

Aus der Klinik für Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie
(Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang)
im Universitätsklinikum Schleswig – Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**HISTOLOGISCHE EVALUATION DES
OSSEOINTEGRATIONSVERHALTENS
OBERFLÄCHENMODIFIZIERTER ZIRKONIUMDIOXIDKERAMIK-
UND TITANIMPLANTATE DURCH UVC-STRAHLUNG BEIM
ADULTEN HAUSSCHWEIN**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
ANNE GRUBE
aus Itzehoe

Kiel 2015

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Yahya Acil
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. Christof Dörfer
- Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2017
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 21.06.2017

gez. Prof. Dr. Johann Roeder
(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Widmung

Meiner Mutter, meinem verstorbenen Vater und meiner Schwester

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
2 Studienhintergründe	8
2.1 Implantateinheilung	8
2.1.1 Osteokonduktion	8
2.1.2 De-novo-Knochenbildung	8
2.1.3 Remodeling	9
2.2 Dentale Implantate	9
2.2.1 Titanimplantate	9
2.2.2 Zirkoniumdioxidimplantate	10
2.2.3 Implantate und Oberflächenmodifikationen	11
2.3 Zusammenfassung und Studienziele	13
Forschungsziele	14
3 Material und Methoden	15
3.1 Wahl der Versuchstierspezies	15
3.2 Tierhaltung- und Vorbereitung	16
3.3 Verwendete Implantattypen	17
3.4 Tierversuchsgenehmigung	18
3.5 Ablauf des operativen Eingriffs	18
3.5.1 Prämedikation, Narkose und andere Pharmaka	18
3.5.2 Implantation	19
3.6 Polychrome Fluoreszenzmarkierungen	22
3.7 Standzeiten/ Opferungsintervalle	23
3.8 Tötung und Entnahme der Knochenproben	24
3.9 Histologische Aufbereitung	24
3.9.1 Herstellung der Mikroradiographien	26
3.9.2 Fluoreszenzmikroskopie	26
3.9.3 Herstellung der Toluidinblaupräparate	27

3.10	Histomorphometrische Auswertung	27
3.11	Micro-CT	29
3.12	Statistik	31
4	Ergebnisse	32
4.1	Mikroradiographien	32
4.2	Fluoreszenzmikroskopie	33
4.3	Micro-CT	33
4.4	Vergleich der Ergebnisse aus Histologie und Micro-CT	34
4.5	Auswertung der Toluidinblau-Schnitte	36
4.5.1	Auswertungsstrategie	38
4.5.2	Prüfung auf Normalverteilung	38
4.5.3	Auswertung nach Opferungszeitpunkt	39
4.5.4	Auswertung nach Material	40
4.5.5	Auswertung nach Oberflächentypus	41
4.5.6	Auswertung von Material & Oberfläche	42
4.5.7	Auswertung unter Berücksichtigung der Standzeit	43
4.5.8	Varianzanalyse mit Berücksichtigung sämtlicher Variablen	45
5	Diskussion & Ausblick	46
6	Zusammenfassung	53
6.1	Schlussfolgerung	54
7	Literaturverzeichnis	55
8	Anhang	63
9	Danksagung	65
10	Lebenslauf	66

1 Einleitung

Der Wunsch der Menschheit nach vollständiger körperlicher Rehabilitation besteht schon seit jeher. Diesem Traum kommen wir nun Dank wissenschaftlichem und technischem Fortschritt auf vielen Gebieten der Medizin immer ein wenig näher. Im Fachbereich der Orthopädie werden Gelenkprothesen wie Knie- und Hüftgelenke seit Jahrzehnten routinemäßig eingesetzt (Grundeis 2006).

Auch aus der heutigen Zahnheilkunde ist der Ersatz verloren gegangener Zähne durch das Einbringen künstlicher Zahnwurzeln (Implantate) in den Kieferknochen nicht mehr wegzudenken. Als ein wichtiger Wegbereiter der modernen dentalen Implantologie ist Per-Ingvar Brånemark zu nennen. Der schwedische Anatomieprofessor und Orthopäde entdeckte im Jahre 1952 das Phänomen der Osseointegration und definierte den Begriff wie folgt:

„Als Osseointegration bezeichnet man den direkten funktionellen und strukturellen Verbund zwischen dem organisierten lebenden Knochengewebe und der Oberfläche eines belasteten Implantats.“ (Brånemark 1985)

Nach Grundlagenforschung über Gewebereaktionen und Materialstudien, die Titan eine hervorragende Biokompatibilität bestätigten, war Brånemark an der Entwicklung eines bis heute gängigen, über die Jahre nur geringfügig modifizierten Dentalimplantatsystems beteiligt (Brånemark 2005).

Auf die positiven Ergebnisse einer retrospektiven 15-Jahres-Studie (Adell et al. 1981) folgte die wissenschaftliche Anerkennung der implantatprothetischen Versorgung im Jahre 1982 durch die Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK). Dies führte zu einem stetigen Anstieg der Implantationen zum Zwecke des Zahnersatzes. Allein in Deutschland wurden laut Schätzungen der DGZMK im Jahr 2006 rund 600.000 Implantatinsertionen vorgenommen (Ritzert 2007), die Tendenz ist steigend.

Mittlerweile sind ca. 100 unterschiedliche Implantatsysteme in Deutschland auf dem Markt (Barfuß 2010). Mit einer Erfolgsrate zwischen 92% und 98% nach 8 Jahren für festsitzenden, bedingt abnehmbaren Zahnersatz ist die Langzeitprognose als vielversprechend zu bewerten (Neukam 2000). Es gibt für nahezu jede Knochen- und Weichgewebssituation ein passendes Implantat. Dabei unterscheiden sich die heutigen Implantate untereinander vor allem in Durchmesser, Länge und Oberflächenbeschaffenheit. Als Makrodesign hat sich weitestgehend das Schraubenimplantat durchgesetzt.

Um eine Implantatversorgung noch langlebiger und vorhersagbarer zu gestalten, konzentriert sich die derzeitige Forschung auf chemische und physikalische Mikromodifikationen der Implantatoberflächen, welche die Einheilung in den Knochen und anliegende Weichgewebe weiter verbessern sollen (Lee et al. 2009; Jeong et al. 2010). Hierdurch sollen Erkenntnisse gewonnen werden, mit denen eine weitere Optimierung des Einheilungsprozesses der Implantate in den Knochen (Osseointegration) sowie das Reduzieren unerwünschter Gewebereaktionen erzielt werden kann. Der klinische Erfolg eines Implantats ist dabei hauptsächlich von der frühen knöchernen Einheilung abhängig, was erwiesener Maßen auf die Gestaltung der Implantatgeometrie sowie dessen Oberflächentopographie (dazu zählen Oberflächenbeschaffenheit, Hydrophilie und Rauigkeit) zurück zu führen ist (Sykaras et al. 2000; Le Guehennec et al. 2007).

2 Studienhintergründe

2.1 Implantateinheilung

Um das Geschehen der frühen Implantateinheilung gezielt beeinflussen zu können, ist es zunächst wichtig, das Prinzip der Einheilung zu verstehen. Daher soll hier kurz darauf eingegangen werden:

Das Einheilen von Implantaten erfolgt nach den Grundprinzipien der knöchernen Frakturheilung und Regeneration. Nach Davies (2003) lassen sich die komplexen Vorgänge der Einheilung in drei Phasen einteilen:

1. Osteokonduktion
2. De-novo-Knochenbildung
3. Remodeling

2.1.1 Osteokonduktion

Durch das iatrogen verursachte Trauma der chirurgischen Implantation kommt es zu einer Einblutung in den Knochen. Nach initialem Blutkontakt heftet sich Fibrin im Rahmen der Blutgerinnung an die Implantatoberfläche an. Nach Thrombozytenaggregation bildet sich ein Blutpfropf. Das so entstandene Fibrin-Thrombozyten-Netzwerk dient nicht zuletzt wegen der Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren als Leitschiene für die folgende Einwanderung, Anlagerung und Differenzierung osteogener Zellen.

2.1.2 De-novo-Knochenbildung

Nach Organisation des Koagulums durch Einsprossung von Kapillaren und Differenzierung der osteogenen Zellen zu Knochenzellen (Osteoblasten), beginnt die Knochenneubildung an der Implantatoberfläche: zunächst werden zwei nicht-kollagene Proteine (Osteopontin und Knochen-Sialoprotein) sezerniert. Im folgenden Verlauf heften sich Kalziumphosphatkomplexe an, die weiter kristallisieren (Strietzel 2002). An die so entstandene Kristallstruktur lagern sich schließlich Kollagenfasern an. Durch Fortsetzung der Kalzifizierung entsteht zunächst ungeordneter Geflechtknochen.

2.1.3 Remodeling

In dieser letzten Phase der Osseointegration wird der Geflechtknochen zu geordnetem lamellärem Knochen umgebaut, was zu einem stabilen Verbund zwischen Knochen und Implantat führt.

Auf die Vorgänge in ihren Einzelheiten soll aufgrund ihrer Komplexität hier nicht eingegangen werden. Die oben genannte Übersicht dient lediglich als Orientierung und Veranschaulichung, um die Denkansätze zur Beeinflussung der Osseointegration auf zellulärer Ebene nachvollziehen zu können.

2.2 Dentale Implantate

2.2.1 Titanimplantate

Bislang galten dentale Implantate aus Titan im Hinblick auf Bioverträglichkeit und ankylotische Implantateinheilung in den Knochen (Osseointegration) als der Goldstandard (Martin et al. 1995; Langhoff et al. 2008). Jedoch haben sich ästhetische Einbußen vor allem beim Einsatz im gut sichtbaren anterioren Bereich von Ober- und Unterkiefer gezeigt. Durch ungenügendes Knochenangebot oder dünne Gingivastrukturen im Bereich der Implantatschulter kann es (oft erst nach einem gewissen Zeitraum nach Implantation) zum Durchsicherm gräulicher Titananteile kommen, was die Ästhetik stark negativ beeinflusst. Titan als Implantatmaterial hat aber nicht nur rein optische Nachteile gegenüber den weißen Zirkonoxidkeramikimplantaten. Ein weiterer Nachteil ist die höhere Plaqueanlagerung im Bereich des Zahnfleischsaumes (Scarano et al. 2004) und die damit verbundene Gefahr der Periimplantitis. Nach derzeitigem Stand der Wissenschaft stellt die Periimplantitis mit den Symptomen eines entzündlich bedingten Knochenabbaus einen wesentlichen Faktor für einen implantologischen Misserfolg, bis hin zum Implantatverlust, dar (Prathapachandran und Suresh 2012). Des Weiteren wurden in einer Studie von Schliephake et al. (1991) Titanpartikel im periimplantären Gewebe sowie in Organen wie Lunge und Leber im unmittelbaren Zusammenhang mit Implantationen von Titanschrauben gefunden. Dies wirft die Frage der Metallverträglichkeit im Organismus als Langzeitergebnis auf.

2.2.2 Zirkoniumdioxidimplantate

Für heutige Zirkoniumdioxidimplantate konnten bislang keinerlei toxische oder allergische Reaktionen nachgewiesen werden (Covacci et al. 1999; Uo et al. 2003; Scarano et al. 2003), die bei Metallunverträglichkeit im Zusammenhang mit Titanimplantaten möglich sind (Egusa et al. 2008; Sicilia et al. 2008). Die aufgezeigte optimale Biokompatibilität und Gewebeverträglichkeit führt hier zur verbesserten Zahnfleischanlagerung als bei Titan. Folglich wird bei Zirkoniumdioxidimplantaten eine gesteigerte Zahnfleischästhetik erreicht sowie das Eindringen der sich in der Mundhöhle befindlichen Bakterien in die alveolären Strukturen erschwert.

Keramikimplantate stellen somit theoretisch eine interessante Alternative zu Titanimplantaten dar, was sich auch schon in früheren Überlegungen und Studien zeigte:

Erstmals im Jahre 1971 dokumentierte Sandhaus positive Ergebnisse zu Keramikimplantaten. Weiterreichende Studien wurden dann von Schulte und Mitarbeitern mit dem aus Aluminiumoxid bestehenden „Tübinger Sofortimplantat“ aufgenommen (Schulte et al. 1976; Schulte et al. 1978).

Allerdings erwies sich das Material Aluminiumoxid zum damaligen Zeitpunkt in zahlreichen biomechanischen Tests als zu fraktur anfällig (Piconi und Maccauro 1999). Zirkoniumdioxidimplantate können nun als stabilere Nachfolger der Aluminiumoxidimplantate angesehen werden. Mit hohen Werten für die Biegefestigkeit von 900-1200 MPa und einer Vickers-Härte von 1200 sind die physikalischen Eigenschaften deutlich verbessert worden (Payer et al. 2010).

Dennoch weisen sie immer noch erhöhte Bruchgefahren gegenüber den Titanimplantaten auf (Aramouni et al. 2008) und zeigen zum Teil eine verzögerte Osseoadaptation (Wiltfang et al. 2009; Möller et al. 2012), die aber nicht in allen Studien nachgewiesen wurde. So konnten Arzt et al. (2009) eine hervorragende Osseointegration von Zirkoniumdioxidimplantaten konstatieren.

Zirkoniumdioxidimplantate sind heute eine mögliche Alternative bei Inkompatibilität und Abneigung einiger Patienten gegenüber Titan (Sicilia et al. 2008, Nilius et al. 2008). Beim Vergleich der Überlebensrate von Zirkoniumdioxid- und Titanimplantaten ist eine überwindbare Unterlegenheit von Zirkon dokumentiert (Lambrich und Iglhaut 2008). Hierzu sind aber bislang keine groß angelegten klinischen Langzeitstudien unternommen worden. Die Einheilung von Titan in den Knochen ist hingegen gut untersucht und dokumentiert.

2.2.3 Implantate und Oberflächenmodifikationen

Gegenwärtige Versuche konzentrieren sich nun vermehrt auf die Modifikation der Implantatoberflächen, um eine Optimierung der knöchernen Einheilung zu erreichen und den Heilungsprozess zu beschleunigen.

Veränderung der Oberflächenrauigkeit

In zahlreichen In-vitro-Studien konnte nachgewiesen werden, dass Implantate mit mikrostrukturellen, rauen Oberflächen bessere Einheilungstendenzen besitzen als Implantate mit glatten Oberflächen (Martin et al. 1995; Kieswetter et al. 1996; Lincks et al. 1998; Abrahamsson et al. 2004). Dies wird durch eine positive Beeinflussung der interzellulären Reaktionen in der frühen Phase der Knochenheilung erreicht. Mit Hilfe von Metaanalysen konnte diese Beobachtung bestätigt werden (Cochran 1999; Shalabi et al. 2006; Wennerberg und Albrektsson 2009). Implantate können nach ihrer Oberflächenrauigkeit (Sa-Wert) in 4 Gruppen eingeteilt werden (Wennerberg und Albrektsson 2009):

1. glatte Oberflächen ($Sa < 0,5 \mu\text{m}$)
2. geringfügig raue Oberflächen ($Sa = 0,5-1 \mu\text{m}$)
3. moderat raue Oberflächen ($Sa = 1-2 \mu\text{m}$)
4. raue Oberflächen ($Sa > 2 \mu\text{m}$)

Insgesamt zeigten Implantate mit moderat rauen Oberflächen eine stärkere Reaktion im umliegenden Knochengewebe und somit eine bessere Einheilungstendenz als raue Implantate (Albrektsson und Wennerberg 2004).

