

Aus der Klinik für Unfallchirurgie  
Der Fakultät für Klinische Medizin Mannheim  
(Direktor: Prof. Dr. med. U. Obertacke)

**Immuninflammatorische Gewebereaktion auf Stahl- und Titanplatten  
bei der Osteosynthese langer Röhrenknochen**

Inauguraldissertation  
Zur Erlangung des Medizinischen Doktorgrades  
der  
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
zu  
Heidelberg

vorgelegt von  
Stephan Leiting

aus  
Düsseldorf  
2003

**2004 U 675**

UB Heidelberg



10156141 , 9

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Dr. h.c. Klaus van Ackern

Referent: Herr Priv.-Doz. Dr. med. Gregor Voggenreiter

**Tag der Promotion: 28. April 2004**

Für Euch

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	6
<b>1. Einleitung</b>	
1.1 Geschichtlicher Überblick über die Entwicklung von Implantatwerkstoffen	9
1.2 Bedeutung der Implantatwerkstoffe in der Unfallchirurgie	11
1.3 Titan als Implantatwerkstoff	14
1.4 Rostfreier Stahl als Implantatwerkstoff	16
1.5 Grundriss des Immunsystems	20
1.6 Fragestellung	22
<b>2. Material und Methoden</b>	
2.1 Patientenkollektiv mit Titanimplantat	24
2.2 Patientenkollektiv mit Stahlimplantat	26
2.3 Gewinnung der Proben	28
2.4 Verarbeitung der Proben	
2.4.1 Fixierung und Einbettung	31
2.4.2 Herstellen der Mikrotomschnitte	33
2.5 Immunhistochemie	
2.5.1 Vorbereitungen für die Immunhistochemie	33
2.5.2 Durchführung der immunhistochemischen Färbung	36
2.6 Auswertung am Lichtmikroskop	39
2.7 Transmissionslektronenmikroskopie	
2.7.1 Vorbereitung der Präparate	41
2.7.2 Auswertung am Elektronenmikroskop	42
2.8 REM-EDX-Analyse	44
<b>3. Ergebnisse</b>	
3.1 Charakteristik der Gewebereaktion auf Titanimplantate	
3.1.1 Titanpartikel im periimplantären Gewebe	45
3.1.2 CD68 positive Makrophagen	47
3.1.3 Antigenpräsentierende Zellen (HLA-DP/DQ/DR)	49

3.1.4 CD45RO positive T-Lymphozyten	51
3.1.5 CD3 positive T-Lymphozyten	54
3.1.6 CD8 positive T-Lymphozyten	55
3.1.7 CD79 $\alpha$ positive B-Lymphozyten	57
3.2 Charakteristik der Gewebereaktion auf Stahlimplantate	
3.2.1 Stahlpartikel im periimplantären Gewebe	59
3.2.2 CD68 positive Makrophagen	61
3.2.3 Antigenpräsentierende Zellen (HLA-DP/DQ/DR)	63
3.2.4 CD45RO positive T-Lymphozyten	65
3.2.5 CD3 positive T-Lymphozyten	67
3.2.6 CD8 positive T-Lymphozyten	68
3.2.7 CD79 $\alpha$ positive B-Lymphozyten	70
3.3 Elektronenmikroskopie	
3.3.1 Implantatkontaktgewebe zu Titanimplantaten	72
3.3.2 Implantatkontaktgewebe zu Stahlimplantaten	73
3.4 REM-EDX-Analyse	75
<b>4. Diskussion</b>	
4.1 Charakterisierung der Immunreaktion	
4.1.1 Charakteristik der Gewebereaktion auf Titanimplantate	77
4.1.2 Charakteristik der Gewebereaktion auf Stahlimplantate	78
4.2 Bewertung des Titans als Implantatwerkstoff	80
<b>5. Zusammenfassung</b>	96
<b>6. Literatur</b>	
6.1 Literaturverzeichnis	98
6.2 Eigene Veröffentlichungen	108
<b>7. Verzeichnisse</b>	
7.1 Abbildungsverzeichnis	109
7.2 Tabellenverzeichnis	111
<b>8. Lebenslauf</b>	112
<b>9. Danksagung</b>	113

## Abkürzungsverzeichnis

- $\mu\text{m}$  = Mikrometer
- $\frac{1}{3}$ -Rohr-Pl. = Drittelrohrplatte
- $\text{\AA}$  = Angström
- AEC = 3-Amino-9-ethylcarbazol
- Ag = Silber
- Al = Aluminium
- AO = Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthese
- Aqua dest. = destilliertes Wasser
- ASTM = American Society for Testing and Materials
- Au = Gold
- BHN = Brinell Hardness Number
- bzw = beziehungsweise
- C = Kohlenstoff
- Ca = Calcium
- CD = cluster of differentiation
- $C_H$  = konstante Domäne der schweren Kette
- $C_L$  = konstante Domäne der leichten Kette
- CN = 4-Chlor-1-Naphtol
- Co = Kobalt
- Cr = Chrom
- Cu = Kupfer
- d = Durchmesser
- DAB = 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
- DCP = Dynamic Compression Plate
- Dk = Dänemark
- $e^-$  = Elektron
- EDX = energy dispersive x-ray
- Fa = Firma
- $F_{AB}$  = fragment antigen binding
- $F_C$  = fragment crystalline
- Fe = Eisen
- g = Gramm
- GN = Giganewton
- H = schwere Kette
- h = Stunde
- $H^+$  = Wasserstoffion
- $H_2$  = Wasserstoffmolekül
- $H_2O$  = Wasser
- $H_2O_2$  = Wasserstoffperoxid
- HLA = human leucocyte antigen
- IgA = Immunglobulin A

- IgE = Immunglobulin E
- IgG = Immunglobulin G
- IL = Interleukin
- J = Jahre
- kDa = KiloDalton
- Kondylenpl. = Kondylenplatte
- L = leichte Kette
- LCDCP = Low Contact Dynamic Compression Plate
- m = männlich
- M = Molar
- MCP = monocyte chemoattractant protein
- Me = Metall
- Mg = Magnesium
- MHC = major histocompatibility complex
- Min = Minute
- MIP = monocyte inflammatory protein
- ml = Mililiter
- Mm = Milimeter
- mM = millimolar
- Mo = Molybdän
- Mon = Monate
- MPa = Megapascal
- mRNA = messenger ribonuclein acid
- N = Newton
- Na = Natrium
- NaCl = Natriumchlorid
- Nb = Niob
- Ni = Nickel
- Nm = Nanometer
- Nr. = Nummer
- OH<sup>-</sup> = Hydroxidion
- OSG = oberes Sprunggelenk
- Pb = Blei
- PBS = Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
- PDGF = platelet derived growth factor
- PMMA = Polymethylmetacrylat
- ppm = parts per million
- Pt = Platin
- Reko.PI = Rekonstruktionsplatte
- RT = Raumtemperatur
- Rundlochpl. = Rundlochplatte
- Si = Silizium
- TGF = tissue growth factor
- Ti = Titan
- TNF = Tumornekrosefaktor

- UTN = unreamed tibia nail
- V = Vanadium
- $V_H$  = variable Domäne der schweren Kette
- $V_L$  = variable Domäne der leichten Kette
- w = weiblich
- Zi = Zink



# 1. Einleitung

## 1.1 Geschichtlicher Überblick über die Entwicklung von Implantatwerkstoffen

Die Geschichte der Osteosynthese ist schon immer mit der Suche nach dem idealen Implantatmaterial verbunden. Dabei wurden im Laufe der Zeit zahlreiche Metalle implantiert und getestet, wobei in der vorantiseptischen Zeit nur Einzelversuche möglich waren. Außerhalb der Frakturversorgung fanden Metalle schon bei den Römern vor allem zur Wundversorgung Verwendung. Die erste dokumentierte Metallimplantation führte 1665 erstmalig Petronius durch, indem er eine angeborene Gaumenspalte mit einer Goldplatte versorgte. Der erste Einsatz von Metallen im Rahmen der Osteosynthese erfolgte 1775 durch Lapayode und Sicre in Toulouse, die eine Humerusfraktur mittels eines Metalldrahtes fixierten (Schuster 1975).

Untersuchungen zur Verträglichkeit von Metallimplantaten wurden erstmals im 19. Jahrhundert durchgeführt (Schuster 1975). Von den im Laufe der Zeit untersuchten Metallen, wiesen die Edelmetalle, wie Gold, Silber und Platin die geringsten Reizungen im menschlichen Körper auf, waren aber in ihrer praktischen Anwendung wegen der hohen Kosten und der vergleichbar schlechten mechanischen Eigenschaften nur bedingt einsetzbar (Schuster 1975). Andere Metalle, wie zum Beispiel Messing, Kupfer oder Eisen eigneten sich, bei guten mechanischen Eigenschaften, wegen der schlechten Biokompatibilität nicht für die Klinik (Schuster 1975). Seit den 20er Jahren des vorherigen Jahrhunderts setzte sich rostfreier Stahl zunächst vor allem in der Endoprothetik als wichtiger Implantatwerkstoff durch (Schuster 1975, Arens und Hansis 1998). Daneben gewannen seit 1936 eisenfreie, molybdänhaltige Gusslegierungen auf Kobalt- und Chrombasis besonders in der Dentalmedizin an Bedeutung. Vitallium wurde seit 1943 vor allem in den USA für Nägel, Schrauben und Platten verwendet (Schuster 1975). Titan gewann nach seiner kommerziellen Herstellung 1946 besonders in den 50er Jahren als Implantatwerkstoff an Bedeutung und wird bis heute ständig weiterentwickelt (Schuster 1975). Andere Metalle wie Tantal und Niob haben hingegen bis jetzt nur wenige Einsatzmöglichkeiten gefunden (Müller 1991).

Einige weitere bedeutsame geschichtliche Daten seien im folgenden tabellarisch genannt (Schuster1975):

- 1827: *Vearny-Rodgers* (New York) führt den Silberdraht zur Zerklage von Humerusfrakturen ein
- 1828: *Somme* (Antwerpen) verwendet Silberdrähte zur Vereinigung von Femurfrakturen
- 1829: *Lever* testet Gewebeverträglichkeit von Metallen im Körper – Platin zeigt die geringsten Irritationen, Blei erweist sich als toxisch
- 1830: *Mott* weist auf die Bedeutung von „gut geglühtem“ Eisendraht hin.
- 1858: *von Langenbeck* versorgt die erste Schenkelhalsfraktur mit einem Silberbolzen
- 1875: *F. König* stabilisiert eine Schenkelhalsfraktur mit einer Stahlschraube
- 1877: *Lister* führt die Patellanaht mit Silberdraht ein
- 1886: *Hansmann* entwickelt die erste Osteosyntheseplatte. Sie bestand aus nickelüberzogenem Stahl mit eingebohrten Löchern
- 1893: *Booth* und *Curtis* verwenden Aluminiumplatten am Schädeldach
- 1893: *W.A.Lane* entwickelt Stahlschrauben und –platten für die Frakturversorgung
- 1904: *Bayer* stellt fest, dass die Gewebereizung durch Metalle in der Reihenfolge Silber, Aluminium, Eisen, Messing und Kupfer zunimmt
- 1909: Entwicklung vom Platten aus Al, Ag und Cu durch *A.Lambotte*
- 1910: *Kirschner* setzt sich für die Verwendung von Klavierseiten-Draht aus Chrom-Nickel-Stahl für Knochennähte ein
- 1912: *W.O'Neil Sherman* konstruiert eine Osteosyntheseplatte aus mit Vanadium legiertem Stahl mit hoher Festigkeit und Zähigkeit
- 1920: Krupp beginnt mit der Herstellung von CrNi-Stählen (CrNi188) und CrNi-Mo-Stählen (CrNiMo1810); der V2A-Stahl wird der dominierende Werkstoff für Allenthesen
- 1924: *Zierold* testet im Tierversuch die Reaktion des Knochens auf Au, Ag, Al, Zi, Pb, Cu, Ni, Mg, Fe, Stellite, Al-Legierungen und Stahl. Au, Ag, Stellite, Pb und Al werden im Körper gut vertragen, während Cu und andere Metalle vom Knochen umwuchert werden
- 1925: *Orsos* konstatiert, dass ungleiche Metalle für die Osteosynthese ungeeignet sind

- 1929: *Singer* und *Hoder* stellen in vitro die Zellwachstumshemmung durch Cu, Ag und Hg fest. Au, Pt und Pb zeigen diese Reaktion nicht
- 1930: *Erdle* entwickelt eine Gussprothese aus einer CoCr-Legierung
- 1936: *Venable* und *Stuck* entdecken elektrolytische Aktivitäten bei allen Osteosynthesemetallen
- 1938: *P.Wiles* stellt die erste Prothese für den totalen Hüftgelenkersatz her
- um 1940: Vitallium findet breite Anwendung vor allem in den USA
- 1940: *Bothe* testet in Hunden alle gängigen Metalle und sieht neben Stahl und Vitallium Titan als alternatives Implantatmetall
- 1940- 1950: *Leventhal* untersucht Tantal, Titan sowie kaltverformbare wolfram- und nickelhaltige Kobaltlegierungen als Implantatwerkstoffe
- 1946: *J. und R. Judet* konzipieren erstmals eine Hüftprothese unter biomechanischen Gesichtspunkten
- ab 1946: *J.Cotton* führt die kommerzielle Herstellung von Titan und Titanlegierungen ein
- 1951: *Leventhal* sieht in Titan ein ideales Metall für die Frakturversorgung, besonders, da er es als „inert“ betrachtet
- 1958: die Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen (AO) wird gegründet und verwendet V4A-Suprastähle für ihre Implantate

## 1.2 Bedeutung der Implantatwerkstoffe in der Unfallchirurgie

In der Behandlung von Knochenbrüchen wird seit dem Beginn der 60er Jahre der offenen Reposition und internen Fixation mit Metallimplantaten der Vorrang gegenüber der konservativen Behandlung mit Gips und Extension gegeben. Die für diese Zwecke verwendeten Implantatmetalle müssen dafür eine vorübergehende Fixation der Fraktur ermöglichen, damit eine funktionelle Behandlung durchgeführt werden kann (Arens und Hansis 1998). Für einen längeren Zeitraum sind die Allenthesen die alleinigen Träger der

Körperlast und damit Teilhebelarme vieler Bewegungen. Durch die ständige Muskeltätigkeit werden ungezählte Schwingungen, aber auch maximale Kraftwirkungen übertragen. Die mechanischen und dynamischen Gesetze haben hier ihre besondere Gültigkeit. Wesentliche Implantatformen für die Frakturbehandlung sind dabei die extramedulläre Platte sowie der intramedulläre Nagel. Für diese Implantate ist bereits seit langem rostfreier Stahl (V4A-Stahl) nach ISO 5832-1 im Gebrauch. Alternativ steht kommerzielles Reintitan nach ISO 5832-2 zur Verfügung (Arens und Hansis 1998). Dabei sind an Materialien für die operative Stabilisierung von Frakturen besonders hohe Materialanforderungen zu stellen.

Dies gilt zunächst einmal für die physikalischen und mechanischen Eigenschaften des Materials. Eine für die Klinik besonders wichtige Eigenschaft ist dabei das Elastizitätsmodul. Darunter versteht man die Fähigkeit eines Materials nach dem Ende einer deformierenden Kraft wieder in die ursprüngliche Form zurückzukehren. Dieser Parameter beträgt beim Knochen  $10 \text{ GN/m}^2$  und sollte beim verwendeten Implantatmaterial möglichst ähnlich sein, um die mechanische Belastung des Implantates zu minimieren. Außerdem muss das Material ermüdungsresistent und die Streß-Relaxation minimal sein, damit die Kompression der Fraktur nicht nachlässt (Schuster 1975). Gute Duktilität ist unentbehrlich, damit die Festigkeit auch nach Anpassung an den Knochen erhalten bleibt (Müller 1991). Das verwendete Material sollte günstige Eigenschaften in Bezug auf die Verarbeitung während der Produktion und während der chirurgischen Implantation (Verbiegung) aufweisen.

Chemisch gesehen ist die Korrosion von Implantatmetallen von besonderer Bedeutung. Die chemische Wechselwirkung zwischen Implantatwerkstoff und Empfängergewebe setzt einen Austausch von Ionen zwischen der Metalloberfläche und dem biologischen Gewebe voraus. Die Körperflüssigkeit wirkt dabei als komplexer Elektrolyt, was zur Bildung eines galvanischen Elementes führt. Dabei läuft prinzipiell die folgende Reaktion ab (Schuster 1975):

Anodische Teilreaktion:  $\text{Me} \rightarrow \text{Me}^+ + \text{e}^-$

Kathodische Teilreaktion:  $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$  (Wasserstoffreduktion)

$\text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} + 4\text{e}^- \rightarrow 4\text{OH}^-$  (Sauerstoffreduktion)

Die anodische Teilreaktion entspricht der Metallauflösung, wodurch Ionen in den Körper freigesetzt werden können und der Korrosionsvorgang stattfindet. Die Geschwindigkeit der Korrosion stellt ein direktes Maß für den Grad der Interaktion zwischen Implantat und Empfängergewebe dar. Bei hoher Korrosionsbeständigkeit kommt es wegen der langsamen

Freisetzung von Ionen nur zu einer schwachen Wechselwirkung mit dem biologischen Gewebe. Schutz vor der Korrosion bietet die sogenannte Passivierung. Dabei bilden die bei der anodischen Metallauflösung entstehenden schwerlöslichen Reaktionsprodukte wie Metallhydroxide und -oxide eine auf der Metalloberfläche festhaftende, undurchlässige Schutzschicht (Ruedi 1975, Schuster 1975).

Die Korrosion von metallischen Implantaten kann das umliegende Gewebe prinzipiell auf drei Arten beeinflussen (Ruedi 1975, Schuster 1975):

1. elektrische Ströme können das Verhalten von Zellen beeinflussen;
2. pH und Sauerstoffpartialdruck können während des Korrosionsprozesses variieren, was zu einer Änderung der chemischen Umgebung führt;
3. die Freisetzung metallischer Ionen kann eine Veränderung des Zellmetabolismus zur Folge haben.

Die Korrosion von metallischen Implantaten wird in verschiedenen Formen beobachtet (Ruedi 1975, Schuster 1975):

1. Spalt- und Lochfraßkorrosion: häufigste Form der Korrosion. Es handelt sich um eine lokale Zerstörung der Passivschicht zum Beispiel durch mechanische Oberflächenzerstörung, Strukturfehler oder Verunreinigungen. An schwer zugänglichen Stellen, wie Löchern und Spalten, kann durch Mangel an Sauerstoff eine Repassivierung nicht erfolgen, so dass sie gegenüber dem übrigen passiven Bereich anodisch werden und zu korrodieren beginnen
2. Spannungsrissskorrosion: Bildung und Ausbreitung von Rissen infolge gleichzeitiger Wirkung von statischer, mechanischer Zugbeanspruchung und Korrosionsangriff
3. galvanische Korrosion

Häufig jedoch lässt sich eine beobachtete Korrosion nicht eindeutig einer der oben genannten Korrosionsarten zuordnen.

Wichtig für den postoperativen Verlauf ist des weiteren eine möglichst geringe Empfänglichkeit für Infektionen, da diese die bedeutendste Komplikation darstellen (Arens und Hansis 1998).

Neben einer ausreichenden mechanischen Festigkeit muss das verwendete Material aber auch eine optimale Biokompatibilität besitzen, da es einen bestimmten Zeitraum, zum Teil sogar für den Rest des Lebens, im Körper des zu versorgenden Patienten verbleibt. In diesem Zusammenhang ist eine möglichst geringe Irritation des lokalen oder ortsfremden Gewebes

und eine geringe allergene Potenz zu fordern. Natürlich muss das Material in unbeschränkten Mengen zu einem günstigen Preis vorhanden sein und ein konstant günstige Qualität aufweisen (Müller 1991).

### 1.3 Titan als Implantatwerkstoff

Titan wurde 1791 entdeckt und 1887 von Nilson und Petterson zum ersten Mal in unreiner Form hergestellt (Ellerbe und Frodel 1995). Erst 1919 gelang es Hunter genügend reines Titan herzustellen, und seine Eigenschaften zu charakterisieren (Brown 1997). Nachdem 1946 nun durch Cotton ein Verfahren zur kommerziellen Herstellung von Titan entwickelt wurde, schlug es 1951 Leventhal als Implantatwerkstoff für die Chirurgie vor (Leventhal 1951). Seitdem wurden zwanzig verschiedene Legierungen hergestellt und getestet, von denen besonders drei Formen in der Klinik Anwendung finden: Reintitan, die Ti-Al6-V4 Legierung mit 6% Aluminium und 4% Vanadium und Ti-Al6-Nb7 (Arens und Hansis 1998).

Beim Reintitan handelt es sich um ein unlegiertes Titan mit geringen Verunreinigungen von Kohlenstoff, Eisen oder Sauerstoff. Titan hat einen hohen Schmelzpunkt und nimmt im geschmolzenen Zustand zusätzliche Verunreinigungen auf, weshalb es in einem Vakuumofen geschmolzen wird. Das reine Titan weist im Vergleich zu den Titanlegierungen eine geringe Festigkeit jedoch eine hohe Zähigkeit auf. Durch Zulegieren von Aluminium und Vanadium und durch eine nachträgliche Wärmebehandlung resultiert eine Zweiphasenlegierung mit gleichmäßiger Verteilung der Mischkristallphasen. Diese Legierungen zeichnen sich durch eine erhöhte Festigkeit und verbesserte Ermüdungserscheinungen aus. Im gegossenen Zustand weist das Gefüge nach der Abkühlung eine lamelläre Duplexstruktur auf. Dieser Zustand wird anschließend einer Homogenisierung unterzogen. Im warmverformten Zustand besteht die TiAl6V4- Legierung aus feinen  $\alpha$ -Körnern und einer sehr feinen Verteilung von interkristallinen  $\beta$ -Teilchen (Williams 1981).

Die mechanischen Eigenschaften des Titans sind abhängig vom Reinheitsgrad. Reintitan ist in vier verschiedenen Reinheitsgraden erhältlich. Die reinste Form, Grad 1, enthält einen maximalen Gewichtsanteil von 0,18% Sauerstoff und 0,2% Eisen und stellt die weichste Form dar. Die Brinell Hardness Number (BHN) beträgt 120 und die Bruchdehnung ist als Maß für

die Duktilität am höchsten. Grad 2 darf maximal 0,25% Sauerstoff und 0,3% Eisen beinhalten und hat demnach eine BHN von 160 bei einer Bruchdehnung von 28%. Reintitan des Grades 3 darf maximal 0,35% Sauerstoff und 0,3% Eisen beinhalten und hat eine BHN von 200 bei einer Bruchdehnung von 25%. Die härteste Form vom Grad 4 enthält maximal 0,4% Sauerstoff und 0,5% Eisen. Seine Härte liegt bei 250 (BHN) und seine Bruchdehnung bei 23%. Allen Graden gemeinsam sind maximale Verunreinigungen von: 0,03% Stickstoff, 0,015% Wasserstoff und 0,1% Kohlenstoff (Williams 1981).

Die Zugfestigkeit des Reintitans liegt entsprechend der vier erhältlichen Stufen zwischen 240 MPa (Grad 1) und 500MPa (Grad 4) (Disegi und Wyss 1989). Sein Elastizitätsmodul beträgt ungefähr  $100 \text{ GN/m}^2$  und ist damit im Vergleich zu anderen Materialien wie Vitallium oder Stahl ungefähr halb so groß. Diese Eigenschaft erscheint positiv im Bezug auf eine optimale Konturierung und Anpassung an die anatomischen Gegebenheiten des Knochens. Dies wird aber durch den doch immensen Unterschied zum Elastizitätsmoduls des Knochens ( $10 \text{ GN/m}^2$ ) relativiert (Williams 1976).

Neben den mechanischen Eigenschaften ist, wie bereits erwähnt, die Infektanfälligkeit des Implantatwerkstoffes im Bezug auf den postoperativen Verlauf von großer Bedeutung. In diesem Zusammenhang konnten Arens et al 1996 in einem Kaninchenmodell eine für Titanimplantate im Vergleich zu Stahl höhere Infekteresistenz nachweisen (Arens et al. 1996). Die Infektrate betrug dabei für Stahlplatten 75% und für Titanplatten 25% und war damit signifikant niedriger. Klinisch konnte dies aber bis heute nicht belegt werden.

Da die Herstellung und Verarbeitung von Titan vergleichsweise aufwendig ist, sind Titanimplantate im Vergleich zu Stahlimplantaten um ungefähr 20%-40% teurer (Arens und Hansis 1998).

Entscheidende Bedeutung erlangte das Titan besonders aufgrund der häufig beschriebenen herausragenden Biokompatibilität. Wesentliche Voraussetzung für diese ist seine gute Korrosionsbeständigkeit. Grundlage dieser Korrosionsbeständigkeit ist die sich ausbildende Oxidschicht, die beim Reintitan  $d = 32 \pm 8 \text{ \AA}$  und bei der TiAl6V4- Legierung  $d = 83 \pm 12 \text{ \AA}$  beträgt und sich nach Zerstörung innerhalb von Millisekunden nachbildet (Brown 1997). Die Korrosionsrate in einer körperanalogen Flüssigkeit beträgt dabei nach Williams et. al rund  $30 \mu\text{g pro cm und Jahr}$  (Williams 1981). Betrachtet man die einzelnen Korrosionsarten, so sind in Bezug auf die Spannungsrisskorrosion bisher keine Berichte über das Versagen von Titanimplantaten infolge von Spannungsrisskorrosion bekannt (Ruedi 1975).

Lochfraßkorrosion tritt in der Regel an Verunreinigungen oder Fehlstellen in der Oxidschicht auf. Daher ist bei der Herstellung von Titanbauteilen darauf zu achten, dass durch den Verarbeitungsprozess keine Verunreinigungen in die Oxidschicht eingelagert werden. Gegenüber galvanischer Korrosion zeigt sich Titan sehr beständig, so dass prinzipiell eine Kombination mit anderen Metallen möglich ist. Bei Kontakt zu rostfreiem Stahl tritt jedoch am Stahl eine anodische Reaktion verbunden mit starker Auflösung auf (Ruedi 1975).

Im Bezug auf die Biokompatibilität wird Titan in der Literatur im Allgemeinen als biologisch inert angesehen. Zu diesem Schluss kam schon Leventhal 1951 und bezeichnete Titan als idealen Implantatwerkstoff zur Fixierung von Frakturen (Leventhal 1951). Auch Perren und Gautier sprechen bei der Vorstellung des Konzeptes der *low contact dynamic compression plate* (LC-DCP) 1990 vom „biologisch idealen Implantatmaterial“ und vom „Material der Wahl ...“, da es eine „ausgezeichnete Gewebeverträglichkeit“ zeige und Allergien auf Reintitan kaum bekannt seien (Perren et al. 1990). Diese Ansicht vertreten auch andere Autoren und dies hat dazu geführt, dass die Arbeitsgemeinschaft Osteosynthese (AO) in ihrem „Manual der Osteosynthese“ Titan als „extrem unlöslich und damit inert“ beschreibt (Müller M.E. 1991). Als Konsequenz daraus leitet sich die in der neusten Auflage der „Leitlinien der Unfallchirurgie“ (Blauth 2000) die Empfehlung ab, Implantate aus Reintitan im Körper des Patienten belassen zu können.

## **1.4 Rostfreier Stahl als Implantatwerkstoff**

Wissenschaftler der Krupp-Werke und der englische Forscher Brearly machten Anfang dieses Jahrhunderts die Entdeckung, dass hochlegierte Chrom- und Chrom-Nickelstähle sehr korrosionsresistent sind. 1919 erhielt die Firma Krupp mehrere Patente für medizinische Zwecke und so wurde der V2A-Stahl das beherrschende Metall für Allenthesen. Später wurde der von Krupp mit V2A bezeichnete Stahl durch die Suprastähle V4A und V44A abgelöst (Schuster 1975).

Stahl ist im einfachsten Sinn eine Lösung von Eisen und Kohlenstoff (Laing 1959). Nach Krupp sind nichtrostende Stähle „Stahllegierungen, die der Zerstörung von der Oberfläche her



unter bestimmten Bedingungen hohen Widerstand entgegensetzen oder sie gar vermeidbar machen. Sie sind rosttrage oder sogar rost- und säurebeständig.“ (Schuster 1975) Für die Korrosionsresistenz sorgen dabei Zusätze von verschiedenen Elementen, von denen jedes einzelne bestimmte Eigenschaften auf das Eisen überträgt. Die für die Eigenschaften des Stahls wichtigsten Legierungszusätze sind Chrom, Nickel, Molybdän und Kohlenstoff (Schuster 1975). Dabei ist der in der Medizin hauptsächlich verwendete Stahl ein hochlegierter Stahl mit 17-20% Chrom, 12-14% Nickel und 2-4% Molybdän (ASTM-Bezeichnung: 316L) (Ellerbe 1995).

Der Kohlenstoffgehalt darf maximal 0,03% betragen. Kohlenstoff erhöhet zwar die Festigkeit des Chrom-Nickelstahls, verringert aber seine Widerstandsfähigkeit gegenüber interkristalliner Korrosion. Diese tritt bei kritischen Temperaturen von ca. 400-900 °C auf und führt dazu, dass sich der Stahl schon in relativ schwachen korrosiven Medien in einzelne Körner auflöst. Dabei scheidet sich der Kohlenstoff als Chrom Karbid an den Korngrenzen ab (Schuster 1975).

Chrom behält auch in Legierungen seine Eigenschaft von Wasser und Luft nicht angegriffen zu werden. Als Legierungsanteil bewirkt es die Ausbildung eines Passivfilms und ist damit für die Korrosionsresistenz verantwortlich. Um eine ausreichend hohe Passivierbarkeit zu gewährleisten muss der Chromgehalt mindestens 12% betragen und das Chrom-Nickel Verhältnis genau abgestimmt sein. In geschmiedeten Zustand besitzt die Legierung eine rein austenitische Kristallstruktur (Schuster 1975).

Nickel hat die Eigenschaft, den Bereich des Austeniten zu erweitern. Bei einem Legierungsanteil von über 10% zu Chromstählen bleibt die austenitische Struktur auch bei Raumtemperatur stabil. Durch Zulegieren von 2-4% Molybdän wird die Beständigkeit gegen Lochkorrosion erhöhet. Neben dem beschriebenen CrNiMo-Stahl (316L) sind in jüngerer Zeit Duplexstahle (25Cr-7Ni-4Mo-N) für medizinische Anwendungen erhältlich, die einen höheren Molybdän- und Stickstoffgehalt als die austenitischen Stähle aufweisen. Sie sind damit beständiger gegen Lochfraß und Spaltkorrosion (Schuster 1975).

Die mechanischen Eigenschaften der rostfreien Stähle sind stark von den unterschiedlichen Herstellungsverfahren abhängig. Rostfreie Stähle weisen eine niedrige Dehngrenze (0,2%-Dehngrenze) auf, ihre Bruchdehnung ist jedoch sehr hoch. Deshalb können Chrom-Nickel Stähle zu den unterschiedlichsten Profilen warm- oder kaltverformt werden (Schuster 1975, Gotman 1996).

Die von der jeweiligen Herstellungsart abhängigen Eigenschaften seien im folgenden tabellarisch dargestellt (Gotman 1996):

Tabelle 1: Mechanische Eigenschaften von 316L Stahl (aus: Gotman 1996)

Werkstoffzustand	Dichte, $\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	Elastizitätsmodul, E (GPa)	Dauerfestigkeit, $\sigma_y$ (Mpa)	Zugfestigkeit, $\sigma_{UTS}$ (MPa)
Geglüht	7,9	200	170	480
30%ig kaltverformt	7,9	200	840	910
80%ig kaltverformt	7,9	200	1100	1350

Im Vergleich zu Titan hat der rostfreie Stahl somit eine höhere Steifigkeit und geringere Verformbarkeit. Dies hat in der chirurgischen Anwendung die Konsequenz, dass Stahlimplantate bei Extrembelastungen eher brechen, während Titanimplantate sich eher verbiegen (Arens und Hansis 1998).

Die Korrosionsbeständigkeit der Chrom-Nickel Stähle beruht im Wesentlichen auf der Ausbildung eines dünnen Passivfilms (1-5 nm) auf der Werkstoffoberfläche, der eine allgemeine Korrosion in der Regel verhindert. Bei Vorliegen von lokalen mechanischen Oberflächenzerstörungen, Heterogenitäten oder Verunreinigungen kann dieser Passivfilm durchbrochen werden. Unter spezifischen Umgebungsbedingungen, wie zum Beispiel einer erhöhten Chloridkonzentration, können sich die Korrosionsbedingungen drastisch ändern und durch eine stark erhöhte Passivierungsstromdichte eine spontane Repassivierung der lokal zerstörten Werkstoffoberfläche unmöglich machen (Ruedi 1975, Hierholzer 1991, Gotman 1996). Durch die beschränkte Repassivierbarkeit weisen rostfreie Stähle eine im Vergleich zu Kobalt-Chrom- oder Titanlegierungen geringere Beständigkeit gegen Lochfraß- oder Spaltkorrosion auf, obwohl durch Zulegieren von Molybdän die Lochfraßbeständigkeit stark erhöht wird (Schuster 1975). Spaltkorrosion wurde bei Osteosynthesematerialien an der Grenzfläche zwischen Platte und Schraube festgestellt, an der auch Reibekorrosion nicht auszuschließen ist (Hierholzer 1991). Neben diesen Korrosionserscheinungen ist zusätzlich

die bereits erwähnte interkristalline Korrosion hinzuzufügen, die als besonders kritisch einzustufen ist, da sie, sobald einmal gestartet, rasch zum Versagen führen kann und relativ große Korrosionsprodukte in Form von Partikeln im Körpergewebe freigesetzt werden (Schuster 1975).

