

Klinik für Kieferorthopädie
(Direktor: Prof. Dr. med. Helge Fischer-Brandies)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**STEREOLICHTMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG VON MIKRORISSEN UM
KIEFERORTHOPÄDISCHE MINISCHRAUBEN**

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

vorgelegt von
Sibbern Sibbersen
aus Husum

Kiel 2012

1. Berichterstatter Prof. Dr. Fischer-Brandies

2. Berichterstatter Prof. Dr. Wenz

Tag der mündl. Prüfung: 13.06.2013

Zum Druck genehmigt, Kiel den 24.04.2013

gez.: Prof. Dr. Johann Roider
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Meinen Eltern

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Färbeprotokoll 1	14
Tabelle 2:	Färbeprotokoll 2	15
Tabelle 3:	Färbeprotokoll 3	16
Tabelle 4:	Färbeprotokoll 4	17
Tabelle 5:	Färbeprotokoll 5	17
Tabelle 6:	Färbeprotokoll 6	18
Tabelle 7:	Protokoll der Referenzgruppe	19
Tabelle 8:	Wiederholungsmessung der LM-Präparate	32
Tabelle 9:	Rissanzahl in Abhängigkeit von der Färbemethode	
Tabelle 10:	Test auf Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov	45
Tabelle 11:	Wiedererkennung der Risse unter dem LM	46
Tabelle 12:	Anova Test	47

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Übersicht über die Herstellung der Präparate.....	5
Abbildung 2: Thomas pin® aus verschiedenen Perspektiven	6
Abbildung 3: Knochenpräparat mit Maßstab.....	7
Abbildung 4: Knochenblock mit interradiikulär gesetzter Schraube.....	8
Abbildung 5: Grafik zum Ankörnen.....	9
Abbildung 6: Die initiale Phase der Insertion.....	9
Abbildung 7: Färbemethodik nach D. B. Burr und M. Hooser	11
Abbildung 8: Färbemethodik nach Stafford und Burr	12
Abbildung 9: Gesputtertes REM-Präparat auf dem Probenhalter	21
Abbildung 10: Intensiv gefärbtes Präparat aus der zweiten Färbereihe (40x).....	24
Abbildung 11: Präparat aus der dritten Färbereihe in Alkohol fixiert ohne Vakuum (40x).....	25
Abbildung 12: Präparat aus der vierten Färbereihe 12 Stunden gefärbt (40x)	26
Abbildung 13: Fünfte Färbelösung 6h gefärbt.....	27
Abbildung 14: Fünfte Färbelösung 12h gefärbt.....	27
Abbildung 15: Fünfte Färbelösung 18h gefärbt.....	27
Abbildung 16: Fünfte Färbelösung 24h gefärbt.....	27
Abbildung 17: Ungefärbtes Präparat unter LM (40x)	28
Abbildung 18: Ungefärbtes Präparat unter REM (100x).....	28
Abbildung 19: Schaden im Ungefärbten REM-Präparat	29
Abbildung 20: Riss im Ungefärbten REM-Präparat mit Pfeil markiert	29
Abbildung 21: Gefärbtes Präparat unter LM mit markierten Rissen.....	30
Abbildung 22: Gefärbtes Präparat unter REM	30
Abbildung 23: Gefärbtes Präparat unter REM (200x),.....	30
Abbildung 24: Ungefärbtes Präparat unter dem REM (50x).....	31
Abbildung 25: Gefärbtes Präparat unter dem REM (50x).....	31
Abbildung 26: Präparat aus der Kontrollgruppe (40x)	31
Abbildung 27: Präparat aus der Experimentalgruppe (40x)	31
Abbildung 28: Längster Riss in Abhängigkeit von der Färbemethode.....	34
Abbildung 29: Risssumme in Abhängigkeit von der Färbemethode.....	35
Abbildung 30: Durchschnittliche Risslänge in Abhängigkeit von der Färbemethode.	36

Abkürzungsverzeichnis

B.F.	Basisches Fuchsin
CT	Computertomogramm
ETOH	Ethanol
LM	Lichtmikroskop
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
REM	Rasterelektronenmikroskop
rpm	rounds per minute

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.2	Zusammenfassung und Zielsetzung	4
2	Material und Methode	5
2.1	Auswahl der Schrauben	6
2.2	Auswahl des Knochens	7
2.3	Herstellung der Knochenblöcke	7
2.4	Bohrung und Schraubeninsertion	8
2.5	Vorversuche zum Färbeverfahren	9
2.5.1	Methodik nach D. B. Burr und M. Hooser	10
2.5.2	Methodik nach D. B. Burr und T. Stafford	12
2.6	Eigene Variationen der Fixierung	13
2.6.1	Erste Färbereihe	14
2.6.2	Zweite Färbereihe	15
2.6.3	Dritte Färbereihe	15
2.6.4	Vierte Färbereihe	16
2.6.5	Fünfte Färbereihe	17
2.7	Fixierung und Färbemethode der Experimentalgruppe	18
2.8	Herstellung der Knochenscheiben für die lichtmikroskopische Untersuchung	19
2.9	Herstellung der Kontrollgruppe	19
2.10	Auswertung unter dem LM und REM	20
2.11	Herstellung der REM-Präparate	21
2.12	Statistik	22
3	Ergebnisse	23
3.1	Ergebnisse der Vorversuche	23
3.1.1	Erste und zweite Färbereihe	23
3.1.2	Dritte Färbereihe	24
3.1.3	Vierte Färbereihe	25
3.1.4	Fünfte Färbereihe	26
3.2	Definitive Färbereihe	27
3.2.1	Allgemeine Beobachtungen bei ungefärbten Präparaten	28
3.2.2	Allgemeine Beobachtungen bei gefärbten Präparaten	29
3.3	Methodische Auswertung	32
3.3.1	Messfehleranalyse	32
3.3.2	Vergleich durch Beschreibung der Verfahren	33
3.3.3	Vergleich der vier Methoden	36
4	Diskussion	38
5	Zusammenfassung	44
6	Anhang	45
7	Literaturverzeichnis	48
	Veröffentlichung	50
	Danksagung	51
	Lebenslauf	52

1 Einleitung

Das dritte Newtonsche Axiom „actio ist gleich reactio“ ist stetiger Begleiter eines Kieferorthopäden im klinischen Alltag. So kam der Wunsch nach einer maximalen Verankerung für orthodontische Apparaturen sehr früh auf. Die erste Arbeit, die sich mit Minischrauben beschäftigt hat, stammt aus dem Jahre 1945 [1]. In dieser Studie wurden noch sehr hohe Verlustraten angegeben. Schon einige Jahre später ist der Trend und die heutige Erfolgsrate bereits zu erahnen [2-3].

Aus Umfragen geht hervor, dass die Anwendung von Minischrauben weit verbreitet ist. So zeigte eine Umfrage unter 546 niedergelassenen Kieferorthopäden und neun Weiterbildungsassistenten, dass 80% der Befragten mindestens in einem Patientenfall kieferorthopädische Minischrauben verwendet hatten [4].

Die Einsatzbereiche für dieses Therapiemittel sind vielfältig und umfassen nicht nur die Positionsveränderung einzelner Zähne [5]. Fallberichte zeigen, dass die kieferorthopädische Korrektur unter Verwendung von Minischrauben bei Dysgnathien der Angle Klasse II und III [6] [7] oder Patienten mit Gummy Smile [8] erfolgreich angewendet werden konnte. Auch komplexere Dysgnathien des Unterkiefers wurden auf diese Art therapiert, so dass die Indikation für eine chirurgische Umstellungsosteotomie eingegrenzt wird [9].

Es werden jedoch auch Misserfolge und limitierende Faktoren beschrieben. So gingen in einer Studie von 141 Patienten bei denen 260 Minischrauben gesetzt wurden, 22 Schrauben über die Studiendauer verloren [10]. Die maßgeblichen Faktoren, die Erfolg oder Misserfolg beeinflussen, wurden in mehreren Studien aufgezeigt.

In einer Retrospektivstudie wurden 359 Mini-Implantate (Minischrauben, Miniplatten, Mikroschrauben), die bei 129 Patienten inseriert wurden, nachuntersucht. Dabei beeinflussten Geschlecht, Art der Fehlstellung, Insertionsort (bukkal oder lingual), Länge der Schraube, Zugrichtung und Dauer der Einheilung den Erfolg nur unwesentlich. Von ausschlaggebender Bedeutung für den Erfolg sind laut der Studie das Schraubendesign, Alter des Patienten und die Positionierung der Minischraube im Unterkiefer [11].

Die häufigsten Ursachen für den Verlust einer Minischraube fanden verschiedene Autoren in Entzündungen der oralen Weichgewebe und der frühen Belastung in den ersten drei Wochen

nach Insertion. Zusätzlich sollte sowohl der Kieferorthopäde als auch der Chirurg bei der Anwendung von Minischrauben erfahren sein, um den klinischen Erfolg sicherzustellen [12]. Bei der Insertion einer Minischraube wird durch das Einbringen der Schraube der zirkuläre Knochen verdrängt und komprimiert. Aus der dentalen Implantologie ist bekannt, dass dieser Vorgang für den langfristigen Erfolg ausschlaggebend ist, da aus ihm die Primärstabilität resultiert. [13-14]. Ohne letztere ist eine bindegewebige Einheilung zu erwarten.

Die Primärstabilität von Minischrauben ist von verschiedenen Faktoren abhängig. So zeigte sich, dass sie unter anderem von der Schraubenform beeinflusst wird. Dabei bewirkt eine konische Form und ein breiter Durchmesser eine höhere Primärstabilität, als zylindrische Schrauben mit dünnen Durchmessern [15-16].

Auch Unterschiede in der Insertionstechnik, beispielsweise das Vorbohren und die Bohrtiefe, sind von signifikanter Bedeutung für die primäre Festigkeit [17-18].

Es herrscht Konsens darüber, dass die ersten zwei Wochen nach Insertion besonders kritisch für eine erfolgreiche Implantateinheilung sind. In diesem Zeitraum wird der komprimierte Knochen zirkulär um das dentale Implantat zu neuem funktionellem Knochen umgebaut. Das ist der Übergang von der Primär- zur Sekundärstabilität [19].

Die Sekundärstabilität hängt von zwei Prozessen ab: Der Konservierung des bestehenden Knochens und der Knochenneubildung. Auf zellulärer Ebene sind die Osteoblasten für die Osteogenese verantwortlich. Eine sofortige Belastung von kieferorthopädischen Minischrauben kann sowohl einen positiven als auch einen negativen Effekt haben [20-21]. Ist die Belastung zu groß, geht die Minischraube verloren. Ist sie jedoch richtig dosiert, so werden Osteoblasten aktiviert und der Heilungsprozess gefördert. Es konnte gezeigt werden, dass Minischrauben bei sofortiger Belastung eine hohe Erfolgsquote aufweisen [22].

Keinen Einfluss auf den Langzeiterfolg soll dagegen die Oberfläche der Minischrauben haben [23]. Sie ist aber beispielsweise verantwortlich für das Drehmoment, das aufgebracht werden muss, um eine Minischraube wieder zu entfernen [24].

Während alle bisher genannten Faktoren vom Behandler beeinflussbar sind, ist das Knochenangebot in der zu implantierenden Region nicht veränderbar. Hier spielt einerseits die Dicke der Kompakta und andererseits die Beschaffenheit der Spongiosa eine Rolle [25]. Eine Einteilung nach Lekholm und Zarb, die das Knochenangebot in vier Kategorien einteilt, findet auch heute noch Anwendung [26]. Es konnte bestätigt werden, dass das

Knochenangebot mit verantwortlich ist für den Erfolg oder Misserfolg der Einheilung einer Minischraube. Je nach Beschaffenheit reagiert der Knochen unterschiedlich auf die Insertion. So sorgte beispielsweise eine dicke Kortikalis für eine bessere Primärstabilität als eine dünne [27].

Die bei der Insertion im Knochen entstehenden Mikrorisse sind Gegenstand der aktuellen Forschung und ihre Anwesenheit wurde in Studien bestätigt [28-29]. Dazu sind Minischrauben verschiedener Hersteller in Knochenpräparate inseriert und unter dem Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht worden [29].

In der Traumatologie wird diskutiert, ob es bei künstlichen Gelenken zum Misserfolg durch Mikrorisse kommen kann. Diese Mikrorisse sollen durch die Insertion von Osteosyntheseschrauben verursacht werden [30].

Um Knochendefekte geht es auch bei der Untersuchung von Osteoporose. Man untersucht Mikrotraumen, die den Knochen schwächen. Diese Defekte müssen nicht pathologisch sein, können den Knochen aber so schwächen, dass es zu einem Ermüdungsbruch kommt [31]. In Studien zu Osteoporose konnten Mikrorisse unter dem Lichtmikroskop (LM) nachgewiesen werden [32-35]. Der lichtmikroskopische Nachweis von durch Minischrauben verursachten Mikrotraumen und die Validität dieser Methode, waren bis dato noch nicht Gegenstand einer In-vitro-Studie und sind Inhalt der vorliegenden Arbeit.

1.2 Zusammenfassung und Zielsetzung

Behandlungen mit orthodontischen Minischrauben sind Bestandteil der modernen kieferorthopädischen Therapie und weisen trotz hoher Erfolgsquoten noch immer Verluste auf. Um die Misserfolgsrate bei der Anwendung von Minischrauben weiter zu reduzieren, bemüht sich die Forschung um ein besseres Verständnis der ablaufenden ossären Umbauprozesse, zu denen auch die oben genannten Mikrorisse gehören. Die lichtmikroskopische Darstellung und ihr quantitativer Nachweis waren bisher nicht Gegenstand einer Studie. Auch ein Vergleich zwischen der licht- und elektronenmikroskopischen Auswertung steht bislang noch aus.

In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- a) Sind Mikrotraumata nach Insertion einer kieferorthopädischen Schraube in den Knochen lichtmikroskopisch darstellbar?
- b) Welche Färbemethode ist besonders geeignet, um Mikrotraumen zirkulär um eine Schraube unter dem Lichtmikroskop (LM) zu erkennen?
- c) Bestehen signifikante Unterschiede zwischen der Auswertung mittels Rasterelektronenmikroskop (REM) und LM hinsichtlich der Parameter Rissanzahl und Risslänge?

2 Material und Methode

In dieser Arbeit wurde die optimale Färbemethode zur Darstellung von Mikrorissen im Knochen, verursacht durch die Insertion von kieferorthopädischen Minischrauben, experimentell ermittelt. Dazu wurden Schrauben in Knochenblöcke inseriert und anschließend gefärbt. Eine Kontrollgruppe wurde in gleicher Art und Weise hergestellt, ohne die Präparate zu färben (siehe Abbildung 1). Im Anschluss erfolgte der Vergleich durch eine Auswertung sowohl unter dem LM als auch unter dem REM.

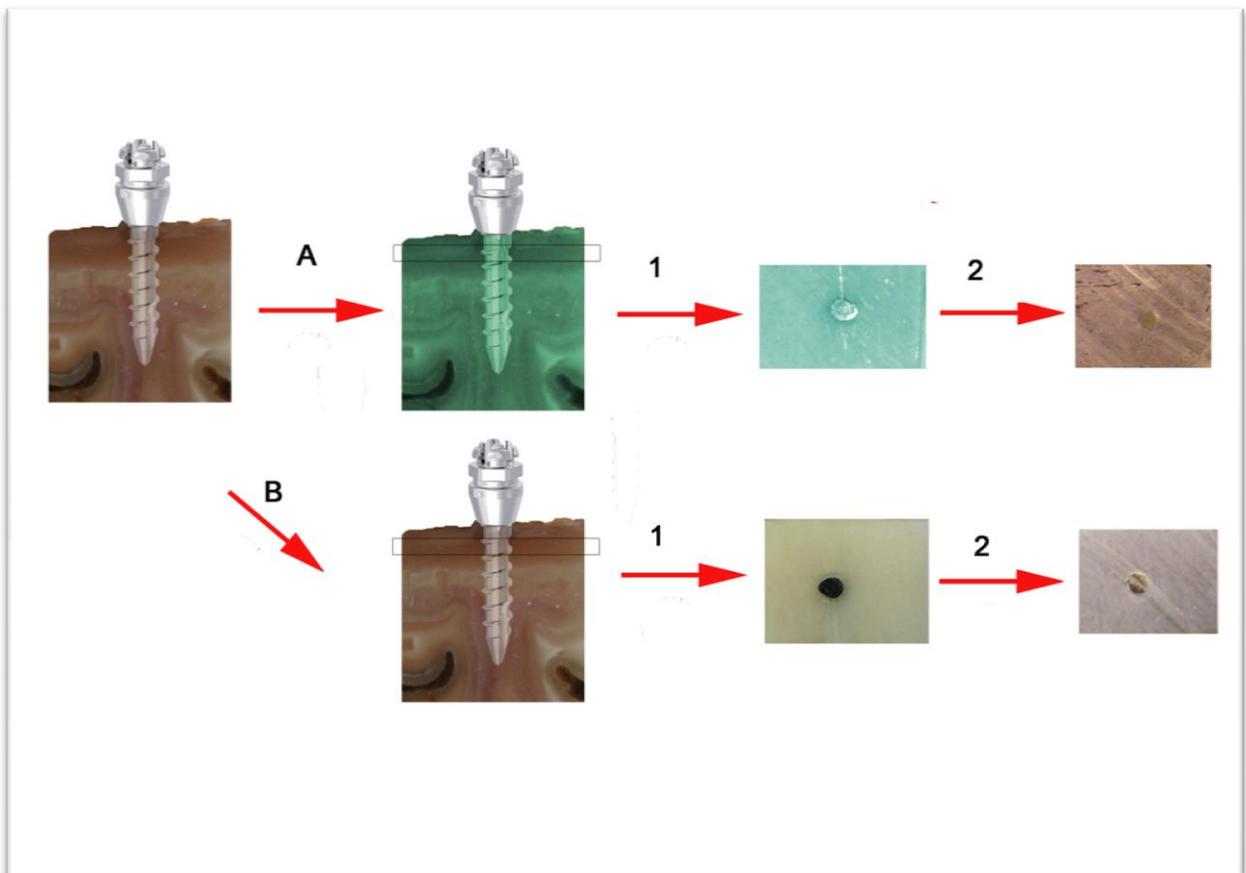


Abbildung 1: Übersicht über die Herstellung der Präparate.