Verschiedene Strategien beim Herstellungsprozess führen zur gewünschten moderaten Oberflächenrauigkeit: Subtraktive Verfahren wie Sandstrahlen, Säureätzung oder eine Kombination aus beiden zeigten sich hierbei gegenüber den additiven Verfahren wie dem Titan-Plasmasprayverfahren überlegen. Es konnte hier ein geringerer Knochenverlust um das Implantat konstatiert werden (Dam et al. 2014). Daher gelten moderat raue SLA-Implantatoberflächen, die durch Sandstrahlen und anschließende Säureätzung erreicht werden, (SLA= Sandblasted with Large-grit and Acid-etched) als Standard-Referenz-Oberfläche in der Implantatforschung (Bornstein et al. 2008; Ferguson et al. 2008; Stadlinger et al. 2009).

Oberflächenbeschichtungen

Mit Hilfe von Oberflächenbeschichtungen können die umliegenden Strukturen im Gewebe des Implantatempfängers gezielt positiv beeinflusst werden, um eine schnellere und bessere Osseointegration zu erreichen. Die Möglichkeiten sind vielfältig:

Anorganische Beschichtungen mit Calciumphosphatverbindungen wie Hydroxylapatit oder Tricalciumphosphat, pharmazeutisch wirksame, antimikrobielle Überzüge und schließlich auch direkte bioaktive Beschichtungen, beispielsweise mit Kollagen oder Wachstumsfaktoren werden getestet (Albrektsson und Wennerberg 2005; Langhoff et al. 2008; Ferguson et al. 2008). Derartige Modifikationen konnten sich aber bisher aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse von In-vitro-Versuchen und Tierexperimenten nicht als Standard-Oberflächen durchsetzen (Ehrensberger 2013). Bislang fehlen zu dieser Gruppe der zukunftssträchtigen biologischen Oberflächenveränderung noch aussagekräftige klinische Studienergebnisse.

Physiko-chemische Maßnahmen an der Oberfläche

Die dritte gängige Art der Oberflächenveränderung zu Gunsten einer verbesserten Osseointegration stellen zusätzliche physiko-chemische Maßnahmen dar. Durch Modifikation der chemischen Eigenschaften kann z.B. die Benetzbarkeit (Hydrophilie) des Implantats verbessert werden, ohne die bewährte moderat raue Topographie zu verändern. Dadurch kann die Implantatoberfläche umfassender mit der Blut- und Gewebsflüssigkeit in Kontakt treten, was eine vereinfachte Zellanlagerung in der initialen Phase der Implantateinheilung zur Folge hat und somit möglicherweise zu einer schnelleren Einheilung führt (Stadlinger et al. 2009, Calvo-Guirado et al. 2010).

Einige derart zusätzlich konditionierte Implantate sind schon kommerziell erhältlich. Sie werden direkt nach dem Herstellungsprozess (Sandstrahlen, Säureätzung unter N₂-Atmosphäre) in isotonischer Natriumchloridlösung gelagert, um eine chemische Reaktion mit der Umgebungsluft zu verhindern (Bornstein et al. 2008).

Durch dieses Vorgehen wird die Implantatoberfläche polarisiert, sie wird hydrophil und damit reaktionsfreudiger. Allerdings dürfen die einzeln verpackten Implantate erst kurz vor dem Insertionsprozess aus der Lösung entnommen werden, damit die aufwendig hergestellte Hydrophilie erhalten bleibt. Bei zu langem Luftkontakt gehen die gewonnenen Eigenschaften schnell wieder verloren (Schlottig 2010).

Derselbe Effekt kann mit Hilfe einer schwach basischen Lösung, die direkt vor dem Einsetzen chairside auf das Implantat appliziert wird, erreicht werden. Durch die Konditionierung der bewährten Oberflächentopographie (sandgestrahlt, säuregeätzt) wird der energetische Zustand erhöht, man spricht hier auch von Superhydrophilie, welche sich in einer sehr guten Benetzbarkeit der Implantatoberfläche äußert (Tugulu et al. 2010).

Der Grad der Benetzbarkeit einer Oberfläche (seine Hydrophilie) kann mit Hilfe des Wasserkontaktwinkels gemessen werden. Dieser Winkel wird zwischen einer Festkörperoberfläche und der sie benetzenden Flüssigkeit bestimmt (Schwuger 1996). Hydrophile Oberflächen zeigen einen Wasserkontaktwinkel von maximal 90 Grad.

Bei superhydrophilen Oberflächen wird ein Wasserkontaktwinkel von weniger als 5 Grad beschrieben.

Eine weitere aktuelle Möglichkeit zur Steigerung der Hydrophilie ist die Bestrahlung mit ultraviolettem Licht des Typs C (Wellenlänge 250 nm). Vorangegangene In-vitro-Studien zu UVC-behandelten Titan- und Zirkoniumdioxidoberflächen zeigten eine gesteigerte Adsorption von Proteinen. Ausserdem kam es zu einer UV-Licht induzierten erhöhten Osteoblastenaffinität bzw. - Adhäsion sowie deren vermehrten Aktivität (Aita et al. 2009; Att et al. 2009a; Suzuki et al. 2009; Iwasa et al. 2010; Ueno et al. 2010). Damit war eine positive Beeinflussung der osteokonduktiven Kapazität von Titan- und Zirkonimplantaten durch vorangegangene UVC-Bestrahlung nachgewiesen. Die noch ausstehende Untersuchung auf den Effekt bezüglich der Osseointegrationseigenschaften bei Titan- und Zirkoniumdioxidimplantaten sollte hier erstmals im Tierversuch erbracht werden.

2.3 Zusammenfassung und Studienziele

Die vorliegende Tierversuchsstudie dient der Evaluation des Osseointegrationsverhaltens physiko-chemisch modifizierter keramischer Zirkoniumdioxidimplantate im Vergleich zu strukturell ähnlichen Titanimplantaten. Bei der Literaturrecherche zeigten sich keine vergleichbaren, existierenden Untersuchungen, die diese Fragestellung bereits gezielt untersucht hätten. Durch die beschriebenen theoretischen Vorteile für die Patientenversorgung mit einem UVC-behandelten Zirkoniumdioxidimplantatsystem ist eine hohe Relevanz und ein Praxisbezug dieser Untersuchung gegeben.

Das Forschungsdesign sah vor, einen Teil der Implantate (Testgruppe) einer UVC-Bestrahlung ad modum Att (Att et al. 2009b) auszusetzen, die zu einer hydrophilen und polarisierten Oberfläche führt (Ti+, Zr+). Zum Vergleich diente eine Kontrollgruppe, deren Implantatoberflächen unverändert blieben (Ti-, Zr-). Über einen tierexperimentellen Versuch am Hausschwein wurden dann die Auswirkungen der UVC-Bestrahlung von Titan- und Zirkoniumdioxidimplantatoberflächen auf deren Einheilung in den Knochen nach 6, 12 und 18 Wochen untersucht. Die Auswertung richtete ihr Hauptaugenmerk auf die histologische Evaluation des Knochen-Implantatkontakts BIC (bone implant contact).

Der BIC dient bei histologischen Fragestellungen als geeignetes Mittel zur Bestimmung der Osseointegration. Er beschreibt per definitionem die Grenzfläche, bei der Implantat und Knochen bei Betrachtung im Lichtmikroskop ohne bindegewebige Zwischenschicht direkt an einander liegen (Depprich et al. 2008; Jeong et al. 2010).

Neben der histologischen Hauptauswertung an Toluidinblauschnitten, die anschließend mit den Ergebnissen einer computertomographischen Messmethode verglichen wurde, kamen weitere gängige Verfahren zur Darstellung der zunehmenden Knochenmineralisation zum Einsatz:

Die Mikroradiographien stellten eine Übersicht der Implantate und deren Position im umgebenen Knochen her, wohingegen die Fluoreszenzhistologie eine geeignete Darstellungsmethode der dynamischen Umbauvorgänge im angrenzenden Knochenareal war.

Forschungsziele

Diese tierexperimentelle Studie hat folgende Forschungsziele:

- Untersuchung der abhängigen Variable Knochen-Implantat-Kontakt (BIC) im Zeitverlauf (6, 12, 18 Wochen nach Implantation) zur Evaluation von:

- a) Einfluss der UVC-Behandlung (UVC-belichtet vs. -unbelichtet)
- b) Einfluss des Implantatmaterials (Titan vs. Zirkon)
- c) Zusammenspiel von UVC-Behandlung und Material

- Vergleich der Ergebnisse unterschiedlicher Auswertungsmethoden (Micro-CT versus Histologie).

3 Material und Methoden

3.1 Wahl der Versuchstierspezies

Die vorliegende Studie wurde am weiblichen erwachsenen Hausschwein (lat. *Sus scrofa domestica*) als Implantatträger durchgeführt. Dabei lag das Alter bei > 18 Monaten, das Durchschnittsgewicht betrug 78,4 kg. In dieser Konstellation von Gewicht und Alter ist das Hausschwein aufgrund der Dimensionen ein geeignetes Modell zur Simulation menschlicher Operationen. Es wird wegen seiner menschenähnlichen Anatomie und Physiologie in der chirurgischen Lehre als verlässliches Medium für OP-Trainings eingesetzt (Kobayashi et al. 2012). Ein weiteres, wichtiges Argument zur Wahl dieser Spezies ist die Vergleichbarkeit des Knochenstoffwechsels des Schweins mit dem des Menschen, was eine hohe Übertragbarkeit der experimentellen Versuchsergebnisse auf den menschlichen Organismus erlaubt. Sowohl die Knochenneubildungsrate ($1,2-1,5 \mu\text{m}/\text{Tag}$ beim Schwein gegenüber $1-1,5 \mu\text{m}/\text{Tag}$ im menschlichen Knochen) (Laiblin und Jaeschke 1979) als auch Einheilvorgänge sowie Durchblutungs- und Zirkulationsparameter im Gewebe ähneln denen des Menschen (Heden und Sollevi 1989). Dieses Tiermodell zeigt humanäquivalente, osteologische Parameter (Hönig und Merten 1993), weshalb es als beliebtes Objekt für Implantatstudien dient (Wiltfang et al. 2009, Möst 2011; Seidl 2011).

Als Implantationsort wurde in der aktuell vorliegenden Studie die Tabula externa des Os frontale anstelle des maxillären oder mandibulären Bereichs verwendet (siehe Abbildung 1). Ein Grund für die Nutzung dieses Areals ist die durch die spongiöse Knochenstruktur desmalen Ursprungs vorliegende gleichmäßige Durchblutung des Gebiets, hervorgerufen durch ein Fehlen eines sogenannten Zentralgefäßes. Dadurch ist es möglich, die Implantateinheilung nur in Abhängigkeit von den knöchernen Lagerstrukturen zu betrachten. Ein weiterer Vorteil der Implantation am Os frontale gegenüber der Kieferregion ist die weitaus bessere Wundkontrolle und Vermeidung unerwünschter Belastungen der Implantate während der unkontrollierten Alimentation der Tiere.



Abbildung 1: Schweineschädel in frontaler Ansicht mit schematischer Darstellung der Implantatpositionen; (Zirkon: hell unterlegt, Titan grau unterlegt; unbelichtet: -, UV-belichtet: +)

3.2 Tierhaltung- und Vorbereitung

Die Versuchstiere wurden artgerecht im Schweinestall mit Strohunterlage bei 20 °C Raumtemperatur und einer Luftfeuchte von 60-70% gehalten. Sie erhielten zweimal täglich 250 g der diätischen Standard-Soft-Nahrung Altromin 9023[®], (Altromin International GmbH, Lage, Deutschland) und Wasser ad libitum. Unter Einhaltung eines 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus wurden die Ställe zweimal täglich gereinigt. Die Betreuung der Tiere erfolgte, neben dem für den Stall zuständigen täglichen Personal, zweimal wöchentlich durch einen Veterinärmediziner.

3.3 Verwendete Implantattypen

Alle verwendeten Implantate hatten eine Makrorauigkeit von unter $30\ \mu$ und ein Ausmaß von 5 mm Durchmesser x 10 mm Länge, das sich an der mittleren Dicke der Tabula externa des Schweine-Stirnbeins von 6-7 mm orientiert.

Die zu testenden konstruktiv identischen, zweiteiligen Zirkoniumdioxid- und Titanimplantate Easy Fast S und Easy Kon wurden von der Firma General Implants (GmbH, Villingen-Schwenningen, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

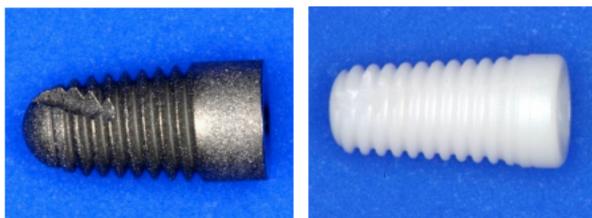


Abbildung 2: Titanimplantat Easy Fast S (links), Zirkonimplantat Easy Kon (rechts)

Es wurden grundsätzlich zwei verschiedene Implantatmerkmale untersucht und miteinander verglichen. Mit der Kontrollgruppe, bestehend aus Zirkoniumdioxid- und Titanimplantaten ohne zusätzliche Oberflächenbehandlung, sollte die Knocheneinheilung bzw. das Knochenanwachsverhalten der beiden Materialien, Titan gegenüber Zirkon, verglichen werden. Die Testgruppe bestand aus UVC-behandelten Implantaten. Diese wurden für eine Dauer von 48 Stunden mit einer 15 Watt starken bakteriziden Lampe (Toshiba, Tokyo, Japan) mit einer Intensität von ca. $0,05\ \text{mW}/\text{cm}^2$ ($\lambda = 360 \pm 20\ \text{nm}$) und $2\ \text{mW}/\text{cm}^2$ ($\lambda = 250 \pm 20\ \text{nm}$) nach der Methode von Att und Mitarbeitern (2009) bestrahlt.

Anschließend wurde überprüft, ob die UVC-Behandlung zu einer histologisch nachweisbaren Steigerung der Osseointegration führt.

Zu diesem Zweck wurden folgende vier Implantattypen im Split-Verfahren, d.h. im links-rechts-Vergleich untersucht:

- Titan UVC-belichtet (Ti+)
- Titan unbelichtet (Ti-)
- Zirkoniumdioxid UVC-belichtet (Zr+)
- Zirkoniumdioxid unbelichtet (Zr-)

Um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten, kamen bei jedem Tier alle Oberflächen- und Materialcharakteristika zum Einsatz.

3.4 Tierversuchsgenehmigung

Die Versuchsdurchführung erfolgte unter Aufsicht von Dr. E. Felszeghy am Institut für Rechtsmedizin der Semmelweis Universität Budapest im Tierstall Herceghalom. Die Studie wurde im Ministerium für Landwirtschaft und ländliche Entwicklung des Komitats Pest (Megyei Allategeszsegügyi es elelmiszer ellenörzö allomas) (Ministry of Agriculture and Rural Development) sowie durch die Animal Health and Food Control Station Budapest, Ungarn genehmigt und überwacht. Die Genehmigung trägt die Nummer 1053/eoh/2007.