Die beobachteten Korrosionsphänomene des rostfreien Stahls haben natürlich besonderen Einfluss auf dessen Biokompatibilität, die im allgemeinen als unproblematisch gilt. Trotzdem berichten Ferguson et al. 1962, nach Untersuchungen an 316L Stahlimplantaten am Kaninchen über Chrom, Nickel und Eisen-Ionen im lokalen Gewebe und über Nickel-Ionen in der Lunge (Ferguson 1962). Seitdem sind viele Publikationen bekannt, die über Ionenfreisetzung und Gewebereaktionen berichten. So spricht Bessho (Bessho et al. 1995) von schwerer Korrosion auf der Oberfläche von Osteosyntheseplatten aus rostfreiem Stahl, die er elektronenmikroskopisch untersuchte. Auch er fand Eisen, Chrom und Nickel im Plattenkontaktgewebe, wobei er bei manchen Patienten eine klinisch manifeste Dermatose im Rahmen einer Typ 4 Hypersensitivität feststellte.

Die wohl umfangreichsten Untersuchungen zur Biokompatibilität von rostfreiem Stahl veröffentlichte 1991 Hierholzer (Hierholzer 1991). Er konnte die Anreicherung der implantatspezifischen Metalle Nickel, Chrom, Molybdän und auch Kobalt im Kontaktgewebe zu Stahlplatten in Abhängigkeit von der Implantatliegezeit nachweisen. Darüber hinaus konnte er zeigen, dass im Vergleich hierzu die Konzentrationen der oben genannten Metalle in der Umgebung von infizierten Osteosynthesen und Osteosynthesen mit verzögertem Heilungsverlauf erhöht ist. Histologisch fand er eine immunologische Reaktion auf lichtmikroskopisch sichtbare Metallpartikel. Dieses bestätigten auch andere Autoren wie zum Beispiel in immunhistochemischen Untersuchungen aus der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie (Torgersen et al. 1995; Katou et al. 1996).

An Organkulturen konnte Gerber den toxischen und wachstumshemmenden Effekt von verschiedenen Metallen, darunter Eisen, Chrom und Nickel zeigen (Gerber et al. 1975).

Eine bekannte Gewebereaktion auf rostfreien Stahl ist die Ausbildung einer bindegewebigen Kapsel (Ruedi 1975). Dies ist Ausdruck einer geringen Gewebeadhärenz, die zu mechanischer Irritation durch Gleitbewegungen im Implantat-Gewebe-Interface führt. Im Totraum zwischen Kapsel und Implantat entsteht so ein flüssigkeitsgefüllter Hohlraum, in dem sich unter Umständen Bakterien ausbreiten und vermehren können.

Im Bezug auf die Biokompatibilität des rostfreien Stahls steht natürlich auch die Frage der Allergisierung besonders auf die Legierungskomponenten Nickel und Chrom im Vordergrund. Die Prävalenzraten liegen dabei ungefähr bei vier bis sechs Prozent (Hierholzer 1991). Bei Osteosynthesen mit septischen oder aseptischen Komplikationen ist diese Rate statistisch auf etwa zehn Prozent erhöht. Vergleicht man hierbei die einzelnen Legierungskomponenten im Bezug auf ihre Allergieraten, so steht Nickel deutlich an der Spitze, gefolgt von Chrom, wohingegen Kobalt und Molybdän nur eine untergeordnete Rolle spielen. Trotz dieser recht hohen Hypersensitivitätsraten gegenüber Nickel und Chrom, sind solche allergische Reaktionen vom zellulären Typ (4) auf Stahlimplantate sehr selten. So spricht Lee 1995 von sieben berichteten Fällen. Diese Patienten entwickelten dabei ein chronisches Ekzem, welches am stärksten im Hautareal über dem Implantat auftrat und sich nach Entfernung des Implantates rasch zurückbildete (Lee et al. 1997).

## 1.5 Grundriss des Immunsystems

Um die in Kapitel 3 beschriebene immunologische Reaktion besser einschätzen zu können, soll im Folgenden ein kurzer Überblick über das Immunsystem und seine Funktion gegeben werden.

Das humane Immunsystem besteht aus drei sich einander ergänzenden Systemen: 1. dem unspezifischen zellulären System, 2. dem unspezifischen humoralen System und 3. dem spezifischen Immunsystem (Roitt 1991).

Grundlage des in unserem Zusammenhang besonders wichtigen unspezifischen zellulären Abwehrsystems stellt die Fähigkeit der weißen Blutkörperchen zur Phagozytose dar. Sie ist bei den Monozyten und den neutrophilen Granulozyten besonders ausgeprägt. Diese Zellen sind reichlich mit lysosomalen Enzymen ausgestattet, mit deren Hilfe sie das phagozytierte Material abbauen (Mikroorganismen, Zelltrümmer, Antigen-Antikörper-Komplexe). Neutrophile Granulozyten werden durch chemotaktische Stoffe an die Entzündungsorte gelockt. Die angelockten Phagozyten bilden Pseudopodien, welche die Fremdkörper bläschenartig einschließen (Phagosombildung). Der Abbau der Fremdkörper setzt ein, wenn

das Phagosom mit intrazellulären Lysosomen zum Phagolysosom verschmilzt. Blutmonozyten und Gewebemakrophagen spielen zudem eine wichtige Rolle bei der initialen Erkennung und Präsentation von Antigenen. Makrophagen besitzen in der Zellmembran Fc-Rezeptoren. An diese heften sich Immunglobuline, mit deren Hilfe sie Antigene binden, die sie anschließend durch lysosomale Enzyme in kleine Bruchstücke zerlegen (so genannte Antigenprozessierung). Hierbei werden unter Umständen zusätzliche antigene Strukturen freigelegt und für Lymphozyten zugänglich. Mittels der HLA-DP/DQ/DR- Moleküle werden diese Bruchstücke dann auf der Zelloberfläche präsentiert und für die T-Lymphozyten mittels ihres T-Zellrezeptors erkennbar. Überdies produzieren Makrophagen Zytokine, die das Wachstum von Lymphozyten anregen, wie z.B. das Interleukin-1. Es gibt somit funktionell wichtige Verbindungen zwischen den spezifischen und den unspezifischen Abwehrmechanismen (Roitt 1991).

Das spezifische Abwehrsystem besitzt eine zelluläre sowie eine humorale Komponente.

Die zelluläre Komponente wird durch die T-Lymphozyten repräsentiert. Diese befinden sich nicht andauernd in Blut und Lymphe auf Wanderschaft, sondern halten sich zwischenzeitlich in den sekundären lymphatischen Organen auf. Nach antigener Stimulation vermehren sie sich und differenzieren sich entweder zu so genannten T-Effektor- oder zu T-Gedächtniszellen. Die langlebigen Gedächtniszellen kreisen im Blut und erkennen ein Antigen bei erneuter Exposition wieder, um dann im Rahmen einer Sekundärreaktion rasch eine große Zahl von Effektorzellen zu bilden. Diese lassen sich anhand ihrer Oberflächenstruktur in die CD4 positiven T-Helferzellen und die CD8 positiven T-Killer- und T-Suppressorzellen differenzieren. Dabei sollen die T-Suppressorzellen eine überschießende Immunreaktion verhindern, indem sie die Aktivität von B- sowie T-Lymphozyten hemmen. T-Killerzellen haben die Aufgabe antigenträgende Zellen enzymatisch zu zerstören. T-Helferzellen schließlich sind wesentlich für die Abwehr körperfremder Substanzen, indem sie nach Stimulation durch Makrophagen zahlreiche Lymphokine freisetzen, die wiederum andere Körperzellen wie etwa die hämopoietischen Stammzellen oder Makrophagen aktivieren. Zu dieser Aktivierung ist es jedoch notwendig, das körperfremde Antigen mittels des spezifischen T-Zellrezeptors zu binden. T-Zellen können dies aber nur, wenn diese mit bestimmten antigenen Strukturen assoziiert sind, die auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen vorhanden sind. Diese Strukturen, die man Histokompatibilitätsantigene (HLA) nennt, existieren in zwei Formen: die Klasse 1, die auf

allen kernhaltigen Zellen des Organismus vorkommen und von den CD8 positiven Lymphozyten erkannt werden und die Klasse 2. Diese sind in der Membran von mononukleären Phagozyten und B-Lymphozyten vorhanden. Sie werden von T-Helferzellen erkannt, die daraufhin beginnen, Interleukine zu sezernieren (Roitt 1991).

B-Lymphozyten vertreten die humorale Komponente des spezifischen Abwehrsystems. In ihrer Zelloberfläche sind Immunglobuline verankert, die die spezifischen Rezeptoren für Antigene darstellen. Bei Kontakt des Rezeptors mit der zugehörigen antigenen Struktur wandelt sich der Großteil der B-Lymphozyten in Plasmazellen um, welche beginnen Immunglobuline zu produzieren, wenn sie gleichzeitig durch T-Lymphozyten und Makrophagen mittels Zytokinen stimuliert werden. Die Antikörper binden dann an ihr Epitop und beschleunigen so den Abbau (Roitt 1991).

Bei der immunologischen Abwehr sind im allgemeinen sowohl die humoralen als auch die zellulären Mechanismen beteiligt. Jedoch überwiegt bei manchen Erkrankungen die humorale Immunantwort, dagegen bei anderen die zelluläre Reaktion. Zu dieser Gruppe gehören viele der so genannten Kontaktallergien (Hierholzer 1991).

## 1.6 Fragestellung

Das Bild von Titan als biologisch inertem Implantatwerkstoff hat dazu geführt, dass entsprechend der Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthese Titanimplantate immer häufiger nicht mehr entfernt werden. Da somit Implantate eventuell Jahrzehnte im Körper des Patienten verbleiben, sind strenge Anforderungen an den Implantatwerkstoff zu stellen. Dies umfasst vor allem eine geringe Irritation des lokalen und ortsfremden Gewebes bei geringer allergener Potenz und geringer immunologischer Reaktion auf das Implantat.

Im Rahmen von Metallentfernungen von Osteosynthesematerial aus Reintitan konnte jedoch wiederholt die auch in der Literatur schon beschriebene schwarze Verfärbung des Implantatkontaktgewebes beobachtet werden (Meachim und Williams 1973; Williams 1974). Da diese Verfärbung des Gewebes in unmittelbarem Zusammenhang mit den jeweiligen Titanimplantaten stehen musste und als Zeichen einer makroskopisch sichtbaren Metallose gelten konnte, erschien die bisherige Charakterisierung des Titans überprüfungswürdig.

Dabei ist von Miniimplantaten aus der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie bekannt, dass die dort verwendeten Titanimplantate zu einer nicht unbeträchtlichen Gewebereaktion führen (Torgersen et al. 1995; Katou et al. 1996). Es ergab sich also die Fragestellung, wie sich die Gewebereaktion des periimplantären Gewebes auf Osteosynthesematerial aus Titan histologisch charakterisieren lässt. Unser besonderes Interesse galt dabei der Frage einer eventuellen immunologischen Antwort des Implantatkontaktgewebes, deren Charakteristik wir durch den Nachweis immunkompetenter Zellen, wie Makrophagen oder Lymphozyten zeigen wollten.

Unseres Wissens sind Gewebereaktionen auf Titanimplantate nach Osteosynthesen von Frakturen langer Röhrenknochen bisher nicht beschrieben worden. In diesem Zusammenhang galt es des Weiteren zu überprüfen, ob qualitative und semiquantitative Unterschiede in der Reaktion auf Osteosyntheseplatten aus Reintitan im Vergleich mit denen aus rostfreiem Stahl bestehen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Patientenkollektiv mit Titanimplantat**

Das von uns untersuchte Patientenkontingent umfasste 20 konsekutive Patienten im Untersuchungszeitraum von Januar 1999 bis Oktober 2000, die zur Versorgung von Frakturen langer Röhrenknochen mit einem Implantat aus Titan versorgt waren. Voraussetzung für die Einbeziehung in die Untersuchung war, dass die jeweiligen Patienten sowohl klinisch als auch laborchemisch keinerlei Infektzeichen aufwiesen. Den einbezogenen Patienten wurden nun im Rahmen elektiver Metallentfernungen Gewebeproben des Implantatkontaktgewebes entnommen. Das Durchschnittsalter lag im Kollektiv bei 24 Jahren und 8 Monaten, wobei der jüngste Patient 2 Jahre und der älteste 83 Jahre alt waren. 7 waren weiblichen und 13 männlichen Geschlechtes. Die Patienten waren insgesamt mit 15 LC-DCPs (low contact dynamic compression plate) und 7 Drittelrohrplatten versorgt, wobei zwei Patienten jeweils zwei Implantaten erhalten hatten. Die Osteosyntheseplatten bestanden dabei aus Reintitan. Die Verweildauer der Implantate lag im Durchschnitt bei 12,2 Monaten mit einer Spanne von 4 Monaten bis zu 31 Monaten. Die Daten der einzelnen Patienten sind im folgenden tabellarisch aufgelistet:



Tabelle 2: Patientenkollektiv mit Titanimplantat

Fall Nr.	Geschlecht	Alter	Implantat	Verweildauer	Frakturort
1	m	8 J	LCDCP	8 Mon	Femurschaft
2	w	39 J	1/3-Rohr-Pl.	12 Mon	OSG
3	w	48 J	1/3-Rohr-Pl.	11 Mon	distale Fibula
4	w	70 J	1/3-Rohr-Pl.	7 Mon	OSG
5	w	83 J	1/3-Rohr-Pl.	14 Mon	OSG
6	m	14 J	LCDCP	12 Mon	Femurschaft
			LCDCP	12 Mon	Femurschaft
7	w	34 J	1/3-Rohr-Pl.	12 Mon	OSG
8	m	8 J	LCDCP	8 Mon	Femurschaft
9	m	9 J	LCDCP	9 Mon	Femurschaft
10	m	15 J	1/3-Rohr-Pl.	9 Mon	distale Fibula
11	m	44 J	LCDCP	31 Mon	Tibiaschaft
			1/3-Rohr-Pl.	31 Mon	distale Fibula
12	m	9 J	LCDCP	11 Mon	Tibiaschaft
13	m	4 J	LCDCP	9 Mon	Femurschaft
14	w	2 J	LCDCP	4 Mon	Femurschaft
15	m	20 J	LCDCP	18 Mon	Tibiaschaft
16	m	23 J	LCDCP	24 Mon	Femurschaft
17	m	18 J	LCDCP	18 Mon	Femurschaft
18	m	10 J	LCDCP	15 Mon	Femurschaft
19	w	8 J	LCDCP	12 Mon	Femurschaft
20	m	17 J	LCDCP	22 Mon	Tibiaschaft

**Legende:** m = männlich; w = weiblich; J = Jahr; Mon = Monate; LCDCP = dynamic compression plate; 1/3-Rohr-Pl. = Drittelrohrplatte; OSG = oberes Sprunggelenk

## 2.2 Patientenkollektiv mit Stahlimplantat

Zur Frage nach eventuellen Unterschieden in der Gewebereaktion auf Implantate aus rostfreiem Stahl untersuchten wir Gewebeproben von zwanzig konsekutiven Patienten im Untersuchungszeitraum von Januar 1999 bis April 2000, die mit Osteosyntheseplatten aus Stahl versorgt waren. Auch hier wurden nur solche Patienten berücksichtigt, die eine ungestörte Frakturheilung aufwiesen. Die Patienten waren bei Metallentfernung im arithmetischen Mittel 52 Jahre und 2 Monate alt, wobei der jüngste Patient 27 Jahre und 7 Monate und die älteste Patientin 69 Jahre und 2 Monate alt waren. Von den 20 Patienten waren 11 männlichen und 9 weiblichen Geschlechtes. Das Implantatmaterial umfasste insgesamt 21 Osteosyntheseplatten, wobei eine Patientin mit zwei Platten versorgt war. Genauer handelte es sich bei den Platten um 11 Drittelrohrplatten, 4 DCPs (dynamic compression plate), 3 Rekonstruktionsplatten, 1 T-Platte, 1 Kondylenplatte und 1 Rundlochplatte. Die Verweildauern der einzelnen Platten lagen zwischen 7 Monaten und 20 Jahren, wobei die durchschnittliche Verweildauer 18,5 Monate betrug (in die Berechnung wurde die Platte mit der ungewöhnlich hohen Verweildauer von 20 Jahren nicht mit einbezogen). Die individuellen Daten der untersuchten Patienten sollen im folgenden tabellarisch aufgeführt werden.

Tabelle 3: Patientenkollektiv mit Stahlimplantat

Fall Nr.	Geschlecht	Alter	Implantat	Verweildauer	Frakturort
1	w	48 J	1/3-Rohr-Pl.	12 Mon	OSG
2	m	45 J	1/3-Rohr-Pl.	21 Mon	OSG
3	m	49 J	Kondylenpl.	63 Mon	distales Femur
4	w	52 J	Reko.Pl.	16 Mon	OSG
5	w	66 J	1/3-Rohr-Pl.	12 Mon	OSG
6	w	50 J	DCP	12 Mon	distaler Radius
7	w	56 J	DCP	12 Mon	distaler Radius
8	m	60 J	Reko.-Pl.	21 Mon	distale Ulna
9	w	63 J	DCP	19 Mon	Tibia
			Reko.Pl.	19 Mon	Clavicula
10	m	27 J	T-Platte	21 Mon	Tibiakopf
11	m	47 J	1/3-Rohr-Pl.	17 Mon	OSG
12	w	42 J	1/3-Rohr-Pl.	7 Mon	OSG
13	m	64 J	1/3-Rohr-Pl.	12 Mon	OSG
14	m	60 J	1/3-Rohr-Pl.	13 Mon	OSG
15	w	45 J	DCP	22 Mon	Radius mediales 1/3
16	w	34 J	1/3-Rohr-Pl.	8 Mon	OSG
17	m	41 J	1/3-Rohr-Pl.	12 Mon	OSG
18	m	48 J	1/3-Rohr-Pl.	19 Mon	OSG
19	m	69 J	1/3-Rohr-Pl.	19 Mon	OSG
20	m	45 J	Rundlochpl.	240 Mon	Tibiaschaft

**Legende :** m = männlich; w = weiblich; J = Jahr; Mon = Monate; 1/3-Rohr-Pl. = Drittelrohrplatte; Kondylenpl. = Kondylenplatte; DCP = dynamic compression plate; Reko.-Pl. = Rekonstruktionsplatte; Rundlochpl. = Rundlochplatte; OSG = oberes Sprunggelenk

## 2.3 Gewinnung der Proben

Zur Untersuchung der Frage der Gewebereaktion des periimplantären Gewebes zu Titan- und Stahlimplantaten wurden bei den Patienten im Rahmen von elektiven Metallentfernungen Proben des dem Implantat anliegenden lokalen Gewebes entnommen. Die Indikation zu den jeweiligen Metallentfernungen erfolgte nach den Richtlinien der Arbeitsgemeinschaft Osteosynthese (Blauth M und Tscherne H 2000). In einem Fall empfand der Patient das Implantat als störend, wobei aber auch hier keinerlei Infektzeichen vorlagen. Das zu entnehmende Gewebe entstammte im Falle der Osteosyntheseplatten zwei Lokalisationen. Zum einen handelte es sich um solches, das sekundär über die Plattenoberfläche im Laufe der Zeit gewachsen war und unmittelbar auf der Platte auflag. Die zweite Entnahmestelle war das Plattenlager nach Entfernung der Platte, wobei das Gewebe auch aus den Schraubenlöchern mittels eines scharfen Löffels entnommen wurde. Dabei wurden nicht nur Proben des schwarz verfärbten Gewebes, dem natürlich im Rahmen der Fragestellung die besondere Aufmerksamkeit galt, gewonnen, sondern auch der makroskopisch unauffälligen Bereiche. Zwei intraoperative Abbildungen zeigen Osteosyntheseplatten vor der Entfernung in situ. Dabei ist die jeweilige Probe der Plattenoberfläche zur Darstellung der Platte bereits entnommen. Die Titanimplantate besitzen aufgrund der Titandioxidschicht, die spontan im Rahmen der Passivierung entsteht, in diesem Fall eine goldene Farbe, während Stahlimplantate silberfarben erscheinen.

Abbildung 1: LCDCP aus Reintitan in situ bei der Metallentfernung

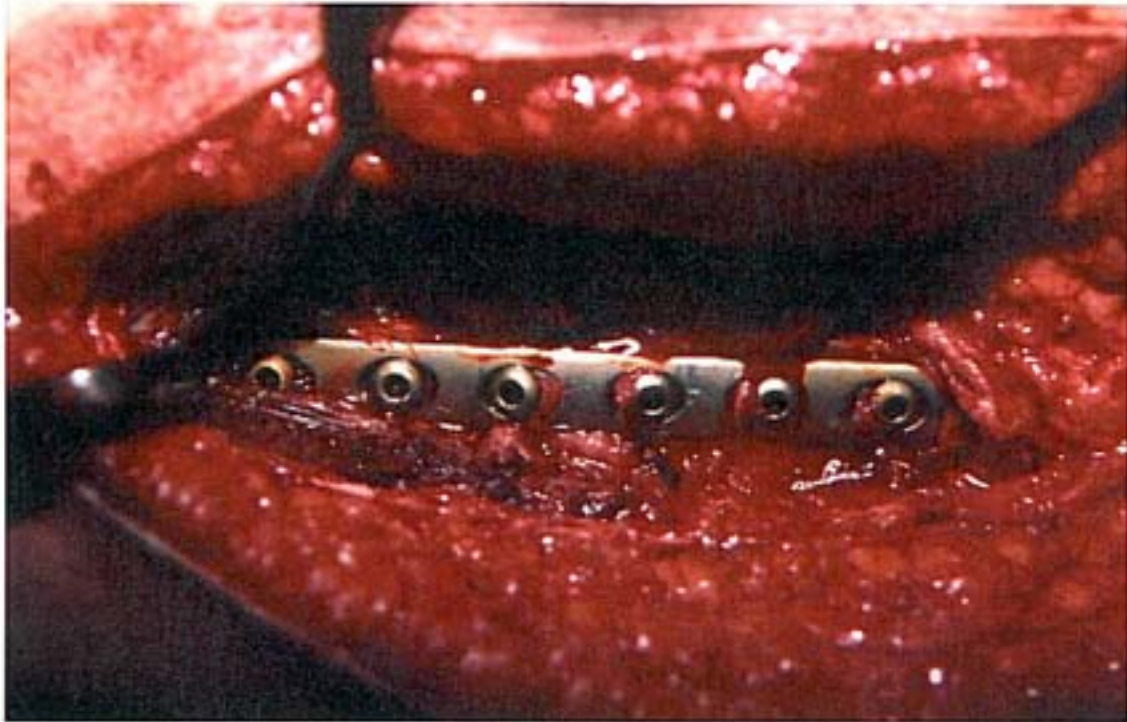


Abbildung 2: Drittelrohrplatte aus rostfreiem Stahl bei der Metallentfernung

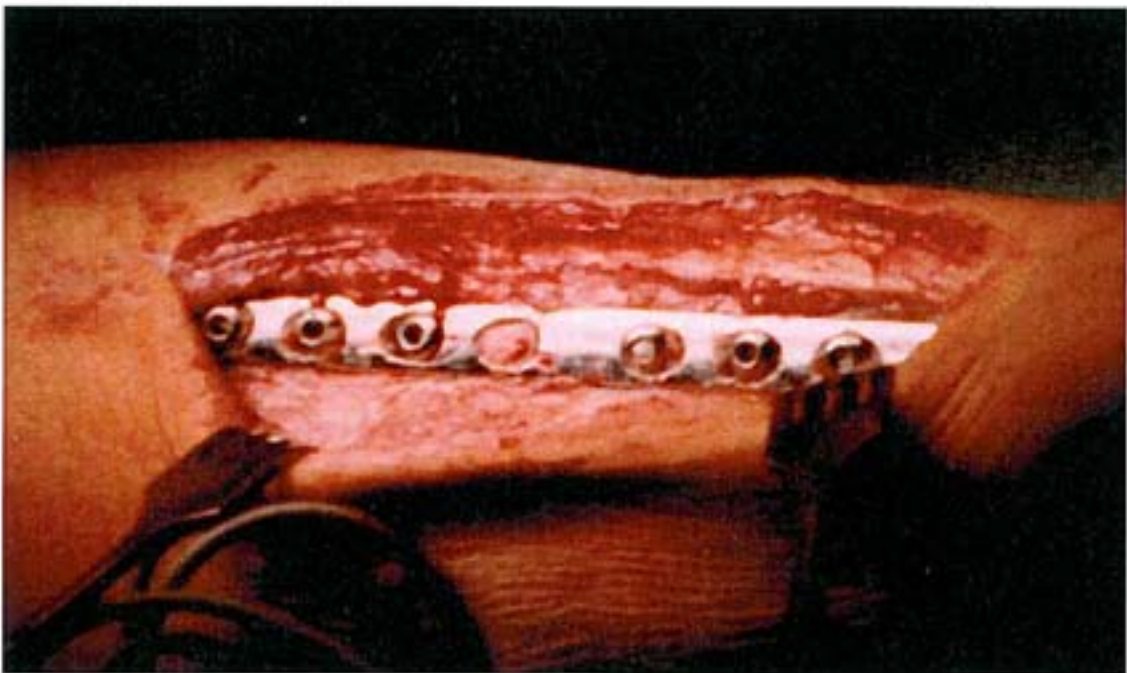




Abbildung 3: Röntgenaufnahme der oben intraoperativ photographierten LC-DCP zur Versorgung einer Tibiafraktur



Abbildung 4: Röntgenaufnahme einer Rekonstruktionsplatte zur Versorgung einer Clavikulafraktur

## 2.4 Verarbeitung der Proben

### 2.4.1. Fixierung und Einbettung

Das entnommene Gewebe wurde sofort nach Entnahme in 40%igem Ethanol fixiert und in diesem für einen Tag belassen. Zur Dehydrierung der Proben wurden diese in einer aufsteigenden Ethanolreihe mit den Stufen 40%, 70%, 80%, 90% für jeweils 24h und abschließend in 100% Ethanol für 72h bei täglichem Wechsel des Alkohols inkubiert. Dabei war wie auch bei den folgenden Lösungen für eine ausreichende Durchsetzung des Gewebes darauf zu achten, dass mindestens das fünffache Volumen der Probe an Lösung verwendet wurde. Es folgte die Entfettung des Gewebes in Xylol für weitere 24h, bevor mit der Einbettung begonnen werden konnte.

Diese erfolgte in Technovit® 9100 NEU (Firma Heraeus Kulzer, Wehrheim), einem Polymerisationssystem auf der Basis von Methylmethacrylat, das für alle immunhistochemischen Untersuchungen Ergebnisse analog der Paraffinhistologie garantieren soll. Darüber hinaus bietet die Einbettung in einem Kunststoff gegenüber der Paraffineinbettung den Vorteil der größeren Härte des zu schneidenden Materials, das sich somit einfacher am Mikrotom verarbeiten lässt. Dies gilt besonders für die von uns untersuchten Gewebeproben, die unterschiedliche Gewebearten wie auch Metall und zum Teil auch Knochen enthielten, die sich nach Paraffineinbettung nicht in für die Immunhistochemie notwendigen Schnittdicken schneiden lassen.

Die chemische Polymerisation von Technovit® 9100 NEU erfolgt unter Sauerstoffausschluss mit Hilfe eines Katalysatorsystems aus Peroxid und Amin. Zusätzliche Komponenten wie PMMA-Pulver und Regler (enthält 1-Decanthiol) ermöglichen eine gesteuerte Polymerisation bei Kälte (-8°C bis -20°C), die eine vollständige Ableitung der Polymerisationswärme garantiert. Die Polymerisationsdauer beträgt bei oben genannten Temperaturbereich und einem Volumen von insgesamt 3-15 ml ca. 18-24h.

Zur Vorbereitung der Einbettung musste zunächst die Technovit® 9100 NEU Basislösung (enthält Methylmethacrylat) mit Hilfe einer Chromatographiesäule mit 50g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> entstabilisiert werden, wobei eine Säulenfüllung zur Entstabilisierung von 3-4 Litern der Basislösung reicht. Mit Hilfe der so gewonnenen Lösung wurde unter Hinzugabe von 1g Härter 1 (enthält

Dibenzoylperoxid) pro 200ml Basislösung die Präinfiltrationslösung hergestellt und die Proben darin für 3 h inkubiert. Danach wurde das Gewebe für 24 h in die Infiltrationslösung gegeben, die aus der entstabilisierten Basislösung mit 20g PMMA-Pulver und 1g Härter auf 250 ml Lösung bestand. Vor der Herstellung des eigentlichen Polymerisationsgemisches war es zunächst nötig zwei Stammlösungen (A und B) anzusetzen. Für die Stammlösung A wurde PMMA-Pulver (80g Pulver auf 500ml Lösung) bei Raumtemperatur schrittweise in die entstabilisierte Basislösung gegeben und mit dem Magnetrührer bis zur vollständigen Lösung gerührt. Anschließend wurden 3g (bezogen auf die oben genannten Mengenangaben) Härter 1 hinzugefügt und so eine sich durch visköse Konsistenz auszeichnende Lösung gewonnen. Stammlösung B bestand aus 4ml Härter 2 (enthält N,N,3,5-Tetramethylanilin) und 2ml Regler, die zu 50 ml entstabilisierter Basislösung gegeben wurden. Nun erfolgte die Herstellung der eigentlichen Polymerisationsmischung aus 9 Volumenteilen Stammlösung A und 1 Volumenteil Stammlösung B, in die die Proben in orientierter Position gegeben wurden. Das randvolle Probengefäß wurde anschließend im vorgekühlten Exsikkator mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe für ca. 15 min evakuiert. Danach wurde die Einbettform luftdicht verschlossen und zum Polymerisieren auf  $-18^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Die Polymerisationszeiten sind dabei abhängig vom Polymerisationsvolumen sowie der Temperatur, wobei größere Volumina bei niedrigeren Temperaturen zu polymerisieren sind. Zur anschließenden Temperierung der Proben verblieben diese für mindestens 1h im Kühlschrank bei  $4^{\circ}\text{C}$ , bevor die Aufwärmung auf Raumtemperatur erfolgte. Eine unzureichende Kühlung stellt dabei einen Risikofaktor für das Aufschäumen durch unzureichende Wärmeableitung dar. Zur weiteren Verarbeitung wurden die gewonnenen Kunststoffzylinder aus den sie umgebenen Einbettungsgläschen (Rollrandgläser mit Schnappdeckel  $100\times 30\text{mm} = 50\text{ml}$  oder  $55\times 27\text{mm} = 20\text{ml}$  oder  $45\times 22\text{mm} = 10\text{ml}$ ; Laborbedarf P.Oehmen) geschlagen.



## **2.4.2 Herstellen der Mikrotomschnitte**

Das Schneiden der Proben erfolgte mit einem Rotationsmikrotom (K. Jung, Heidelberg) mit einer Schnittdicke von 7µm. Dazu wurde der jeweilige Block in 90° Stellung zum feststehenden Mikrotommesser eingespannt und in einer Rotationsbewegung am Messer vorbeigeführt. Während des Schneidens wurde der Block mit 40%-igem Ethanol befeuchtet. Die gewonnenen Schnitte wurden abgenommen und auf Objektträgern mit 96%-igem Ethanol gestreckt. Um eine ausreichende Adhäsion der Schnitte für die weitere Färbebehandlung zu gewährleisten, verwendeten wir dabei HistoBond®-Adhäsionsobjektträger der Größe 75x25x1mm (Firma Marienfeld, Lauda-Königshofen), die über elektrostatische Kräfte das Gewebe binden. Schließlich wurden die Schnitte mit Polyethylen-Folie abgedeckt und über Nacht bei ca. 40°C gepresst.

## **2.5. Immunhistochemie**

### **2.5.1 Vorbereitungen für die Immunhistochemie**

Bevor die eigentliche immunhistochemische Färbung der zu untersuchenden Präparate begonnen werden konnte, mussten zunächst die optimalen Verdünnungen der einzelnen vom Hersteller (DAKO, Glostrup, Dänemark) gelieferten Antikörper-Stammlösungen sowie die Präparatvorbehandlung anhand einer positiven Kontrolle getestet werden. Nach Literaturrecherchen ist nämlich eine immunhistochemische Färbung alkoholfixierter und kunststoffeingebetteter Präparate bisher nicht beschrieben worden. Zur Verdünnung der Stammlösung verwendeten wir ein speziell entwickeltes Antikörperverdünnungsmedium mit Komponenten, die eine unspezifische Hintergrundfärbung reduzieren (DAKO, Glostrup, Dänemark). Genauere Informationen zur chemischen Zusammensetzung erteilte die herstellende Firma leider nicht. Als positive Kontrolle diente uns humanes Tonsillengewebe, das wir aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde nach Tonsillektomien erhielten. Die Tonsillen wurden wie die zu untersuchenden Gewebeproben der Metallentfernungen in einer

aufsteigenden Alkoholreihe fixiert und in Technovit® 9100 NEU eingebettet. Die Verdünnungen der einzelnen Antikörper lagen in Bereichen zwischen 1:100 und 1:1400 (siehe Tabelle).

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Antikörperklon</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Epitop tragende Zellen</b>	<b>Verdünnung</b>
Anti-CD68	PG-M1	IgG3,kappa	Makrophagen	1:200
Anti-CD45RO	UCHL1	IgG2a,kappa	T-Lymphozyten, Thymozyten	1:800
Anti-CD3	polykonal		T-Lymphozyten	1:100
Anti-CD8	C8/144B	IgG1,kappa	zytotoxische T-Lymphozyten	1:100
Anti-79α	JCB 117	IgG1,kappa	B-Lymphozyten	1:200
Anti-HLA	CR3/43	IgG1,kappa	aktivierte Makrophagen, B-Zellen, Langerhans' Zellen, Retikulumzellen	1:1400

Als für die Immunhistochemie notwendige Vorbehandlung ergab sich folgendes Procedere. Nach Anfertigen der Mikrotomschnitte und Aufbringen auf die HistoBond®-Adhäsionsobjektträger wurde das Gewebe zunächst entplastet, d.h. vom Kunststoff befreit. Dazu wurden die Objektträger für 24h in eine mit (2-Methoxyethyl)-acetat (Merck, Darmstadt) gefüllte Küvette gestellt, wobei nach 1h zuerst die Polyethylenfolie entfernt werden musste. Anschließend erfolgte die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe für jeweils 5 min mit den Stufen 100%, 70%, 40% und destilliertem Wasser.