Nach Insertion der Schrauben in den Knochen wurde aus der Hälfte der Proben durch Färbung die Experimentalgruppe (A). Die andere Hälfte blieb als Kontrollgruppe ungefärbt (B). Anschließend wurden aus allen Knochenblöcken etwa 200µm dicke Knochenscheiben hergestellt. Diese wurden erst unter dem LM untersucht (1) und anschließend für die Untersuchung unter dem REM vorbereitet und ausgewertet (2).

2.1 Auswahl der Schrauben

Kieferorthopädische Minischrauben werden unterteilt in den Schraubenkopf, die Implantatschulter und den Implantatschaft.

Das Schraubenkopfdesign fällt sehr unterschiedlich aus, wobei der Kreuzslot (siehe Abbildung 2) das größte Anwendungsgebiet hat, da der Kieferorthopäde sie einfach in sein Behandlungskonzept integrieren kann [36]. Hier lassen sich durch die Verwendung von Vierkantdrähten dreidimensionale Bewegungen exakt einstellen [37]. Alternativ gibt es Schrauben mit einem Kugelkopf oder mit einfachem Schlitz.

Die Implantatschulter stellt den transgingivalen Anteil dar. Er ist oft mit einem Tiefenstopp kombiniert, der ein zu tiefes Inserieren vermeidet. Die Oberfläche ist bei den meisten Herstellern zur besseren Hygiene poliert.

Den Schaft gibt es mit konischer oder zylindrischer Grundform und einem Links- oder einem Rechtsgewinde. Eine weitere Einteilung ist in selbstschneidende und selbstbohrende Schrauben möglich. Selbstschneidende Minischrauben benötigen eine Vorbohrung, auch Pilotbohrung genannt, die zur Schraube kongruent ist. Die Schraube schneidet sich ihr Gewinde bei der Insertion selbst. Im Gegensatz dazu gibt es die selbstbohrenden Minischrauben, welche keine Pilotbohrung benötigen. Bei Ihrer Anwendung wird lediglich empfohlen die Kortikalis vor Insertion zu perforieren.

In den Versuchsreihen dieser Arbeit werden konische selbstbohrende kieferorthopädische Minischrauben des Typs tomas-pin® der Firma Dentaaurum, Ispringen, Deutschland, verwendet (siehe Abbildung 2). Es handelt sich dabei um selbstbohrende Minischrauben mit einer Schaftlänge von 8 mm und einem sich verjüngenden Gewindedurchmesser von 1,6 mm auf 1,2 mm. Der Schraubenkopf besitzt einen Kreuzslot.

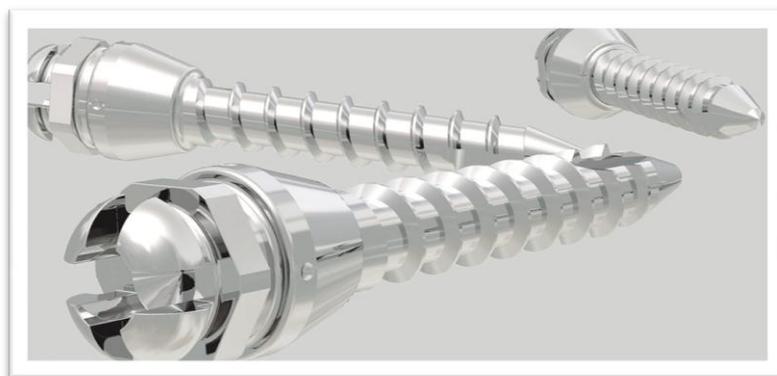


Abbildung 2: Thomas pin® aus verschiedenen Perspektiven.
Quelle: DENTAURUM GmbH & Co. KG

2.2 Auswahl des Knochens

In den Versuchen wurde die Mandibula von Schafen als Knochenpräparat verwendet. Diese wurde direkt von der Schlachtereier „Schlachtereier Burmeister in Viöl, SH“ bezogen und umgehend verarbeitet. Für die Wahl des Knochenmaterials waren folgende Faktoren besonders wichtig:

Das Knochenmaterial sollte möglichst frisch verarbeitet werden, um zu vermeiden, dass postmortale Prozesse die Beschaffenheit des Knochens verändern.

Die mechanische Beanspruchung in vivo, sowie der craniomandibuläre Apparat sollte dem des Menschen möglichst ähneln. Dementsprechend sollte die Stärke der kortikalen Knochenschicht Werte zwischen 0,5 mm und 3 mm aufweisen [38-40], was bei der Mandibula von Schafen der Fall ist (siehe Abbildung 3). Zusätzlich waren die Tiere älter als 18 Monate, um ein bleibendes Gebiss aufzuweisen.



Abbildung 3: Knochenpräparat mit Maßstab.

2.3 Herstellung der Knochenblöcke

Nach dem Einlegen in eine 4°C kalte einmolare phosphatgepufferte Salzlösung, wurden die Unterkiefer von anhaftendem Weichgewebe befreit und mit einer Bandsäge in 1 cm³ große Blöcke gesägt. Dabei wurde darauf geachtet, dass im Zentrum des Blockes keine Zahnwurzeln vorhanden waren, die bei der späteren Schraubeninsertion stören würden.

Demensprechend wurden die Blöcke retromolar oder in Molarenregion gewonnen. Bei den Blöcken aus der Molarenregion sind die Schrauben interradi­kulär inseriert worden (siehe Abbildung 4).



Abbildung 4: Knochenblock mit interradi­kulär gesetzter Schraube.

2.4 Bohrung und Schraubeninsertion

Bei der Vorbohrung und der Schraubeninsertion wurde streng nach den Angaben des Herstellers vorgegangen, um eine reproduzierbare Technik zu gewährleisten. Zunächst wurde der Knochen mit dem tomas®-round drill 1.0 ® ange­kört (siehe Abbildung 5). Anschließend wurde mit dem thomas®-drill SD-Bohrer (ø 1,1 mm, Länge 4 mm) ® eine Vorbohrung durch die Kompakta vorgenommen. Dabei wurde mit einem Winkelstück der Marke Kavo® mit einer 1:1-Übersetzung bei max. 1500 Umdrehungen pro Minute und mit Wasserkühlung intermittierend gebohrt.

Die Insertion lässt sich in zwei Arbeitsschritte aufteilen: Die initiale Phase (siehe Abbildung 5) und die finale Phase (siehe Abbildung 6).

In der initialen Phase wurde mit Hilfe des Einbringadapters der SD-Pin um zwei bis drei Umdrehungen im Uhrzeigersinn in die Vorbohrung eingedreht. Um diesen Vorgang möglichst atraumatisch durchzuführen und Spannungen im Knochen zu vermeiden, wurde ein konstantes Drehmoment verwendet. Um den Pin auf seine definitive Länge einzudrehen wurde der Einbringadapter abgenommen. Für die finale Phase der Insertion, das Einbringen der Minischraube bis zum Tiefenstopp wurde der tomas®-screw driver verwendet. Das Design des tomas®-screw driver birgt die Gefahr den Pin mit einem zu großen Drehmoment zu inserieren. Dementsprechend war vorsichtiges Arbeiten geboten, um eine Fraktur des Pins zu vermeiden.

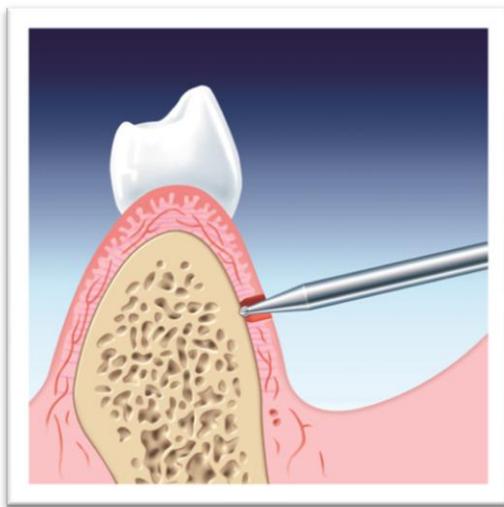


Abbildung 5: Grafik zum Ankörnen.
Quelle: DENTAURUM GmbH & Co. KG



Abbildung 6: Die initiale Phase der Insertion.
Quelle: DENTAURUM GmbH & Co. KG

2.5 Vorversuche zum Färbeverfahren

Um die optimale Färbemethode zu ermitteln, wurden verschiedene Ansätze verfolgt. So wurden die Färbelösungskonzentrationen, die Zeiten und die Art der Fixierung variiert. Dabei wurden die Erkenntnisse aus der jeweils vorangegangenen in die folgende Färbung eingebracht, bis die Färbung für die Experimentalgruppe feststand.

Die entsprechenden Vorversuche bestehen aus fünf verschiedenen Färbereihen (F1 bis F5). Grundlage der Färbeversuche waren Färbemethoden zum einen von D. B. Burr und M. Hooser [33] (F1 bis F3) und zum anderen von D. B. Burr und T. Stafford [32] (F4 bis F5). In der Arbeit von D. B. Burr und M. Hooser wurde das Färbeprotokoll verwendet, um

Mikrorisse bei Osteoporose darzustellen. D. B. Burr und T. Stafford haben dieses Protokoll abgewandelt und männliche Rippen auf Mikrorisse untersucht.

Die verwendeten chemischen Elemente sind im Folgenden tabellarisch erfasst:

PBS Phosphatgepufferte Salzlösung ist eine Pufferlösung, die in der Biochemie verwendet wird. Die Lösung besteht aus Natriumchlorid, Kaliumchlorid und Gesamt-Phosphat. Der pH-Wert der eingestellten Pufferlösung ist 7,4. Die Eigenschaft als Pufferlösung ermöglicht das Arbeiten bei diesem konstanten pH-Wert. Durch die verschiedenen Salze besitzt die Lösung den osmotischen Druck des menschlichen Organismus (isotonische Salzlösung) und verlängert so die Lebensdauer von immobilisierten Biomolekülen.

ETOH Ethanollösung (Alkohol) dient in den entsprechend verwendeten Konzentrationen der Fixierung und Dehydrierung.

Glutaraldehyd Es dient in einer Konzentration von 2,5% als Fixierungsmittel und wird oft bei Proben angewandt, die elektronenmikroskopisch untersucht werden sollen.

Basisches Fuchsin (B.F.) Ein roter Triphenylmethanfarbstoff, der in Alkohol gelöst in der Mikroskopie und Histologie zum Färben verwendet wird. Er färbt Osteoid, Hohlräume und Knochenzellen rot, während Knochen ungefärbt bleibt.

2.5.1 Methodik nach D. B. Burr und M. Hooser

In der Arbeit von D. B. Burr und M. Hooser [33] wurden die Proben vor der Färbung in 70%iges ETOH eingelegt. Im nächsten Schritt wurde jede Probe zweimal in 1%iges B.F. in

80% ETOH eingelegt. Darauf folgte die Einlage in 1%iges B.F. in 90% ETOH. Abschließend wurden die Proben in 1%iges B.F. in 100%iges ETOH eingelegt (siehe

Abbildung 7). Der Lösungswechsel war notwendig um die ETOH-Konzentration möglichst konstant zu halten, da ein Teil verdunstet und der Knochenblock noch Wasser abgeben konnte.

Die Färbezeiten waren dabei von der Größe der zu färbenden Objekte abhängig. Eine menschliche Rippe ist mit einer Färbezeit von zwei Stunden pro Färbelösung, die Speiche eines Hundes mit drei Tagen pro Färbeschritt angegeben.

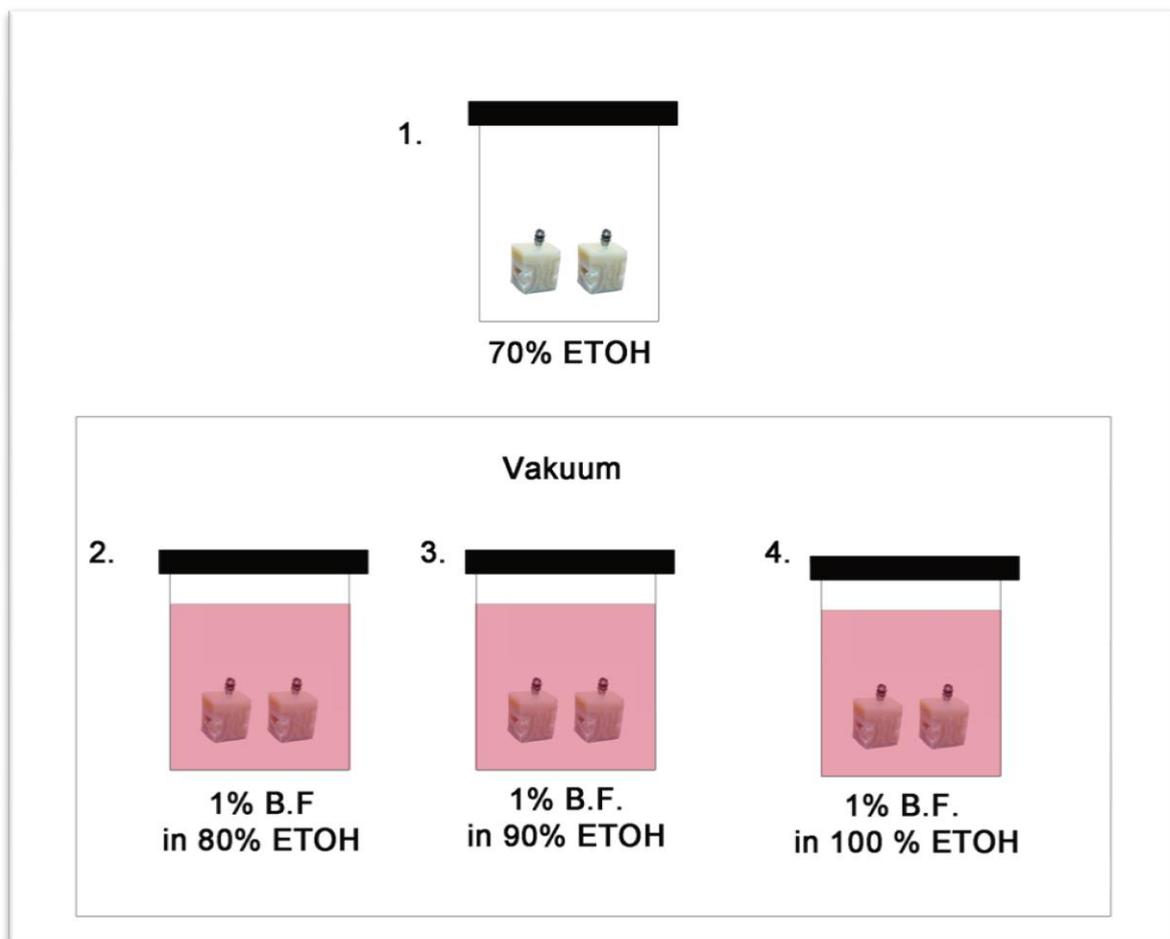


Abbildung 7: Färbemethodik nach D. B. Burr und M. Hooser [33].

Zur Vorbereitung der Färbung erfolgte eine Einlage der Proben in 70%iges ETOH. Darauf durchliefen dieselben Proben den zweiten, dritten und vierten Schritt je zweimal im Vakuum.

2.5.2 Methodik nach D. B. Burr und T. Stafford

Bei der Färbetechnik nach Burr und Stafford [32] wurden die Proben im ersten Schritt in 1%iges B.F. in 100% ETOH für acht Stunden eingelegt. Darauf erfolgte ein Lösungswechsel und die Proben wurden für 24 Stunden in 1%iges B.F. in 100 % eingelegt. Es folgte das Trocknen der Proben für zwei Tage bei Raumtemperatur, um sie im Anschluss vier Tage in destilliertem Wasser zu rehydrieren.

Die Dehydrierung diente der Verdichtung der Färbung in den Mikrorissen. Die Kombination aus De- und Rehydrierung denaturiert und härtet die Proben.