3.5 Ablauf des operativen Eingriffs

3.5.1 Prämedikation, Narkose und andere Pharmaka

Bei insgesamt 9 Schweinen wurde nach intravenöser Gabe von 30 mg Ketamin HCl (Ketavets[®], Ratiopharm, Ulm, Deutschland) und Lokalanästhesie mit Articain HCl (Ultracain D-S forte[®], Hoechst GmbH, Frankfurt, Deutschland) die Implantation vorgenommen. Die Tiere erhielten durch eine präoperative intramuskuläre Injektion von 1,5 g Augmentan[®] (Amoxicillin + Clavulansäure) (GlaxoSmithKline Consumer Healthcare GmbH & Co. KG, München, Deutschland) eine perioperative Antibiose. Zum Schutz vor einer Corneaschädigung wurde den Tieren zusätzlich Augensalbe (Bepanthen[®], Bayer Vital GmbH, Leverkusen) appliziert. Nach Enthaarung des Operationsfeldes (Rasur und Enthaarungscreme) und Desinfektion mit der Polyvidon-Iod-Lösung Braunol[®] (Braun, Melsungen, Deutschland) wurden die Tiere durch Schaumstoffkissen in Bauchlage fixiert. Das Operationsgebiet wurde

mit einem Schlitztuch abgedeckt. Zur Schmerzkontrolle erfolgte unmittelbar postoperativ einmalig eine Analgesie durch intramuskuläre Injektion von 500 mg Metamizol (Novalgin[®], Hoechst AG, Bad Soden, Deutschland). Danach wurde dem Futter zweimal täglich ein Analgetikazusatz von je 50 mg Tramadol (Tramal[®], Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland) beigemischt.

3.5.2 Implantation

Nach sagittaler Schnittführung im Bereich der Stirn wurde das Os frontale präpariert. Das Periost wurde ebenfalls präpariert und für die Implantation zur Seite gedrängt. Danach wurde ca. 8 cm über dem Supraorbitalrand eine Bohrschablone angebracht, die temporär durch Minischrauben ossär fixiert wurde. Insgesamt wurden acht Implantate nach Studienprotokoll rechts und links untereinander inseriert. Mit dem von der Firma General-Implants (GmbH, Villingen-Schwenningen, Deutschland) bereit gestellten Implantations-Set wurden zunächst mit einem kleinen, wassergekühlten 2-mm-Spiralbohrer achsparallele Pilotbohrungen im Abstand von 10 mm vorgenommen. Dieser Abstand wurde eingehalten, um biologisch-knöchernen Interaktionen benachbarter Implantate auszuschließen. Nach Anlegen der Pilotbohrungen wurden in aufsteigender Reihenfolge die Bohrer mit den Durchmessern 3,5 mm und 4,2 mm zur weiteren Implantatbettauflbereitung bei 500 Umdrehungen pro Minute ohne Druckausübung verwendet. Mit dem konischen Bohrer der Länge 10 mm wurde die Ausschachtung der Bohrstollen abgeschlossen. Vor Implantatinsertion wurde mit dem Gewindeschneider die kortikale Lagerstruktur vorgeschritten, ohne dabei die Stirnhöhlenmukosa zu verletzen.



Abbildung 3: Bohrer des General-Implants-Sets

(von links nach rechts: Pilotbohrer, Vorbohrer, Konusbohrer, Gewindeschneider)

In die Bohrschächte der rechten Seite wurden bei allen Versuchstieren die jeweils UV-behandelten Implantate (Testgruppe) eingebracht, linksseitig hingegen die unbehandelten Varianten (Kontrollgruppe). Rechtsseitig okzipital beginnend wurden zwei UV-belichtete Zirkonimplantate (Zr+) untereinander in die Bohrlöcher inseriert. Rostralwärts, d. h. nach anterior, wurden jeweils zwei UV-behandelte Titanimplantate (Ti+) eingebracht. Kontralateral, also auf der linken Seite des Os frontale, wurde genau nach dem gleichen Protokoll verfahren, allerdings mit der Abweichung, dass hier nur Implantate ohne UV-Belichtung zum Einsatz kamen. Alle Implantate wurden mit einer geforderten Primärstabilität von 30 N/cm eingeschraubt.

Implantatposition (kranial nach caudal)	rechts	links
1	Zirkoniumdioxid UVC-belichtet (Zr+)	Zirkoniumdioxid unbelichtet (Zr-)
2	Zirkoniumdioxid UVC-belichtet (Zr+)	Zirkoniumdioxid unbelichtet (Zr-)
3	Titan UVC-belichtet (Ti+)	Titan unbelichtet (Ti-)
4	Titan UVC-belichtet (Ti+)	Titan unbelichtet (Ti-)

Tabelle 1: Implantations-Schema mit UVC-belichteten Implantaten (Titan / Zirkon)



Abbildung 4: OP-Ansicht der Schädelkalotte nach Implantatinsertion vor Nahtverschluss

Alle Implantate wurden niveauneutral, also auf Höhe der Knochenebene, mit einer Einheilkappe verschlossen. Abschließend erfolgte ein mehrschichtiger Wundverschluss. Zunächst wurden die Periost- und Muskelschichten spannungsfrei mit resorbierbaren Einzelknopfnähten fixiert (Vicryl 3.0[®], Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt, Deutschland). Der Hautverschluss erfolgte mit dem nicht-resorbierbaren Nahtmaterial Supramid[®] 2.0, (Resorba, Nürnberg, Deutschland). Die gesamte Operation wurde unter aseptischen Kautelen durchgeführt und mit anschließender Braunoltouchierung der Wundränder beendet.

3.6 Polychrome Fluoreszenzmarkierungen

Um die chronologische Dynamik der Implantateinheilung in Abhängigkeit von der Lagerdurchblutung und der Rekrutierung der Osteoblasten sichtbar und somit auch messbar zu machen, bediente man sich der Methode der polychromen Fluoreszenzmarkierung. Mit dieser Technik können der Osseointegrationszeitpunkt sowie Beginn und Ausmaß des Knochenumbaus (Remodeling) festgelegt werden. Jedem der an der Studie beteiligten Tiere wurden zu festgelegten Zeitpunkten verschiedene Fluorochromen intraperitoneal appliziert. Insgesamt erfolgten vier unterschiedliche Fluorochromen-Applikationen, deren zeitlicher Ablauf in Tabelle 2 dargestellt wird:

Fluorochromfarbstoff	Dosis	Injektionszeitpunkt
Calceingrün (1% in 2% NaHCO ₃ - Lösung)	5,0 ml/kg KG	2 Wochen post-operativ
Alizarinkomplexon (3% in 2% NaHCO ₃ - Lösung)	0,83 ml/kg KG	4 Wochen post-operativ
Xylenol orange (6% in 2% NaHCO ₃ -Lösung)	1,5 ml/kg KG	8 Wochen post-operativ
Doxycyclin (Ratiopharm GmbH, Ulm)	1,5 ml/kg KG	11 Wochen post-operativ

Tabelle 2: Zeitplan der intravitale Fluoreszenzmarkierung, die Farbstoffe wurden jeweils intraperitoneal injiziert (KG = Körpergewicht)

3.7 Standzeiten/ Opferungsintervalle

Für die Untersuchung wurden insgesamt 9 adulte Hausschweine benötigt, die zu unterschiedlichen Zeiten geopfert wurden. Die Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt. Jede Gruppe bestand somit aus jeweils drei Schweinen. Die Opferung der ersten Gruppe fand nach 6 Wochen statt. Nach 12 Wochen folgte die Opferung von Gruppe 2 und schließlich nach 18 Wochen Gruppe 3 (siehe Zeitstrahl in Abb. 5).

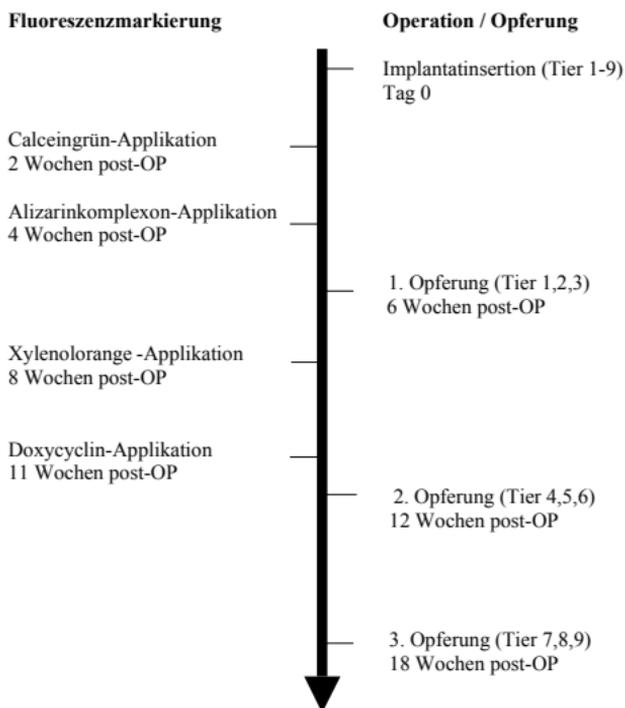


Abbildung 5: Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge der tierexperimentellen Studie

3.8 Tötung und Entnahme der Knochenproben

Nach dem operativen Eingriff zeigten alle Tiere ein normales Fressverhalten. Es konnten zu keiner Zeit Zeichen einer Infektion beobachtet werden, die Tiere gewannen während des Versuchs bis zu 10% an Körpermasse.

Nach Erreichen der entsprechenden Standzeiten wurden die Tiere nach initialer Sedierung mit einem Azaperone-Midazolam-Gemisch (Stresnil[®], Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland / Dormicum[®], Hoffman-La Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) (1mg/kg, i.m.) durch intravasale Injektion einer 20%igen Pentobarbitallösung (Dermocal AG, Buenos Aires, Argentinien) in die Ohrvene geopfert. Der Tod erfolgte durch Eintreten des Herzstillstandes.

Im Anschluss wurden die fronto-orbitalen Schädelanteile mit dem anheftenden weichen Gewebe von den Restkörpern reseziert. Mit einer Bandsäge (Exakt Gerätebau, Norderstedt, Deutschland) wurden die Knochenblöcke unter radiologischer Kontrolle zersägt und zum Fixieren in Formalin (10%) gelagert.

3.9 Histologische Aufbereitung

Zur Herstellung der histologischen Schnitte wurden die Proben exakt median in zwei Hälften gesägt, so dass die Implantate mit dem umgebenen Knochen genau in der Längsachse mit größtmöglichem Durchmesser zu sehen waren.

Die Präparate wurden schließlich als unentkalkte Hartschliffe, angelehnt an das Trenn-Dünnschliff-Verfahren nach Donath und Breuner (Donath und Breuner 1982) weiter bearbeitet.

Dazu wurden die Knochen-Implantat-Quader in einen Einbettautomaten (PSI Pool of Scientific Instruments, Ltd., Basel, Schweiz) gegeben. Dieser übernahm in vollständig automatisierter Form die notwendige Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe und die Entfettung mit Hilfe von Aceton. Die Funktion sei hier kurz dargestellt:

Die jeweils zu verarbeitende Probe befand sich an einem Hebearm und konnte so nacheinander in 12 kreisförmig angeordnete Gefäße getaucht werden. Die durch die Programmierung festgelegten Einwirkzeiten in dem jeweiligen flüssigkeitsgefüllten Gefäß sicherten eine einwandfreie Technik (Tabelle 3).

Gefäß Nr.	Flüssigkeit	Konzentration	Stunden
1	Ethanol	60 %	2
2	Ethanol	80 %	2
3	Ethanol	90 %	4
4	Ethanol	96 %	5
5	Ethanol	100 %	4
6	Aceton-Ethanol	1:1	1
7	Aceton-Ethanol	1:1	4
8	Ethanol	100 %	1
9	Ethanol	100 %	4
10	Ethanol	100 %	3
11	Methylmethacrylat	-	12
12	Einbettungsgemisch	-	3-5 Tage im Kühlschrank lagern

Table 3: Arbeitsweise des Einbettautomaten: Flüssigkeiten mit deren Konzentrationen und Einwirkdauer, welche die Proben in genannter Reihenfolge durchlaufen

Danach wurden die Blöcke nun mit dem Methacrylat- Einbettgemisch (Zusammensetzung siehe Anhang) im Wärmebad (Köttermann GmbH u. Co KG, Uetze / Hänigsen, Deutschland) auspolymerisiert. Danach wurden sie zunächst an der Tischbandsäge (Metabowerke GmbH, Nürtingen, Deutschland) zugeschnitten. Mittels Trimmer wurde anschließend eine Fläche parallel zur oben beschriebenen Implantatachse mit maximal erhaltener Knochenstrecke ausgerichtet und poliert. Der so entstandene Probenblock wurde mit schnell aushärtendem Kleber (Henkel Loctite Adhesives Ltd., Watchmead) auf eine dünne, selbstklebende Folie aufgebracht (Gudy® clear, Neschen AG, Bückeberg, Deutschland), die zuvor auf einen Objektträger geklebt wurde.

Danach wurde mit Hilfe einer Computer gesteuerten Pendel-Diamant-Bandsäge (Exakt, Norderstedt) eine 200 μm dicke Scheibe aus dem Block herausgelöst, die das Implantat mittig in Längsrichtung angeschliffen enthielt. Diese Scheibe wurde dann auf einem Computer gesteuerten Tellerschleifgerät (Exakt, Norderstedt) mit Schleifpapierscheiben absteigender Körnung bis auf eine Dicke von ca. 80-100 μm plangeschliffen und schließlich mit Schleifpapier in Feinstkörnung 2000 geglättet bzw. poliert.

3.9.1 Herstellung der Mikroradiographien

Zur Herstellung der Mikroradiographien wurden die Folien mit den Knochen-Implantat-Proben auf besonderen Mikroradiographieplatten (Hochauflösungsplatten, Kodak, New York, USA) befestigt. Die Objekte wurden pro 10 μm Dicke einer Minute Strahlenexposition bei einer Stromstärke von 3 mA und einer Spannung von 25 kV im Röntgengerät (Faxitron, Hewlett Packard, Ore, USA) ausgesetzt. Der Fokusabstand betrug 16 cm. Die Entwicklung der Radiographien erfolgte mit einer Entwicklerlösung (mit Wasser verdünntes Perimat-Entwicklerkonzentrat 1:9) für fünf Minuten und anschließendem Eintauchen in das Fixierungsbad (verdünntes Kodak-Fixierkonzentrat 1:4) für zehn Minuten.

3.9.2 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Präparate mittels lichtpolimerisierendem Kleber (Technovit Präzisionskleber, Fa. Kulzer) auf Objektträgern fixiert und ein weiteres Mal bis auf 40 μm ausgedünnt.

Die fluoreszenzmikroskopische Methode bedient sich der Tatsache, dass vier zu unterschiedlichen Zeitpunkten intravital zugeführte Fluorochromen nach Einlagerung in den Knochen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Microphot-FXA, Nikon) in verschiedenen Farben imponieren. Dabei kommt es zur Fluoreszenz derjenigen Geweberegionen, die zu dem Zeitpunkt der intravitales Fluoreszenzmarkierung verkalkt sind (Rahn und Perren 1971). Im Gegensatz zu den statischen histologischen Verfahren werden durch die polychrome Fluoreszenzmarkierung der zeitliche und örtliche Verlauf von knöchernen Umbauprozessen histologisch visualisiert. Die applizierten Farbstoffe lagern sich in die Mineralisationsfront des neu entstandenen Knochens ein, indem sie durch Bindung an bivalente Calciumionen Komplexe bilden (Urist und Ibsen 1963; Rahn und Perren 1971; Rahn 2003). Durch den

Einsatz einer speziellen Lichtquelle sowie eines auf die Fluorochromen abgestimmten Filtersystems mit Erreger- und Sperrfilter am Fluoreszenzmikroskop wird nur das längerwellige Fluoreszenzlicht zum Betrachter hindurch gelassen. Auf diese Weise zeigt Calceingrün eine deutlich grüne Färbung, Alizarinkomplexon eine Rotfärbung, Xylenolorange erscheint braun und Doxycyclin gelb.