Die rehydrierten Schnitte wurden dann für 10 min in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS), einem Verdünnungs- und Waschpuffer mit der Zusammensetzung 0,02M Natriumphosphat, 0,15M NaCl bei einem pH von 7,0 für 10 min aufbewahrt (DAKO, Glostrup, Dänemark).

Da die von uns gewählte Immunperoxidase-Methode auf der enzymatischen Umsetzung eines chromogenen Substrates durch die an den Fc-Teil des Sekundärantikörpers gebundenen Peroxidase-Moleküle beruht, war es im weiteren notwendig, die im Gewebe endogen vorhandene Peroxidase zu blockieren. Die Peroxidaseaktivität ist nämlich eine generelle Eigenschaft aller Hämproteine, wie Hämoglobin (Erythrozyten), Myoglobin (Muskelzellen), Zytochrome (Granulozyten, Monozyten) und Katalasen (Leber und Nieren). Hämoglobin kann eine so starke endogene Peroxidaseaktivität auslösen, dass diese auch interstitiell nachweisbar ist. Zur Unterdrückung dieser unerwünschten Aktivität nutzt man das Prinzip der Enzymhemmung durch Substratüberschuss. Dabei inkubiert man das Gewebe für 10 min in 3%iger Wasserstoffperoxidlösung. Der dabei entstehende Komplex aus Peroxidase und einem Überschuss an Wasserstoffperoxid ist katalytisch inaktiv und bei Fehlen eines Elektronendonors reversibel blockiert. Vor dem Auftragen des Primärantikörpers wurden die Präparate abschließend für weitere 10 min in den oben beschriebenen PBS-Puffer gestellt. Die Tabelle 5 fasst die durchgeführte Vorbehandlung zusammen.

Tabelle 5: Übersicht der Vorbehandlung

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Zeit</b>	<b>Ziel</b>
(2-Methoxyethyl)-acetat	Merck, Darmstadt	24h	Entplasten der Schnitte
Ethanol 100%	Hausapotheke	5 min	} Rehydrieren der Schnitte
Ethanol 70%	eigene Herstellung	5 min	
Ethanol 40%	eigene Herstellung	5 min	
Aqua dest.	eigene Herstellung	5 min	
PBS	DAKO, Glostrup, Dk	10 min	Waschpuffer
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%	Hausapotheke	10 min	Blockierung der endogenen Peroxidase
PBS	DAKO, Glostrup, Dk	10 min	Waschpuffer

Legende: PBS = Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung; Dk = Dänemark

## 2.5.2 Durchführung der immunhistochemischen Färbung

Nachdem die Objektträger für 10 min in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung standen, wurden die Primärantikörper in der oben genannten Verdünnung aufgetragen. Die Menge richtete sich dabei nach der Größe der Gewebeprobe und lag meistens bei 25µl. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle von jeder Probe angefertigt, indem statt der Antikörper nur das Antikörperverdünnungsmedium auf die Schnitte gegeben wurde, die Schnitte aber sonst der gleichen im Folgenden erläuterten Färbeprozedur unterzogen wurden. Die Inkubationszeit eines Antikörpers ist abhängig von seiner Affinität zum Antigen, der Temperatur sowie vom Antikörpertiter. Je höher der Titer und die Affinität des Antikörpers, desto geringer kann die Inkubationsdauer sein. Diese kann prinzipiell zwischen 1,5 Minuten und 48 Stunden betragen. Dabei ist auch die unspezifische Hintergrundfärbung zu berücksichtigen, die von der Verdünnung sowie der Inkubationszeit abhängig sein kann. Nach Versuchen an der Tonsille ergaben sich Inkubationszeiten von 16h bei 4°C oder 2h bei Raumtemperatur. Dies galt für die von uns verwendeten Antikörpertiter. Während der Inkubation befanden sich die Schnitte zum Schutz vor Austrocknung in einer feuchten Kammer.

Die weiteren Schritte der Färbung vollzogen wir nicht mehr wie bei der Vorbehandlung in Küvetten, sondern auf speziell angefertigten Färbebänken, wobei die Reagenzien mit Hilfe von Eppendorf® Pipetten (Eppendorf-Netheler Hinz GmbH, Hamburg) aufgetragen wurden. Nach der Antikörperinkubation wurden die Schnitte zunächst mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung gespült und diese für 10 min auf den Objektträgern belassen. Im weiteren erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in Form des DAKO-Envision™, dem Polymer aus Sekundärantikörpern und Peroxidase-molekülen. Bei den Sekundärantikörpern handelte es sich um Ziege Anti-Maus Antikörper, da der Primärantikörper aus der Maus stammte und somit die Ziege gegen die Primärantikörper immunisiert wurde. Während der 30minütigen Inkubationszeit band nun das Polymer an die Fc-Teile der an den Zellen haftenden Primärantikörper. Es folgte wiederum ein Spülschritt mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung, die wiederum für 10 min auf den Schnitten verblieb.

Der nächste Schritt war das Auftragen des chromogenen Substrates. Für die Peroxidase stehen dabei prinzipiell 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB), 4-Chlor-1-Naphtol (CN), p-Phenylendiamin Dihydrochlorid und 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) zur Verfügung. Wegen des besseren Kontrastes in der Lichtmikroskopie bei der am Schluss vorzunehmenden

blauen Kernfärbung wählten wir das 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) (DAKO, Glostrup, Dänemark). Dieses bildet unter Oxidation durch die Peroxidase ein rotes Farbprodukt, das alkohollöslich ist. Proben, die mit AEC gefärbt wurden, dürfen daher nicht mit Alkohol oder alkoholhaltigen Lösungen in Berührung kommen. Nachteil des AEC ist allerdings, dass der Oxidationsprozess weiter fortschreiten, und es somit besonders unter Lichteinwirkung zu einem Ausbleichen des Reaktionsproduktes kommen kann. Nach Auftragen war eine ausreichende Färbung nach ungefähr 10 min erreicht. Überschüssiges AEC wurde anschließend mit destilliertem Wasser abgespült.

Nun folgte zur besseren Detektion der Zellen eine Zellkernfärbung mit Hämatoxylin. Als Hämatoxylinlösung verwendeten wir Mayer's saures Hämatoxylin (Merck KGaA, Darmstadt), das unter anderem 1g Zitronensäure enthält und gebrauchsfertig zu kaufen ist. Die Lösung blieb für 30 Sekunden auf den Gewebeschnitten bevor diese mit Leitungswasser gespült wurden. Nachdem dieses für 10 min auf den Objektträgern blieb, wurden die Schnitte abschließend nochmals mit destilliertem Wasser gespült.

Um die so gefärbten Präparate luftdicht und ohne Einfluss auf die Färbung langfristig haltbar zu machen, wurden die Präparate nun eingedeckt und mit Deckgläsern bedeckt. Als Eindeckmedium verwendeten wir Faramount-Eindeckmedium (DAKO, Glostrup, Dänemark), das bei Färbungen mit wasserlöslichen Farbstoffen Anwendung findet. Dieses war notwendig, da das AEC wie bereits erwähnt alkohollöslich ist und mit alkoholhaltigen Substanzen nicht in Berührung kommen darf. Als Deckgläser standen uns verschiedenen Größen zur Verfügung: 18 x 18 mm, 24 x 24 mm, 24 x 32 mm, 24 x 46 mm und 24 x 60 mm. Diese wurden nach Auftragen des Eindeckmediums ohne Einschluss von Luftblasen aufgelegt. Die so fertig gefärbten Präparate mussten anschließend ungefähr 24h trocknen, bevor die Auswertung am Lichtmikroskop erfolgen konnte. Zur Aufbewahrung eigneten sich handelsübliche Objektträgerkästen, die auch Dunkelheit garantieren, damit der Oxidationsprozess des AEC möglichst nicht weiter fortschreitet. Die Tabelle 6 soll die einzelnen Schritte der Färbung zusammenfassen.

Tabelle 6: Durchführung der immunhistochemischen Färbung

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Zeit</b>	<b>Ziel</b>
Primärantikörper	DAKO, Glostrup, Dk	16h bei 4°C oder 2h bei RT	Markieren der Leukozyten
PBS	DAKO, Glostrup, Dk	10 min	Entfernen der nicht - bindenden Primärak.
Envision™	DAKO, Glostrup, Dk	30 min	Detektion der Primärantikörper
PBS	DAKO, Glostrup, Dk	10 min	Entfernen des überschüssigen Envisions
AEC	DAKO, Glostrup, Dk	10 min	chromogenes Substrat für die Peroxidase
Aqua dest.	eigene Herstellung	kurz	Entfernen überschüssigen AECs
Mayer's Hämalaninsg.	Merck, Darmstadt	30 sec	} Kernfärbung
H <sub>2</sub> O	Leitungswasser	10 min	
Aqua dest.	eigene Herstellung	kurz	Spülen
Faramount	DAKO, Glostrup, Dk	langfristig	Eindecken

Legende : RT = Raumtemperatur, Dk = Dänemark, PBS = Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, AEC = 3-Amino-9-ethylcarbazol, Aqua dest. = destilliertes Wasser,

## 2.6 Auswertung am Lichtmikroskop

Zur Betrachtung der wie oben beschrieben gefärbten Präparate verwendeten wir ein Leica DM LB Stereolichtmikroskop (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar) unter Anwendung der Durchlichtmikroskopie. Dabei dienten uns zur Betrachtung die folgenden Objektive (Vergrößerung/Apertur): 2,5x/0,07; 5x/0,15; 10x/0,30; 20x/0,50; 50x/0,75 und 100x/1,3 mit Immersionsöl unter Verwendung eines 10x/22 (Vergrößerung/Schfeldzahl) Okulars. Somit ergaben sich nach der Formel Gesamtvergrößerung = Objektivvergrößerung x Okularvergrößerung die Vergrößerungen 25x, 50x, 100x, 200x, 500x und 1000x. Die Betrachtung erfolgte ohne zusätzliche Filter. Zusätzlich stand uns eine Leica DC 200 Digitalkamera (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar) zur digitalen Auswertung und Archivierung zur Verfügung, wobei als Software der Leica DC Viewer Version 2.51 fungierte.

Eine exakte quantitative Auswertung, in deren Rahmen wir die genauen Zellzahlen der einzelnen Leukozytensubpopulationen hätten bestimmen müssen, war nicht möglich und sinnvoll. Das lag zum einen an der Größe der Gewebeproben, die wie auch der Ort der Entnahme nicht genau normiert und damit bei jeder Probenentnahme unterschiedlich waren. Außerdem schwankte die Zellzahl in den mikroskopischen Gesichtsfeldern sehr stark, so dass das Auszählen von Gesichtsfeldern nur unter Bestimmung eines Mittelwertes sinnvoll erschien. Zum anderen waren die einzelnen Zellen aufgrund des oft dichten Metallmaterials nicht gegeneinander abgrenzbar sowie ihre Zellkerne nicht sichtbar und somit auch nicht exakt zählbar. Im übrigen wären exakte Zahlen statistisch nicht auswertbar, da im Rahmen eines Projektes mit humanem Gewebe eine statistisch genügende Standardisierung mit gleichen Gruppen in Bezug auf potentiell einflussnehmende Faktoren wie Alter, Verweildauer, Art des Implantates usw. aus ethischen Gründen nicht möglich ist. Da im übrigen der Einfluss dieser einzelnen Parameter nicht geklärt ist, war es Gegenstand unserer Fragestellung, wie die Charakteristik der Gewebereaktion auf das Osteosynthesematerial qualitativ zu beschreiben ist. Trotzdem war es nötig dabei eine quantitative Aussage zu machen, um in etwa das Ausmaß der Reaktion und damit die Relevanz beurteilen zu können. Aus all diesen Überlegungen heraus wählten wir in Anlehnung an die Arbeit von Mirra et al 1976 eine semiquantitative Auswertung mit der folgenden Einteilung, wobei bei der Beurteilung das Verhältnis der Zellzahl zur Fläche der untersuchten Gewebeprobe zu Grunde

lag. In der gleichen Art und Weise quantifizierten wir auch die Metallpartikel. Hier waren ebenfalls selten einzelne Partikel abzugrenzen, so dass ihre Fläche als Grundlage galt. Im einzelnen wurde dabei die Anzahl der detektierten Zellen oder Partikel eines Gewebeschnittes in mindestens fünf mikroskopischen Gesichtsfeldern bestimmt und die somit erhobene Zahl dann gemittelt. Die jeweilige mikroskopische Vergrößerung der Gesichtsfelder wählten wir für die Lymphozyten, die mononuklearen Zellen und die Metallpartikel entsprechend der von Mirra et al. übernommenen Auswertung (Mirra 1976). Anhand der so gewonnenen Anzahl wurde dann eine vierstufige semiquantitative Einteilung vorgenommen, die im einzelnen folgendermaßen aussah (nach Mirra 1976):

### **1. Mononukleäre Zellen (Makrophagen, antigenpräsentierende Zellen):**

- a) - = keine Zellen
- b) += 1 - 5 Zellen pro Gesichtsfeld bei einer 500fachen Vergrößerung
- c) ++ = 6 - 49 Zellen pro Gesichtsfeld bei einer 500fachen Vergrößerung
- d) +++ = mehr als 50 Zellen pro Gesichtsfeld bei einer 500fachen Vergrößerung

### **2. Lymphozyten (T-Lymphozyten, B-Lymphozyten):**

- a) - = keine Zellen
- b) += 1 - 9 Zellen pro Gesichtsfeld bei einer 500fachen Vergrößerung
- c) ++ = 10 - 49 Zellen pro Gesichtsfeld bei einer 500fachen Vergrößerung
- d) +++ = mehr als 50 Zellen pro Gesichtsfeld bei einer 500fachen Vergrößerung

### **3. Metallpartikel:**

- a) - = keine Metallpartikel
- b) += 1 - 19 Partikel pro Gesichtsfeld bei einer 500fachen Vergrößerung
- c) ++ = 20 - 499 Partikel pro Gesichtsfeld bei einer 500fachen Vergrößerung
- d) +++ = mehr als 500 Partikel pro Gesichtsfeld bei einer 500fachen Vergrößerung



## 2.7 Transmissionselektronenmikroskopie

### 2.7.1 Vorbereitung der Präparate

Die Fixierung der Präparate erfolgte unmittelbar nach der Entnahme in Glutaraldehyd (Serva, Heidelberg) in einer Konzentration von 2,5% für zwei Stunden bei 4°C im Kühlschrank. Anschließend wurden die Proben dreimal für jeweils 10 min in 0,1 molaren Cacodylatpuffer gewaschen. Dieser besteht aus den Komponenten Natriumcacodylat (Merck, Darmstadt), Magnesiumsulfat (Merck, Darmstadt) und Calciumchlorid (Sigma, Taufkirchen).

Die folgende Entwässerung nahmen wir in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit den Konzentrationen 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% und 100% vor, wobei die Inkubationszeit jeweils 20 min betrug. Dem 70%igen Alkohol wurde darüber hinaus Uranylacetat (Merck, Darmstadt) in einer Konzentration von 1% zur besseren Kontrastierung zugefügt und das Präparat hier im Gegensatz zu den anderen Schritten zwei Stunden belassen.

Zur weiteren Verarbeitung war es nun notwendig, die Proben in Kunststoff einzubetten. Als Vorbereitung dafür wurden die Präparate zunächst für zweimal 20 min in Propylenoxid inkubiert. Als Kunststoff verwendeten wir Epon (Polyscience, Eppelheim), dem zunächst Propylenoxid nacheinander im Verhältnis 1:3, 1:1 und schließlich 3:1 zugegeben wurde. Nachdem die Präparate anschließend für fünf Stunden in reinem Epon inkubiert wurden, erfolgte die Polymerisation bei 60°C für 3 Tage.

Die so entstandenen Blöcke wurden zunächst getrimmt, das heißt also der überschüssige Kunststoff wurde entfernt und die Form entsprechend einer Pyramide geschliffen. Zur Orientierung fertigten wir zunächst Semidünnschnitte von 0,5 bis 2µm an, die nach Richardson gefärbt wurden (Richardson et al 1960). Nach deren mikroskopischer Betrachtung wurden sodann Ultradünnschnitte von 500-700 Angström hergestellt und auf Grids (Plano, Wetzlar) aufgetragen. Die für die Betrachtung im Elektronenmikroskop notwendige Schnittkontrastierung führten wir mit 1%igem Uranylacetat und Bleizitrat (Serva, Heidelberg) nach Reynolds durch (Reynolds 1963).

Die folgende Tabelle (Tabelle 7) gibt einen Überblick über die einzelnen Schritte der Vorbereitung für die Elektronenmikroskopie.

**Tabelle 7:** Übersicht der Vorbereitung für die Elektronenmikroskopie

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Zeit</b>	<b>Ziel</b>
Glutaraldehyd 2,5%	Serva, Heidelberg	2h	Fixierung
<u>Cacodylatpuffer 0,1M :</u>			
Natriumcacodylat	Merck, Darmstadt	} 3 x 10min	Waschen
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt		
Calciumchlorid	Sigma, Taufkirchen		
Ethanol 30%	eigene Herstellung	20 min	Dehydrierung
Ethanol 50%	eigene Herstellung	20 min	Dehydrierung
Ethanol 70% + Uranylacetat 1%	eigene Herstellung Merck, Darmstadt	2h	Dehydrierung + Blockkontrastierung
Ethanol 80%	eigene Herstellung	20 min	} Dehydrierung
Ethanol 90%	eigene Herstellung	20 min	
Ethanol 96%	Hausapotheke	20 min	
Ethanol 100%	Hausapotheke	3 x 20 min	
Propylenoxid		2 x 20 min	} Einbettung
Epon + Propylenoxid 1:3	eigene Herstellung	1h	
Epon + Propylenoxid 1:1	eigene Herstellung	1h	
Epon + Propylenoxid 3:1	eigene Herstellung	1h	
Epon rein	Polyscience, Eppelheim		5h
Epon rein		3 Tage bei 60°C	Polymerisation

## 2.7.2 Auswertung am Elektronenmikroskop

Die Auswertung der so angefertigten Präparate erfolgte mit einem Elektronenmikroskop (EM 902 A, Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Dabei wurden die Vergrößerungsstufen  $M = 4000$  und  $M = 6000$  verwendet, um zunächst eine Übersicht zu gewinnen sowie die Vergrößerungen  $M = 13000$  und  $M = 22000$  zur genaueren Betrachtung.

Ziel war es dabei, zum einen die Phagozytose der Partikel durch Zellen zu verifizieren und zusätzlich die Morphologie der phagozytierenden Zellen zu identifizieren. Zum anderen interessierte uns des Weiteren die Lokalisation des phagozytierten Materials in der Zelle und eine eventuelle morphologische Veränderung als Reaktion auf die Aufnahme des Fremdmaterials. Natürlich war es in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse, ob morphologische Unterschiede zwischen der Phagozytose von Titan- und Stahlpartikeln bestehen würden.

## **2.8. Rasterelektronenmikroskopische Energy Dispersive X-Ray Analyse (REM-EDX)**

Für die Durchführung der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die vorgesehenen Präparate zunächst wie in Kapitel 2.4 beschrieben eingebettet und fixiert. Wie für die lichtmikroskopische Untersuchung verwendeten wir auch im Rahmen dieser Analyse Mikrotomschnitte der in Technovit® 9100 Neu eingebetteten Proben mit einer Dicke von 7µm. Auch hier wurden diese anschließend zunächst unter Verwendung von 2-(Methoxyethyl)-acetat entplastet und mittels einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Als für die rasterelektronenmikroskopische Analyse spezifische Vorbehandlung war es darüber hinaus notwendig, die Schnitte der Präparate mit einer dünnen Goldschicht zu beschichten. Diese hatte dabei eine Dicke von ungefähr 2nm und wurde durch Bedampfen erreicht (EMITECH, K550, Ashford, Großbritannien). Mit diesem Schritt sollte ein besserer topographischer Kontrast erreicht werden. Die nun folgende Betrachtung der Präparate erfolgte mit einem Rasterelektronenmikroskop (DSM 962, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit dessen Hilfe die zu analysierenden Partikel lokalisiert werden konnten. Um deren Zusammensetzung zu bestimmen, wurde nun im Folgenden eine energy-dispersive-x-ray Analyse (EDX Analyse; Noran Instruments, Voyager) durchgeführt. Dabei wurden die für ein jeweiliges Element spezifischen Röntgenstrahlen, die durch zurückgestreute Elektronen erzeugt wurden, analysiert.

Das Ziel dieser Untersuchung lag somit in der Bestimmung der elementaren Bestandteile der gefundenen Partikel. Somit sollte es möglich sein, den Nachweis zu führen, dass die im periimplantären Gewebe gefundenen Partikel in der Zusammensetzung dem jeweiligen Implantat entsprachen. In diesem Falle konnte man dann folglich davon ausgehen, dass sie auch wirklich von dem verwendeten Osteosynthesematerial stammten.

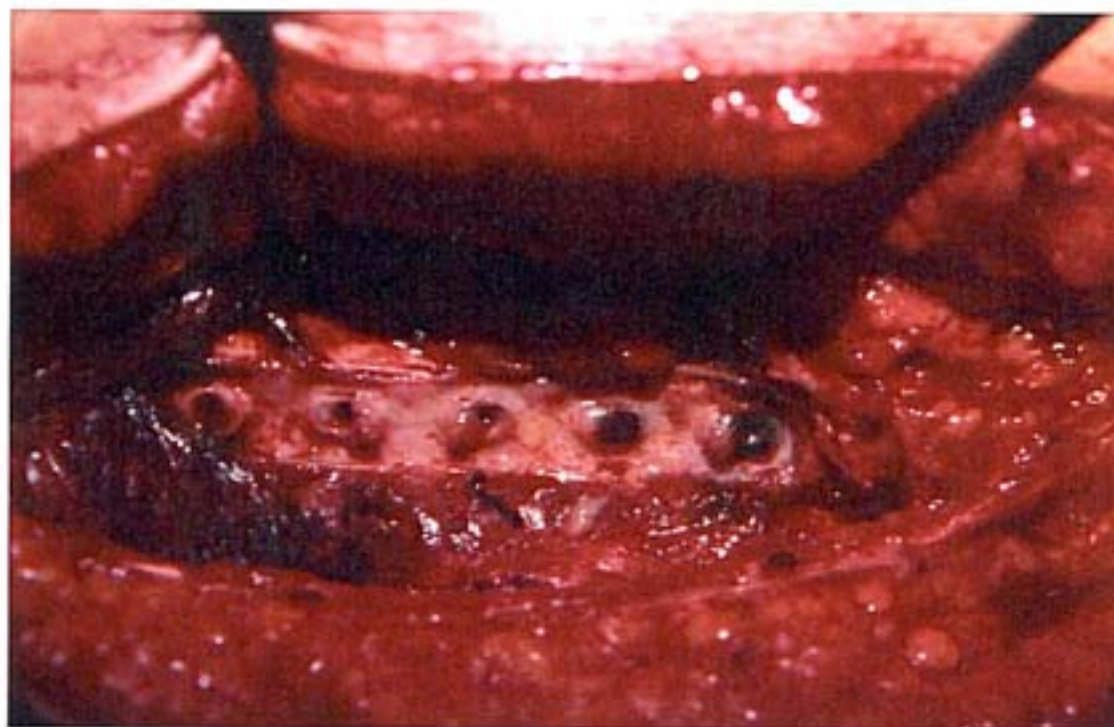
## 2. Ergebnisse

### 3.1 Gewebereaktion auf Titanimplantate

#### 3.1.1 Titanpartikel im periimplantären Gewebe

Während der Metallentfernungen konnten, wie schon in der Einleitung beschrieben, bereits makroskopisch schwarze Verfärbungen des Implantatkontaktgewebes beobachtet werden. Dies war in der Gruppe der Patienten, die mit einem Implantat aus Reintitan versorgt waren, in 18 von 20 Fällen der Fall (siehe Tabelle 8) und somit bezogen auf die Zahl der Implantate in 20 von 22 Fällen zu finden. Darüber hinaus waren die Implantate in allen untersuchten Fällen von einer fibrösen Kapsel umgeben.

Abbildung 5: Plattenlager nach Entfernung einer LC-DCP aus Reintitan



Die Abbildung 5 zeigt eine solche Verfärbung im Bereich der Grate der Schraubenlöcher, nach Entfernung der Platte (LC-DCP) im Plattenlager. Dabei sind besonders die beiden rechten Schraubenlöcher betroffen.

Allgemein lässt sich diese Lokalisation als Prädilektionsstelle für eine solche Verfärbung charakterisieren. Als weitere Lokalisation ergab sich der Bereich der Schraubköpfe, wo sich häufig auch Kochenspannen um diesen gebildet hatten. In einigen Fällen war auch das über der Platte liegende Gewebe schwarz verfärbt. Im Falle von Tibiamarknägeln (UTN), die nicht in die Untersuchung einbezogen wurden, haben wir diese Beobachtung im Bereich der Abschlusskappe, die nach Implantation des Nagels am kranialen Ende zur einfacheren späteren Entfernung eingeschraubt wird, gemacht.

Mikroskopisch konnten in allen untersuchten Proben des periimplantären Bereiches bei Implantaten aus Titan schwarze Partikel gefunden werden (siehe Tabelle 8).

**Abbildung 6:** Probe des Plattenlagers einer LC-DCP aus Reintitan (Hämatoxylin;100x)



Die Abbildung 6 zeigt ein Beispiel einer Gewebeprobe aus dem Plattenlager nach Entfernung der LC-DCP bei dem Patienten 12 der Tabelle 8. In diesem mit Hämatoxylin gefärbten und in 100facher Vergrößerung betrachteten Gewebeschnitt lassen sich zahlreiche schwarze Partikel finden, die wie in den meisten Fällen in einer intraoperativ sichtbaren fibrösen Kapsel zu finden waren.

Die Größe dieser Partikel variierte zwischen winzigen, feinen Stäuben bis hin zu großen undurchsichtigen Körnern. Schon in der relativ unspezifischen Färbung mit Hämatoxylin ließ sich erkennen, dass sich diese Partikel fast ausschließlich intrazellulär befanden, also phagozytiert waren. Dabei konnte man bei für die Phagozytose zu großen Partikeln die Adhärenz von Zellen beobachten. In einigen Fällen ließen sich darüber hinaus durch Fusion mehrerer Zellen entstandene mehrkernige Riesenzellen finden. Die genaue Spezifizierung der involvierten Zellen sollte die Immunhistochemie leisten.

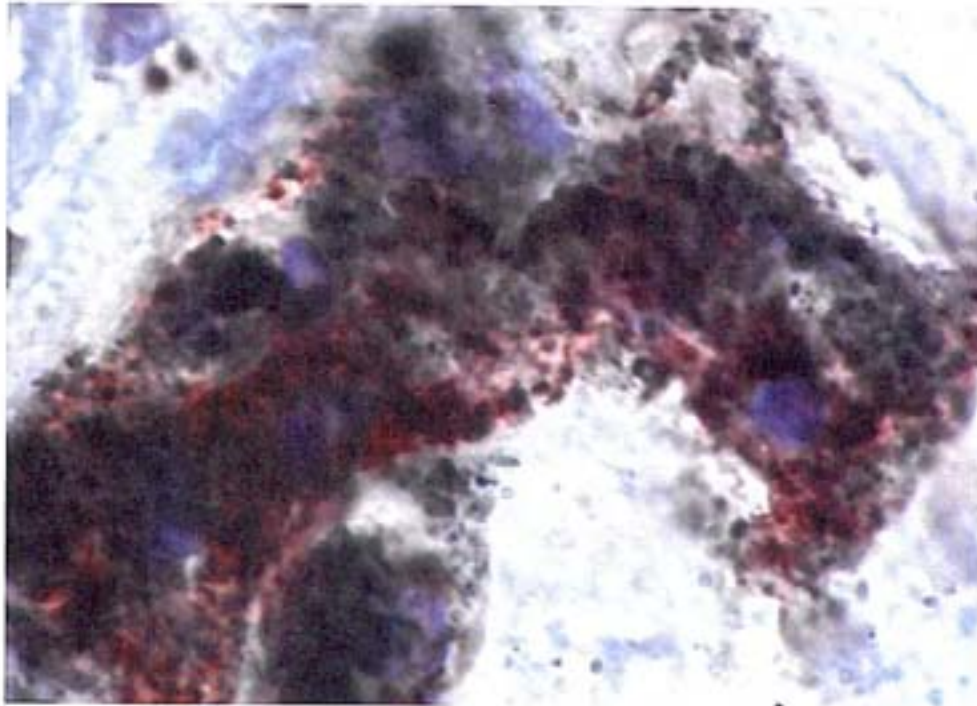
Entsprechend der in Kapitel 2.6 beschriebenen semiquantitativen Auswertung nahmen wir auch eine Quantifizierung der Partikel vor, wie sie für die Titanimplantate in der Tabelle 8 für die einzelnen Patienten wiedergegeben ist. Demnach fanden wir bei den insgesamt 22 Implantaten von 20 Patienten zweimal eine geringe, 14-mal eine mittlere und sechs mal eine große Zahl von Partikeln.

### **3.1.2 CD68 positive Makrophagen**

Wie bereits in der Färbung mit Hämatoxylin zu erkennen befanden sich die gefundenen Titanpartikel in der Regel intrazellulär. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung identifizierte diese phagozytierenden Zellen nun als CD68 positive Makrophagen. Diese hatten die jeweiligen Partikel je nach Größe entweder vollständig internalisiert oder adhärten an solchen, die für eine Phagozytose zu groß waren. Darüber hinaus konnten wir in manchen Fällen die Fusion mehrerer Makrophagen zu mehrkernigen Riesenzellen beobachten. Dabei ließ sich allgemein feststellen, dass ihre Anzahl mit der vorhandenen Titanpartikel korrelierte. Obwohl wir mit einer im Anschluss an die eigentliche immunhistochemische Färbung durchgeführten Hämatoxylinfärbung die Kerne blau färbten, war es oft nicht möglich einzelne Zellen voneinander abzugrenzen. Dies lag zum einen an der Menge und zum anderen an der Kompaktheit der auftretenden Partikel.

Die Abbildungen 7 und 8 zeigen je ein Beispiel einer immunhistochemischen Färbung unter Verwendung des Antikörpers gegen das Epitop CD68.

Abbildung 7: CD68 positive Makrophagen mit phagozytierten Titanpartikeln (1000x)



Dabei stammt die Abbildung 7 von einer Probe des Plattenlagers nach Entfernung einer LC-DCP aus Reintitan beim Patienten mit der Nummer 11 in der Tabelle 8. Sie zeigt in einer 1000fachen Vergrößerung die Anwesenheit feiner Titanpartikel, die sich schwarz darstellen. Wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben, zeigt die rote Färbung die Bindung des Antikörpers an sein Epitop und somit die Anwesenheit von CD68 positiven Makrophagen an. Die durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin wegen ihrer Basophilie blau gefärbten Zellkerne lassen sich durch die undurchsichtigen Metallpartikel allerdings nicht exakt lokalisieren. Mehrere Makrophagen scheinen eine Art Konglomerat zu bilden. Im linken Drittel des unteren Bildrandes lässt sich jedoch gut ein einzelner, die Form eines Fisches annehmender, Makrophage abgrenzen. Er zeigt intrazelluläre Titanpartikel, die er zuvor phagozytiert haben muss. Dieses mikroskopische Bild ist typisch für unsere Beobachtungen im Zusammenhang mit der Reaktion des Plattenkontaktgewebes auf freigesetzte Titanpartikel.

Die semiquantitative Auswertung ergab in Bezug auf die untersuchten 22 Implantate in zwei Fällen eine geringe, in dreizehn Fällen eine mittlere und in sieben Fällen eine große Anzahl von CD68 positiven Makrophagen (Tabelle 8).



Abbildung 8: Titanpartikel mit adhärirten Makrophagen (CD68; 1000x)



Die Abbildung 8 zeigt ebenfalls in 1000facher Vergrößerung einen einzelnen großen Titanpartikel, der offensichtlich für die Phagozytose durch Makrophagen zu groß ist. Trotzdem zeigt auch hier die rote Färbung die Anwesenheit von Makrophagen an, die an diesen Partikel adhärirten. Die blauen Zellkerne sind vereinzelt lokalisierbar, erlauben aber keine genaue Abgrenzung der einzelnen Zellen. Auch diese Abbildung ist repräsentativ für ähnliche Beobachtungen bei anderen Proben

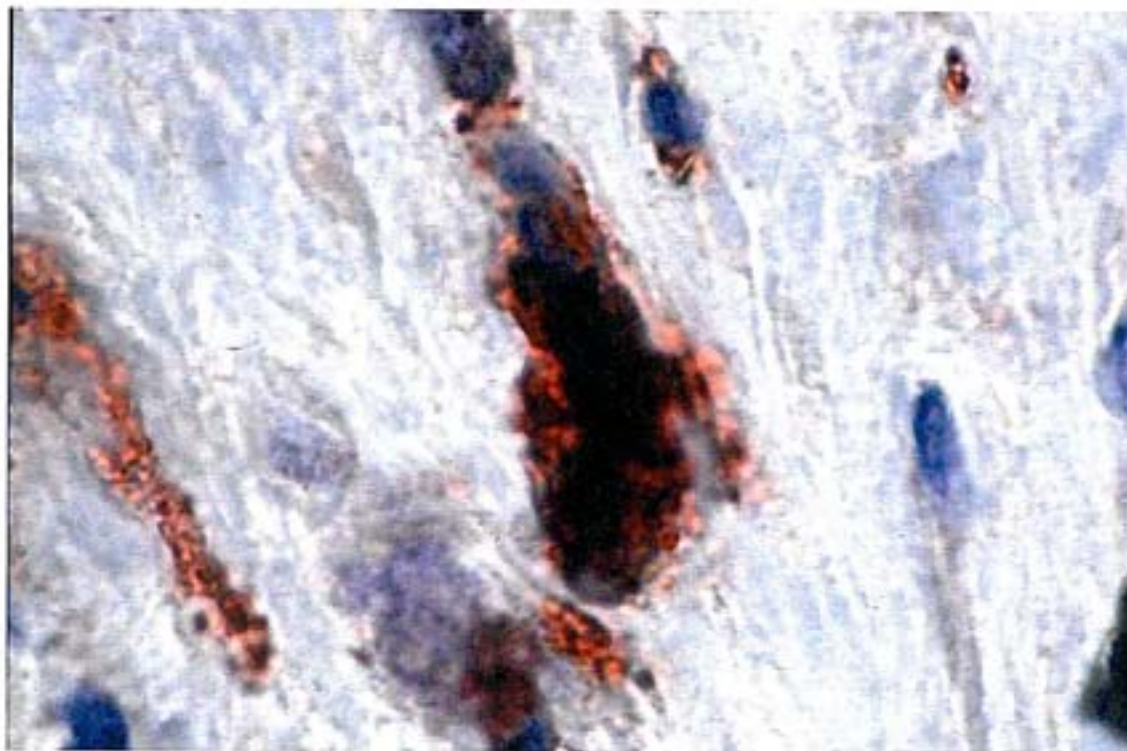
### **3.1.3 Antigenpräsentierende Zellen (HLA-DP/DQ/DR)**

Die Auswertung der Immunhistochemie zeigte eine große Anzahl HLA-DP/DQ/DR positiver Zellen, wobei die semiquantitative Analyse in vier Fällen eine geringe, in zwölf Fällen eine mittlere und in sechs Fällen eine große Anzahl antigenpräsentierender Zellen ergab (Tabelle 8). Der Vergleich mit den Präparaten, die unter Verwendung des Antikörpers gegen das

Epitop CD68 gefärbt wurden, zeigte, dass fast alle Makrophagen auch HLA-DP/DQ/DR positiv waren. Bei den meisten detektierten antigenpräsentierenden Zellen handelte es sich also um Makrophagen, die Titanpartikel phagozytiert hatten. Somit lässt sich von einer Aktivierung dieser Zellen durch die Phagozytose der Partikel ausgehen.