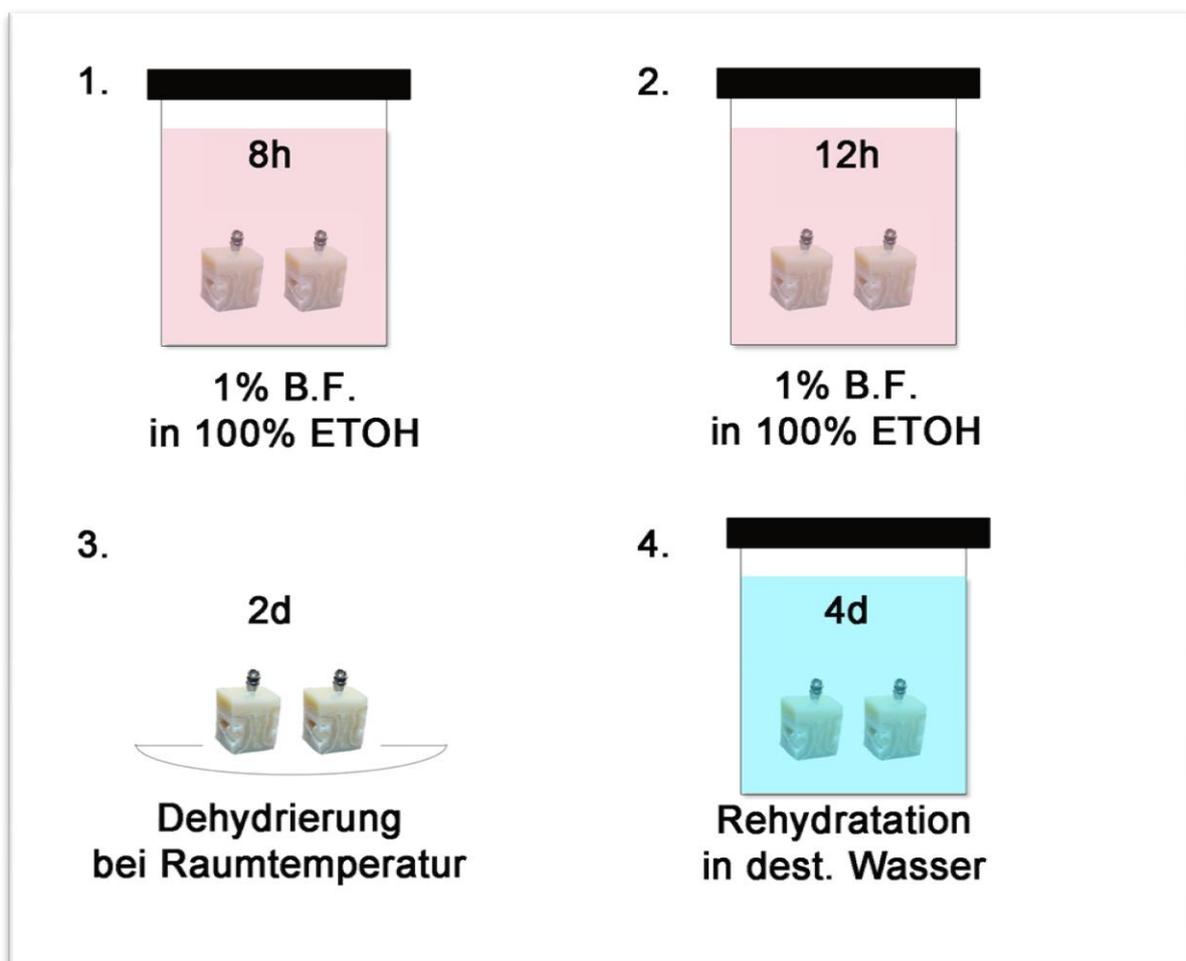


Abbildung 8: Färbemethodik nach Stafford und Burr [32].

Bei dieser Methode durchläuft jede Probe die Schritte eins bis vier. Im ersten und zweiten Schritt werden die Proben gefärbt. Im dritten und vierten Schritt erfolgt eine Dehydrierung gefolgt von einer Rehydrierung.

2.6 Eigene Variationen der Fixierung

Die Vorbehandlung der Proben in aufsteigenden Alkoholreihen zur langsamen Dehydrierung der Präparate wurde nur in der Methode von nach D. B. Burr und M. Hooser [33] angewandt. Um den Effekt auf die Färberesultate zu untersuchen, wurde in den Vorversuchen getestet, ob eine Vorbehandlung mit Alkohol oder Glutaraldehyd einen positiven Effekt auf die Färbung hat.

Die im Folgenden gegebene Übersicht zeigt, wie die Vorversuche durchgeführt und die Methodik der Färbung für die Experimentalgruppe herausgefunden wurde:

1. In den ersten drei Vorversuchen wurde nach D. B. Burr und M. Hooser [33] vorgegangen. Die erste und zweite Färbereihe (F1 und F2) wurden angelegt, um die Färbedauer herauszufinden, die benötigt wird, um einen 1cm³ großen Knochenblock vollständig zu penetrieren. Beide Färbereien wurden mit aufsteigenden Alkoholreihen begonnen und im Vakuum durchgeführt.
2. Die dritte Färbereihe (F3) zeigt den Verschiedenheit zwischen den Präparaten, die in Glutaraldehyd beziehungsweise Alkohol fixiert wurden. Zusätzlich wurde die Konzentration des B.F. von 1% auf 0,5% reduziert. Auf die Anwendung von Vakuum wurde verzichtet.
3. Die vierte Färbereihe (F4) stellt die Färbelösungskonzentrationen 1%iges B.F. und 0,5%iges B.F. gegenüber. Dabei wurde die Färbemethodik von D. B. Burr und T. Stafford [32] angewandt. Auf eine Vorbehandlung in aufsteigenden Alkoholkonzentrationen wurde in der vierten und fünften Färbereihe verzichtet.
4. Die fünfte Färbemethode (F5) diente der Optimierung der Färbezeit aus der vierten Färberreihe bei einer 0,5%igen Färbelösungskonzentration.

2.6.1 Erste Färbereihe

Bei der ersten Färbereihe F1 wurden die zehn Knochenblöcke für zehn Minuten in eine PBS Pufferlösung gelegt.

Es folgte das Einlegen in Alkohol: zunächst für 15 Minuten in 30%ige Ethanollösung, gefolgt von 15 Minuten in 60%iger Ethanollösung. Anschließend erfolgte der eigentliche Färbevorgang. Die Proben wurden in drei verschiedene Färbelösungen gelegt. Um die Färbefektivität zu erhöhen wurden die Proben in den entsprechenden Lösungen bei -0,3bar unter eine Vakuumglocke gestellt.

Jede der drei Lösungen wurde dabei nach 30 Minuten erneuert und der Prozess wiederholt. Die Proben waren somit jeder Färbelösung für eine Stunde ausgesetzt. Die erste Lösung bestand aus 0,5%igem B.F. in 80%igem Ethanol, die zweite aus Fuchsin gleicher Konzentration in 90%igem Ethanol und die dritte aus Fuchsin gleicher Konzentration in 100%igem Ethanol.

Dauer	Lösung
10 min	PBS
10 min	PBS
10 min	PBS
15 min	30% ETOH
15 min	60% ETOH
30 min	80% ETOH in 0,5% B.F. mit Vakuum
30 min	80% ETOH in 0,5% B.F. mit Vakuum
30 min	90% ETOH in 0,5% B.F. mit Vakuum
30 min	90% ETOH in 0,5% B.F. mit Vakuum
30 min	100% ETOH in 0,5% B.F. mit Vakuum
30 min	100% ETOH in 0,5% B.F. mit Vakuum

Tabelle 1: Färbeprotokoll 1

Die Tabelle zeigt das Färbeprotokoll der ersten Färbung. Dabei ist in der ersten Spalte die Zeit, die die Proben in der Lösung verweilen angegeben und in der zweiten Spalte die verwendete Lösung.

2.6.2 Zweite Färbereihe

Bei der zweiten Färbereihe F2 wurden erneut zehn Knochenblöcke verwendet. Die Hauptunterschiede zur Färbung F1 bestanden in der Verlängerung der Färbedauer und der Erhöhung der Konzentration der Färbelösung (1% B. F.). Statt der bisherigen 30 Minuten verblieben die Knochenblöcke nun 24 Stunden in der jeweiligen Färbelösung. Die Färbelösung selbst war 1%ig, während der Alkoholanteil unverändert blieb.

Dauer	Lösung
10 min	PBS
10 min	PBS
10 min	PBS
15 min	30% ETOH
15 min	60% ETOH
24 h	80% ETOH in 1% B.F. mit Vakuum
24 h	80% ETOH in 1% B.F. in mit Vakuum
24 h	90% ETOH in 1% B.F. mit Vakuum
24 h	90% ETOH in 1% B.F. mit Vakuum
24 h	100% ETOH in 1% B.F. mit Vakuum
24 h	100% ETOH in 1% B.F. mit Vakuum

Tabelle 2: Färbeprotokoll 2

Die Tabelle zeigt das Färbeprotokoll der zweiten Färbung. Dabei ist in der ersten Spalte die Zeit, die die Proben in der Lösung verweilen, angegeben und in der zweiten Spalte die verwendete Lösung.

2.6.3 Dritte Färbereihe

In der dritten Färbereihe F3 wurde die Färbezeit von 24 Stunden aus der zweiten Färbereihe übernommen und mit 0,5%igem B.F. aus Färbereihe 1 kombiniert. Zusätzlich wurde die Hälfte der Proben vor dem Färbevorgang 48 Stunden in 2,5%iges Glutaraldehyd gelegt.

Damit enthielt F3 zwei Untergruppen F3.1 und F3.2, denen jeweils fünf Präparate zugeordnet sind. Auf die Verwendung des Vakuums wurde generell verzichtet.

Dauer	Lösung	
	Gruppe F3.1	Gruppe F3.2
48 h	2,5%iges Glutaraldehyd	keine Vorbehandlung
30 min	30% ETOH	
30 min	60% ETOH	
30 min	80% ETOH	
24 h	80% ETOH in 0,5% B.F.	
24 h	80% ETOH in 0,5% B.F.	
24 h	90% ETOH in 0,5% B.F.	
24 h	90% ETOH in 0,5% B.F.	
24 h	100% ETOH in 0,5% B.F.	
24 h	100% ETOH in 0,5% B.F.	

Tabelle 3: Färbeprotokoll 3

Die Tabelle zeigt das Färbeprotokoll der dritten Färbung. Die Färbung F3.1 wurde in Glutaraldehyd fixiert, bei der Färbung F3.2 wurde darauf verzichtet.

2.6.4 Vierte Färbereihe

In der vierten Färbereihe F4 wurde nach der Methode von D. Burr und T. Stafford vorgegangen, die im Folgenden näher erläutert wird. Die Färbelösung wurde einmal gewechselt. Nach dem Verweilen in der zweiten Färbelösung folgte die Trocknungsphase. Im Anschluss wurden die Proben wieder rehydriert. Bei diesem Versuch wurde mit acht Knochenblöcken gearbeitet. Im ersten Schritt verweilten die Proben in der ersten Lösung acht Stunden, im zweiten wurden die Proben zwölf beziehungsweise 24 Stunden gefärbt. Zusätzlich wurde eine Hälfte der Präparate in 0,5%iges B.F. in 100% ETOH eingelegt, die andere Hälfte in 1%iges B.F. in 100% ETOH. Das Austrocknen nahm drei Tage in Anspruch. Anschließend wurden alle Präparate in destilliertem Wasser für vier Tage rehydriert

Arbeitsschritt	Dauer			
	Konzentration des B.F. [%]			
Färben in 100% ETOH	8 h			
	0,5	1	0,5	1
Färben in 100% ETOH	12 h		24 h	
	0,5	1	0,5	1
Austrocknen	3 d			
Rehydratation	4 d			

Tabelle 4: Färbeprotokoll 4

In dieser Tabelle ist die vierte Färbereihe dargestellt. Sie zeigt den jeweiligen Arbeitsschritt, die Dauer (d für Tage, h für Stunden) und die verwendete Konzentration des B.F.

2.6.5 Fünfte Färbereihe

Die fünfte Färbereihe F5 ähnelte der vierten. Es wurde die Dauer der zweiten Färbung variiert. Ein weiterer Unterschied bestand in der Verwendung von nur noch 0,5%igem B.F. in 100% ETOH. Es gab acht Proben, diese wurden zunächst acht Stunden in oben genannter Lösung gefärbt und im Anschluss paarweise noch einmal für 6, 12, 18 und 24 Stunden. Es folgte eine dreitägige Austrocknungsphase, bevor die Knochenblöcke für vier Tage in destilliertem Wasser rehydrierten.

Arbeitsschritte	Dauer			
0,5%iges B.F. in 100% ETOH	8 h			
0,5%iges B.F. in 100% ETOH	6 h	12 h	18 h	24 h
Austrocknen	3 d			
Rehydratation	4 d			

Tabelle 5: Färbeprotokoll 5

In der Tabelle ist der jeweilige Arbeitsschritt und dessen Dauer (d für Tage, h für Stunden) aufgeführt.

2.7 Fixierung und Färbemethode der Experimentalgruppe

Der Knochen wurde bei Abholung aus der Schlachtereier zum Transport in eine 4°C kalte einmolare PBS-Lösung gelegt. Im Labor wurden umgehend 30 Knochenblöcke hergestellt und die Schrauben inseriert.

Die angewandte Färbemethode F6 ist das Ergebnis der Vorversuche. Es konnte herausgearbeitet werden, dass eine zusätzliche Fixierung in Glutaraldehyd nicht notwendig ist. Die Proben wurden direkt gefärbt, ohne sie vorher in Alkohol einzulegen. Stattdessen übernimmt die Färbelösung gleichzeitig die Fixierung der Knochenblöcke. Als Farbstoff wurde B.F. in 0,5%iger Konzentration verwendet.

Für die Knochenblöcke der Färbung F6 galt das folgende Färbeprotokoll:

- a) Einlage der Präparate für 48 Stunden in 0,5%igem B.F. in 80% ETOH. Nach 24 Stunden wurde die Lösung erneuert.
- b) Einlage der Präparate für 48 Stunden in 0,5%igem B.F. in 90% ETOH. Nach 24 Stunden wurde die Lösung erneuert.
- c) Einlage der Präparate für 48 Stunden in 0,5%igem B.F. in 100% ETOH. Nach 24 Stunden wurde die Lösung erneuert.

Färbelösung	Dauer	Wiederholungen
0,5%iges B.F. in 80% ETOH	24 h	2
0,5%iges B.F. in 90% ETOH	24 h	2
0,5%iges B.F. in 100% ETOH	24 h	2

Tabelle 6: Färbeprotokoll 6

Angegeben sind die einzelnen Arbeitsschritte mit der jeweiligen Zusammensetzung der Färbelösung, Dauer und Anzahl der Wiederholungen.

2.8 Herstellung der Knochenscheiben für die lichtmikroskopische Untersuchung

Bei der Herstellung der Präparate wurden erst nach ihrer Färbung Scheiben aus den Knochenblöcken für die lichtmikroskopische Untersuchung hergestellt.

Dazu wurden die Knochenblöcke mit Hilfe einer Schleif- und Poliermaschine (Buehler Metaserv grinder-polisher, Buehler Ltd., Illinois, USA) parallelisiert. Im Anschluss wurden die Knochenblöcke mit Sekundenkleber auf Plexiglasplatten aufgeklebt, bevor sie mit einem Sägemikrotom (Sägeblatt: diamantiert, 100µm; Gerät: Leitz 1600, Wetzlar, Deutschland) in etwa 200µm dicke Knochenscheiben gesägt wurden. Der erste Schnitt erfolgte möglichst weit an der Oberfläche des Präparates (Richtung Schraubenkopf).

2.9 Herstellung der Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe LM-0 dienten Proben, die wie in Kapitel 2.2 und 2.3 beschrieben, hergestellt wurden. Die Proben der Kontrollgruppe wurden nicht gefärbt, sondern nur in den entsprechenden Alkoholkonzentrationen eingelegt.

Lösung	Dauer	Wiederholungen
80% ETOH	24h	2
90% ETOH	24h	2
100% ETOH	24h	2

Tabelle 7: Protokoll der Referenzgruppe
Angabe sind die einzelnen Arbeitsschritte mit der jeweiligen Lösung, die Dauer (h für Stunden) und die Anzahl der Wiederholungen.

Wie aus der Tabelle 7 ersichtlich wird, erfolgte die Einlage der Proben zweimal für je 24 Stunden in 80%ige ETOH-Lösung. Weiter wurden die Proben zweimal nacheinander für 24 Stunden erst in 90%ige ETOH-Lösung, dann in 100%ige ETOH-Lösung eingelegt.

2.10 Auswertung unter dem LM und REM

Die Auswertung der gefärbten und ungefärbten Präparate erfolgte mit dem Auflichtmikroskop (Motic SMZ-168-TL, Motic Incorporation). Bei dem LM wird über optische Linsen eine Vergrößerung des Objektes erreicht. Da die Knochenblöcke lichtundurchlässig sind und somit ein herkömmliches LM mit einer Lichtquelle unter dem Objekt nicht in Frage kam, fand ein Auflichtmikroskop Anwendung.