3.9.3 Herstellung der Toluidinblaupräparate

Die Färbung der histologischen Schnitte erfolgte mit dem basischen Thiazinfarbstoff Toluidinblau nach einer modifizierten Methode nach Romeis (Romeis et al. 1989).

Für die Herstellung der Toluidinblauschnitte wurden die Präparate weiter bis zu einer Dicke von 20 µm heruntergeschliffen. Die Toluidinblaufärbung erfolgte nach folgendem Schema: Zunächst wurden die Schnitte für 2-4 Minuten mit 0,1% Ameisensäure vorbehandelt, um die Schnittoberfläche zu entkalken und eine verbesserte Anfärbbarkeit zu erzielen. Danach erfolgte die Spülung mit destilliertem Wasser. Im zweiten Schritt ließ man für 60 bis 120 Minuten 20%iges Methanol einwirken, worauf wieder die Spülung mit destilliertem Wasser anschloss. Zum Schluss wurde die eigentliche Färbung für 3 Minuten in Toluidinblaulösung (1g Toluidinblau und 1g Natriumtetraborat in 100 ml aqua dest.) vollzogen. Die überschüssige Farbe wurde mit destilliertem Wasser abgespült.

3.10 Histomorphometrische Auswertung

Die histologischen Toluidinblau-Präparate wurden mit einem Lichtmikroskop (Nikon® Microphot-FXA, Nikon Corporation, Tokyo, Japan) bei 6-facher Vergrößerung betrachtet. Für die Bearbeitung und Analyse auf dem Computer wurden die Präparate zunächst in Ausschnitten mit einer integrierten Digitalkamera abfotografiert (Axio Cam MRc5, Zeiss® AG, Oberkochen, Deutschland) und mit einem verbundenen Bildbearbeitungsprogramm (AxioVision Rel 4.6) gespeichert. Pro Präparat wurden ca. 24 bis 48 sich überlappende Teilbilder aufgenommen und anschließend mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms Image Composition Editor (ICE - Microsoft® Research, Redmond, USA, V1.4.4) verlustfrei und ohne weitere Bildmanipulationen zu je einem Übersichtsbild pro histologischem Präparat zusammengefügt.

Zum Bestimmen des BIC (Bone implant contact) im Bereich der Windungen wurde mit dem auf die wissenschaftliche Bildanalyse ausgerichteten Programm ImageJ (National Institute of Health USA, Bethesda, Maryland, USA, V1.46d) der Implantat-Knochen-Kontakt ausgewertet. Hierzu wurden zunächst in geeigneter Vergrößerung alle Abschnitte eines Präparats markiert und ausgemessen, an denen durch ausreichendes Knochenangebot der umgebenden Areale die Voraussetzung für eine Einheilung gegeben war (Regions Of Interest – ROI). Im nächsten Schritt wurden sämtliche Abschnitte eines Implantats in der ROI, an denen sich tatsächlich ein Knochen-Implantat-Kontakt (BIC) zeigte, addiert (siehe Abbildung 6) und in Relation zur Gesamtlänge der ROI gesetzt. Somit konnten die prozentualen Anteile der Implantatoberfläche, die stabil knöchern eingehilt waren, exakt dokumentiert und berechnet werden.

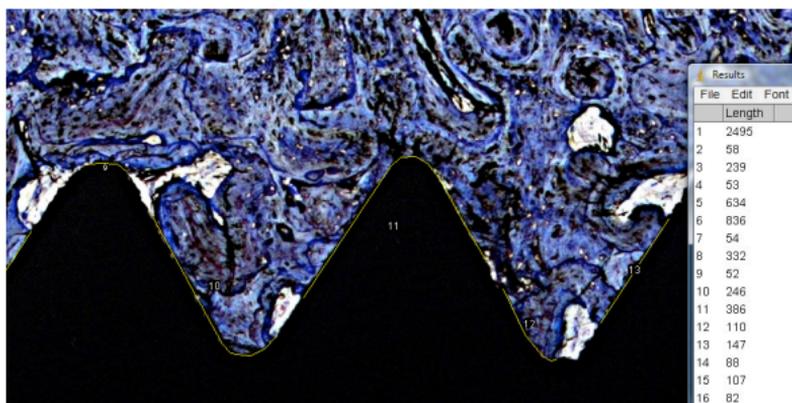


Abbildung 6: Bildausschnitt mit der beispielhaften Ausmessung der BIC-Anteile in ImageJ

3.11 Micro-CT

Die Anfertigung und Analyse der Micro-CT-Daten fand im kooperierenden Zentrum für bildgebende Molekularforschung, dem Molecular Imaging North Competence Center (MOIN CC) in Kiel, (Direktor Professor Dr. C.C. Glüer) statt.

Es wurden 34 Knochen-Titanimplantat-Proben mit dem hochauflösenden Microcomputertomographen Scanco vivaCT40 (SCANCO Medical AG, Brüttisellen, Schweiz), ausgestattet mit einer Microfocus-Röntgenquelle (70 kV, 114 μ A), eingescannt. Die Zirkonimplantate konnten aufgrund ihrer starken Radioopazität nicht in die Micro-CT-Auswertung mit einfließen. Von den Titanimplantaten wurden mehrere 2D-Projektionen als virtuell zusammenhängendes 3D-Bild gespeichert. Auf diese Weise ist es möglich, mit Hilfe eines Micro-CTs ohne Destruktion des Objekts und mit weitaus geringerer Vorarbeit (Herstellung der histologischen Schnitte über mehrere Tage entfällt) eine Knochenprobe dreidimensional zu analysieren.

Für jedes Implantat wurden im 3D-Modus am PC mit der Herstellersoftware Image Processing Language (V5.15) zwei interessante Auswertungsareale in zylindrischer Geometrie (Ring 1 & 2) in Anlehnung an die Analyse von Ferguson et al. (2008) festgelegt. Für die vorliegende Studie galt es, den für die Knochendichte maßgeblichen Faktor BV/TV zu bestimmen. Dieser Quotient gibt an, in welchem Verhältnis das Knochenvolumen (BV) zum Gesamtvolumen (TV) der Probe (VOI) steht. Damit konnte dann in geeignetem Abstand zum Implantat der knöcherne Inhalt eines ringförmigen bzw. zylindrischen Areals um das Implantat berechnet werden, welches somit dem BIC gleich zu setzen war.

Die zylindrischen Volumes of Interest (VOI) beinhalteten konstant 200 Voxel-Schichten auf der Z-Achse, d.h. auf der Längsachse des Implantats. Dies entsprach in etwa den oberen 2 mm der Implantatwindungen ab Implantatschulter. Die isotropische Voxelgröße entsprach hier 10,5 μ m. Für die Unterscheidung von Weichgewebe, Knochengewebe und Titanoberfläche wurden Dichte-Schwellenwerte von 240 und 7864 (Thresholds) in der Programmierung festgelegt, die statistisch für die eindeutige Zuordnung der Dichtewerte zu einem Material sorgten. Dieser Wert entsprach für Titan einem Schwellenwert von 78,64% auf der Graustufenskala, Knochen erhielt einen Wert von 24%, 100% wurden als maximaler Graustufenwert festgelegt.

Auf diese Weise wurden zwei Areale auf das Knochenangebot in Implantatumgebung hin untersucht. Ring I (innerer Ring), analysierte in den Voxel-Schichten 3 bis 6 den Knochen in unmittelbarer Nachbarschaft zum Implantat (Implantat-Knochen-Grenze), wohingegen Ring

II (äußerer Ring), mit etwas weiterer Entfernung von der Implantatoberfläche die Schichten 7 bis 20 darstellte. Durch diese Festlegung erhielt man je einen Zylinder, der innen der Form der Implantatoberfläche mit ihren Windungen entsprach. Die Wanddicke von Ring I entsprach hierbei $42\ \mu\text{m}$, die exakte Länge war $2,1\ \text{mm}$. Die Wanddicke von Ring II entsprach demnach $147\ \mu\text{m}$.

Der Grund für das Auslassen der Schichten 1 und 2, die direkt an die Titanimplantatoberfläche angrenzten, ist der sogenannte GLOW-Artefakt, ein Streueffekt, der durch das Auftreffen und Reflektieren der Röntgenstrahlung auf die Titanoberfläche entsteht. Diese Art von Artefakt wurde zuvor schon von Butz und Mitarbeitern (2006) beschrieben. Um diese Artefakte, die bisweilen knochenähnliche Dichtewerte erzeugen, nicht fälschlicherweise als Knochen auszuwerten, wurden die Areale der ersten beiden Schichten nicht in die Berechnung einbezogen.

Vorangestellt an die Micro-CT-Auswertung erfolgte eine visuelle Beurteilung der festgelegten VOIs am PC. Durch das Aussortieren von Präparaten, die aufgrund einer zu engen Schnittführung an den Rändern der Knochenproben nicht genügend Informationen lieferten, fand eine Selektion statt.

Diejenigen CT-Scans, die sich von vornherein visuell als unzureichend knöchern begrenzt zeigten, wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. So reduzierte sich die Anzahl der CT-Auswertungen auf 26.

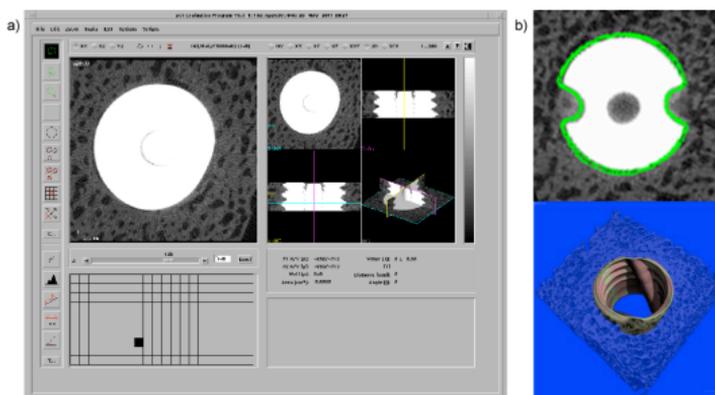


Abbildung 7: Micro-CT mit a) Maske b) 3D-Analyse. Die oberen 2 mm der Implantatwindungen wurden ausgewertet. Die isotropische Voxel-Größe entspricht $10,5\ \mu\text{m}$.

3.12 Statistik

Die statistische Analyse der gewonnenen Daten wurde mit SPSS 14.0 für Windows (IBM Software, New York, USA) durchgeführt. Hauptaugenmerk lag dabei auf der Auswertung des Einflusses der experimentellen Faktoren UV-Behandlung und Material auf die abhängige Variable des Knochen-Implantat-Kontakts (BIC). Zudem gingen die Standzeiten der Tiere zur Kontrolle von Effekten im Zeitverlauf in die Untersuchung ein. Ab einem Wertenniveau von $p < .05$ wurden die Gruppenunterschiede als statistisch signifikant gewertet (vgl. Bortz 1999).

4 Ergebnisse

Eingangs wurden 72 Implantate (je 36 aus Titan und Zirkoniumdioxid) inseriert, pro Versuchstier 8. Im Links-Rechts-Studiendesign wurden links- und rechtsseitig in die Tabula externa je 4 Implantate untereinander primärstabil eingedreht (siehe Ablauf des operativen Eingriffs). Nach histologischer Aufbereitung wurden die angefertigten Bilder auf ihre Verwertbarkeit hin geprüft. Aussortiert wurden die rein oder vornehmlich bindegewebig eingehielten Implantate (keine Osseointegration möglich) sowie Schnitte, die bei der Anfertigung der Präparate beschädigt worden waren. Es standen schließlich 50 Implantate für die eingehende Auswertung zur Verfügung.

4.1 Mikroradiographien

Mikroradiographien wurden angefertigt, um einen Überblick über die Proben zu ermöglichen. Zudem erlauben sie eine qualitative Beurteilung der knöchernen Einheilung, da durch das Röntgen der Mineralisationsgrad des umgebenden Knochens gut sichtbar wird.

Abbildung 8 zeigt, dass bereits nach 6 Wochen Einheilzeit ein direkter Knochen-Implantatkontakt (BIC) beobachtet werden kann.



Abbildung 8: Mikroradiographie eines Titanimplantats nach einer Standzeit von 6 Wochen

4.2 Fluoreszenzmikroskopie

Abbildung 9 zeigt beispielhaft die Osseointegrationsmerkmale, die durch Fluoreszenzmarkierungen visualisiert werden können:

Schon nach 2 Wochen (grüne Banden) und 4 Wochen (rote Banden) zeigten sich erste Knochenanlagerungen an der Implantatoberfläche. Die Unterbrechungen der Farbbanden sind hierbei Anzeichen der dynamischen Knochen-Umbauprozesse (Remodeling).

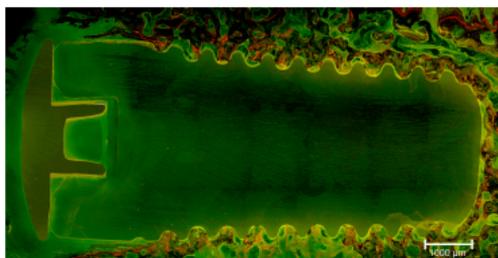


Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopie eines Zirkoniumdioxidimplantats nach einer Standzeit von 12 Wochen

4.3 Micro-CT

Die durchgeführten Tests und Analysen des Micro-CT ergeben für den ersten Auswertungsbereich (innerer Ring) einen Wert von $Ti+= 76,0\%$ (belichtete Titanimplantate) und $Ti-= 74,4\%$ (unbehandelte Titanimplantate). Der zweite Auswertungsbereich (äußerer Ring) zeigt ähnliche Ergebnisse wie der vorhergehende Bereich mit Werten von $Ti+=Ti-= 73,4\%$.

4.4 Vergleich der Ergebnisse aus Histologie und Micro-CT

Beim Vergleich der Ergebnisse des BIC von Titanimplantaten nach histomorphometrischer Auswertung und Micro-CT-Analyse (Abb. 10) fällt auf, dass der per Computer-Scan ermittelte Wert des inneren Rings mit 76,0% (Ti+) und 74,4% (Ti-) höhere Zahlen aufweist, als der Wert des äußeren Rings mit 73,4% (Ti+ und Ti-) und die histologisch ermittelten BICs von 49,6% (Ti+) und 50,3% (Ti-).

Die Unterschiede zwischen den histologisch gemessenen BICs gegenüber den beiden Micro-CT-Gruppen ist hochsignifikant niedriger im T-Test (jeweils $p < .01$).

Auch wenn die Messwerte des inneren Rings mit einem Mittelwert von 76,0% etwas höher als die des äußeren Rings ausfallen, ist dieser Unterschied innerhalb der Micro-CT-Scans nicht signifikant ($p = .20$).