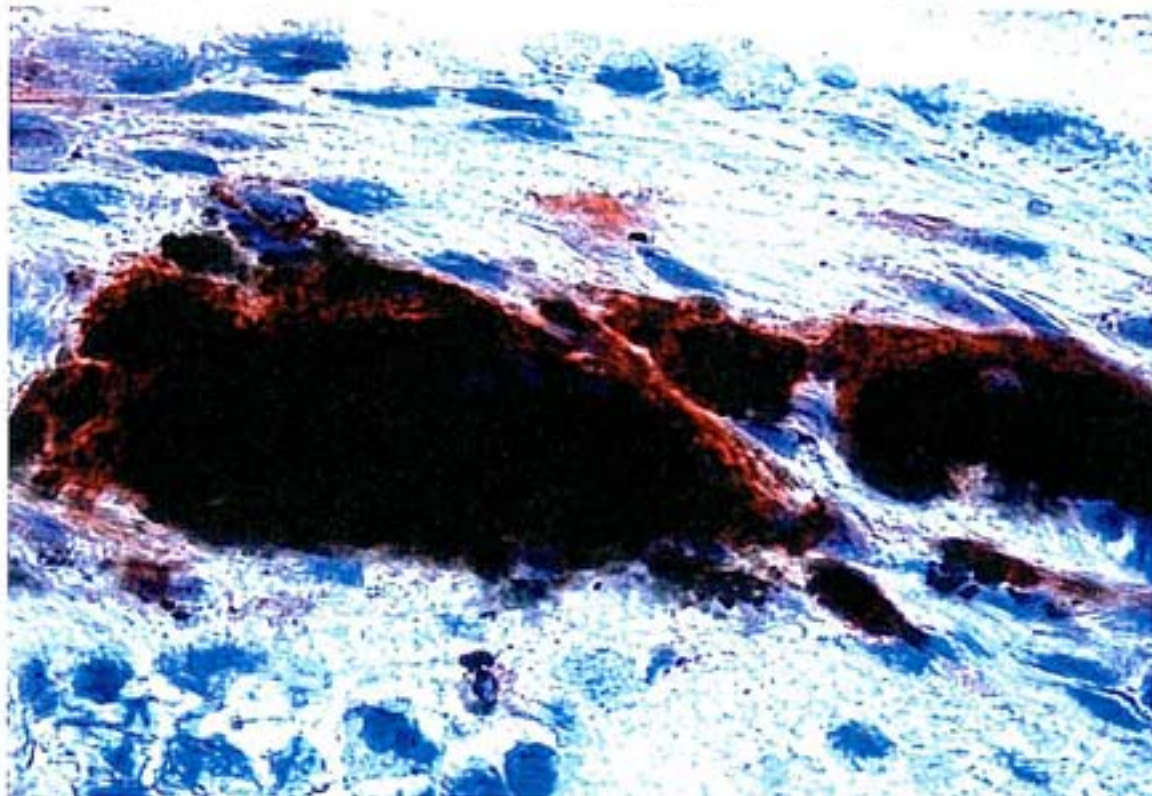
Die Abbildungen 9 und 10 zeigen je ein Beispiel des Ergebnisses einer Färbung mit diesem Antikörper. Das Präparat der Abbildung 9 stammt dabei vom Patienten mit der Nummer 11 der Tabelle 8 und wird hier in einer 1000fachen Vergrößerung betrachtet.

Abbildung 9: HLA-DP/DQ/DR präsentierende Makrophagen (1000x)



Die Photographie zeigt wie auch die Abbildung 7 schwarze Titanpartikel, die einer Phagozytose unterliegen. Da der Antikörper, wie die rote Färbung signalisiert, an sein Epitop HLA-DP/DQ/DR gebunden hat, befinden sich die Partikel in antigenpräsentierenden Zellen. Durch Vergleich mit der Färbung des gleichen Präparates unter Verwendung des Antikörpers CD68, lassen sich diese Zellen als aktivierte Makrophagen identifizieren.

Abbildung 10: Titanpartikel mit adhärierenden HLA positiven Makrophagen



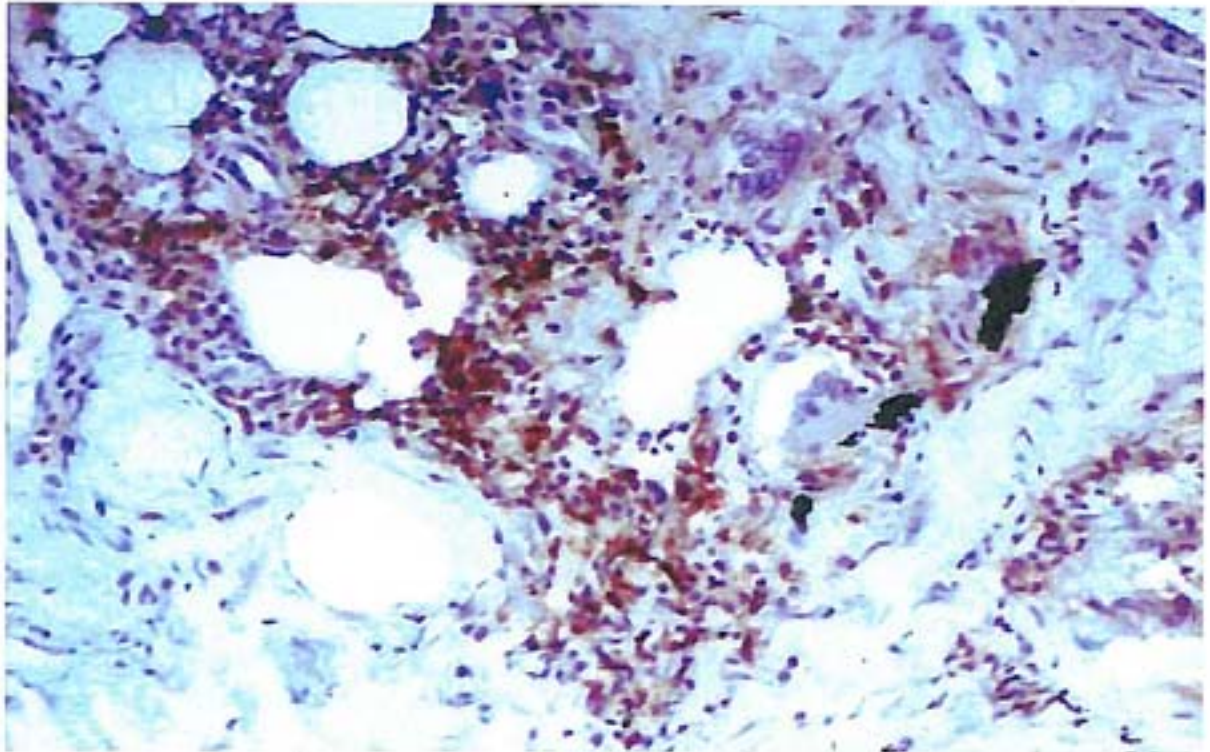
Die Abbildung 10 zeigt in Analogie zur Abbildung 8 im wesentlichen einen großen Titanpartikel an den HLA-DP/DQ/DR positive Makrophagen adhärieren, da er für eine Internalisierung durch Phagozytose zu groß ist. Die zugrunde liegende Probe stammt hier vom Patienten mit der Nummer 9 in der Tabelle 8. In diesem Fall sind dabei die blauen Zellkerne der einzelnen Zellen gut abgrenzbar, wobei es sich bei den nicht immunhistochemisch erfassten in der Regel um Bindegewebszellen handelt.

### **3.1.4 CD45RO positive T-Lymphozyten**

Immunhistochemisch konnten in fast allen untersuchten Fällen CD45RO positive T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Nur in den Gewebeproben eines Patienten ließen sich keine dieser Zellen detektieren. Darüber hinaus fand ich bei 5 Implantaten eine geringe, bei 14 Implantaten eine mittlere und bei 2 Implantaten eine große Zahl von T-Lymphozyten (Tabelle 8). Dabei war auffällig, dass sich diese besonders in der Nähe der gefundenen Titanpartikel befanden und sich als Cluster anordneten. In einigen Fällen umschlossen diese

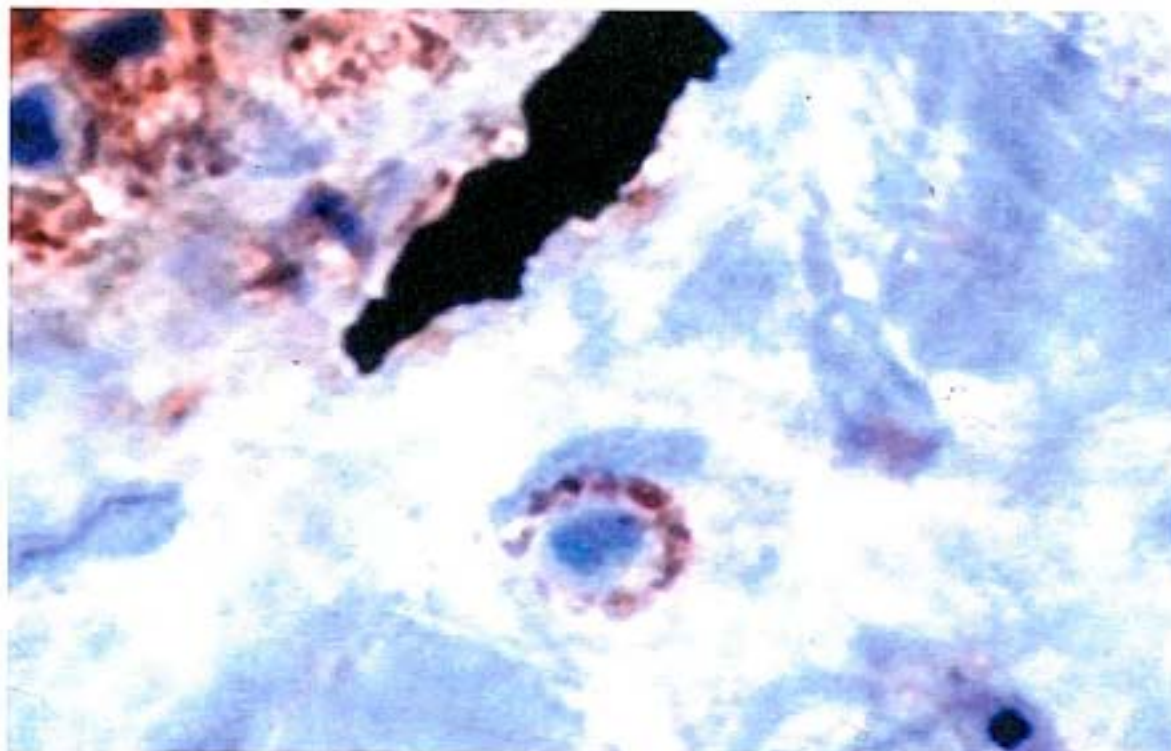
Cluster auch die einzelnen Partikel. Im übrigen konnte man auch hier einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der vorhandenen Titanpartikel und derjenigen der detektierten T-Lymphozyten feststellen.

Abbildung 11: CD45RO positive T-Lymphozyten in der Nähe von Titanpartikeln (100x)



Die Abbildung 11 (Patient Nr.11 in der Tabelle 8) zeigt in einer 100fachen Vergrößerung ein Beispiel eines solchen Clusters von T-Lymphozyten in der Mitte der Photographie in der Nähe einiger schwarzen Titanpartikel bei drei Uhr. Die rot als CD45RO positive Leukozyten detektierten Zellen lagern sich dabei eng zusammen, so dass eine Angrenzung einzelner Zellen kaum möglich ist.

Abbildung 12: Titanpartikel mit CD45RO positivem T-Lymphozyten (1000x)



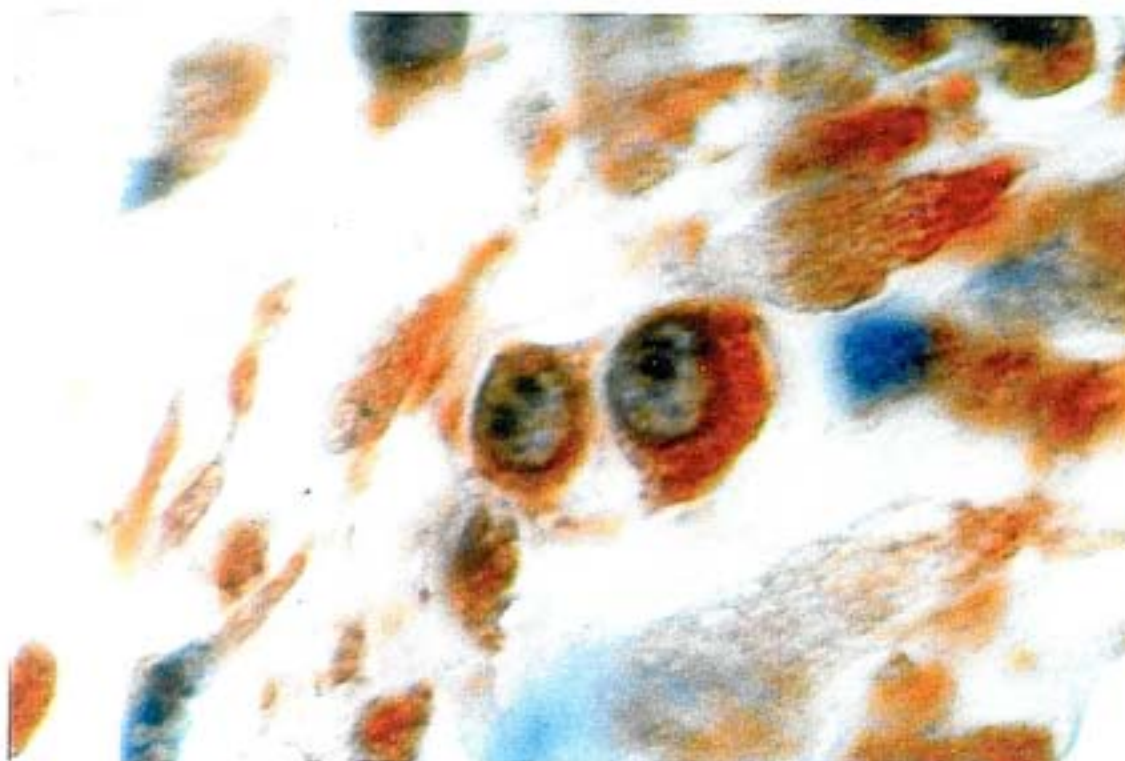
Im Gegensatz dazu zeigt die Abbildung 12 (Patient Nr.11) in der Mitte einen einzelnen T-Lymphozyten, der sich ebenfalls direkt benachbart zu einem Titanpartikel befindet. Darüber hinaus beobachtet man in dieser 1000fachen Vergrößerung bei ungefähr zehn Uhr andeutungsweise einen weiteren T-Zellen-Cluster. Die genauere Betrachtung des einzelnen T-Lymphozyten illustriert des weiteren sehr anschaulich die Bindung des monoklonalen Antikörpers gegen das Epitop CD45RO an die äußere Zellmembran sowie dessen Detektion. Als Ergebnis der Färbung resultiert also dieser rote Ring um den mit Hämatoxylin blau gefärbten basophilen Zellkern.

### **3.1.5 CD3 positive T-Lymphozyten**

Da das zur Charakterisierung von T-Lymphozyten gewählte Epitop CD45RO auch von Zellen der myelomonozytischen Zellreihe exprimiert wird, war es zur Absicherung der im vorherigen Kapitel beschriebenen Ergebnisse notwendig eine weitere Färbung unter Verwendung von Antikörpern gegen das Epitop CD3 durchzuführen. Dieses findet sich nur auf den äußeren Zellmembranen von T-Lymphozyten (Roitt 1991). Die diesbezüglich

durchgeführten Untersuchungen belegten die Anwesenheit von T-Lymphozyten in allen untersuchten Proben mit der im vorherigen Kapitel erwähnten Ausnahme der Proben des Patienten mit der Nummer 12. Dabei ließen sich im Implantatkontaktgewebe zu den Titanimplantaten in sechs Fällen eine geringe, in 13 Fällen ein mittlere und in zwei Fällen eine große Zellzahl nachweisen (siehe Tabelle 8). Wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben formierten sich die T-Lymphozyten auch hier in der Regel in einer clusterförmigen Anordnung. Einen Ausschnitt eines solchen Clusters zeigt die Abbildung 13.

Abbildung 13: Ausschnitt eines Clusters von CD3 positiven T-Lymphozyten (1000x)

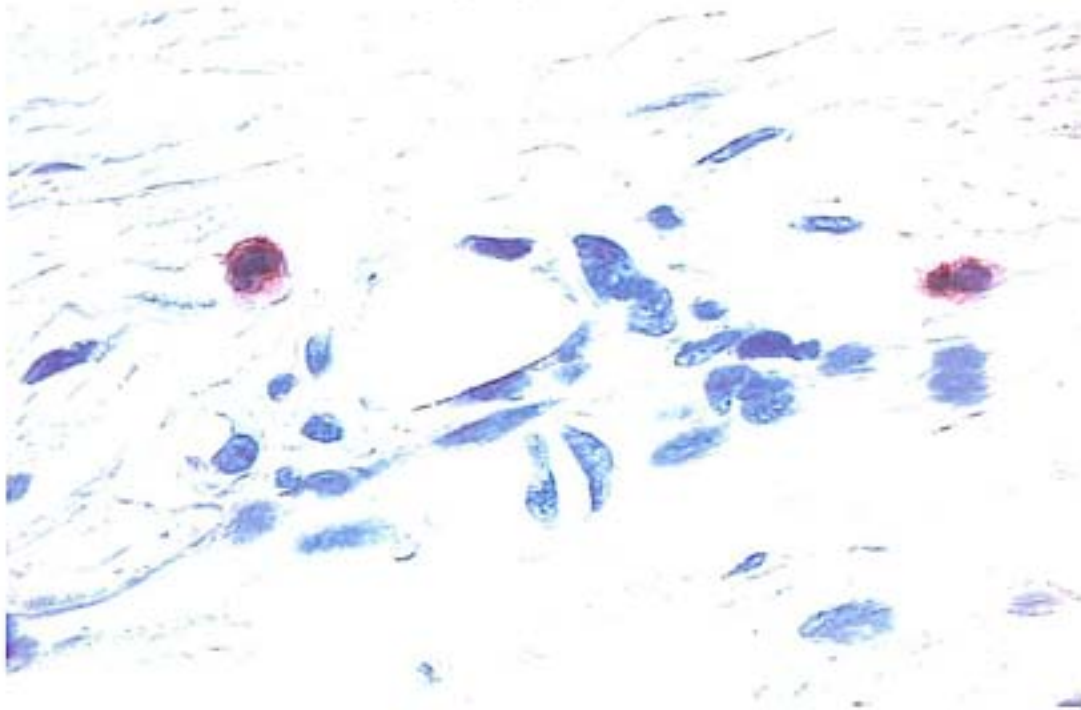


Diese Abbildung zeigt in ihrem Zentrum zwei angefärbte T-Lymphozyten mit der für diese Zellgattung typischen Kern/Plasma Relation. Diese ist zugunsten des blau dargestellten Zellkernes verschoben, wohingegen sich das Zellplasma schmal darstellt. Im übrigen findet man die Anschnitte einiger weiterer Zellen, deren Zellmembran durch die Bindung des Antikörpers gegen das Epitop CD3 rot gefärbt ist.

### 3.1.6 CD8 positive T-Lymphozyten

Nach der oben beschriebenen Detektion von T-Lymphozyten erschien es natürlich sinnvoll zu untersuchen, um welche Subpopulation es sich handelte. Da uns in diesem Zusammenhang kein paraffinängiger Antikörper für das Epitop CD4 zur Verfügung stand, mussten wir uns darauf beschränken, nach CD8 positiven T-Lymphozyten zu suchen und die so nicht detektierten T-Zellen als CD4-positive T-Helferzellen zu identifizieren. Wie die Tabelle 8 zeigt, war nur der kleinere Anteil der im Rahmen der Färbung unter Verwendung des Antikörpers gegen das Epitop CD45RO identifizierten T-Lymphozyten auch CD8 positiv. Wir konnten im Kontaktgewebe zu 2 Implantaten eine mittlere, zu 13 Implantaten eine geringe und zu 7 Implantaten keine CD8 positiven T-Zellen nachweisen. Eine große Zahl von diesen ließ sich in keinem Fall zeigen. Wir gehen daher davon aus, dass es sich bei den übrigen T-Lymphozyten um CD4 positive T-Helferzellen handelt. Dieses erscheint auch nach der großen Zahl von identifizierten Makrophagen nachvollziehbar, da diese im Rahmen der Immunkaskade mit den T-Helferzellen über die ebenfalls nachgewiesenen HLA-DP/DQ/DR-Moleküle interagieren.

**Abbildung 14:** CD8 positive T-Lymphozyten (1000x)



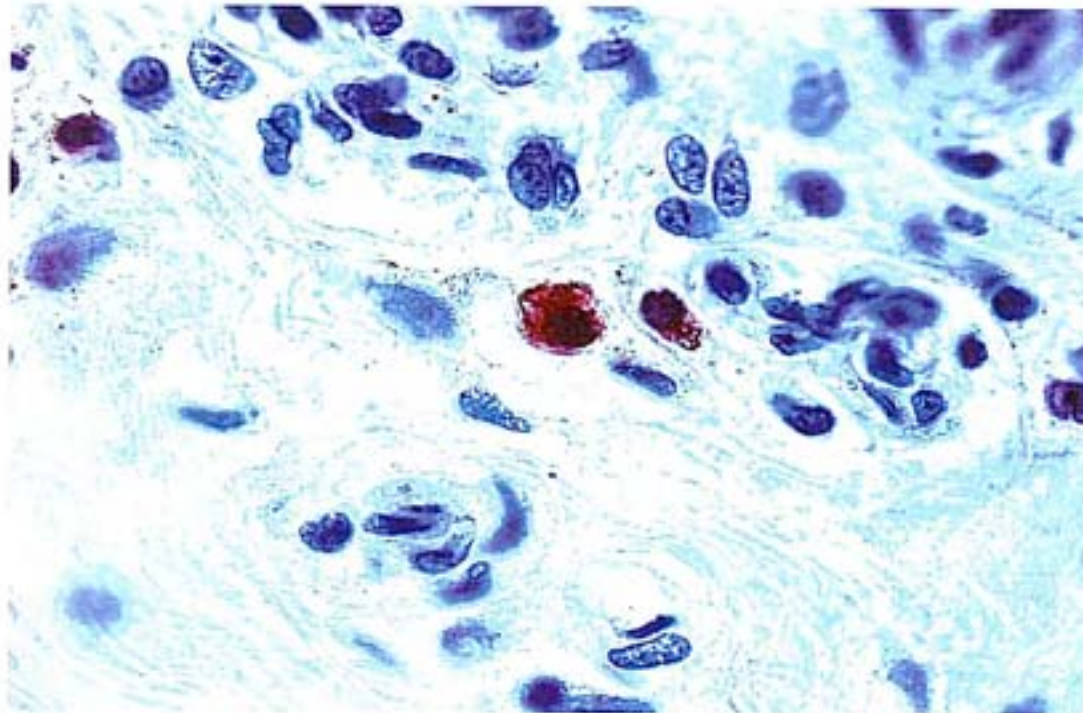
Die Abbildung 14 zeigt zwei detektierte CD8 positive T-Lymphozyten in 1000facher Vergrößerung. Ihr liegt dabei eine Probe des Patienten Nr. 20 (Tabelle 8) zugrunde. Diese Photographie zeigt repräsentativ für andere, dass diese Zellen nur vereinzelt vorlagen. Bei den anderen durch ihre Zellkerne in Erscheinung tretenden Zellen handelt es sich um Bindegewebszellen.

### **3.1.7 CD79 $\alpha$ positive B-Lymphozyten**

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung ergab nur eine geringe Anzahl von B-Lymphozyten. Wie der Tabelle 8 zu entnehmen ist, konnten wir nur bei insgesamt sechs Patienten eine geringe Anzahl von CD79 $\alpha$  positiven B-Lymphozyten beobachten. In den anderen Proben waren sie hingegen nicht nachweisbar.



Abbildung 15: CD79 $\alpha$  positiver B-Lymphozyt (1000x)



Die Abbildung 15, deren zugrunde liegende Probe dem Patienten mit der Nummer 4 in der Tabelle 8 entnommen wurde, zeigt zentral zwei immunhistochemisch detektierte B-Lymphozyten. Sie verdeutlicht, dass diese Zellen nur vereinzelt sichtbar waren.

**Tabelle 8: Auswertung für die Patienten mit Titanimplantaten**

Fall Nr.	Alter/Geschl.(Jahre)	Implantat	Implantat-verweildauer (Monate)	makroskop. Metallose	Partikel	Antikörper						
						CD68	CD45R0	HLA-DP/DQ/DR	CD8	CD79α	CD3	
1	8/M	LC-DCP	8	ja	++	++	+	++	-	-	++	
2	39/W	Drittelrohrplatte	12	ja	++	++	+	++	-	-	++	
3	48/W	Drittelrohrplatte	11	ja	++	++	++	++	+	+	++	
4	70/W	Drittelrohrplatte	7	ja	+++	+++	++	+++	++	+	+++	
5	83/W	Drittelrohrplatte	14	ja	++	++	++	+++	++	-	++	
6	14/M	LC-DCP	12	ja	+++	+++	+	+++	+	+	++	
		LC-DCP		ja	+	+++	++	+++	+	-	++	
7	34/W	Drittelrohrplatte	12	ja	++	++	++	++	-	-	+	
8	8/M	LC-DCP	8	ja	++	++	++	++	+	-	++	
9	9/M	LC-DCP	9	ja	+++	+++	++	+++	+	+	++	
10	15/M	Drittelrohrplatte	9	ja	++	++	++	++	+	+	++	
11	44/M	LC-DCP	31	ja	++	++	++	++	+	-	+	
		Drittelrohrplatte		ja	++	++	+++	++	+	-	++	
12	9/M	LC-DCP	11	ja	+++	+++	-	++	-	-	-	
13	4/M	LC-DCP	9	nein	++	++	+	+	+	+	+	
14	2/W	LC-DCP	4	ja	++	+	++	++	-	-	+	
15	20/M	LC-DCP	18	ja	++	++	++	++	+	-	++	
16	23/W	LC-DCP	24	ja	++	++	++	++	+	-	+	
17	18/M	LC-DCP	18	ja	++	++	+	++	+	-	+	
18	10/M	LC-DCP	15	ja	+++	+++	++	+++	-	-	++	
19	8/M	LC-DCP	12	nein	+	+	+++	+	-	-	+++	
20	17/M	LC-DCP	22	ja	+++	+++	++	+++	+	+	++	

**Legende:** +++ = zahlreich/dicht; ++ = mittlere Anzahl; + = vereinzelt; W = weiblich; M = männlich  
 LC-DCP = low contact dynamic compression plate

## 3.2 Gewebereaktion auf Stahlimplantate

### 3.2.1 Stahlpartikel im periimplantären Gewebe

Auch im Falle der Stahlimplantate waren in den meisten untersuchten Fällen bereits intraoperativ makroskopisch schwarze Verfärbungen des periimplantären Gewebes zu erkennen. Diese Beobachtung konnten wir entsprechend der in der Tabelle 9 wiedergegebenen Auswertung bei 17 von 22 untersuchten Implantaten aus rostfreiem Stahl, die zur Versorgung von insgesamt 20 Patienten eingesetzt waren, machen. Dabei zeigte sich diese Verfärbung sowohl im Plattenlager wie auch im sekundär über die jeweilige Platte gewachsenen Gewebe. Als Prädilektionsstelle muss man jedoch das Plattenlager bezeichnen.

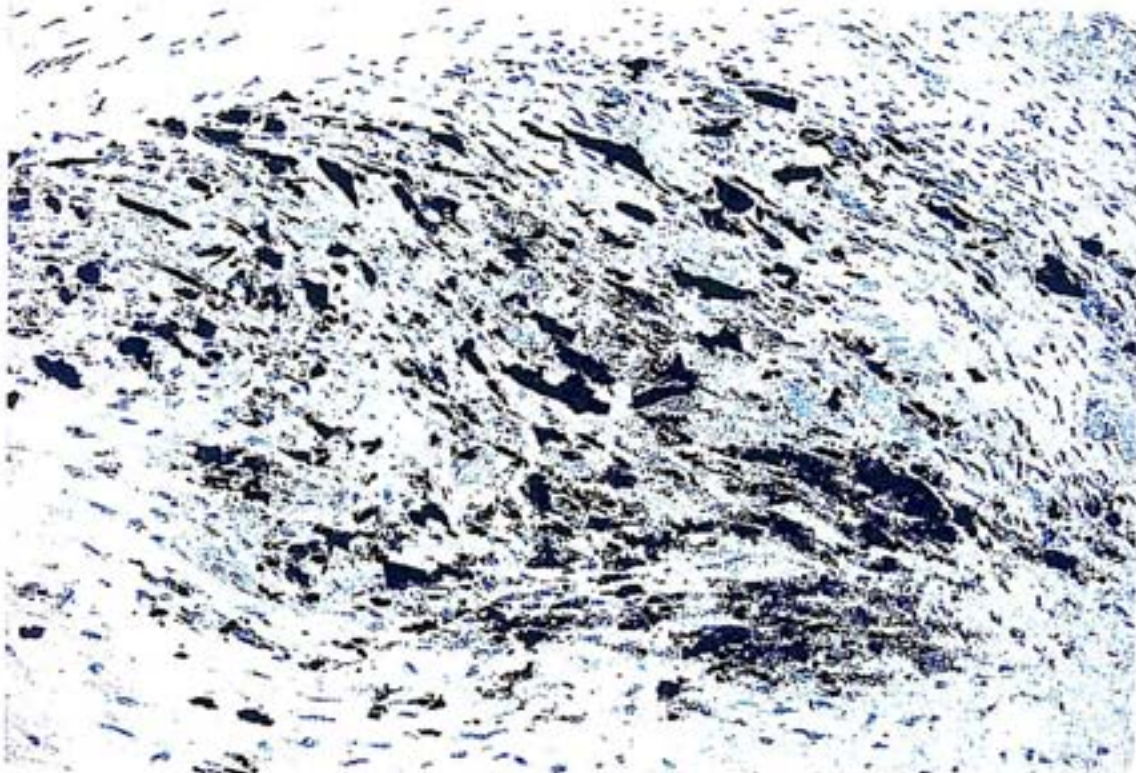
Abbildung 16: Plattenlager einer DCP aus rostfreiem Stahl



Die Abbildung 16 zeigt eine intraoperativ gemachte Aufnahme des Plattenlagers nach der Entfernung einer DCP aus rostfreiem Stahl. Hier zeigt vor allem das dritte Schraubenloch von links eine ausgeprägte schwarze Verfärbung als Zeichen für die Anwesenheit von Stahlpartikeln.

Diese Vermutung bestätigte sich bei Betrachtung der mikroskopischen Präparate. In diesem Zusammenhang konnten wir bei allen untersuchten Proben Stahlpartikel in dem in der Tabelle 9 jeweils im Einzelnen wiedergegebenem Ausmaß beobachten. Auch hier erfolgte die Quantifizierung nach dem in Kapitel 2.6 beschriebenen Prinzip. Dabei fanden sich in einem Fall eine große, in 16 Fällen eine mittlere und in vier Fällen ein kleine Anzahl von Partikeln, die sich wie im Falle der Titanimplantate in einer intraoperativ zu beobachteten fibrösen Kapsel befanden.