Bei der Auswertung der verschiedenen Färbungen der Vorversuche F1-F5 unter dem LM wurden folgende Faktoren beurteilt: Strukturwiedergabe, Eindringen und Sättigung der Färbung. Hinsichtlich der Strukturwiedergabe interessierte vor allem, wie deutlich der Übergang von der Schraube zum Knochen und etwaige Risse zu erkennen waren.

Für die Auswertung wurden Fotografien der Präparate unter dem LM angefertigt. Zunächst trockneten die 200µm dicken Präparate eine halbe Stunde bei Raumtemperatur, um Spiegelungen der feuchten Oberfläche bei dem digitalen Fotografieren zu vermeiden. Mit Hilfe einer Software (Motic images 2.0 ML, Motic China Group) wurden die Bilder auf den PC übertragen und gespeichert. Es folgte die Optimierung der Ansichten mit einem Bildbearbeitungsprogramm (Adobe Photoshop CS4 Extended Version 11.0.2). Parameter wie Kontrast, Helligkeit und Sättigung konnten so angepasst werden. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse flossen wiederum in die nachfolgenden Vorversuche ein, um die Färbemethodik zu verbessern.

Das REM (XL-30 ESEM FEG, Philips Research, Eindhoven, Holland) wurde zur Aufnahme der REM-Proben verwendet. Im Gegensatz zum LM verwendet es keine optischen Linsen zur Vergrößerung des Objektes, sondern ein Elektronenstrahl wird in einem bestimmten Muster über das zu vergrößernde Objekt geführt. Durch Wechselwirkungen der Elektronen mit dem Objekt kommt es zur Erzeugung eines Bildes.

Damit es zu dieser Wechselwirkung kommen kann, müssen die Präparate eine spezielle Beschichtung erhalten (siehe Kapitel 2.11). Bei der rasterelektronmikroskopischen Untersuchung wurden systematisch erst bei 50-facher und darauf bei 100-facher Vergrößerung Übersichtsbilder hergestellt. Anschließend fuhr der Auswerter bei 200-facher Vergrößerung den Übergang von dem Knochen zur Minischraube zirkulär ab und dokumentierte Risse im Knochen.

Dabei wurden unter dem REM zwei verschiedene Formen von Mikrotraumen sichtbar: diffuse Schäden und lineare Risse. In dieser Arbeit wurden ausschließlich die linearen Risse ausgewertet.

Die Bilder der Experimentalgruppe unter dem LM wurden von je zwei Personen ausgewertet, um diese Ergebnisse statistisch auswerten zu können. Die rasterelektronenmikroskopischen Bilder der Experimental- und der Kontrollgruppe wurden von einer Person einmal ausgewertet. Dabei wurden die Parameter Rissanzahl pro Präparat und die Risslänge ermittelt. Die entsprechenden Werte wurden in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Excel® 2007 Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) übertragen.

2.11 Herstellung der REM-Präparate

Für die Ansicht unter dem REM mussten die Knochenscheiben der Experimentalgruppe und der Kontrollgruppe gesputtert werden, so entstand die Gruppe REM-F aus der Experimentalgruppe LM-F und REM-0 aus der Kontrollgruppe LM-0. Dazu trockneten die Knochenscheiben zunächst für eine Woche bei Zimmertemperatur. Darauf folgte das Sputtern. Bei diesem Vorgang wurden die Präparate auf REM-Probentellern mit Leitsilber befestigt (siehe Abbildung 9) und in einem Sputter (Modell SCD 500, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein) im Hochvakuum mit einer 15µm dicken Goldschicht bedampft.

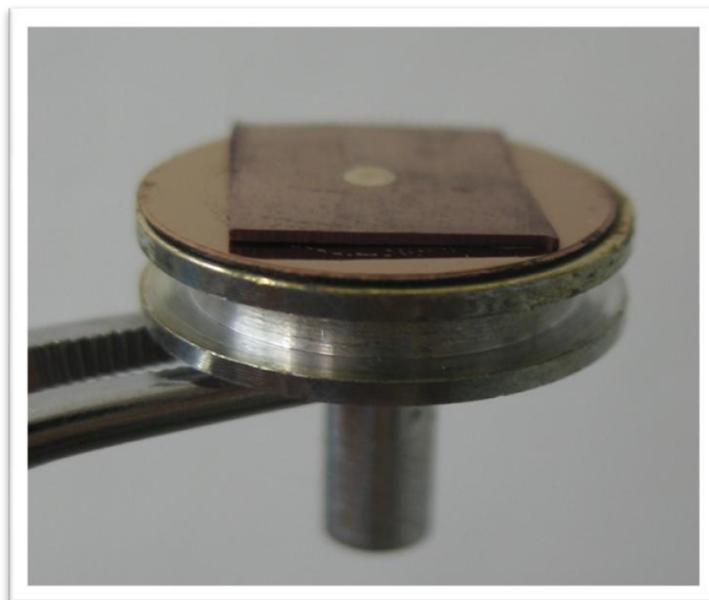


Abbildung 9: Gesputtertes REM-Präparat auf dem Probenteller.

2.12 Statistik

Die LM- und REM-Bilder wurden mit Hilfe derselben Software (Motic images 2.0 ML, Motic China Group) ausgewertet, um gleiche Voraussetzungen bei der Erfassung der Risse zu gewährleisten. Mit diesem Programm war es möglich, die Risse manuell zu markieren und die Risslänge und Rissanzahl zu erfassen und im Anschluss in eine Tabelle einzupflegen.

In einer deskriptiven Statistik wurden anschließend die Ergebnisse hinsichtlich der Rissanzahl, der Risssumme sowie der durchschnittlicher Risslänge und dem längsten Riss untersucht und ein statistischer Vergleich der Messreihen durch einen t-test auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ durchgeführt. Die Normalverteilung der Werte wurde anhand des Kolmogorow-Smirnow-Tests überprüft.

Eine Messfehleranalyse wurde bei den gefärbten, unter dem LM ausgewerteten Präparaten durchgeführt. Dazu wertete ein Untersucher fünf Präparate der Experimentalgruppe fünfmal aus. Diese fünf Bilder pro Präparat wurden mit Adobe Photoshop (Adobe® Photoshop CS4 extended, Version 11.0.2, Stadt, Land) geöffnet und es wurde eine zusätzliche Ebene eingefügt auf der die eingezeichneten Risse markiert wurden. Diese Ebene konnte von einem Präparatfoto auf das Andere übertragen werden um herauszubekommen, ob es sich um den gleichen oder einen zusätzlichen Riss handelt. Ein etwaiger neuer Riss wurde mit einer neuen Farbe markiert.

3 Ergebnisse

Alle Präparate sind auf die im Kapitel „Material und Methoden“ beschriebene Art und Weise verarbeitet und den verschiedenen Untersuchungsmethoden zugeführt worden. Dabei wurden keine vorzeitigen Schraubenverluste oder Verfahrensfehler registriert. Nachfolgend sind die Ergebnisse der Vorversuche, sowie der lichtmikroskopischen und rasterelektronenmikroskopischen Analyse aufgeführt.

3.1 Ergebnisse der Vorversuche

Das Ziel der Vorversuche war es, eine Färbemethodik zu erhalten, die Risse für eine Auswertung unter dem LM optimal darstellt. Dazu wurden fünf Färbereien (F1 bis F5) angefertigt.

3.1.1 Erste und zweite Färbereihe

Bei der ersten Färbereihe F1 fand keine Penetration in die Tiefe statt. Bei der zweiten Färbereihe F2 wurde daher die Konzentration von B.F. in der Färbelösung von 0,5% auf 1% gesteigert und die Färbedauer heraufgesetzt. Die Färbung der Blöcke war jetzt zwar vollständig, in ihrer Intensität jedoch zu stark (siehe Abbildung 10).

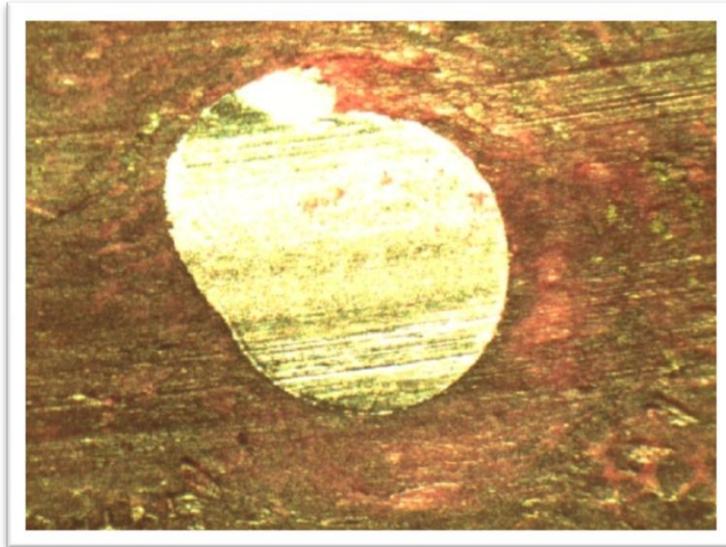


Abbildung 10: Intensiv gefärbtes Präparat aus der zweiten Färbereihe (40 x Vergrößerung). Zentral ein Querschnitt des Thomas Pins® mit dem Knochen zirkulär.

3.1.2 Dritte Färbereihe

Bei der dritten Färbereihe F3 wurde im Gegensatz zu den beiden vorherigen ohne Vakuum gefärbt. Ein Teil der Proben wurde mit Glutaraldehyd fixiert, der andere Teil mit Alkohol. Die Fixierung mit Alkohol brachte im Vergleich zu Glutaraldehyd eine deutliche Besserung der Färbung. Die mit Glutaraldehyd fixierten Proben zeigten eine schlechtere Detailwiedergabe und die Knochenstruktur wirkte blasig (siehe Abbildung 11). In Bezug auf die Eindringtiefe und Sättigung waren keine Unterschiede auszumachen. Der Verzicht auf Vakuum hatte keinen negativen Einfluss auf die Färbung.

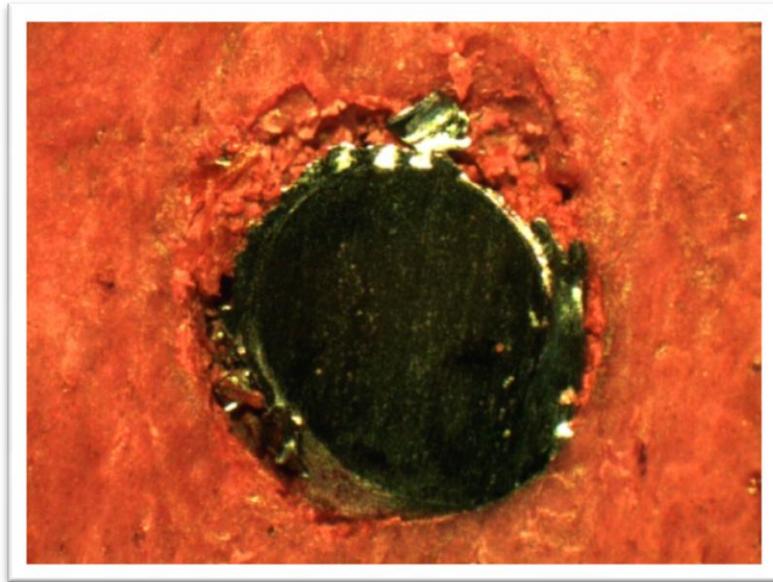


Abbildung 11: Präparat aus der dritten Färbereihe in Alkohol fixiert ohne Vakuum (40 x Vergrößerung). Zirkulär um die Schraube sind die Defekte vor allem im oberen Bereich als blasige Auftreibungen zu erkennen.

3.1.3 Vierte Färbereihe

Bei der vierten Färbereihe wurde eine modifizierte Färbemethode angewandt (siehe Kapitel 2.5.4). Die Gruppe gefärbt mit 1%igem B.F. zeigte eine zu starke Intensität (siehe Abbildung 12). Durch die Überfärbung war auch die Strukturwiedergabe stark herabgesetzt. Bessere Ergebnisse lieferte hingegen die Färbung mit 0,5%igem B.F. In Abhängigkeit von der Färbedauer erhöhte sich auch die Färbintensität. In Bezug auf die Farbintensität stellten sich die Bilder, die 12 Stunden gefärbt wurden am besten dar.

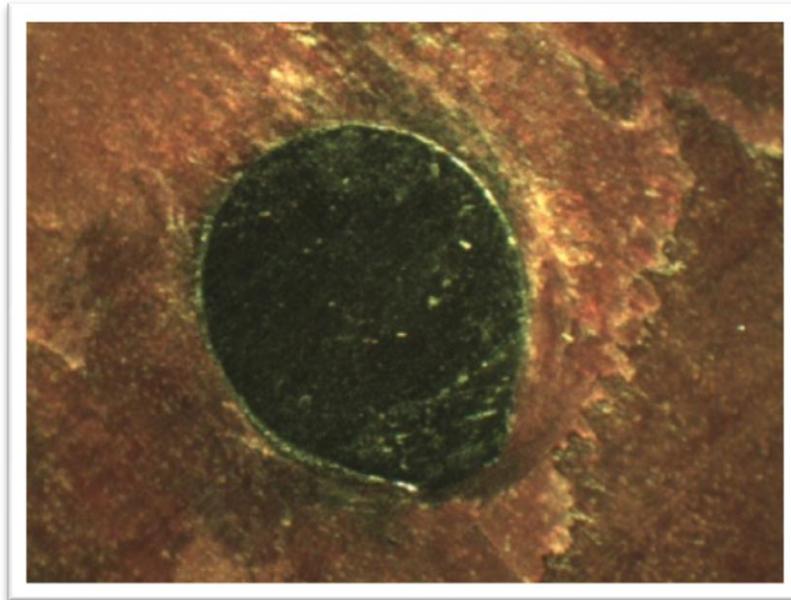


Abbildung 12: Präparat aus der vierten Färbereihe 12 Stunden gefärbt (40 x Vergrößerung). Der Knochen ist sehr intensiv gefärbt. Etwaige Risse sind nicht von dem zirkulären Knochen abzugrenzen.

3.1.4 Fünfte Färbereihe

In der fünften Färbereihe F5 wurde nur noch 0,5%iges B.F. verwendet. Im zweiten Färbeschritt wurden die Proben unterschiedlich lange gefärbt. Wie den folgenden Bildern zu entnehmen ist, führte dies zu unterschiedlichen Färbeintensitäten (siehe Abbildung 13 bis 16). Das sechs Stunden gefärbte Präparat (siehe Abbildung 13) war noch sehr blass und unvollständig vom Farbstoff penetriert. Die 18 und 24 Stunden gefärbten Präparate (Abbildung 15 und 16) waren intensiver gefärbt, als das 12 Stunden gefärbte Präparat (siehe Abbildung 14). Die längere Färbedauer führte jedoch nicht zu einer besseren Darstellung der Bezirke zirkulär um die Schraube. Details waren hier schlechter abgebildet, da kleine Differenzen in dem Knochen nicht mehr zu erkennen waren.

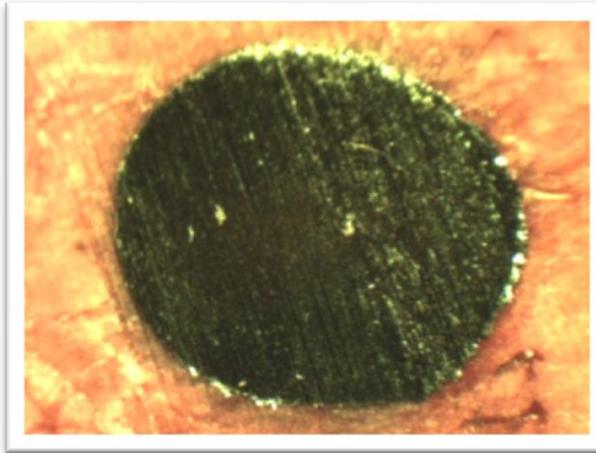


Abbildung 13: Fünfte Färbelösung 6h gefärbt.

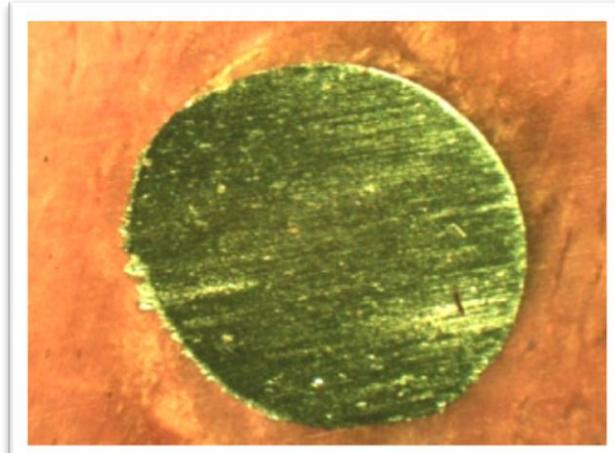


Abbildung 14: Fünfte Färbelösung 12h gefärbt.