Analyse- verfahren	BIC (in %)	
	Ti+	Ti-
Histologie	49,6	50,3
	n=14, SD 20,2	n=13, SD 17,1
Innerer Ring CT	76,0	74,4
	n=14, SD 13,6	n=12, SD 15,1
Äußerer Ring CT	73,4	73,4
	n=14, SD 15,7	n=12, 19,7

Tabelle 4: Mittelwerte des Knochen-Implantat-Kontakts (BIC) in Prozent mit Anzahl (n) und Standardabweichung (SD) nach Art des Analyseverfahrens

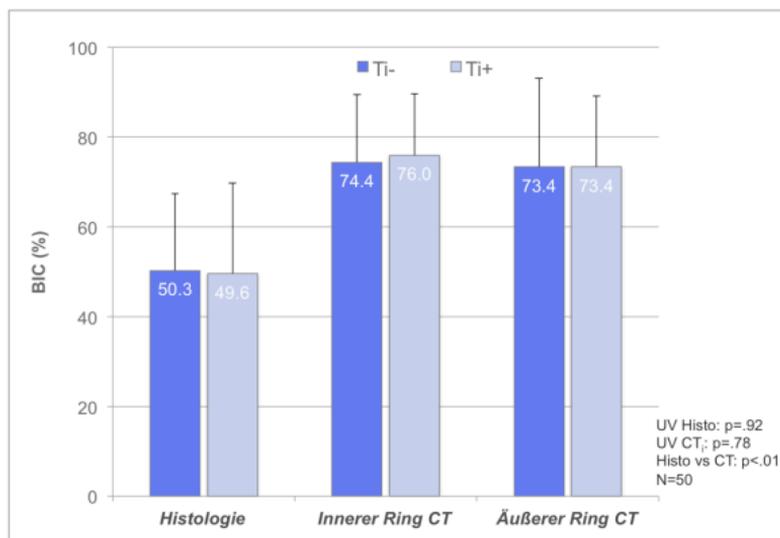


Abbildung 10: BIC-Vergleich nach Auswertungsmethode

In Bezug auf die UVC-Applikation zeigen sich folgende Ergebnisse: Der Histo-BIC der behandelten Titanimplantate liegt bei 49,6%, die nicht UV-behandelten Titanimplantate haben einen leicht erhöhten BIC-Wert von 50,3%. Statistisch kann für diese geringe Abweichung keine Signifikanz belegt werden ($p = .92$)

Die Micro-CT-Daten weisen zum Teil gesteigerte Osseointegrationsraten der UVC-konditionierten Titanimplantate (Ti+) zur unbehandelten Kontrollgruppe (Ti-) auf. Beim inneren Ring liegt sie mit 76,0% um 1,6 Prozentpunkte höher, jedoch ist diese Tendenz nicht signifikant ($p = .78$). Beim äußeren Ring liegt der BIC in beiden Gruppen bei 73,4%.

Insofern zeigt sich für Titanimplantate kein einheitliches Bild für den Nutzen der UV-Behandlung. Statistisch zumindest lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Knochenangebot der belichteten und unbelichteten Titanimplantate erkennen.

Im nächsten Abschnitt soll diese Variable durch die Hinzunahme der Zirkonimplantate und die Kontrolle der Standzeiten eingehender untersucht werden.

4.5 Auswertung der Toluidinblau-Schnitte

Insgesamt konnten 50 Implantate in die histomorphometrische Auswertung einfließen, darunter 27 aus Titan und 23 aus Zirkonoxid. Die Verteilung der Oberflächencharakteristik UV-belichtet und -unbehandelt war ausgeglichen mit je 25 Präparaten vertreten. In allen Kombinationen aus Material und UV-Behandlung war eine zweistellige Fallzahl in den Untergruppen gegeben (min. 11, max. 14 Messwerte).

Bei der Betrachtung unter dem Lichtmikroskop stellen sich Hartgewebestrukturen blassblau bis ungefärbt dar. Alle unmineralisierten Komponenten wie Zellkerne, Zellen, Kittlinien, Kollagenfasern und Osteoidsäume imponieren in unterschiedlichen Blaunancen. Nach den verschiedenen Standzeiten ist ein ähnlicher Knochen-Implantat-Kontakt bei den Zirkoniumdioxidimplantaten und Titanimplantaten zu erkennen (Abb. 11). An beiden Implantatoberflächen haben sich Knochen und Osteoid in engem Kontakt zum Implantat ausgebildet.

Besonderes Interesse bei ihrer histomorphometrische Auswertung galt der Knochen-Implantat-Kontaktrate (BIC= bone implant contact rate).

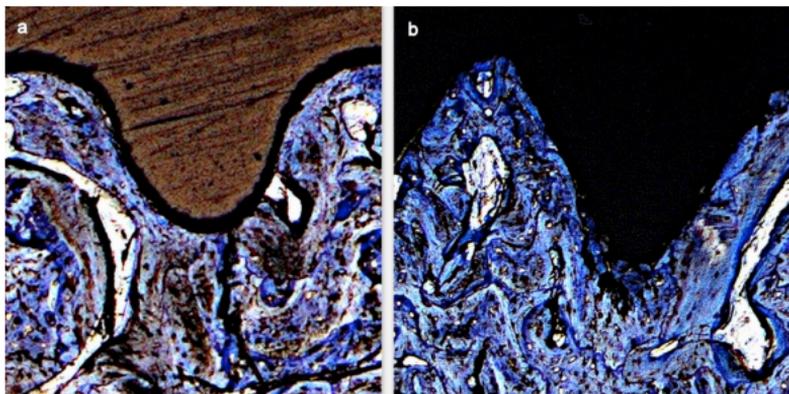


Abbildung 11: Teilausschnitt der mikroskopischen Aufnahmen
a) Zirkonimplantat; b) Titanimplantat



Abbildung 12: Toluidinblauschnitte von Zirkonimplantaten mit Oberflächenmodifikation (UVC-Bestrahlung) = Zr+ und ohne = Zr- nach einem Beobachtungszeitraum von 6 und 18 Wochen. unentkalkte Hartschliffe, Toluidinblau



Abbildung 13: Toluidinblauschnitte von Titanimplantaten mit Oberflächenmodifikation (UVC-Bestrahlung) = Ti+ und ohne = Ti- nach einem Beobachtungszeitraum von 6 und 18 Wochen. unentkalkte Hartschliffe, Toluidinblau

4.5.1 Auswertungsstrategie

Im Fokus lag die Auswertung des Knochen-Implantat-Kontakts (BIC) in Abhängigkeit zur Variable UV-Behandlung. Zunächst sollten jedoch die Kontrollvariablen Standzeit und Material untersucht werden. Nach der separaten Betrachtung der Gruppen erfolgte eine kombinierte Analyse aller beteiligten experimentellen Faktoren in einem Gesamtmodell, um diese auf etwaige Abhängigkeiten und Kombinationseffekte zu prüfen.

4.5.2 Prüfung auf Normalverteilung

Da es sich um recht geringe Stichprobengrößen handelt, wurde eine Prüfung auf Normalverteilung durchgeführt. Der Kolmogorov-Smirnov-Test unterstellt die Nullhypothese, dass die Daten der Variable normalverteilt seien (vergl. Bortz 1999).

Mit einem Wert von $p = .70$ lag dieser deutlich über dem Signifikanzniveau, so dass die Arbeitshypothese einer Normalverteilung nicht verworfen werden konnte.

Daher konnte zur Prüfung der Gruppenunterschiede auf parametrische Verfahren mit einer höheren Testgüte zurückgegriffen werden.

Abhängige Variable war stets der BIC-Wert in Prozent. Für einfache Mittelwertvergleiche kam der T-Test für unabhängige Stichproben zum Einsatz. Bei gleichzeitiger Betrachtung der unabhängigen Variablen wurde eine mehrfaktorielle Varianzanalyse gerechnet.

4.5.3 Auswertung nach Opferungszeitpunkt

Aus den Opferungszeitpunkten ergaben sich drei Gruppen mit unterschiedlich langen Einheilzeiten (Abbildung 14). Der BIC zeigt nach 6 Wochen bereits einen Mittelwert von 39,5%, stagniert dann aber bis zur Standzeit von 12 Wochen (BIC = 39,2%).

Erst beim dritten Opferungsintervall nach 18 Wochen ist eine deutliche Zunahme des Knochen-Implantatkontakts zu erkennen (BIC = 47,2%).

Im Pool aller Implantattypen deutet sich die verbesserte Osseointegration also erst nach längerer Zeit an. Die Varianzanalyse weist die Gruppenunterschiede jedoch als nicht signifikant aus ($p = .45$).

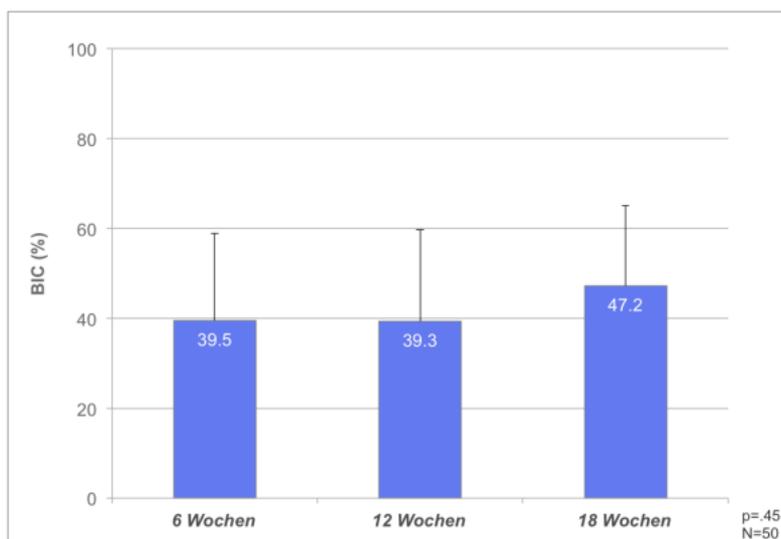


Abbildung 14: BIC-Vergleich nach Standzeit

4.5.4 Auswertung nach Material

Der BIC-Mittelwert der Titanimplantate weist mit 49,9% gegenüber einem BIC von 31,8% bei Zirkoniumdioxid einen um mehr als 50% höheren Osseointegrationserfolg auf (Abbildung 15). Dieser Unterschied ist hochsignifikant ($p < .01$) und lässt Titan als das überlegene Material erscheinen.

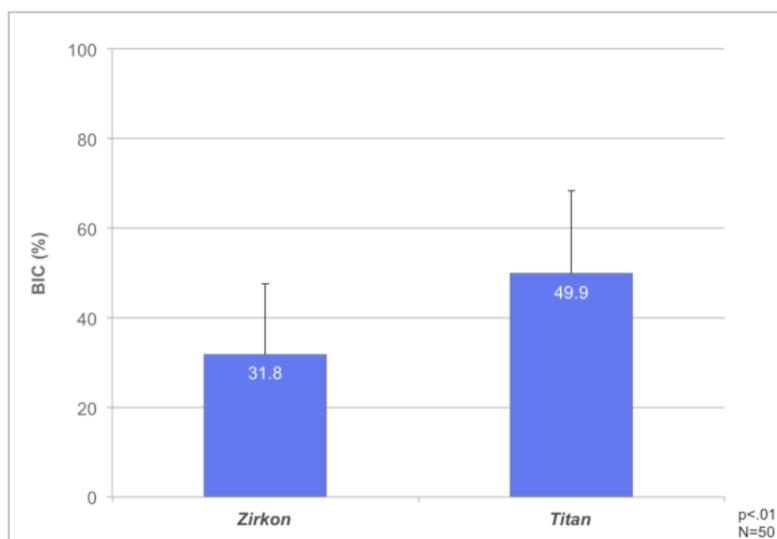


Abbildung 15: BIC-Vergleich nach Material

4.5.5 Auswertung nach Oberflächentypus

Demgegenüber zeigt sich beim Vergleich nach Oberflächenbehandlung (Abbildung 16) kein substanzieller Unterschied im BIC: Die Implantate mit UV-behandelter Oberfläche (42,0%) schneiden minimal besser ab, deutlich absetzen können sie sich von denen ohne UV-Behandlung (41,1%) aber nicht. Die leichte Tendenz einer gesteigerten Einheilung für UV-behandelte Implantate liegt knapp unter einem Prozentpunkt und kann nicht als signifikant eingestuft werden ($p = .87$).

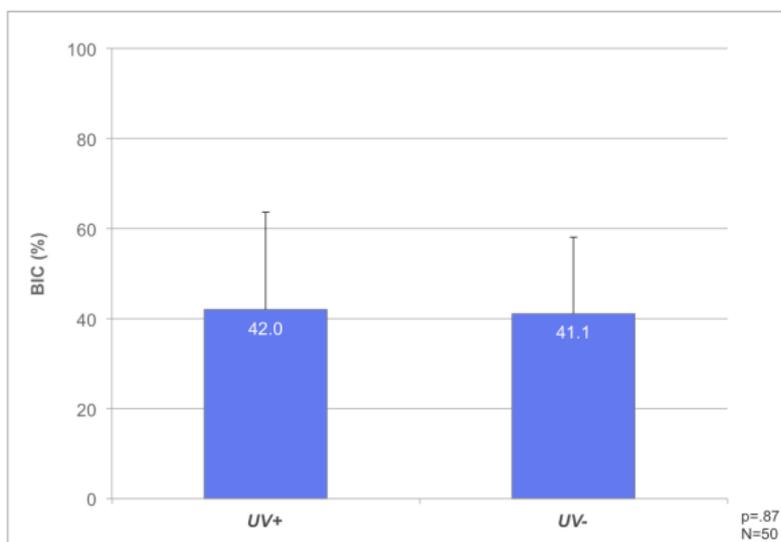


Abbildung 16: BIC-Vergleich nach UV-Behandlung

4.5.6 Auswertung von Material & Oberfläche

Um den kombinierten Effekt von Material und Oberflächenbeschaffenheit auszuwerten, insbesondere um mögliche Interaktionseffekte der Variablen aufzuzeigen, werden in Abbildung 17 die Variablen in Untergruppen aufgeschlüsselt. Hierbei liegt in allen Konstellationen (Ti+, Ti-, Zr+, Zr-) eine zweistellige Fallzahl ($n \geq 11$) vor.

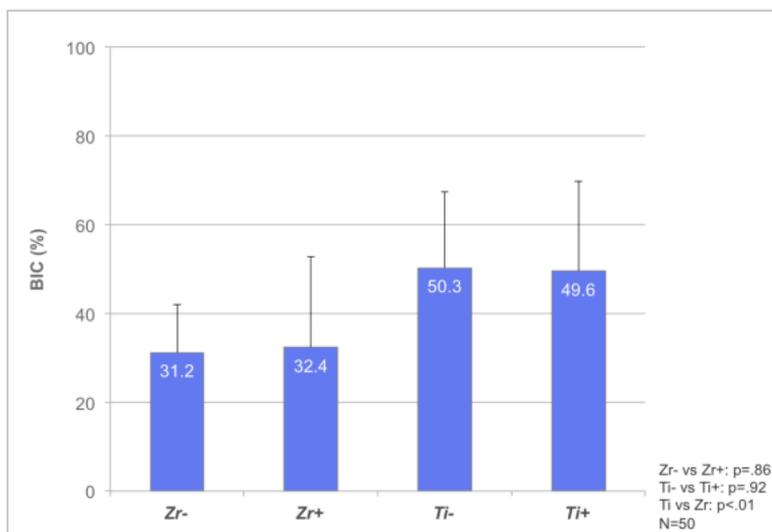


Abbildung 17: BIC-Vergleich nach Material & UV-Behandlung

Während sich die BIC-Mittelwerte für Titan um eine Marke von 50% bewegen, befinden sich die BIC-Werte für Zirkoniumdioxid nur wenig oberhalb von 30%. Die Varianzanalyse zeigt für den materialbezogenen Mittelwertunterschied einen signifikanten Effekt ($p < .01$).

Betrachtet man hingegen die Auswirkung der UV-Behandlung innerhalb der Materialgruppen, zeigt sich ein schwächerer Effekt. In der Gruppe der Zirkon-Implantate liegt der BIC für die UV-behandelten Präparate (Zr+) um 1,2 Prozentpunkte höher (31,2% vs. 32,4%). Bei Titan hingegen liegt er um 0,7 Prozentpunkte niedriger (50,3% vs. 49,6%). Diese Abweichungen liegen im Rahmen des Zufallsfehlers und lassen sich nicht als signifikant klassifizieren (Titan: $p = .92$; Zirkon: $p = .86$).