Abbildung 17: Stahlpartikel im Plattenkontaktgewebe (Hämatoxylin, 200x)



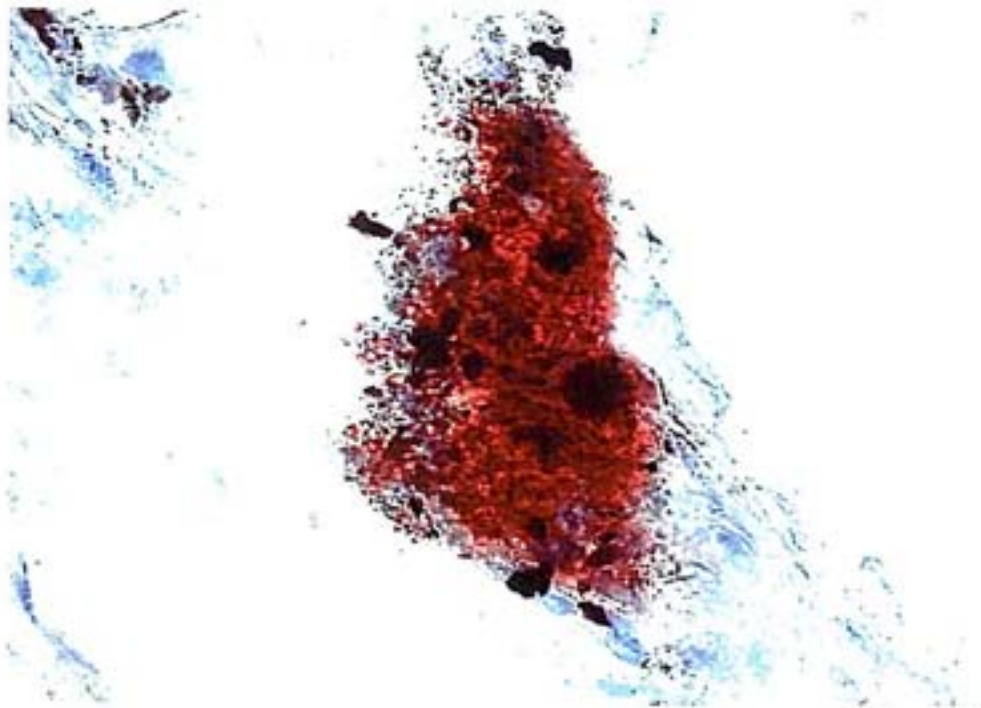
Die Abbildung 17 zeigt die 200fache Vergrößerung eines mit Hämatoxylin gefärbten histologischen Präparates, das dem Lager einer DCP aus Stahl des Patienten Nr. 9 der Tabelle 9 entstammte. Hier erkennt man eine große Anzahl ebenfalls schwarzer Stahlpartikel die sich ohne Ordnung über die gesamte Bildfläche verteilen. Ihre Größe entsprach dabei der der Titanpartikel und umfasste so ein Spektrum von feinen Stäuben bis hin zu größeren Körnern. Auch hier war dabei schon in den mit Hämatoxylin gefärbten Präparaten zu erkennen, dass sich der größte Teil der gefundenen Partikel intrazellulär befinden musste.

### 3.2.2 CD68 positive Makrophagen

Da bereits die Hämatoxylinfärbung den Verdacht auf eine Phagozytose der gefundenen Stahlpartikel nahe legte, war auch im Falle der Stahlimplantate eine immunhistochemische Untersuchung zum Nachweis CD68 positiver Makrophagen indiziert.

Wie im Falle der untersuchten Titanimplantate konnten auf diese Weise die phagozytierenden Zellen als Makrophagen identifiziert werden. Sie waren, wie auch die Partikel, in jeder Probe zu identifizieren und korrelierten in ihrer Anzahl mit der der vorhandenen Partikel aus rostfreiem Stahl. Ihre Fähigkeit zur Phagozytose war dabei ebenfalls abhängig von der Größe des Materials, so dass sie ab einer gewissen Größe nur noch an die Partikel adhärten, statt sie zu internalisieren.

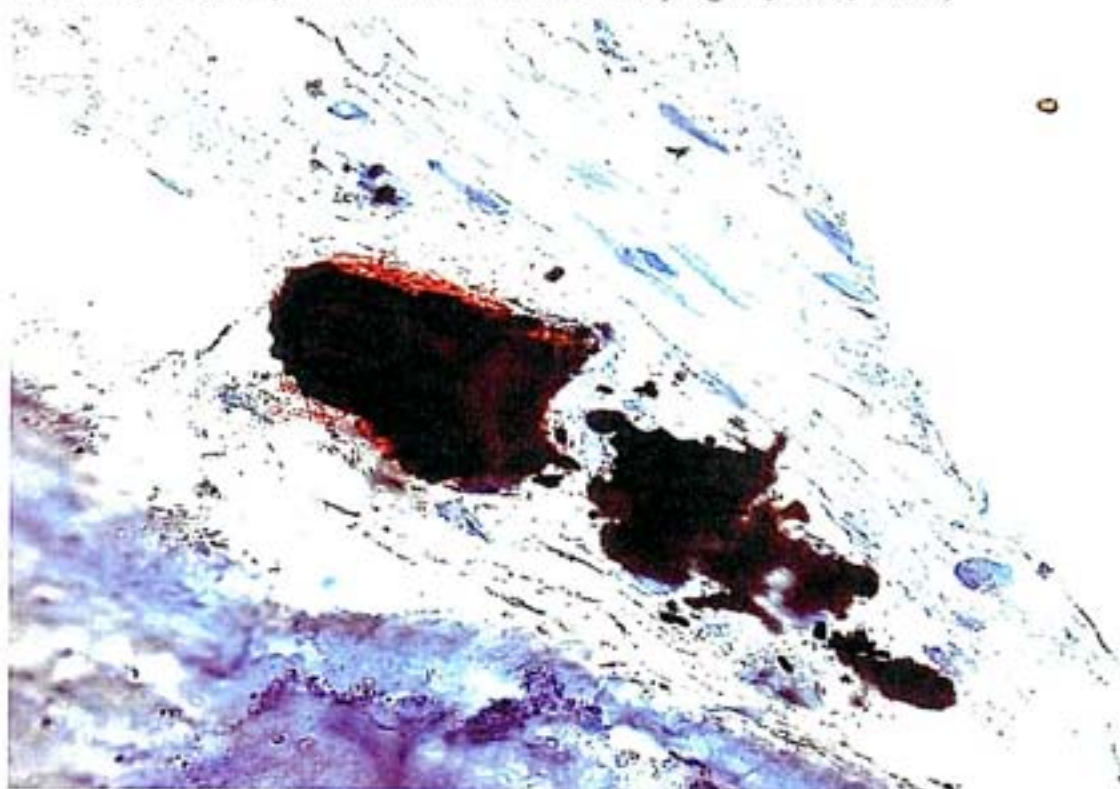
Abbildung 18: Feine phagozytierte Stahlpartikel (CD68, 1000x)



Die Abbildung 18 zeigt ein Beispiel von einem feinen Stahlstaub, der von CD68 positiven Makrophagen phagozytiert worden ist. Die zugrunde liegende Probe entstammt dem Patienten Nr.4 der Tabelle 9. Während die feinen Partikel dabei schwarz sind, zeigt die intensive rote Färbung die Anwesenheit der Makrophagen.

Leider sind in diesem Bild die rote Färbung mit den schwarzen Partikeln zusammen so kompakt, dass die einzelnen Zellkerne und somit die einzelnen Makrophagen nicht voneinander abgrenzbar sind, obwohl sie mittels einer Hämatoxylinfärbung blau hervorgehoben werden sollten.

Abbildung 19: Stahlpartikel mit adhärennten Makrophagen (CD68, 1000x)



Im Gegensatz dazu zeigt die Abbildung 19, die von einer Probe des Patienten mit der Nummer 3 in der Tabelle 9 entnommen wurde, mehrere große Stahlpartikel, die wegen ihrer Größe eine Internalisierung durch die Makrophagen unmöglich machen. Der schmale rote Saum um den großen Partikel bestätigt dabei die Anwesenheit der Makrophagen. Darüber hinaus erkennt man bei genauerer Betrachtung auch einige Zellkerne, die direkt anliegen. Der linke untere Bildrand zeigt Knochengewebe und somit wird klar, dass auch diese Probe dem Plattenlager entstammte.

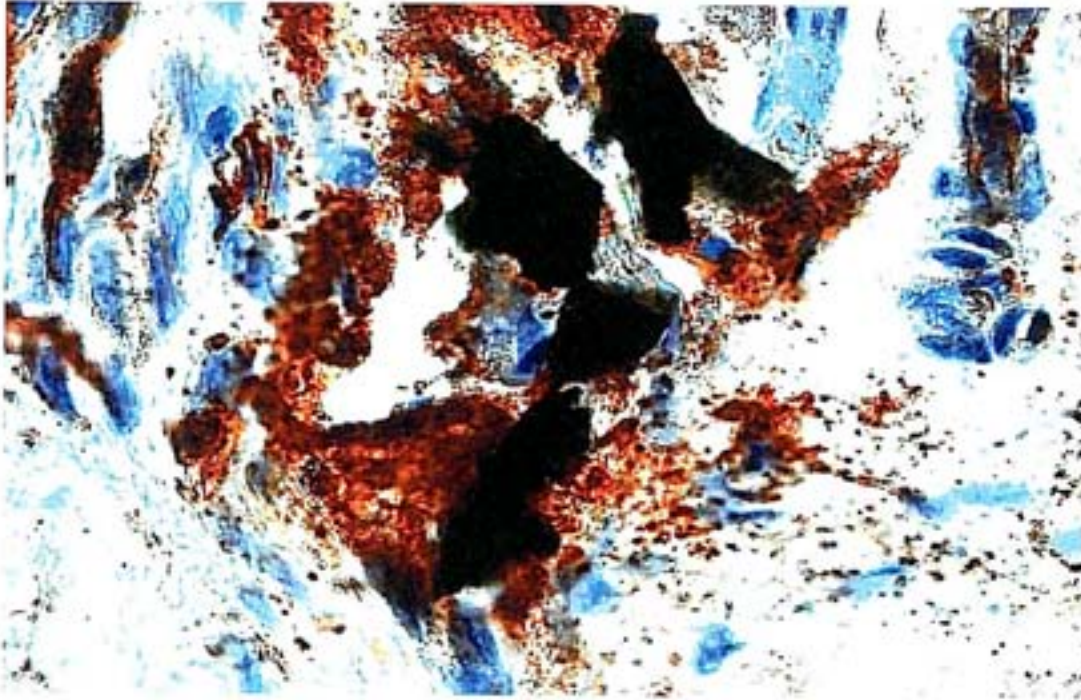
Insgesamt ergab die semiquantitative Auswertung in zwei Fällen eine große, in 14 Fällen eine mittlere und in fünf Fällen eine kleine Anzahl von CD68 positiven Makrophagen.

### 3.2.3 Antigenpräsentierende Zellen (HLA-DP/DQ/DR)

Auch im Rahmen der Untersuchung des Implantatkontaktgewebes zu Osteosyntheseplatten aus rostfreiem Stahl erschien es sinnvoll, eine eventuelle Aktivierung der gefundenen Makrophagen durch die Phagozytose zu überprüfen. Analog den in Kapitel 3.1.3 dargelegten Überlegungen verwendeten wir auch hier den Antikörper gegen das Epitop HLA-DP/DQ/DR. Durch den Vergleich dieser Färbung mit den Ergebnissen unter Verwendung des Antikörpers CD68 war es somit möglich eine Aktivierung der gefundenen phagozytierenden Makrophagen nachzuweisen.

Wie den in der Tabelle 9 dargelegten Auswertung zu entnehmen ist, waren die meisten detektierten Makrophagen gleichzeitig auch HLA-DP/DQ/DR positiv und somit durch die Aufnahme der Stahlpartikel aktiviert. Wir fanden dabei in zwei Fällen eine große, in acht Fällen eine mittlere, in zehn Fällen eine kleine und in einem Fall keine HLA-DP/DQ/DR positiven Zellen. In zwölf Proben stimmt dabei die semiquantitative Beurteilung mit derjenigen der Färbung mit Antikörper CD68 überein. In acht Fällen fanden wir um einen Beurteilungspunkt weniger und in zweien um etwa die gleiche Zahl mehr HLA-DP/DQ/DR positive Zellen. Dies bedeutet, dass teilweise nicht alle gefunden Makrophagen eine Aktivierung zeigten und in zwei Fällen auch andere HLA-DP/DQ/DR positive Zellen vorhanden waren.

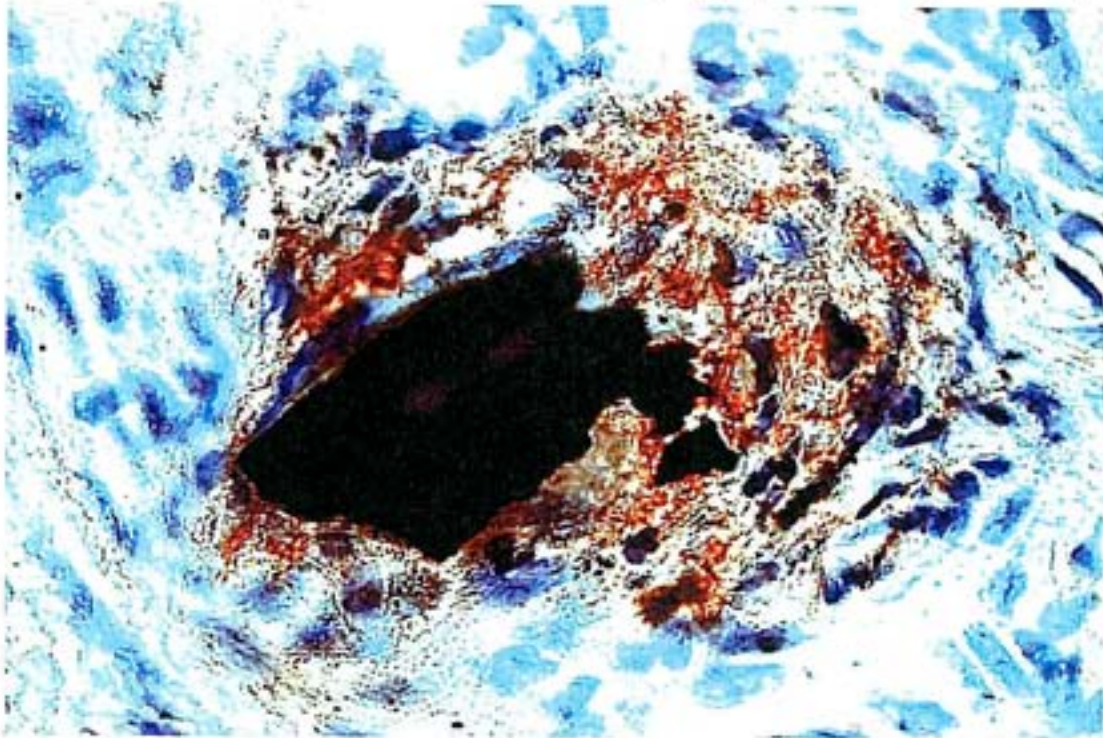
Abbildung 20: Phagozytose von Stahlpartikeln durch HLA-positive Makrophagen (1000x)



Die Abbildung 20, deren zugrunde liegende Probe dem Patienten mit der Nummer 18 in der Tabelle 9 entnommen wurde, zeigt zahlreiche Stahlpartikel in unterschiedlicher Größe, die zum überwiegenden Teil durch Makrophagen phagozytiert wurden. Diese mittels des Antikörpers CD68 identifizierten Zellen sind nach dieser Färbung ebenfalls HLA-DP/DQ/DR positiv und dürfen somit als aktiviert im Sinne der Antigenpräsentation gelten.



Abbildung 21: Stahlpartikel mit adhärenen Makrophagen (HLA-DP/DQ/DR 1000x)



Ähnliches wie für die Abbildung 20 gilt auch für Abbildung 21, deren Probe dem Patienten 8 entstammte. Hier zeigt sich in 1000facher Vergrößerung ein für die Internalisierung zu großer Stahlpartikel, an den die Makrophagen, wie schon im obigen Kapitel gezeigt, adhäreren. Sie bilden dabei förmlich einen Ring von mehreren Zellreihen und schließen diesen ein. Auch diese Zellen sind HLA-DP/DQ/DR positiv und somit in einem höheren Aktivitätsstatus

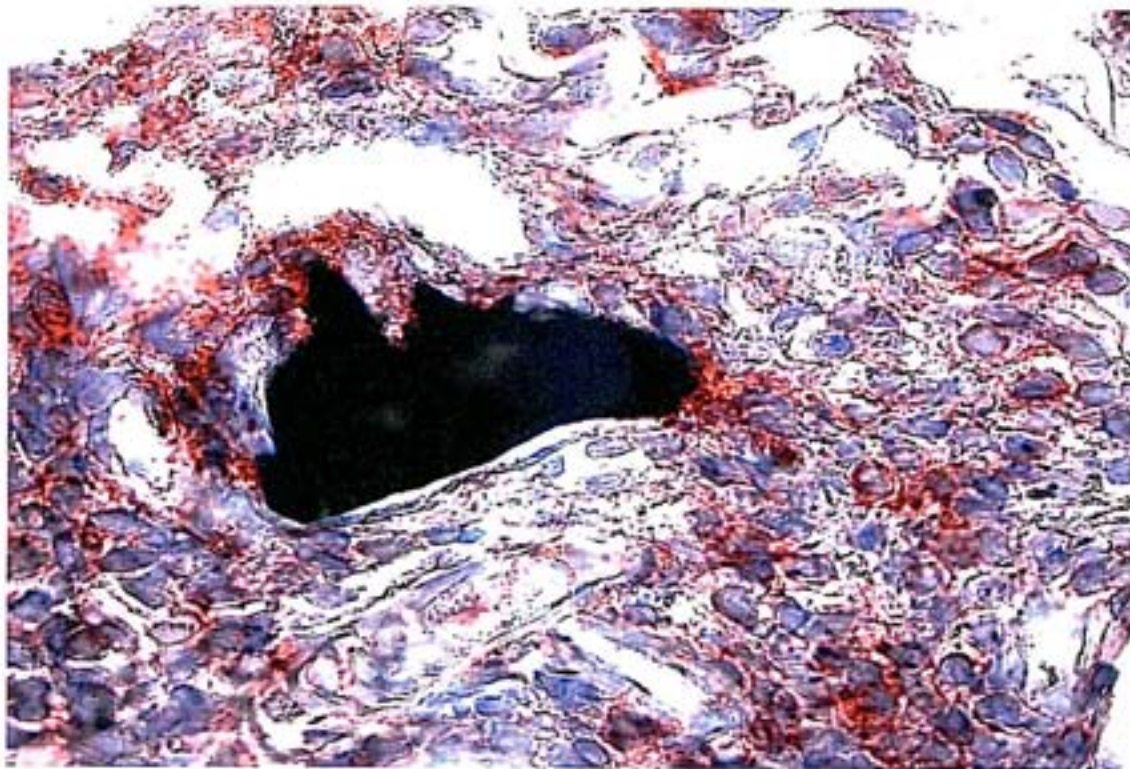
### **3.2.4 CD45RO positive T-Lymphozyten**

Wie für die Titanimplantate oben beschrieben, war auch für die Untersuchung der Gewebereaktion auf Osteosynthesematerial aus rostfreiem Stahl der Nachweis von T-Lymphozyten mittels des Antikörpers gegen das Epitop CD45RO und das Epitop CD3 von zentraler Bedeutung. Dieser Nachweis gelang in allen einbezogenen Proben in dem in der Tabelle 9 im Einzelnen wiedergegebenen Ausmaße. Dabei fanden wir in zwei Fällen eine große, in 16 Fällen eine mittlere und in drei Fällen eine kleine Anzahl von T-Lymphozyten.

Bei genauerer Betrachtung der Präparate scheint es, wie auch bei den bisher betrachteten Zelltypen, einen Zusammenhang mit der Anzahl der vorhandenen Stahlpartikel zu geben. Grob verallgemeinernd kann man also sagen, dass mit einer steigenden Zahl von Partikeln auch die Zahl der Makrophagen, der antigenpräsentierenden Zellen sowie auch der in diesem Kapitel betrachteten T-Lymphozyten zunimmt.

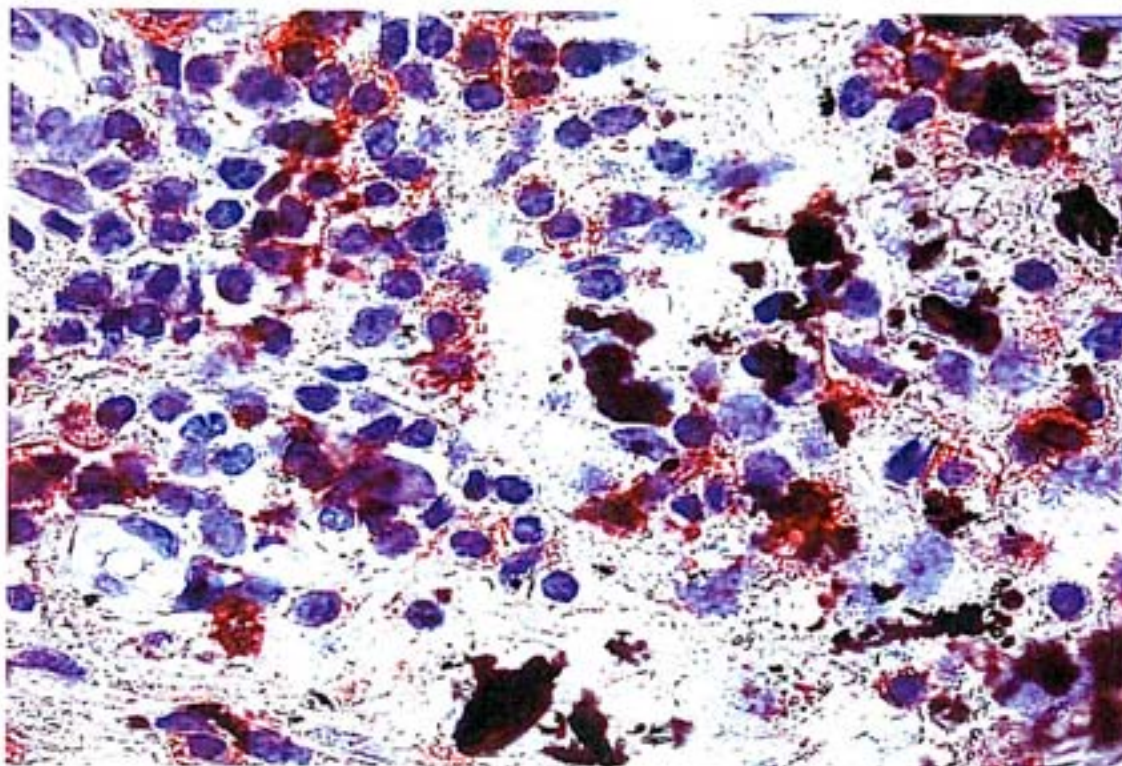
Das Verhalten der so detektierten Zellen entsprach in den untersuchten Fällen demjenigen wie es in Kapitel 3.1.4 im Rahmen der untersuchten Titanimplantate beschrieben wurde. So konnten auch hier beobachtet werden, dass sich die T-Lymphozyten besonders in der Nähe der im Präparat vorhandenen Stahlpartikel aufhielten und diese teilweise einschlossen. Dabei waren sie häufig in Form von Zellhaufen angeordnet.

Abbildung 22: Stahlpartikel mit CD45RO positiven T-Lymphozyten (1000x)



Die Abbildung 22 wurde von einem Präparat des Patienten 1 der Tabelle 9 angefertigt und stellt ein anschauliches Beispiel für dieses Verhalten dar. Man erkennt hier einen zentral gelegenen großen Stahlpartikel, der von einem Cluster von CD45RO positiven T-Lymphozyten umgeben ist. Die unmittelbar an diesen anliegenden Zellen stellen in Analogie der bisherigen Ergebnisse wahrscheinlich Makrophagen dar.

**Abbildung 23:** zahlreiche Stahlpartikel mit T-Lymphozyten (CD45RO, 1000x)



Die in Abbildung 23 (Patient Nr. 9, Tabelle 9) zu sehenden Stahlpartikel sind feiner und liegen in den meisten Fällen intrazellulär nach der vermutlichen Phagozytose durch Makrophagen. Hierauf weisen die dicht neben den Partikeln sichtbaren blau gefärbten Zellkerne hin. Auch hier erkennt man zahlreiche T-Lymphozyten, die sich in unmittelbarer Nähe zu den Partikeln aufhalten. Sie liegen auch hier in Form eines Zellclusters vor, obwohl manche von ihnen nur schwach detektiert sind.

### **3.2.5 CD3 positive T-Lymphozyten**

Die in Ergänzung zu den Färbungen mit dem Antikörper CD45RO durchgeführten Untersuchungen unter Verwendung des Epitopes CD3 zeigten ebenfalls die Anwesenheit von T-Lymphozyten in allen untersuchten Proben des Implantatkontaktgewebes zu den Stahlimplantaten. In diesem Zusammenhang war es möglich in drei Fällen eine geringe, in 16 Fällen ein mittlere und in zwei Fällen ein große Zellzahl nachzuweisen (Tabelle 9). Im

übrigen bestätigten die im Rahmen dieser Färbung gemachten Beobachtungen die im Kapitel 3.2.4 beschriebenen Erfahrungen. Auch hier zeigten die nachgewiesenen T-Lymphozyten die Tendenz sich in Clustern zu organisieren, die in der Regel in der Nähe von freigesetzten Stahlpartikeln zu finden waren.

Abbildung 24: Übersichtsaufnahme nachgewiesener CD3 positiver T-Lymphozyten (100x)



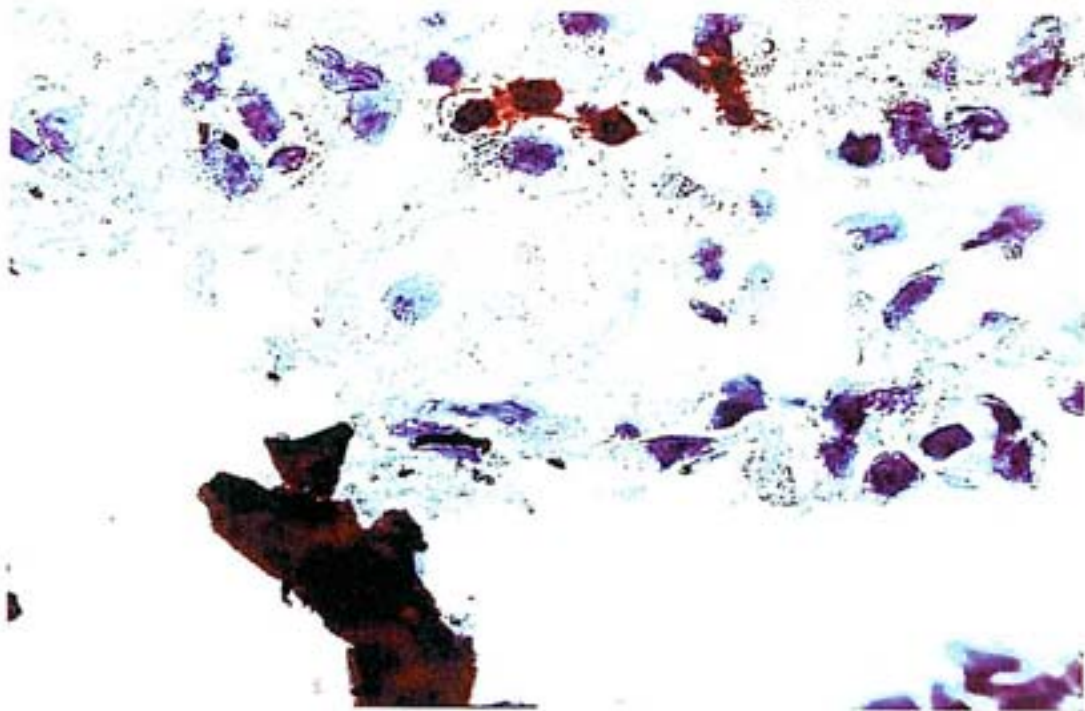
Die Abbildung 24 zeigt in diesem Zusammenhang eine Übersichtsaufnahme eines Präparates in 100facher Vergrößerung. Man erkennt hier einige detektierte T-Lymphozyten zwischen anderen Zellen, bei denen es sich am ehesten um Fibrozyten oder -blasten handelt. Diese zeigen dabei besonders im Bereich links unten die Tendenz zu Zusammenlagerung zu Gruppen oder Paaren.

### 3.2.6 CD8 positive T-Lymphozyten

Die Untersuchungen zur Subspezifizierung der gefundenen T-Lymphozyten führten wir mangels Alternativen auch im Fall des Stahls mittels des Antikörpers gegen das Epitop CD8 durch. Auch hier mussten wir den Vergleich mit den Ergebnissen der Färbung unter

Verwendung des Antikörpers CD45RO anstellen, um die mit CD8 nicht detektierten T-Lymphozyten als CD4positive T-Helferzellen zu identifizieren. Nach den Auswertungen der Tabelle 9 konnten wir in fünf Fällen eine mittlere, in zwölf Fällen eine geringe und in vier Fällen keine CD8 positiven T-Lymphozyten beobachten. Dieses Ergebnis ähnelt dabei demjenigen der Untersuchung der Titanimplantate. Auch hier ist also der geringere Anteil der T-Lymphozyten mit dem Epitop CD8 zu charakterisieren, so dass man in der Mehrzahl der Fälle von T-Helferzellen ausgehen muss. In einzelnen Fällen konnten wir dabei diese CD8 positiven Zellen auch in der unmittelbaren Nähe zu den Stahlpartikeln finden.

Abbildung 25: Stahlpartikel mit einzelnen CD8 positiven T-Lymphozyten (1000x)

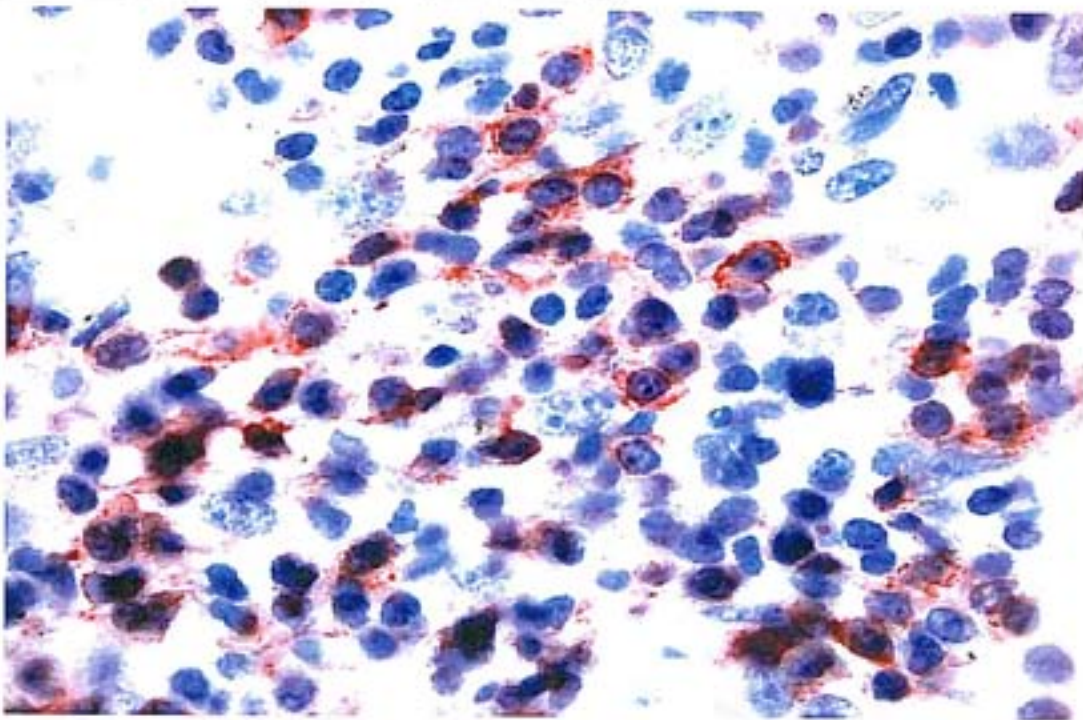


Die Abbildung 25 soll dieses illustrieren. Das hier zu sehende Präparat entstammt dem Patienten mit Nummerierung 18 (Tabelle9) und zeigt am oberen Bildrand fünf CD8 positive T-Lymphozyten. Am unteren Bildrand, also in direkter Nähe, erkennt man dabei einen größeren Stahlpartikel. Die kleineren Partikel liegen gut sichtbar intrazellulär.

### 3.2.7 CD79 $\alpha$ positive B-Lymphozyten

Auch im Rahmen der Untersuchung der immunologischen Reaktion auf Stahlimplantate erschien die Suche nach B-Lymphozyten als Vertreter der humoralen Immunantwort sinnvoll. Das Resultat der immunhistochemischen Färbung ergab jedoch ein ähnliches Bild wie im Falle der Titanimplantate. Die Anwesenheit von B-Lymphozyten erwies sich als Ausnahme. Wie der Tabelle 9 zu entnehmen ist, fanden wir nur in vier Fällen B-Lymphozyten, von denen zwei eine geringe und zwei eine mittlere Zahl aufwiesen.

Abbildung 26: B-Lymphozyten (CD79 $\alpha$ , 1000x)



Die Abbildung 26 zeigt das einzige Präparat, in dem B-Lymphozyten in nennenswerter Zahl beobachtet werden konnten. Man erkennt hier eine ganze Gruppe von diesen Zellen, die jedoch in keiner Beziehung zu Stahlpartikeln standen. Diese Aufnahme stellt jedoch, wie bereits erwähnt, eine Ausnahme dar.