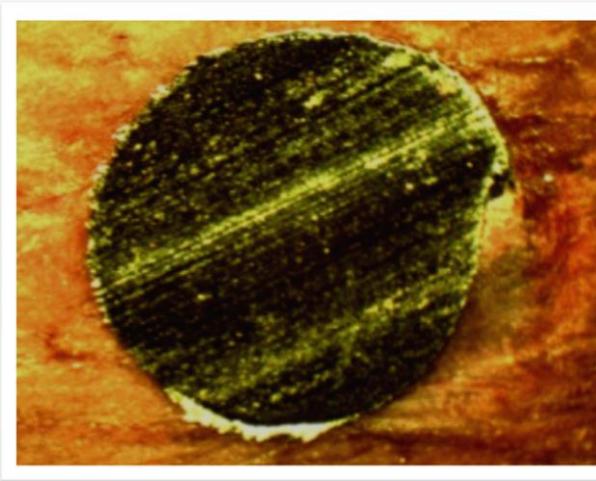


Abbildung 15: Fünfte Färbelösung 18h gefärbt.

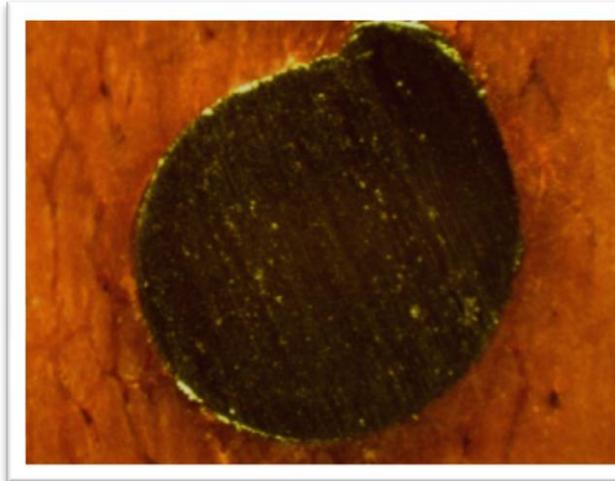


Abbildung 16: Fünfte Färbelösung 24h gefärbt.

3.2 Definitive Färbereihe

Da sich bei dem Vergleich der zweiten und dritten Färbereihe keine Verschlechterung der Färbequalität zeigte, wurde in der definitiven Färbereihe LM-F nicht mit Vakuum gefärbt. In der ersten Färbereihe gelang bei einer Färbedauer von sechsmal einer halben Stunde mit B.F. keine Penetration des Farbstoffes in die Tiefe. Ab der vierten Färbereihe wurde auf die Reihe der aufsteigenden Alkoholkonzentrationen von je einer halben Stunde zu Beginn der Färbung verzichtet, da ausgeschlossen werden konnte, dass in diesem Zeitraum der Knochenblock

vollständig von Alkohol penetriert wird. Ein Vergleich der Färbereihen F3.2 und F5 lieferte die Entscheidung über die definitive Färbedauer und Methode. Die Strukturwiedergabe und Intensität waren in der Färbung F3.2 besser, so dass sie die Grundlage für die Färbung der Experimentalgruppe darstellte. Im Gegensatz zu der Färbung F3.2 wurden die Proben nicht mit Alkohollösungen auf die Färbung vorbereitet und es fand keine extra Fixierung statt.

3.2.1 Allgemeine Beobachtungen bei ungefärbten Präparaten

Lichtmikroskopisch zeichneten sich die ungefärbten Präparate durch einen geringen Kontrast und eine spärliche Detailwiedergabe aus. Die Bestimmung von Bereichen intakter Knochenstruktur, die bei der Schraubeninsertion nicht tangiert werden, viel schwer. Im Randbereich der Schraube ließen sich zentrifugal von der Schraube ausstrahlende Aufhellungen, sowie wolkig dunkel veränderte Bereiche ausmachen (siehe Abbildung 17). Im Vergleich dazu zeigten die REM-Bilder eine sehr gute Detailwiedergabe. Bereits in der Übersicht waren die vorhandenen Strukturen, Schraube, Riss und Knochen deformation deutlich voneinander abzugrenzen (siehe Abbildung 18). Eine weitere Vergrößerung der interessanten Bereiche zeigte, wie unterschiedlich der Knochen auf die Schraubeninsertion reagiert hatte.

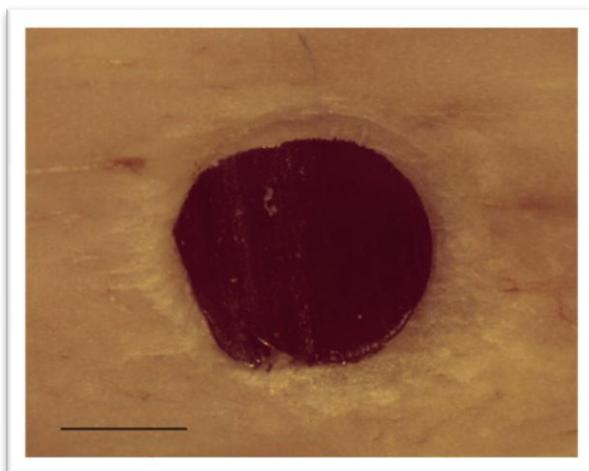


Abbildung 17: Ungefärbtes Präparat unter LM (40 x Vergrößerung).

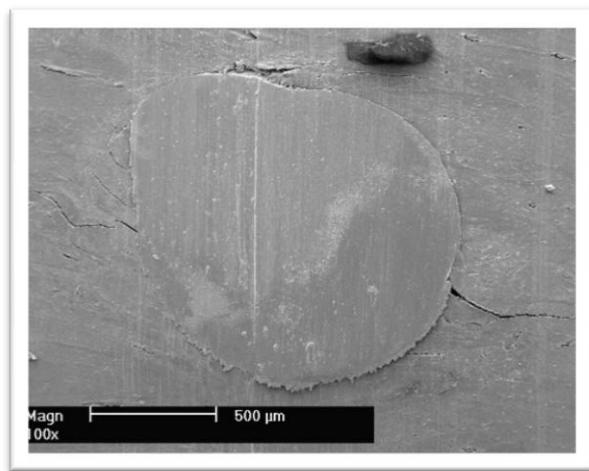


Abbildung 18: Ungefärbtes Präparat unter REM (100 x Vergrößerung).

So zeigt die Abbildung 20 einen eindeutigen Riss. In Abbildung 19 wird ein diffuser Schaden deutlich, bei dem die Knochenoberfläche durch die Schraubeninsertion aufgeworfen wurde.

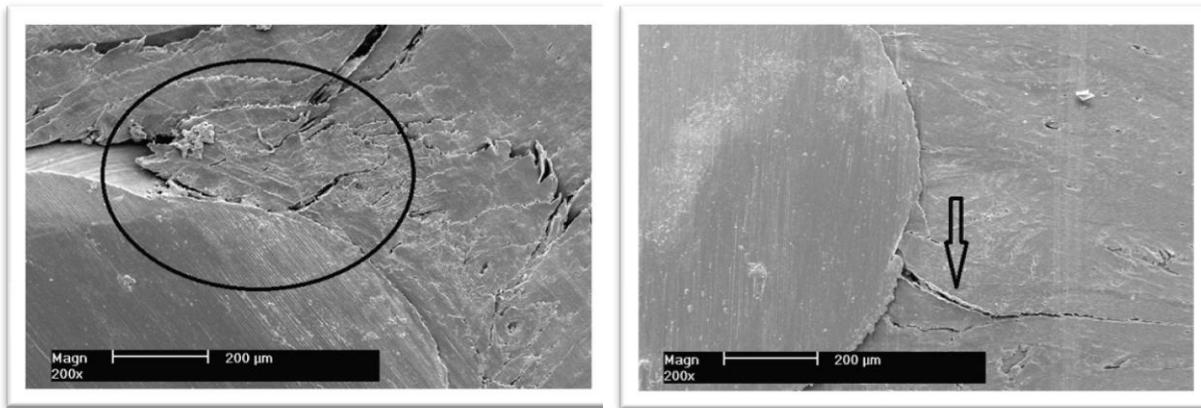


Abbildung 19: Ungefärbtes Präparat unter REM (200 x Vergrößerung) Schaden im Kreis markiert. **Abbildung 20:** Ungefärbtes Präparat unter REM (200 x Vergrößerung) Riss mit Pfeil markiert.

3.2.2 Allgemeine Beobachtungen bei gefärbten Präparaten

Die gefärbten Präparate zeigten unter dem Lichtmikroskop gut abgrenzbare Strukturen. Es waren sehr gut angefärbte und weniger intensiv gefärbte Bereiche zu sehen. Risse stellten sich als dunkelrote Linien dar, die an der Schraube entsprangen und zentrifugal ausliefen. In Abbildung 21 sind zwei solcher Risse deutlich erkennbar.

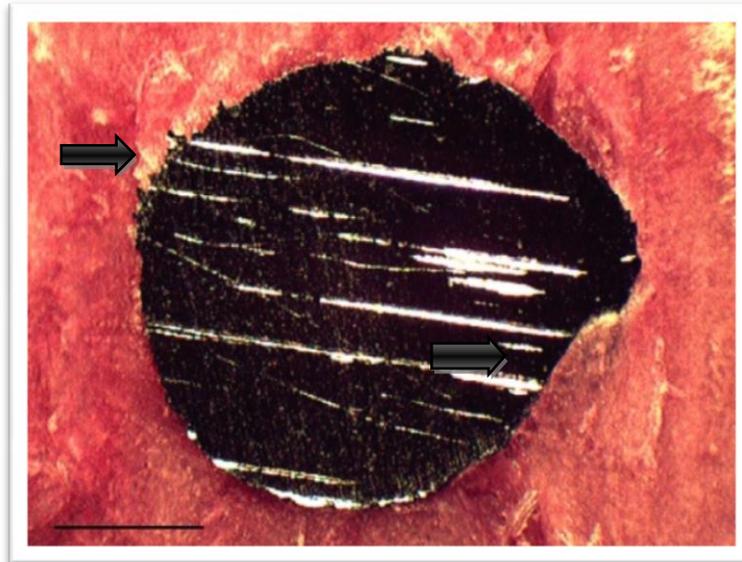


Abbildung 21: Gefärbtes Präparat unter LM mit markierten Rissen (40 x Vergrößerung).

Im REM waren bei 50-facher Vergrößerung größere Risse bereits deutlich zu erkennen (siehe Abbildung 22). Bei 200-facher Vergrößerung ließen sich auch feinste Frakturlinien im Knochen ausmachen (siehe Abbildung 23).

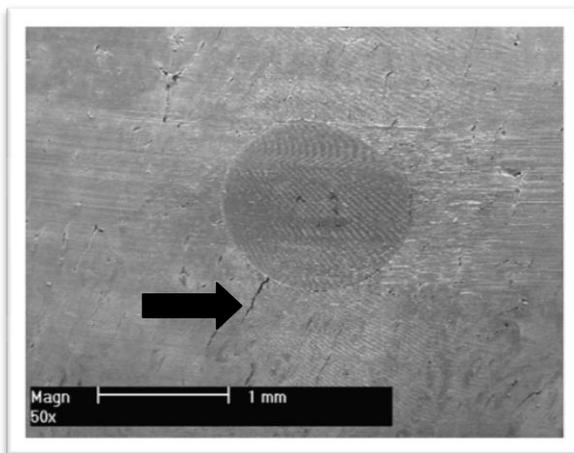


Abbildung 22: Gefärbtes Präparat unter REM (50 x Vergrößerung) Riss mit Pfeil markiert.

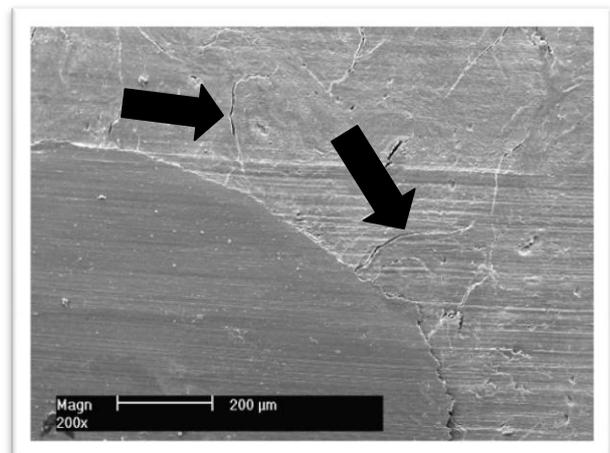


Abbildung 23: Gefärbtes Präparat unter REM (200 x Vergrößerung) Risse mit Pfeilen markiert.

Bei dem Vergleich der gefärbten Präparate mit der ungefärbten Kontrollgruppe fällt unter dem LM und REM folgendes auf: Nach dem Vorgang des Sputterns ist bei den REM-Präparaten nicht mehr zu unterscheiden, ob sie zuvor gefärbt worden sind (siehe Abbildung 24 und 25).

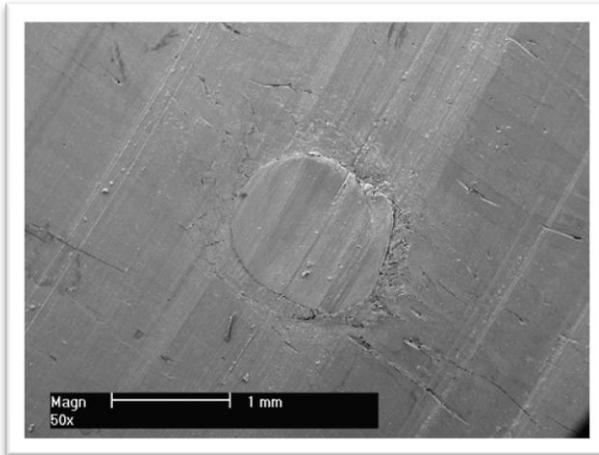


Abbildung 24: Ungefärbtes Präparat unter dem REM (50 x Vergrößerung).

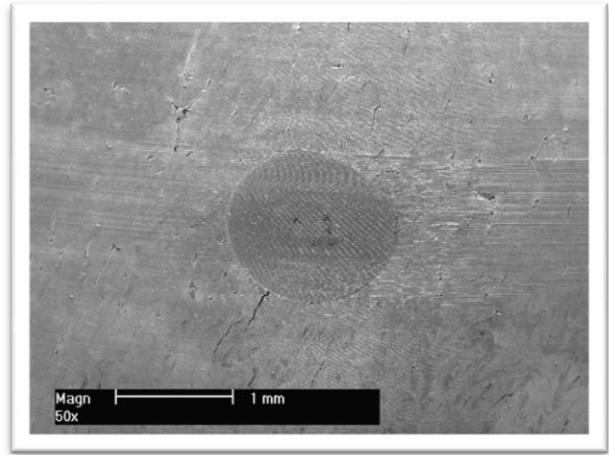


Abbildung 25: Gefärbtes Präparat unter dem REM (50 x Vergrößerung).

Die LM-Präparatgruppen sind hingegen klar voneinander abzugrenzen. Das Präparat aus der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 26) ist deutlich blasser und erscheint weniger detailreich, als das der Experimentalgruppe (siehe Abbildung 27). Das gefärbte Präparat ist eindeutig als gefärbt zu identifizieren. Auf beiden ist klar die Kontur der Minischraube zu erkennen. Die Struktur des Knochens ist im ungefärbten Präparat kaum zu erkennen.

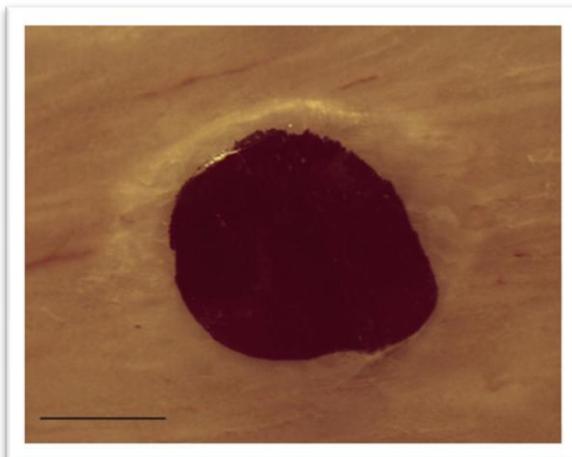


Abbildung 26: Präparat aus der Kontrollgruppe (40 x Vergrößerung).

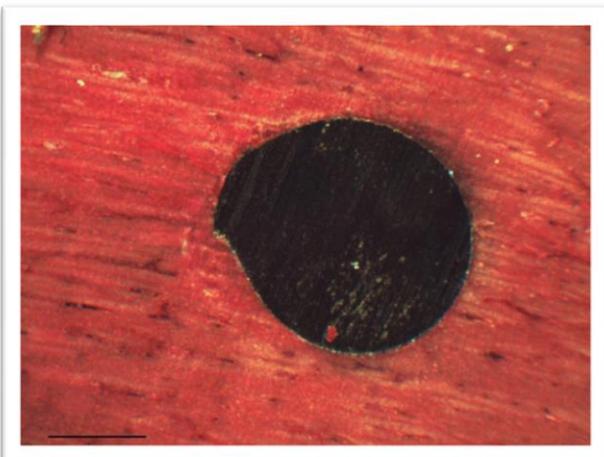


Abbildung 27: Präparat aus der Experimentalgruppe (40 x Vergrößerung).

3.3 Methodische Auswertung

3.3.1 Messfehleranalyse

Die Überprüfung der Messwerte auf Normalverteilung wurde durch den Kolmogorow-Smirnow Test bestätigt (siehe Tabelle 9).