Auch wenn sich in den Daten für die Gruppe der Zirkonimplantate eine leicht positive Tendenz für die bessere Osseointegration durch die Oberflächenmodifizierung andeutet, zeigt sich die Art des Materials als der maßgebliche Einflussfaktor.

Ein Interaktionseffekt, der auf eine Beziehung des Nutzens der UV-Modifikation zum Materialtypus schließen ließe, lässt sich statistisch nicht finden ($p = .85$).

4.5.7 Auswertung unter Berücksichtigung der Standzeit

Im letzten Auswertungsschritt soll abschließend die knöchernen Einheilung der Gruppen Ti-, Ti+, Zr- und Zr+ unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Opferungszeitpunkte verglichen werden (Abbildung 18).

Wie Tabelle 5 entnommen werden kann, liegen die Fallzahlen der einzelnen Untergruppen jedoch nur im unteren einstelligen Bereich ($n = 2$ bis $n = 5$). Daher müssen die Mittelwertunterschiede mit Bedacht analysiert werden. Weiterhin wurde auf das Rechnen von T-Tests verzichtet.

Nach 6 Wochen Einheilzeit liegt der BIC der Titanimplantate mit 39,8% (Ti-) und 46,9% (Ti+) über den Werten von Zirkoniumdioxidimplantaten, die 29,2% (Zr-) sowie 44,6% (Zr+) zeigen. Nach 12 Wochen findet sich ein BIC-Anstieg der Titanimplantate auf 53,3% (Ti-) und 54,8% (Ti+). Auch die Osseointegrationsraten der unbehandelten Keramikimplantate nimmt im zweiten Opferungszeitraum zu (Zr- = 34,4%), wohingegen für die belichteten Implantate eine deutliche Abnahme zu sehen ist (Zr+ = 11,9%). Nach einer Osseointegrationszeit von 18 Wochen steigen die BIC-Werte für unbelichtete Titanimplantate weiter auf 60,3% (Ti-). Während die Implantate aus unbelichtetem Zirkoniumdioxid einen Abfall des BIC-Wertes auf 28,5% (Zr-) aufzeigen, zeichnet sich für die oberflächenbehandelten Zirkonimplantate ein Anstieg auf 43,6% (Zr+) ab.

Auch wenn einzelne Schwankungen zufallsbedingt sein können, deuten die Daten zumindest wieder auf eine Überlegenheit des Materials Titan hin.

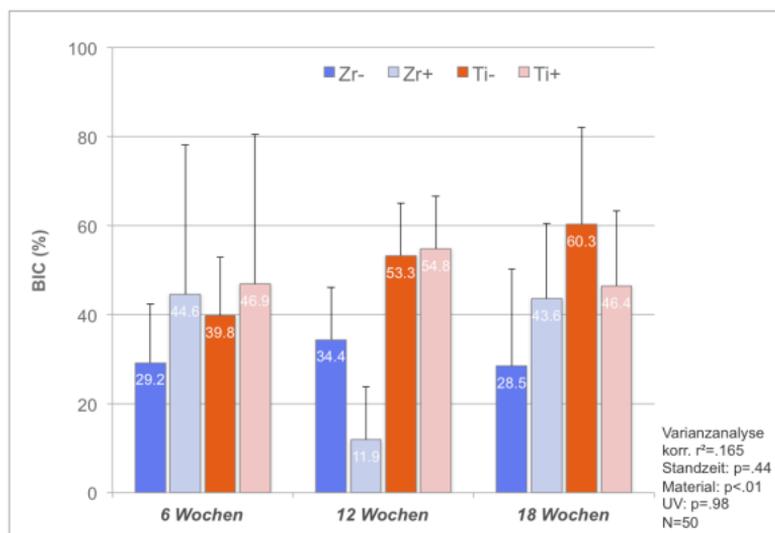


Abbildung 18: BIC-Vergleich nach Implantattypen und Standzeit

Standzeiten	BIC (in %)			
	Ti+	Ti-	Zr+	Zr-
6 Wochen	46,9 n=4, SD 33,6	39,8 n=5, SD 13,1	44,6 n=4, SD 20,1	29,2 n=5, SD 7,6
12 Wochen	54,8 n=5, SD 11,9	53,3 n=4, SD 11,8	11,9 n=4, SD 8,2	34,4 n=5, SD 14,2
18 Wochen	46,4 n=5, SD 16,9	60,3 n=4, SD 21,8	43,6 n=3, SD 4,4	28,5 n=2, SD 12,1

Tabelle 5: Mittelwerte des Knochen-Implantat-Kontakts (BIC) in Prozent mit Anzahl (n) und Standardabweichung (SD) nach einem Beobachtungszeitraum von 6, 12 und 18 Wochen

4.5.8 Varianzanalyse mit Berücksichtigung sämtlicher Variablen

Zur abschließenden Prüfung der im vorherigen Abschnitt geschilderten Beobachtungen gingen die Variablen in eine univariate Varianzanalyse als Gesamtmodell ein. Hierbei wurden Material und UV-Behandlung als feste Faktoren aufgenommen, der BIC als abhängige Variable. Zusätzlich wurde die Standzeit als Kovariate hinzugefügt, um den Effekt der zeitlich bedingten Einheilung zu kontrollieren und diesen Einfluss von den im Zentrum der Untersuchung stehenden Variablen zu isolieren.

Das Modell kann 16,5% (korrigiertes R-Quadrat) der Schwankung der Osseointegrationsrate erklären.

Hierbei zeigt die Kovariate Standzeit keinen signifikanten Effekt ($F = .61$; $p = .44$). Das Material hat einen hochsignifikanten Einfluss ($F = 12.3$; $p < .01$), die UV-Applikation hingegen nicht ($F = .001$; $p = .98$). Auch ein Interaktionseffekt, also eine Wechselwirkung zwischen Material und UV-Behandlung in bestimmten Kombinationen, lässt sich statistisch nicht belegen ($F = .34$; $p = .85$).

5 Diskussion & Ausblick

Die Osseointegration von Implantaten ist die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Implantation. Neben der Primärstabilität ist die Oberflächenrauigkeit ein wichtiger Parameter für die Langzeitstabilität und den klinischen Erfolg von Implantaten (Nasatzky et al. 2003). Mit Modifikationen der Oberflächentopographie ließen sich in einzelnen Studien in jüngster Zeit gesteigerte Osseointegrationsraten belegen, wobei sich die Untersuchungen überwiegend auf Titanimplantate konzentrierte. So wurden zum Beispiel Methoden wie Titan-Plasma-Spraying, Sandstrahlen, Hydroxylapatit-Beschichtung, Säureätzung sowie die Kombination mehrerer Techniken in Labor- und tierexperimentellen Studien getestet (Novaes et al. 2010). Auch chemische Veränderungen von Implantatoberflächen rücken immer mehr in den Fokus von Implantatstudien. Ohne die bewährten Eigenschaften der schraubenförmigen, mikrorauen Oberflächen zu beeinflussen, kann durch zusätzliche Konditionierung eine chemische Eigenschaft hergestellt werden, welche die Osseointegration positiv beeinflusst (Schlottig 2010).

Eine schnellere Versorgung vom Moment der Extraktion bis zur prothetischen Implantatversorgung ist erstrebenswert und trägt zu einem besseren Patientenkomfort bei. Diesbezüglich führten Calvo-Guirado und Mitarbeiter 2010 eine Evaluation von konditionierten Titanimplantaten im Vergleich zu Standard-Titan-Oberflächen durch. Zu allen drei Untersuchungszeiträumen (2, 4, 12 Wochen) war die Knocheneinheilung der konditionierten Implantate besser zu bewerten als die der Kontrollvarianten. So können möglicherweise durch gezielte Beeinflussung der chemischen Beschaffenheit von Implantaten mehr Sofortimplantationen durchgeführt werden, was von den Patienten als positiv empfunden wird, da eine erneute Operation (die Implantation) nach der Zahntfernung und der Ausheilphase entfällt (Grunder et al. 1999).

Derart veränderte, superhydrophile Titanimplantate sind mittlerweile kommerziell erhältlich (SLActive, Fa. Straumann) bzw. können mit einer geeigneten Apparatur kurz vor dem Implantieren konditioniert werden (INICELL, Fa. Thommen Medical). Für Keramikimplantate ist dies allerdings zur Zeit noch nicht möglich.

Bisher wurden zudem nur wenige In-vivo-Studien mit Oberflächenmodifikationen von Zirkoniumdioxidimplantaten durchgeführt (Lee et al. 2013; Salem et al. 2013; Park et al. 2013), obwohl gerade dieses Material ein ungeahntes Potenzial für die Implantatprothetik darstellen könnte. Schließlich ist Zirkoniumdioxid durch seine ästhetischen Vorteile und die bestätigte uneingeschränkte Gewebefreundlichkeit ein interessanter Werkstoff für die moderne dentale Implantologie und wird somit auch als weißes Gold bezeichnet.

Jedoch gelten Zirkoniumdioxidimplantate aufgrund ihrer geringen Bruchzähigkeit sowie durch das in mehreren Studien belegte schlechtere Einheilvermögen den Titanimplantaten unterlegen (Lambrich und Iglhaut 2008). Daher sind experimentelle Untersuchungen zu den angesprochenen Materialmodifikationen gerade für dieses Material ein vielversprechender Ansatzpunkt, um seine Schwächen zu minimieren sowie eine vermehrte und gesicherte Anwendung in der dentalen Implantologie zu ermöglichen.

Erstmals hat die vorliegende Studie daher mittels eines Tierversuches den Effekt der UVC-Bestrahlung von dentalen Titan- und Zirkoniumdioxidimplantaten vergleichend untersucht. Als Hintergrund ist eine Entdeckung von Att und Mitarbeitern anzuführen: 2009 zeigte diese Arbeitsgruppe im In-vitro-Versuch die Möglichkeit auf, die Bioaktivität von Oberflächen durch UVC-Licht-Applikation zu erhöhen. Durch die UVC-Bestrahlung einer Titanscheibe konnte sowohl eine verbesserte Hydrophilie (Superhydrophilie) als auch eine gesteigerte Zellanheftungsrate der kultivierten Knochenzellen (Att et al. 2009b) nachgewiesen werden. Ähnliche Beobachtungen konnten bei UVC-behandelten Zirkonoxidoberflächen gemacht werden (Att et al. 2009a). Durch die Konditionierung mit UVC-Strahlung wurden die Oberflächen chemisch so verändert, dass sie eine erhöhte Oberflächenenergie bekamen und somit reaktiver wurden. Hieraus ergab sich ein interessanter Ansatzpunkt, diese Technologie für die Behandlung von Implantatoberflächen einzusetzen.

Zudem sprechen die einfache Handhabung und geringe zusätzliche Kosten (einmalige Anschaffungsinvestition der UVC-Lampe und vernachlässigbare Stromkosten) für die Eignung und Praktikabilität dieser Technologie im Praxiseinsatz. Durch einen vergleichsweise geringen Mehraufwand wäre also die Attraktivität dieser Art der Oberflächenveränderung selbst bei einem schwach positiven Effekt vermutlich bereits gegeben.

Diese Studie griff den entstandenen Forschungsbedarf auf, um den klinischen Nutzen der UVC-Behandlung für die Implantologie eingehender und in vivo zu eruieren. Hierzu wurden

4 Implantattypen ins Stirnbein von Hausschweinen inseriert: Zirkonoxidimplantate (Easy Kon, General Implants) mit und ohne UVC-Belichtung, sowie strukturell ähnliche Titanimplantate (Easy Fast, Firma General Implants), ebenfalls mit und ohne UVC-Behandlung. Nach unterschiedlichen Einheilphasen (6, 12, 18 Wochen) wurde die Osseointegrationsrate gemessen und verglichen.

Im Aggregat wiesen die UV-behandelten Oberflächen lediglich eine minimal verbesserte Einheilungsrate gegenüber den unbehandelten auf (+0,9 Prozentpunkte auf 42,0%). Diese konnte jedoch nicht als signifikant gewertet werden ($p = .87$). Beim Vergleich der BIC-Werte nach Material, zeigte sich Titan mit einem Mittelwert von 49,9% gegenüber Zirkon mit 31,8% signifikant überlegen ($p < .01$).

Die Analyse des BIC unter Berücksichtigung der Standzeiten ergab in den Untergruppen kein homogenes Muster. Hierbei muss jedoch bedacht werden, dass aufgrund geringer Fallzahlen für die einzelnen Variablenkombinationen (d.h. Standzeit+Material+UV-Behandlung: $n=5$ bis $n=2$), statistische Aussagen nur bedingt sinnvoll möglich sind und Gruppenunterschiede mit Vorsicht interpretiert werden müssen.

Für die behandelten Keramikimplantate war insgesamt eine marginal positive Auswirkung der UVC-Vorbehandlung auf ihr Osseointegrationsvermögen zu verzeichnen, die sich jedoch nicht als überzufällig erwies (+1,2 Prozentpunkte auf 32,4%). Für zwei der drei Tiergruppen war dennoch ein merklicher Anstieg für UV-behandelte Implantate zu sehen (nach 6 Wochen +15,4 Prozentpunkte auf 44,6% und +15,1 Prozentpunkte auf 43,6% nach 18 Wochen). Diese Beobachtung war jedoch gegenteilig zum mittleren Opferungszeitpunkt (12 Wochen), der einen starken Abfall von Zr⁺ gegenüber Zr⁻ aufzeigte. Hier konnte ein Zufallseffekt nicht ausgeschlossen werden.

Bei den Titanimplantaten war für die histologischen Präparate insgesamt keine signifikante Beeinflussung des BIC durch Oberflächenmodifikation zu erkennen (Ti⁻ 50,3% vs. 49,6% Ti⁺), auch wenn sich für die Standzeiten 6 und 12 Wochen gesteigerte Werte für die UV-behandelten Präparate zeigten (nach 6 Wochen +7,1 Prozentpunkte auf 46,9%; nach 12 Wochen +1,5 Prozentpunkte auf 54,8%). Diese Verbesserung ließ sich jedoch in der letzten Gruppe nicht mehr erkennen (nach 18 Wochen -13,9 Prozentpunkte auf 46,4%).

Nur bei den unbehandelten Titanimplantaten (Ti-) war eine chronologisch zunehmende Osseointegration zu verzeichnen: Lag nach einer Einheilphase von 6 Wochen die Knochen-Implantat-Kontakt-Rate noch bei 39,8%, so waren es nach 12 Wochen schon 53,3% und nach 18 Wochen lag die Rate der von Knochen umgebenen Implantatoberfläche bei 60,3%. Über alle Gruppen hinweg, war die Ti-/18 Wochen-Kombination (BIC = 60,3%) die erfolgreichste. Dieses Ergebnis erscheint plausibel, da dies die längste Standzeit war und Titan als Material mit guter Einheilfähigkeit bekannt ist.

Salem und Mitarbeiter untersuchten 2012 die Osseointegration von oberflächenveränderten Zirkon-Implantaten (Zirkonoxid-Pulver-Alkohol-Spray mit anschließender Sinterung) im Vergleich zu baugleichen Zirkon-Kontrollimplantaten sowie standardisierten Titanimplantaten (sandgestrahlt, säuregeätzt). Es konnte durch eine elektronenmikroskopische Analyse gezeigt werden, dass durch das Besprühen der Zirkonimplantate eine Vergrößerung der Oberfläche erzielt wurde. Ihre BIC-Werte (nach 4 Wochen 69,67% und nach 8 Wochen 88,0%) waren zu den frühen Zeitpunkten der Einheilung gegenüber den beiden Kontrollimplantaten signifikant erhöht (nach 4 Wochen 62,8% und 56,9%. und 8 Wochen post-OP 82,9% und 70,4%).