**Tabelle 9: Auswertung für die Patienten mit Stahlimplantaten**

Fall Nr.	Alter/Geschlecht (Jahre)	Implantat	Implantat-verweildauer (Monate)	makroskop. Metallose	Partikel	Antikörper						
						CD68	CD45R0	HLA-DP/DQ/DR	CD8	CD79α	CD3	
1	48/W	Drittelrohrplatte	12	ja	++	++	++	++	+	-	+	
2	45/M	Drittelrohrplatte	21	ja	+	++	++	+	++	-	++	
3	49/M	Kondylenplatte	63	ja	++	+	+	+	+	-	+	
4	52/W	Rekonstruktionsplatte	16	ja	++	+	+	+	+	-	++	
5	66/W	Drittelrohrplatte	12	ja	++	++	++	++	++	-	+	
6	50/W	DCP	12	ja	++	+	++	+	+	-	++	
7	56/W	DCP	12	ja	+	++	-	++	++	-	++	
8	60/M	Rekonstruktionsplatte	21	ja	++	++	+	+	-	-	++	
9	63/W	DCP	19	ja	+++	++	++	+	+	-	++	
10	27/M	Rekonstruktionsplatte		ja	++	+++	+	+	+	-	++	
11	47/M	T-Platte	21	ja	++	++	+	+	+	-	++	
12	42/W	Drittelrohrplatte	17	nein	+	++	+	+	+	+	++	
13	64/M	Drittelrohrplatte	7	ja	++	++	+	+	-	-	++	
14	60/M	Drittelrohrplatte	12	nein	+	++	+	+	++	-	++	
15	45/W	DCP	13	ja	++	++	++	+	+	-	++	
16	45/W	DCP	22	nein	++	++	+	+	-	-	+++	
17	34/W	Drittelrohrplatte	8	ja	++	++	++	++	-	-	++	
18	41/M	Drittelrohrplatte	12	ja	++	++	++	++	++	++	++	
19	48/M	Drittelrohrplatte	19	ja	++	++	+++	+++	+	-	++	
20	69/M	Drittelrohrplatte	19	ja	++	++	++	++	+	++	++	
20	45/M	Drittelrohrplatte	240	ja	++	+++	+++	+++	+	+	+++	

**Legende:** +++ = zahlreich/dicht; ++ = mittlere Anzahl; + = vereinzelt; M = männlich; W = weiblich  
DCP = dynamic compression plate

## **3.3 Elektronenmikroskopie**

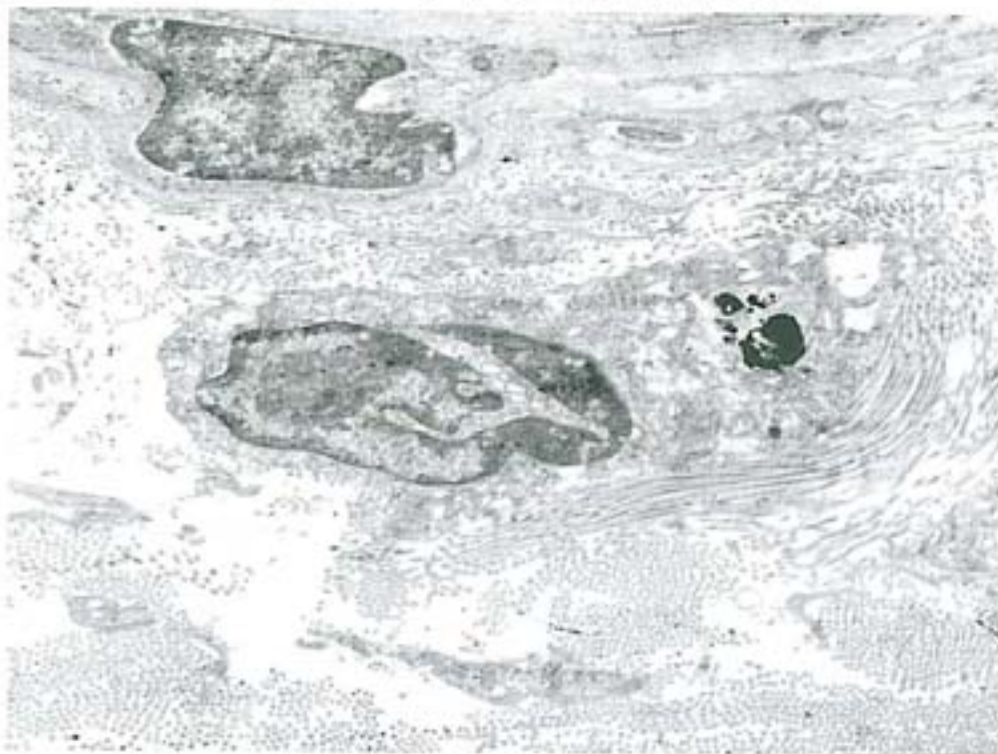
### **3.3.1 Implantatkontaktgewebe zu Titanimplantaten**

Wie bereits in Kapitel 2.7.2 dargelegt, diente uns die Elektronenmikroskopie zum einen zur Verifizierung der Aufnahme der vom jeweiligen Implantat freigesetzten Titanpartikel in phagozytierende Zellen. Des weiteren war die Charakterisierung der intrazellulären Lokalisation dieser Partikel Ziel dieser Untersuchung.

Die mit den Vergrößerungsfaktor 4000 bis 22000 durchgeführte Betrachtung der nach Kapitel 2.7 vorbereiteten Präparate zeigte, dass sich die Titanpartikel des periimplantären Gewebes intrazellulär befanden. Dabei konnten wir in den meisten Fällen eine Membran um diese Partikel beobachten, so dass davon auszugehen ist, dass sie in Phagolysosomen aufgenommen worden waren. Die phagozytierenden Zellen konnten wir auch in dieser Untersuchung anhand der Morphologie als Makrophagen identifizieren. Neben intakten Makrophagen mit phagozytiertem Material fanden wir jedoch auch eine Zahl von zerstörten Zellen, wobei nicht geklärt ist, ob es sich hier um Artefakte handelt, oder diese durch die Aufnahme der Titanpartikel zugrunde gingen.



**Abbildung 27:** Makrophage mit phagozytiertem Titan (22000x)



Die Abbildung 27 zeigt ein Beispiel einer elektronenmikroskopischen Abbildung. Man erkennt unter anderem bei ungefähr drei Uhr eine phagozytierende Zelle, die sich als Makrophage identifizieren lässt. Bei dem phagozytierten Objekt handelt es sich um Titan, welches sich wie schon in der Durchlichtmikroskopie schwarz darstellt. Bei genauerer Betrachtung stellt man fest, dass sich dieses Material in einem Phagolysosom befindet, da es von einer Membran eingeschlossen wird.

Neben diesem Lysosom lässt sich der Zellkern klar abgrenzen. Oberhalb des Makrophagen erkennt man im übrigen ein weitere Zelle mit dem auch hier deutlich sichtbaren Zellkern. Der Interzellularraum zeigt vor allem unterhalb des Makrophagen Kollagenfasern, die sowohl quer- als auch längs angeschnitten sind.

### **3.3.2 Implantatkontaktgewebe zu Stahlimplantaten**

Die Untersuchung des periimplantären Gewebes zu den Implantaten aus Stahl zeigte dieselben Ergebnisse, wie wir sie im Falle des Titans beobachten konnten. Auch hier konnten wir im Rahmen der elektronenmikroskopischen Betrachtung der nach Kapitel 2.7 vorbereiteten Präparate beobachten, dass die vom Implantat freigesetzten Partikel intrazellulär

in Phagolysosomen zu finden waren. Auch hier entsprach die Morphologie der phagozytierenden Zellen der von Makrophagen.

Zur besseren Veranschaulichung soll auch in diesem Zusammenhang eine Abbildung dienen.

Abbildung 28: Anschnitt eines Makrophagen mit phagozytierten Stahlpartikeln (22000x)



Die Abbildung 28 zeigt dabei mit einem Vergrößerungsfaktor von 22000 den Ausschnitt eines Makrophagen, dessen Zellkern sich leider nicht im gewählten Bildausschnitt befindet. Zentral und bei etwa zehn Uhr lassen sich schwarze Partikel finden, bei denen es sich, wie im folgenden Kapitel zu beweisen ist, um Stahl handelt. Besonders im Falle des oberen Partikels lässt sich dabei wie im Falle des Titans eine dünne Linie erkennen, bei der es sich um eine Membran handelt. Diese zeigt auch der andere besonders bei ungefähr vier Uhr und bestätigt, dass auch sie jeweils von der Membran eines Phagolysosoms eingeschlossen sind.

Des weiteren erkennt man auf der Abbildung einige Mitochondrien sowie Ribosomen. Die sich als feine Punkte darstellen. Im Intrazellularraum findet man darüber hinaus zahlreiche Kollagenfibrillen, die oberhalb der Zelle quer und unterhalb längs angeschnitten sind. Der obere Bildrand zeigt im übrigen den Anschnitt einer folgenden Zelle.

### 3.4 Rasterelektronenmikroskopische EDX Analyse

Wie sowohl die Betrachtung mittels der Durchlichtmikroskopie sowie der Elektronenmikroskopie zeigten, stellten sich die gefundenen Partikel jeweils schwarz und nicht transparent dar. Obwohl es nahe liegend erschien, dass es sich hier jeweils um Material des betreffenden Implantates aus Titan oder Stahl handelte, war es notwendig, dieses mittels einer rasterelektronenmikroskopischen energy dispersive x-ray Analyse (EDX-Analyse) der Partikel zu verifizieren.

Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tabelle 10: Zusammensetzung der schwarzen Partikel im periimplantären Gewebe zu Titanplatten:

Bestandteil	relativer Anteil in %
Titan (Ti)	57,5
Silizium (Si)	33
Calcium (Ca)	6,5
Natrium (Na)	3

Tabelle 11: Zusammensetzung der schwarzen Partikel im periimplantären Gewebe zu Stahlplatten

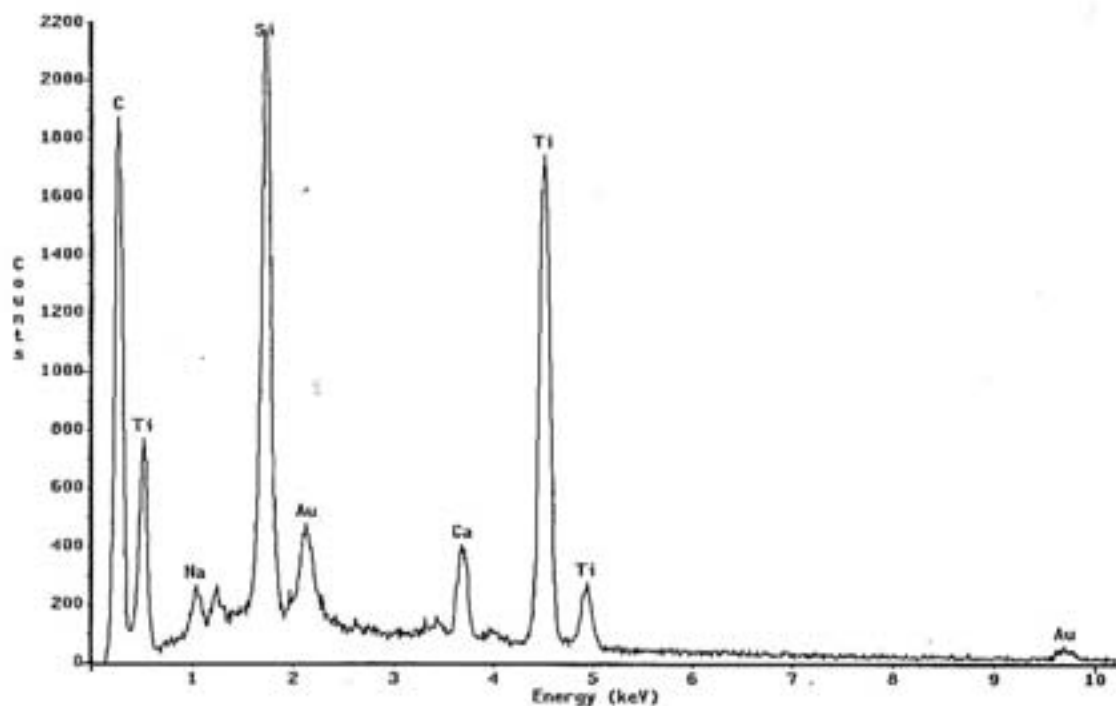
Bestandteil	relativer Anteil in %
Eisen (Fe)	66
Chrom (Cr)	18,75
Nickel (Ni)	13,75
Silizium (Si)	1,5

Bei diesen Ergebnissen ist zu berücksichtigen, dass verfahrensbedingt leider auch nicht den Partikeln zuzuordnende Bestandteile aufgeführt werden. So entstammt das Silizium dem Objektträger aus Glas, auf dem das zu untersuchende Präparat aufgebracht war. Das in Tabelle 10 zu findende Natrium sowie auch das Calcium entstammen dem Einbettmedium.

Zu besseren Veranschaulichung zeigt die Abbildung 29 die graphische Darstellung der REM-EDX-Analyse für die Partikel im Implantatkontaktgewebe zu Titanplatten. Hier findet man unter anderem auch einen Gold (Au)- Peak, der entsteht, da man, wie Kapitel 2.8 beschrieben die Präparate zur besseren Kontrastierung mit Gold bedampft. Der Kohlenstoff (C) –Peak ist ebenfalls verfahrensbedingt.

Nach Berücksichtigung dieser artifiziellen Bestandteile bleiben nur noch die Zusammensetzungen der jeweiligen Implantate aus Titan und Stahl übrig. Damit ist offensichtlich, dass die gefundenen schwarzen Partikel tatsächlich vom jeweiligen Implantat freigesetzt wurden.

Abbildung 29: graphische Darstellung der EDX-Analyse der Titanpartikel



## **4. Diskussion**

### **4.1 Charakterisierung der Gewebereaktion**

#### **4.1.1 Charakteristik der Gewebereaktion auf Titanimplantate**

Wie die vorliegende Untersuchung zeigt, setzen Osteosyntheseplatten aus Reintitan, die zur Versorgung von Frakturen langer Röhrenknochen Verwendung fanden, in allen untersuchten Fällen Titanpartikel in das lokale Gewebe frei. Dabei konnten diese Partikel sowohl im Plattenlager, als auch im Gewebe über der Platte nachgewiesen werden. Als Prädilektionsstelle müssen in diesem Zusammenhang allerdings die Grate im Bereich der Schraubenlöcher gelten. Mikroskopisch konnten dabei auch in solchen Fällen Partikel gefunden werden, die makroskopisch unauffällig waren.

Die von uns durchgeführte rasterelektronenmikroskopische EDX-Analyse konnte zeigen, dass diese Partikel in ihrer chemischen Zusammensetzung dem jeweiligen Implantat entsprachen, so dass damit der Nachweis geführt werden konnte, dass sie auch tatsächlich von diesen freigesetzt wurden.

Wie wir immunhistochemisch und elektronenmikroskopisch zeigen konnten unterlagen die Titanpartikel dabei der Phagozytose durch CD68 positive Makrophagen. Intrazellulär war das phagozytierte Material von einer Membran umgeben und somit wahrscheinlich in Phagolysosomen dem Angriff durch Enzyme ausgesetzt. Bei Partikeln aus Titan, die für eine Internalisierung durch Phagozyten zu groß waren, beobachten wir eine Adhärenz der Zellen. Die phagozytierenden Makrophagen präsentierten dabei auf ihrer Zelloberfläche HLA-DP/DQ/DR-Moleküle, so dass wir von einer Aktivierung dieser Zellen durch die Aufnahme der Titanpartikel ausgehen können.

Neben den Makrophagen zeigten die Auswertungen der Immunhistochemie in den meisten Fällen auch die Anwesenheit von zahlreichen CD45RO bzw. CD3 positiven T-Lymphozyten, die sich häufig in Form von Clustern formierten. Der Zusammenhang zur Phagozytose der

Titanpartikel wird dabei durch die Tatsache bekräftigt, dass sich diese meistens in der Nähe der Partikel aufhielten oder diese gar umringten. Die Subspezifizierung der gefundenen T-Lymphozyten führten wir unter Verwendung des Antikörpers gegen das Epitop CD8 durch und stellten dabei fest, dass die Subpopulation der CD8 positiven T-Zellen nur die Minderheit darstellte. Daher gehen wir davon aus, dass es sich in der Mehrzahl um die CD4 positiven T-Helferzellen handelt. Neben diesen Vertretern der zellulären spezifischen Immunabwehr konnten wir jedoch nur in Ausnahmefällen auch CD79 $\alpha$  positive B-Lymphozyten als Vertreter der humoralen spezifischen Abwehr detektieren.

Zusammenfassend konnte unsere Untersuchung also zeigen, dass Osteosyntheseplatten aus Reintitan Partikel freisetzen, die eine immunologische Reaktion des periimplantären Gewebes auslösen. Träger dieser Reaktion sind HLA-DP/DQ/DR-positive Makrophagen und in der Mehrzahl CD4-positive T-Lymphozyten in Abwesenheit von B-Lymphozyten. Es handelt sich also um eine Immunantwort vom zellulären Typus, wie sie auch im Rahmen von Kontaktallergien zu beobachten ist. Die humorale Komponente des Immunsystems scheint dabei keine wesentliche Rolle zu spielen.

#### **4.1.2 Vergleich der Gewebereaktion auf Osteosyntheseplatten aus rostfreiem Stahl**

Auch die von uns untersuchten Osteosyntheseplatten aus rostfreiem Stahl setzten Partikel in das Implantatkontaktgewebe frei, wobei auch hier unabhängig vom makroskopischen Aspekt mikroskopisch in allen Fällen Partikel nachgewiesen werden konnten. Die semiquantitative Auswertung erbrachte dabei keinen wesentlichen Unterschied zur Freisetzung von Titanpartikeln im Bezug auf die Menge der freigesetzten Partikel: Titan: 6 x +++, 14 x ++ und 2 x +; Stahl: 1 x +++, 16 x ++ und 4 x +.

Auch bei der Frage der Prädilektionsstellen zeigte die Untersuchung der Proben aus dem lokalen Gewebe von Stahlplatten keine Unterschiede. Wie im Falle des Titans lagen diese im Plattenlager im Bereich der Schraubenlöcher, obwohl Stahlpartikel ebenfalls im Gewebe über der Platte zu finden waren.

Mittels der rasterelektronenmikroskopischen EDX-Analyse der schwarzen Partikel konnte im Falle der Stahlimplantate ebenfalls der Nachweis erbracht werden, dass diese auch tatsächlich von Osteosyntheseplatten aus rostfreiem Stahl freigesetzt wurden, da die elementare Zusammensetzung dieselbe war.

Auch die Partikel aus Stahl unterlagen der Phagozytose durch CD68 positive Makrophagen, die diese ebenfalls in Phagolysosomen aufnahmen. Waren die Stahlpartikel für die Phagozytose zu groß, adhärten die Makrophagen an diese. Wie im Falle des Titans führte dabei die Aufnahme der Stahlpartikel zu einer Aktivierung Makrophagen, die dieses durch die Präsentation von HLA-DP/DQ/DR Molekülen auf der Zelloberfläche offenbarten. Nachdem der qualitative Vergleich somit in diesem Punkt keine Unterschiede aufweist, zeigt auch der Blick auf die semiquantitative Auswertung keine wesentlichen Differenzen:

**CD68:** Titan: 7 x +++, 13 x ++ und 2 x + im Vergleich zu Stahl: 2 x +++, 14 x ++ und 4 x + sowie

**HLA-DP/DQ/DR:** Titan: 6 x +++, 12 x ++ und 4 x + im Vergleich zu Stahl: 2 x +++, 8 x ++, 10 x + und 1 x -.

Die Makrophagen wurden dabei ebenfalls durch CD45RO bzw. CD3 positive T-Lymphozyten begleitet, die auch hier besonders in der Nähe der Stahlpartikel in Clusterform zu finden waren. Die Subspezifizierung erbrachte wie bei den Titanplatten ein vorwiegendes Vorliegen von CD4 positiven T-Helferzellen, wohingegen die CD8 positiven T-Lymphozyten den kleineren Anteil repräsentierten. Der Vergleich der Quantifizierung zeigt hierbei keinen eindeutigen Unterschied:

**CD45RO:** Titan: 2 x +++, 14 x ++, 5 x + und 1 x - im Vergleich zu Stahl: 2 x +++, 16 x ++ und 3 x + bzw.

**CD3:** Titan: 2 x +++, 13 x ++, 6 x + und 1 x - im Vergleich zu Stahl: 2 x +++, 17 x ++ und 2 x + sowie

**CD8:** Titan: 2 x ++, 13 x + und 7 x - im Vergleich zu Stahl: 5 x ++, 12 x + und 4 x -.

B-Lymphozyten als Vertreter der humoralen spezifischen Immunantwort waren auch hier nur vereinzelt nachweisbar wie das semiquantitative Ergebnis im Vergleich zum Osteosynthesematerial aus Reintitan zeigt: **CD79a:** Titan: 6 x + und 16 x - sowie Stahl: 2 x ++, 2 x + und 17 x -.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass sowohl qualitativ als auch semiquantitativ kein wesentlicher Unterschied zwischen der immunologischen Reaktion des periimplantären

Gewebes zu Osteosyntheseplatten aus Reintitan und aus rostfreiem Stahl in unserer Untersuchung nachweisbar war. Wie bereits oben erwähnt handelt es somit in beiden Fällen um eine Immunreaktion vom zellulären Typus, die vor allem durch aktivierte Makrophagen und T-Helferzellen bei einer geringeren Anzahl von CD8 positiven T-Lymphozyten getragen wird.

## 4.2 Bewertung des Titans als Implantatwerkstoff

Nach unserem Kenntnisstand wird in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal die Gewebereaktion des Implantatkontaktgewebes zu Osteosyntheseplatten aus Titan im Vergleich zu rostfreiem Stahl nach Versorgung von Frakturen langer Röhrenknochen charakterisiert. Titan gilt im allgemeinen, wie im Kapitel 1.2 beschrieben wurde, als idealer Implantatwerkstoff im Rahmen des Konzeptes der offenen Reposition und internen Fixation (ORIF), wie sie seit den 60er Jahren von der Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthese gefordert wird (Perren 1991). Wie bereits erwähnt, soll ein wesentlicher Vorteil in der „ausgezeichneten Biokompatibilität“ liegen (Perren et al. 1990), die sich vor allem in der Oxidschicht (Titandioxid) begründet (Scales 1991), welche sich bei Sauerstoffexposition sofort aus- und nachbildet.

Trotz dieses Bildes vom Titan als biologisch inerten Implantatwerkstoff berichten schon früh einige Autoren von erhöhten Titanspiegeln im periimplantären Gewebes von Titanimplantaten (Ferguson 1960; Meachim und Williams 1973; Williams D. F. 1974; Williams 1974; Ruedi 1975; Moran et al. 1991; Rosenberg et al. 1993; Jorgenson et al. 1997; Mofid 1997; Acero et al. 1999). Schon 1967 beobachteten Berg und Emneus in ihrer Untersuchung von insgesamt 55 Moore-Prothesen aus Vitallium und Titan das Titan öfter eine Schwarzverfärbung der Gewebe hinterließ, die jedoch regelmäßig ohne entzündliche Reaktion verlief (Ruedi 1975).

Williams und Meachim berichten 1974 ebenfalls von einer Schwarzfärbung des Implantatkontaktgewebes bei ihren untersuchten Titanimplantaten, was sie veranlasste den Titanspiegel im periimplantären Gewebe zu bestimmen. Sie fanden bei ihren insgesamt 19 untersuchten Fällen neun Mal eine Titankonzentration von mehr als 100 ppm, wobei drei von diesen sogar eine Konzentration von >2000 ppm aufwiesen. Dabei sahen sie einen



Zusammenhang zwischen der Höhe des nachgewiesenen Titanspiegels des Gewebes und dem Grad der Verfärbung zum Schwarzen hin, so dass sie im Titan die Ursache für ihre Beobachtung vermuteten. Die gefundenen Titanpartikel detektierten sie bei genauerer mikroskopischer Betrachtung intrazellulär im Zytoplasma von Makrophagen, Fibrozyten und perivaskulären Zellen. Ein Zusammenhang zwischen der Verweildauer der Implantate und der Konzentration des Titans im Gewebe konnten sie erstaunlicherweise nicht feststellen (Williams 1974). Schlussfolgernd konstatiert Williams später, dass auch Titan nicht als absolut biokompatibel gelten darf (Williams 1994).

Auch Ruedi beschreibt in seiner tierexperimentellen Untersuchung von „Titan und Stahl in der Knochenchirurgie“ schwarze Partikel und stellt fest, dass „die ausgeprägteste Gewebedurchsetzung mit schwarzen Partikeln [...] die Sekundärheilung mit Titan-Monometallen“ aufwies (Ruedi 1975). In diesem Zusammenhang beobachtet auch er „eine durch Metalldepots verursachte grau-schwarze Gewebsverfärbung, die histologisch außer den phagozytierten Pigmenten keine reaktiven Veränderungen auslöste“.

Moran berichtet 1991 von sechs untersuchten Fällen von Titanexpositionen von denen drei die Lunge, zwei die Haut und einer die Synovia betrafen. Die pulmonale Reaktion auf die Exposition umfasste dabei eine ausgeprägte Fibrose und zahlreiche Makrophagen, die eine große Anzahl schwarzer Partikel phagozytiert hatten. Darüber hinaus wiesen die Patienten Bronchopneumonien in benachbarten Lungenarealen auf. Auch an der Haut beobachtete er reichlich schwarzes Pigment, das von einer unspezifischen inflammatorischen Reaktion in dem einen und einer ausgedehnten Nekrose in dem anderen Fall begleitet wurde. In allen Fällen wurde dabei die Präsenz von Titan mittels der EDX-Analyse der schwarzen Partikel bestätigt (Moran et al. 1991).

Rosenberg (Rosenberg et al. 1993) sah sich durch diese Ergebnisse veranlasst auch die Gewebereaktion auf Titan-Miniplatten aus der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie hinsichtlich der Anreicherung von Titan im lokalen Gewebe zu untersuchen. Dabei führte er einen Vergleich mit Champy-Platten aus rostfreiem Stahl durch. Er sah eine makroskopisch sichtbare schwarze Pigmentierung des Implantatkontaktgewebes zu den Titanplatten in 25,5% der Fälle, während er diese Beobachtung im Falle der Stahlimplantate nicht machen konnte. Mikroskopisch war die Pigmentierung in 71,8% der Proben des Kontaktgewebes zu Titan und in 65,3% zu Stahl detektierbar. Auch hier bestätigte er die Anwesenheit des Titans und des

Stahls mittels der EDX-Analyse. Die Titanpartikel lokalisierte er vor allem „zwischen den Kollagenfasern“, wohingegen die Stahlpartikel besonders in Riesenzellen zu finden waren.

Zur genaueren Charakterisierung der Gewebereaktion bedienten sich unter anderem Torgersen 1995 und Katou 1996 erstmalig in diesem Zusammenhang der Immunhistochemie, um immuninflammatorische Zellen im periimplantären Gewebe nachzuweisen (Torgersen et al. 1995; Katou et al. 1996). Beide untersuchten dabei das lokale Gewebe von Miniplatten, die zur Versorgung von Frakturen in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie eingesetzt worden waren. Katou (Katou et al. 1996) beobachtete mikroskopisch bei jedem seiner zwölf untersuchten Patienten die Anwesenheit von Titanpartikeln, die auch hier eine Schwarzfärbung des Gewebes verursachten und sich in den meisten Fällen in einer fibrösen Kapsel um das Implantat aufhielten. Sie unterlagen der Phagozytose durch CD68 positive Makrophagen, in denen sie elektronenmikroskopisch nachweisbar in Phagolysosomen lokalisiert waren. Die Makrophagen exprimierten darüber hinaus HLA-DR Moleküle auf ihrer äußeren Zellmembran, was auch Katou als Zeichen ihrer Aktivierung durch die Phagozytose interpretierte. Einige unter ihnen zeigten wie in unserer Untersuchung degenerative Veränderungen. Auch T-Lymphozyten konnte er bei neun der in die Studie einbezogenen Patienten detektieren, wobei die CD4 positiven T-Helferzellen den größeren Anteil stellten. Ihre Anwesenheit nach einer durchschnittlichen Implantatverweildauer von zirka neun Monaten interpretierte Katou als Zeichen einer chronischen Entzündung. Im übrigen berichtet er von der Proliferation zahlreicher Blutgefäße, deren Endothelzellen hypertrophierten und neben HLA-DR auch CD54 sowie CD62P exprimierten. Er bediente sich ebenfalls der rasterelektronenmikroskopischen EDX-Analyse, um die schwarzen Partikel als Titan zu identifizieren. Ähnliche Ergebnisse beschreibt auch Torgersen (Torgersen et al. 1995) in seiner Arbeit. Er führte darüber hinaus noch einen Vergleich mit der Gewebereaktion auf Miniplatten aus rostfreiem Stahl durch. Dieser ergab jedoch keinen wesentlichen Unterschied in der durch HLA-DR positive Makrophagen und CD3positive T-Lymphozyten geprägten immuninflammatorischen Reaktion. Besonders diese beiden Arbeiten zeigen also eine große Übereinstimmung mit den Ergebnissen unserer Untersuchung.

Acero (Acero et al. 1999) kommt, nachdem er in 80% seiner untersuchten Fälle lichtmikroskopisch sichtbare Titanpartikel im Titanplattenkontaktgewebe identifizieren konnte, zu dem Ergebnis, dass Titan wohl doch mehr Korrosion entwickelt, als bisher angenommen.

Mofid (Mofid 1997) untersuchte in seiner tierexperimentellen Arbeit die Reaktion des Gehirns auf Titan im Vergleich mit Vitallium, rostfreiem Stahl und Silikon. Er implantierte diese Materialien in den Parietallappen von Kaninchen und beobachtete die inflammatorische Reaktion des Gewebes nach zwei, vier, acht und 26 Wochen. Dabei wählte er als Kriterien die Mikroglia proliferation, die Gliose sowie die Leukozyteninfiltration. Nach zwei Wochen verursachte Titan im Vergleich die stärkste inflammatorische Reaktion. Nach 26 Wochen jedoch zeigten Vitallium und Titan ein ähnliches Ausmaß an entzündlicher Reaktion, das ausgeprägter als beim Silikon und schwächer als beim rostfreiem Stahl zu bewerten war. Auch diese Untersuchung zeigt aber, dass Titan nicht als biologisch inert einzustufen ist.

Eine Frage, die sich nach der Beobachtung von Titanpartikeln im periimplantären Gewebe stellt, ist die nach dem weiteren Verbleib. Metallionen und lösliche Korrosionsprodukte können einerseits offenbar durch Diffusion eliminiert und über den Lymphabfluss wegtransportiert werden (Ferguson 1960), während die unlöslichen Metallpartikel andererseits in der Umgebung des Implantates interzellulär deponiert oder durch Phagozytose intrazellulär gespeichert werden.

Fischer Brandies (Fischer-Brandies 1993) untersuchte in seiner Arbeit die Gewebebelastung mit Titan nach 17 Schraubenosteosynthesen mit Salzburger Zugschrauben. Wie die anderen erwähnten Autoren konnte auch er unabhängig vom makroskopischen Aspekt, der in 40% der Fälle eine schwarze Pigmentierung offenbarte, in fast allen Fällen Titanpartikel im Gewebe nachweisen. Dabei findet er neben Histiozyten, die die Partikel phagozytierten keine weiteren Leukozytensubpopulationen. Entscheidend für die weiteren Betrachtungen ist bei dieser Studie jedoch, dass hier keine Reibung zwischen einer Platte und einer Schraube stattgefunden haben kann. Darüber hinaus folgert Fischer-Brandies, dass „die Titanabgabe nicht auf das lokale Gewebe beschränkt“ bleibt und verweist dabei vor allem auf die Publikationen von Schliephake (Schliephake et al. 1993; Schliephake et al. 1993).

Dieser führte eine tierexperimentelle Untersuchung mit sechs Göttinger Minischweinen durch, denen er je zwei Schraubenimplantate aus Reintitan implantierte. Die Ergebnisse zeigten, dass Titanpartikel während der Präparation des Implantatbettes abgerieben und auf der Knochenoberfläche deponiert wurden. Fünf Monate nach der Implantation waren keine Partikel mehr auf der Knochenoberfläche nachweisbar. Die Bestimmung des Titangehaltes der Organe zeigte, dass die Lungen den höchsten Gehalt an Titan aufwiesen, während die Nieren und die Leber weit weniger Titan enthielten. Man muss also davon ausgehen, dass

prinzipiell von Implantaten freigesetztes Titan nicht im lokalen Gewebe verbleibt, sondern auch in den parenchymatösen Organen zu finden ist. Diese These bestätigen auch die Arbeiten anderer Autoren (Woodman et al. 1984; Onodera et al. 1993; Bessho et al. 1995; Urban et al. 2000). Dabei identifizierte Bessho (Bessho et al. 1995), der japanischen Kaninchen mit Frakturen des Mandibularkörpers 4-Loch Miniplatten aus Reintitan implantierte, Titan ebenfalls vor allem in der Lunge. Er ging schlussfolgernd davon aus, dass durch Korrosion der Titanplatten Titanionen freigesetzt und mit dem Blutstrom in die Lunge transportiert wurden. Daneben konnte Titan auch in der Leber, der Milz und den Nieren nachgewiesen werden, wo die Konzentrationen jedoch deutlich geringer waren. Seiner Meinung nach ist es nach diesen Ergebnissen nicht gerechtfertigt Titanimplantate nach Implantation in situ zu belassen.

Die Anreicherung von Titanpartikeln in einem submandibulären Lymphknoten, der im lymphatischen Abflussgebiet einer am Unterkiefer implantierten Titanplatte beschreibt Onodera (Onodera et al. 1993) in einer Fallbeschreibung. Hier wird zum einen deutlich, dass die tierexperimentellen Ergebnisse der oben zitierten Autoren durchaus auf den Menschen übertragbar sind. Zum andern scheint neben dem Abtransport über den Blutweg in die parenchymatösen Organe auch der lymphatische Weg eine Rolle zu spielen.