Die Ergebnisse der zwei Auswerter zeigen, dass alle Messreihen bei einem Signifikanzniveau von 5% nicht signifikant verschieden sind (siehe Tabelle 8). Bis auf wenige Ausnahmen wurden die Risse bei der Wiederholungsmessung zu 100% wiedererkannt. Der Mittelwert der Wiedererkennung liegt bei 89%. Die Ergebnisse der Wiederholungsmessung bestätigen demnach, dass die Messwerte reproduzierbar sind. Die statistische Auswertung zeigt gleiche p-Werte in Bezug auf den längsten Riss, die Risssumme (Summe der Risslängen), die Rissanzahl und die durchschnittliche Risslänge. Aus diesem Grund fließen im weiteren Verlauf nur die Werte von Behandler 1 in die Statistik ein.

	Behandler	N	MW	SD	SEM	T	Sig.
längster Riss	1	15	587,55	145,54	37,58	-1,639	0,112
	2	15	707,29	242,65	62,65		
Risssumme	1	15	1609,55	546,30	141,05	-,074	0,942
	2	15	1623,65	500,50	129,23		
Rissanzahl	1	15	3,60	0,74	0,19	1,206	0,238
	2	15	3,30	0,62	0,16		
Risslänge	1	15	436,67	79,53	20,53	-1,545	0,134
	2	15	497,67	130,65	33,73		

Tabelle 8: Wiederholungsmessung der LM-Präparate durch 2 Behandler mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwertes (SEM), t-statistik (T) und p-Wert (Sig) für Signifikanzniveau von 5%.

3.3.2 Vergleich durch Beschreibung der Verfahren

3.3.2.1 Anzahl von Rissen

Bei der Kontrollgruppe traten bei den lichtmikroskopisch ausgewerteten Präparaten durchschnittlich zwei, maximal fünf und minimal ein Riss auf. Bei den gefärbten Präparaten wurden zwischen zwei und fünf, im Mittel vier Risse erkannt. Die Auswertung der REM-Präparate zeigt, dass bei den REM-F Präparaten eine mittlere Anzahl von sechs Rissen auftrat, wobei das Maximum bei zehn und das Minimum bei drei Rissen lag. Bei den REM-0 Präparaten lag die Rissanzahl zwischen zwei und neun, im Durchschnitt bei fünf Rissen.

Anzahl	LM-F	REM-F	LM-0	REM-0
Mittelwert	4	6	2	5
Minimum	2	3	1	2
Maximum	5	10	5	9

Tabelle 9: Rissanzahl in Abhängigkeit von der Färbemethode mit Mittelwert, Minimum bzw. Maximum.

LM-0: Kontrollgruppe unter dem LM ausgewertet

REM-0: Kontrollgruppe unter dem REM ausgewertet

LM-F: Experimentalgruppe unter dem LM ausgewertet

REM-F: Experimentalgruppe unter dem REM ausgewertet

3.3.2.2 Längster Riss pro Präparat

Die Risslängen erstreckten sich bei den LM-F Präparaten von 314,48µm bis zu 1136,86µm, der Mittelwert betrug 711,51µm. In der Gruppe LM-0 lagen die Werte zwischen 290,30µm und 541,38µm, im Mittel bei 446,28µm. Die längsten Risse betrug bei den REM-F-Präparaten zwischen 272,40µm und 769,30µm. Der Mittelwert belief sich auf 450,06µm. Die längsten Risse der REM-0 Präparate lagen im Mittel bei 362,46µm. Der kürzeste Riss maß hier 133,87µm und der längste 524,61µm.

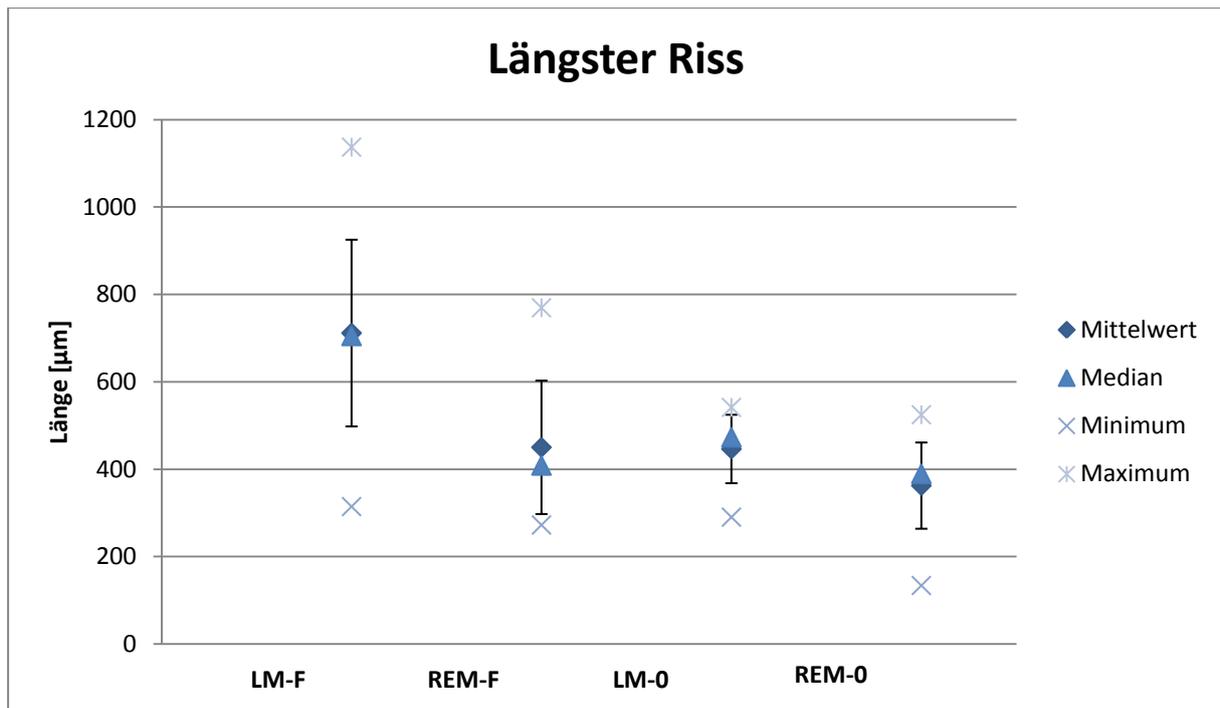


Abbildung 28: Längster Riss in Abhängigkeit von der Färbemethode mit Mittelwert, Median, Standardabweichung und Minimum bzw. Maximum.

LM-0: Kontrollgruppe unter dem LM ausgewertet

REM-0: Kontrollgruppe unter dem REM ausgewertet

LM-F: Experimentalgruppe unter dem LM ausgewertet

REM-F: Experimentalgruppe unter dem REM ausgewertet

3.3.2.3 Risssumme

Die Risssumme ist definiert als die Summe aller Risslängen pro Präparat. Sie nahm bei den LM-F Präparaten Werte von 562,64µm bis 3272,08µm an und betrug im Durchschnitt 1917,32µm. Bei den LM-0 Präparaten lagen die Werte zwischen 383,64µm und 1365,94µm, im Mittel bei 769,30µm.

Unter dem REM beliefen sich die Risssummen für die REM-F Präparate auf minimal 652,64µm und maximal 2784,33µm. Der Durchschnitt betrug hier 1595,05µm. Bei den REM-0 Präparaten lag der Mittelwert bei 1774,70µm, die kleinste Risssumme betrug 267,74µm und die größte 2772,02µm.

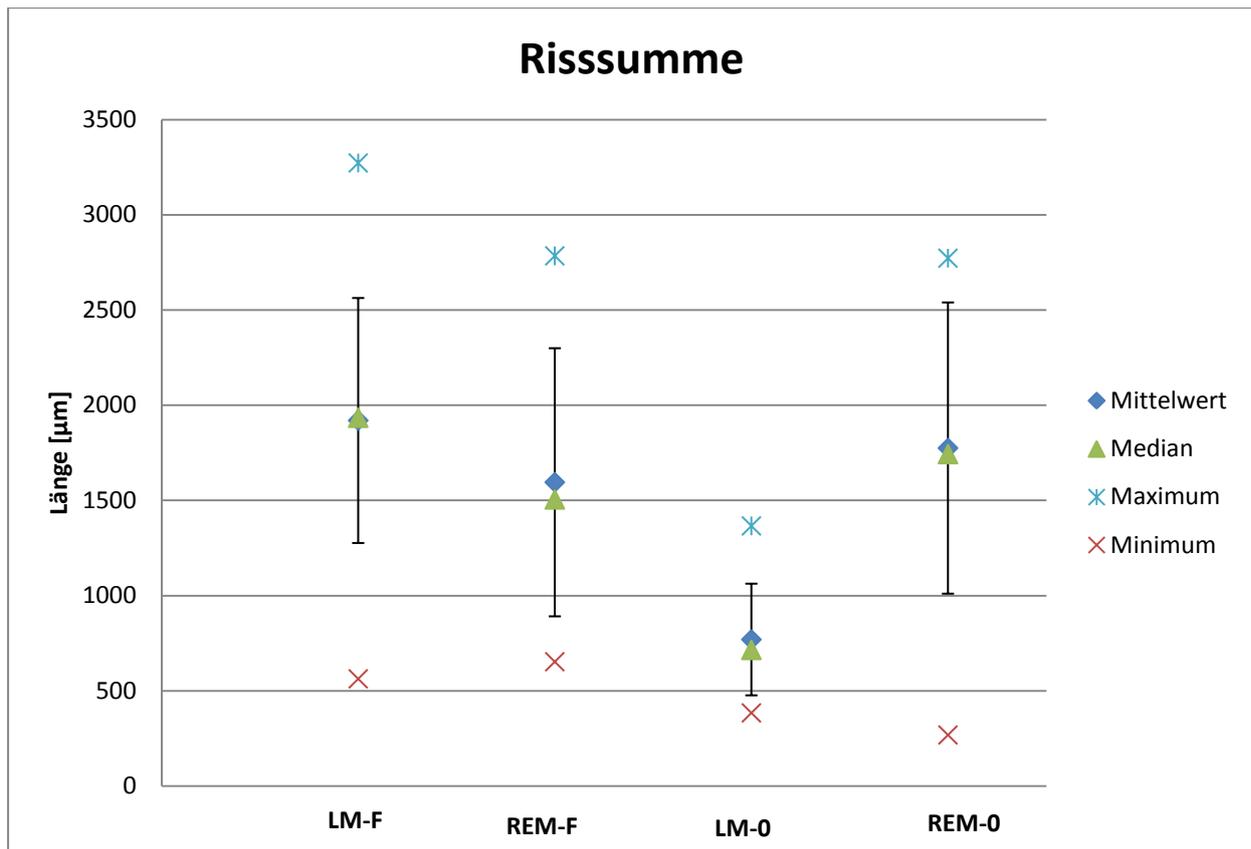


Abbildung 29: Risssumme in Abhängigkeit von der Färbemethode mit Mittelwert, Median, Standardabweichung, Minimum bzw. Maximum.

LM-0: Kontrollgruppe unter dem LM ausgewertet

REM-0: Kontrollgruppe unter dem REM ausgewertet

LM-F: Experimentalgruppe unter dem LM ausgewertet

REM-F: Experimentalgruppe unter dem REM ausgewertet

3.3.2.4 Durchschnittliche Risslänge

Die durchschnittliche Risslänge ergab bei den LM-F Präparaten Werte von 281,32 μm bis 818,02 μm . Der Mittelwert betrug 525,50 μm . Die LM-0 Präparate zeigten hier Maxima zwischen 207,86 μm und 541,38 μm und eine durchschnittliche Risslänge von 382,30 μm . Unter dem REM beliefen sich die Werte bei den gefärbten Objekten von 156,44 μm bis 438,09 μm . Bei den ungefärbten Präparaten lagen sie zwischen 133,87 μm und 524,61 μm . Die durchschnittliche Risslänge unter den REM-Präparaten betrug bei den gefärbten Präparaten 250,35 μm und bei den ungefärbten 362,46 μm .

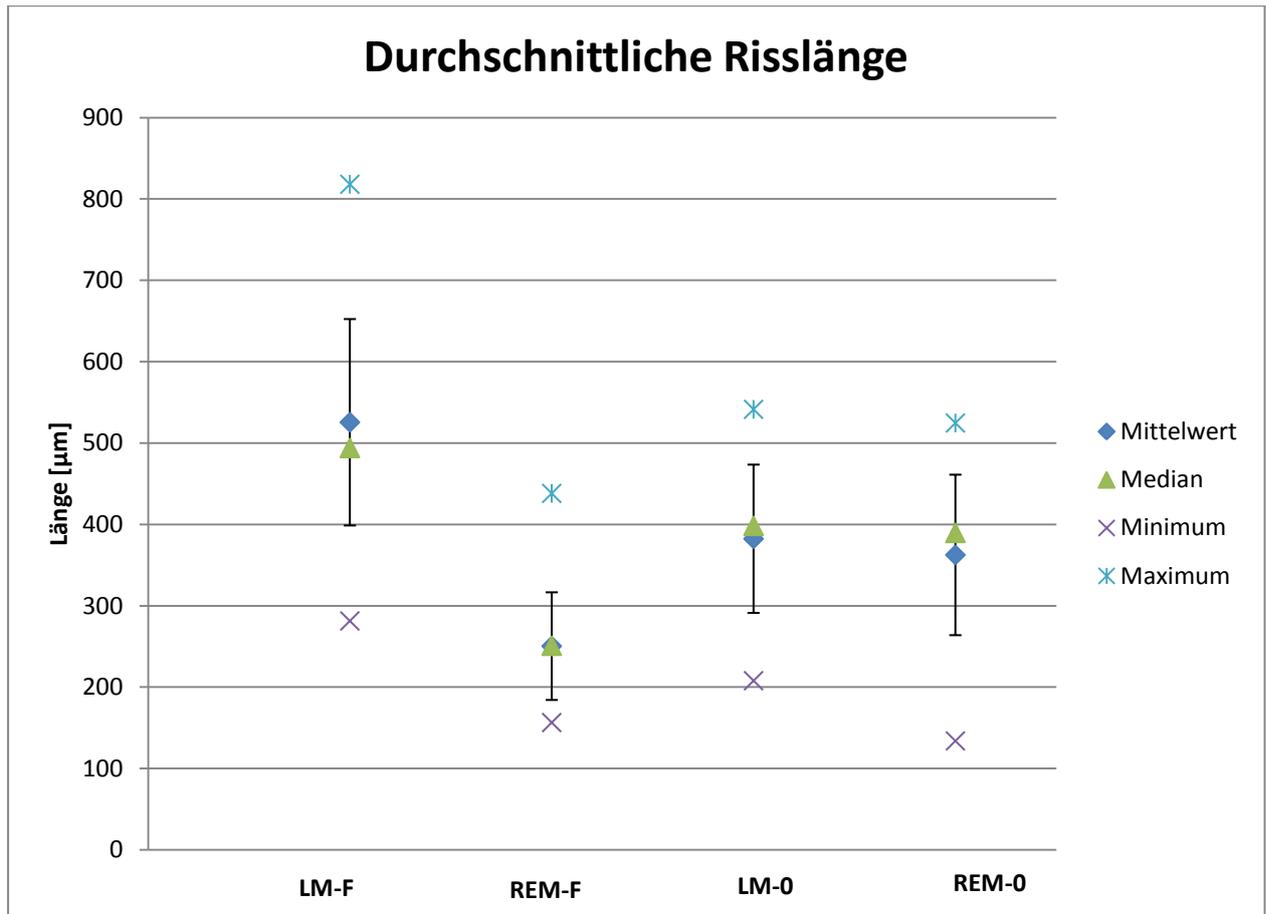


Abbildung 30: Durchschnittliche Risslänge in Abhängigkeit von der Färbemethode mit Mittelwert, Median, Standardabweichung, Minimum bzw. Maximum.
 LM-0: Kontrollgruppe unter dem LM ausgewertet
 REM-0: Kontrollgruppe unter dem REM ausgewertet
 LM-F: Experimentalgruppe unter dem LM ausgewertet
 REM-F: Experimentalgruppe unter dem REM ausgewertet

3.3.3 Vergleich der vier Methoden

Der t-test zeigt, dass die Ergebnisse aller vier Methoden signifikant verschieden sind (siehe Tabelle 12). Dies wird auch durch die Mittelwerte aller 15 Präparate bezüglich Rissanzahl, Risslänge, Risssumme und längstem Riss bestätigt. Die Maxima häufen sich nicht in einer bestimmten Gruppe und es gibt keine eindeutige Reihenfolge der vier Präparategruppen bezüglich der genannten Faktoren.

Die Gruppe LM-0 zeigt die geringste Rissanzahl und die geringste Risssumme. Bezüglich der durchschnittlichen Risslänge zeigen die LM-Gruppen größere Werte (LM-F: 525,50μm und

LM-0: 382,3 μ m), als die REM-Gruppen (REM-0: 362,46 μ m und REM-F: 250,35 μ m). Die Rissanzahl ist bei den REM-Gruppen (REM-F: 6 und REM-0: 5) größer, als bei den LM-Gruppen (LM-F: 4 und LM-0: 2).