Nach 12 Wochen verlor der nur noch leicht erhöhte BIC-Wert der Testimplantate (89,1%) gegenüber den Titanimplantaten (86,8%) an Signifikanz, was letztendlich auf eine vergleichbare Osseointegration nach Abschluss der Frühphase von besprühten Zirkonimplantaten und Titanimplantaten schließen ließ.

Ähnliche Ergebnisse konnten auch in der vorliegenden Untersuchung gewonnen werden: Zeigten die UV-behandelten Zirkoniumdioxidimplantate nach 6 Wochen noch einen höheren BIC (Zr+ = 44,6%) als die Titankontrollen (Ti- = 39,8%), so waren nach 12 und 18 Wochen keine Vorteile mehr im Vergleich zu den unbehandelten Titanimplantaten zu beobachten. Im Gegenteil, nach 12 Wochen Osseintegrationszeit schnitten die Titanimplantate (nach 12 Wochen Ti=53,3%; nach 18 Wochen Ti=60,3%) besser ab als die belichteten Zirkoniumdioxidimplantate (nach 12 Wochen Zr+=11,9%; nach 18 Wochen Zr+= 43,6%).

Lee et al. (2012) konnten keinen signifikanten Unterschied in der Osseointegration von sandgestrahlten Zirkon- und Titan-Implantaten feststellen. Ebenso wie bei Park et al. (2012) wurden vergleichbare Einheil Tendenzen auf eine ähnliche Oberflächenrauigkeit zurückgeführt.

Die Ergebnisse von Möller et al. (2012) bestätigen diese Annahme. In ihrer Studie wurde u.a. die Osseointegration histomorphometrisch mit Hilfe der BIC-Bestimmung analysiert und

zeigte ähnliche Resultate für Zirkon (nach 4 Wochen 59,3%; nach 12 Wochen 67,1%) und Titan (nach 4 Wochen 64,1%; nach 12 Wochen 73,6 %). In der frühen Phase der Einheilung kam es zu einer geringfügig verlangsamt Integration von Keramikimplantaten gegenüber Titanimplantaten, die statistisch jedoch ohne Relevanz war.

Stellt man weiterhin die erhaltenen Ergebnisse dieser Studie mit denen vorangegangener Untersuchungen gegenüber, ist ein generell niedriger BIC wahrzunehmen: Nach einer Einheilzeit von 12 Wochen lag der Wert für Titanimplantate bei Möller und Mitarbeitern (2012) bei 73,6% (hier Ti- = 53,3%) und für Zirkoniumoxidimplantate bei 67,1% (hier Zr- = 34,4%). Auch in anderen Studien sind BIC-Werte von über 60% keine Seltenheit (Scarano et al. 2003; Langhoff et al. 2008).

Durch die unmittelbare Nähe des Operationsfelds zum Sinus frontalis kam es bei einigen Implantaten zu einer teilweisen oder rein bindegewebigen Einheilung und mussten aussortiert werden. Zusätzlich kam es während der komplexen histologischen Aufbereitung zu Defekten an einzelnen Schnitten. Daher konnten von den eingangs 72 inserierten Implantaten nur 50 in die Auswertung einfließen. Neben der verringerten Ausgangsbasis minimierten sich folglich die Fallzahlen in den Untergruppen (wie etwa Ti-), so dass die genannten Abweichungen zufällig verursacht sein könnten.

In der Nebenauswertung der Osseointegration mittels Micro-CT ergab sich im Vergleich zur histologischen Erfassung ein durchweg besserer BIC, welcher auf dem Wertenniveau der zitierten Studien lag: Das gilt für unbelichtetes Titan (74,4% innerer Ring vs. 50,3% Histologie) gleichfalls wie für belichtetes Titan (76,0% innerer Ring vs. 49,6% Histologie).

Dies könnte durch die unterschiedlichen Voraussetzungen der zweidimensionalen Auswertung im Gegensatz zu den exakt berechneten VOIs des Micro-CT begründet sein. Für zukünftige Forschung scheint letztere Untersuchungsmethode somit ein interessanter Ansatzpunkt zu sein, um die Implantateinheilung nicht nur punktuell an ultradünnen Schnitten sondern in ihrer vollständigen räumlichen Dimension zu analysieren.

Insgesamt deutete sich in der vorliegenden Studie höchstens ein Potenzial an, die Osseointegration von Keramikimplantaten mit UV-Licht positiv zu beeinflussen. Dieses müsste durch Folgeforschung eingehender untersucht und gesichert werden. In weiteren tierexperimentellen Studien könnte zudem die Art der Oberflächenbehandlung selbst variiert und hierdurch gegebenenfalls verbessert werden. Zu erreichen wäre dies beispielsweise durch eine modifizierte Applikation (veränderte Bestrahlungszeit) oder die Nutzung anderer Strahlungsarten, denkbar wäre ebenfalls eine Kombination verschiedener Wellenlängen.

Diese Untersuchung hat gezeigt, dass weiterhin der Materialtypus eine deutliche Einflussgröße auf den Einheilungserfolg darstellt. Titan schnitt insgesamt signifikant besser beim BIC ab als Zirkoniumdioxid und bestätigt somit die Ergebnisse vorangegangener Studien (Lambrich und Iglhaut 2008).

Bei der Betrachtung der Ergebnisse müssen jedoch auch ihre empirischen Grenzen berücksichtigt werden. In erster Linie ist die recht geringe Fallzahl in den Untergruppen zu nennen. Durch einen noch umfangreicheren Versuch könnten auch subtile Effekte (wie eventuell die UVC-Behandlung) besser gemessen werden.

Die verlängerte Standzeit hatte in den einzelnen Versuchsgruppen außerhalb von Ti- nicht die zu erwartende Steigerung des BIC gezeigt. Eventuell waren nach sechs Wochen die Implantate bereits größtenteils eingeeilt. In diesem Fall wäre eine Überprüfung der Osseointegration in früheren Phasen, z.B. zusätzlich nach 2 und 4 Wochen post-OP interessant.

Abschließend lässt sich festhalten, dass durch die zunehmende Alterung der Gesellschaft in Verbindung mit dem Wunsch nach hochwertigem und hochfunktionalem Zahnersatz, weitere Studien wünschenswert sind, um die Implantattherapie wissenschaftlich weiter zu entwickeln. Gerade im Materialbereich ist weitere Forschung gefragt. Sowohl breiter angelegte Studien als auch Langzeituntersuchungen scheinen von Nöten zu sein, um die Wirksamkeit neuer Ansatzpunkte für eine noch erfolgreichere Behandlung mit Implantaten eindeutig zu belegen. Als ein mögliches Evaluationsinstrument ließe sich in Zukunft vermehrt die Micro-CT-Analyse integrieren, die durchaus das Potenzial besitzt, eine histologische Aufbereitung zu ersetzen. Zudem besteht beim Micro-CT die Möglichkeit, anästhesierte Kleintiere in toto zu scannen, sodass eine Tötung nicht mehr erforderlich ist (Butz et al. 2006).

Nur durch zahnmedizinischen Fortschritt kann der steigenden Erwartungshaltung der Patienten an Implantatprothetik bezüglich schnellerer postoperativer Belastbarkeit und ästhetischer Resultate langfristig Rechnung getragen werden.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es, im tierexperimentellen Versuch einen Vergleich der Knocheneinheilung (Osseointegration) von Titan- und Zirkoniumimplantaten mit und ohne UVC-modifizierten Oberflächen vorzunehmen, um so einen denkbaren positiven Effekt durch die UVC-Behandlung herauszustellen.

Zur Beurteilung der Osseointegration der verschiedenen Implantatoberflächen wurde ein In-vivo-Test an adulten Hausschweinen mit unterschiedlich langen Einheilzeiten von 6 Wochen (Gruppe I), 12 Wochen (Gruppe II) und 18 Wochen (Gruppe III) durchgeführt. Dazu wurden bei 9 Schweinen je 8 Implantate (4 Ti- und 4 Zr-Implantate) ins Stirnbein inseriert. Rechtsseitig wurden als Testgruppe je zwei UVC-bestrahlte Ti- und Zr-Implantate (Ti+, Zr+) gesetzt, als Kontrollgruppe diente die linke Seite mit je zwei unbehandelten Implantaten (Ti-, Zr-). Anschließend wurde der Knochenkontakt zur Implantatoberfläche (BIC) histomorphologisch mit Hilfe eines Lichtmikroskops anhand von Dünnschliffpräparaten sowie zusätzlich mittels Micro-CT bestimmt.

Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied der Osseointegration (BIC) nach UV-Bestrahlung der Implantatoberflächen innerhalb der ersten 6 Wochen nachgewiesen werden (46,9% Ti+ vs. 39,8% Ti- und 44,6% Zr+ vs. 29,2% Zr-). Nach 18 Wochen stieg der BIC für unbelichtete Titanimplantate (60,3% Ti-), wohingegen der BIC für Zirkoniumimplantate und belichtete Titanimplantate sogar leicht abfiel (43,6% Zr+ vs. 28,5% Zr- und 46,4% Ti+).

Über alle Standzeiten aggregiert zeigten Zirkoniumimplantate eine marginale Verbesserung durch eine UV-Behandlung (32,4% Zr+ vs. 31,2% Zr-), die aber nicht das Signifikanzniveau erreichte. Für Titan fiel die Gruppe der UV-bestrahlten Implantate leicht ab, jedoch ebenfalls nicht statistisch nachweisbar (49,6% Ti+ vs. 50,3% Ti-).

Als ein deutlicher Einflussfaktor für den Osseointegrationserfolg konnte der Materialtyp belegt werden ($p < .01$). Titanimplantate heilten unabhängig von der Oberflächenbehandlung signifikant besser in den Knochen ein als Zirkoniumimplantate (BIC 49,9% Ti vs. 31,8% Zr). Auch unter Berücksichtigung der Einheilzeit bestätigte sich dieses Bild.

6.1 Schlussfolgerung

Titan zeigte sich in Bezug auf das Osseointegrationsverhalten gegenüber Zirkon als das überlegene Implantatmaterial. Dieser Effekt trat unabhängig von der Materialmodifikation ein.

Die UVC-Modifizierung ließ in einigen Untergruppen der Zirkonimplantate positive Effekte vermuten, diese konnten jedoch nicht als statistisch gesichert angenommen werden. Zu dieser Methode der Oberflächenbehandlung sind daher weitere Studien wünschenswert, die mögliche Effekte durch größere Fallzahlen sowie das Langzeitverhalten der Implantate eingehender untersuchen sollten.

7 Literaturverzeichnis

- Abrahamsson, I., Berglundh, T., Linder, E., Lang, N.P., Lindhe, J. (2004): Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*, 15, 381-392.
- Adell, R., Lekholm, U., Rockler, B., Branemark, P.-I. (1981): A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg*, 10, 387-416.
- Aita, H., Att, W., Ueno, T., Yamada, M., Hori, N., Iwasa, F., Tsukimura, N., Ogawa, T. (2009): Ultraviolet light-mediated photofunctionalization of titanium to promote human mesenchymal stem cell migration, attachment, proliferation and differentiation. *Acta Biomater*, 5, 3247-3257.
- Aita, H., Hori, N., Takeuchi, M., Suzuki, T., Yamada, M., Anpo, M., Ogawa, T. (2009): The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone. *Biomaterials*, 30, 1015-1025.
- Albrektsson, T., Wennerberg, A. (2004): Oral implant surfaces: Part 1- Review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont*, 17, 536-543.
- Albrektsson, T., Wennerberg, A. (2005): The impact of oral implants - past and future, 1966–2042. *J Can Dent Assoc*, 71, 327.
- Aramouni, P., Zebouni, E., Tashkandi, E., Dib, S., Salameh, Z., Almas, K. (2008): Fracture resistance and failure location of zirconium and metallic implant abutments. *J Contemp Dent Pract*, 9, 41-48.
- Arzt, T., Merten, H.A., Patyk, A. (2009): ZrO₂ Keramikimplantate. Humanhistologische Aspekte eines innovativen Implantatwerkstoffes. *Implantologie Journal*, 13, 26-28.
- Att, W., Hori, N., Iwasa, F., Yamada, M., Ueno, T., Ogawa, T. (2009a): The effect of UV-photofunctionalization on the time-related bioactivity of titanium and chromium-cobalt alloys. *Biomaterials*, 30, 4268-4276.
- Att, W., Takeuchi, M., Suzuki, T., Kubo, K., Anpo, M., Ogawa, T. (2009b): Enhanced osteoblast function on ultraviolet light-treated zirconia. *Biomaterials*, 30, 1273-1280.

- Barfuß, A. (2010): Implantologie - die richtige Verbindung. *Dent Mag*, 28, 58-64.
- Bornstein, M.M., Valderrama, P., Jones, A.A., Wilson, T.G., Seibl, R., Cochran, D.L. (2008): Bone apposition around two different sandblasted and acid-etched titanium implant surfaces: a histomorphometric study in canine mandibles. *Clin Oral Implants Res*, 19, 233-241.
- Bortz, J. (1999): Statistik für Sozialwissenschaftler (5., vollst. überarb. und aktualisierte Aufl.). Springer, Heidelberg.
- Brånemark, P.-I. (1985): Einführung in die Osseointegration. In: Brånemark, P.-I., Zarb, G., Albrektsson, T. (Hrsg.): *Gewebeintegrierter Zahnersatz*, Quintessenz, Berlin.
- Brånemark, P.-I. (2005). Associated Brånemark Osseointegration Centers: History. Erhältlich unter: <http://www.branemark.com/History.html> [letzter Zugriff am 20.06.2013].
- Butz, F., Ogawa, T., Chang, T.L., Nishimura, I. (2006): Three-dimensional bone-implant integration profiling using micro-computed tomography. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 21, 687-695.
- Calvo-Guirado, J.L., Ortiz-Ruiz, A.J., Negri, B., Lopez-Mari, L., Rodriguez-Barba, C., Schlottig, F. (2010): Histological and histomorphometric evaluation of immediate implant placement on a dog model with a new implant surface treatment. *Clin Oral Implants Res*, 21, 308-315.
- Cochran, D.L. (1999): A comparison of endosseous dental implant surfaces. *J Periodontol*, 70, 1523-1539.
- Covacci, V., Bruzzese, N., Maccauro, G., Andreassi, C., Ricci, G.A., Piconi, C., Marmo, E., Burger, W., Cittadini, A. (1999): In vitro evaluation of the mutagenic and carcinogenic power of high purity zirconia ceramic. *Biomaterials*, 20, 371-376.
- Dam, H.G., Najm S.A., Nurdin, N., Bischof, M., Finkelman, M., Nedir, R. (2014): A 5- to 6-year radiological evaluation of titanium plasma sprayed/sandblasted and acid-etched implants: results from private practice. *Clin Oral Implants Res*, 25 e159-e165.
- Davies, J.E. (2003): Understandig peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ*, 67, 932-949.

