dr. U. Stratmann danke ich für die Hilfestellung am Elektronenmikroskop.

Vielen Dank dem Koreferenten für die Begutachtung der Arbeit.