Aus dem Bereich der Endoprothetik berichten sowohl Woodman 1984 (Woodman et al. 1984) als auch Urban 2000 (Urban et al. 2000) von der Anreicherung von Titanpartikeln in parenchymatösen Organen. Woodmann untersuchte dazu Paviane, bei denen er nach Implantation einer Prothese mit einer Titankomponente erhöhte Titanspiegel vor allem in den Lungen, der Milz, der regionalen Muskulatur sowie der Lymphknoten des entsprechenden Abflussgebietes identifizierte. Darüber hinaus zeigte auch der Urin der Tiere einen signifikant erhöhten Gehalt an Titan. Urban entnahm bei Patienten post mortem Proben der parenchymatösen Organe, die zu Lebzeiten eine Knie oder Hüftprothese erhalten hatten. Auch er fand dabei erhöhte Konzentrationen an Titan sowohl in der Leber, als auch in der Milz sowie in den paraaortalen Lymphknoten. Dabei wiesen die Patienten mit gelockerten Prothesen häufiger erhöhte Metallspiegel auf als solche mit primären Prothesen.

Im Bereich der Endoprothetik wird überdies von zahlreichen Autoren einen Zusammenhang zwischen der Anhäufung von Titanpartikeln im periprothetischen Gewebe und der aseptischen Prothesenlockerung diskutiert (Mirra et al. 1976; Mirra et al. 1982; Pazzaglia et al. 1987; Dorr et al. 1990; Howie 1990; Lalor et al. 1990; McKellop et al. 1990; Nasser et al.

1990; Haynes 1991; Lalor et al. 1991; Santavirta et al. 1991; Witt und Swann 1991; Lalor 1993; Friedman et al. 1994; Kim 1994; Gonzales et al. 1996; Willert et al. 1996; Jacobs et al. 1998). Hier könnte sich also ein negativer Effekt der oben beschriebenen Korrosion von Titanimplantaten begründen. Wie Black schon 1988 (Black 1988) in seiner Arbeit „does corrosion matter?“ als conclusio konstatiert: „Yes, corrosion does matter. All metallic implants corrode. The corrosion products are biologically active. Patients do exhibit symptoms relative to corrosion products from implants. The magnitude and clinical significance of these symptoms remains to be seen.“ Besonders Anfang der neunziger Jahre berichten zahlreiche Autoren über eine von Black befürchtete klinische Relevanz: der aseptischen Prothesenlockerung. Während Head (Head et al. 1995) Titan als „Material der Wahl“ für die femorale Komponente der zementfreien totalen Endoprothese der Hüfte ansieht und dabei vor allem auf neben dem guten Einwachsen des Knochens auf die gute Biokompatibilität verweist, sehen andere Autoren gerade im Titan eine mögliche Ursache für die zahlreich beobachteten aseptischen Prothesenlockerungen.

Witt (Witt und Swann 1991) untersuchte im Bezug auf diese Fragestellung 13 gelockerte Hüftprothesen aus einer Titanlegierung, die im Durchschnitt bereits zwei Jahre nach der Implantation gewechselt werden mussten und somit die sonst durchschnittliche Haltbarkeitsdauer von ungefähr zehn Jahren deutlich unterschritten. Während der Revisionen beobachtete er eine schwarze Verfärbung des Prothesenkontaktgewebes, wie sie auch in anderen Untersuchungen von Titanimplantaten beschrieben worden ist. Histologisch fand er Titanpartikel, deren Anwesenheit er mittels der EDX-Analyse bewies, frei im Gewebe sowie intrazellulär nach Phagozytose durch Histiozyten. Diese waren dabei zum Teil zu Fremdkörperriesenzellen fusioniert. Des weiteren beschreibt er die Anwesenheit von zahlreichen Fibroblasten im Rahmen einer starken Bindegewebsreaktion, die zu einer fibrösen Kapsel geführt hatte. Solche schwarzen Verfärbungen des periprothetischen Gewebes durch Anhäufung von vor allem Titanpartikeln beschreiben unter anderen auch Leventhal (Leventhal 1951), McKellop (McKellop et al. 1990) und Agins (Agins et al. 1988). Witt sieht in der „aggressiven Reaktion“ des Implantatkontaktgewebes auf die freigesetzten Partikel, wie sie auch Bullough (Bullough 1990) beschreibt, die Ursache für die vorzeitige aseptische Lockerung. Auch Scales beschreibt die schwarze Verfärbung des Gewebes um Prothesen aus Titan, und bezeichnet dieses Phänomen als „orthopädisches Rätsel“ (Scales 1991).

Bedeutende Untersuchungen zu dieser Fragestellung stammen auch von PA Lalor und PA Revell beginnend im Jahre 1990 (Lalor et al. 1990; Lalor et al. 1991; Lalor 1993; Revell und Lalor 1995). Lalor sieht in diesen Arbeiten in der Überempfindlichkeit gegenüber Titan eine mögliche Ursache für die von ihm untersuchten Fälle von aseptischer Prothesenlockerung. In seiner Arbeit von 1991 beschreibt er die Entnahme von Gewebeproben bei fünf Patienten, bei denen es ebenfalls frühzeitig zur Prothesenlockerung gekommen war, ohne dass dabei ein Infekt eine Rolle spielte. In allen diesen Proben, die wie schon oben beschrieben, schwarz verfärbt erschienen, wies er große Mengen von Titanpartikeln nach. Diese stammten in vier Fällen von den Titanschrauben, die zur Fixierung der Pfanne eingesetzt werden, und in einem Fall vom Schaft. Dieses Gewebe unterzog er nun sowohl einer immunhistochemischen wie auch einer elektronenmikroskopischen Analyse. Mittels monoklonaler Antikörper wies er vor allem zahlreiche Makrophagen nach, die die Partikel phagozytiert hatten. Darüber hinaus detektierte er eine große Anzahl an T-Lymphozyten, während B-Lymphozyten fehlten. Diese Konstellation an immunkompetenten Zellen entspricht dem, was auch unsere Untersuchung ergab (Kapitel 4.1.2). Auffällig ist dabei vor allem die Anwesenheit von T-Lymphozyten nach mehr als sechs Monaten, was für einen chronischen entzündlichen Prozess spricht. Da eine solche immunologische Reaktion typischerweise im Rahmen von Allergien vom Typ 4 nach Coombs und Gell zu finden ist, führte Lalor des weiteren Hauttests bei den betroffenen Patienten durch. Hier fand er bei Anwendung eines Standardtests der Europäischen Forschungsgemeinschaft für Kontaktdermatitis (Fregert 1969), der die Verwendung von Pflastern mit Titansalzlösungen verschiedener Verdünnungen vorsieht, in allen Fällen negative Resultate. Dem entgegen stehen die Ergebnisse einer Testung mit titanhaltiger Salbe, die in zwei Fällen positiv war. Da es zur Testung von Überempfindlichkeit gegenüber Titan keine Daten und nur wenig Erfahrungen gibt, sind Lalors Ergebnisse in diesem Punkt schwer zu interpretieren. Wie Witt sieht auch er jedoch in der durch Makrophagen und T-Lymphozyten geprägten immunologischen Reaktion auf Titanpartikel im periprothetischen Gewebe eine mögliche Ursache für eine aseptische Prothesenlockerung. Eine eventuelle Überempfindlichkeit gegen Titan könnte hierbei erklären, warum diese nicht bei allen Patienten mit solchen Prothesen auftritt.

Willert (Willert et al. 1996) stellt in seinen Überlegungen die Hypothese eines mehrschrittigen Prozesses im Rahmen der Prothesenlockerung auf. Danach spielt die Eigenschaft des Titans sich mit einer passiven Oxidschicht zu umgeben eine entscheidende

Rolle. Kommt es zur Zerstörung dieser Oxidschicht, die im Mittel ungefähr 10 Å (Scales 1991) beträgt, so reoxidiert das nun offenliegende Titan sofort (Steinemann 1998). Dazu wird der notwendige Sauerstoff der Umgebung entzogen. Kommt es nun zur Freisetzung von Titanpartikeln von der Prothese, so steigt der Sauerstoffbedarf zur Reoxidierung des Titans stark an. Steht nicht mehr genügend Sauerstoff im lokalen Gewebe zur Verfügung, führt dies zu einer mangelnden Repassivierung der Titanoberfläche, sowie zum anderen zur Ausbildung eines sauren Milieus. Die Titanoberfläche ist somit nicht mehr genügend gegen Korrosion geschützt, und das umgebende Milieu wird durch die sauren Valenzen zunehmend aggressiv und greift die Oberfläche verstärkt an. Somit kommt es zur weiteren Freisetzung von Titanpartikeln, was letztendlich im Rahmen eines Circulus vitiosus zur Prothesenlockerung führt.

Eine weitere Möglichkeit die aseptische Prothesenlockerung zu erklären sehen eine Reihe von Autoren in der Freisetzung von Mediatorsubstanzen durch Makrophagen, die durch die Phagozytose von Titanpartikeln aktiviert wurden (Shanbhag et al. 1995).

So untersuchte zum Beispiel Maloney 1996 das Verhalten von Makrophagen, die in der Zellkultur mit Titanpartikeln in Kontakt gebracht wurden (Maloney et al. 1996). Er beobachtete danach die Anreicherung der der Zellkultur zugegebenen Titanpartikel im Zytoplasma der Makrophagen. Durch die Phagozytose aktiviert, setzten diese daraufhin eine Reihe von Mediatorsubstanzen frei, die Maloney in der Kultur nachweisen konnte. Dabei handelte es sich um Prostaglandin E<sub>2</sub>, Interleukin 1 $\beta$ , Interleukin 6 und den Tumornekrosefaktor- $\alpha$ . Daneben konnte er auch eine erhöhte Aktivität der Hexosaminidase beobachten.

Der Funktion dieser Zytokine widmet sich Goldring in seinen Arbeiten (Goldring und Goldring 1990; Goldring und Goldring 1996). Eine besondere Rolle im Rahmen des Knochenstoffwechsels kommen dabei dem Interleukin-1 und dem Tumornekrosefaktor- $\alpha$  zu. Beide stimulieren potentiell die Knochenresorption sowohl in vitro wie auch in vivo, indem sie die Osteoblasten in ihrer Funktion des Knochenaufbaus hemmen und die Osteoklasten, die ein Knochenresorption bewirken, aktivieren. (Dayer 1988; Arend et al 1990; Goldring und Goldring 1990; Mundy 1993). Aus diesem Grund scheinen sie auch eine wesentliche Rolle bei der postmenopausalen Osteoporose (Pacifci 1989; Pacifci 1991) sowie der Knochenresorption im Rahmen von Entzündungen, wie der rheumatoiden Arthritis zu spielen (Dayer 1979; Dayer 1988; Dinarello 1988; Arend et al 1990; Arend et al 1990; Oyajobi

1993). Auch das von Maloney nachgewiesene Interleukin 6 stimuliert auf dem parakrinen Wege die Differenzierung und Proliferation von Osteoklasten und führt so ebenfalls zu einer vermehrten Knochenresorption (Ishimi 1990; Jilka 1992; Manolagas 1995). Gleiches gilt auch für die Wirkung des Prostaglandin E<sub>2</sub> (Mundy 1993). Durch die Freisetzung besonders dieser Mediatoren durch Makrophagen im Rahmen der Phagozytose von Titanpartikeln könnte es also zur vermehrten Knochenresorption durch die Aktivierung von Osteoklasten bei Inhibierung von Osteoblasten und somit zu Prothesenlockerung kommen.

Zu dieser Einschätzung kommen auch andere Autoren, wie zum Beispiel Lassus (Lassus et al. 1998), Gonzales (Gonzales et al. 1996), Blaine (Blaine et al. 1996) oder auch Trindade (Trindade et al. 2001). So konnte Gonzales bei seinen in vitro Versuchen, bei denen er ebenfalls zu Zellkulturen von Makrophagen Titanpartikel zugab, erhöhte Konzentrationen des Tumornekrosefaktors feststellen, wohingegen in seinen Untersuchungen kein vermehrter Gehalt an Interleukin-1 und Prostaglandin E<sub>2</sub> nachgewiesen werden konnte.

Auch Lassus glaubt die Basis für die aseptische Prothesenlockerung in der Aktivierung von Makrophagen im Rahmen einer chronischen Fremdkörperreaktion zu sehen. Diese wird demnach durch die mit Korrosion oder Mikrobewegungen freigesetzten Titanpartikel ausgelöst, die nach der Phagozytose nicht zerstört werden können und somit einen chronischen Reiz darstellen. Folglich kommt es zur Aktivierung der Makrophagen, die damit die oben erwähnten Zytokine freisetzen, die ihrerseits eine vermehrte Knochenresorption verursachen.

Rader konnte darüber hinaus zeigen, dass die Menge an freigesetzten Mediatoren von der Anzahl der zugesetzten Titanpartikel abhängig ist (Rader et al. 1999). Er wies dabei die Freisetzung von Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin 8 sowie dem Tumornekrosefaktor- $\alpha$  durch Makrophagen, die nachweislich Titanpartikel phagozytiert hatten, nach. In diesem Zusammenhang liegt die Funktion des Interleukin 8 in der Chemotaxis (Seitz 1991; Liebler 1994).

Neben den bereits erwähnten Mediatoren setzen Makrophagen nach der Phagozytose von Titanpartikeln auch das monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) sowie auch das monocyte inflammatory protein-1  $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) frei, die chemotaktisch auf Monozyten, Lymphozyten, Basophile und Eosinophile wirken (Nakashima et al. 1999). Darüber hinaus konnte Nakashima diese Substanzen auch in Gewebeproben von gelockerten Hüftprothesen in signifikant erhöhten Konzentrationen detektieren. Außerdem wies er neben den erhöhten



Konzentrationen der beiden Proteine auch deren mRNA im Anschluss an die Phagozytose nach.

Nach diesen Ergebnissen muss man davon ausgehen, dass auch die von uns beobachteten Makrophagen, die bewiesenermaßen Titanpartikel phagozytiert haben, Mediatoren wie die Interleukine-1, -6 oder -8, das Prostaglandin E<sub>2</sub>, den Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , das monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) oder das monocyte inflammatory protein-1  $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) freisetzen.

Auch auf andere Zellen scheinen Titanpartikel einzuwirken. Dabei sind vor allem die Fibroblasten zu nennen. So konnte unter anderem Shanbhag (Shanbhag et al. 1997) zeigen, dass Titanpartikel Fibroblasten und damit die Fibrogenese stimulieren. Er geht dabei davon aus, dass diese Stimulation von den Makrophagen ausgeht, die durch die Phagozytose von Titanpartikeln aktiviert wurden. Diese setzen dabei neben den bisher erwähnten Zytokinen auch einen Wachstumsfaktor für das Bindegewebe (TGF $\beta$ 1 = tissue growth factor) frei, der Fibroblasten stimuliert, Bindegewebsfasern zu produzieren. Auch andere Autoren beschreiben meist nach in vitro Versuchen die vermehrte Fibrogenese nach Stimulation mit Titanpartikeln (Maloney et al. 1993; Goodman et al. 1995; Yao et al. 1995; Manlapaz et al. 1996; Katou et al. 1998). Eine klinische Relevanz dieser Ergebnisse ist wiederum in der Prothesenlockerung zu sehen, die durch die vermehrte Proliferation von Bindegewebe im Knochen-Implantat-Interface begünstigt wird. Außerdem setzen auch aktivierte Fibroblasten proinflammatorische Mediatoren frei, die den Knochenmetabolismus beeinflussen (Manlapaz et al. 1996), so dass hier von einer Synergie von Makrophagen und Fibroblasten ausgegangen werden kann.

Katous Untersuchungen basierten im Unterschied zu denen anderer Autoren auf Gewebeproben, die er bei 20 Patienten nach osteosynthetischer Versorgung von Mandibulafrakturen mittels Miniplatten aus Reintitan entnahm. Diese Proben entstammten dabei der bindegewebigen Kapsel, die sich um das Implantat gebildet hatte und die zahlreiche Titanpartikel aufwies. Er konnte nun mittels der Immunfluoreszenzmikroskopie zeigen, dass die Fibroblasten sowohl TGF $\beta$ -Rezeptoren als auch solche für PDGF (plate derived growth factor) exprimierten, die also gemeinsam für ihre Stimulation verantwortlich sind.

Weitere Untersuchungen befassen sich mit dem Einfluss von Titanpartikeln auf die Funktion von Osteoblasten (Yao et al. 1997; Heinemann et al. 2000).

Yao (Yao et al. 1997) bestimmte dafür mittels Northern Blot den Gehalt an mRNA (messenger RNA) für das Knochenkollagen vor und nach Zugabe von Titanpartikeln in vitro.

Die Titanpartikel, die mit einer maximalen Größe von 3 µm phagozytierbar waren, bewirkten eine signifikante Supprimierung des Genes sowohl für das Prokollagen 1 als auch das Prokollagen 3. Auch eine verminderte Biosynthese dieser beiden Kollagensorten konnte er nachweisen. Somit werden also durch die Anwesenheit von Titanpartikeln Osteoblasten in ihrer Funktion gehemmt.

Heinemann (Heinemann et al. 2000) konnte des weiteren zeigen, dass Osteoblasten nach Stimulation mit Titanpartikeln selbst Partikel phagozytieren und das sonst für Makrophagen Antigen CD68 exprimieren. Sie nehmen also einen intermediären Phänotyp zwischen Osteoblasten und Makrophagen an.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass Titanpartikel, die von Implantaten freigesetzt werden, Makrophagen und Fibroblasten stimulieren, während sie Osteoblasten in ihrer Funktion supprimieren und in ihrer Differenzierung beeinflussen. Als Konsequenz kommt es dadurch zu einer vermehrten Knochenresorption, die über Zytokine vermittelt wird. Diese in der Literatur beschriebenen Ergebnisse könnten auch in unserer Untersuchung eine Rolle spielen, auch wenn klinisch kein Anhalt für eine Knochenresorption gegeben war.

Gegen diese Berichte sprechen Untersuchungen einiger Autoren wie zum Beispiel Johansson (Johansson und Albrektsson 1987; Johansson et al. 1989; Johansson et al. 1990; Johansson und Albrektsson 1991; Johansson et al. 1991; Johansson et al. 1998; Johansson et al. 1999), der bei Verwendung von Titanimplantaten eine größere Kontaktzone zwischen Knochen und Implantat fand, als bei anderen Materialien und somit beim Titan eine bessere Osteointegration vermutet. Dies würde also der These widersprechen, wonach Titan eine vermehrte Knochenresorption induziert. Linder (Linder et al. 1989) sieht aber in seiner Studie im Gegensatz zu Johansson keine Unterschiede zwischen Stahl und Titan als Implantatmaterial im Bezug auf die Kontaktzone zum Knochen und konstatiert, dass Osteointegration keine Eigenschaft des Implantatmaterials sondern des Heilungspotentials des Knochens sei.

Da es sich bei unseren Implantaten jedoch nicht um Endoprothesen, sondern um Osteosyntheseplatten handelt, bleibt bei unseren Überlegungen die Frage offen, wie es zur Freisetzung der Titanpartikel vom Implantat kommt. Da wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben die Prädilektionsstellen für die oft schon makroskopisch sichtbare Metallose im Bereich der Grate der Schraubenlöcher lagen, liegt die Vermutung nahe, dass hier die Reibung zwischen Platte und Schraube durch häufige Mikrobewegungen eine wichtige Rolle spielt. Dagegen spricht

jedoch die Beobachtung, die wir im Rahmen der Entfernung von Tibiamarknägeln (UTN) machten. Hier war ebenfalls eine deutliche schwarze Verfärbung als Zeichen der Metallose zu beobachten, die hier jedoch im Bereich der kranialen Abschlusskappe zu finden war. Hier kann also folglich keine Reibung zwischen Platte und Schraube eine Rolle gespielt haben. Des Weiteren findet man Angaben über eine solche makroskopisch sichtbare Metallose auch nach Zugschrauben- (Fischer-Brandies 1993) oder Stentimplantationen (Gotman 1997) sowie nach der Beschreibung von Mofid (Mofid 1997) nach dem Einbringen von Minischrauben in den Parietallappen von Kaninchen, wo nun überhaupt keine Titankomponenten aufeinander reiben können.

In der Literatur finden sich jedoch noch weitere Erklärungsmodelle, wie es zur Freisetzung von Titanpartikeln kommen kann, obwohl die Titanoberfläche ja durch eine Oxidschicht geschützt wird. So geht Gotman (Gotman 1997) davon aus, dass Titanionen langsam durch die Oxidschicht diffundieren und sich so im periimplantären Gewebe ansammeln.

Andere Autoren kommen zu dem Ergebnis, dass es während der Implantation des Osteosynthesematerials zu Freisetzung von Partikeln kommt (Matthew et al. 1996; Ray et al. 1999). So untersuchte Ray (Ray et al. 1999) die Oberfläche von 15 Miniplatten und 60 Schrauben aus Reintitan mittels der Rasterelektronenmikroskopie. Er beobachtete dabei in der Hälfte der zur Untersuchung stehenden Implantate Unebenheiten und kleine Erhebungen, die während der Herstellung dieser Platten entstanden waren. Prädilektionsstellen für diese waren im Falle der Miniplatten die Plattenlöcher und im Falle der Schrauben die Schraubenköpfe. Somit geht Ray davon aus, dass diese vorstehenden Unebenheiten während der Implantation abgesprengt und in das umliegende Gewebe freigesetzt werden. Zu dieser Einschätzung kommt auch Matthew, da er keine Unterschiede an der Plattenoberfläche nach einem Beobachtungszeitraum von 24 Wochen zum Zustand bei der Implantation nachweisen konnte. Eine ähnliche Theorie entwickelte Solar (Solar et al. 1979), der die Überlegung aufstellte, dass es bei der Ausbildung der Oxidschicht auf der Titanoberfläche zur Bildung kleiner „Nadeln“ kommt, die bei der Implantation abbrechen könnten.

Gegen diese Theorien spricht in unserer Untersuchung jedoch die Tatsache, dass die Titanpartikel auch im Gewebe über der Platte nachweisbar waren. Dieses Gewebe entwickelt sich erst im Laufe der Zeit nach der Implantation, so dass hier Partikel, die während der osteosynthetischen Versorgung freigesetzt wurden hier nicht nachweisbar sein sollten.

Eine neuere Theorie zu dieser Fragestellung stammt von Mu (Mu et al. 2000). Grundlage hierfür ist die Eigenschaft von Makrophagen, Sauerstoffradikale freisetzen zu können (Silverstein 1977; Nathan 1980; Adams 1984; Halliwell 1989; Cross 1991). Dabei produzieren diese aktiviere Formen von Radikalen, wenn sie zum Beispiel Titanpartikel phagozytiert haben (Johnston, RB 1978; Johnston et al. 1978; Ward 1983). Eine Form dieser aktiven Sauerstoffradikale ist das  $O_2^-$ , welches intrazellulär durch die Superoxiddismutase (SOD) in  $H_2O_2$  umgewandelt wird. Dieses ist erheblich langlebiger und permeiert die Zellmembran besser als das  $O_2$  (Halliwell 1989; Tengvall 1989; Behl 1994). Adhären die Makrophagen nun an eine Titanoberfläche, so wird die Oberfläche aus Titanoxid durch das von ihnen freigesetzte  $H_2O_2$  hyperoxidiert, was die Freisetzung von Titanionen verursachen könnte (Tengvall 1989; Montague 1996; Pan 1996). Darauf weisen auch seine experimentellen Ergebnisse hin, nach denen die Freisetzung von Titanpartikeln in einer Lösung mit Makrophagen signifikant höher war als in der identischen Lösung ohne Makrophagen. Neben dieser Zerstörung des Oxidfilms durch Sauerstoffradikale ist die Behinderung der Reoxidierung durch die Adhäsion der Makrophagen an der Oberfläche ein additiver Effekt. Beides zusammen führt zur Risskorrosion.

Im Rahmen der Implantation von metallischen Fremdkörpern in den menschlichen Körper wird auch die Frage der Karzinogenese diskutiert (Sinibaldi et al. 1976; Lewis und Sunderman 1996).

Bouchard (Bouchard et al. 1996) untersuchte dabei in einer seiner Gruppen die Inzidenz von malignen Tumoren im Zusammenhang mit der Implantation von Zylindern aus Ti6Al4V in die Femura von Ratten. Er beobachtete als Folge das Auftreten von Implantat assoziierten Tumoren, die allerdings nur bei gelockerten Implantaten signifikant häufiger vorkamen. Bei diesen handelte es sich um Dermatofibrosarkome, Fibrosarkome, maligne Histiocytozytome, Rhabdomyosarkome und Osteosarkome. Er schlussfolgert, dass eine chronische Entzündungsreaktion im Rahmen der Fremdkörperreaktion die Grundlage für die Karzinogenese darstellt. Wie jede chronische Entzündung stellt auch diese einen Proliferationsreiz dar, wie die bisherigen Ausführungen belegen. Daher ist es durchaus denkbar, dass es im Rahmen dieser Zellproliferationen auch zu Entartungen kommen kann, zumal manche Implantate über Jahrzehnte im Körper verbleiben. Da es jedoch bisher keine entsprechenden klinischen Daten zu dieser Thematik gibt, ergeben sich momentan daraus keine Konsequenzen.

Wie bereits in Kapitel 1.3 erwähnt, unterscheiden sich die mechanischen Eigenschaften des Titans besonders im Bezug auf die Verformbarkeit deutlich von denen anderer Metalle wie beispielsweise dem rostfreien Stahl. So ist sein Elastizitätsmodul mit  $100 \text{ GN/m}^2$  ungefähr halb so groß wie das des Stahls (Williams 1976), was zur Folge hat, dass es damit zweimal so elastisch ist. Titan als verformbareres Metall ermöglicht so eine bessere Konturierung und Anpassung an die anatomischen Gegebenheiten des Knochens. Ein Nachteil ist jedoch, dass hierdurch die Feinreposition über das Implantat im Gegensatz zum Stahl erschwert ist und es eher zur Verformung des Titanimplantates kommen kann. Beim Festziehen der Schrauben aus Titan kommt es früher zum Bruch, wobei im Gegensatz zu Stahlschrauben der Chirurg dabei nicht durch ein kurz vor dem Abriss fühlbares „Knacken“ gewarnt wird (Arens 1998). Banovetz untersuchte in mittels einer retrospektiven Studie die Raten für Implantatbrüche von Osteosyntheseplatten aus Reintitan im Vergleich mit solchen aus rostfreiem Stahl (Banovetz et al. 1996). Dabei fand er in einem Zeitraum von zwei Jahren in zwei Kliniken bei 68 verwendeten Titanplatten, die zu Versorgung von Frakturen langer Röhrenknochen eingesetzt worden waren, 9 Implantatbrüche, was einer Versagerquote von 13% entspricht. Im selben Zeitraum betrug diese bei Osteosyntheseplatten aus rostfreiem Stahl nur 1%, da es bei 200 untersuchten Fällen nur zu 2 Implantatbrüchen kam.

Dem entgegen stehen Erfahrungen von Matter (Matter und Burch 1990) und Johnson (Johnson 1988), die im Titan einen idealen Werkstoff für die Osteosynthese sehen. So spricht Matter nach Entfernung von 57 LC-DCP aus Reintitan, bei einer Gesamtzahl der Studie von 271 Platten, von sehr guten Ergebnissen ohne Komplikationen und hebt dabei besonders die „hervorragende Biokompatibilität“ des Titans hervor.

Johnson verwendete Titanimplantate bei acht komplizierten Osteosynthesen, bei denen es zur fehlenden Knochenbruchheilung oder zum Versagen des Implantates gekommen war. Nach seinen Angaben verheilten im Anschluss alle Frakturen nach einem durchschnittlichen Zeitraum von 33 Monaten postoperativ.

Positiv bewertet wird auch die Infekteresistenz des Titans, wie bereits im Kapitel 1.3 erwähnt. Hier sind besonders die Untersuchungen von Arens et al. (Arens et al. 1996) zu erwähnen. Er verabreichte Kaninchen nach Implantation von dynamischen Kompressionsplatten aus Titan oder Stahl bestimmte Konzentrationen von Staphylokokken mittels einer über der Platte liegenden Kanüle. Bei identischen experimentellen Bedingungen ergaben seine

Auswertungen eine Infektionsrate von 75% für den Stahl und eine von 25% für das Titan, womit ein signifikanter Unterschied gegeben sei. Er schlussfolgert, dass „die Verwendung von Titan als Implantatmaterial für die ORIF (offene Reposition und interne Fixierung) mit Osteosyntheseplatten und Marknägeln zumindest in Situationen mit mittlerer bakterieller Kontamination hinsichtlich der Infektesistenz Vorteile gegenüber Stahl als Implantatmaterial bietet.“ Klinische Daten, die diese Ergebnisse untermauern, fehlen jedoch bis heute. Im Gegenteil zeigt die klinische Studie von Holzach (Holzach und Matter 1978) keine Unterschiede zwischen Stahl und Titan als Implantatmaterial bezüglich lokaler Wundinfektionen, Osteitis oder Pseudarthrosen. Dabei lag der Studie eine große Gesamtzahl von 256 untersuchten Frakturen zugrunde, von denen 123 mit einem Titan- und 133 mit einem Stahlimplantat versorgt waren. Weitere klinische Untersuchungen müssen zeigen, ob tatsächlich ein signifikanter Unterschied bezüglich der Infektesistenz besteht.

Unbestritten scheint jedoch der Vorteil des Titans bezüglich der Prävalenz der Allergien gegen das Implantatmaterial. Während diese gegen die Stahlkomponente Nickel mit ungefähr 4-6% in der Bevölkerung angegeben wird (Hierholzer 1991), sind nur vereinzelt Berichte über Allergien gegen Titan bekannt. Dies liegt sicher zum Teil auch daran, dass Titan im Alltag nicht in so großem Umfang Verwendung findet und so die Möglichkeit einer Sensibilisierung nicht so groß ist wie beim preiswerten Stahl. Fraglich bleibt jedoch, ob nicht die Freisetzung von Partikeln aus Titanimplantaten, wie wir sie feststellen konnten nicht zu einer Allergisierung führen kann. Hinweise darauf lieferten die bereits beschriebenen Untersuchungen von Lalor et al. (Lalor et al. 1990; Lalor et al. 1991; Lalor 1993).

Ein Aspekt, der bei Tumorpazienten oder anderen, bei denen häufig magnetresonanztomographische Diagnostik notwendig ist, sind die geringeren Artefakte, die Titan im Vergleich zu Stahl oder anderen Implantatmaterialien zu machen scheint. Dabei handelt es sich um das sogenannte Starburst Phänomen, welches die Beurteilung solcher Aufnahmen stören kann. Wie die Untersuchungen von zum Beispiel Lawton et al (Lawton et al. 1996) zeigen, sind diese bei Titanimplantaten weniger stark ausgeprägt.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass die Rolle des Titans als Implantatmaterial differenziert zu betrachten ist. Nach unseren Ergebnissen sowie den Berichten aus der Literatur liegen sichere Hinweise dafür vor, dass es nicht als biologisch inert gelten darf. Mittels rasterelektronenmikroskopische EDX-Analyse konnten in erheblichen Maße Titanpartikel im periimplantären Gewebe von Osteosyntheseplatten aus Reintitan

nachgewiesen und immunhistochemisch eine ausgeprägte immunologische Gewebereaktion gezeigt werden. Diese beinhaltet eine ausgeprägte Phagozytose der vom Implantat freigesetzten Partikel durch Makrophagen, die durch diese Phagozytose nachweislich aktiviert wurden. Wie oben dargestellt, ist davon auszugehen, dass diese Mediatoren freisetzen, die zum Beispiel chemotaktisch wirken und somit zu einer Ausdehnung der immunologischen Reaktion führen können. Andere dieser Zytokine wirken darüber hinaus knochenresorbierend, was im Rahmen der Endoprothetik eine große Rolle spielt. Die von uns vor allem in der Nähe der Titanpartikel noch nach mehr als 6 Monaten gefundenen T-Lymphozyten zeigen, dass es sich hier um eine chronische Entzündungsreaktion handelt. Man darf also nicht von der folgenlosen Phagozytose eines inerten Werkstoffes ausgehen, sondern von einer komplexen immunologischen Reaktion, bei der von einer Makrophagen-T-Lymphozyten Interaktion ausgegangen werden muss. Unterschiede zur Gewebereaktion auf Implantate aus rostfreiem Stahl waren sowohl qualitativ wie auch semiquantitativ nicht gegeben, so dass nach unserer Einschätzung Titan keinen nachweisbaren Vorteil im Bezug auf die Biokompatibilität bietet. Besondere Bedeutung haben diese Erkenntnisse im Rahmen der Diskussion um die Entfernung von Osteosynthesematerial aus Titan, wobei gerade bei jungen Patienten eine individuelle Diskussion zu fordern ist. Die Empfehlung der Arbeitsgemeinschaft Osteosynthese Titanimplantate im Körper belassen zu können (Blauth 2000) ist kritisch zu bewerten. Neben den zahlreichen Überlegungen, die dabei eine Rolle spielen, muss dabei also auch berücksichtigt werden, dass Titan nicht als biologisch inert gelten darf. In diesem Zusammenhang scheint ein Zitat von Black erwähnenswert: „However, all orthopaedic surgeons should reflect that, as they wait for further intelligence, corrosion continues. Second by second, minute by minute, day by day, week by week, month after month, year piles upon year, metal is released and permeates every tissue of the bodies of patients with metallic implants.“

## 5. Zusammenfassung

Der Implantatwerkstoff Titan gilt als nicht immunogen und biologisch inert. Die dem entgegenstehende Beobachtung einer im Rahmen der Metallentfernung häufig schon makroskopisch sichtbaren Metallose war Anlaß, histologische Untersuchungen zur Charakterisierung der Gewebereaktion auf Osteosyntheseplatten durchzuführen. Dabei sollten die Frage qualitativer und quantitativer Unterschiede in der Gewebereaktion auf Stahl- und Titanplatten herausgearbeitet werden.