- Depprich, R., Zipprich, H., Ommerborn, M., Naujoks, C., Wiesmann, H.-P., Kiattavorncharoen, S., Lauer, H.-C., Meyer, U., Kübler, N.R., Handschel, J. (2008): Osseointegration of zirconia implants compared with titanium: an in vivo study. *Head Face Med*, 4, 30.
- Donath, K., Breuner, G. (1982): A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol*, 11, 318-326.
- Egusa, H., Ko, N., Shimazu, T., Yatani, H. (2008): Suspected association of an allergic reaction with titanium dental implants: a clinical report. *J Prosthet Dent*, 100, 344-347.
- Ehrensberger, C. (2013): Implantate auf der IDS 2013. Oberflächen haben hohes Innovationspotenzial. *Zahnärztliche Mitteilungen*, 4, 58-63.
- Ferguson, S.J., Langhoff, J.D., Voelter, K., von Rechenberg, B., Scharnweber, D., Bierbaum, S., Schnabelrauch, M., Kautz, A.R., Frauchiger, V.M., Mueller, T.L., van Lenthe, G.H., Schlottig, F. (2008): Biomechanical comparison of different surface modifications for dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 23, 1037-1046.
- Grundeî, H. (2006): Geschichtliche Entwicklung der Endoprothetik und der Fixation durch Spongiosa-Metal[®]. In: Grading, R., Gollwitzer, H. (Hrsg.): *Ossäre Integration*, Springer, Heidelberg.
- Grunder, U., Polizzi, G., Goene, R., Hatano, N., Henry, P., Jackson, W.J., Kawamura, K., Köhler, S., Renouard, F., Rosenberg, R., Triplett, G., Werbit, M., Lithner, B. (1999): A 3-year prospective multicenter follow-up report on the immediate and delayed-immediate placement of implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 14, 210-216.
- Le Guehennec, L., Soueidan, A., Layrolle, P., Amouriq, Y. (2007): Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater*, 23, 844-854.
- Heden, P., Sollevi, A. (1989): Circulatory and metabolic events in pig island skin flaps after arterial and venous occlusion. *Plast Reconstr Surg*, 84, 475-481.
- Höning, J.F., Merten, H.A. (1993): Das Göttinger Miniaturschwein (GMS) als Versuchstier in der human-medizinischen osteologischen Grundlagenforschung. *Z Zahnärztl Implantol*, 9, 244-254.

- Iwasa, F., Hori, N., Ueno, T., Minamikawa, H., Yamada, M., Ogawa, T. (2010): Enhancement of osteoblast adhesion to UV-photofunctionalized titanium via an electrostatic mechanism. *Biomaterials*, 31, 2717-2727.
- Jeong, R., Marin, C., Granato, R., Suzuki, M., Gil, J.N., Granjeiro, J.M., Coelho, P.G. (2010): Early bone healing around implant surfaces treated with variations in the resorbable blasting media method. A study in rabbits. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 15,e119-e125.
- Kieswetter, K., Schwartz, Z., Hummert, T.W., Cochran, D.L., Simpson, J., Dean, D.D., Boyan, B.D. (1996): Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. *J Biomed Mater Res*, 32, 55-63.
- Kobayashi, E., Hishikawa, S., Teratani, T., Lefor, A.T. (2012): The pig as a model for translational research: overview of porcine animal models at Jichi Medical University. *Transplant Res*, 1, 8.
- Laiblin, C., Jaeschke, D. (1979): Klinisch-chemische Untersuchungen des Knochen- und Muskelstoffwechsels unter Belastung beim Göttinger Miniaturschwein – eine experimentelle Studie. *Berl Münch Tierärztl Wschr*, 92, 124-128.
- Lambrich, M., Iglhaut, G. (2008): Vergleich der Überlebensrate von Zirkondioxid- und Titanimplantaten. *Z Zahnärztl Impl*, 24, 182-191.
- Langhoff, J.D., Voelter, K., Scharnweber, D., Schnabelrauch, M., Schlottig, F., Hefti, T., Kalchofner, K., Nuss, K., von Rechenberg, B. (2008): Comparison of chemically and pharmaceutically modified titanium and zirconia implant surfaces in dentistry: a study in sheep. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 37, 1125-1132.
- Lee, J.E., Heo, S.J., Koak, J.Y., Kim, S.K., Han, C.H., Lee, S.J. (2009): Healing response of cortical and cancellous bone around titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 24, 655-662.
- Lee, B.-C., Yeo, I.-S., Kim, D.-J., Lee, J.-B., Kim, S.-H., Han, J.-S. (2013): Bone formation around zirconia implants combined with rhBMP-2 gel in the canine mandible. *Clin Oral Implants Res*, 24, 1332-1338.

- Lincks, J., Boyan, B.D., Blanchard, C.R., Lohmann, C.H., Liu, Y., Cochran, D.L., Dean, D.D., Schwartz, Z. (1998): Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials*, 19, 2219-2232.
- Martin, J.D., Schwartz, Z., Hummert, T.W., Schraub, D.M., Simpson, J., Lankford, J. Jr., Dean, D.D., Cochran, D.L., Boyan, B.D. (1995): Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res*, 29, 389-401.
- Möller, B., Terheyden, H., Açı, Y., Purcz, N.M., Hertrampf, K., Tabakov, A., Behrens, E., Wiltfang, J. (2012): A comparison of biocompatibility and osseointegration of ceramic and titanium implants: an in vivo and in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 41, 638-645.
- Möst, T. (2011): Tierexperimentelle Studie zur Knocheneinheilung chemisch oberflächenmodifizierter Implantate im Typ-2 diabetischen Schwein, Med. Diss., Erlangen.
- Nasatzky, E., Gultchin, J., Schwartz, Z. (1993): The role of surface roughness in promoting osteointegration. *Refuat Hapeh Vehashinayim*, 20, 8-19, 98.
- Neukam, F.W. (2000): Lebenserwartung von Implantaten und Implantatlager. *Deutsche Gesellschaft für Zahn- Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK), DZZ* 55.
- Nilus, M., Nilus, M., Goeken, R., Kanzler, U., Amirfallah, N., Zahn, A. (2008): Keramik-Implantate im zahnlosen Oberkiefer – Alternative bei multipler Unverträglichkeit?!. *Implantologie Journal*, 3, 20-29.
- Novaes, A.B. Jr., de Souza, S.L., de Barros, R.R., Pereira, K.K., Iezzi, G., Piattelli, A. (2010) : Influence of implant surfaces on osseointegration. *Braz Dent J*, 21, 471-481.
- Park, Y.-S., Chung, S.-H., Shon, W.-J. (2013): Peri-implant bone formation and surface characteristics of rough surface zirconia implants manufactured by powder injection molding technique in rabbit tibiae. *Clin Oral Implants Res*, 24, 586-591.
- Payer, M., Lorenzoni, M., Jakse, N., Kirmeier, R., Dohr, G., Stopper, M., Pertl, C. (2010): Zellwachstum auf unterschiedlich strukturierten Zirkoniumdioxid- und Titanoberflächen: eine morphologische In-vitro-Untersuchung. *Z Zahnärztl Impl*, 4, 338-351.

- Piconi, C., Maccauro, G. (1999): Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials*, 20, 1-25.
- Prathapachandran, J., Suresh, N. (2012): Management of peri-implantitis, *Dent Res J (Isfahan)* 9, 516-521.
- Rahn, B.A., Perren, S.M. (1971): Xylenol orange, a fluorochrome useful in polychrome sequential labeling of calcifying tissues. *Stain Technol*, 46, 125-129.
- Rahn, B.A. (2003): Fluorochrome labelling of bone dynamics. *Eur Cell Mater*, 5, 41.
- Ritzert, B. (2007): Fortbildung dient der Qualitätssicherung. Newsletter der DGZMK, Ausgabe 04/2007.
- Romeis, B., Bock, P., Denk, H. (1989): Romeis mikroskopische Technik (17. Aufl.), Urban und Schwarzenberg, München.
- Salem, N.A., Taleb, A.L., Aboushelib, M.N. (2013): Biomechanical and histomorphometric evaluation of osseointegration of fusion-sputtered zirconia implants. *J Prosthodont*, 22, 261-267.
- Sandhaus, S. (1971): Oral rehabilitation using implantation method C.B.S., *ZWR Das Deutsche Zahnärzteblatt* 80, 597-604.
- Scarano, A., Di Carlo, F., Quaranta, M., Piattelli, A. (2003): Bone response to zirconia ceramic implants: an experimental study in rabbits. *J Oral Implantol*, 29, 8-12.
- Scarano, A., Piattelli, M., Caputi, S., Favero, G.A., Piattelli, A. (2004): Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study. *J Periodontol*, 75, 292-296.
- Schliephake, H., Reiss, J., Urban, R., Neukram, F.W., Günay, H. (1991): Freisetzung von Titan aus Schraubenimplantaten. *Z Zahnärztl Implantol*, 7, 6-10.
- Schlottig, F. (2010): Implantatoberflächen- Stand der Technik. *ZMK Online*, 26, 2-6.
- Schulte, W., Heimke, G. (1976): Das Tübinger Sofort-Implantat. *Die Quintessenz*, 27, 17-23.
- Schulte, W., Kleinekenscheidt, H., Schareyka, R., Heimke, G. (1978): Concept and testing of the Tübingen immediate implant. *Dtsch Zahnärztl Z*, 33, 319-325.
- Schwuger, M.J. (1996): *Lehrbuch der Grenzflächenchemie* (5. Aufl.), Thieme Verlag, Stuttgart.

- Seidl, C. (2011): Vergleichende tierexperimentelle Studie zur ossären Einheilung oberflächenmodifizierter Implantate im diabetischen Schwein, Med. Diss., Erlangen.
- Shalabi, M.M., Gortemaker, A., Vant Hof, M.A., Jansen, J.A., Creugers, N.H.J. (2006): Implant surface roughness and bone healing: an systematic review. *J Dent Res* 85, 496-500.
- Sicilia, A., Cuesta, S., Coma, G., Arregui, I., Guisasaola, C., Ruiz, E., Maestro, A. (2008): Titanium allergy in dental implant patients: a clinical study on 1500 consecutive patients. *Clin Oral Implants Res*, 19, 823-835.
- Stadlinger, B., Lode, A.T., Eckelt, U., Schlottig, F., Hefti, T., Mai, R. (2009): Surface-conditioned dental implants: an animal study on bone formation. *J Clin Periodontol*, 36, 882-891.
- Strietzel, F.P. (2002): Einheilung der Implantate – Grundlagen der Osseointegration. In: Reichart, P.A., Hausamen, J.-E., Becker, J., Neukam, F.W., Schliephake, H., Schmelzeisen, R. (Hrsg.): *Curriculum Zahnärztliche Chirurgie Band I*, Quintessenz, Berlin.
- Suzuki, T., Hori, N., Att, W., Kubo, K., Iwasa, F., Ueno, T., Maeda, H., Ogawa, T. (2009): Ultraviolet treatment overcomes time-related degrading bioactivity of titanium. *Tissue Eng Part A*, 15, 3679-3688.
- Sykaras, N., Iacopino, A.M., Marker, V.A., Triplett, R.G., Woody, R.D. (2000): Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 15, 675-690.
- Tugulu, S., Löwe, K., Scharnweber, D., Schlottig, F. (2010): Preparation of superhydrophilic microrough titanium implant surfaces by alkali treatment. *J Mater Sci Mater Med*, 21, 2751-2763.
- Ueno, T., Yamada, M., Suzuki, T., Minamikawa, H., Sato, N., Hori, N., Takeuchi, K., Hattori, M., Ogawa, T. (2010): Enhancement of bone-titanium integration profile with UV-photofunctionalized titanium in a gap healing model. *Biomaterials*, 31, 1546-1557.
- Uo, M., Sjögren, G., Sundh, A., Watari, F., Bergman, M., Lerner, U. (2003): Cytotoxicity and bonding property of dental ceramics. *Dent Mater*, 19, 487-492.
- Urist, M.R., Ibsen, K.H. (1963): Chemical reactivity of mineralized tissue with oxytetracycline. *Arch Pathol*, 76, 484-496.

-
- Wennerberg, A., Albrektsson, T. (2009): Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*, 20, 172-184.
 - Wiltfang, J., Möller, B., Acil, Y., Warnke, P., Becker, S., Purcz, N., Behrens, E. (2009): Metallfreie Implantate: Wunsch oder Wirklichkeit? Vergleichsstudie zur Biokompatibilität und Osseointegration von Keramik- und Titanimplantaten. *Dental Tribune*, 6, 9-11.

8 Anhang

Zusammensetzung des Einbettgemischs

- 2 l Methylmethacrylat (M55909 Aldrich)
- 0,4 l Nonylphenyl-Polyethylenglycolacetat (74432 Sigma)
- 0,02 l Dibutylphthalat (800919 Merck)
- 12g α - α -Azoisobutyronitril (11630 Fluka)

Tierversuchsgenehmigung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die zuständigen Behörden (Ethikkommission/Amt für Tierschutz) zugestimmt haben, dass Forschungsvorhaben an Menschen oder Tieren vorgenommen wurden. Die Versuchsdurchführung erfolgte am Institut für Rechtsmedizin der Semmelweis Universität Budapest unter Aufsicht von Dr. E. Felszeghy im Tierstall Herceghalom. Die Studie wurde im Pest Megyei Allategészegügyi és élelmiszer ellenőrző allomás (Ministry of Agriculture and Rural Development) durch das Komitat Pest Animal Health and Food Control Station (Versuchstiergenehmigung Nr.: 1053/eoh/2007) Budapest, Ungarn genehmigt.

Es besteht seit langem eine enge wissenschaftliche Kooperation zwischen der Semmelweis Universität Budapest und der Kieler Universität. Zur Zeit der experimentellen Phase bestand des weiteren wegen Umbaumaßnahmen an der Kieler Universität keine Kapazität für Großtierversuche, die für dieses Projekt Voraussetzung war. Der histologische Teil der Studie wurde an der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Dir. Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang) durchgeführt.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinen Unterstützern und Wegbegleitern für die Dissertation bedanken.

Prof. Dr. Dr. Jörg Wiltfang danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation an der Klinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie, UK-SH, Campus Kiel, anzufertigen.

Dr. Dr. Björn Möller möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas sowie für die Unterstützung bei der Verfassung der Dissertation danken.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Nicolai Purcz, der mir mit fachlicher Unterstützung und viel Engagement zur Seite stand.

Ich danke dem Leiter der wissenschaftlichen Laboratorien Herrn Prof. Dr. Yahya Açil für das Vertrauen, das er mir u.a. beim USB-Stick-Verleih entgegen gebracht hat, sowie Frau Gaby Nessenius für die Einarbeitung und tatkräftige Unterstützung im Labor. Graeme Campbell bin ich zu Dank verpflichtet, da er mir stets bei der Micro-CT-Auswertung mit Rat und Tat zur Seite stand.

Des Weiteren möchte ich allen danken, die mich mit Ratschlägen und PC-Kenntnissen bei der Entstehung der Doktorarbeit bestärkt und ermutigt haben, vor allem meinem Mann Nils, auf dessen Hilfe ich mich stets verlassen konnte.

10 Lebenslauf

Zur Person

Name	Anne Grube, geb. Witt
Geburtsdatum	08.07.1981
Geburtsort	Itzehoe
Familienstand	verheiratet

Schule

1988 – 1992	Grundschule Sude-West, Itzehoe
1992 – 2001	Sophie-Scholl-Gymnasium, Itzehoe

Studium

2001 – 2007	Studium der Zahnmedizin Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
12/ 2007	Staatsexamen
01/2008	Approbation als Zahnärztin

Beruf

03/08 –12/09	Assistenz-ZÄ in Hamburg Barmbek und Lüneburg
01/10 – 02/12	Assistenz-ZÄ /angest. ZÄ in Hamburg Winterhude
01/11-03/13	angestellte ZÄ in Elmshorn
04/12-09/12	angestellte ZÄ in Hamburg Bramfeld
seit 04/13	angestellte ZÄ in Hamburg Dulsberg