

Abbildung 1: LCDCP aus Reintitan in situ bei der Metallentfernung

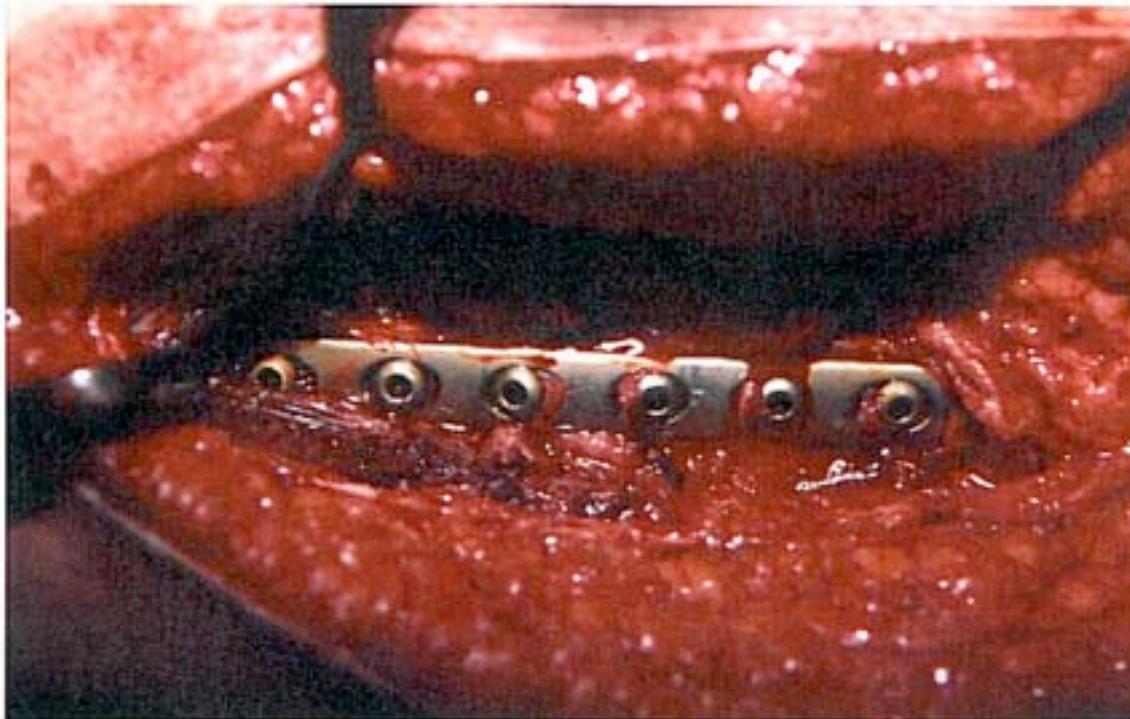


Abbildung 2: Drittelrohrplatte aus rostfreiem Stahl bei der Metallentfernung





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 Al₂O₃ 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°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°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

Antikörper	Antikörperklon	Isotyp	Epitop tragende Zellen	Verdünnung
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

Substanz	Hersteller	Zeit	Ziel
(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 ₂ O ₂ 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 Aufrufen 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

Substanz	Hersteller	Zeit	Ziel
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 Primäarak.
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 Hämalauungsg.	Merck, Darmstadt	30 sec	} Kernfärbung
H ₂ 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

Substanz	Hersteller	Zeit	Ziel
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.