Die größten Werte bei den Parametern längster Riss, Risssumme und durchschnittliche Risslänge sind in der Gruppe LM-F zu finden. Der längste Riss misst (711,51 μ m), gefolgt von REM-F (450,06 μ m), LM-0 (446,28 μ m) und REM-0 (362,46 μ m). Die größte Risssumme beträgt bei den LM-F Präparaten 1919,55 μ m. Darauf schließen sich die Gruppen REM-0 (1774,77 μ m), REM-F (1595,05 μ m) und LM-0 (508,91 μ m) an.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit ist der qualitative und quantitative in vitro Nachweis von Mikrorissen im Knochen, die bei Insertion von Minischrauben entstehen. Durch einen Vergleich zwischen der lichtmikroskopischen und rasterelektronenmikroskopischen Darstellung sollen Möglichkeiten und Grenzen beider Verfahren aufgezeigt werden. Bezüglich der lichtmikroskopischen Untersuchung soll durch die Gegenüberstellung verschiedener Methoden die optimale Färbung für das Aufzeigen von Mikrorissen herausgefiltert werden.

Der wichtigste Aspekt bei der Auswahl des verwendeten Knochenmaterials war eine möglichst große Ähnlichkeit mit dem menschlichen Unterkiefer. Da der Unterkiefer immer als Teil des gesamten stomatognathen Systems anzusehen ist, wurde auch in dieser Hinsicht auf ähnliche funktionelle Belastung geachtet. Bezüglich des morphologischen Knochenaufbaus galten detaillierte Auswahlkriterien. So variiert die Schichtstärke der Kompakta einer menschlichen Mandibula zwischen 0,5mm und 3mm [38-40]. Diese Stärke sollte bei den ausgewählten Knochenpräparaten wiederzufinden sein.

In Anlehnung an verschiedene Studien, die mit tierischen Knochenpräparaten experimentierten, wurde in dieser Studie Schafsknochen als Studienmodell benutzt. So untersuchte eine Gruppe um Trisi mit Hilfe eines Knochenpräparates vom Schaf den Effekt vom Drehmoment bei Implantation in Knochen [41], während eine weitere Arbeit sich mit der Sofortimplantation nach Zahnextraktion befusste [42].

Das Alter der Schafe, die dieser Arbeit als Knochenspender dienten, betrug mindestens vier Jahre. So konnte sichergestellt werden, dass der Zahnwechsel bereits abgeschlossen und somit ein permanentes Gebiss vorzufinden war [43].

Das Knochenmaterial wurde für die Versuche unmittelbar vor der Präparatherstellung von einer Schlachtereier abgeholt und in einer Pufferlösung gelagert, um Zerfallsprozesse zu vermeiden und einen unverfälschten Knochen als Grundlage für die Knochenblöcke zu besitzen [44].

Nach Herstellung der Knochenblöcke und Schraubeninsertion wurden die Blöcke zunächst gefärbt. Das Sägen in Knochenscheiben erfolgte absichtlich erst nach der Färbung, damit Risse, die durch die Knochenscheibenherstellung entstanden waren, ungefärbt blieben und somit eindeutig als Artefakt gewertet werden konnten.

Dieser Vorteil, dass die Risse bestimmten Arbeitsschritten zugeordnet werden konnten, besteht nur für die lichtmikroskopisch untersuchten Präparate. Die rasterelektronenmikroskopischen Präparate wurden erst im Anschluss an die lichtmikroskopischen Versuche hergestellt. So sind Schäden, die während des Sägens aufgetreten sind mit in die rasterelektronenmikroskopische Auswertung eingegangen.

Auf eine vorherige Einbettung der nativen Knochenproben in Kunststoff musste verzichtet werden, da eine Analyse der Risse unter dem REM, nachdem diese durch den Kunststoff verschlossen worden wären, unmöglich gewesen wäre.

Eine große Anzahl von Studien diskutiert die Insertionstechnik von kieferorthopädischen und dentalen Implantaten. Dabei wurde unter anderem die Insertionsgeschwindigkeit untersucht. Mehrere Autoren [38-39, 41] kamen zu dem Ergebnis, dass ab einer Temperatur von 47°C mit einer Knochennekrose zu rechnen ist. Um hitzebedingte Knochennekrosen zu vermeiden, wurden die Minischrauben in dieser Studie daher mittels eines niedertourigen Winkelstücks mit einer Laufgeschwindigkeit von max. 1500rpm inseriert. Ebenfalls wurde während des Sägens der Knochenblöcke und der Insertion der Minischraube in den Knochen auf eine genügende Wasserkühlung geachtet.

Hinsichtlich der lichtmikroskopischen Analysen spielt die Auswahl des Farbstoffes in dieser Arbeit eine zentrale Rolle. In der Literatur werden verschiedene Farbstoffe beschrieben, die bei der Färbung von Knochenpräparaten Anwendung finden.

In einigen Studien wurde basisches Fuchsin verwendet [28, 45-46]. Reifes und mineralisiertes Knochengewebe bleibt bei dieser Färbung weitestgehend ungefärbt. Rot angefärbt werden Osteoid, nicht völlig mineralisiertes Knochengewebe und Hohlräume.

Den Autoren war es mit dieser Methodik gelungen, Mikrotraumen in Form von Rissen, die auf Grund von Osteoporose entstanden sind, lichtmikroskopisch darzustellen.

Ebenfalls fand diese Färbung Anwendung bei Dünnschliffpräparaten zur Darstellung von Hohlräumen [47]. Daher orientierte sich sowohl der in der vorliegenden Studie angewandte Farbstoff, als auch die Färbetechnik an diesen Arbeiten.

Das Färbeprotokoll konnte jedoch nicht vollständig übernommen werden, da sowohl die Färbelösungskonzentration, als auch die Färbedauer auf die verwendeten Knochenblöcke abgestimmt werden mussten. So waren Vorversuche nötig um Färbedauer, Konzentration der Färbelösung und die Technik anzupassen.

Ein Ergebnis der Vorversuche ist, dass Färben im Vakuum keinen positiven Effekt hat. Diese Erkenntnis spiegelt sich auch in der Literatur wieder [35]. Einige Autoren favorisierten die

Präparate während des Färbeprozesses zu trocknen und später zu rehydrieren [32]. In den vorliegenden Versuchen wurde damit kein Vorteil erzielt.

Die Kernfrage dieser Studie ist, ob Mikrorisse, die bei der Insertion von Minischrauben entstanden sind, lichtmikroskopisch darstellbar sind. Weiter interessiert, ob die lichtmikroskopische Auswertung gegenüber der etablierten rasterelektronenmikroskopischen Auswertung Vorteile bringt.

Hierzu wurden vier Messreihen angelegt. Zur Vereinfachung werden sie im Folgenden LM-0, LM-F, REM-0 und REM-F bezeichnet. LM-0 steht für die Kontrollgruppe, welche die Präparate enthält, die unter dem Lichtmikroskop ungefärbt untersucht wurden. Die zweite Gruppe LM-F beinhaltet die Experimentalgruppe, die nach Färbung unter dem Lichtmikroskop untersucht wurde. Die Gruppe REM-0 beinhaltet die ungefärbten Präparate, die nach der Ansicht unter dem Lichtmikroskop auch unter dem REM untersucht wurden. REM-F ist dementsprechend die Präparatengruppe, die aus den gefärbten Präparaten LM-F hervorgeht.

Zur Auswertung wurden die Parameter Rissanzahl pro Präparat, durchschnittliche Risslänge und maximale Risslänge herangezogen.

Vergleicht man die Rissanzahl in den vier Gruppen, so zeichnete sich eine klare Reihenfolge ab. In der Reihe LM-0 waren am wenigsten Risse zu erkennen. Es folgte die Gruppe LM-F und REM-0. Die meisten Risse waren bei REM-F zu finden.

Dass Mikrorisse, die durch die Insertion von Minischrauben in den Knochen entstehen, mit dem Lichtmikroskop zu erkennen sind, ist somit bestätigt.

Es war zu erwarten, dass die Kontrollgruppe LM-0 durchgängig die wenigsten Risse zeigt, da insbesondere dünne Risse ungefärbt im Lichtmikroskop schwer von der gesunden Knochensubstanz abzugrenzen sind.

Die rasterelektronenmikroskopisch untersuchten Gruppen REM-0 und REM-F wiesen mit fünf (REM-0) bzw. sechs (REM-F) Rissen eine ähnliche Rissanzahl auf. Eine Färbung der Präparate vor Herstellung der REM-Präparate hat also zu keinen weiteren Schäden am Knochen geführt. Die Ansicht der Präparate unter dem REM zeigte keine Veränderung der Oberflächen bei den gefärbten Präparaten. Ihre Struktur wurde durch den Färbeprozess somit nicht beeinträchtigt.

Bei der Auswertung unter dem REM wurden deutlich mehr Risse erkannt, im Durchschnitt sechs, als unter dem LM mit drei Rissen. Diese Differenz basiert auf den technischen Eigenschaften der Mikroskope. Wurden die Risse mit dem Rasterelektronenmikroskop mit

50- bis 200-facher Vergrößerung aufgenommen, so waren mit dem verwendeten Auflichtmikroskop lediglich 40-fache Vergrößerungen möglich.

Beim Vergleich der durchschnittlichen Risslängen zeigte sich ein umgekehrtes Ergebnis. Die durchschnittliche Risslänge war bei den REM-Reihen kleiner als bei den LM-Reihen. Eine Begründung ist, dass die kürzeren Risse mit dem Lichtmikroskop gar nicht erkannt wurden und somit aus der Statistik herausfallen.

Bei der Auswertung der maximalen Risslängen sind im Durchschnitt die längsten Risse in der LM-F Reihe zu finden, gefolgt von REM-F, LM-0 und REM-0. Die Werte der längsten Risse sind unter den letzten drei Gruppen ähnlich. Dies ist begründet in der Tatsache, dass in den beiden REM-Gruppen die Risse ganz eindeutig in ihrer Ausdehnung bestimmt werden konnten. Die Gruppe LM-0 fällt ab, da hier die Risse entweder gar nicht, oder nicht in ihrer gesamten Länge erkannt wurden. Die durchschnittliche Summe aller Risse unterstützt diese Vermutung. Auch hier weist die Gruppe LM-0 die kleinsten Werte auf. LM-F zeigt bezüglich des längsten Risses so große Werte, da es schwierig ist den genauen Endpunkt zu bestimmen. Verschiedene Studien die sich mit Mikrotraumen befassten verwendeten zur Darstellung von Mikrotraumen ein Fluoreszenzmikroskop in Kombination mit basischem Fuchsin [28, 33]. Die Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops könnte einen Vorteil gegenüber dem LM bringen und die Abweichung der Ergebnisse zwischen dem REM und LM weiter eingrenzen. Da der fluoreszierende Farbstoff in Rissen und Hohlräumen besser zu erkennen wäre als unter einem Auflichtmikroskop.

Eine Studie, die sich ebenfalls mit der rasterelektronenmikroskopischen Darstellung von Mikrotraumen zirkulär um selbstbohrende Minischrauben befasste, untersuchte zwei selbstbohrende, zylindrische Schraubensysteme. Der Mittelwert der Rissanzahl lag pro Präparat bei 18 [48]. In der vorliegenden Arbeit beträgt der Mittelwert der Rissanzahl bei beiden REM-Reihen zusammen sechs Risse. Auch die Risssumme fällt mit $1700\mu\text{m}$ in der vorliegenden Arbeit kleiner aus, als in der oben genannten Studie mit $3100\mu\text{m}$. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz liegt im Schraubendesign. Die hier verwendeten Minischrauben waren nicht zylindrisch, wie in der Vergleichsarbeit, sondern konisch. Verschiedene Designs üben unterschiedliche Kräfte bei Insertion auf den Knochen aus. Konische Systeme zeigten dabei durchschnittlich eine geringere Knochenschädigung [25, 49].

Ein Nachteil beider Mikroskopieverfahren ist, dass nur der Nachweis von Mikrotraumen in der im Präparat angeschnittenen Schicht erbracht werden kann. Diese Methoden können demnach den qualitativen Nachweis erbringen, dass es Mikrotraumen gibt. Die Gesamtheit

aller Mikrotraumen über die vollständige Länge der Minischraube kann jedoch nicht analysiert werden.

Eine weitere Schwierigkeit stellte die Messung der Risse mittels der verwendeten Methodik/Software dar. Da die Risse manuell markiert wurden, unterlag jede Markierung einer Messungenauigkeit, die vom Untersucher abhängig ist.

Im Rahmen der Wiederholungsmessung konnte eine bedeutsame Messungenauigkeit nicht verifiziert werden. Hier wurde bei der wiederholten Messung des gleichen Risses im vergleichenden t-test kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten festgestellt (vgl. Kapitel 3.3.1).

Bei der Berechnung der mittleren Wiedererkennung bestätigen sich hingegen kleinere Abweichungen. Wenn ein Riss eindeutig als solcher identifiziert würde, läge die Wiedererkennung bei 100%. In den vorliegenden Versuchen liegt sie im Mittel bei 89%.

Ein geübter Auswerter erkennt bei allen Methoden die Anzahl und Länge der Risse mit gleichbleibender Konstanz. Man kann demnach davon ausgehen, dass wenn Risse entstanden sind und diese kenntlich gemacht wurden, diese auch erkannt worden sind.

Neuere Arbeiten befassen sich mit der Auswertung von Mikrotraumen im Knochen mittels Mikro-CT und einem speziellen Kontrastmittel. Dabei konnten Mikrotraumen in vitro nachgewiesen werden. Diese wurden aber nicht zusätzlich histologisch untersucht [50], der histologische Nachweis steht noch aus.

In einer weiteren Arbeit wurde Knochenheilung mittels Mikro-CT und anschließend durch histologische Untersuchungen betrachtet. Dabei konnten durch eine moderne computergestützte Technik die verschiedenen Bestandteile wie mineralisierter Knochen, Knorpel und Bindegewebe voneinander unterschieden werden [51]. Dieses ist ein möglicher Ansatz zur dreidimensionalen Erfassung und computergestützten Auswertung von Mikrotraumen.

Während in der vorliegenden Arbeit die Risse parallel zur Knochenoberfläche untersucht wurden, verglich eine andere Veröffentlichung Mikroschäden um orthodontische Minischrauben in Abhängigkeit von der Insertionstechnik. Dabei wurden die Präparate nicht parallel zur Knochenoberfläche sondern in Längsrichtung parallel zur Schraube angefertigt [49].

Unterschiedliche Autoren haben sich bemüht in ihren Disziplinen Verfahren zur Auswertung zu entwickeln, die manuelle Fehler und die Subjektivität des Auswerters ausschließen. In einer Arbeit um López-López [52] wurde der horizontale Knochenabbau um Zähne im Unterkiefer bei Patienten untersucht. Dabei wurde die manuelle Auswertung mit der

computerunterstützten Auswertung verglichen. Es wurde bewiesen, dass die computerunterstützte Auswertung eine größere Genauigkeit erzielte und besser mit dem intraoral festgestellten Befund übereinstimmte, als bei der manuellen Auswertung.

Computerunterstützte Auswertung fand auch Anwendung zur Erfassung von Mikrorissen. Eine Gruppe um Nagaraja untersuchte die Ursachen von Mikrotraumen im Knochen, wie Dehnung und Spannung, bei jungen Kühen und wertete diese sowohl manuell, als auch über eine computergestützte Methode aus. Das Ergebnis zeigte, dass die computergestützte Auswertung präziser als die manuelle Methode war [53].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Mikrotraumen im Knochen verursacht durch die Insertion von Minischrauben, mit dem Lichtmikroskop darstellbar sind. Beim Auswerten der lichtmikroskopischen Präparate lassen sich Fehler und Ungenauigkeiten jedoch nicht vermeiden, wodurch die Aussagekraft dieses Verfahrens im Vergleich zur REM-Darstellung abfällt.

Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mikrorisse im Knochen, die durch die Insertion von Minischrauben entstanden sind, am besten entsprechend des ermittelten Färbeprotokolls (siehe Kap 2.6) unter der Verwendung von 0,5%igem B.F. angefärbt werden. Diese Mikrorisse konnten unter einem Auflichtmikroskop bei 40-facher Vergrößerung dargestellt und in einer Wiederholungsmessung annähernd zu 100% wiedererkannt.

Der quantitative Vergleich zwischen dem REM, das bereits in verschiedenen Studien zur Auswertung von Mikrotraumen Anwendung fand, und LM zeigt, dass der lichtmikroskopische dem rasterelektronenmikroskopischen Informationswert unterliegt.

Nachteil beider Verfahren ist, dass Mikrorisse nur in einem Schnittbild erfasst werden und durch die manuelle Auswertung Messungenauigkeiten nicht zu vermeiden sind. Daher sollte es das Ziel zukünftiger Studien sein, eine Auswertmöglichkeit zu schaffen, die computerbasiert Mikrorisse erkennt, automatisch markiert und ihre Ausdehnung erfasst. Idealerweise sollte diese Methodik nicht nur in einem Schnittbild analysieren, sondern über eine dreidimensionale Darstellung Defekte zirkulär und über die gesamte Länge der Minischraube erkennen.