Bei 20 Patienten mit Titanimplantaten (Alter: 2-83 J) und 20 mit Stahlimplantaten (Alter: 27-69 J) wurden im Rahmen der Metallentfernung (Verweildauern: Titan 6-31 Mo und Stahl 7-62 Mo) Proben des periimplantären Gewebes entnommen und immunhistochemisch untersucht. Das Implantatmaterial umfasste im Fall des Titans LC-DCPs (n=15) und Drittelrohrplatten (n=7) sowie im Falle des Stahls DCPs (n=4), Drittelrohrplatten (n=11), Rekonstruktionsplatten (n=3), 1 T-Platte, 1 Kondylenplatte und 1 Rundlochplatte. Alle Patienten wiesen dabei eine ungestörte Frakturheilung ohne Lockerung des Implantatmaterials oder nachgewiesene Infektion auf. Für die immunhistochemische Untersuchung wurde das Gewebe in Alkohol fixiert, in PMMA eingebettet und nach der Immunperoxidase-methode gefärbt. Zur Charakterisierung der Leukozytensubpopulation dienten die folgenden monoklonalen Primärantikörper: CD 68 (Makrophagen), CD 45RO sowie CD3 (T-Lymphozyten), CD 8 (zytotoxische T-Lymphozyten), Anti-HLA (antigenpräsentierende Zellen) und CD 79 $\alpha$  (B-Lymphozyten). Zudem wurden eine REM-EDX Analyse der Metallpartikel und transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

Unabhängig vom makroskopischen Aspekt konnten wir mikroskopisch bei allen Patienten Metallpartikel im quantitativ ähnlichen Ausmaß nachweisen, die der Phagozytose durch CD68 positive Makrophagen unterlagen. Diese Makrophagen präsentierten dabei MHC-Klasse 2 Moleküle als Zeichen ihrer Aktivierung durch die Phagozytose auf der Zelloberfläche. Zudem ließen sich im Plattenkontaktgewebe zu beiden Metallen im gleichen Umfang CD45RO bzw CD3 positive T-Lymphozyten besonders in der Nähe der Partikel nachweisen. Diese waren nur im kleineren Anteil auch CD8 positiv, so dass wir bei der Mehrzahl von der Anwesenheit der CD4 positiven T-Helferzellen ausgehen müssen. B-



Lymphozyten ließen sich hingegen nur vereinzelt finden. Die durchgeführten REM-EDX Analysen bestätigten, dass die gefundenen Partikel tatsächlich von den jeweiligen Implantaten stammten.

Nach den aktuellen Ergebnissen liegen sichere Hinweise vor, dass Titan als Osteosynthesematerial nicht als biologisch inert anzusehen ist. Titan und Stahlimplantate setzen Partikel frei, die zu einer qualitativ und semiquantitativ nahezu gleichen immuninflammatorischen Gewebereaktion führen. Diese Reaktion wird dabei vor allem von aktivierten Makrophagen und T-Lymphozyten in Abwesenheit von B-Lymphozyten getragen. Besondere Bedeutung haben diese Erkenntnisse im Rahmen der Diskussion um die Entfernung von Osteosynthesematerial aus Titan, wobei gerade bei jungen Patienten eine individuelle Diskussion zu fordern ist. Des weiteren ist eine Optimierung der für die Herstellung von chirurgischen Implantaten verwendeten Werkstoffe anzustreben.

## 6. Literatur

### 6.1 Literaturverzeichnis

1. Acero J, Calderon J, Salmeron JI, Verdaguer JJ, Concejo C Somacarrera ML. "The behaviour of titanium as a biomaterial: microscopy study of plates and surrounding tissues in facial osteosynthesis." *J Craniomaxillofac Surg* 1999; 27(2): 117-23.
2. Adams D, Hamilton, TA. "The cell biology of macrophage activation." *Annu Rev Immunol* 1984; 2: 283-318.
3. Agins HJ, Alcock NW, Bansal M, Salvati EA, Wilson PD, Jr., Pellicci PM Bullough PG. "Metallic wear in failed titanium-alloy total hip replacements. A histological and quantitative analysis." *J Bone Joint Surg Am* 1988; 70(3): 347-56.
4. Arend W, Dayer, JM. "Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 1990; 33: 305-315.
5. Arend W, Welgus, HG, Thompson, RC, Eisenberg, SP. "Biological properties of recombinant human monocyte-derived interleukin 1 receptor antagonist." *J Clin Invest* 1990; 85: 1694-1697.
6. Arens S, Hansis, M. "Osteosynthese mit Titan." *Deutsches Ärzteblatt* 1998; 24: 1216-1219.
7. Arens S, Schlegel U, Printzen G, Ziegler WJ, Perren SM Hansis M. "Influence of materials for fixation implants on local infection. An experimental study of steel versus titanium DCP in rabbits." *J Bone Joint Surg Br* 1996; 78(4): 647-51.
8. Banovetz JM, Sharp R, Probe RA Anglen JO. "Titanium plate fixation: a review of implant failures." *J Orthop Trauma* 1996; 10(6): 389-94.
9. Behl C, Davis, JB, Lesley, R, Schubert, D. "Hydrogen peroxide mediates amyloid b protein toxicity." *Cell* 1994; 77: 817-827.
10. Bessho K, Fujimura K Iizuka T. "Experimental long-term study of titanium ions eluted from pure titanium miniplates." *J Biomed Mater Res* 1995; 29(7): 901-4.
11. Black J. "Does corrosion matter?" *J Bone Joint Surg Br* 1988; 70(4): 517-20.
12. Blaine TA, Rosier RN, Puzas JE, Looney RJ, Reynolds PR, Reynolds SD O'Keefe RJ. "Increased levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 protein and messenger

- RNA in human peripheral blood monocytes due to titanium particles." *J Bone Joint Surg Am* 1996; 78(8): 1181-92.
13. Blauth M, Tscherne, H (2000). *Implantatentfernung, Indikation zu definitiven Therapie. Leitlinien Unfallchirurgie*. K. Stürmer. Stuttgart, New York, Thieme. 2. Auflage: 12-20.
  14. Bouchard PR, Black J, Albrecht BA, Kaderly RE, Galante JO Pauli BU. "Carcinogenicity of CoCrMo (F-75) implants in the rat." *J Biomed Mater Res* 1996; 32(1): 37-44.
  15. Brown D "All you wanted to know about titanium, but were afraid to ask" *Br Dent J* 1997; 182(10): 393-394
  16. Bullough P, Bansal, F, Betts, F, Salvati, EA. "The histological response to and the recovery of metal from around failed titanium alloy pttheses." *J Bone Joint Surg Br* 1990; 72-B: 533.
  17. Cross A, Jones, OTG. "Enzymic mechanism of superoxide production." *Biochim Biophys Acta* 1991; 1057: 281-298.
  18. Dayer J, Goldring, SR, Robinson, DR, Krane, SM. "Effects of human mononuclear cell factors on cultured rheumatoid synovial cells. Interactions of prostaglandin E and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate." *Biochem Biophys Acta* 1979; 586: 87-105.
  19. Dayer J, Seckinger, P (1988). *Interleukin-1 and interleukin-1 inhibitors and their relation to connective tissue damage. The control of tissue damage*. Glauert. Amsterdam, Elsevier. 15: 151-163.
  20. Dinarello C (1988). *Cytokines: Interleukin-1 and tumor necrose factor. Inflammation: Basic Principles and clinical correlates*. J. Gallin, Goldstein, IM, Synderman R. New York, Raven Press: 195-221.
  21. Disegi JA Wyss H. "Implant materials for fracture fixation: a clinical perspective." *Orthopedics* 1989; 12(1): 75-9.
  22. Dorr LD, Bloebaum R, Emmanuel J Meldrum R. "Histologic, biochemical, and ion analysis of tissue and fluids retrieved during total hip arthroplasty." *Clin Orthop* 1990; (261): 82-95.
  23. Ellerbe DM Frodel JL. "Comparison of implant materials used in maxillofacial rigid internal fixation." *Otolaryngol Clin North Am* 1995; 28(2): 365-72.

24. Ferguson AY, Laing PG, Hodge ES. "Characterization of trace ion release from embedded metal implants in the rabbit." *J Bone Joint Surg Am* 1962; 44-A: 317-336.
25. Ferguson LP, Hodge ES. "The ionization of metal implants in living tissues." *J Bone Joint Surg Am* 1960; 42-A: 77-90.
26. Fischer-Brandies E, Zeintl W, Schramel P, Brenner, KU. "Zur Frage der Gewebelastung mit Titan nach Schraubenosteosynthese." *Dtsch Z Mund Kiefer GesichtsChir* 1993; 17: 93-94.
27. Fregert S, Hjorth, N, Magnusson, B. "Epidemiology of contact dermatitis." *Trans St John's Hosp Dermatol Soc* 1969; 55: 17-35.
28. Friedman RJ, Black J, Galante JO, Jacobs JJ Skinner HB. "Current concepts in orthopaedic biomaterials and implant fixation." *Instr Course Lect* 1994; 43: 233-55.
29. Gerber H, Burge M, Cordey J, Ziegler W, Perren SM. „Quantitative determination of tissue tolerance to corrosion products in organ culture“ *Langenbecks Arch Chir* 1975; Suppl: 389-94
30. Goldring MB Goldring SR. "Skeletal tissue response to cytokines." *Clin Orthop* 1990; (258): 245-78.
31. Goldring SR Goldring MB. "Cytokines and skeletal physiology." *Clin Orthop* 1996; (324): 13-23.
32. Gonzales JB, Purdon MA Horowitz SM. "In vitro studies on the role of titanium in aseptic loosening." *Clin.Orthop* 1996; (330): 244-50.
33. Goodman S, Aspenberg P, Song Y, Doshi A, Regula D Lidgren L. "Effects of particulate high-density polyethylene and titanium alloy on tissue ingrowth into bone harvest chamber in rabbits." *J Appl Biomater* 1995; 6(1): 27-33.
34. Gotman I. "Characteristics of metals used in implants." *J Endourol* 1997; 11(6): 383-9.
35. Halliwell B, Gutteridge, JMC (1989). The chemistry of oxygen radicals and other oxygen-derived species. *Free radicals in biology and medicine*. B. Halliwell, Gutteridge, JMC. Oxford, Oxford University. 2: 22-266.
36. Haynes D, Rogers, SD, Hay, S, Percy, MJ, Howie, DW. "The differences in toxicity and release of bone-resorbing mediators induced by titanium and cobalt-chromium alloy wear particles." *J Bone Joint Surg Am* 1991; 75-A: 825-834.
37. Head WC, Bauk DJ Emerson RH, Jr. "Titanium as the material of choice for cementless femoral components in total hip arthroplasty." *Clin Orthop* 1995; (311): 85-90.

38. Heinemann DE, Lohmann C, Siggelkow H, Alves F, Engel I, Koster G. "Human osteoblast-like cells phagocytose metal particles and express the macrophage marker CD68 in vitro." *J Bone Joint Surg Br* 2000; 82(2): 283-9.
39. Hierholzer G, Hierholzer, S, Weller S (1991). *Osteosynthese und Metallallergie; Klinische Untersuchungen, Immunologie und Histologie des Implantatlagers*, Thieme, Stuttgart-New York
40. Holzach P, Matter P. "The comparison of steel and titanium dynamic compression plates used for internal fixation of 256 fractures of the tibia." *Injury* 1978; 10(2): 120-3.
41. Howie DW. "Tissue response in relation to type of wear particles around failed hip arthroplasties." *J Arthroplasty* 1990; 5(4): 337-48.
42. Ishimi Y, Miyaura, C, Jin, CH. "IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption." *J Immunol* 1990; 145: 3297-3303.
43. Jacobs JJ, Skipor AK, Patterson LM, Hallab NJ, Paprosky WG, Black J, Galante JO. "Metal release in patients who have had a primary total hip arthroplasty. A prospective, controlled, longitudinal study." *J Bone Joint Surg Am* 1998; 80(10): 1447-58.
44. Jilka R, Hangoc, G, Girasole, G. "Increased osteoclast development after estrogen loss: Mediation by IL-6." *Science* 1992; 257: 88-91.
45. Johansson C, Albrektsson T. "Integration of screw implants in the rabbit: a 1-year follow-up of removal torque of titanium implants." *Int J Oral Maxillofac Implants* 1987; 2(2): 69-75.
46. Johansson C, Lausmaa J, Ask M, Hansson HA, Albrektsson T. "Ultrastructural differences of the interface zone between bone and Ti 6Al 4V or commercially pure titanium." *J Biomed Eng* 1989; 11(1): 3-8.
47. Johansson CB, Albrektsson T. "A removal torque and histomorphometric study of commercially pure niobium and titanium implants in rabbit bone." *Clin Oral Implants Res* 1991; 2(1): 24-9.
48. Johansson CB, Han CH, Wennerberg A, Albrektsson T. "A quantitative comparison of machined commercially pure titanium and titanium-aluminum-vanadium implants in rabbit bone." *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998; 13(3): 315-21.
49. Johansson CB, Hansson HA, Albrektsson T. "Qualitative interfacial study between bone and tantalum, niobium or commercially pure titanium." *Biomaterials* 1990; 11(4): 277-80.

50. Johansson CB, Roser K, Bolind P, Donath K Albrektsson T. "Bone-tissue formation and integration of titanium implants: an evaluation with newly developed enzyme and immunohistochemical techniques." *Clin Implant Dent Relat Res* 1999; 1(1): 33-40.
51. Johansson CB, Sennerby L Albrektsson T. "A removal torque and histomorphometric study of bone tissue reactions to commercially pure titanium and Vitallium implants." *Int J Oral Maxillofac Implants* 1991; 6(4): 437-41.
52. Johnson EE. "Custom titanium plating for failed nonunion or delayed internal fixation of femoral fractures." *Clin Orthop* 1988; (234): 195-203.
53. Johnston R. "Oxygen metabolism and the microbicidal activity of macrophages." *Fed Proc* 1978; 37: 2759-2764.
54. Johnston R, Godzik, CA, Cohn, ZA. "Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages." *J Exp Med* 1978; 148: 115-127.
55. Jorgenson DS, Mayer MH, Ellenbogen RG, Centeno JA, Johnson FB, Mullick FG Manson PN. "Detection of titanium in human tissues after craniofacial surgery." *Plast Reconstr Surg* 1997; 99(4): 976-9; discussion 980-1.
56. Katou F, Andoh N, Motegi K Nagura H. "Immuno-inflammatory responses in the tissue adjacent to titanium miniplates used in the treatment of mandibular fractures." *J Craniomaxillofac Surg* 1996; 24(3): 155-62.
57. Katou F, Ohtani H, Nagura H Motegi K. "Procollagen-positive fibroblasts predominantly express fibrogenic growth factors and their receptors in human encapsulation process against foreign body." *J Pathol* 1998; 186(2): 201-8.
58. Kim K, Chiba, J, Rubash, HE. "In vivo and in vitro analysis of membranes from hip prostheses inserted without cement." *J Bone Joint Surg Am* 1994; 76-A: 172-180.
59. Lalor P, Revell, PA. "T-lymphocytes and titanium aluminium vanadium alloy: evidence for immunological events associated with debris deposition." *Clin Mater* 1993; 12: 57-62.
60. Lalor PA, Gray AB, Wright S, Railton GT, Freeman MA Revell PA. "Contact sensitivity to titanium in a hip prosthesis?" *Contact Dermatitis* 1990; 23(3): 193-4.
61. Lalor PA, Revell PA, Gray AB, Wright S, Railton GT Freeman MA. "Sensitivity to titanium. A cause of implant failure?" *J Bone Joint Surg Br* 1991; 73(1): 25-8.

62. Lassus J, Salo J, Jiranek WA, Santavirta S, Nevalainen J, Matucci-Cerinic M, Horak P, Konttinen Y. "Macrophage activation results in bone resorption." *Clin Orthop* 1998; (352): 7-15.
63. Lawton MT, Ho JC, Bichard WD, Coons SW, Zabramski JM, Spetzler RF. "Titanium aneurysm clips: Part I--Mechanical, radiological, and biocompatibility testing." *Neurosurgery* 1996; 38(6): 1158-63; discussion 1164.
64. Lee SH, Brennan FR, Jacobs JJ, Urban RM, Ragasa DR, Glant TT. "Human monocyte/macrophage response to cobalt-chromium corrosion products and titanium particles in patients with total joint replacements." *J Orthop Res* 1997; 15(1): 40-9.
65. Leventhal. "Titanium, a metal for surgery." *J Bone Joint Surg Am* 1951; 33-A: 473-474.
66. Lewis CG, Sunderman FW, Jr. "Metal carcinogenesis in total joint arthroplasty. Animal models." *Clin Orthop* 1996; (329 Suppl): S264-8.
67. Liebler J, Kunkel SL, Burdick MS. "Production of IL-8 and monocyte chemoattractant protein-1 by peripheral blood monocytes." *J Immunol* 1994; 168: 241.
68. Linder L, Obrant K, Boivin G. "Osseointegration of metallic implants. II. Transmission electron microscopy in the rabbit." *Acta Orthop Scand* 1989; 60(2): 135-9.
69. Maloney WJ, James RE, Smith RL. "Human macrophage response to retrieved titanium alloy particles in vitro." *Clin Orthop* 1996; (322): 268-78.
70. Maloney WJ, Smith RL, Castro F, Schurman DJ. "Fibroblast response to metallic debris in vitro. Enzyme induction, cell proliferation, and toxicity." *J Bone Joint Surg Am* 1993; 75(6): 835-44.
71. Manlapaz M, Maloney WJ, Smith RL. "In vitro activation of human fibroblasts by retrieved titanium alloy wear debris." *J Orthop Res* 1996; 14(3): 465-72.
72. Manolagas S, Jilka RL. "Bone marrow, cytokines, and bone remodeling: emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis." *New Engl J Med* 1995; 332: 305-311.
73. Matter P, Burch HB. "Clinical experience with titanium implants, especially with the limited contact dynamic compression plate system." *Arch Orthop Trauma Surg* 1990; 109(6): 311-3.
74. Matthew IR, Frame JW, Browne RM, Millar BG. "In vivo surface analysis of titanium and stainless steel miniplates and screws." *Int J Oral Maxillofac Surg* 1996; 25(6): 463-8.

75. McKellop HA, Sarmiento A, Schwinn CP Ebramzadeh E. "In vivo wear of titanium-alloy hip prostheses." *J Bone Joint Surg Am* 1990; 72(4): 512-7.
76. Meachim G Williams DF. "Changes in nonosseous tissue adjacent to titanium implants." *J Biomed Mater Res* 1973; 7(6): 555-72.
77. Mirra JM, Amstutz HC, Matos M Gold R. "The pathology of the joint tissues and its clinical relevance in prosthesis failure." *Clin Orthop* 1976; (117): 221-40.
78. Mirra JM, Marder RA Amstutz HC. "The pathology of failed total joint arthroplasty." *Clin Orthop* 1982; (170): 175-83.
79. Mofid M, Thompson, RC, Pardo, CA, Manson, PN. "Biocompatibility of fixation Materials in the brain." *Plast Reconstr Surg* 1997; 7: 14-20.
80. Montague AM, K, Brown, S, Payer, J. "Effects of Ca and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> added to RPMI on the fretting corrosion of Ti6Al4V." *J Biomed Mater Res* 1996; 32: 516-526.
81. Moran CA, Mullick FG, Ishak KG, Johnson FB Hummer WB. "Identification of titanium in human tissues: probable role in pathologic processes." *Hum Pathol* 1991; 22(5): 450-4.
82. Mu Y, Kobayashi T, Sumita M, Yamamoto A Hanawa T. "Metal ion release from titanium with active oxygen species generated by rat macrophages in vitro." *J Biomed Mater Res* 2000; 49(2): 238-43.
83. Müller M.E. AM, Schneider R., Willenegger H. (1991). *Manual der Osteosynthese*, 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg
84. Mundy G (1993). *Mononuclear phagocytes in bone cell function. Mononuclear phagocytes in cell biology*. G. Lopez-Berestein, Klostergaard, J. Boca Raton, CRC Press Inc: 101-111.
85. Mundy G. "Role of cytokines in bone resorption." *Cell Biochem* 1993; 53: 296-300.
86. Nakashima Y, Sun DH, Trindade MC, Chun LE, Song Y, Goodman SB, Schurman DJ, Maloney WJ Smith RL. "Induction of macrophage C-C chemokine expression by titanium alloy and bone cement particles." *J Bone Joint Surg Br* 1999; 81(1): 155-62.
87. Naish S (1997). *Handbuch II immunchemischer Färbemethoden*  
3. Auflage, DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
88. Nasser S, Campbell PA, Kilgus D, Kossovsky N Amstutz HC. "Cementless total joint arthroplasty prostheses with titanium-alloy articular surfaces. A human retrieval analysis." *Clin Orthop* 1990; (261): 171-85.



89. Nathan C, Murray, HW, Cohn, ZA. "The macrophage as an effector cell." *N Engl J Med* 1980; 303: 622-626.
90. Onodera K, Ooya K, Kawamura H. "Titanium lymph node pigmentation in the reconstruction plate system of a mandibular bone defect." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993; 75(4): 495-7.
91. Oyajobi B, Russell, RGG (1993). *Cytokines and joint disease. Articular cartilage and osteoarthritis*. K. Keutmer. New York, Raven Press: 333.349.
92. Pacifici R, Brown, C, Puscheck, E. "Effects of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells." *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5134-5138.
93. Pacifici R, Rifas, L, McCracken, R. "Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin 1 release." *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2398-2402.
94. Pan J, Thierry, D, Leygraf, C. "Hydrogen peroxide toward enhanced oxide growth on titanium in PBS solution: blue coloration and clinical relevance." *J Biomed Mater Res* 1996; 30: 393-402.
95. Pazzaglia UE, Dell'Orbo C, Wilkinson MJ. "The foreign body reaction in total hip arthroplasties. A correlated light-microscopy, SEM, and TEM study." *Arch Orthop Trauma Surg* 1987; 106(4): 209-19.
96. Perren SM. "The concept of biological plating using the limited contact-dynamic compression plate (LC-DCP). Scientific background, design and application." *Injury* 1991; 22(Suppl 1): 1-41.
97. Perren SM, Klaue K, Pohler O, Predieri M, Steinemann S, Gautier E. "The limited contact dynamic compression plate (LC-DCP)." *Arch Orthop Trauma Surg* 1990; 109(6): 304-10.
98. Rader CP, Sterner T, Jakob F, Schutze N, Eulert J. "Cytokine response of human macrophage-like cells after contact with polyethylene and pure titanium particles." *J Arthroplasty* 1999; 14(7): 840-8.
99. Ray MS, Matthew IR, Frame JW. "Metallic fragments on the surface of miniplates and screws before insertion." *Br J Oral Maxillofac Surg* 1999; 37(1): 14-8.
100. Revell PA, Lalor PA. "Massive exposition to titanium, but without sensitization." *Acta Orthop Scand* 1995; 66(5): 484.

101. Reynolds ES "The use of lead citrate of high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy" *J Cell Biol* 1963; 77: 208-213
102. Richardson KC, Jarret L, Fink EH "Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy" *Stain Technol* 1960; 35: 313
103. Roitt IM, Brostoff J, Male D (1991). *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*, 2. Auflage, Thieme, Stuttgart-New York
104. Rosenberg A, Gratz KW Sailer HF. "Should titanium miniplates be removed after bone healing is complete?" *Int J Oral Maxillofac Surg* 1993; 22(3): 185-8.
105. Ruedi TP (1975). *Titan und Stahl in der Knochenchirurgie.*, Hefte Unfallheilkunde 123,
106. Santavirta S, Konttinen YT, Hoikka V Eskola A. "Immunopathological response to loose cementless acetabular components." *J Bone Joint Surg Br* 1991; 73(1): 38-42.
107. Scales JT. "Black staining around titanium alloy prostheses--an orthopaedic enigma." *J Bone Joint Surg Br* 1991; 73(4): 534-6.
108. Schliephake H, Lehmann H, Kunz U Schmelzeisen R. "Ultrastructural findings in soft tissues adjacent to titanium plates used in jaw fracture treatment." *Int J Oral Maxillofac Surg* 1993; 22(1): 20-5.
109. Schliephake H, Reiss G, Urban R, Neukam FW Guckel S. "Metal release from titanium fixtures during placement in the mandible: an experimental study." *Int J Oral Maxillofac Implants* 1993; 8(5): 502-11.
110. Schuster J. (1975) *Die Metallose*, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
111. Seitz M, Dewald, B, Gerber, N, Bagiolini, M. "Enhanced production of neutrophil-activating peptide-1/ interleukin-8 in rheumatoid arthritis." *J Clin Invest* 1991; 87: 463.
112. Shanbhag AS, Jacobs JJ, Black J, Galante JO Glant TT. "Human monocyte response to particulate biomaterials generated in vivo and in vitro." *J Orthop Res* 1995; 13(5): 792-801.
113. Shanbhag AS, Jacobs JJ, Black J, Galante JO Glant TT. "Effects of particles on fibroblast proliferation and bone resorption in vitro." *Clin Orthop* 1997; (342): 205-17.
114. Silverstein S, Steinman, RM, Cohn, ZA. "Endocytosis." *Annu Rev Biochem* 1977; 46: 669-722.
115. Sinibaldi K, Rosen H, Liu SK DeAngelis M. "Tumors associated with metallic implants in animals." *Clin Orthop* 1976; (118): 257-66.

116. Solar RJ, Pollack SR Korostoff E. "In vitro corrosion testing of titanium surgical implant alloys: an approach to understanding titanium release from implants." *J Biomed Mater Res* 1979; 13(2): 217-50.
117. Steinemann S. "Titanium - the material of choice ?" *Periodontology 2000* 1998; 17: 7-21.
118. Tengvall P, Lundström, Sjöqvist, L, Elwing, H. "Titanium-hydrogen peroxide interaction: model studies of the influence of the inflammatory response on titanium implants." *Biomaterials* 1989; 10: 166-175.
119. Torgersen S, Gjerdet NR, Erichsen ES Bang G. "Metal particles and tissue changes adjacent to miniplates. A retrieval study." *Acta Odontol Scand* 1995; 53(2): 65-71.
120. Torgersen S, Moe G Jonsson R. "Immunocompetent cells adjacent to stainless steel and titanium miniplates and screws." *Eur J Oral Sci* 1995; 103(1): 46-54.
121. Trindade MC, Lind M, Sun D, Schurman DJ, Goodman SB Smith RL. "In vitro reaction to orthopaedic biomaterials by macrophages and lymphocytes isolated from patients undergoing revision surgery." *Biomaterials* 2001; 22(3): 253-9.
122. Urban RM, Jacobs JJ, Tomlinson MJ, Gavrilovic J, Black J Peoc'h M. "Dissemination of wear particles to the liver, spleen, and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee replacement." *J Bone Joint Surg Am* 2000; 82(4): 457-76.
123. Ward P, Duque, RE, Sulavik, MC, Johnson, KJ. "In vitro and in vivo stimulation of rat neutrophils and alveolar macrophages by immune complexes." *Am J Pathol* 1983; 110: 297-309.
124. Willert HG, Broback LG, Buchhorn GH, Jensen PH, Koster G, Lang I, Ochsner P Schenk R. "Crevice corrosion of cemented titanium alloy stems in total hip replacements." *Clin Orthop* 1996; (333): 51-75.
125. Williams D. F. MG. "A combined metallurgical and histological study of tissue-prosthesis interaction in orthopedic patients." *J Biomed Mater Res* 1974; Symp 5: 1-5.
126. Williams DF. "Biomaterials and biocompatibility." *Med Prog Technol* 1976; 4(1-2): 31-42.
127. Williams DF. "Biocompatibility of clinical implant material." series in *Biocompatibility* 1981; Volume 1.
128. Williams DF. "Titanium: epitome of biocompatibility or cause for concern." *J Bone Joint Surg Br* 1994; 76(3): 348-9.

129. Williams DF, Meachim, G. "A combined metallurgical and histological study of tissue-prosthesis interaction in orthopedic patients." *J Biomed Mater Res* 1974; Symp 5: 1-5.
130. Witt JD Swann M. "Metal wear and tissue response in failed titanium alloy total hip replacements." *J Bone Joint Surg Br* 1991; 73(4): 559-63.
131. Woodman JL, Jacobs JJ, Galante JO Urban RM. "Metal ion release from titanium-based prosthetic segmental replacements of long bones in baboons: a long-term study." *J Orthop Res* 1984; 1(4): 421-30.
132. Yao J, Cs-Szabo G, Jacobs JJ, Kuettner KE Glant TT. "Suppression of osteoblast function by titanium particles." *J Bone Joint Surg Am* 1997; 79(1): 107-12.
133. Yao J, Glant TT, Lark MW, Mikecz K, Jacobs JJ, Hutchinson NI, Hoerner LA, Kuettner KE Galante JO. "The potential role of fibroblasts in periprosthetic osteolysis: fibroblast response to titanium particles." *J Bone Miner Res* 1995; 10(9): 1417-27.

## 6.2 Eigene Veröffentlichungen

1. Leiting S, Assenmacher S, Brauer H, Obertacke U, Voggenreiter G „Gewebereaktion auf Titanpartikel – Histologische Untersuchungen an Plattenbettgewebe“ *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* 2001; 32: 172-177
2. Leiting S, Assenmacher S, Brauer H, Voggenreiter G „Vergleichende Untersuchungen zur Gewebereaktion auf Osteosynthesematerial aus Titan und Stahl“ S. 399-401  
in: Schönleben K, Neugebauer E, Hartel W (Hrsg) (2001) „Chirurgisches Forum 2001 für experimentelle und klinische Forschung“, 1. Auflage, Springer, Berlin-Heidelberg
3. Voggenreiter G, Leiting S, Brauer H, Leiting P, Majetschak M, Bardenheuer M, Obertacke U „Immuno-inflammatory tissue reaction to stainless-steel and titanium plates used for internal fixation of long bones“ *Biomaterials* 2003; 24: 247-254

## 7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb.-nummer	Beschreibung	Seite
1	LCDCP aus Reintitan in situ bei der Metallentfernung	29
2	Drittelrohrplatte aus rostfreiem Stahl bei der Metallentfernung	29
3	Röntgenaufnahme der oben intraoperativ photographierten Drittelrohrplatte zur Versorgung einer Tibiafraktur	30
4	Röntgenaufnahme einer Rekonstruktionsplatte zur Versorgung einer Clavikulafraktur	30
5	Plattenlager nach Entfernung einer LC-DCP aus Reintitan	45
6	Probe des Plattenlagers einer LC-DCP aus Reintitan (Hämatoxylin;100x)	46
7	CD68 positive Makrophagen mit phagozytierten Titanpartikeln (1000x)	48
8	Titanpartikel mit adhärennten Makrophagen (CD68; 1000x)	49
9	HLA-DP/DQ/DR präsentierende Makrophagen (1000x)	50
10	Titanpartikel mit adhärennten HLA positiven Makrophagen	51
11	CD45RO positive T-Lymphozyten in der Nähe von Titanpartikeln (100x)	52
12	Titanpartikel mit CD45RO positivem T-Lymphozyten (1000x)	53
13	Ausschnitt eines Clusters von CD3 positiven T-Lymphozyten (1000x)	54
14	CD8 positive T-Lymphozyten (1000x)	56
15	CD79 $\alpha$ positiver B-Lymphozyt (1000x)	57
16	Plattenlager einer DCP aus rostfreiem Stahl	59
17	Stahlpartikel im Plattenkontaktgewebe ( Hämatoxylin, 200x)	60
18	Feine phagozytierte Stahlpartikel (CD68, 1000x)	61
19	Stahlpartikel mit adhärennten Makrophagen (CD68, 1000x)	62
20	Phagozytose von Stahlpartikeln durch HLA-positive Makrophagen (1000x)	64
21	Stahlpartikel mit adhärennten Makrophagen (HLA-DP/DQ/DR 1000x)	65

22	Stahlpartikel mit CD45RO positiven T-Lymphozyten (1000x)	66
23	zahlreiche Stahlpartikel mit T-Lymphozyten (CD45RO, 1000x)	67
24	Übersichtsaufnahme nachgewiesener CD3 positiver T-Lymphozyten (100x)	68
25	Stahlpartikel mit einzelnen CD8 positiven T-Lymphozyten (1000x)	69
26	B-Lymphozyten (CD79 $\alpha$ , 1000x)	70
27	Makrophage mit phagozytiertem Titan (M = 22000)	73
28	Anschnitt eines Makrophagen mit phagozytierten Stahlpartikeln (M = 22000)	74
29	graphische Darstellung der EDX-Analyse der Titanpartikel	76

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tab.- Nummer	Beschreibung	Seite
1	Mechanische Eigenschaften von 316L Stahl	18
2	Patientenkollektiv mit Titanimplantat	24
3	Patientenkollektiv mit Stahlimplantat	27
4	Übersicht der verwendeten Antikörper	34
5	Übersicht der Vorbehandlung	35
6	Durchführung der immunhistochemischen Färbung	38
7	Übersicht der Vorbereitung für die Elektronenmikroskopie	43
8	Auswertung für die Patienten mit Titanimplantaten	58
9	Auswertung für die Patienten mit Stahlimplantaten	71
10	Zusammensetzung der schwarzen Partikel im periimplantären Gewebe zu Titanplatten	75
11	Zusammensetzung der schwarzen Partikel im periimplantären Gewebe zu Stahlplatten	75

## 8. Lebenslauf

### Personalien

Name und Vorname:	Leiting, Stephan
Geburtsdatum:	17.02.1976
Geburtsort:	Düsseldorf
Familienstand:	ledig
Vater:	Dr. med. Peter Leiting
Mutter:	Gabriele Leiting, geb. Kocken

### Schulischer Werdegang

1982 - 1986	Grundschule
1986 - 1995	Gymnasium
13.06.1995	Abitur

### Universitärer Werdegang

WS 1996/97	Beginn des Studiums der Medizin an der Universität des Saarlandes
14.09.1998	Ärztliche Vorprüfung
31.08.1999	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06.09.2001	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04.11.2002	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11.11.2002	Approbation



## 9. Danksagung

☞ Tel: 0621-383-2335

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Gregor Voggenreiter danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die ausgezeichnete Betreuung.

Frau Heike Uhlenkott danke ich für die Hilfe bei den experimentellen Arbeiten.

Bei Herrn Dr. med. Peter Leiting bedanke ich mich für die Hilfsbereitschaft bei der Gewinnung der Proben.

Herrn Dipl.-Ing. Holger Brauer schulde ich Dank für die Erstellung der REM-EDX-Analyse.

Frau Bärbel Gobs-Hevelke danke ich für die Hilfe im Rahmen der elektronenmikroskopischen Untersuchung.