5 Zusammenfassung

Kieferorthopädische Minischrauben sind aus der modernen Kieferorthopädie nicht mehr wegzudenken. Die Minischraube bietet dem Kieferorthopäden eine sichere Verankerung für ein breites Therapiespektrum.

Trotz hoher Erfolgsraten gibt es nach wie vor Faktoren, die zu einem frühzeitigen Schraubenverlust führen können. Die Reaktion des Knochens auf die Schraubeninsertion ist daher Gegenstand aktueller Forschung. Durch verschiedene Studien ist bereits belegt, dass die Insertion einer Minischraube Risse im Knochen zirkulär um die Schraube verursacht [28-29]. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob und mit welcher Färbemethode sich diese Risse nachweisen lassen. Ein Vergleich zwischen der Lichtmikroskopie und der Rasterelektronenmikroskopie bringt Aufschluss über die Grenzen dieser Verfahren.

Durch verschiedene Versuchsreihen wurde zunächst die optimale Färbemethode zur Darstellung von ossären Mikrorissen ermittelt: Die Proben wurden über sechs Tage in 0,5%iges Basisches Fuchsin in aufsteigenden Alkoholkonzentrationen, 80%, 90% und 100% eingelegt.

Nach der Insertion von je einer Minischraube in 30 Knochenblöcke wurden 15 dieser Blöcke entsprechend gefärbt. Aus allen 30 Blöcken sind Dünnschliffpräparate hergestellt worden, die zuerst unter einem Auflichtmikroskop und im Anschluss unter einem Rasterelektronenmikroskop ausgewertet worden sind.

Die Analysen bestätigten, dass Mikrorisse um die Schraube unter dem Lichtmikroskop auszumachen sind. Diese Defekte werden in einer Wiederholungsmessung im Mittel zu 89% wiedererkannt. Hinsichtlich der Risslänge ergibt sich eine mittlere Abweichung von 53,35µm. Die Messreihen sind bei einem Signifikanzniveau von 5% gleich. Die angewandte Statistik bestätigt, dass die Werte valide sind.

Der Vergleich zwischen dem Lichtmikroskop und dem Rasterelektronmikroskop zeigt, dass die gefärbten Präparate unter dem LM ähnliche Ergebnisse liefern, wie bei der Auswertung unter dem REM. Ungefärbt werden die Risse unter dem LM nur schlecht erkannt.

Die vorliegende bringt den qualitativen Nachweis, dass Mikrorisse entstanden durch die Insertion von Minischrauben im Knochen lichtmikroskopisch deutlich darstellbar sind. Die reproduzierbare Auswertung von Rissanzahl und Risslänge fällt gegenüber der Rasterelektronenmikroskopie jedoch ab und kann somit nicht empfohlen werden. Die Aufgabe weiterer Forschung sollte sein, computerbasierte Verfahren zur reproduzierbaren Erfassung von Mikrorissen in Knochenpräparaten zu entwickeln.

6 Anhang

Messung/Proben	Kolmogorov-Smirnov	Asymptotische Signifikanz
M1	0,748	0,630
M2	0,630	0,822
M3	0,574	0,897
M4	0,641	0,806
M5	0,695	0,720
M6	0,508	0,959
M7	0,409	0,996
M8	0,423	0,994
M9	0,581	0,888
M10	0,602	0,862
M11	0,742	0,640
M12	0,446	0,989
M13	0,655	0,784
M14	0,681	0,742
M15	0,573	0,898

Tabelle 10: Test auf Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov für jeweils 15 gefärbte und ungefärbte Proben unter REM und LM ($p \geq 0,05$ normalverteilt).

	Wiedererkennung				
Probe	Präparat 1	Präparat 2	Präparat 3	Präparat 4	Präparat 5
1	100%	100%	100%	-	40%
2	100%	100%	100%	80%	100%
3	100%	100%	-	100%	100%
4	100%	-	100%	40%	80%
5	100%	100%		80%	-
6				75%	80%
MW	89%				

Tabelle 11: Wiedererkennung der Risse unter dem LM von fünf Präparaten dreimal ausgewertet (MW = Mittelwert der Wiedererkennung über alle Präparate).

Proben / Messung	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
M1	310835,550	3	103611,850	3,886	,029
M2	175663,050	3	58554,350	3,192	,059
M3	1034632,457	3	344877,486	13,063	,001
M4	309668,417	3	103222,806	5,397	,014
M5	314584,350	3	104861,450	5,022	,013
M6	445464,580	3	148488,193	4,170	,021
M7	69353,730	3	23117,910	2,927	,077
M8	273227,668	3	91075,889	5,479	,013
M9	332817,381	3	110939,127	3,433	,066
M10	101206,702	3	33735,567	2,496	,102
M11	124854,920	3	41618,307	1,577	,234
M12	221686,863	3	73895,621	2,078	,157
M13	161296,627	3	53765,542	1,112	,386
M14	55899,248	3	18633,083	,816	,512
M15	117573,985	3	39191,328	2,039	,152

Tabelle 12: Anova Test auf signifikante Unterschiede für jeweils 15 gefärbte und ungefärbte Proben unter REM und LM (Signifikanzniveau $\alpha=5\%$). Für $p \leq 0,05$ signifikant verschieden.

7 Literaturverzeichnis

1. B. L. Gainsforth D.D.S., M.S.a.L.B.H.B.A., D.D.S., M.S., *A study of orthodontic anchorage possibilities in basal bone*. American Journal of Orthodontics and Oral Surgery, 1945. **31**(8): p. 406-417.
2. Atkinson, P.J. and C. Woodhead, *Remodeling in the aging mandible--a factor in implant dentistry*. J Oral Implantol, 1979. **8**(3): p. 353-70.
3. Shapiro, P.A. and V.G. Kokich, *Uses of implants in orthodontics*. Dent Clin North Am, 1988. **32**(3): p. 539-50.
4. Buschang, P.H., et al., *2008 survey of AAO members on miniscrew usage*. J Clin Orthod, 2008. **42**(9): p. 513-8.
5. Gracco, A., L. Luca, and G. Siciliani, *Molar distalisation with skeletal anchorage*. Aust Orthod J, 2007. **23**(2): p. 147-52.
6. Choi, N.C., et al., *Treatment of Class II protrusion with severe crowding using indirect miniscrew anchorage*. Angle Orthod, 2007. **77**(6): p. 1109-18.
7. Weisner, S.M., *Treatment of a skeletal Class III malocclusion with mandibular asymmetry using a single miniscrew*. J Mass Dent Soc, 2009. **58**(3): p. 28-33.
8. Lin, J.C., E.J. Liou, and S.J. Bowman, *Simultaneous reduction in vertical dimension and gummy smile using miniscrew anchorage*. J Clin Orthod, 2010. **44**(3): p. 157-70.
9. Lee, K.J., et al., *Miniscrew-assisted nonsurgical palatal expansion before orthognathic surgery for a patient with severe mandibular prognathism*. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2010. **137**(6): p. 830-9.
10. Lee, S.J., et al., *Survival analysis of orthodontic mini-implants*. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2010. **137**(2): p. 194-9.
11. Chen, Y.J., et al., *A retrospective analysis of the failure rate of three different orthodontic skeletal anchorage systems*. Clin Oral Implants Res, 2007. **18**(6): p. 768-75.
12. Chen, Y.J., et al., *Stability of miniplates and miniscrews used for orthodontic anchorage: experience with 492 temporary anchorage devices*. Clin Oral Implants Res, 2008. **19**(11): p. 1188-96.
13. Frost, H.M., *The mechanostat: a proposed pathogenic mechanism of osteoporoses and the bone mass effects of mechanical and nonmechanical agents*. Bone Miner, 1987. **2**(2): p. 73-85.
14. Schroeder, A., et al., *[The accumulation of osteocementum around a dental implant under physical loading]*. SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd, 1978. **88**(10): p. 1051-8.
15. Wilmes, B., et al., *Impact of implant design on primary stability of orthodontic mini-implants*. J Orofac Orthop, 2008. **69**(1): p. 42-50.
16. Florvaag, B., et al., *Biomechanical properties of orthodontic miniscrews. An in-vitro study*. J Orofac Orthop, 2010. **71**(1): p. 53-67.
17. Wilmes, B. and D. Drescher, *Impact of insertion depth and predrilling diameter on primary stability of orthodontic mini-implants*. Angle Orthod, 2009. **79**(4): p. 609-14.
18. Kim, J.W., et al., *Comparison of stability between cylindrical and conical type mini-implants. Mechanical and histological properties*. Angle Orthod, 2008. **78**(4): p. 692-8.
19. Straumann, F., *Wissenschaftliche Studien 02/2007*. Basel, Schweiz: Straumann. 2007.
20. Joos, U. and U. Meyer, *New paradigm in implant osseointegration*. Head Face Med, 2006. **2**: p. 19.
21. Ignatius, A., et al., *Tissue engineering of bone: effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type I collagen matrices*. Biomaterials, 2005. **26**(3): p. 311-8.

22. Owens, S.E., et al., *Experimental evaluation of tooth movement in the beagle dog with the mini-screw implant for orthodontic anchorage*. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2007. **132**(5): p. 639-46.
23. Chaddad, K., et al., *Influence of surface characteristics on survival rates of mini-implants*. Angle Orthod, 2008. **78**(1): p. 107-13.
24. Kim, S.H., et al., *Rotational resistance of surface-treated mini-implants*. Angle Orthod, 2009. **79**(5): p. 899-907.
25. Wilmes, B., et al., *Parameters affecting primary stability of orthodontic mini-implants*. J Orofac Orthop, 2006. **67**(3): p. 162-74.
26. Lekholm U, Z.G., *Tissue - integrated prosthesis: Osseointegration in clinical dentistry*. Quintessence Chicago, 1985: p. 199 - 209.
27. Holm, L., et al., *An in vitro study of factors affecting the primary stability of orthodontic mini-implants*. Angle Orthod, 2012. **82**(6): p. 1022-8.
28. Shank, S.B., et al., *Bone damage associated with orthodontic placement of miniscrew implants in an animal model*. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2012. **141**(4): p. 412-8.
29. Wawrzinek, C., T. Sommer, and H. Fischer-Brandies, *Microdamage in cortical bone due to the overtightening of orthodontic microscrews*. J Orofac Orthop, 2008. **69**(2): p. 121-34.
30. Kim, K., et al., *Stress concentration near pin holes associated with fracture risk after computer navigated total knee arthroplasty*. Comput Aided Surg, 2010.
31. Chapurlat, R.D. and P.D. Delmas, *Bone microdamage: a clinical perspective*. Osteoporos Int, 2009. **20**(8): p. 1299-308.
32. Burr, D.B. and T. Stafford, *Validity of the bulk-staining technique to separate artifactual from in vivo bone microdamage*. Clin Orthop Relat Res, 1990(260): p. 305-8.
33. Burr, D.B. and M. Hooser, *Alterations to the en bloc basic fuchsin staining protocol for the demonstration of microdamage produced in vivo*. Bone, 1995. **17**(4): p. 431-3.
34. Burr, D.B., et al., *Bone microdamage and skeletal fragility in osteoporotic and stress fractures*. J Bone Miner Res, 1997. **12**(1): p. 6-15.
35. Burr, D.B., et al., *En bloc staining of bone under load does not improve dye diffusion into microcracks*. J Biomech, 1998. **31**(3): p. 285-8.
36. Mah, J. and F. Bergstrand, *Temporary anchorage devices: a status report*. J Clin Orthod, 2005. **39**(3): p. 132-6; discussion 136; quiz 153.
37. Maino, B.G., et al., *The spider screw for skeletal anchorage*. J Clin Orthod, 2003. **37**(2): p. 90-7.
38. Heibel, H., et al., *[Cortical thickness of the mandible with special reference to miniplate osteosynthesis. Morphometric analysis of autopsy material]*. Mund Kiefer Gesichtschir, 2001. **5**(3): p. 180-5.
39. Ishii, T., et al., *Evaluation of the implantation position of mini-screws for orthodontic treatment in the maxillary molar area by a micro CT*. Bull Tokyo Dent Coll, 2004. **45**(3): p. 165-72.
40. Deguchi, T., et al., *Quantitative evaluation of cortical bone thickness with computed tomographic scanning for orthodontic implants*. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2006. **129**(6): p. 721 e7-12.
41. Trisi, P., et al., *High versus low implant insertion torque: a histologic, histomorphometric, and biomechanical study in the sheep mandible*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2011. **26**(4): p. 837-49.
42. Vlaminck, L., et al., *Immediate postextraction implant placement in sheep's mandibles: a pilot study*. Implant Dent, 2008. **17**(4): p. 439-50.
43. R. Nickel, A.S., E. Seiferle, *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. 2 ed. 1967: Paul Parey.
44. Sambrook, J.M., T.; Russel, D.W, *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3rd edition, 2001.
45. Verna, C., et al., *Microdamage in porcine alveolar bone due to functional and orthodontic loading*. Eur J Morphol, 2005. **42**(1-2): p. 3-11.

46. Verna, C., et al., *Microcracks in the alveolar bone following orthodontic tooth movement: a morphological and morphometric study*. Eur J Orthod, 2004. **26**(5): p. 459-67.
47. Romeis, B., *Mikroskopische Technik*. 1989. **17**.
48. Wawrzinek, C., *Orthodontische Mikroschrauben- Untersuchung zum Auftreten von Mikrotraumen in kortikalem Knochen post insertionem*. 2007.
49. Yadav, S., et al., *Microdamage of the cortical bone during mini-implant insertion with self-drilling and self-tapping techniques: a randomized controlled trial*. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2012. **141**(5): p. 538-46.
50. Turnbull, T.L., et al., *Detection of fatigue microdamage in whole rat femora using contrast-enhanced micro-computed tomography*. J Biomech, 2011. **44**(13): p. 2395-400.
51. Preininger, B., et al., *Histogram feature-based classification improves differentiability of early bone healing stages from micro-computed tomographic data*. J Comput Assist Tomogr, 2012. **36**(4): p. 469-76.
52. Lopez-Lopez, J., et al., *Computer-aided system for morphometric mandibular index computation (Using dental panoramic radiographs)*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2012. **17**(4): p. e624-32.
53. Nagaraja, S., O. Skrinjar, and R.E. Guldborg, *Spatial correlations of trabecular bone microdamage with local stresses and strains using rigid image registration*. J Biomech Eng, 2011. **133**(6): p. 064502.

Veröffentlichung

Das Poster der Arbeit wurde im Abstraktband der 85. Wissenschaftlichen Jahrestagung der DGKFO auf Seite 110 veröffentlicht.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Fischer-Brandies für die Vergabe dieses Themas sowie meinem Betreuer und Statistiker Herrn Robert Ciesielski für die freundliche und sehr engagierte Unterstützung bei dieser Dissertation.

Vielen Dank auch an OA Dr. B. Koos für die sachlichen Hinweise und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ein Dankeschön allen Mitarbeitern der kieferorthopädischen Abteilung am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel, die mir nicht nur die Räumlichkeiten und Geräte zur Verfügung gestellt haben, sondern auch mit Rat und Tat zur Seite standen. Besonders erwähnt sei dabei Frau Martina Schneeberg, die mich bei der Präparatherstellung unterstützt hat.

Des Weiteren möchte ich mich sehr herzlich bei meinen Eltern bedanken, ohne deren psychologische, philosophische und nicht zuletzt pekuniäre Hilfe weder das Studium der Zahnmedizin noch diese abschließende Dissertation möglich gewesen wäre.

Meiner Frau Lisa gilt besonderer Dank, da sie mich stets motiviert hat und jederzeit für mich da war.

Allen denjenigen, die ich vergessen haben sollte oder die sich an dieser Stelle vergessen fühlen sollten, möchte ich hiermit auch herzlich danken.

Lebenslauf

Name: Sibbern Karsten Sibbersen

Anschrift: Otto-Gildemeister str.1
28209 Bremen
Tel.: 0421/ 68544675
Mobil: 0162 6569851

GEBURTSORT: Lübeck

GEBURTSDATUM: 06.11.1983

FAMILIENSTAND: verheiratet

EHEFRAU: Dr. Lisa Sibbersen (Zahnärztin)

AUSBILDUNG:

1990-1994 Iven-Agßen Schule (Husum)

1994-2003 Hermann-Tast Schule (Husum)

Juli 2003 Allgemeine Hochschulreife

2003-2004 Zivildienst an der Rungholt Schule (Husum)

2004-2009 Studium der Zahnmedizin an der CAU Kiel

Dezember 2009 Staatsexamen

März 2010-März 2011 Vorbereitungsassistent in der Gemeinschaftspraxis von Daniel Bleicken und Thomas Kurz (Flensburg)

März 2011-Juli 2011 Vorbereitungsassistent in der Gemeinschaftspraxis von Dr. Dr. N. von Sternberg und Prof. Dr. Dr. I. Springer (Hamburg)

August 2011-März 2011 Weiterbildungsassistent für Oralchirurgie in der Praxis von Prof. Dr. Dr. I. Jend-Rossmann (Hamburg)

Seit März 2011 Weiterbildungsassistent für Oralchirurgie in der Gemeinschaftspraxis Mund. Kiefer. Gesicht. (Bremen)

Promotionsarbeit: seit Juni 2011 an der Klinik für Kieferorthopädie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel