

Aus der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Prof. Dr. med. vet. Ulrike Matis

Angefertigt am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
Direktor des Instituts: Univ. Prof. Dr. med. Bernd Gänsbacher
(unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Axel W. Stemberger)

**Untersuchungen zur
Osteogenese, Biokompatibilität und Biodegradation sowie
Pharmakokinetik der inkorporierten Antibiotika
verschiedener Kalziumsulfat-Formulierungen
nach Implantation in die Tibia**

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
von
Meredith Kioekli
Tierärztin aus
Aachen

München 2010

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Matis
Korreferent/in: Univ.-Prof. Dr. Potschka

Tag der Promotion: 13. Februar 2010

Meiner Familie in Dankbarkeit gewidmet

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Knochenersatzmaterialien	3
2.2	Knocheninfekte	4
2.2.1	Einteilung der Osteomyelitis	5
2.2.2	Erregerspektrum	5
2.2.3	Aspekte zur Pathophysiologie	6
2.2.4	Etablierte Behandlungsgrundlagen	7
2.3	Implantat-assoziierte Infektionen	8
2.3.1	Problem der Expression bakterieller Rezeptoren	9
2.3.2	Problem der Biofilmbildung	9
2.3.3	Problem Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus (MRSA)	10
2.4	Trägersysteme für die lokale Applikation von Arzneimitteln	10
2.4.1	Antibiotikaträger im Einsatz bei Knochendefekten und -infekten	11
2.4.2	Träger auf Basis von PMMA	12
2.4.3	Knochenersatzstoff/Träger auf Basis von HA und TCP	14
2.4.4	Knochenersatzstoff/Träger auf Basis von Kalziumsulfat	16
2.4.5	Proteine als Arzneimittelträger	18
2.4.6	Synthetische, resorbierbare Polymere als Arzneimittelträger	20
2.5	Verwendete Antibiotika	20
2.5.1	Aminoglykoside	20
2.5.2	Glykopeptide	20
3	Material und Methoden	22
3.1	Implantate	22
3.2	Tierversuch	23
3.2.1	Versuchstiere	23
3.2.2	Präoperative Maßnahmen	23
3.2.3	Versuchsanordnung	23
3.3	Operationsdurchführung	25
3.3.1	Operationsvorbereitung und Anästhesie	25
3.3.2	Operationsprotokoll	26
3.3.3	Postoperative Nachsorge	27

3.4	Probengewinnung und Lagerung post mortem	29
3.4.1	Biokompatibilitätsgruppe	29
3.4.2	Pharmakokinetikgruppe	29
3.5	μ-Computertomographie	30
3.6	Methodik der Histologie	31
3.6.1	Kontaktradiographie	31
3.6.2	Einbettung	31
3.6.3	Oberflächenfärbung	31
3.6.4	Dokumentation	32
3.6.5	Methodik der Fluoreszenz	32
3.7	Methodik der Antibiotika-Bestimmung	33
3.7.1	Antibiotikafreisetzung in vitro	33
3.7.2	Antibiotikafreisetzung in vivo	33
3.7.3	Antibiotika-Bestimmung in der Tibia	33
3.8	Versuche zur Blutgerinnung	35
3.8.1	roTEG Coagulation Analyzer	37
3.8.2	Analyse von Markern der aktivierten Gerinnung	37
4	Ergebnisse	39
4.1	Auswertung der Röntgenbefunde	39
4.1.1	Palasorb-G	39
4.1.2	Palasorb-V	41
4.1.3	Osteoset®	43
4.1.4	Zusammenfassende Darstellung der Röntgenbefunde	44
4.2	Auswertungen der Bilder der μ-CT	46
4.2.1	Palasorb-G	47
4.2.2	Palasorb-V	53
4.2.3	Osteoset®	57
4.3	Auswertung der histologischen Ergebnisse	60
4.3.1	Palasorb-G	61
4.3.2	Palasorb-V	76
4.3.3	Osteoset®	91
4.4	Zusammenfassende Bewertung der Röntgenbefunde, μ-Computertomographie und Histologie	102
4.4.1	Palasorb-G Zusammenfassung	102

4.4.2	Palasorb-V Zusammenfassung	112
4.4.3	Osteoset®-Zusammenfassung	120
4.5	Pharmakokinetik der Antibiotika	127
4.5.1	Antibiotika-Freisetzung – In-vitro-Daten	127
4.5.2	Antibiotika-Freisetzung – In-vivo-Daten	130
4.5.3	Antibiotika-Konzentrationen in Medulla und Kortikalis	133
4.6	Möglicher Einfluss der Kalziumsulfatträger auf die Gerinnung	137
4.6.1	Untersuchungen mit dem roTEG	138
4.6.2	Marker der aktivierten Gerinnung	141
5	Diskussion	144
5.1	Diskussion der Methode	144
5.1.1	Tiermodell	144
5.1.2	Operationsmethode	144
5.1.3	Arzneimittelträger	145
5.1.4	Analysemethoden	145
5.2	Diskussion der Ergebnisse	146
5.2.1	Biokompatibilität	146
5.2.2	Biodegradation	148
5.2.3	Osteogenese	151
5.2.4	Kalziumsulfat als Wirkstoffträger	153
5.2.5	Knocheninfektionen	156
5.2.6	Der Einfluss der Kalziumsulfatträger auf die Gerinnung	158
5.3	Schlussbetrachtung und Ausblick	159
6	Zusammenfassung	160
6.1	Summary	162
7	Literaturverzeichnis	164
8	Tabellenverzeichnis	182
9	Abbildungsverzeichnis	183
10	Danksagung	186

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BPS	Biphosphatpuffer
BL	Blank
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CFT	Clot Formation Time
CT	Clotting Time
C3a-desArg	Complement 3a-desArg
CT	Computertomograph
d	Tage
2D/3D	2 bzw. 3 Dimensional
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPS	extrazelluläre Polysaccharide
-x	-fach
FXIIa	Faktor XII a
F ₁₊₂	Fragment 1 und 2
Gew.-%	Gewicht-Prozent
HA	Hydroxylapatit
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
in-TEG [®]	intrinsischer Aktivator
CaSO ₄	Kalziumsulfat
MCF	Maximum Clot Formation
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
MSSA	Methicillin-sensitiver Staphylococcus aureus
MMA	Methylmethacrylat
MRCRAMM	microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
μ-CT	Mikro-Computertomograph
mAs	Milliampere-Sekunde
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
mind.	mindestens

MIC	Minimal Inhibitory Concentration
MW	Mittelwert
OS	Osteoset [®]
ORSA	Oxacillin-resistenter Staphylococcus aureus
PG	Palasorb-Gentamicin
POW	Palasorb ohne Wirkstoff
PV	Palasorb-Vancomycin
pcs.	pieces
pmol	Pikomol
PMMA	Polymethylmethacrylat
p.op.	post operationem
star-TEG [®]	Rekalzifizierungsreagenz
roTEG	Rotationsthromboelastographie
spp.	species pluralis
SPF	Specific Pathogen Free
STABW	Standardabweichung
Stk.	Stück
s.c.	subkutan
Tab.	Tabelle
TCP	Trikalziumphosphat
Vergr.	Vergrößerung
pH	Wasserstoffionenkonzentration
ZPF	Zentrum für präklinische Forschung

1 Einleitung

Eine möglichst schnelle sowie vollständige Rekonstruktion durch körpereigenes Knochengewebe ist Ziel der Behandlung ossärer Defekte in der Traumatologie sowie der Orthopädie. Die Resektion von Tumoren oder Zysten, komplexe Frakturen sowie die Herdausräumung nach Knocheninfekten verbunden mit größerem Substanzverlust erfordern den Einsatz allogener bzw. autogener Spongiosa oder Knochenersatzmaterialien. Knochenersatzmaterialien sollten sowohl die Knochenheilung fördern als auch einen antiinfektiven Schutz des Implantatlagers bieten. Ziel ist eine ausreichende antibiotische Versorgung am Ort des Geschehens ohne systemisch toxische Spiegel zu erreichen. Toxizität der Antibiotika sowie ungenügende Blutversorgung des geschädigten Gewebes erschweren die Behandlung. In den nach Resektion oder Débridement entstandenen Hohlräumen sammeln sich Körperflüssigkeit sowie Blut und bieten somit einen idealen Nährboden für Bakterien. Das Einbringen nicht resorbierbarer Materialien, wie Septopal[®]-Ketten, erfordert nicht nur eine 2. Operation zur Entfernung, sondern hinterlässt erneut einen „dead space“. Die Verwendung nicht resorbierbarer Knochenersatzmaterialien ist in der Klinik etabliert, als Träger für Arzneimittel jedoch nur bedingt geeignet.

Kalziumsulfat als resorbierbarer Träger ist kostengünstig, leicht erhältlich und zu sterilisieren, biokompatibel und röntgenpositiv (Mackey et al. 1982; Peltier 1961; Peltier und Jones 1978). Kalziumsulfat füllt knöcherne Hohlräume auf, wodurch sich kein Koagulum als idealer Nährboden für Bakterien anreichern kann. Das Material wird schrittweise resorbiert und kann gleichzeitig das Einwachsen von Knochen ermöglichen. Die bisher verwendeten Formulierungen können lokal Antibiotika in hohen Konzentrationen freisetzen, ohne dabei systemisch toxische Level zu erreichen. Wie Studien zeigen, hat die Verwendung von reinem Kalziumsulfat den Nachteil, dass in der Resorptionsphase unerwünschte Reaktionen in Form von Wundheilungstörungen sowie osteolytischen Prozessen beobachtet wurden (Coetzee 1980).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Prüfung der neuen Kalziumsulfatformulierungen (Palasorb-G und Palasorb-V) mit den jeweils eingearbeiteten Antibiotika Gentamicin und Vancomycin im Vergleich mit dem seit 1997 zugelassenem Produkt Osteoset[®] (Wright Medical Technology, Arlington, TN) hinsichtlich der Biokompatibilität, Biodegradation sowie des osteogenetischen Potentials. Des Weiteren wird die Pharmakokinetik der

inkorporierten Antibiotika untersucht und somit die Eignung als Arzneimittelträger bewertet. Im Unterschied zum reinen Kalziumsulfat der bisher vorliegenden Materialien soll die Kombination mit Kalziumkarbonat die pH-Absenkung abpuffern und das eingearbeitete Tripalmitat zu einer retardierten Freisetzung der Antibiotika führen.

2 Literaturübersicht

2.1 Knochenersatzmaterialien

In der Wiederherstellungschirurgie des Bewegungsapparats stellen ossäre Defekte mit größerem Substanzverlust infolge komplexer Frakturen oder der Resektion von Tumoren sowie Zysten ein zentrales Problem dar. In den USA sowie in Europa werden ungefähr 500.000 Operationen unter Verwendung von Knochenersatzmaterialien durchgeführt, welche neben transfundiertem Blut die am häufigsten eingesetzten biologischen Materialien sind (Bucholz 2002; Wirth und Windhagen 2004). Weltweit liegt der Einsatz in Orthopädie, Neurochirurgie und Zahnmedizin bei 2,2 Millionen (Lewandrowski et al. 2000; Muschler et al. 1996).

Als Goldstandard gilt autologe Spongiosa, welches die optimalen Kriterien der Osteointegration, Osteokonduktion, Osteoinduktion sowie Osteogenese erfüllt (Costantino und Friedman 1994; Cypher und Grossman 1996; Moore et al. 2001). Nachteile wie ein weiterer Eingriff, die verlängerte Narkosedauer, mögliche operationsbedingte Komplikationen durch erhöhten Blutverlust, Schmerzen, Infektionen sowie letztendlich begrenzte Verfügbarkeit limitieren dessen Verwendung (Kurz et al. 1989).

Allogene Knochen transplantate bedeuten unbegrenzten Zugriff, bergen aber die Nachteile serologischer Abstoßungsreaktionen sowie erhöhter Infektionsrisiken (Friedlaender et al. 1999). Um diesen zu begegnen, sind weitere Aufbereitungs- und Sterilisationsverfahren notwendig, die die biologischen sowie mechanischen Eigenschaften beeinträchtigen (Bonfiglio und Jeter 1972; Bos et al. 1983; Damien und Parsons 1991; Henman und Finlayson 2000; Keating und McQueen 2001; Palmer et al. 1999; Pelker und Friedlaender 1987). Zusätzlich ist das Führen von Knochenbanken sehr kostenintensiv.

Das Streben nach dem idealen Knochenersatzstoff hat unzählige Materialien auf den Markt gebracht. Synthetischer Knochenersatz ist im Gegensatz zu Autograft und Allograft bestenfalls in Besitz zweier Eigenschaften: Osteointegration und Osteokonduktion. Als ideales Material gilt, welches zusätzlich osteoinduktiv, biokompatibel sowie -degradierbar ist, dem Remodeling-Prozess unterworfen und die Bildung neuen Knochens unterstützt. Außerdem sollte es leicht zu handhaben und kostengünstig sein (Giannoudis et al. 2005). Zu

nennen seien Biogläser, die 1970 zum ersten Mal beschrieben wurden. Dabei zu unterscheiden sind die bioaktiven Gläser (NovaBone[®]) und Glas Ionomere (Fugi XP gp[®]). Als Kalziumphosphate werden Hydroxylapatit in koralliner (Pro Osteon[®]) oder synthetischer (Calcitite[®]) Form sowie Beta-Trikalziumphosphat (Orthograft[®]) eingesetzt (Moore et al. 2001). Flüssiges Kalziumphosphat wie Norian-SRS[®] kann in Hohlräume injiziert werden und beinhaltet gleichzeitig die Eigenschaften des Zements ohne signifikante Temperaturerhöhung bei der Aushärtung (Giannoudis et al. 2005). Nachteilig beim Einsatz der Biogläser sowie der verschiedenen Hydroxylapatitmaterialien ist die mangelnde Biodegradation.

Die Verwendung des als „Plaster of Paris“ bekannten Gipses wird bereits im 10. Jahrhundert zur äußerlichen Frakturbehandlung von den Arabern dokumentiert, 1852 entwickelt der holländische Militärarzt Mathysen zu diesem Zweck aus Kalziumsulfat bestehende Bandagen (Moore et al. 2001). Peltier lieferte umfangreiche Daten über den klinischen Einsatz von Gips, um Knochendefekte aufzufüllen (Peltier 1959, 1961; Peltier et al. 1957; Peltier und Jones 1978; Peltier und Orn 1957). Kalziumsulfat dient als osteokonduktive Matrix dem Einwachsen von Blutgefäßen und somit dem Einwandern von Zellen. Nach Coetzee sollte zu diesem Zweck der implantierte Gips unbedingt mit dem Periost oder dem Endost in Verbindung stehen (Coetzee 1980). Kalziumsulfat gilt als vollständig degradierbar. In der Literatur werden Zeiträume von 3–4 Wochen (Lebourg und Biou 1961) bis 6 Monate (Kelly et al. 2001) angegeben. Im Vergleich zu spongiösen Knochen weist Kalziumsulfat eine höhere Druckfestigkeit und Zugfestigkeit auf (Moore et al. 2001). Die Vorteile des Kalziumsulfats liegen darin begründet, dass es resorbierbar, gewebeverträglich, preisgünstig, leicht erhältlich sowie sterilisierbar ist (Mackey et al. 1982; Peltier 1961; Peltier und Jones 1978).

2.2 Knocheninfekte

Häufig verbunden mit ossären Defekten ist das Auftreten von Knocheninfektionen. Beschreibungen über Osteomyelitiden reichen bis ins 16. Jahrhundert zurück. Während die ersten Berichte über Knocheninfekte in Zusammenhang mit traumatischen Ereignissen stehen, erkennt Chassaignac 1854 die Bedeutung der hämatogen ausgelösten Osteomyelitis. Pasteur isolierte 1880 als erster *Staphylococcus aureus* bei einem an Osteomyelitis Erkrankten. In den 20er und 30er Jahren des 20. Jahrhunderts erkannte man die Notwendigkeit der chirurgischen Intervention bei der Therapie von Knocheninfekten, die Einführung von Antibiotika erhöhten die Heilungschancen um ein Weiteres (Schwameis et al. 1996).

Das Vorkommen der Osteomyelitis lag Mitte des Jahrhunderts bei 2–3 % der Bevölkerung. Während ein Rückgang der hämatogenen Form zu verzeichnen ist, hat die traumatische Form zugenommen. Durch eine vermutlich erhöhte Verletzungsrate liegt das Verhältnis bei Kindern männlich zu weiblich bei 3–4:1, im jugendlichen Alter gleicht es sich wieder aus. Männliche Erwachsene sind insbesondere durch die posttraumatische Osteomyelitis mit 6–7:1 häufiger betroffen (Lang 1996).

Trotz Fortschritt in chirurgischer Technik sowie Verbesserung der Implantate sind Knocheninfektionen immer noch mit einem Auftreten von 0,8–1,2 % in der orthopädischen Chirurgie (Espehaug et al. 1997) und 3,6–8,1 % (gedeckte Frakturen) bis 17,5–21,2 % (offene Frakturen) in der traumatischen Chirurgie (Boxma et al. 1996) eine ernst zu nehmende Komplikation.

2.2.1 Einteilung der Osteomyelitis

Die Einteilung der Knocheninfekte erfolgt nach unterschiedlichen Kriterien. Klinisch treten Osteomyelitiden in subakuter, akuter und chronischer Verlaufsform auf, nach Art des Erregers wird zwischen spezifischen und unspezifischen Infekten unterschieden und letztendlich klassifiziert die Art des Infektionswegs die Osteomyelitis in eine endogene (hämatogene) und exogene (posttraumatische und postoperative) Form. Je nach Alter des Patienten wird die hämatogene akute Osteomyelitis abermals in die Säuglingsosteomyelitis, juvenile Osteomyelitis und die der Erwachsenen unterteilt. Ausschlaggebend für die Differenzierung sind die Art des Erregers und der Ausbreitungsweg der Infektion (Schwameis et al. 1996).

2.2.2 Erregerspektrum

Mit Ausnahme der Säuglingsosteomyelitis, in der Streptokokken die Hauptrolle spielen, wird die akute hämatogene Form hauptsächlich durch Staphylokokken, insbesondere *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*, ausgelöst. Bei chronischen Verlaufsformen werden zusätzlich Anaerobier wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* sowie *E. coli* beobachtet (Carek et al. 2001; Cierny et al. 2003; Lew und Waldvogel 1997). Nach Taylor ist zu 33 % *Staphylococcus aureus* als einzig auslösender Keim für die Infektion verantwortlich, zu 16 % nur koagulase-negative Staphylokokken und zu 51 % Mischinfektionen mit wiederum einer 83 %iger Beteiligung der Staphylokokken

(Taylor et al. 1990). Erreger spezifischer Osteomyelitiden sind *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhi* (insbesondere verbunden mit der Sichelzellanämie) (Carlson und Dobozi 1994) oder *Haemophilus influenza* (Sarria et al. 2001). Bei Immunsupprimierten spielen auch Pilze wie *Aspergillus* (Stratov et al. 2003) oder *Candida albicans* (El-Zaatari et al. 2002) eine Rolle (Lew und Waldvogel 2004).

Tab. 1: An Knocheninfektionen beteiligte Mikroorganismen (Lew und Waldvogel 2004).

Organismen	Kommentar
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA/MSSA)	häufig beteiligter Mikroorganismus in jeglicher Form der Osteomyelitis
Koagulase-negative Staphylokokken oder Propionibakterien	Fremdkörper-assoziierte Infektion
Enterobakterien, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida</i> spp.	häufig in nosokomialen Infektionen
Streptokokken und/oder Anaerobier	verbunden mit Bisswunden, diabetische Fußläsionen, Dekubitus, Ulzera
<i>Salmonella</i> spp. oder <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Sichelzellanämie
<i>Bartonella henselae</i> oder <i>B. quintana</i>	HIV-Infektion
<i>Pasteurella multocida</i> oder <i>Eikenella corrodens</i>	Bisswunden durch Menschen oder Tiere
<i>Aspergillus</i> spp., <i>Candida albicans</i> oder <i>Mycobacteria</i> spp.	immunsupprimierte Patienten
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Populationen, in denen Tuberkulose verbreitet ist
<i>Brucella</i> spp., <i>Coxiella burnetii</i> , Fungi, in spezifischen geographischen Gegenden (Kokzidioidomykose, Blastomykose, Histoplasmose)	Populationen, in denen diese Pathogene endemisch sind

Zu den Sonderformen der Osteomyelitis zählen der Brodie-Abszess, die sklerosierende Osteomyelitis (Garré) und die plasmazelluläre Osteomyelitis (Lang 1996; Schwameis et al. 1996).

2.2.3 Aspekte zur Pathophysiologie

Der hämatogenen Absiedlung von Bakterien in den Knochen folgt die leukozytäre Infiltration. Nach Ausbreitung des Exsudats entlang der Volkmann- und Havers-Kanäle kommt es zum Durchtritt durch die Kortikalis und das Periost wird abgehoben. Durch die Komprimierung der Gefäße ist die Versorgung nicht mehr gewährleistet, Anteile des Knochens unterliegen der Nekrose. Es folgt die Demarkierung durch Granulationsgewebe und Entwicklung von avitalen Knochensequestern, die ihrerseits wieder Bakterien horten können (Lang 1996). Die Entwicklung der posttraumatischen Osteomyelitis wird zusätzlich begünstigt durch Ödeme und Hämatome sowie Instabilität von Fragmenten (Schwameis et al. 1996). Insbesondere

Fremdkörper bieten eine ideale Grundlage für Bakterien (Melcher et al. 1994; Petty et al. 1985; Sanzen und Linder 1995). Bakterielle Produkte, die Veränderung des pH-Wertes sowie die Aktivierung von Enzymen führen zu einem weiteren Zerfall vitalen Gewebes (Schwameis et al. 1996).

Mit dem Auftreten einer akuten Osteomyelitis ist gleichzeitig die Gefahr von Komplikationen verbunden. Zu nennen seien der Übergang in die Chronizität, polytope Osteomyelitiden (insbesondere beim Säugling), Einbruch in das Gelenk mit darauf folgender Ankylose, Entstehen einer Weichteilphlegmone, Periostitis mit Ausbildung von subperiostalen Abszessen, bei Übergreifen auf die Wachstumsfuge Veränderung im Längenwachstum (verkürzend oder überschießend), Frakturen, Fistelkarzinom und Amyloidose (Lang 1996).

2.2.4 Etablierte Behandlungsgrundlagen

Es gilt die mikrobiologische Ätiologie aufzuklären und die notwendige antimikrobielle Therapie einzuleiten. Ein frühzeitiger Beginn ergibt die besten Ergebnisse, das Antibiotikum muss mindestens 4, besser 6 Wochen systemisch verabreicht werden. Insbesondere im Fall von chronischen Knocheninfekten ist ein chirurgischer Eingriff mit gründlichem Débridement sowie Management des verbliebenen „dead space“ notwendig, gegebenenfalls eine Stabilisierung des Knochens (Schwameis et al. 1996).

Tab. 2: Antibiotikaregime zur systemischen Verabreichung (Lew und Waldvogel 2004).

isolierter Mikroorganismus	Behandlung (1. Wahl)	Alternativen
Penicillin-sensitiver Staphylococcus aureus	Benzylpenicillin (12–20 Mio. Einheiten täglich)	Cefazolin (1 g, alle 6 h) Clindamycin (600 mg, alle 6 h) Vancomycin (1g, alle 12 h)
Penicillin-resistenter Staphylococcus aureus	Nafcillin* (1,0–1,5 g, alle 4-6 h) oder Cefazolin (2 g, alle 8 h)	Cephalosporine der 2. Generation Clindamycin (600 mg, alle 6 h) Vancomycin (1 g, alle 12 h) Ciprofloxacin (750 mg per os, alle 12 h) oder Levofloxacin in Kombination mit Rifampicin (600 mg am Tag)
Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus [†]	Vancomycin (1 g, alle 12 h)	Teicoplanin (400 mg, alle 24 h, 1. Tag alle 12 h)
verschiedene Streptokokken (Gruppe A oder B; Streptococcus pneumoniae)	Benzylpenicillin (12–20 Mio. Einheiten täglich)	Clindamycin (600 mg, alle 6 h) Erythromycin (500 mg, alle 6 h) Vancomycin (1 g, alle 12 h)
gramnegative Enterobakterien	Quinolone (z. B. Ciprofloxacin, 400–750 mg, alle 12 h)	Cephalosporine der 3. Generation
Serratia spp.; Pseudomonas aeruginosa	Piperacillin (2–4 g, alle 4 h) und Aminoglykoside	Cefepime (2 g, alle 12 h [‡]) oder ein Quinolon und Aminoglykoside (je nach Sensitivität tägliche Dosis)
Anaerobier	Clindamycin (600 mg, alle 6 h)	Ampicillin-Sulbactam (2 g, alle 8 h) Metronidazol gegen-gramnegative Anaerobier (500 mg, alle 8 h)
Mischinfektionen (Aerobier und Anaerobier)	Ampicillin-Sulbactam (2–3 g, alle 6–8 h) [§]	Imipenem (500 mg, alle 6 h) [¶]

Alle angegebenen Dosierungen sind nur bei normaler Funktion der Nieren und Leber einzusetzen, ansonsten müssen diese angepasst werden. Die Behandlung erfolgt intravenös. Teicoplanin ist derzeit nur in Europa erhältlich. * Flucloxacillin, Oxacillin oder Cloxacillin in Europa. † Die meisten Koagulase-negativen Staphylokokken sind Methicillin-resistent und werden mit Vancomycin oder Teicoplanin behandelt. ‡ Hängt von der Sensitivität ab; ein Cephalosporin der 4. Generation (Cefepime), Piperacillin/Tazobactam, Meropenem und Imipenem sind nützliche Alternativen. § Amoxicillin-Clavulansäure in Europa (1,2-2,2 g, alle 6-8 h). In Fällen von gramnegativen Aerobiern, die resistent gegenüber Amoxicillin-Clavulansäure sind.

2.3 Implantat-assoziierte Infektionen

Infektionen von Biomaterialien sind eine gefürchtete Komplikation bei orthopädischen und vaskulären/kardiovaskulären Implantaten (Gracia et al. 1997). Staphylococcus aureus gilt als Hauptverursacher Implantat-assoziiierter Infektionen sowie akuter und chronischer Osteomyelitiden. Seine besondere Pathogenität liegt unter anderem in der Fähigkeit begründet, an Proteine zu binden sowie einen Biofilm auszubilden (Mayberry-Carson et al. 1984). In diesem Biofilm sind die Keime nicht nur vor dem Immunsystem sowie Antibiotika geschützt, sondern reduzieren gleichzeitig ihren Metabolismus und somit ihre Generationszeit. Damit steigt ihre MIC gegenüber Antiinfektiva, die auf wachsende Bakterien wirken. Costerton et al. fanden heraus, dass die MIC für Tobramycin bei adhätierenden Pseudomonas aeruginosa 500-mal höher ist als die für nicht adhätierende (Costerton et al. 1995).

2.3.1 Problem der Expression bakterieller Rezeptoren

Auf seiner Oberfläche exprimiert *Staphylococcus aureus* den Rezeptor MRCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules). Dieser Rezeptor bindet an Proteine wie Fibronectin, Kollagen, Laminin, Osteonektin, Vitronectin, Elastin, Sialoprotein und Fibrinogen (Patti et al. 1994). Somit kann sich der Keim an den Proteinen der Knochenmatrix festsetzen und durch seine Virulenzfaktoren die Zerstörung ossärer Strukturen induzieren (ob eine Zerstörung durch Keime und/oder durch Granulozyten wird kontrovers diskutiert).

Implantate werden nach Einbringen in den Körper ebenfalls von einem proteinreichen „conditioning film“ überzogen. Da auch Gewebezellen integrine Rezeptoren für Matrixproteine besitzen (Patti et al. 1994), liefern sich Körperzellen und Bakterien einen Wettkampf um die Besiedlung der Oberfläche („race for the surface“) (Gristina 1987). Gewinnen die Gewebezellen dieses Wettrennen, ist es den Bakterien kaum noch möglich zu adhären. Daher ist die antiinfektive Beschichtung von Fremdkörpern der 1. Schritt zum Schutz vor bakterieller Kolonisation. Auch die Art der Oberfläche ist ausschlaggebend für die Adhäsion. Da auf rauen Flächen die Oberfläche vergrößert sowie Scherkräfte verringert sind, steigt auch das Ausmaß der Besiedlung (Characklis und James 2009). Nur kurz sei an dieser Stelle erwähnt, dass ebenfalls hydrophobe, elektrostatische oder Van-der-Waals-Kräfte auf die Adhäsion einen Einfluss nehmen (Jansen und Peters 1993).

2.3.2 Problem der Biofilmbildung

Die Fähigkeit der Biofilmbildung induziert 3-mal häufiger eine Implantat-assoziierte Infektion als Staphylokokken, die nicht dazu in der Lage sind (Christensen et al. 1983). Nachdem sich die Keime auf der Oberfläche festgesetzt haben, produzieren Enzyme extrazelluläre Polysaccharide (EPS) und bauen so schichtweise einen Biofilm auf (Costerton et al. 1995). Diese Glykokalix schützt nicht nur als mechanische Penetrationsbarriere die Keime vor den phagozytierenden Zellen der Immunabwehr, sondern auch durch die verlängerte Diffusionsstrecke vor wirksamen Antibiotikaspiegeln im Inneren (Anwar et al. 1992; Gristina und Costerton 1985; Gristina et al. 1985; Habash und Reid 1999; Tsukayama 1999). In Biofilmen befindliche Keime sind 10- bis 1000-mal resistenter gegenüber Antibiostatika als „planktonisch lebende“ Bakterien (Evans und Holmes 1987; Gristina et al. 1987; Nickel et al. 1985; Prosser et al. 1987). Das nährstoffarme Milieu führt zu einem Ruhezustand, der die

Bakterien gegenüber wachstumsbeeinflussenden Antiinfektiva unempfindlich macht (Patel 2005).

2.3.3 Problem Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus (MRSA)

Staphylococcus aureus zählt zu den wichtigsten Erregern nosokomialer Infektionen. Methicillin- bzw. Oxacillin-resistente Stämme (MRSA/ORSA) sind gegenüber allen Beta-Lactam-Antibiotika unempfindlich und in der Regel auch gegenüber Antibiotika anderer Gruppen. Beta-Lactam-Antibiotika immitieren einen Baustein, der daraufhin die Verknüpfung zur Zellwand verhindert. MRSA-Keime besitzen eine modifizierte Transpeptidase, die diesen Baustein nicht mehr mit einbaut. MRSA-Keime sind weltweit verbreitet, allerdings in unterschiedlicher Ausprägung. Während in den USA, Japan und südeuropäischen Ländern eine Prävalenz von 30–80 % herrscht, ist diese in den Niederlanden mit unter 0,5 % und den skandinavischen Ländern mit unter 1 % sehr niedrig (Panlilio et al. 1992; Salmenlinna et al. 2000; Verhoef et al. 1999; Voss et al. 1994). Das Vorkommen von MRSA-Keimen in Deutschland ist von 1990 mit 1,7 % auf 15,2 % 1998 und im Jahr 2001 auf 20,7 % gestiegen (Kresken et al. 2003). In einer Studie zu Blutkulturisolaten (S.-aureus-Isolate) von 1996–1999 betrug der Anteil MRSA-Keime 13,5 %. Dabei waren Unterschiede von 1,7–41,0 % zwischen den verschiedenen Krankenhäusern zu verzeichnen (von Eiff et al. 2000).

2.4 Trägersysteme für die lokale Applikation von Arzneimitteln

Die Entwicklung eines idealen Trägersystems für die lokale Applikation von Arzneimittel ist Ziel von Wissenschaftlern und Ärzten der letzten 50 Jahren. Es sollte sowohl leicht zu platzieren, entfernen oder auszutauschen sowie patientenfreundlich und kostengünstig sein. Elutionskurve, Einflussfaktoren und das in die Umgebung am besten passende Material sollten bekannt sein (Nelson 2004). Außerdem fördert das ideale Trägersystem die Heilung, eluiert die gesamte Dosis des Arzneimittels und es ist keine weitere Operation notwendig (Papagelopoulos et al. 2006). Trägermaterialien für Antibiotika sollten anfänglich eine schnelle Freisetzung gewährleisten, über eine definierte Zeitperiode hohe und konstante Level aufweisen sowie in einer kurzen Endphase das Antibiotikum vollständig freisetzen. Während lokal hohe Konzentrationen erwünscht sind, sollten systemisch keine hohen Spiegel beobachtet werden (Ruszczak und Friess 2003).

Es wurden verschiedene Formulierungen für den lokalen Transport von Antibiotika verwendet. Als einfache Methode wurde häufig das Arzneimittel vor dem Verschluss der Wunde in Form von Puder über die Wundregion verteilt (Rushton 1997). Der Nachteil bestand darin, dass für nur kurze Zeit zu hohe lokale Konzentrationen erreicht wurden, die das Gewebe zusätzlich schädigen konnten. Eine weitere Möglichkeit boten Injektionen oder Spülungen, um das Arzneimittel in flüssiger Form an den Ort des Geschehens zu platzieren. Durch kontinuierliche Perfusion konnte die Wirksamkeit erhöht werden, dies erfordert aber erfahrenes Pflegepersonal und ist arbeitsintensiv. Auch der Einsatz implantierbarer Pumpen, die perkutan aufgefüllt werden können, wurde beschrieben (Perry und Pearson 1991). In vielen Ländern wird zur postoperativen Reduktion des Infektionsrisikos Antibiotika durchtränkte Baumwollgaze verwendet, die in der Wunde bis zum endgültigen Verschluss belassen wird (Ruszczak und Friess 2003).

2.4.1 Antibiotikaträger im Einsatz bei Knochendefekten und -infekten

Infizierter sowie traumatisierter Knochen weist eine gestörte Blutversorgung auf, es entstehen Knochensequester, die wiederum Bakterien horten. Das nekrotische Gewebe ist durch die unzureichende Blutversorgung nicht mehr dem physiologischen Heilungsprozedere unterworfen und muss chirurgisch entfernt werden (Papagelopoulos et al. 2006). Therapeutisches Vorgehen beinhaltet radikales Débridement, Spülung sowie Antibiose (Cierny und Mader 1987; Koort et al. 2005; Rissing 1997; Toma et al. 2006). Trotz der 4- bis 6-wöchigen systemischen Antibiose ist die Rückfallquote sehr hoch (Gitelis und Brebach 2002). Durch die beeinträchtigte Blutversorgung kann das parenteral verabreichte Antibiotikum lokal nicht die notwendige therapeutische Konzentration gewährleisten ohne toxische Serumspiegel zu erreichen. Insbesondere der systemische Einsatz von Aminoglykosiden ist mit Nebenwirkungen wie Oto- und Nephrotoxizität verbunden.

Der Einsatz lokaler Antibiotika-Träger bietet den Vorteil lokal hoher Spiegel bei relativ geringen Serumkonzentrationen. Implantate als Trägermaterial sollten nicht nur die notwendige antiinfektiöse Versorgung mit einem Arzneimittel ermöglichen, sondern gleichzeitig den knöchernen Defekt auffüllen (Gitelis und Brebach 2002) und die Knochenheilung durch Osteokonduktivität unterstützen. Das Vorhandensein eines knöchernen Hohlraums birgt mechanische Instabilität sowie bei Hämatombildung die Gefahr einer erhöhten (Re-)Infektanfälligkeit.

Der Einsatz von Trägern auf Basis von Polymethylmethacrylat (PMMA) erfordert eine „two-stage“-Operationsprozedur. Das Material muss nach 3–4 Wochen in einer weiteren Operation entfernt (Calhoun und Mader 1989) und der Hohlraum wieder aufgefüllt werden. Ein weiterer Nachteil sind unbefriedigende Ergebnisse der Antibiotika-Freisetzung (Schurman et al. 1978). Ein biodegradierbares Material, das eine schnellere sowie komplette Freisetzung erfüllt, eliminiert die Notwendigkeit einer weiteren Operation (Mader et al. 1996) und reduziert das Risiko einer Reinfektion sowie Entwicklung von Resistenzen.

2.4.2 Träger auf Basis von PMMA

2.4.2.1 Knochenzement

1970 berichteten erstmalig Buchholz und Engelbrecht über den Einsatz von Gentamicin-haltigem Knochenzement zur Behandlung von infiziertem Gelenkersatz mit erfolgreicher Senkung der Infektionsrate (Buchholz et al. 1981; Buchholz und Engelbrecht 1970). Die Verwendung von Polymethylmethacrylat gilt auch heute noch als Standard in der orthopädischen Chirurgie (Joseph et al. 2003; Klemm 1993; Ostermann et al. 1995).

Der Einsatz von Knochenzement zur postoperativen, antiinfektiven Behandlung ist mit einigen Nachteilen verbunden. Die Druckfestigkeit des Zements kann durch Beimischung von Antibiotika beeinträchtigt werden (Nelson et al. 1978), die – zudem unvollständige – Freisetzung erstreckt sich auf Wochen und Monate (Diez-Pena et al. 2002; van de Belt et al. 2000). Die Auswahl des richtigen Antibiotikums ist eingeschränkt, es muss eine geeignete Wasserlöslichkeit aufweisen, um die Diffusion aus dem Zement zu ermöglichen. Weiterhin ist eine kurzzeitige Hitzestabilität notwendig, da bei der Polymerisation Temperaturen bis zu 100 °C entstehen können. Zu guter Letzt sollte ein anti-infektiver Effekt schon bei niedrigen Dosen auftreten, um den nachteiligen Effekt der höheren Antibiotikum-Beladung auf die mechanischen Eigenschaften zu vermeiden. Ein weiterer Nachteil besteht in der Behinderung des Sekretabflusses durch den Zement aus dem ausgeräumten Bereich sowie die Entfernung des Zements im Falle eines Re-Débridements (Ruszczak und Friess 2003).

Weitere unliebsame Eigenschaften beinhalten systemische Toxizität der Knochenzemente durch absorbierte Monomere, eine dadurch verursachte Hypotension ist umstritten. Die Hitze des Zements bei der Polymerisation kann thermische Verletzungen nach sich ziehen (McLaren 2004). Außerdem sollen Polymethylmethacrylate zu einer verminderten Funktion

von Zellen des Immunsystems sowie lokaler Immunsuppression führen (Horowitz et al. 1991).

2.4.2.2 Kugelketten

Klemm entwickelte Ketten, bei denen Gentamicin-imprägnierte Zementkugeln auf chirurgischen Draht aufgefädelt wurden (Klemm 1979). Die Kugeln weisen einen Durchmesser von 7 mm auf, wiegen 0,2 g und enthalten 7,5 mg Gentamicinsulfat sowie als Röntgenkontrastmittel Zirkoniumoxid. In Europa werden diese Ketten unter dem Handelsnamen Septopal[®] vertrieben.

In Elutionsstudien wurde die Antibiotika-Freisetzung aus unterschiedlichen Methylmethacrylaten untersucht (Bowyer und Cumberland 1994; Nelson et al. 1992; Nelson et al. 1994). Sowohl die Form als auch die Art des MMA besitzen einen signifikanten Einfluss auf die Höhe und die Dauer der Antibiotika-Freisetzung. Die besten Ergebnisse erzielten die Kombinationen von Tobramycin, Gentamicin oder Vancomycin mit MMA. Das beste Freisetzungsprofil bewiesen die Septopal[®]-Ketten aus Palacos[®]-Zement und Gentamicin (Patzakis et al. 1993). Werden die Kugeln im Körper belassen, sinkt der Antibiotikumspegel mit der Zeit auf subtherapeutische Dosen, die über einen langen Zeitraum eluiert werden (Neut et al. 2003). Die Oberfläche bietet gute Bedingungen für Biofilm-bildende Bakterien (Kanellakopoulou und Giamarellos-Bourboulis 2000; Kendall et al. 1996; Neut et al. 2001; Siverhus und Edmiston 1991) und es wächst die Gefahr der Resistenzentwicklung. Damit die Kugeln nicht als Fremdkörper agieren, auf dem Bakterien wachsen und eine erneute Infektion auslösen können, müssen die Ketten in einer weiteren Operation entfernt werden. Neut et al. beließen die Kugeln 5 Jahre im Körper und demonstrierten sowohl die Kolonisation mit Bakterien als auch die Entwicklung von Gentamicin-resistenten Stämmen (Neut et al. 2003). Mit einer weiteren Operation verbunden sind die Gefahr von zusätzlichen Schmerzen und Komplikationen bei der Anästhesie sowie zusätzliche Kosten.

2.4.3 Knochenersatzstoff/Träger auf Basis von HA und TCP

Als mineralischer Hauptbestandteil von Knochen und Zähnen wird Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) bereits weitläufig in Form von Granulat oder porösen Blöcken als Knochenersatzmaterial eingesetzt. Es weist eine knochenähnliche Struktur auf, ist nicht immunogen, nicht toxisch, osteokonduktiv, biokompatibel und bioaktiv (Belcarz et al.). Diese Eigenschaften variieren mit dem Reinheitsgrad, der Größe und Morphologie der Poren sowie der kristallinen Struktur (Sopyan 2008). Auch als Beschichtung metallischer Implantate findet Hydroxylapatit Einsatz (Wen et al. 2000). Im Gegensatz zu Trikalziumphosphat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) gilt HA als nicht resorbierbar. In-vivo-Studien zeigen, dass gesintertes HA nicht der Biodegradation unterliegt (de Bruijn et al. 1994; Hasegawa et al. 2003; Klein et al. 1983). Grund dafür sind unter anderem die kristalline Struktur, Dichte und Porosität.

Anfang der 90iger Jahre untersuchten Uchida et al. Hydroxylapatit als Trägermaterial für die lokale Chemotherapie nach Exzision von Knochentumoren (Uchida et al. 1992). Im gleichen Jahr setzten Shinto et al. poröse HA-Keramik-Blöcke als Träger für 3 unterschiedliche Antibiotika ein und untersuchten ihre Freisetzungskinetik in vitro sowie für Gentamicin im Tierexperiment (Shinto et al. 1992). Cornell et al. kamen in ihren Untersuchungen zu dem Schluss, dass die zusätzliche Bestückung mit dem schwer löslichen Gentamicin die Effektivität für den lokalen Einsatz von HA erhöht (Cornell et al. 1993).

Nach klinischem Einsatz an chronischer Osteomyelitis erkrankter Männern und Frauen in einem durchschnittlichen Alter von 38,7 Jahren, empfahlen Yamashita et al. ergänzend zur Herdsanierung und systemischen Antibiose die lokale Behandlung mit Antibiotika-imprägnierten HA (Yamashita et al. 1998). Sie kamen zu dem Ergebnis, dass poröses Hydroxylapatit gegenüber PMMA einige Vorteile bietet. Jedes Antibiotikum kann inkorporiert werden, da es keinem thermischen Schaden unterliegt, die Freisetzungskinetik gute Ergebnisse ergibt, es kompatibel ist, mechanische Stabilität bietet und keine weitere Operation notwendig ist (Shinto et al. 1992; Yamashita et al. 1998). In einer tierexperimentellen Studie von Korkusuz und Mitarbeiter mit Ratten fanden diese heraus, dass die lokale Antibiotika-Konzentration 2,5-mal höher ist und 1,2-mal länger andauert als bei Kunstharz. Es gelang die Eradikation der Infektion, ohne das Metallimplantat entfernen zu müssen (Korkusuz et al. 1993). Laut Korkusuz et al. liegt allerdings der Nachteil beim Einsatz von HA darin begründet, dass nach der Elution das Hydroxylapatit als Fremdkörper agieren

und die Infektion somit wiederkehren kann. Auch kann die lange Freisetzungskinetik Resistenzen verursachen (Korkusuz et al. 1993).

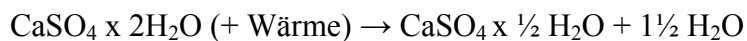
Hasegawa und Mitarbeiter vertraten die Meinung, dass HA idealerweise zum Einwachsen des Knochens große Poren ($> 50\mu\text{m}$) (Klawitter und Hulbert 1971) sowie für die langsame Antibiotika-Freisetzung kleine Poren aufweisen sollte. Daher entwickelten sie ein Trägersystem aus Hydroxylapatit mit bimodaler Verteilung der Porengröße (kleine Poren intragranular im nm-Bereich, große Poren im μm -Bereich und zusätzlich Querverbindungen) und untersuchten die Antibiotika-Freisetzung in vitro sowie die Osteokonduktivität in vivo. Auch nach Hasegawa et al. besteht der Vorteil des HA gegenüber PMMA in einer langsamen Freisetzung, Ausbleiben eines thermischen Schadens, der Biokompatibilität, keiner weiteren Operation sowie dem Einsatz als Arzneimittelträger wie auch als Knochenersatzmaterial (Hasegawa et al. 2004).

Shirtliff et al. verglichen die Freisetzung von Vancomycin aus Hydroxylapatit sowie aus PMMA. 81,8 % der Infektionen wurden mit HA als Transportsystem ausgemerzt, während es bei PMMA nur 70 % waren. Die Forscher kamen wie die anderen Autoren zu dem Schluss, dass HA einen ausreichenden antibiotischen Spiegel zur Behandlung einer Infektion liefert (Shirtliff et al. 2002).

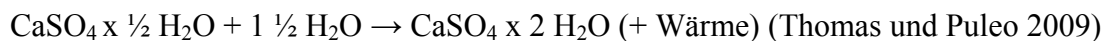
Als anorganisches Trägersystem für Arzneimittel wurden bisher untersucht: Reines HA (Itokazu et al. 1998; Itokazu et al. 1995; Korkusuz et al. 1993; Saito et al. 2002; Shinto et al. 1992; Yamashita et al. 1998), biphasische Kalziumphosphat-Keramiken (HA und β -TCP) (Guicheux et al. 1998), Kalziumphosphat-Zement (Sasaki und Ishii 1999) und Kalziumphosphat-Beschichtungen (Radin et al. 1997), sowie Kombinationen mit HA, z.B. karbonisierte HA-beschichtete Titanium-Implantate (Stigter et al. 2004), HA-Chitosan-POP (Buranapanitkit et al. 2004) und HA-TCP-Poly-(DL-lactide) (Baro et al. 2002; Sanchez et al. 2001), um Eigenschaften und Freisetzungskinetiken zu verbessern. Auch über den Einsatz von Proteinen, wie Gelatine (Sivakumar und Panduranga Rao 2002) und Keratin (Belcarz et al. 2009), zur Modifikation von HA wurde berichtet.

2.4.4 Knochenersatzstoff/Träger auf Basis von Kalziumsulfat

In Abhängigkeit vom Wassergehalt ist Kalziumsulfat in natürlicher Form als Anhydrid (CaSO_4) oder als Gips ($\text{CaSO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) vorhanden (Thomas und Puleo 2009). Die Erwärmung von Gips auf 110°C geht mit einem Wasserverlust einher, dieser Prozess wird als Kalzinierung bezeichnet. Das Produkt, auch bekannt als „Plaster of Paris“, ist Kalziumsulfat-Hemihydrat:



Kalziumhemihydrat kommt in einer α - und β - Form vor. Obwohl beide Formen chemisch identisch sind, unterscheiden sie sich in ihren physikalischen Eigenschaften. α - Kalziumsulfat besitzt eine höhere Dichte, ist hart und weniger wasserlöslich als die β -Form. Wird das pulverisierte Hemihydrat erneut mit Wasser vermischt, entsteht über eine exotherme Reaktion Kalziumsulfatdihydrat:



Mit der zugegebenen Wassermenge kann man die Porosität beeinflussen. Viel Wasser verursacht demnach eine höhere Porosität als eine geringe Menge. Bei einem Verhältnis von 0,25:1–1:1 variiert sie von 10–85% (Skinner und Phillips 1967).

2.4.4.1 Geschichte des Kalziumsulfats in der Medizin

Erstmals wurde Kalziumsulfat im 19. Jahrhundert als „Plaster of Paris“ zur Schienung und Bandagierung verletzter Gliedmaßen verwendet. Auch zur Auffüllung von Knochendefekten findet Kalziumsulfat schon seit über 100 Jahren Einsatz als gewebeverträgliches sowie leicht resorbierbares Material (Dreesmann 1892) und wird bis zum heutigen Tag in der Wiederherstellungschirurgie verwendet. 1928 führte Petrova erstmalig durch Zugabe von Kreolin und Rivanol einen antiseptischen Schutz herbei (Petrova 1928). Nach Einführung der Antibiotika behandelte Kovacevic 3 Patienten, die an hämatogener Osteomyelitis erkrankt waren, nach Diaphysektomie mit einer Mischung aus Gips, Penizillin und Sulfonamid (Kovacevic 1953). Korendiasev bestätigte diese Ergebnisse sowohl im Tierversuch als auch in klinischen Studien (Korendiasev 1959). Peltier und Mitarbeiter führten umfangreiche Studien zur Resorption und Defektheilung nach Implantation von Gips in Tierversuchen sowie in

klinischen Einsatz durch (Peltier 1959; 1961; Peltier et al. 1957; Peltier und Orn 1957). Coetzee kam zu dem Ergebnis, dass die Implantation von Kalziumsulfat zu einer pH-Absenkung und somit zu Wundheilungstörungen führt. Der Versuch, den pH durch die Vermischung von pulverisiertem CaSO_4 mit 20%iger NaCl-Lösung anzuheben, verursachte lokale Adenitiden sowie starke Schmerzen (Coetzee 1980). Eine alternative Erklärung für den gelegentlichen serösen Abfluss ist nach Kelly ein osmotischer Effekt (Kelly et al. 2001). Weitere Studien zur Verdeutlichung der exakten Mechanismen werden jedoch noch benötigt.

Mackey et al. verglichen 1982 die Dissolution und Antibiotika-Freisetzung von Lincomycin, Fusidin, Cephazolin und Gentamicin in vitro. Sie verwendeten die Pelletform, um im Gegensatz zu einer soliden Masse, Resorption und Antibiotika-Freisetzung durch die größere Oberfläche zu erhöhen mit dem Ergebnis, dass Gentamicin-beladene Kalziumsulfat-Pellets in den ersten 24 Stunden 80 % ihres Wirkstoffs freigaben. (Mackey et al. 1982).

Dahners und Funderburk behandelten an Osteomyelitis erkrankte Kaninchen mithilfe von Gentamicin-versetzter bzw. -freier Gipspaste. Eine Stunde nach der Operation war bereits das Konzentrationsmaximum von Gentamicin im Blut erreicht. Nach 5 Wochen wurden die Tiere getötet, jeweils die gesamte Tibia pulverisiert und sowohl Keimzahl als auch der Gentamicin-Gehalt bestimmt. Nur 2 von 10 wiesen keine Bakterien auf. Daher empfahlen die Autoren zusätzlich die systemische Antibiose (Dahners und Funderburk 1987).

Miclau et al. untersuchten in einer In-vitro-Studie das Freisetzungsverhalten von Tobramycin aus unterschiedlichen Implantatmaterialien wie Kalziumsulfat, PMMA, demineralisierte Knochenmatrix sowie autologem Knochentransplantat. In den ersten 24 Stunden setzte in aufsteigender Reihenfolge PMMA 7 %, CaSO_4 17 %, demineralisierte Knochenmatrix 45 % und das Knochentransplantat 70 % des Antibiotikums frei. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass letztere zur Kurzzeitversorgung, z.B. von offenen Frakturen, und PMMA sowie Kalziumsulfat zu Langzeitbehandlungen, wie die der Osteomyelitiden, eingesetzt werden sollten (Miclau et al. 1993).

Mousset et al. hingegen erforschten in Elutionsstudien das Freisetzungsverhalten 11 verschiedener Antibiotika aus Kalziumsulfat-Pellets sowie ihre Thermostabilität bei 37 °C. Insbesondere Aminoglykoside wiesen eine geeignete Thermostabilität auf und konnten für mindestens 1 Woche eine konstante Freisetzung gewährleisten. Während Tobramycin am

8. Tag therapeutische Spiegel aufwies, reichte die Elutionsrate von Gentamicin bis zum 11. Tag. Auch Glykopeptide verhielten sich bei 37 °C stabil und wurden innerhalb 1 Woche freigesetzt. Hingegen eluierten die Cephalosporine sehr schnell, waren bei angegebener Temperatur instabil und zeigten eine schlechte Wirksamkeit gegen *Staphylococcus aureus* (Mousset et al. 1995).

1997 wurden Tobramycin-impregnierte Kalziumsulfat-Pellets klinisch als Medizinprodukt (Osteoset[®], Wright Medical Technology, Inc, Arlington, TN) eingeführt (Kelly et al. 2001; Mirzayan et al. 2001). Das chirurgisch verwendbare Kalziumsulfat in reiner kristalliner Form als α -Hemihydrat unterscheidet sich von dem herkömmlich eingesetzten β -Hemidrat. Der kontrollierte Herstellungsprozess und die damit verbundene Einheit in kristalliner Form und Größe ermöglicht voraussehbare Resorptionsraten. Osteoset[®] ist biodegradierbar, röntgendicht und in 2 Größen erhältlich: 4,8 x 3 mm oder 3 x 2,5 mm (Kelly et al. 2001). Die deklarierten Indikationen beinhalten eine Vielzahl chirurgischer Situationen wie Trauma, Tumor und Rekonstruktion (Lee et al. 2002). Nach Implantation in den Knochen sollen lokal über einen anhaltenden Zeitraum hohe Antibiotika-Konzentrationen erreicht werden (Pujalte et al. 1998; Richelsoph et al. 1998). In der Zwischenzeit dienen die Formkörper als Platzhalter und ermöglichen die Bildung neuen Knochens bei gleichzeitiger Degradation des Kalziumsulfats (Coetzee 1980; Kelly et al. 2001; Moore et al. 1987; Snyders et al. 1993).

2.4.5 Proteine als Arzneimittelträger

Proteine als Arzneimittelträger werden bereits einzeln oder in Kombination klinisch eingesetzt, wie z.B. mikrofibrilläres Kollagen Typ 1, lyophilisierter Kollagenschwamm, Gelatine, humanes Fibrinogen und Thrombin, Albumin und Eigenblutblombe (Allababidi und Shah 1998; Faupel et al. 1986; Hettfleisch und Schottle 1993; Itokazu et al. 1997; Letsch et al. 1993; Nazarov et al. 1988). In Elutionsstudien zeigen diese Materialien eine vollständige Freigabe der Antibiotika innerhalb von Stunden bis wenigen Tagen (McLaren 2004).

2.4.5.1 Kollagen

Nach erfolgreichem Einsatz von Kollagen für die lokale Hämostase wurden Kollagen-Gentamicin-Vliese entwickelt. 1986 fanden sie erstmalig klinische Verwendung (Ascherl et al. 1986). 63 von 67 Patienten mit posttraumatischer oder postoperativer Osteomyelitis konnten mit Kollagen-Gentamicin-Vliesen erfolgreich behandelt werden. Kollagen ist charakterisiert

durch gute Toleranz und vollständige Dissolution mittels Phagozytose und enzymatischer Degradation. Je nach Präparation erhält man für Gentamicin eine Freisetzung von Tagen oder Wochen. In einem Freisetzungskinetikmodell wurden 95 % nach 1,5 Stunden freigesetzt – im Gegensatz zu PMMA mit 8 % (Sorensen et al. 1990). Eine längere Freisetzungskinetik ergibt die zusätzliche Verwendung von hydrophoben Gentamicin crobefat (Walenkamp und Karsemaker 1998).

Als natürliches Polymer und Hauptbestandteil von organischem Gewebe liegt Kollagen im besonderen Fokus des Interesses für den Transport von Arzneimitteln. Es kann aus Tierhaut (Rind/Schwein) oder Achillessehnen (Rind/Pferd) gewonnen werden (Ruszczak und Friess 2003). Kollagen ist voll kompatibel sowie nicht toxisch. Strukturelle, physikalische, chemische, biologische und immunologische Eigenschaften sind bekannt und dokumentiert. (Ramshaw et al. 1996).

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Produkten kann natives, unlösliches Kollagen oder – durch pH bzw. enzymatische Einwirkung – Kollagen in Suspension verwendet werden. Kollagen als Träger für Arzneimittel wird in Pulver oder flüssiger Form, als solide und komprimierte Masse, als Membran oder Schwamm mit unterschiedlicher Porosität sowie unterschiedlichem Kollagengehalt angeboten. Der Kollagenschwamm als kommerzielles Trägermaterial für Gentamicin wurde in den frühen 80er Jahren entwickelt. Als Produktbeispiele des Herstellers Innocoll (Saal/Donau, Deutschland) seien hier zu nennen: Sulmycin®-Implant, Garacon®, Gentacoll®, Garamycin®-Schwamm, Collatamp®-G, Collatamp®-EG (Ruszczak und Friess 2003).

Das Arzneimittel kann durch Hinzufügen in eine kollagene Dispersion während des Herstellungsprozess (Lyophilisation) inkorporiert werden. Durch die Lyophilisation kann eine gleichmäßige Verteilung des Arzneimittels ermöglicht und auch die Porengröße zur Steuerung der Freisetzungskinetik variiert werden (Geiger und Friess 2002). In einer Vergleichsstudie mit 5 verschiedenen Antibiotika erzielte Gentamicin die besten Ergebnisse (Wachol-Drewek et al. 1996).

2.4.6 Synthetische, resorbierbare Polymere als Arzneimittelträger

Weltweit wurden verschiedene synthetische, resorbierbare Polymere entweder einzeln oder in Kombinationen untersucht, wie z.B. Polyanhydride P(FAD-SA), Polylactide (PLA) und Polyglycolide (PGA), Poly-DL-Lactide-co-Glycolide (PLGA) und Polyhydroxybutyrate-co-Hydroxyvalerate (PHB-HV) (Ambrose et al. 2003; Calhoun und Mader 1997; Kanellakopoulou und Giamarellos-Bourboulis 2000; Lin et al. 1999; Ozalp et al. 2001). Diese Materialien wurden als Trägersysteme für Antibiotika eingesetzt. Änderung von Materialeigenschaften sowie Kombinationen von 2 oder mehreren dieser Materialien führen zu unterschiedlichen Freisetzungsraten (Ambrose et al. 2003).

2.5 Verwendete Antibiotika

2.5.1 Aminoglykoside

Die Aminoglykoside Gentamicin (Ascherl et al. 1990; Rutten und Nijhuis 1997; Stemberger et al. 1997) sowie Tobramycin (Hendricks et al. 2001; Lindsey et al. 1993; Nelson et al. 2002) werden bereits erfolgreich zur lokalen Anwendung eingesetzt. Insbesondere Gentamicin ist gegen eine große Bandbreite an Mikroorganismen wirksam, vor allem aber gegen gramnegative Keime und einen Teil der Kokken, die bei Knocheninfekten auftreten. Gegen Anaerobier sind Aminoglykoside unwirksam. Gentamicinsulfat zeigt in Wasser eine hohe, in Körperflüssigkeiten hingegen eine geringe Löslichkeit. Durch seine polare Struktur weist es eine schlechte Gewebegängigkeit auf und wird nur schlecht aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert. Der therapeutische Spiegel reicht von 4–12 µg/ml, allerdings sollte die Serumkonzentration 10–12 µg/ml nicht übersteigen. Durch Überdosierung, aber insbesondere durch die Verabreichung über einen langen Zeitraum, akkumulieren Aminoglykoside in Niere sowie im Innenohr und gelten somit als nephro- und ototoxisch. Während Schäden an der Niere reversibel sind, besteht das Risiko von dauerhaften Innenohrschäden. Tobramycin weist einen therapeutischen Bereich von 4–8 µg/ml auf.

2.5.2 Glykopeptide




Vancomycin zählt zu den Glykopeptiden und hemmt den Aufbau der Bakterienzellwand grampositiver Bakterien. Gegen gramnegative Keime ist es unwirksam. Es zählt zu den Reserveantibiotika gegen multiresistente grampositive Kokken, wie MRSA-Keime. Bei

systemischer Verabreichung ist die Gewebegängigkeit eingeschränkt, insbesondere in Knochen und Lunge. Es treten immer mehr Resistenzen gegen Vancomycin auf. Ebenso wie Gentamicin muss es parenteral verabreicht werden und verfügt über nephro- wie ototoxische Nebenwirkungen. Der therapeutische Bereich liegt zwischen 5 und 40 µg/ml.

3 Material und Methoden

3.1 Implantate

Tab. 3: Implantate im Vergleich

	Palasorb-G Forschungspräparat	Palasorb-V Forschungspräparat	Osteoset® Vergleichspräparat
Hersteller	Heraeus Medical GmbH Wehrheim, Deutschland	Heraeus Medical GmbH Wehrheim, Deutschland	Wright Medical Technology, Inc., Arlington, US
Masse pro Formkörper	250 mg (2 Kugeln = 500 mg)	35 mg (14 Kugeln = 490 mg)	107,5 mg (5 Kugeln = 537,5 mg)
Form			
Durchmesser	6,0 mm	3,0 mm	4,8 mm
Höhe	6,0 mm	3,0 mm	3,0 mm
Antibiotikagehalt pro Formkörper	Gentamicinsulfat: 1,66 Gew.-% Gentamicinbase: 1 % = 2,5 mg	Vancomycinhydrochlorid: 1,10 Gew.-% Vancomycinbase: 1 % = 0,35 mg	Tobramycinsulfat: 4,0 Gew.-% Tobramycinbase: 2,66 % = 2,86 mg
Zusammensetzung der Formkörper	Kalziumsulfat-Dihydrat: 71,59 Gew.-% Kalziumkarbonat: 17,90 Gew.-% Tripalmitin: 8,85 Gew.-%	Kalziumsulfat-Dihydrat: 72,00 Gew.-% Kalziumkarbonat: 18,00 Gew.-% Tripalmitin: 8,90 Gew.-%	Kalziumsulfat- Hemihydrat: 96 Gew.-%

3.2 Tierversuch

3.2.1 Versuchstiere

Hierzu werden weibliche Kaninchen der Rasse Weiße Neuseeländer mit einem Durchschnittsgewicht von ca. 4,5 kg von der Versuchstierzuchtstelle Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) als SPF-Tiere bezogen. Die Tierhaltung erfolgt im Zentrum für präklinische Forschung (ZPF) des Klinikums rechts der Isar in München, wo die Tiere einzeln in Kunststoffkäfigen auf Lochböden (Typ „Europa 92“, Ehret GmbH, Emmendingen) untergebracht sind. Als Futter erhalten sie ein pelletiertes Alleinfutter (Altromin Haltungsdiät 2120, Altromin Tier-Labor-Service, Lage), während ihnen zusätzlich täglich frisches Heu und Möhren und in regelmäßigen Abständen hartes Brot gereicht wird. Wasser steht ad libitum über eine Nippeltränke zur Verfügung und wird täglich frisch aufgefüllt. Die Kaninchen sind durchschnittlich einem Kunstlicht von 50 Lux im Hell-Dunkel-Rhythmus von jeweils 12 Stunden ausgesetzt. Es herrscht eine konstante Temperatur von 21 °C und eine relative Luftfeuchtigkeit von 55 % ± 5. Die Identifizierung erfolgt durch eine Ohrtätowierung sowie eine vom ZPF zugeteilte Nummer. Der Versuch ist von der Regierung Oberbayern unter der Nummer 209.1/211-2531.2-22/05 genehmigt.

3.2.2 Präoperative Maßnahmen

Nach Ankunft der Tiere beträgt die Eingewöhnungszeit mindestens 2 Wochen. Die Tiere werden gewogen und klinisch untersucht. Gleichzeitig wird ein kleines Blutbild angefertigt sowie der Gehalt an Kalzium und alkalischer Phosphatase bestimmt.

3.2.3 Versuchsanordnung

Die Tiere werden postoperativ in folgende Versuchsgruppen randomisiert:

Versuchsgruppe 1: Untersuchung der Osteogenese, Gewebeverträglichkeit und Biodegradation der Formkörper sowie des Antibiotikagehalts im Serum mit insgesamt 54 Tieren (Tab.4).

Versuchsgruppe 2: Untersuchung des Antibiotikagehalts im Knochen mit insgesamt 31 Tieren (Tab. 5).

Tab. 4: Versuchsgruppe 1.

Überlebenszeit	Anzahl Tiere	Produkt	Antibiotikum	Grundgemisch	Übersicht Tiernummern
4 Wochen	4	Palasorb-G	Gentamicin	Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat, Tripalmitat	10, 13, 89, 91
	4	Palasorb-V	Vancomycin	Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat, Tripalmitat	123, 127, 131, 132
	4	Osteoset®	Tobramycin	Kalziumsulfat	133, 129, 130, 128
6 Wochen	4	Palasorb-G	Gentamicin	Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat, Tripalmitat	2, 5, 116, 118
	4	Palasorb-V	Vancomycin	Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat, Tripalmitat	118 b, 119, 120, 121
	4	Osteoset®	Tobramycin	Kalziumsulfat	122, 124, 126, 125
8 Wochen	5	Palasorb-G	Gentamicin	Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat, Tripalmitat	17, 9, 11, 114, 115
	5	Palasorb-V	Vancomycin	Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat, Tripalmitat	96, (97), 100, 102, 103
	5	Osteoset®	Tobramycin	Kalziumsulfat	88, 90, 92, 87, 101
12 Wochen	5	Palasorb-G	Gentamicin	Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat, Tripalmitat	82, 4, 6, 12, 41
	5	Palasorb-V	Vancomycin	Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat, Tripalmitat	109, 112, 106, 108, 104
	5	Osteoset®	Tobramycin	Kalziumsulfat	82 b, 83, 84, 85, 86

Tab. 5: Versuchsgruppe 2.

Überlebenszeit	Anzahl Tiere	Produkt	Antibiotikum	Grundgemisch	Übersicht Tiernummern
1 Tag	3	Palasorb-G	Gentamicin	Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat, Tripalmitat	157, 158, 177
	3	Palasorb-V	Vancomycin	Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat, Tripalmitat	159, 160, 178
	3	Osteoset®	Tobramycin	Kalziumsulfat	179, 180, 181
3 Tage	3	Palasorb-G	Gentamicin	Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat, Tripalmitat	149, 150, 173
	3	Palasorb-V	Vancomycin	Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat, Tripalmitat	147, 148, 156
	3	Osteoset®	Tobramycin	Kalziumsulfat	174, 175, 176
14 Tage	3	Palasorb-G	Gentamicin	Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat, Tripalmitat	151, 152, 153
	3	Palasorb-V	Vancomycin	Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat, Tripalmitat	155, 182, 183
	3	Osteoset®	Tobramycin	Kalziumsulfat	184, 185, 186
84 Tage (12 Wochen)	2	Palasorb-G	Gentamicin	Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat, Tripalmitat	110, 111
	2	Palasorb-V	Vancomycin	Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat, Tripalmitat	107, 99
	-	Osteoset®	Tobramycin	Kalziumsulfat	-

3.3 Operationsdurchführung

3.3.1 Operationsvorbereitung und Anästhesie

Zur Anästhesie wird den Tieren intramuskulär Medetomidin (Domitor® , Fa. Pfizer, Karlsruhe, 0,25 mg/kg,) und Ketamin (S-Ketanest® , Fa. Parke-Davis GmbH, Berlin, 17 mg/kg) in einer Mischspritze verabreicht. Nach Bedarf wird die Narkose mit einer Verdünnung von 70 mg Ketamin und 1 mg Medetomidin auf 10 ml isotonischer Kochsalzlösung intravenös unter Spontanatmung aufrechterhalten. Die intra- und postoperative Analgesie erfolgt durch die intravenöse Applikation von Metamizol (Novaminsulfon® , Fa. Ratiopharm, Ulm, 30 mg/kg) über eine Ohrbraunüle. Die Kornea wird beidseitig mit einer Augensalbe (Bepanthen® , Fa. Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Whylen) geschützt. Die zu operierende linke

Hintergliedmaße wird geschoren, die Haut gereinigt und desinfiziert (Cutasept[®], Fa. Bade Chemie, Hamburg, Deutschland).

3.3.2 Operationsprotokoll

Lateral wird distal der Tuberositas tibiae die Haut mit einem 1,5 cm langen Schnitt inzidiert und nach medial verschoben. Mit dieser Hautplastik soll eine Infektion des Implantationslagers durch selbstständiges Ziehen der Fäden durch die Kaninchen verhindert werden. Medial wird der Schnitt bis auf den Knochen vertieft und mit einem Raspatorium das Periost vorsichtig zurückgeschoben. Mithilfe einer wassergekühlten Diamantfräse wird ein Knochenzylinder entfernt und damit die Markhöhle eröffnet. Mittels einer Pinzette wird die entsprechende Anzahl der Formkörper (Palasorb-G: 2 Stück, Palasorb-V: 14 Stück, Osteoset[®]: 5 Stück) in die Markhöhle eingesetzt (siehe Abb. 1–3). Implantationszeitpunkt, Anzahl und Art der implantierten Formkörper werden registriert. Anschließend erfolgt der Verschluss der Markhöhle mit der herausgefrästen Knochenschuppe. Muskulatur und Faszie werden mit resorbierbarem (3-0 Vicryl[®], Fa. Ethicon GmbH, Norderstedt), die Hautwunde mit nicht resorbierbarem Faden (3-0 Prolene[®], Fa. Ethicon GmbH, Norderstedt) verschlossen und anschließend ein Sprühverband (Opsite[®], Hull, England) aufgebracht. Zur Antagonisierung des Medetomidins wird nach der Operation Atipamezol (Antisedan, Fa. Pfizer, 0,25 mg/kg) intramuskulär injiziert.

Bilderreihe Operation:



Abb. 1: Herausfräsen des Knochendeckels.

Abb. 2: Implantationszugang.

Abb. 3: Implantation eines Formkörpers.

3.3.3 Postoperative Nachsorge

3.3.3.1 Medikation und allgemeine Kontrollen

Zur postoperativen Analgesie wird den Tieren Buprenorphin (Temgesic[®], Fa. Essex Pharma, München, 0,03 mg/kg s.c.) über 4 Tage und Carprofen (Rimadyl[®], Fa. Pfizer, Karlsruhe 4 mg/kg s.c) über 7 Tage verabreicht. Dabei wird täglich das Allgemeinbefinden überprüft, die Körpertemperatur gemessen sowie die operierte Gliedmaße auf Schwellung, Schmerzhaftigkeit und Gebrauch untersucht. Die Antibiotikabestimmung im Serum erfolgt zunächst nach 24, 48 und 72 Stunden und anschließend nach 7, 14, 21 und 28 Tagen durch das Labor „LC Labor Consult GmbH“ in Dieburg. Dazu wird aus der mittleren Ohrarterie Vollblut in einem Serumröhrchen entnommen und 10 Minuten bei 20 °C und 3500 x g zentrifugiert (Varifuge 3.OR, Heraeus Sepatech, Osterode am Harz). Das Serum wird abgehebert und bis zur Analyse bei -20 °C aufbewahrt. In wöchentlichen Abständen werden Gewichtskontrollen und klinische Untersuchungen der operierten Tiere durchgeführt. Vor der Operation sowie in wöchentlichen Abständen bis zur Euthanasie erfolgt die Bestimmung des kleinen Blutbilds sowie des Serumgehalts an Kalzium und alkalischer Phosphatase im Institut der klinischen Chemie und Pathobiochemie, Klinikum rechts der Isar in München.

3.3.3.2 Behandlung einzeln erkrankter Tiere

Tiere, die sich selbstständig einzelne Hautfäden gezogen haben, wurden zusätzlich parenteral mit dem Antibiotikum Enrofloxacin (Baytril[®] 2,5%, Fa. Bayer, Leverkusen, 10 mg/kg s.c.) versorgt.

3.3.3.3 Röntgenkontrollen

Unmittelbar nach der Implantation und am Versuchsende werden die operierten Gliedmaßen unter Kurzanästhesie mit 0,5 ml Midazolam (1–3 mg/kg, 15 mg/3 ml Ratiopharm, Ulm) und Propofol (Propofol 1 %, Fa. Fresenius, Bad Homburg, verabreicht nach Wirkung mit maximal 5 ml) geröntgt (Philips Super 80CP, geröntgt bei 44 kV und 4 mAs). Die Röntgenbilder werden digital festgehalten und ausgewertet.

3.3.3.4 Polychrome Sequenzmarkierung

Bezeichnung und Eigenschaften der Farbstoffe

Mit Ausnahme des Tetrazyklins (Terramycin[®] 100, Fa. Pfizer, Karlsruhe) werden Alizarin-Komplexon (Sigma A3882), die Calcein-Grün-Indikator-Lösung (Merck 2315), die Xylenol-Orange-Lösung (Xylenol-Orange-Natriumsalz Riedel-de Haen 33825) und die Calcein-Blau-Lösung (Calcein Blue Sigma M1255) in der eigenen Klinikapotheke hergestellt. Dabei enthalten 100 ml 3 g des betreffenden Farbstoffs sowie 2 g Natriumhydrogencarbonat, aufgefüllt mit Wasser für Injektionszwecke. Der pH wird mittels verdünnter Salzsäure bzw. Natronlauge auf 7,2 eingestellt.

Tab. 6: Fluorochrome: Anregung, Emission, Fluoreszenzfarbe.

Substanz	maximale Anregung (nm)	maximale Emission (nm)	Fluoreszenzfarbe
Tetrazyklin	390–425	520–560	gelb-grün
Alizarin-Komplexon	530–580	624–645	rot
Calcein-Grün	494	517	grün
Xylenol-Orange	440/570	610	orange
Calcein-Blau	373	420–440	blau

Applikationsart/-zeitraum

Zur Untersuchung und Markierung der Knochenumbauvorgänge werden die Fluorochrome den Kaninchen nach folgendem Schema subkutan appliziert:

Tab. 7: Dosierungsschema Fluorochrome

Substanz	Dosierung mg/kg KGW	Tag p.op.
Tetrazyklin	30 mg	21. und 22.
Alizarin-Komplexon	30 mg	35. und 36.
Calcein-Grün	30 mg	49. und 50.
Xylenol-Orange	90 mg	63. und 64.
Calcein-Blau	30 mg	77. und 78.

3.3.3.5 Euthanasie

Die Euthanasie der Tiere erfolgt nach 4, 6, 8 und 12 Wochen durch eine Überdosis Pentobarbital-Natrium i.v. (Narcoren[®], Fa. Merial GmbH, Halbergmoos, 50 mg/kg).

3.4 Probengewinnung und Lagerung post mortem

3.4.1 Biokompatibilitätsgruppe

Die explantierten Tibiae werden zunächst in 100%igem Methanol aufbewahrt. Die Proben werden erst mittels μ -Computertomographie analysiert, anschließend erfolgt die histologische Auswertung sowohl histomorphologisch sowie fluoreszenzmikroskopisch hinsichtlich der Knochenregeneration.

3.4.2 Pharmakokinetikgruppe

Zur Analyse des Antibiotikagehalts der explantierten Tibiae werden die Proben bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren.

3.5 μ-Computertomographie

Folgende Proben werden mithilfe eines hochauflösenden μ-Computertomographen (μ-CT 80, Fa. Scanco, Brüttisellen, Schweiz) in der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Murnau analysiert.

Tab. 8: Übersicht der Proben für die Analyse mittels μ-Computertomograph

Überlebenszeit	Anzahl Tiere	Produkt	Antibiotikum	Grundgemisch	Übersicht Tiernummern
4 Wochen	3	Palasorb-G	Gentamicin	Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat, Tripalmitat	13, 89, 91
	3	Palasorb-V	Vancomycin	Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat, Tripalmitat	123, 127, 131
	3	Osteoset®	Tobramycin	Kalziumsulfat	128, 129, 130
6 Wochen	3	Palasorb-G	Gentamicin	Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat, Tripalmitat	2, 5, 116
	3	Palasorb-V	Vancomycin	Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat, Tripalmitat	118b, 119, 120
	3	Osteoset®	Tobramycin	Kalziumsulfat	124, 125, 126
8 Wochen	3	Palasorb-G	Gentamicin	Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat, Tripalmitat	9, 11, 14
	3	Palasorb-V	Vancomycin	Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat, Tripalmitat	96, 100, 103
	3	Osteoset®	Tobramycin	Kalziumsulfat	-
12 Wochen	3	Palasorb-G	Gentamicin	Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat, Tripalmitat	4, 12, 41
	3	Palasorb-V	Vancomycin	Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat, Tripalmitat	104, 108, 112
	3	Osteoset®	Tobramycin	Kalziumsulfat	-

3.6 Methodik der Histologie

Kontaktradiographie, Einbettung, Erstellung der Dünnschliffe, fotografische Dokumentation der polychromen Sequenzmarkierung sowie Oberflächenfärbung wurden durch eine beauftragte Histologin durchgeführt und werden daher in der Methodik nur kurz aufgeführt.

3.6.1 Kontaktradiographie

Die Tibiae werden in der Epiphysenfuge und 1 cm unterhalb des frontalen Knochenvorsprungs abgesetzt. Von den Präparaten werden Kontaktradiographien angefertigt. Als Filmmaterial dienen Kodak X-OMAT MA Filme.

3.6.2 Einbettung

Nach schonender Entfettung und Entwässerung erfolgen die Infiltration und Einbettung in Methylmethacrylat (nachzulesen in "Mikroskopische Technik", Seite 145–147 von Benno Romeis) (Romeis 1989). Die eingebetteten Proben werden sagittal gesägt (Exakt GmbH, Norderstedt) und zu Dünnschliffen mit einer Dicke zwischen 40 und 120 µm weiterverarbeitet (Planopol-V und Pedemax-2, Struers GmbH, Errath).

3.6.3 Oberflächenfärbung

Es handelt es sich um eine von der beauftragten Histologin selber entwickelte Oberflächenfärbung, die sie als modifizierte Grünwald-Giemsa-Färbung definiert und „K2“ nennt.

Tab. 9: Farbliche Darstellung einzelner Bestandteile nach Einbettung und Färbung.

Farbliche Darstellung	Bestandteile
orange/rot	Bindegewebe, Zellkerne
braun	Kollagenfibrillen
braun/rot/gelb	Knorpel, Osteoid
satt grün/blau	mineralisierter Knochen, Mineralisationskerne (punktförmig), abgelagerte Kalksalze (strukturlos)
hell-grün/blau	alter Knochen

Farbabweichungen von grün nach blau sind fotografisch bedingt. Unschärfen innerhalb der Aufnahmen lassen sich aufgrund des unterschiedlichen Schrumpfverhaltens der einzelnen Präparat-Komponenten (Knochen, Bindegewebe, Implantatmaterial) nicht vermeiden.

3.6.4 Dokumentation

Die Auswertung erfolgt an einem Leica DMRB (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland), die Befunde werden mit einer Zeiss Axiocam dokumentiert.

3.6.5 Methodik der Fluoreszenz

Vor dem Prozess der Oberflächenfärbung werden die Dünnschliffe mit oben genanntem Mikroskop (Leica DMRB, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland), das mit integriertem UV-Licht und Fluoreszenzfiltern für unten genannte Fluorochrome ausgestattet ist, fotografisch dokumentiert.

Tab. 10: Fluorochrome: Anregung, Emission, Fluoreszenzfarbe.

Substanz	maximale Anregung (nm)	maximale Emission (nm)	Fluoreszenzfarbe
Tetrazyklin	390–425	520–560	gelb-grün
Alizarin-Komplexon	530–580	624–645	rot
Calcein-Grün	494	517	grün
Xylenol-Orange	440/570	610	orange
Calcein-Blau*	373	420–440	blau

*Calcein-Blau kann mit dem verwendeten Mikroskop nicht dargestellt werden.

3.7 Methodik der Antibiotika-Bestimmung

3.7.1 Antibiotikafreisetzung in vitro

Als Freisetzungsmedium dient ein Biphosphat-Puffer (BPS) mit einem pH von 7,4 bei einer Temperatur von 37 °C. Die Inkubation erfolgt jeweils mit 6 Palasorb-G-, 15 Palasorb-V- bzw. 6 Osteoset®-Formkörpern. Täglich werden 20 ml des Freisetzungsmediums entnommen und durch 20 ml BPS-Puffer ersetzt. Die Bestimmung des freigesetzten Antibiotikums erfolgt mit einem TDx-Analyzer (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA).

3.7.2 Antibiotikafreisetzung in vivo

Die Antibiotikabestimmung im Serum erfolgt zunächst nach 24, 48 und 72 Stunden, anschließend nach 7, 14, 21 und 28 Tagen durch das Labor „LC Labor Consult GmbH“ in Dieburg (Gerät: Advia 1650, Testkit: ADVIA Chemistry entsprechend für Gentamicin, Vancomycin bzw. Tobramycin, Hersteller: Bayer Health Care LLC, Leverkusen, Deutschland). Dazu wird aus der mittleren Ohrarterie Vollblut in einem Serumröhrchen entnommen und 10 Minuten bei 20 °C und 3500 x g zentrifugiert (Varifuge 3. OR, Heraeus Sepatech, Osterode am Harz). Das Serum wird abgenommen und bis zur Analyse bei -20 °C aufbewahrt.

3.7.3 Antibiotika-Bestimmung in der Tibia

Insgesamt wurden 31 Proben auf ihren Antibiotikagehalt untersucht. Jeweils 11 Proben nach Implantation von Palasorb-G bzw. Palasorb-V sowie 9 Proben nach Implantation von Osteoset® (siehe Tab. 5 unter 3.2.3).

Zur Analyse dient das proximale $\frac{1}{3}$ der Tibia. Dieses wird zur Versprödung in flüssigen Stickstoff getaucht, anschließend mit der Dremel-Handsäge in Längsrichtung aufgesägt. Die Medulla wird mit einem scharfen Spatel isoliert, in einen Falcon Tube überführt und die Masse jeweils gravimetrisch bestimmt. Die Kortikalis wird nochmalig mit flüssigem Stickstoff versprödet und in einer Mühle zerkleinert. Nach Überführung in die Falcon Tubes erfolgt die gravimetrische Bestimmung der Masse. Zur Bestimmung des Antibiotikagehalts dient Sörensen-Puffer (Medulla in 10 ml, Kortikalis in 20 ml) mit einem pH von 7,4 und einer Temperatur von 37 °C. Nach 72-stündiger Inkubation wird jeweils das Extrakt zentrifugiert

und der Überstand eingefroren. Die Proben werden in dem Labor „LC Labor Consult GmbH“ in Dieburg auf ihren Antibiotikagehalt untersucht (Gerät: Advia 1650, Bayer Health Care, Testkit: ADVIA Chemistry entsprechend für Gentamicin, Vancomycin bzw. Tobramycin, Hersteller: Siemens Medical Solutions Diagnostics, Deutschland).

3.8 Versuche zur Blutgerinnung

Um den möglichen Einfluss des Kalziumträgers auf die lokale Blutgerinnung zu ermitteln, werden Untersuchungen mittels roTEG (Rotationsthromboelastographie) durchgeführt und Marker der aktivierten Gerinnung bestimmt. Zu diesem Zweck wird zunächst 3 verschiedenen Probanden Vollblut entnommen und dieses 8 Minuten mit den entsprechenden Formkörpern inkubiert. Als Versuchspersonen dienen:

Proband 1: weiblich, 32 Jahre alt

Proband 2: männlich, 62 Jahre alt

Proband 3: weiblich, 22 Jahre alt

Vor der Blutentnahme werden im Doppelansatz (Ansatz a und b) 4 Falcon Tubes (15 ml, Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) mit der entsprechenden Anzahl der Formkörper versehen, während ein Falcon Tube (Blank, „BL“) als Referenz leer bleibt. Anschließend werden diese nacheinander jeweils mit je 4 ml frisch entnommenen Humanblut befüllt und 8 Minuten inkubiert.

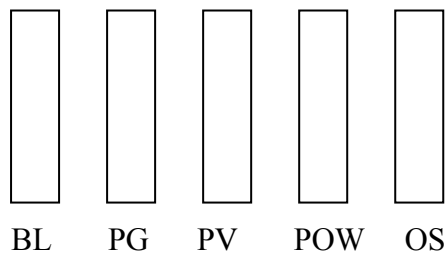


Abb. 4: Schema Ansatz a bzw. b:

Abkürzungen:

BL „Blank“ = Vollblut ohne Formkörper

PG „Palasorb-G“ = Vollblut inkubiert mit 2 Palasorb-G-Formkörpern

PV „Palasorb-V“ = Vollblut inkubiert mit 14 Palasorb-V-Formkörpern

POW „Palasorb-ohne-Wirkstoff“ = Vollblut inkubiert mit 2 Palasorb-Formkörpern ohne Wirkstoff

OS „Osteoset®“ = Vollblut inkubiert mit 5 Osteoset®-Formkörpern

Um die entsprechenden Proben sowohl für die roTEG-Analyse als auch die Bestimmung der Marker der aktivierten Gerinnung zu gewinnen, unterscheiden sich im weiteren Verlauf die Arbeitsschritte wie folgt:

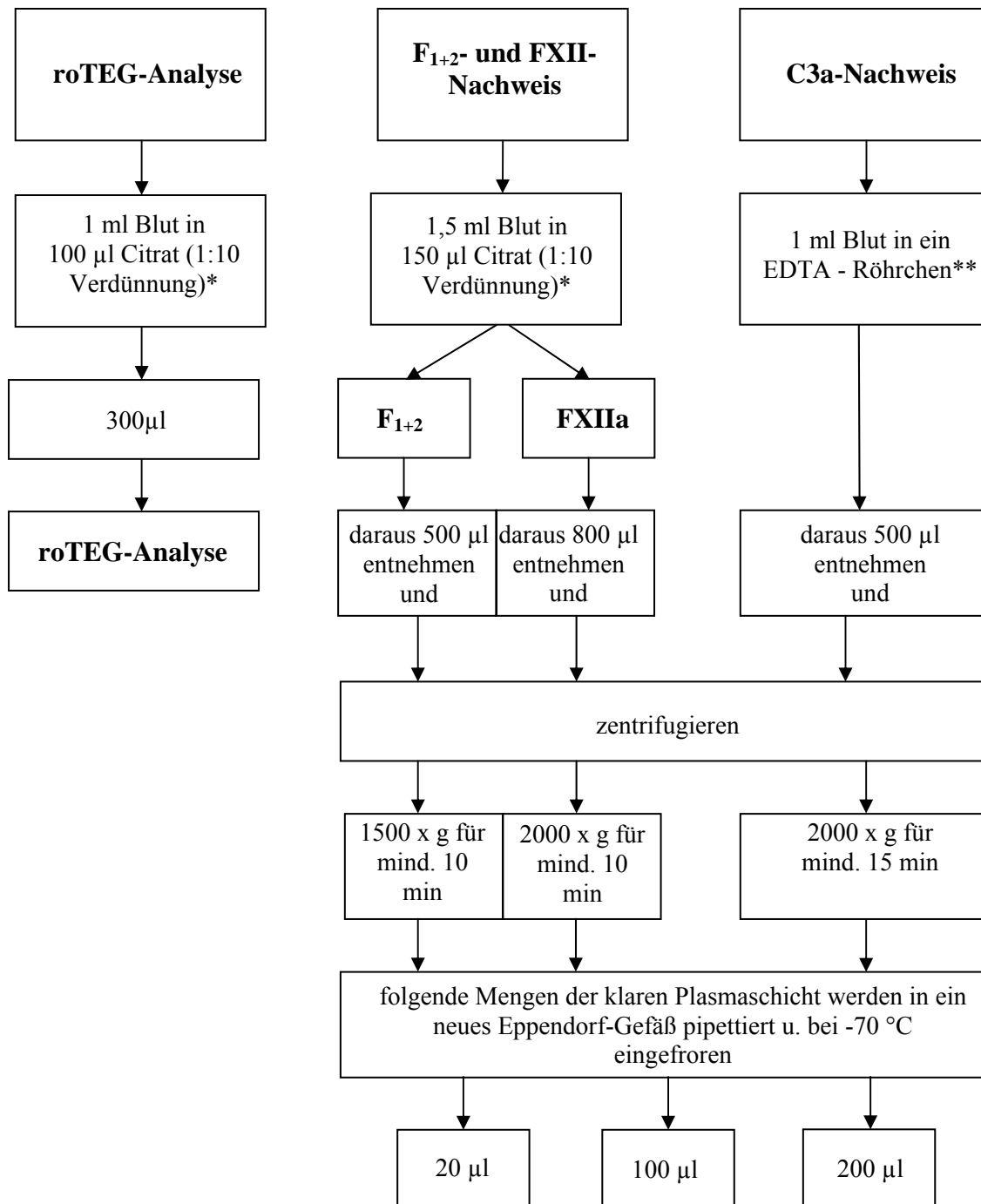


Abb. 5: Gewinnung der Proben für die Gerinnungsversuche.

* Natriumcitrat-Lösung (3,13 %) (Eifelfango, Chemisch-Pharmazeutische Werke J. Graf Metternich GmbH & Co. KG, Bad Neuenahr-Ahrweiler, Deutschland)

** ein von innen mit EDTA beschichtetes 1,3 ml Röhrchen (Sarstedt Aktiengesellschaft & Co, Nürnberg, Deutschland)

3.8.1 roTEG Coagulation Analyzer

Die Rotationsthromboelastographie (roTEG) untersucht als Globalmethode den Ablauf der Gerinnung. Hierzu können die Gerinnungszeit (Clotting Time, CT in Sek.), Gerinnselbildungszeit (Clot Formation Time, CFT in Sek.) und die maximale Gerinnselhaftigkeit (Maximum Clot Firmness, MCF in mm) bestimmt werden. Die Clotting Time beschreibt die Zeitspanne von Beginn der Messung bis zum Beginn der Gerinnselbildung, die Clot Formation Time die Zeitspanne von Beginn der Gerinnselbildung bis zu einer Gerinnselstabilität von 20 mm und die Maximum Clot Firmness die maximal erreichte Festigkeit des Gerinnsels. Dazu werden 300 µl durch Citrat antikoaguliertes Blut in die dazu vorgesehenen roTEG-Küvetten (Cup & Pin, Pentapharm GmbH, München) pipettiert und durch Zugabe von 10 µl in-TEG[®] sowie star-TEG[®] (Pentapharm GmbH, München) die Gerinnung aktiviert. Die Küvetten werden auf den Stempel gesetzt und die Messung gestartet.

3.8.2 Analyse von Markern der aktivierten Gerinnung

3.8.2.1 Fragment₁₊₂-Bestimmung

Die F₁₊₂-Plasmakonzentration wird mittels ELISA (Enzygnost[®] F₁₊₂ Assay, Dade Behring Marburg GmbH) ermittelt. Dafür wird 500 µl Citratblut in ein Eppendorf Tube überführt und 10 Minuten bei Raumtemperatur und 1500 x g zentrifugiert (Mikrozentrifuge MiniSpin plus, Eppendorf AG, Hamburg). 100 µl Plasma werden abgenommen und bei -70 °C sofort eingefroren. Zur Durchführung des ELISA werden die Proben bei 37 °C aufgetaut.

3.8.2.2 Faktor XIIa-Bestimmung

Die Menge des Faktor XIIa ist ein Marker für die Thrombinbildung. Mithilfe eines sogenannten „amidolytic substrate assay“ (UNITEST Faktor XIIa-like Activity, Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen) wird die FXIIa-Aktivität gemessen. Für die Plasmagewinnung von 200 µl werden 800 µl Citratblut in ein Eppendorf Tube pipettiert, 15 Minuten bei Raumtemperatur und 2000 x g zentrifugiert (Mikrozentrifuge MiniSpin plus, Eppendorf AG, Hamburg) und anschließend sofort bei -70 °C eingefroren. Für die Durchführung des „amidolytic substrate assay“ werden die Proben bei 37 °C aufgetaut.

3.8.2.3 Complement C3a-desArg-Bestimmung

Mithilfe des Complement C3a-desArg-ELISA (Firma Progen Biotechnik, Heidelberg) wird der Gehalt an C3a-desArg als stabile Form des kurzlebigen C3a im Plasma quantifiziert, welches Rückschlüsse auf die Komplementaktivität ermöglicht. Für die Gewinnung von 20 µl Plasma wird 500 µl des EDTA-Blutes in ein Eppendorf Tube überführt, 15 Minuten bei 4 °C und 2000 x g zentrifugiert (Centrifuge 5471 R, Eppendorf AG, Hamburg) und anschließend sofort bei -70 °C eingefroren. Für die Durchführung des Complement C3a-desArg ELISA werden die Proben bei 37 °C aufgetaut und anschließend sofort wieder auf Eis gestellt.

4 Ergebnisse

Mit der angewandten Operationstechnik sowie der verwendeten Anästhesie konnten die Formkörper erfolgreich in die Tibiae implantiert werden, insgesamt kamen 4 Chirurgen zum Einsatz. Die Hautplastik verhinderte eine mechanische Manipulation durch die Tiere im unmittelbaren Bereich des Osteotomiedefekts. Postoperativ konnte eine schnelle Erholung verzeichnet werden, die Käfighaltung ermöglichte eine angemessene und regelmäßige Betreuung ohne risikoträchtiges Einfangen der Tiere sowie zusätzlichen Stress durch Artgenossen.

4.1 Auswertung der Röntgenbefunde

4.1.1 Palasorb-G

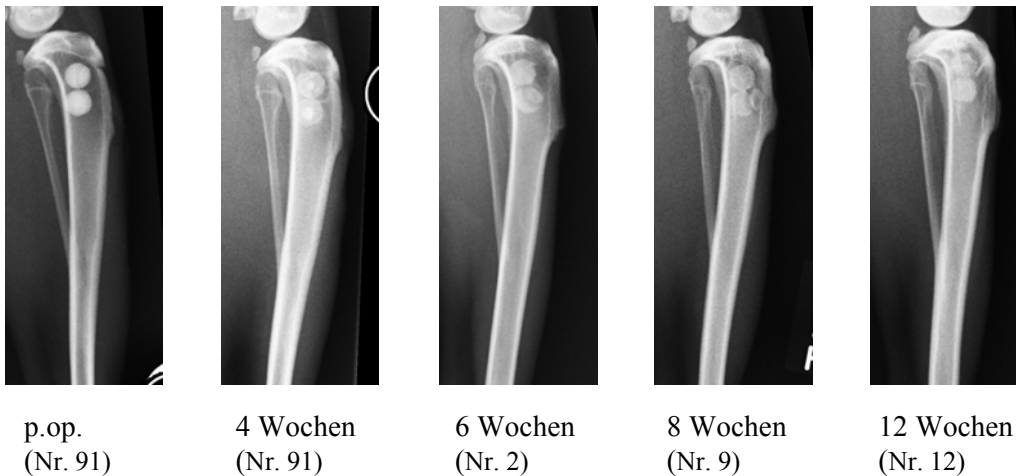


Abb. 6: Röntgenbefunde Palasorb-G.

Semiquantitative Bewertung der Röntgendichte der Formkörper im zeitlichen Verlauf

Tab. 11: Bewertung der Röntgendichte Palasorb-G.

	m.l.	m.l.	m.l.	m.l.	m.l.	Zusammenfassung:
Tiernummer nach 4 Wochen	10 +++	13 +++	89 +++	91 +++		4 Tiere +++
Tiernummer nach 6 Wochen	2 ++	5 ++	116 ++	118 /		3 Tiere ++/1 Tier vorzeitige Euthanasie
Tiernummer nach 8 Wochen	9 ++	11 ++	17 +++	114 ++	115 ++	4 Tiere ++/1 Tier +++
Tiernummer nach 12 Wochen	4 ++	6 ++	12 ++	41 ++	82 ++	5 Tiere ++

- +++ Röntgendichte stellenweise reduziert
- ++ Röntgendichte einheitlich reduziert
- + Formkörper schattenhaft
- kein Formkörper mehr zu erkennen
- / kein Röntgenbild vorhanden
- m.l. mediolateraler Strahlengang

4 Wochen post operationem ist die Röntgendichte der Formkörper aller Tiere randständig reduziert, während zentral ein röntgendichter Kern vorhanden ist. Lediglich das distale Implantat bei Tier Nr. 13 ist insgesamt in seiner Resorption fortgeschritten. Nach 6 Wochen sind die Implantate immer noch deutlich erkennbar und im Gegensatz zur 4-Wochen-Gruppe einheitlich in ihrer Röntgendichte reduziert. Die röntgenologischen Befunde der 8-Wochen-Gruppe unterscheiden sich kaum von der 6-Wochen-Gruppe. Nur ein Tier (Nr. 17) weist im distalen Formkörper einen röntgendichten Kern auf. 12 Wochen nach Implantation der Palasorb-G-Formkörper sind diese bei allen Tieren röntgenologisch deutlich nachweisbar.

4.1.2 Palasorb-V

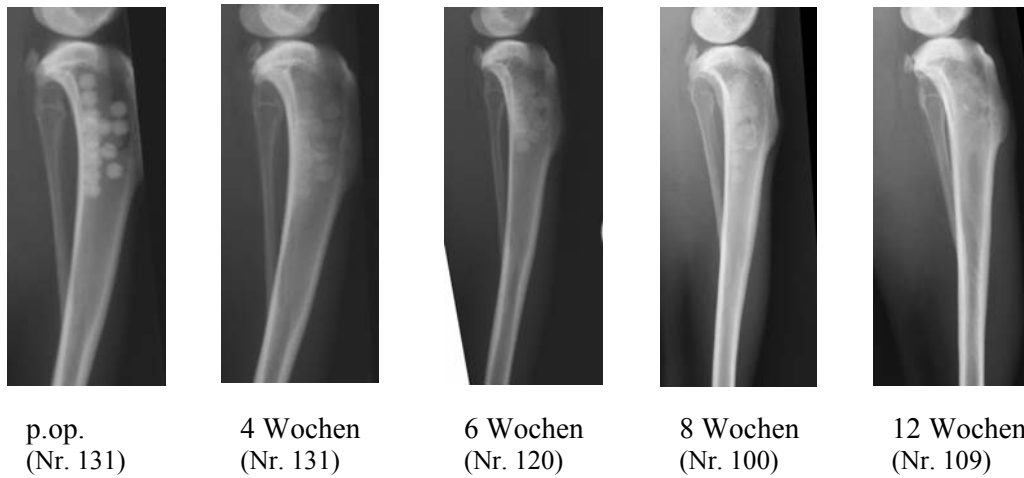


Abb. 7: Röntgenbefunde Palasorb-V.

Semiquantitative Bewertung der Röntgendichte der Formkörper im zeitlichen Verlauf

Tab. 12: Bewertung der Röntgendichte Palasorb-V.

	m.l.	m.l.	m.l.	m.l.	m.l.	Zusammenfassung
Tiernummer nach 4 Wochen	123 ++	127 +++	131 ++	132 ++		3 Tiere ++ / 1 Tier +++
Tiernummer nach 6 Wochen	118 ++	119 ++	120 ++	121 +		3 Tiere ++ / 1 Tier +
Tiernummer nach 8 Wochen	96 +	97 /	100 +	102 (+)	103 +	4 Tiere +
Tiernummer nach 12 Wochen	104 -	106 +	108 -	109 -	112 -	4 Tiere - / 1 Tier +

- +++ Röntgendichte stellenweise reduziert
- ++ Röntgendichte einheitlich reduziert
- + Formkörper schattenhaft
- kein Formkörper mehr zu erkennen
- / kein Röntgenbild vorhanden
- m.l. mediolateraler Strahlengang

4 Wochen nach der Implantation ist die Röntgendichte der Palasorb-V-Formkörper aller Tiere zwar gleichmäßig reduziert, aber noch als solche erkennbar. Tier Nr. 127 weist einige röntgendichte Areale auf. Die 6-Wochen-Gruppe unterscheidet sich kaum von der 4-Wochen-Gruppe, lediglich die Formkörper eines Tieres (Nr. 121) sind in ihrer Degradation weiter vorangeschritten. 8 Wochen nach der Implantation sind die Formkörper kaum noch zu erkennen. Ein Tier (Nr. 97) verstarb nach der subkutanen Alizarin-Applikation in der 5. Woche, ein weiteres Tier (Nr. 102) erlitt eine Stauchungsfraktur. Nr. 96 zeigt zwar insgesamt nur noch schattenhafte Implantate, distal sind jedoch röntgendichte Areale zu erkennen. In der 12. Woche sind bei 4 von 5 Tieren die Formkörper röntgenologisch nicht mehr sichtbar.

4.1.3 Osteoset®

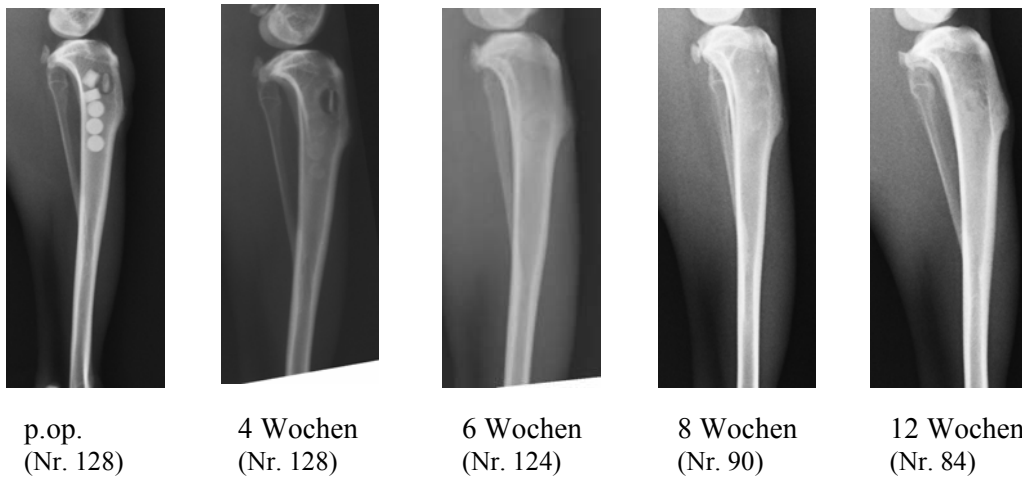


Abb. 8: Röntgenbefunde Osteoset®.

Semiquantitative Bewertung der Röntgendichte der Formkörper im zeitlichen Verlauf

Tab. 13: Bewertung der Röntgendichte Osteoset®.

	m.l.	m.l.	m.l.	m.l.	m.l.	Zusammenfassung
Tiernummer nach 4 Wochen	133 +++	129 +	130 +	128 +		3 Tiere + / 1 Tier +++
Tiernummer nach 6 Wochen	122 -	124 -	126 -	125 -		4 Tiere -
Tiernummer nach 8 Wochen	88 -	90 -	92 -	87 -	101 -	5 Tiere -
Tiernummer nach 12 Wochen	82b -	83 -	84 -	85 -	86 -	5 Tiere -

- +++ Röntgendichte stellenweise reduziert
- ++ Röntgendichte einheitlich reduziert
- + Formkörper schattenhaft
- kein Formkörper mehr zu erkennen
- / kein Röntgenbild vorhanden
- m.l. mediolateraler Strahlengang

Bereits bei den Tieren der 4-Wochen-Gruppe sind die Formkörper nur noch schattenhaft zu erkennen. Lediglich ein Tier (Nr. 133) weist noch röntgendichte Areale auf. 6 Wochen nach der Implantation sind die Formkörper röntgenologisch nicht mehr vorhanden.

4.1.4 Zusammenfassende Darstellung der Röntgenbefunde

Semiquantitative Bewertung der Röntgendichte der Formkörper im zeitlichen Verlauf

Tab. 14: Zusammenfassende Bewertung der Röntgendichte Palasorb-G, Palasorb-V und Osteoset®.

	Palasorb-G	Palasorb-V	Osteoset®
4 Wochen	+++	++	+++
	+++	+++	+
	+++	++	+
	+++	++	+
6 Wochen	++	++	-
	++	++	-
	++	++	-
	/	+	-
8 Wochen	++	+	-
	++	/	-
	+++	+	-
	++	(+)	-
	++	+	-
12 Wochen	++	-	-
	++	+	-
	++	-	-
	++	-	-
	++	-	-

- +++ Röntgendichte stellenweise reduziert
- ++ Röntgendichte einheitlich reduziert
- + Formkörper schattenhaft zu erahnen
- kein Formkörper mehr zu erkennen
- / kein Röntgenbild vorhanden
- m.l. mediolateraler Strahlengang

Die Röntgenbilder zeigen, dass sich die Knochenersatzstoffe hinsichtlich ihrer Biodegradation unterscheiden. 4 Wochen nach Implantation sind alle Präparate röntgenologisch nachweisbar. Während die Osteoset®-Formkörper nur noch undeutlich zu erkennen sind, zeigen die Palasorb-V-Implantate lediglich eine Reduktion der Röntgendichte, das Palasorb-G-Präparat weist sogar zentral noch einen deutlich röntgendichten Kern auf. Im weiteren Verlauf sind im Fall von Osteoset® bereits nach 6 Wochen und Palasorb-V nach 12 Wochen keine Formkörper mehr vorhanden. Die Palasorb-G-Formulierung zeigt hingegen im gesamten Versuchsverlauf

lediglich eine reduzierte Röntgendichte, die Formkörper sind auch nach 12 Wochen noch deutlich in der Tibia zu sehen.

4.2 Auswertungen der Bilder der μ -CT

Die Untersuchungen der Präparate mithilfe der μ -Computertomographie erfolgte zum einen mit transversalen Schnitten durch die Tibia auf 2-dimensionaler Ebene sowie nach weiterer Bearbeitung als 3-dimensionale Übersichtskonstruktion (siehe Abb. 9).

Die Beschreibung der Ergebnisse wird getrennt nach den unterschiedlichen Formulierungen Palasorb-G, Palasorb-V und Osteoset[®] sowie der Überlebenszeit mit 4, 6, 8 und 12 Wochen durchgeführt. Da der Schwerpunkt in der qualitativen Betrachtung liegt, sind die Präparate einzeln und hauptsächlich auf Basis der 2-dimensionalen Schnitte beschrieben worden, ergänzt durch die 3-dimensionale Übersicht. Am Schluss jeder Gruppe werden durch eine „Gesamtwertung“ die wesentlichen Ergebnisse zusammengefasst.

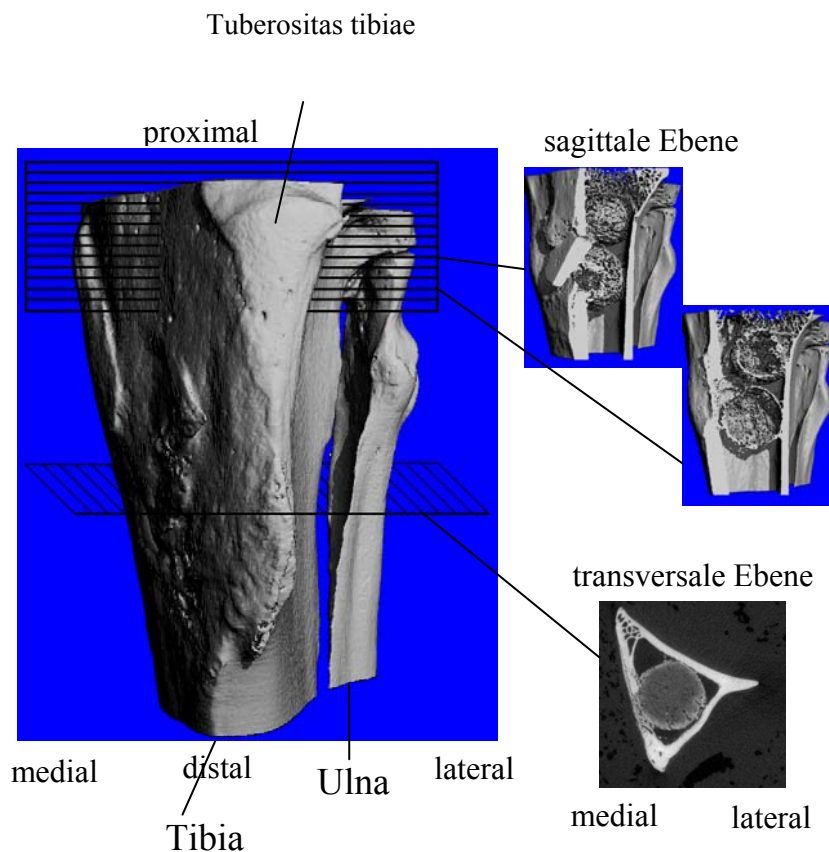


Abb. 9: μ -CT-Schnittebenen.

4.2.1 Palasorb-G

4.2.1.1 4-Wochen-Gruppe

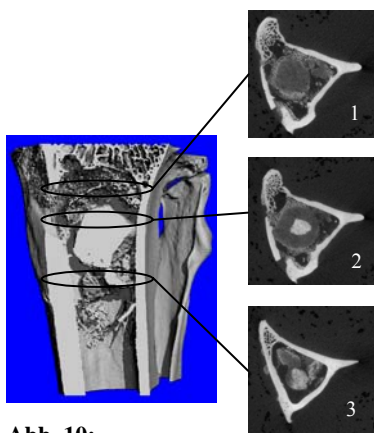


Abb. 10:
μ-CT Nr. 13.

Präparat 13:

Auf Höhe des medialen Zugangs in die Tibia befindet sich der proximale Formkörper (1, 2). Auffällig ist der hochgradig röntgendichte Anteil des Implantats im Zentrum (2). Die Implantatoberfläche ist aufgelockert und lokal mittelgradig mineralisiert. Im hoch proximalen Bereich der Tibia nimmt der mineralisierte Anteil zu (1). Der distale Formkörper ist fragmentiert, aber auch hier sind röntgendichte Kerne sowie mineralisierte Randstrukturen erkennbar (3).

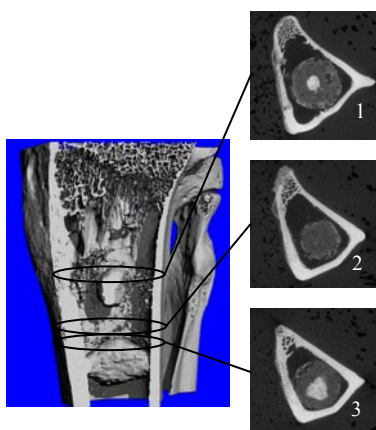


Abb. 11:
μ-CT Nr. 89.

Präparat 89:

Auch hier liegt der proximale Formkörper auf Höhe des knöchernen Zugangs. Beide Implantate sind als solche erhalten und weisen einen röntgendichten Kern auf, insbesondere der distale Formkörper (2, 3) liegt im Resorptionsstatus weiter zurück (3). Hingegen ist die Degradation des proximalen Implantats geringgradig fortgeschritten, erkennbar an der allgemein reduzierten Röntgendichte, der stark zerklüfteten Oberfläche und den Resorptionslakunen (1). Die Kontur des distalen Formkörpers ist kaum, die des proximalen

Formkörpers hingegen geringgradig mineralisiert.

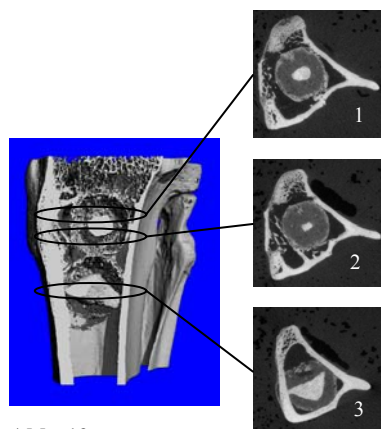


Abb. 12:
μ-CT Nr. 91.

Präparat 91:

Auch in diesem Fall weisen beide Formkörper zentral röntgendichte Areale auf. Ähnlich wie bei Präparat Nr. 89 ist der Umfang dieses Kerns insbesondere im diaphysären Implantat (3) stärker ausgeprägt. Die Implantatoberflächen sind zerklüftet, die Konturen sind deutlicher als in den anderen beiden Präparaten dieser Gruppe mineralisiert. Zwischen dem proximalen Formkörper und der Kortikalis haben sich auffallende Knochenbrücken ausgebildet (2).

Gesamtwertung für die 4-Wochen-Gruppe:

Alle Implantate der 3 Präparate weisen röntgendichte Kerne auf. Sie sind lokal an der Oberfläche mineralisiert, wobei der Grad im proximalen Bereich der Tibia zunimmt. Präparat Nr. 13, aber insbesondere Präparat Nr. 91, lassen trabekuläre Strukturen zwischen Kortikalis und proximalen Formkörper erkennen.

4.2.1.2 6-Wochen-Gruppe

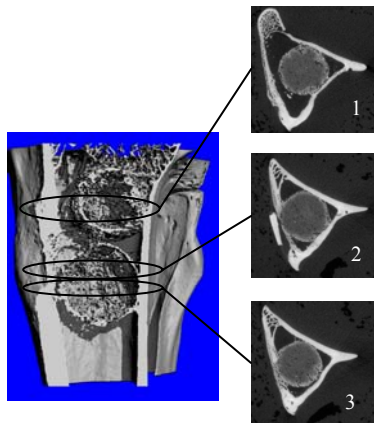


Abb. 13:
μ-CT Nr. 2.

Präparat 2:

Beide Implantate weisen eine zerklüftete Oberfläche auf, lokal ziehen Resorptionslakunen ins Innere. Insbesondere das proximale Implantat (1) weist vermehrt Resorptionsbuchten auf. Nicht nur die Konturen sind sehr deutlich mineralisiert, Mineralisationskerne umgeben ebenfalls die Resorptionslakunen. Geringgradig haben sich bei beiden Formkörpern kortikal Knochenbrücken gebildet.

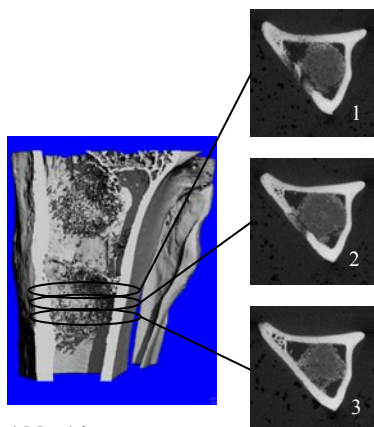


Abb. 14:
μ-CT Nr. 5.

Präparat 5:

Die Implantate sind strukturell sehr deutlich aufgelockert und an ihrer Oberfläche zerklüftet. Beide Formkörper sind randständig geringgradig mineralisiert. Eine Trabekelbildung ist nicht zu verzeichnen.

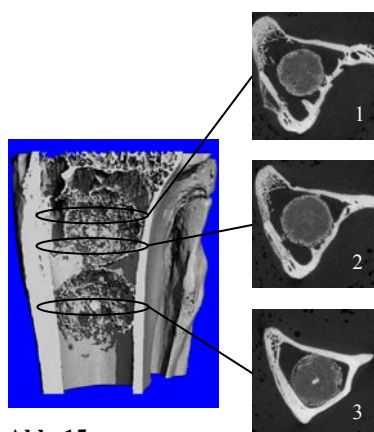


Abb. 15:
μ-CT Nr. 116.

Präparat 116:

Beide Implantate zeigen eine zerklüftete Oberfläche, die stellenweise weiter fortgeschritten ist. Der distale Formkörper weist noch geringgradig einen röntgendichten Kern auf (3). Die Konturen sind mittelgradig mineralisiert und schließen auch hier die Resorptionsbuchten mit ein. Insbesondere hoch proximal haben sich kortikale Knochenbrücken zum Implantat hin gebildet (1).

Gesamtwertung für die 6-Wochen-Gruppe

Im Vergleich zur 4-Wochen-Gruppe ist der röntgendichte Kern weitgehend nicht mehr vorhanden. Lediglich Präparat Nr. 116 weist im distalen Implantat nur noch geringfügig eine röntgendichte Struktur auf. Die Oberflächen aller Implantate sind durch Zerrüttung und Resorptionslakunen gekennzeichnet. Die Mineralisierung hat in unterschiedlicher Intensität bei allen Implantaten stattgefunden, aber ist insgesamt im Vergleich zu der 4-Wochen-Gruppe, insbesondere in Präparat Nr. 2 und Nr. 116, vorangeschritten. Mit Ausnahme von Präparat Nr. 5 haben sich kortikale Knochenbrücken gebildet.

4.2.1.3 8-Wochen-Gruppe

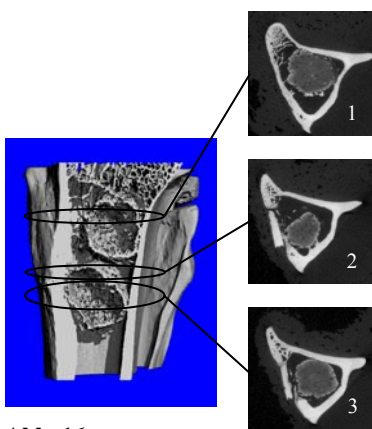


Abb. 16:
μ-CT Nr. 9.

Präparat 9:

Das distale Implantat (2, 3) liegt auf Höhe des knöchernen Zugangs. Beide Implantate scheinen in ihrem Umfang reduziert. Ihre Oberflächen sind zerrüttet und weisen vereinzelt Resorptionslakunen auf. Die Konturen sind gleichmäßig und deutlich mineralisiert, feine kortikale Trabekel führen in die Formkörper.

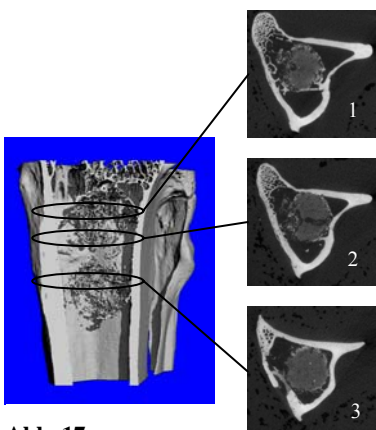


Abb. 17:
μ-CT Nr. 11.

Präparat 11:

Das proximale Implantat (1, 2) ist durch tiefe Resorptionslakunen in der Resorption fortgeschritten. Das distale Implantat (3) ist strukturell deutlich aufgelockert, die Oberfläche zerklüftet. Die Mineralisierung der Kontur ist stellenweise unterschiedlich stark ausgeprägt. Das proximale Implantat ist hingegen auch in den Mineralisierungsvorgängen deutlicher vorangeschritten, hoch proximal greifen kortikal breite Knochen trabekel in das Material (1, 2).

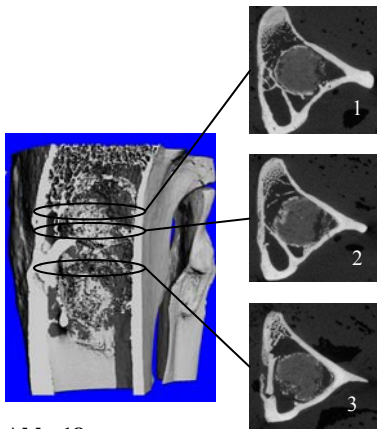


Abb. 18:
μ-CT Nr. 114.

Präparat 114:

Der distale Formkörper (3) weist stark resorbierte Randbereiche auf, die sich auf Höhe des Fräslochs bis ins Innere erstrecken. Auch das proximale Implantat (1, 2) ist randständig durch deutliche Lysezonen gekennzeichnet, die Kontur ist hier allerdings stärker mineralisiert und das Implantat proximal trabekulär ummantelt.

Gesamtwertung für die 8-Wochen-Gruppe:

Die Resorption ist geringgradig vorangeschritten, erkennbar an der Textur der Oberfläche, den Resorptionslakunen sowie der Röntgendichte und Struktur des Implantatmaterials. In Bezug auf Präparat Nr. 11 und Nr. 114 scheinen insbesondere die proximalen Implantate in randständiger Mineralisation sowie trabekulärer Knochenbildung weiter fortgeschritten zu sein als die distalen Formkörper.

4.2.1.4 12-Wochen-Gruppe

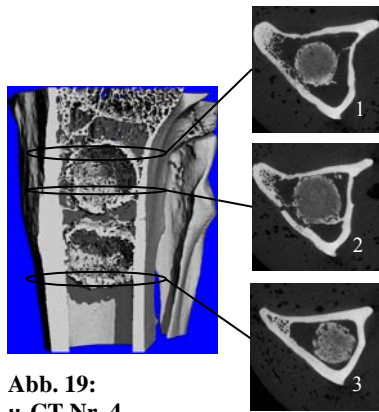


Abb. 19:
μ-CT Nr. 4.

Präparat 4:

Beide Implantate sind an ihrer Oberfläche zerklüftet und weisen lokal Resorptionslakunen auf. Besonders hervor tritt die hochgradige Mineralisierung der Konturen sowohl in Ausdehnung sowie erhöhter Röntgendichte (1, 3). Weiterhin sind deutlich ausgeprägte Knochenbrücken insbesondere zwischen proximal gelegenem Implantat und Kortikalis erkennbar (2).

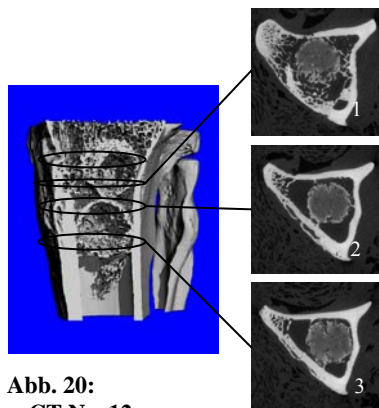


Abb. 20:
μ-CT Nr. 12.

Präparat 12:

Die Implantatoberflächen sind zerklüftet, Resorptionslakunen führen tief ins Implantatmaterial oder dehnen sich in ihrer Breite aus. Die Randareale sind hochgradig in ihrer Röntgendichte erhöht. Trabekel führen von der Kortikalis in die Implantate (1, 2, 3), insbesondere das proximale Implantat ist deutlich in den spongiösen Bereich der Tibia integriert (1).

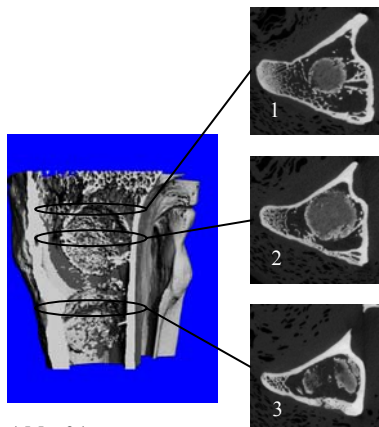


Abb. 21:
μ-CT Nr. 41

Präparat 41:

Das distale Implantat ist nicht in seiner ursprünglichen Form erhalten, die verbliebenen Implantatanteile sind größtenteils deutlich mineralisiert (3). Der proximale Formkörper weist eine zerklüftete Oberfläche sowie Resorptionslakunen auf. Auffällig sind die hochgradig mineralisierte Kontur sowie die deutliche Trabekelbildung zwischen Kortikalis und Implantat (1, 2).

Gesamtwertung für die 12-Wochen-Gruppe:

Die Implantate der 12-Wochen-Gruppe scheinen in ihrer Resorption nicht deutlich vorangeschritten zu sein. Hingegen augenscheinlich ist die randständige Mineralisierung in ihrer Ausdehnung sowie in der Intensität der Röntgendichte. Ebenfalls ausgeprägt ist die Ausbildung von Knochenbrücken zwischen Kortikalis und Implantaten.

4.2.1.5 Gesamtwertung Palasorb-G :

Die Implantate der 4-Wochen-Gruppe zeigen noch deutlich röntgendichte Innenareale, die 6 Wochen nach der Implantation nicht mehr vorhanden sind. Bis zur 8. Woche schreiten Resorptionsvorgänge voran, erkennbar an Veränderungen der Röntgendichte und Struktur des Implantatmaterials sowie der Implantatoberfläche. Zwischen der 8. und 12. Woche sind bezüglich der Degradation keine grundlegenden Unterschiede vorhanden. Die Implantate aller Präparate zeigen eine randständige Mineralisation. Während in der 4-Wochen-Gruppe bei einem Präparat (Nr. 91) deutliche Knochenbrücken zwischen Implantat und Kortikalis erkennbar sind, betrifft dies in der 6-Wochen-Gruppe schon 2 Präparate (Nr. 116 und Nr. 2), ab der 8. Woche zeigt jedes Präparat eine kortikale Trabekelbildung. Insbesondere die Implantate der 12-Wochen-Gruppe sind in ihrer Intensität sowie der Breite der röntgendichten Außenkonturen fortgeschritten und weisen zusätzlich ausgeprägte kortikale Knochenbrücken auf.

4.2.2 Palasorb-V

4.2.2.1 4-Wochen-Gruppe

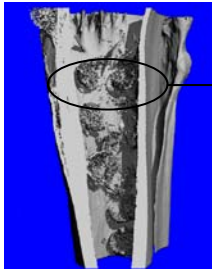
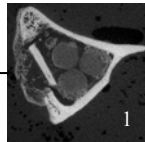


Abb. 22:
μ-CT Nr. 123.

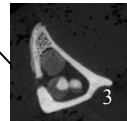
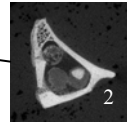
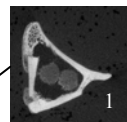


Präparat 123:

Die Implantate sind in ihrer Form erhalten, aber insgesamt in ihrer Röntgendichte reduziert (1). Insbesondere die zur Kortikalis zugewandten Implantatoberflächen sind zerklüftet und mineralisiert, die gegenüberliegende Oberflächen sind hingegen in Kontur und Textur unverändert. Auf der medialen Seite der Tibia ist eine spongiforme, röntgendichte Zubildung zu erkennen.



Abb. 23:
μ-CT Nr. 127.



Präparat 127:

Die Implantate befinden sich in unterschiedlichen Stadien der Resorption. Die sich gegenüberliegenden Implantatoberflächen sind auch hier unverändert. Während im Bereich der Diaphyse kaudolateral hochgradig röntgendichte Kerne sichtbar sind, sind die zur medialen Spongiosa gelegenen Implantate in ihrer Resorption fortgeschritten (2, 3). Insbesondere die auf Höhe und zum tibialen Zugang gewandten Oberflächen sind stark zerklüftet (2). Lokal sind in äußerst geringer Ausprägung mineralisierte Bereiche der Kontur zu erkennen.

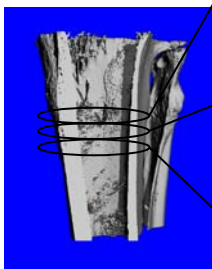
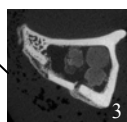
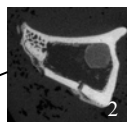
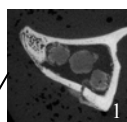


Abb. 24:
μ-CT Nr. 131.



Präparat 131:

Die Implantate sind in ihrer Form erhalten. Auch hier sind vor allem die Oberflächen, die zur Kortikalis bzw. Spongiosa gewandt sind, stärker zerklüftet (1, 3) und auch geringfügig mineralisiert. Hingegen sind die Oberflächen der Formkörper, die sich gegenüber liegen, in ihrer Kontur und Textur unverändert (1, 3). Insgesamt ist die Mineralisation distal und nur gering ausgeprägt.

Gesamtwertung der 4-Wochen-Gruppe:

Bei allen 3 Präparaten sind die Formkörper im Markraum vorhanden und weisen Zeichen der Resorption auf. Sie sind insgesamt in ihrer Röntgendichte reduziert und nur Präparat Nr. 127

lässt stellenweise hochgradig röntgendichte Implantatkerne erkennen. Implantatoberflächen, die sich gegenüber liegen, sind weniger der Resorption unterworfen. Insbesondere in Präparat Nr. 123 sind Randbereiche der Implantate mineralisiert. Die beiden verbliebenen weisen nur eine geringe Mineralisation auf.

4.2.2.2 6-Wochen-Gruppe

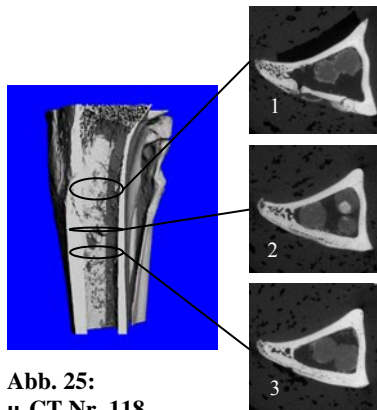


Abb. 25:
μ-CT Nr. 118.

Präparat 118:

Distal sind die Implantate deutlicher in ihrer Kontur erhalten und weisen teilweise noch einen röntgendichten Kern auf (2). Resorption sowie Mineralisation sind weiter proximal, insbesondere auf Höhe des tibialen Zugangs, stärker ausgeprägt (1).

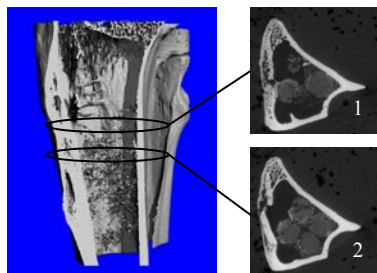


Abb. 26:
μ-CT Nr. 119.

Präparat 119:

Die Formkörper sind in ihrer Resorption fortgeschritten, sichtbar an stark aufgelockerten Oberflächen der Implantate als auch an deutlichen Resorptionslakunen, die ins Innere ziehen. Die Konturen weisen lokal stark mineralisierte Bereiche auf (1, 2).

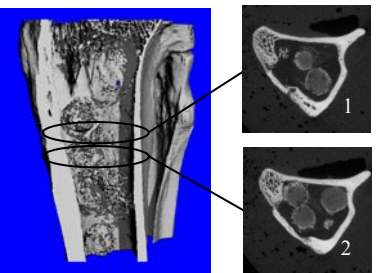


Abb. 27:
μ-CT Nr. 120.

Präparat 120:

Die Implantate sind ähnlich wie in Präparat Nr. 119 in ihrer Resorption vorangeschritten, erkennbar an lokal zerklüfteten Oberflächen sowie Resorptionslakunen. Gleichfalls finden wir stellenweise hochgradig mineralisierte Implantatanteile, die in der 3-D-Projektion die ursprüngliche Form der Implantate erkennen lassen (1, 2).

Gesamtwertung der 6-Wochen-Gruppe:

Die Implantate sind noch vorhanden. Die Resorption sowie die randständige Mineralisierung sind bei Präparat Nr. 119 und Nr. 120 stärker vorangeschritten als bei Präparat Nr. 118 und insgesamt deutlicher als bei der 4-Wochen-Gruppe.

4.2.2.3 8-Wochen-Gruppe

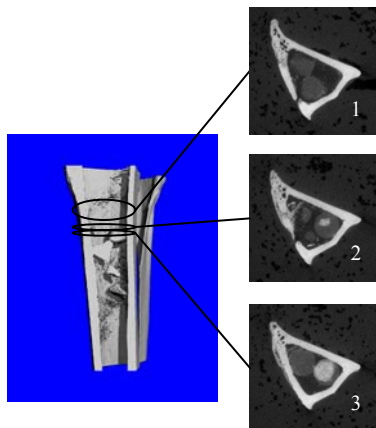


Abb. 28:
μ-CT Nr. 96.

Präparat 96:

Im Bereich der Diaphyse weisen einige Implantate noch einen röntgendichten Kern auf (2, 3). Die Formkörper sind in ihrer Kontur erhalten und weisen geringe Zeichen der randständigen Mineralisierung auf. Weiter proximal (1) ist die Resorption vorangeschritten, eine Mineralisation ist in geringer Ausprägung vorhanden.

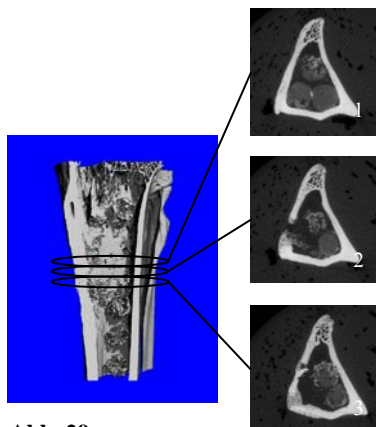


Abb. 29:
μ-CT Nr. 100.

Präparat 100:

Mehrheitlich weisen die Implantate deutliche Resorptionslakunen sowie hochgradig röntgendichte Randbereiche auf (1–3). Einige wenige sind in Form und Textur erhalten und ohne Anzeichen der Mineralisation. Diese liegen lateral und proximal vom Fräsloch entfernt der Kortikalis an.

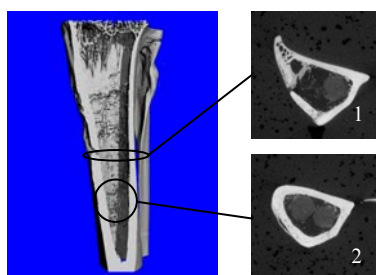


Abb. 30:
μ-CT Nr. 103.

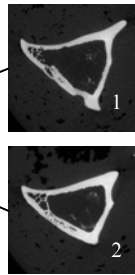
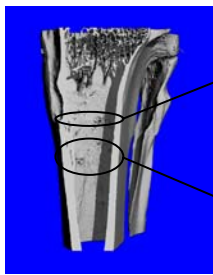
Präparat 103:

Die Implantate sind insgesamt in ihrer Form erhalten und lediglich in ihrer Röntgendichte reduziert (1, 2). Im proximalen Bereich der Tibia auf Höhe des Fräslochs fällt die Resorption geringgradig stärker aus. Lokal sind Randbereiche mineralisiert.

Gesamtwertung der 8-Wochen-Gruppe:

Die Ergebnisse dieser Gruppe sind sehr inhomogen. Die Formkörper des Präparates Nr. 96 liegen im Status der Resorption sowie der randständigen Mineralisation weit zurück und sind eher mit den Implantaten der 4-Wochen-Gruppe zu vergleichen. Nachfolgende Position nimmt Präparat Nr. 103 ein, während Präparat Nr. 100 den beiden anderen deutlich in Resorption sowie Mineralisation voraus ist.

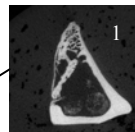
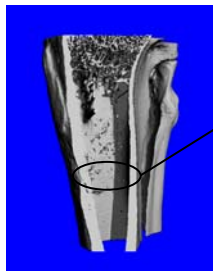
4.2.2.4 12-Wochen-Gruppe



Präparat 104:

Es sind nur noch geringfügige Materialreste vorhanden, die lokal mineralisiert sind (1, 2).

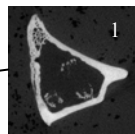
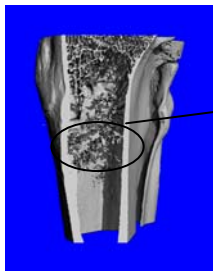
Abb. 31:
μ-CT Nr. 104.



Präparat 108:

Die Implantate sind zum größten Teil resorbiert. Stark aufgelockerte Fragmente lassen stellenweise auf die einstige Form der Implantate schließen. Lokal sind die Reste mineralisiert (1).

Abb. 32:
μ-CT Nr. 108.



Präparat 112:

Es sind nur noch geringfügige Implantatreste zu erkennen. Diese sind hochgradig mineralisiert (1).

Abb. 33:
μ-CT Nr. 112.

Gesamtwertung der 12-Wochen-Gruppe:

Insgesamt ist die Resorption bei allen 3 Präparaten deutlich fortgeschritten und es sind nur mehr einzelne Reste vorhanden, die insbesondere bei Präparat Nr. 112 mineralisiert sind.

4.2.2.5 Gesamtwertung Palasorb-V:

In einem Zeitrahmen von 12 Wochen sind die Implantate nahezu vollständig resorbiert. Bei allen Gruppen findet in unterschiedlicher Ausprägung eine randständige Mineralisation statt, eine klare Tendenz ist diesbezüglich nicht auszumachen.

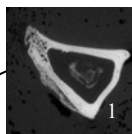
4.2.3 Osteoset®

Aufgrund der röntgenologischen Befunde wurden lediglich die Präparate der 4- sowie 6-Wochen-Gruppe mittels μ -Computertomographie analysiert, zur 8- und 12-Wochen-Gruppe hingegen liegen keine Ergebnisse der μ -CT vor.

4.2.3.1 4-Wochen-Gruppe



Abb. 34:
 μ -CT Nr. 128.



Präparat 128:

Die Resorption der Formkörper findet sowohl randständig als auch im Inneren statt, wodurch sich eine Art Resorptionszone zwischen Implantatkern und Außenrand bildet. Stellenweise und in geringer Ausprägung sind Implantatanteile mineralisiert (1).

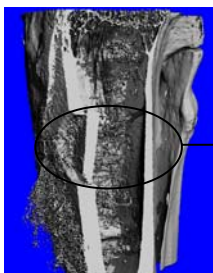
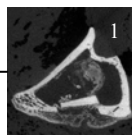


Abb. 35:
 μ -CT Nr. 129.

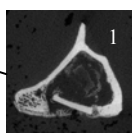


Präparat 129:

Die zentrale Resorption der Formkörper ist hochgradig vorangeschritten und lässt zum Teil nur noch die Implantatränder übrig. Es besteht eine deutliche Mineralisation der verbliebenen Implantatanteile (1). Insbesondere diaphysär bestimmt medial eine röntgendichte appositionelle Zubildung das Bild, auf Höhe des knöchernen Zugangs ist diese nur noch geringgradig ausgeprägt.



Abb. 36:
 μ -CT Nr. 130.



Präparat 130:

Ähnlich wie bei Präparat Nr. 128 hat sich eine Resorptionszone zwischen Implantatrand und Implantatkern gebildet. Insgesamt ist die Resorption stark vorangeschritten (1). Deutlich sind mineralisierte Implantatkonturen insbesondere diaphysär zu erkennen.

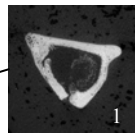
Gesamtwertung der 4-Wochen-Gruppe:

Alle 3 Präparate zeigen sowohl eine randständige als auch eine zentrale Resorption. Vor allem die Präparate Nr. 129 und Nr. 130 weisen deutlich mineralisierte Randbereiche auf.

4.2.3.2 6-Wochen-Gruppe



Abb. 37:
μ-CT Nr. 124.

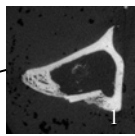


Präparat 124:

Es sind nur noch Implantatreste vorhanden, die strukturell hochgradig aufgelockert sind und nur geringgradig an ihre ursprüngliche Form erinnern (1). Distal finden sich lokal im Markraum mineralisierte Implantatanteile.



Abb. 38:
μ-CT Nr. 125.

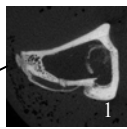


Präparat 125:

In äußerst geringer Form sind noch Materialreste erkennbar, die allerdings deutlich mineralisiert sind (1).



Abb. 39:
μ-CT Nr. 126.



Präparat 126:

Auch bei diesem Präparat ist die Resorption sowohl randständig und insbesondere zentral vorangeschritten. Im Vergleich zu den beiden anderen Präparaten sind allerdings die Implantatanteile deutlicher erkennbar und die verbliebenen „Implantatkränze“ mineralisiert (1).

Gesamtwertung der 6-Wochen-Gruppe:

Insgesamt ist bei allen 3 Präparaten die Resorption deutlich vorangeschritten, insbesondere Präparat Nr. 125 fällt durch das nur noch geringfügige Vorhandensein von Materialresten auf, gefolgt von Nr. 124. Bei Präparat Nr. 126 hingegen sind noch röntgendichte „Implantatkränze“ zu erkennen.

4.2.3.3 8- und 12-Wochen-Gruppe:

Es liegen keine Ergebnisse mittels μ -Computertomographie vor.

4.2.3.4 Gesamtwertung Osteoset[®]

Schon bei der 4-Wochen-Gruppe weisen die Implantate deutliche Zeichen der Resorption auf, die sowohl oberflächlich als auch zentral ihren Ursprung haben. Somit bildet sich eine Art Resorptionszone zwischen Außenrand und Implantatkern. Randbereiche zeigen eine erhöhte Röntgendichte. 6 Wochen nach Implantation sind nur noch geringfügige Reste vorhanden. Nur bei einem Präparat sind mineralisierte „Implantatkränze“ deutlich zu erkennen.

4.3 Auswertung der histologischen Ergebnisse

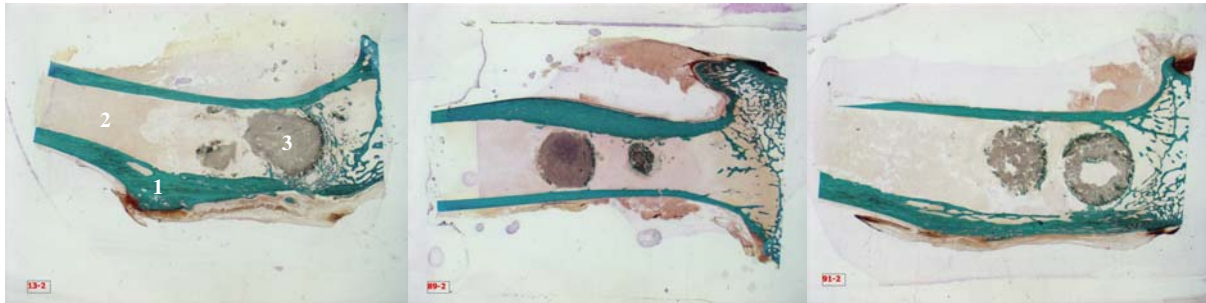
Die Auswertung der histologischen Bilder wird dadurch erschwert, dass nur ein Dünnschliff pro Tibia angefertigt wurde. Der Schnitt wurde sagittal in der Medianen der Tibia durchgeführt. Die implantierten Formkörper weichen in Größe und Anzahl voneinander ab und sind unterschiedlich im Markraum verteilt. Auf Grund dessen sind bei Anfertigung der Dünnschliffpräparate die Implantate einschließlich der körperlichen Reaktionen nach dem Zufallsprinzip angeschnitten und somit nur sehr begrenzt quantitativ auswertbar. Der folgende Inhalt ist daher deskriptiv und als Ergänzung zu den röntgenologischen sowie computertomographischen Ergebnissen zu verstehen. Zusätzlich erfolgt die qualitative Auswertung der polychromen Sequenzmarkierung in der 12-Wochen-Gruppe.

Die Beschreibung der Ergebnisse erfolgt getrennt nach den unterschiedlichen Formulierungen Palasorb-G, Palasorb-V und Osteoset[®] sowie den Überlebenszeiträumen (4, 6, 8 und 12 Wochen). Innerhalb der Gruppen wird jedes Präparat einzeln nach Kriterien des osteogenetischen Potentials sowie der Biodegradation der Formkörper bewertet.

4.3.1 Palasorb-G

4.3.1.1 4-Wochen-Gruppe

Übersichtsaufnahmen zur Darstellung der 3 Präparate, die anschließend einzeln dargestellt werden:



Übersicht Nr. 13

Übersicht Nr. 89

Übersicht Nr. 91

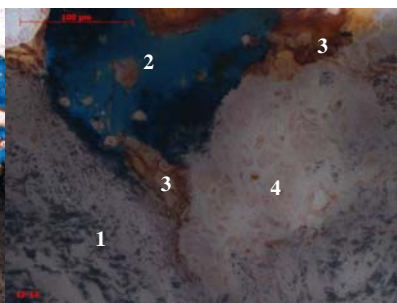
Abb. 40: Histologische Übersichtsaufnahmen Palasorb-G 4 Wochen.

1 Kortikalis; 2 Medulla; 3 Implantat

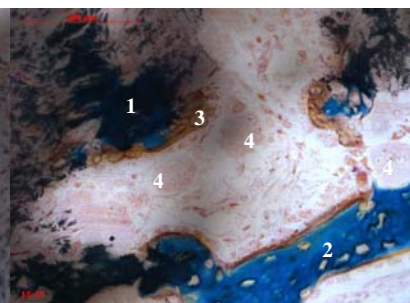
Präparat 13:



10-fache Vergrößerung



40-fache Vergrößerung

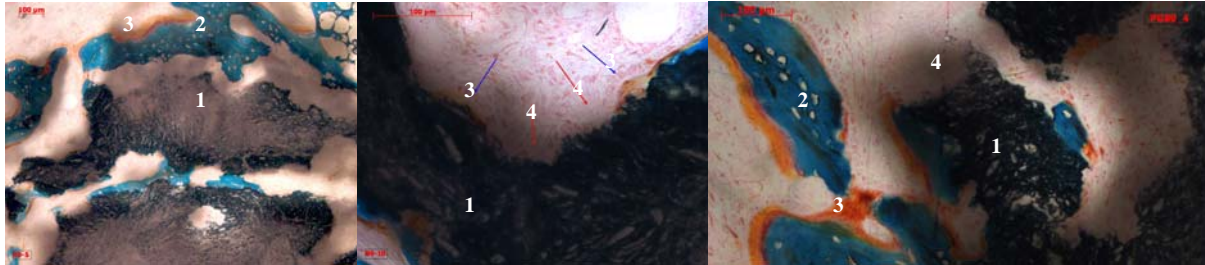
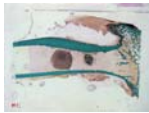


40-fache Vergrößerung

Abb. 41: Histologiepräparat Nr. 13.

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen; 3 Osteoblasten bei Osteoidsynthese; 4 mehrkernige Riesenzellen

Insbesondere das proximale Implantat ist angeschnitten, der distale Formkörper hingegen nur geringgradig. Deutlich wird die hochgradige trabekuläre Abstützung des proximalen Implantatkörpers. Die genauere Betrachtung zeigt die zerklüftete Implantatoberfläche mit aktiver und vitaler Osteogenese. Implantatanteile werden durch knöcherne Brücken miteinander verbunden, Bruchstücke vollständig integriert. Die 40-fache Vergrößerung zeigt die Einwanderung von Osteoblasten sowie ihre aktive Osteoidsyntheseleistung. Gleichzeitig bauen mehrkernige Riesenzellen das Implantatmaterial ab.

Präparat 89:

10-fache Vergrößerung

40-fache Vergrößerung

20-fache Vergrößerung

Abb. 42: Histologiepräparat Nr. 89.

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen; 3 Osteoblasten bei Osteoidsynthese; 4 mehrkernige Riesenzellen

Beide Implantate sind auf der Übersicht erkennbar. Der proximale Formkörper ist oberflächlich angeschnitten und auf dieser Schliffebene mit Resorptionslakunen durchzogen sowie deutlich trabekulär ummantelt. Der distale Implantatkörper zeigt nur geringe Resorptionsanzeichen und weist lediglich einseitig knöchernen Anbau auf. Auffällig ist ein dunkel angefärbter zentraler Anteil des Implantatmaterials. Bei vergrößerter Betrachtung des proximalen Formkörpers wird die oberflächliche, aktive Osteogeneseleistung deutlich. Es finden sich Knochentrabekel mit breiten reaktiven Osteoidsäumen direkt auf dem Implantatmaterial, Teile werden knöchern überbrückt und kleine Fragmente vollständig umschlossen. Osteoblasten lagern sich direkt auf der Implantatoberfläche an und sind osteoidsynthetisch aktiv. Gleichzeitig findet phagozytärer Abbau des Implantatmaterials statt. Medullär besteht eine deutlich erhöhte Zellinfiltration. Beide Implantate sind stellenweise von zystisch abgelagerten Degenerationsprodukten umgeben. Die genaue Betrachtung zeigt degenerierte Riesenzellen mit nekrotischen Knochen- und Implantatresten. Vereinzelt sind Bakterien erkennbar. Umgebendes Markgewebe sowie neu gebildeter Knochen weisen Zeichen der Degeneration auf.

Präparat 91:

20-fache Vergrößerung

20-fache Vergrößerung

20-fache Vergrößerung

Abb. 43: Histologiepräparat Nr. 91.

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen; 3 Osteoblasten bei Osteoidsynthese; 4 mehrkernige Riesenzellen

Beide Implantate sind deutlich in ihrer Struktur aufgelockert und mit zahlreichen Resorptionslakunen durchzogen. Im Zentrum des proximalen Formkörpers ist eine große Lakune vorhanden, während dort röntgenologisch eine gesteigerte Röntgendichte erkennbar ist. Es findet bei beiden Formkörpern eine Implantat-assoziierte Osteogenese statt. Vor allem das proximale Implantat wird kortikal kräftig trabekulär abgestützt. Knochen trabekel greifen tief in die aufgelockerte Oberfläche ein, Resorptionslakunen werden knöchern überbrückt sowie ausgekleidet. Unmittelbar auf der Implantatoberfläche findet Knochenneubildung statt, kleinere Implantatfragmente werden knöchern umschlossen. Die 40-fache Vergrößerung zeigt Osteoblasten, die in die Materialoberfläche einwandern und osteoidsynthetisch aktiv sind. Das Material wird zellulär resorbiert. Der Markraum ist sehr zellreich. Es ist Knochendetritus erkennbar, der vermutlich vom Implantationshergang stammt.

Gesamtwertung der 4-Wochen-Gruppe:

Die Resorption und Osteogenese wurde mit einer Skala von 1–4 bewertet, innerhalb dieser Gruppe wurde eine Feingraduierung vorgenommen.

Tab. 15: Histologische Gesamtwertung Palasorb-G 4-Wochen.

Versuchszeitraum	Präparat-Nr.	Anzahl sichtbarer Formkörper	Grad der Resorption*	Grad der Osteogenese*
4 Wochen	13	2	1,8	2,0
	89	2	1,8	1,8
	91	2	2,5	2,3
maximale Zahl		6	12,0	9,0
erreichte Zahl		6	6,1	6,1

* Feingraduierung

0		keine	Resorption/Osteogenese
1	1,3/1,5/1,8	geringgradige	Resorption/Osteogenese
2	2,3/2,5/2,8	mittelgradige	Resorption/Osteogenese
3	3,3/3,5/3,8	hochgradige	Resorption/Osteogenese
4		vollständige	Resorption

4.3.1.2 6-Wochen-Gruppe

Übersichtsaufnahmen zur Darstellung der 3 Präparate, die anschließend einzeln dargestellt werden:



Übersicht Nr. 2

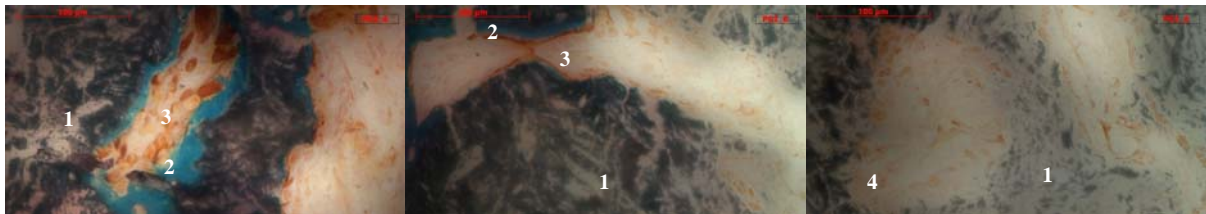
Übersicht Nr. 5

Übersicht Nr. 116

Abb. 44: Histologische Übersichtsaufnahmen Palasorb-G 6 Wochen.

1 Kortikalis; 2 Medulla; 3 Implantat

Präparat 2:



40-fache Vergrößerung

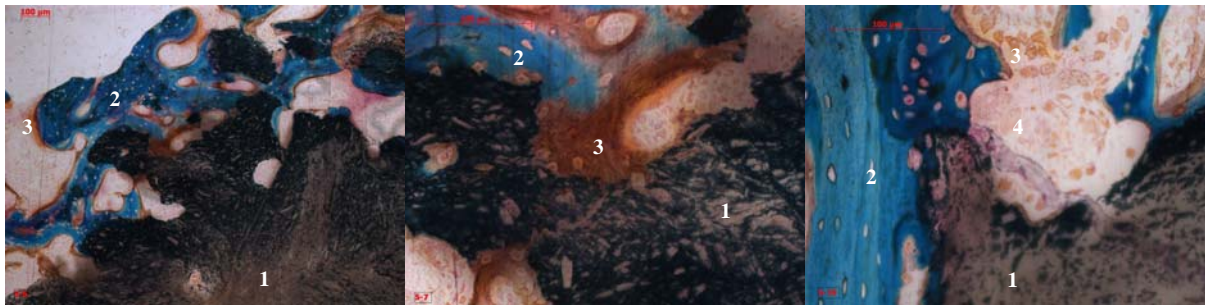
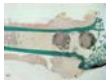
40-fache Vergrößerung

40-fache Vergrößerung

Abb. 45: Histologiepräparat Nr 2.

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen; 3 Osteoblasten bei Osteoidsynthese; 4 mehrkernige Riesenzellen

Beide Implantate sind gleichermaßen angeschnitten und liegen einseitig der Kortikalis an. Sie weisen eine zerklüftete Oberfläche sowie einige Resorptionslakunen auf. Auf den Formkörpern ist Knochenbildung zu erkennen, Trabekel haben sich zwischen ihnen ausgebildet oder ziehen in die Tiefe von Resorptionslakunen. Insbesondere das proximale Implantat wird zusätzlich trabekulär abgestützt. Die 10-fach vergrößerte Betrachtung zeigt mineralisierten Knochen sowie Osteoidsäume auf der Oberfläche, Anteile werden knöchern überbrückt, kleinere Fragmente vollständig umschlossen sowie Resorptionslakunen ausgekleidet. Die 40-fache Vergrößerung verdeutlicht die Anlagerung von Osteoblasten sowie die aktive zelluläre Resorption von Implantatmaterial durch mehrkernige Riesenzellen. Das Markgewebe ist mit Zellen infiltriert und verdichtet, stellenweise zystisch degeneriert.

Präparat 5:

10-fache Vergrößerung

40-fache Vergrößerung

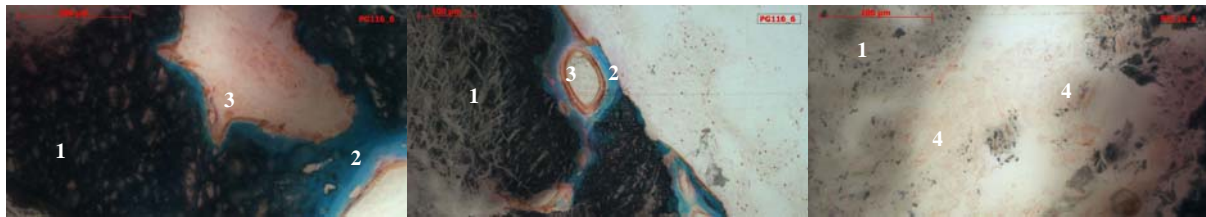
40-fache Vergrößerung

Abb. 46: Histologiepräparat Nr. 5.

1 Implantat; **2** mineralisierter Knochen; **3** Osteoblasten bei Osteoidsynthese; **4** mehrkernige Riesenzellen

Beide Formkörper liegen einseitig der Kortikalis an. Sowohl das proximale als auch das distale Implantat sind oberflächlich hochgradig zerklüftet, deutliche Resorptionslakunen ziehen tief in das Innere. Auffällig ist die starke trabekuläre Ummantelung beider Formkörper, Knochenbrücken führen von der Kortikalis in die Implantate. Bei 10-facher Vergrößerung erkennt man die aktive Knochensynthese auf der Implantatoberfläche mit flächigen Osteoidsäumen, Resorptionslakunen werden knöchern ausgekleidet oder überbrückt, einzelne Implantatbruchstücke knöchern umbaut. Bei 40-facher Vergrößerung werden die zahlreichen vitalen Osteoblasten sowie Osteozyten auf der Implantatoberfläche bzw. in Resorptionslakunen erkennbar. Gleichzeitig wird das Material zellulär abgebaut. Geringgradig ist das Gewebe granulomatös verdichtet.

Präparat 116:



40-fache Vergrößerung

20-fache Vergrößerung

40-fache Vergrößerung

Abb. 47: Histologiepräparat Nr. 116.

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen; 3 Osteoblasten bei Osteoidsynthese; 4 mehrkernige Riesenzellen

Beide Formkörper sind angeschnitten. Sie weisen eine deutlich resorbierte Oberfläche auf, einige Resorptionslakunen ziehen ins Innere. Die Implantate liegen einseitig der Kortikalis an, trabekuläre Neubildungen im Markraum fehlen auf dieser Schnittebene. Die Vergrößerung macht Knochenneubildung auf der Oberfläche sichtbar. 40-fach vergrößert werden aktive Osteoblasten bei vitaler Osteoidsynthese erkennbar, mehrkernige Riesenzellen sind in das aufgelockerte Material eingewandert. Es findet eine Ossifizierung von Implantatfragmenten statt, Resorptionslakunen werden knöchern ausgekleidet sowie überbrückt. Zur Stabilisierung der Implantate führen endostale Knochen trabekel in die Implantate.

Gesamtwertung der 6-Wochen-Gruppe:

Die Resorption und Osteogenese wurde mit einer Skala von 1–4 bewertet, innerhalb dieser Gruppe wurde eine Feingraduierung vorgenommen.

Tab. 16: Histologische Gesamtwertung Palasorb-G 6-Wochen.

Versuchszeitraum	Präparat-Nr.	Anzahl sichtbarer Formkörper	Grad der Resorption*	Grad der Osteogenese*
6 Wochen	2	2	2,0	1,3
	5	2	2,5	3,0
	116	2	2,5	1,5
maximale Zahl		6	12,0	9,0
erreichte Zahl		6	7,0	5,8

* Feingraduierung

0		keine Resorption/Osteogenese
1	1,3/1,5/1,8	geringgradige Resorption/Osteogenese
2	2,3/2,5/2,8	mittelgradige Resorption/Osteogenese
3	3,3/3,5/3,8	hochgradige Resorption/Osteogenese
4		vollständige Resorption

4.3.1.3 8-Wochen-Gruppe

Übersichtsaufnahmen zur Darstellung der 3 Präparate, die anschließend einzeln dargestellt werden:



Übersicht Nr. 9

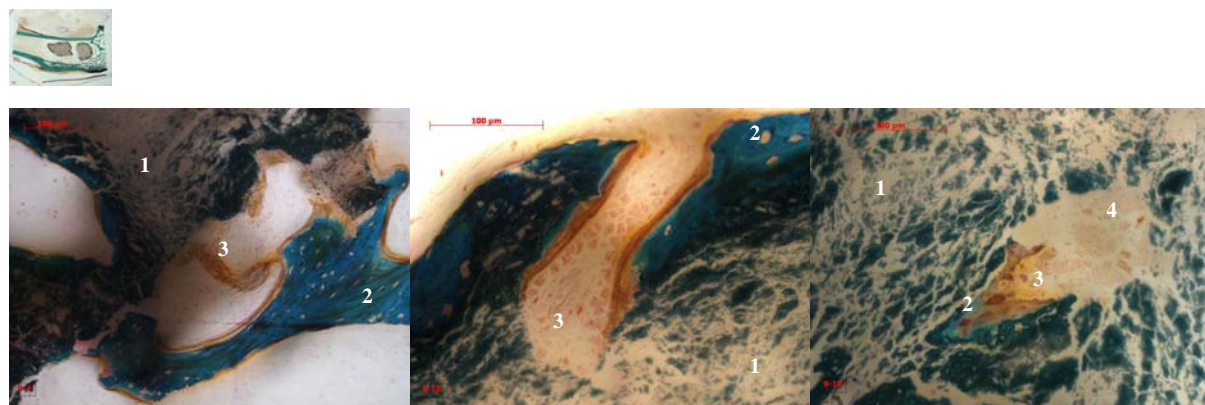
Übersicht Nr. 11

Übersicht Nr. 114

Abb. 48: Histologische Übersichtsaufnahmen Palasorb-G 8 Wochen.

1 Kortikalis; 2 Medulla; 3 Implantat

Präparat 9:



20-fache Vergrößerung

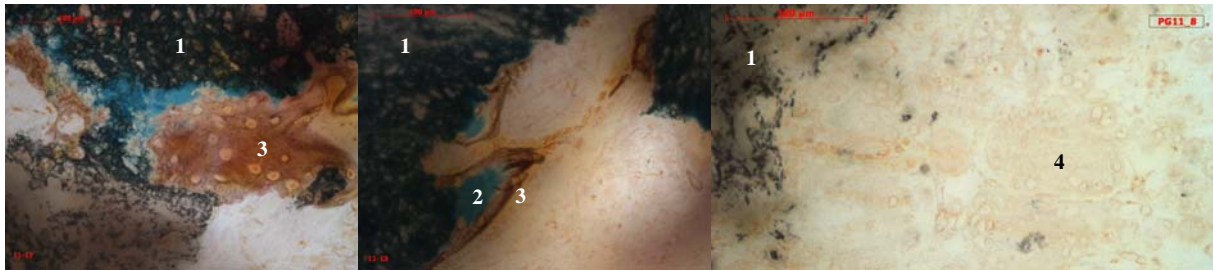
40-fache Vergrößerung

40-fache Vergrößerung

Abb. 49: Histologiepräparat Nr. 9.

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen; 3 Osteoblasten bei Osteoidsynthese; 4 mehrkernige Riesenzellen

Beide Implantate sind angeschliffen. Ihre Oberflächen sind zerklüftet und mit einzelnen Resorptionslakunen durchsetzt. Eine offensichtliche Trabekelneubildung im Markraum ist nicht zu erkennen. Bei 20-facher Vergrößerung wird die Osteogenese auf der Implantatoberfläche sowie in der Tiefe von Resorptionslakunen deutlich. Die 40-fache Vergrößerung zeigt zahlreiche aktive Osteoblasten sowohl dem Osteoid angelagert wie auch in direkten Kontakt mit der Implantatoberfläche. Resorption des Implantatmaterials geschieht zellulär durch mehrkernige Riesenzellen.

Präparat 11:

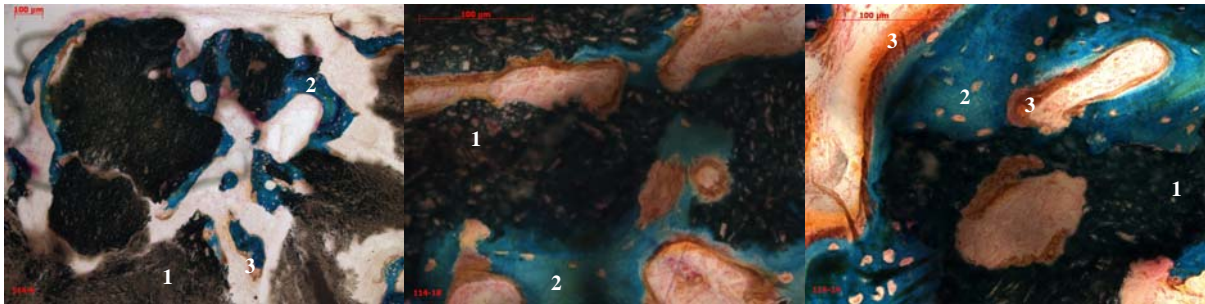
40-fache Vergrößerung

40-fache Vergrößerung

40-fache Vergrößerung

Abb. 50: Histologiepräparat Nr. 11.**1** Implantat; **2** mineralisierter Knochen; **3** Osteoblasten bei Osteoidsynthese; **4** mehrkernige Riesenzellen

Beide Formkörper sind auf diesem Präparat zu erkennen. Das distale Implantat ist in seiner Struktur aufgelockert und weist einzelne Resorptionslakunen auf. Hingegen ist der proximale Formkörper hochgradig in seiner Resorption fortgeschritten. Auch die trabekuläre Knochenneubildung konzentriert sich stärker im proximalen Implantatbereich. Die Betrachtung der Implantat-assoziierten, osteogenetisch aktiven Bereiche zeigt eine deutlich vitale Knochenneubildung auf der Implantatoberfläche, in Resorptionslakunen sowie zwischen den Implantatkörpern. Osteoblasten synthetisieren aktiv Osteoid, im Anschluss findet sich mineralisierter Geflechtknochen. Das Material wird zellulär abgebaut.

Präparat 114:

10-fache Vergrößerung

40-fache Vergrößerung

40-fache Vergrößerung

Abb. 51: Histologiepräparat Nr. 114.**1** Implantat; **2** mineralisierter Knochen; **3** Osteoblasten bei Osteoidsynthese; **4** mehrkernige Riesenzellen

Beide Implantate sind in ihrer Resorption weit fortgeschritten und weisen tiefe Resorptionslakunen auf. Sie sind deutlich von knöchernen Trabekeln umgeben. Die genauere Betrachtung zeigt aktive Osteoblasten bei der Osteoidbildung sowie bereits mineralisierten Knochen direkt auf der fragmentierten Implantatoberfläche, breite Knochen trabekel mit aktiver Osteogenese verbinden Implantatbruchstücke miteinander oder integrieren sie vollständig. Das Implantatmaterial wird zellulär resorbiert. Im Markraum besteht eine stark erhöhte Zellinfiltration, die Implantate sind von Granulationsgewebe umgeben. Teilweise unterliegt das Markgewebe deutlicher Degeneration sowie neu gebildeter Knochen der Nekrose. Stellenweise findet man Phagozytosereste. Die genauere Betrachtung der endostalen Kortikalis zeigt lokal nekrotische Zellen und Bakterienansammlungen.

Gesamtwertung der 8-Wochen-Gruppe:

Die Resorption und Osteogenese wurde mit einer Skala von 1–4 bewertet, innerhalb dieser Gruppe wurde eine Feingraduierung vorgenommen.

Tab. 17: Histologische Gesamtwertung Palasorb-G 8-Wochen.

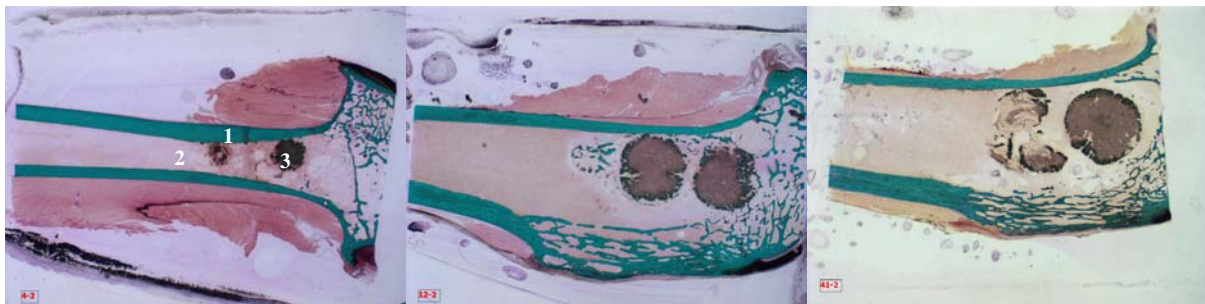
Versuchszeitraum	Präparat-Nr.	Anzahl sichtbarer Formkörper	Grad der Resorption*	Grad der Osteogenese*
8 Wochen	9	2	2,0	1,0
	11	2	2,5	2,0
	114	2	2,8	2,8
maximale Zahl		6	12,0	9,0
erreichte Zahl		6	7,3	5,8

* Feingraduierung:

- | | | |
|---|-------------|--------------------------------------|
| 0 | | keine Resorption/Osteogenese |
| 1 | 1,3/1,5/1,8 | geringgradige Resorption/Osteogenese |
| 2 | 2,3/2,5/2,8 | mittelgradige Resorption/Osteogenese |
| 3 | 3,3/3,5/3,8 | hochgradige Resorption/Osteogenese |
| 4 | | vollständige Resorption |

4.3.1.4 12-Wochen-Gruppe

Zusätzlich zur histomorphologischen Betrachtung werden die Präparate der 12-Wochen-Gruppe mittels polychromer Sequenzmarkierung bewertet. Übersichtsaufnahmen zur Darstellung der 3 Präparate, die im Folgenden einzeln dargestellt werden:



Übersicht Nr. 4

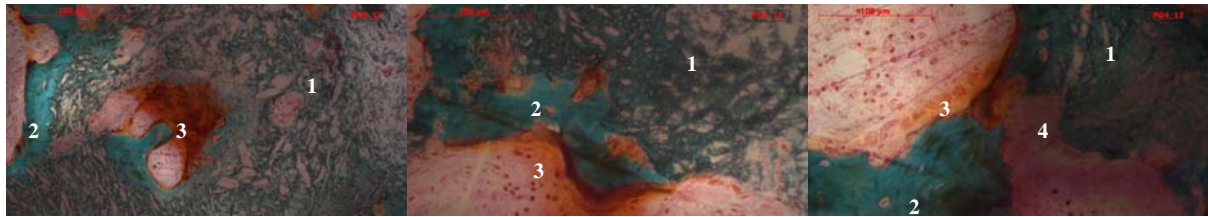
Übersicht Nr. 12

Übersicht Nr. 41

Abb. 52: Histologische Übersichtsaufnahmen Palasorb-G nach 12 Wochen.

1 Kortikalis; 2 Medulla; 3 Implantat

Präparat 4:



40-fache Vergrößerung

40-fache Vergrößerung

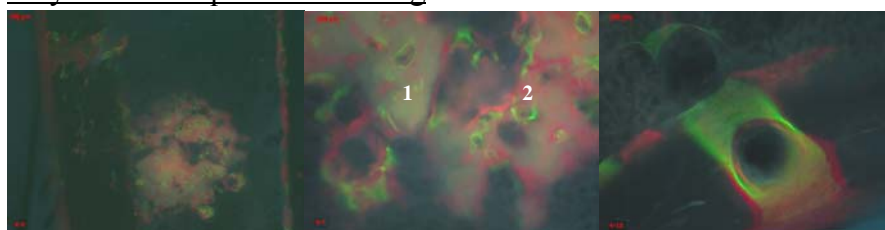
40-fache Vergrößerung

Abb. 53: Histologiepräparat Nr. 4.

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen; 3 Osteoblasten bei Osteoidsynthese; 4 mehrkernige Riesenzellen

Beide Implantate liegen der Kortikalis an. Das distale Implantat ist nur geringgradig, der proximale Formkörper mittelgradig angeschliffen. Beide Formkörper zeigen eine aufgelockerte Oberfläche und vereinzelt Resorptionslakunen. Die Knochenneubildung ist gering ausgeprägt. Die genauere Betrachtung zeigt die Osteogenese auf der Implantatoberfläche, Bruchstücke werden knöchern verbunden oder umbaut. Lokal sind vitale Osteoblasten bei der Osteoidbildung zu erkennen sowie die angrenzende Mineralisation mit Osteozyten. Das Implantatmaterial wird zellulär abgebaut. Der Markraum ist deutlich mit Zellen infiltriert und verdichtet. Lokal finden sich nekrotische Knochen- sowie Implantatreste in teilweise eitrigem Markgewebe

Polychrome Sequenzmarkierung



distales Implantat:

links 5-fache, rechts 10-fache Vergrößerung

Kortikalis:

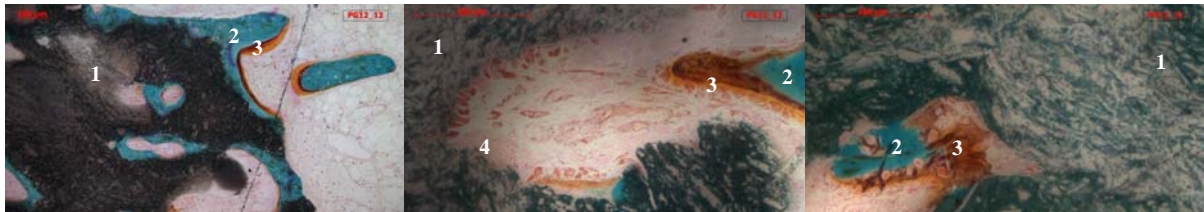
10-fache Vergrößerung

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen

Beide Implantatkörper sind diffus mit Farbstoffen angefärbt. Insbesondere das proximale Implantat weist randständig rötliche Einlagerungen auf. Bei beiden Formkörpern sind deutlich zirkuläre Anreicherungen der Fluorochrome Calcein-Grün und Alizarin-Rot zu erkennen, das proximale Implantat vor allem randständig, der distale Formkörper auch im zentralen Bereich.

Neben der zirkulären Anreicherung sind gleichfalls Trabekel auf der Implantatoberfläche in den genannten Farben sichtbar.

Präparat 12:



10-fache Vergrößerung

40-fache Vergrößerung

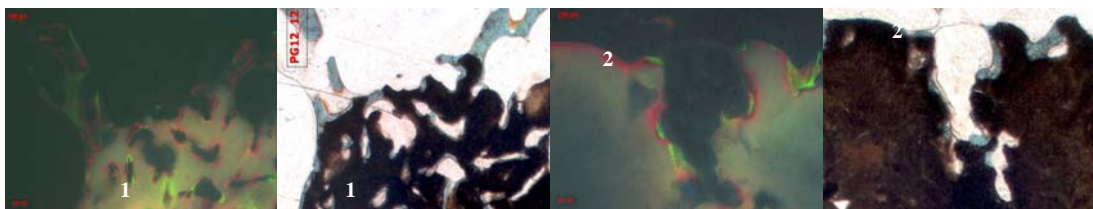
40-fache Vergrößerung

Abb. 55: Histologiepräparat Nr. 12.

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen; 3 Osteoblasten bei Osteoidsynthese; 4 mehrkernige Riesenzellen

Beide Implantate sind gleichermaßen angeschliffen. Sowohl der distale als auch der proximale Formkörper ist deutlich zerklüftet, breite Resorptionslakunen ziehen ins Innere. Knochen trabekel umgeben die Implantate und ziehen stellenweise in die Tiefe der Resorptionslakunen. Die 10-fache Vergrößerung zeigt die Knochenneubildung auf der Implantatoberfläche, Resorptionslakunen werden knöchern ausgekleidet und überbrückt, Implantatfragmente sind knöchern ummantelt. Die 40-fache Vergrößerung zeigt Osteoblasten bei der Osteoidsynthese auf bereits mineralisierten Knochen. Der Implantatabbau findet zellulär statt. Der Markraum ist hochgradig mit Zellen infiltriert und granulomatös verdichtet. Lokal sind Mark- und Granulationsgewebe sowie Osteoblasten und Riesenzellen degeneriert. Stellenweise ist das Gewebe eitrig eingeschmolzen.

Polychrome Sequenzmarkierung



5-fache Vergrößerung

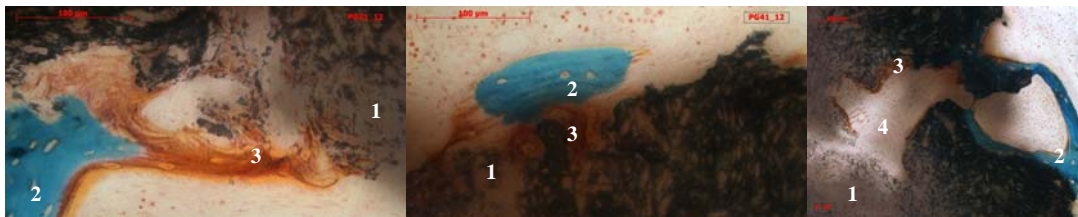
10-fache Vergrößerung)

Abb. 56: Polychrome Sequenzmarkierung Präparat Nr. 12.

Polychrome Sequenzmarkierung und Histomorphologie im Vergleich.
1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen

Die Farbstoffe haben sich diffus in den mineralisierten Randbereichen der Implantate gebunden. Auf der Implantatoberfläche sowie in der Auskleidung von Resorptionslakunen sind die Fluorochrome Calcein-Grün und Alizarin-Rot konzentriert in osteogenetisch aktiven Bereichen erkennbar.

Präparat 41:



40-fache Vergrößerung

40-fache Vergrößerung

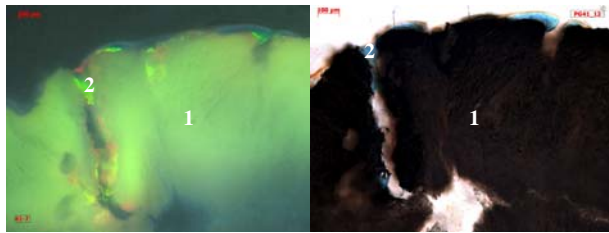
20-fache Vergrößerung

Abb. 57: Histologiepräparat Nr. 41.

1 Implantat; **2** mineralisierter Knochen; **3** Osteoblasten bei Osteoidsynthese; **4** mehrkernige Riesenzellen

Während das distale Implantat fragmentiert ist und deutliche Anzeichen der Resorption aufweist, ist der proximale Formkörper weitgehend in seiner Form erhalten und vereinzelt mit Resorptionslakunen durchsetzt. Die Implantat-assoziierte Knochenbildung ist bei beiden Formkörpern erkennbar, insbesondere im inneren Resorptionsbereich des distalen Implantats haben sich geflechtartige Trabekel mit aktiven Osteoidsaum gebildet. Des Weiteren wird Knochenneubildung mit aktivem Osteoidsaum direkt auf der Implantatoberfläche sichtbar, Fragmente werden umbaut und Resorptionslakunen knöchern ausgekleidet. Gleichzeitig findet eine aktive zelluläre Resorption des Implantatmaterials statt. Im Markraum besteht eine deutlich erhöhte entzündliche Zellinfiltration. Das weitgehend resorbierte distale Implantat ist mit verdichtetem Granulationsgewebe durchsetzt. Lokal sind Markgewebe, Riesenzellen und neu gebildeter Knochen degeneriert oder nekrotisch.

Polychrome Sequenzmarkierung



10-fache Vergrößerung

Abb. 58: Polychrome Sequenzmarkierung Präparat Nr. 41.

Polychrome Sequenzmarkierung und Histomorphologie im Vergleich
1 Implantat; **2** mineralisierter Knochen

In den mineralisierten Randbereichen der Implantate sind die Farbstoffe diffus eingelagert erkennbar. Lokal haben sich insbesondere die Fluorochrome Calcein-Grün und Alizarin-Rot in osteogenetisch aktiven Bereichen auf der Implantatoberfläche sowie in den Resorptionslakunen angereichert.

Gesamtwertung der 12-Wochen-Gruppe:

Die Resorption und Osteogenese wurde mit einer Skala von 1–4 bewertet, innerhalb dieser Gruppe wurde eine Feingraduierung vorgenommen.

Tab. 18: Histologische Gesamtwertung Palasorb-G nach 12- Wochen.

Versuchszeitraum	Präparat-Nr.	Anzahl sichtbarer Formkörper	Grad der Resorption*	Grad der Osteogenese*
12 Wochen	4	2	2,0	1,5
	12	2	2,8	2,5
	41	2	2,5	2,0
maximale Zahl		6	12,0	9,0
erreichte Zahl		6	7,3	6,0

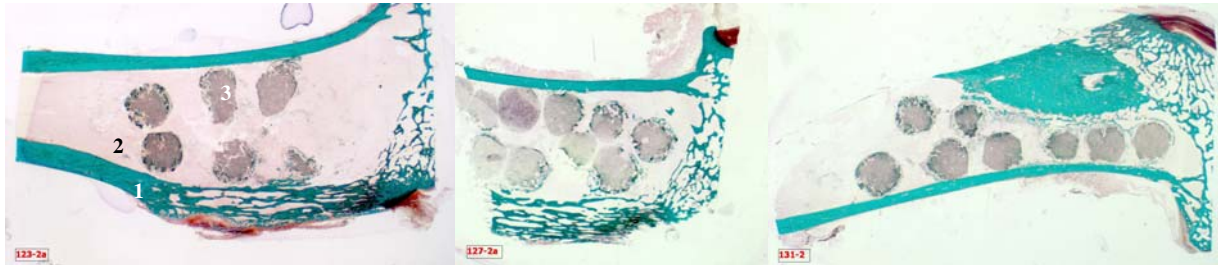
* Feingraduierung

0		keine Resorption/Osteogenese
1	1,3/1,5/1,8	geringgradige Resorption/Osteogenese
2	2,3/2,5/2,8	mittelgradige Resorption/Osteogenese
3	3,3/3,5/3,8	hochgradige Resorption/Osteogenese
4		vollständige Resorption

4.3.2 Palasorb-V

4.3.2.1 4-Wochen-Gruppe

Übersichtsaufnahmen zur Darstellung der 3 Präparate, die anschließend einzeln dargestellt werden:



Übersicht Nr. 123

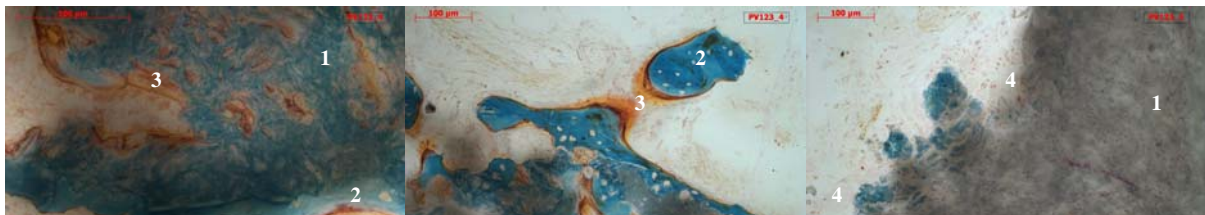
Übersicht Nr. 127

Übersicht Nr. 131

Abb. 59: Histologische Übersichtsaufnahmen Palasorb-V nach 4 Wochen.

1 Kortikalis; 2 Medulla; 3 Implantat

Präparat 123:



40-fache Vergrößerung

20-fache Vergrößerung

20-fache Vergrößerung

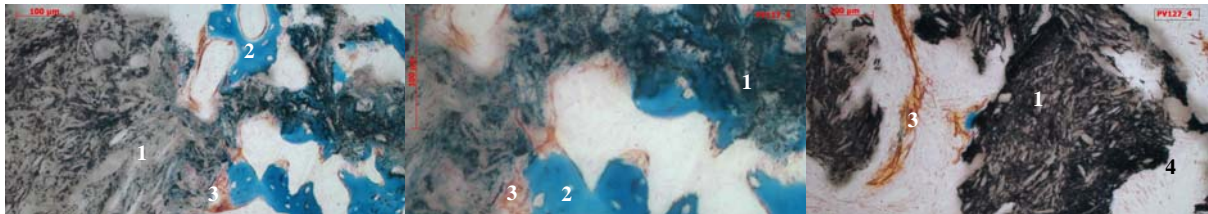
Abb. 60: Histologiepräparat Nr. 123.

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen; 3 Osteoblasten bei Osteoidsynthese; 4 mehrkernige Riesenzellen

Von den 14 implantierten Formkörpern sind 6 angeschnitten. Die Übersicht zeigt die Implantate mit stark zerklüfteten Oberflächen und Resorptionslakunen, die ins Innere ziehen. Alle Formkörper zeigen eine mittelgradige Osteogenese auf ihrer Oberfläche. Die 10-fache Vergrößerung verdeutlicht die Knochensyntheseleistung auf der Implantatoberfläche und in der Tiefe von Resorptionslakunen, Knochenspannen überbrücken Implantatanteile, Fragmente werden knöchern integriert. Bei 40-facher Vergrößerung erkennt man vitale Osteoblasten bei der aktiven Osteoidbildung sowie Osteozyten in bereits mineralisiertem Knochen. Riesenzellen bauen das Implantatmaterial ab. Im Markraum besteht um die Implantate eine erhöhte zelluläre Infiltration. Das Markgewebe unterliegt teilweise deutlicher Degeneration und eitriger Nekrose, in den Resorptionslakunen liegt lokal entzündliches

Granulationsgewebe vor. Nur wenige der neu gebildeten Knochentrabekel sind von diesen Vorgängen betroffen.

Präparat 127:



20-fache Vergrößerung

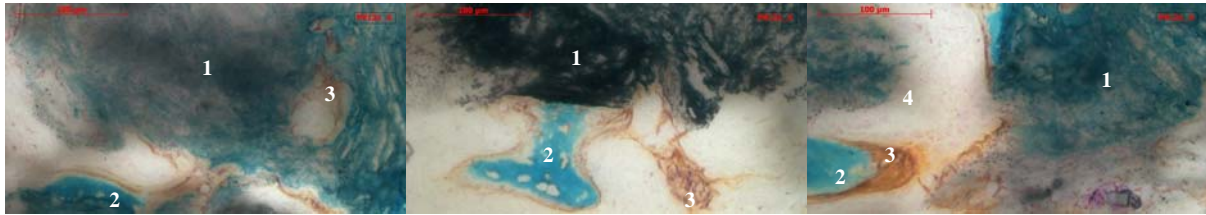
40-fache Vergrößerung

20-fache Vergrößerung

Abb. 61: Histologiepräparat Nr. 127.

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen; 3 Osteoblasten bei Osteoidsynthese; 4 mehrkernige Riesenzellen

Von den 10 angeschnittenen Formkörpern fallen insbesondere die 6 proximalen Implantate durch fortgeschrittene Resorption sowie durch randständige Ossifikation auf. Bei 2,5-facher Vergrößerung des hoch proximalen Implantats wird die fortgeschrittene Resorption anhand von tiefen Lakunen deutlich, gleichzeitig ist der Körper von zahlreichen Knochentrabekeln umgeben. 20-fach vergrößert erkennt man Knochenbildung mit aktiven Osteoidsäumen auf der Implantatoberfläche, Lakunen werden knöchern überbrückt, während feine Osteoidläufer in die Tiefe ziehen. Das Implantatmaterial wird zellulär abgebaut. Es fallen granulomatöse Verdichtungen sowie eitrige Massen im Markraum auf, neu gebildeter Knochen ist stellenweise degenerativ und nekrotisch. Beim Versuch des zellulären Abbaus entstehen zystische Vakuolen von degenerierten Riesenzellen. Bei 40-facher Vergrößerung wurden lokal Bakterien an der Implantatoberfläche entdeckt.

Präparat 131:

40-fache Vergrößerung

40-fache Vergrößerung

40-fache Vergrößerung

Abb. 62: Histologiepräparat Nr. 131.

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen; 3 Osteoblasten bei Osteoidsynthese; 4 mehrkernige Riesenzellen

8 Implantatkörper sind angeschliffen. Alle sind oberflächlich zerklüftet, insbesondere die distalen Implantate weisen auf dieser Schliffebene deutliche Zeichen der Resorption auf. Bis auf eine Ausnahme (mittlerer Formkörper) sind alle Implantate trabekulär ummantelt. Die 10-fache Vergrößerung zeigt sowohl Knochen trabekel, die die Formkörper umfassen, als auch Knochenausläufer, die zur Implantatoberfläche führen, sich dort verankern oder in die Tiefe der Resorptionslakunen ziehen. Die 40-fache Vergrößerung macht die Osteogenese einschließlich vitaler Osteoidsäume auf der Implantatoberfläche deutlich, Riesenzellen bauen das Material ab. Das Markgewebe ist verdichtet und degenerativ verändert, stellenweise nekrotisch oder eitrig eingeschmolzen. Lokal sind Knochenneubildungen der Degeneration und Nekrose unterworfen. Die 40-fache Vergrößerung zeigt Bakterien auf der Implantatoberfläche sowie im Markraum.

Gesamtwertung der 4-Wochen-Gruppe:

Die Resorption und Osteogenese wurde mit einer Skala von 1–4 bewertet, innerhalb dieser Gruppe wurde eine Feingraduierung vorgenommen.

Tab. 19: Histologische Gesamtwertung Palasorb-V 4-Wochen.

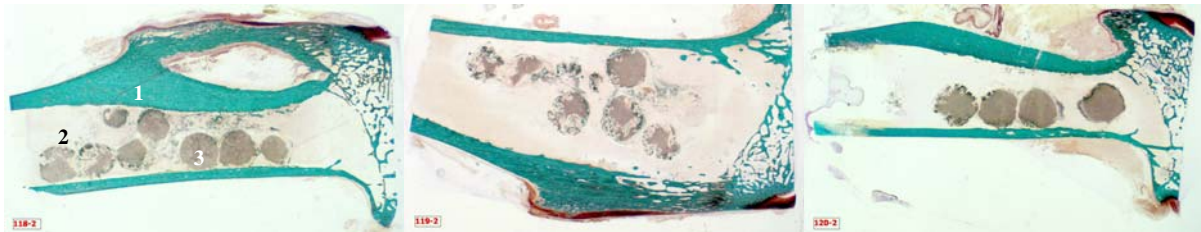
Versuchszeitraum	Präparat-Nr.	Anzahl sichtbarer Formkörper	Grad der Resorption*	Grad der Osteogenese*
4 Wochen	123	6	2,3	2,0
	127	10	1,8	1,5
	131	8	1,8	2,0
maximale Zahl		42	12,0	9,0
erreichte Zahl		24	5,9	5,5

* Feingraduierung

0		keine Resorption/Osteogenese
1	1,3/1,5/1,8	geringgradige Resorption/Osteogenese
2	2,3/2,5/2,8	mittelgradige Resorption/Osteogenese
3	3,3/3,5/3,8	hochgradige Resorption/Osteogenese
4		vollständige Resorption

4.3.2.2 6-Wochen-Gruppe

Übersichtsaufnahmen zur Darstellung der 3 Präparate, die anschließend einzeln dargestellt werden:



Übersicht Nr. 118

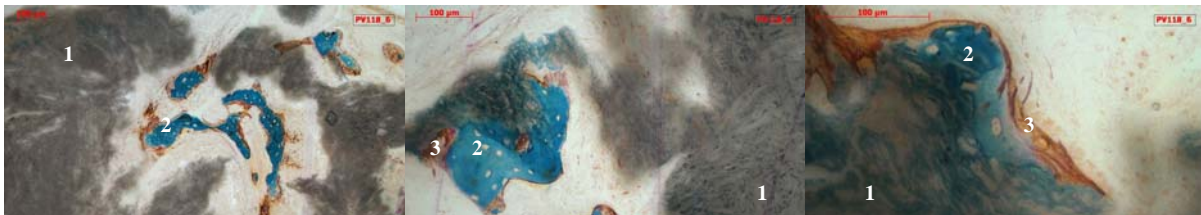
Übersicht Nr. 119

Übersicht Nr. 120

Abb. 63: Histologische Übersichtsaufnahmen Palasorb-V nach 6 Wochen.

1 Kortikalis; 2 Medulla; 3 Implantat

Präparat 118:



10-fache Vergrößerung

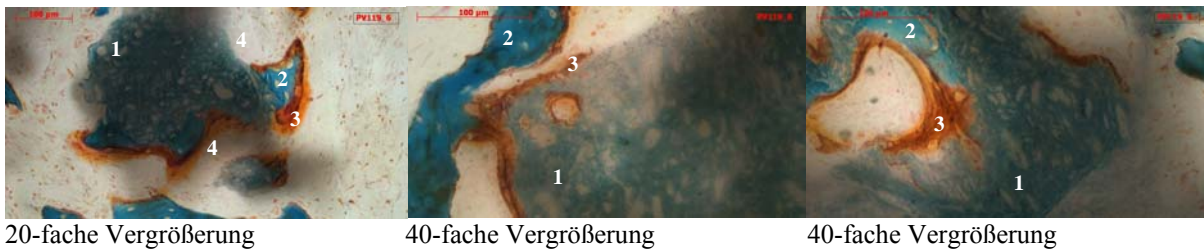
20-fache Vergrößerung

40-fache Vergrößerung

Abb. 64: Histologiepräparat Nr. 118.

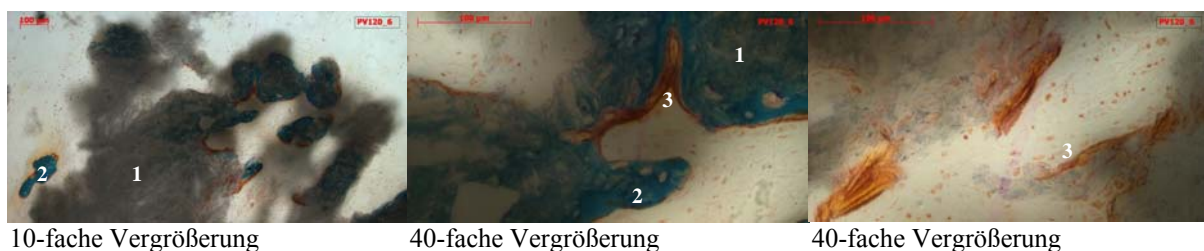
1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen; 3 Osteoblasten bei Osteoidsynthese

Die Dünnschliff-Übersicht zeigt 8 Formkörper. Vor allem die 4 distalen Implantate unterliegen deutlichen Zeichen der Resorption in Form von tiefen sowie breiten Resorptionsbuchten. Mit Ausnahme eines Formkörpers ist bei allen eine Implantat-assoziierte Knochenbildung erkennbar. Bei 2,5-fach vergrößerter Betrachtung des Implantats, das distal an 2. Stelle liegt, wird in dem resorbierten Anteil zentral Knochenneubildung erkennbar. Die 10-fache Vergrößerung zeigt Trabekel- und Geflechtknochenbildung mit aktiven Osteoblasten bei der Osteoidbildung. Die proximalen Implantatkörper zeigen auf dieser Schliffebene kaum Anzeichen von Resorption. Sie sind ebenfalls von feinen Knochenneubildungen umgeben, die an ihrer Oberfläche Osteoidsäume aufweisen. Riesenzellen infiltrieren die Implantatoberfläche und die aufgelockerte Implantatstruktur. Das Markgewebe in und um die Implantatkörper ist teilweise granulomatös verdichtet und lokal einschließlich des neu gebildeten Knochens einer Degeneration und Nekrose unterworfen.

Präparat 119:**Abb. 65: Histologiepräparat Nr. 119.**

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen; 3 Osteoblasten bei Osteoidsynthese; 4 mehrkernige Riesenzellen

8 Implantatkörper sind in unterschiedlichem Grad angeschliffen. Auffällig sind die fortgeschrittene Resorption sowie die deutliche Trabekelbildung um und in den Implantaten. Die 10-fach vergrößerte Betrachtung des maximal distalen Implantats zeigt den weitgehend resorbierten Körper mit deutlicher Knochenbildung sowie knöcherner Implantatintegration. Bei 40-facher Vergrößerung ist die aktive Osteogenese am Implantat erkennbar. Sowohl an der Implantatoberfläche als auch am Osteoidsaum des neu gebildeten Knochens sind aktive Osteoblasten wie Perlenschnüre aufgereiht. Neben der Knochenneubildung wird das Implantatmaterial aktiv durch Riesenzellen resorbiert. Das Markgewebe ist verdichtet, dazwischen liegendes Gewebe lokal degeneriert oder nekrotisch. In unmittelbarer Nähe vitaler Knochen trabekel sind nekrotische Knochenreste zu finden. Diese werden wiederum von Riesenzellen aufgelöst, die teilweise degenerieren und zystische Vakuolen hinterlassen. Die gezielte Suche zeigt lokal Bakterien an der Implantatoberfläche.

Präparat 120:**Abb. 66: Histologiepräparat Nr. 120.**

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen; 3 Osteoblasten bei Osteoidsynthese

4 Implantatkörper sind angeschliffen. Die 3 proximal gelegenen sind in ihrer Form erhalten und weisen kaum Zeichen der Resorption auf. Der distale Formkörper hingegen ist in seiner Resorption weiter voran geschritten. Bei allen Implantaten findet lokal nur eine sehr geringe randständige Ossifikation statt. Die 10-fache Vergrößerung des maximal distalen Formkörpers zeigt kleine Resorptionszonen, die mit schmalen Osteoid- und Knochensäumen ausgekleidet sind sowie Implantatreste, die vollständig knöchern integriert sind. Bei 40-facher Vergrößerung erkennt man in die Oberfläche einwandernde Osteoblasten, Osteoidbildung sowie bereits mineralisierten Knochen. Gleichzeitig werden Bereiche degenerierten Markgewebes sichtbar, teilweise nekrotisch sowie eitrig eingeschmolzen. In der Nachbarschaft befindliche Knochenneubildungen unterliegen ebenfalls der Degeneration oder Nekrose. Bei genauer Suche wurden Bakterienansammlungen gefunden.

Gesamtwertung der 6-Wochen-Gruppe:

Die Resorption und Osteogenese wurde mit einer Skala von 1–4 bewertet, innerhalb dieser Gruppe wurde eine Feingraduierung vorgenommen.

Tab. 20: Histologische Gesamtwertung Palasorb-V nach 6- Wochen.

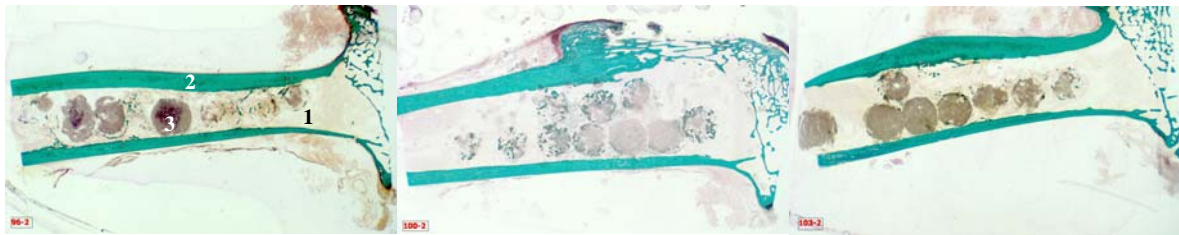
Versuchszeitraum	Präparat-Nr.	Anzahl sichtbarer Formkörper	Grad der Resorption*	Grad der Osteogenese*
6 Wochen	118	8	2,0	1,5
	119	8	3,0	2,3
	120	4	1,3	0,8
maximale Zahl		42	12,0	9,0
erreichte Zahl		20	6,3	4,6

* Feingraduierung

0		keine Resorption/Osteogenese
1	1,3 / 1,5 / 1,8	geringgradige Resorption/Osteogenese
2	2,3 / 2,5 / 2,8	mittelgradige Resorption/Osteogenese
3	3,3 / 3,5 / 3,8	hochgradige Resorption/Osteogenese
4		vollständige Resorption

4.3.2.3 8-Wochen-Gruppe

Übersichtsaufnahmen zur Darstellung der 3 Präparate, die anschließend einzeln dargestellt werden:



Übersicht Nr. 96

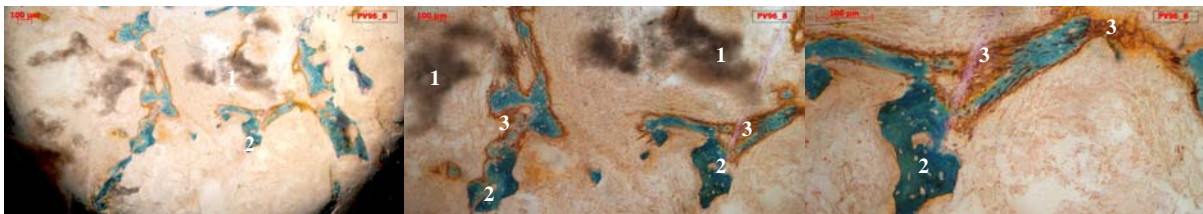
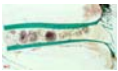
Übersicht Nr. 100

Übersicht Nr. 103

Abb. 67: Histologische Übersichtsaufnahmen Palasorb-V nach 8 Wochen.

1 Kortikalis; 2 Medulla; 3 Implantat

Präparat 96:



5-fache Vergrößerung

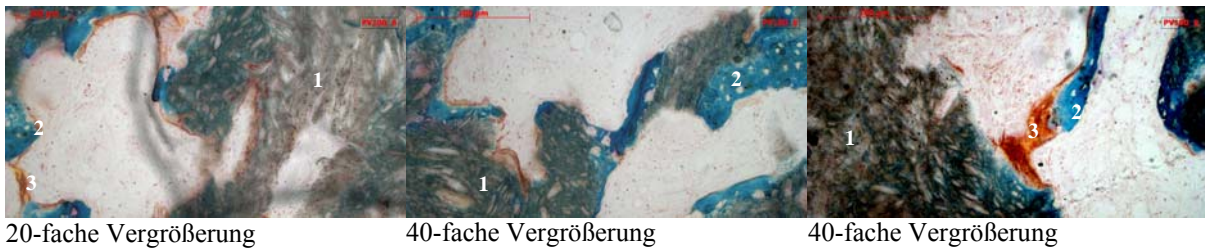
10-fache Vergrößerung

20-fache Vergrößerung

Abb. 68: Histologiepräparat Nr. 96.

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen; 3 Osteoblasten bei Osteoidsynthese

7 Implantate sind angeschliffen. Im Gegensatz zu den distalen Formkörpern sind insbesondere von den 3 proximalen Formkörpern nur Reste erkennbar. Im Markraum befinden sich Implantat-assoziierte Knochentrabekel. Die vergrößerte Betrachtung zeigt aktive Osteoidsäume auf bereits mineralisierten Knochen sowie in geringer Ausprägung auf dem Implantatmaterial. Histopathologisch fällt deutlich eine eitrig Zellodegeneration des Markgewebes auf. Auch einige der neu gebildeten Knochentrabekel sind der Nekrose unterworfen. Bakterien finden sich lokal im Markraum sowie an der Kortikalis.

Präparat 100:

20-fache Vergrößerung

40-fache Vergrößerung

40-fache Vergrößerung

Abb. 69: Histologiepräparat Nr. 100.

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen; 3 Osteoblasten bei Osteoidsynthese

Die Übersicht zeigt 10 Implantatkörper. Die Mehrzahl ist an der Oberfläche stark zerklüftet und weist tiefe Resorptionslakunen auf, nur 2 Implantate sind in Struktur und Form größtenteils erhalten. Randständig wird eine stark erhöhte Mineralisation sowie ausgeprägte Trabekelzubildung an den Implantatoberflächen und in den Resorptionslakunen deutlich. Die Vergrößerungen zeigen Knochenneubildung mit aktivem Osteoidsaum direkt auf der Implantatoberfläche sowie Knochen trabekel, die Implantatbruchstücke miteinander verbinden. Implantatreste sind vollständig von neu gebildetem Knochen umgeben und integriert. Auffällig ist die degenerative Veränderung des umgebenden Markgewebes. Teilweise findet man zwischen den Implantaten eitrig, nekrotische Gewebmassen. Nahe liegende Knochenneubildungen sind der Degeneration und Nekrose unterworfen, stellenweise nur noch als nekrotische Phagozytoseprodukte. Bei 100-facher Vergrößerung sind Bakterien auf der Implantatoberfläche erkennbar.

Präparat 103:

10-fache Vergrößerung

40-fache Vergrößerung

20-fache Vergrößerung

Abb. 70: Histologiepräparat Nr. 103.

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen; 3 Osteoblasten bei Osteoidsynthese

Die Dünnschliff-Übersicht zeigt 8 Implantatkörper. Von dem proximalen Bereich der Tibia bis hin zur Diaphyse nimmt der Grad der Resorption ab. Implantat-assoziierte Knochenbildung zeigt sich an allen Implantaten in Form von oberflächlichen Lamellen sowie Trabekeln, die in die Tiefe der Resorptionslakunen ziehen oder als Brücken zwischen Implantatanteilen. Insgesamt ist die Knochenbildung nur gering ausgeprägt. Stellenweise ist das Markgewebe degenerativen Prozessen unterworfen. Die darin befindlichen trabekulären Neubildungen weisen degenerative sowie nekrotische Anteile auf, welche sich auch als nekrotische Resorptionsprodukte nach Phagozytendegeneration darstellen. Bakterien wurden distal in Implantatnähe gefunden.

Gesamtwertung der 8-Wochen-Gruppe

Die Resorption und Osteogenese wurde mit einer Skala von 1–4 bewertet, innerhalb dieser Gruppe wurde eine Feingraduierung vorgenommen.

Tab. 21: Histologische Gesamtwertung Palasorb-V nach 8- Wochen.

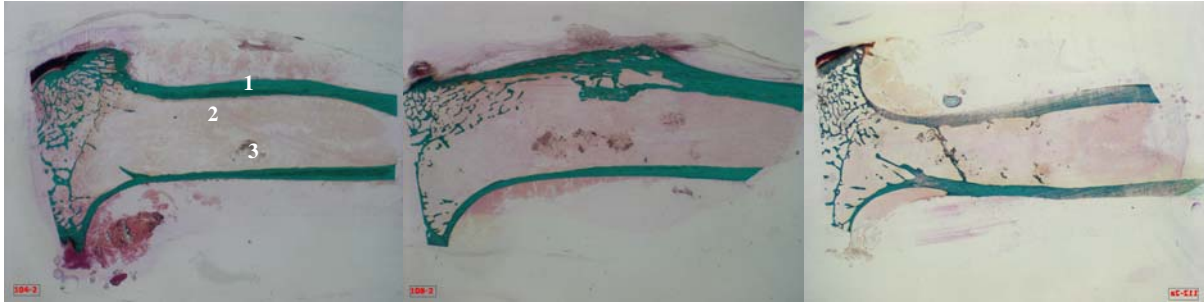
Versuchszeitraum	Präparat-Nr.	Anzahl sichtbarer Formkörper	Grad der Resorption*	Grad der Osteogenese*
8 Wochen	96	7	2,0	1,0
	100	10	3,0	2,0
	103	8	2,0	1,3
maximale Zahl		42	12,0	9,0
erreichte Zahl		25	7,0	4,3

* Feingraduierung

- | | | |
|---|-------------|--------------------------------------|
| 0 | | keine Resorption/Osteogenese |
| 1 | 1,3/1,5/1,8 | geringgradige Resorption/Osteogenese |
| 2 | 2,3/2,5/2,8 | mittelgradige Resorption/Osteogenese |
| 3 | 3,3/3,5/3,8 | hochgradige Resorption/Osteogenese |
| 4 | | vollständige Resorption |

4.3.2.4 12-Wochen-Gruppe

Zusätzlich zur histomorphologischen Betrachtung werden die Präparate der 12-Wochen-Gruppe mittels polychromer Sequenzmarkierung bewertet. Übersichtsaufnahmen zur Darstellung der 3 Präparate, die im Folgenden einzeln dargestellt werden:



Übersicht Nr. 104

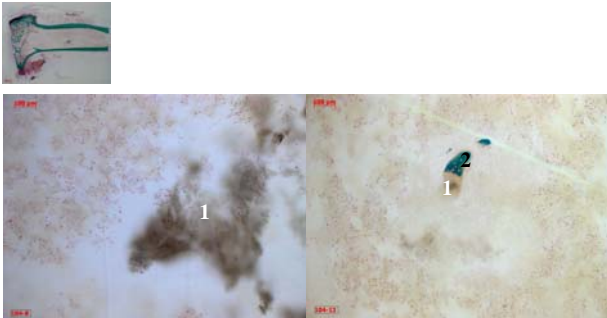
Übersicht Nr. 108

Übersicht Nr. 112

Abb. 71: Histologische Übersichtsaufnahmen Palasorb-V nach 12 Wochen.

1 Kortikalis; 2 Medulla; 3 Implantat

Präparat 104:



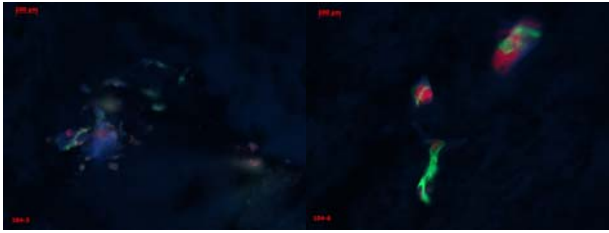
10-fache Vergrößerung

Abb. 72: Histologiepräparat Nr. 104.

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen

Es ist nur noch ein geringfügiger, strukturell aufgelockerter Implantatrest erkennbar. Die Vergrößerung zeigt kaum sichtbare trabekuläre Knochenneubildungen in der Nähe des Implantatrests. Das Knochenmark ist mit Zellen infiltriert. Hoch proximal im spongiosen Bereich der Tibia zeigt sich ein geringfügiger Bereich der eitrigen Einschmelzung der Zellen, Bakterien wurden nicht gefunden.

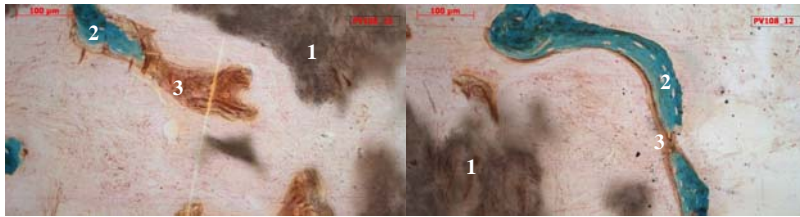
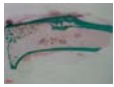
Polychrome Sequenzmarkierung



10-fache Vergrößerung.

Abb. 73: Polychrome Sequenzmarkierung, Präparat Nr. 104.

Der medullär sichtbare Implantatrest ist diffus sowohl mit den Fluorochromen Calcein-Grün und Alizarin-Rot schwach eingefärbt. Eine feine trabekuläre Neubildung wird leuchtend in den zuletzt genannten Farben erkennbar.

Präparat 108:

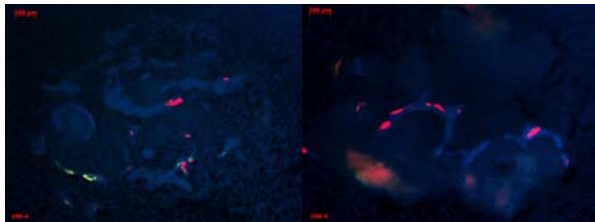
20-fache Vergrößerung

20-fache Vergrößerung

Abb. 74: Histologiepräparat Nr. 108.

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen; 3 Osteoblasten bei Osteoidsynthese

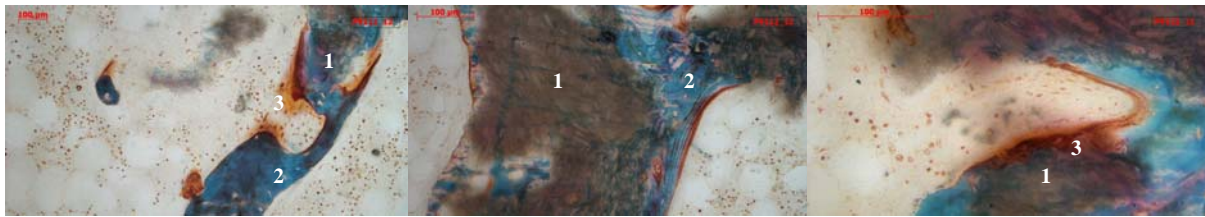
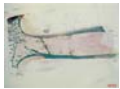
Die Implantatkörper sind weitgehend resorbiert und es sind nunmehr die Reste von vermutlich 4 Implantaten zu erkennen. Die Vergrößerung weist neben den Implantatresten einzelne Knochentrabekel mit aktiven Osteoidsäumen auf. Im Markraum ist eine erhöhte Zellinfiltration erkennbar, das Markgewebe ist im Bereich der Implantate granulomatös verdichtet und das Granulationsgewebe zum Teil degeneriert. Bakterienansammlungen sind bei 100-facher Vergrößerung lokal auf einem Implantatrest nachweisbar.

Polychrome Sequenzmarkierung:

10-fache Vergrößerung.

Abb. 75: Polychrome Sequenzmarkierung, Präparat Nr. 108.

Innerhalb der Implantatreste zeigen sich im Bereich der Trabekelbildungen als Einlagerung von Alizarin und Calcein-Grün kleine, leuchtend rote und geringfügig grün eingefärbte Bereiche.

Präparat 112:

10-fache Vergrößerung

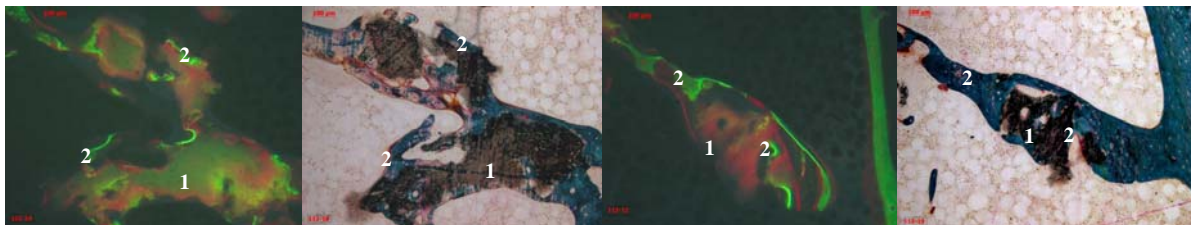
20-fache Vergrößerung

40-fache Vergrößerung

Abb. 76: Histologiepräparat Nr. 112.

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen; 3 Osteoblasten bei Osteoidsynthese

Es sind noch sehr geringfügige Implantatreste vorhanden. Eine Knochenlamelle zieht von der einen Kortikalis zur gegenüberliegenden Seite. Integriert sind die Reste der Formkörper. Bei 40-facher Vergrößerung erkennt man die aktive Implantatintegration mit vitalen Osteoblasten und Osteozyten. Gleichzeitig fällt die deutlich erhöhte Zellinfiltration auf, an der Kortikalis finden sich lokal Bakterien sowie eitrige Gewebeeinschmelzungen.

Polychrome Sequenzmarkierung

10-fache Vergrößerung

Abb. 77: Polychrome Sequenzmarkierung, Präparat Nr. 112.

Polychrome Sequenzmarkierung und Histomorphologie im Vergleich.

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen.

Die Implantatreste, die in die quer verlaufende Knochenlamelle integriert sind, sind diffus rötlich mit Alizarin eingefärbt. Die Knochenlamelle hingegen hat die Farbe Calcein-Grün angereichert.

Gesamtwertung der 12-Wochen-Gruppe:

Die Resorption und Osteogenese wurde mit einer Skala von 1–4 bewertet, innerhalb dieser Gruppe wurde eine Feingraduierung vorgenommen.

Tab. 22: Histologische Gesamtwertung Palasorb-V nach 12- Wochen.

Versuchszeitraum	Präparat-Nr.	Anzahl sichtbarer Formkörper	Grad der Resorption*	Grad der Osteogenese*
12 Wochen	104	Rest	3,8	0,3
	108	Rest	3,3	1,0
	112	Rest	3,5	1,0
maximale Zahl		42	12,0	9,0
erreichte Zahl		0	10,6	2,3

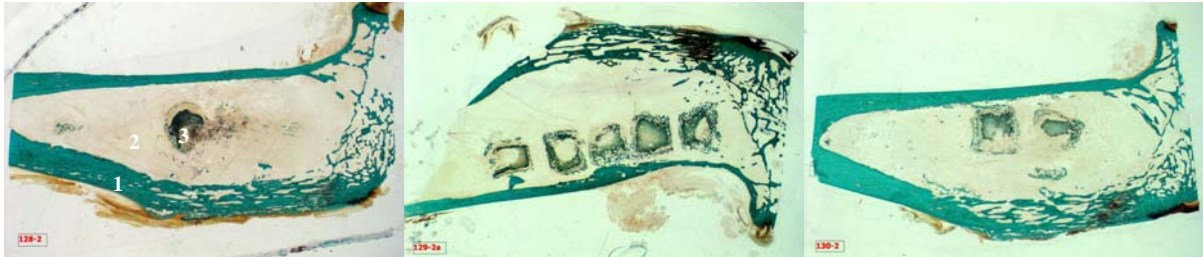
* Feingraduierung

0	0,3/0,5/0,8	keine Resorption/Osteogenese
1	1,3/1,5/1,8	geringgradige Resorption/Osteogenese
2	2,3/2,5/2,8	mittelgradige Resorption/Osteogenese
3	3,3/3,5/3,8	hochgradige Resorption/Osteogenese
4		vollständige Resorption

4.3.3 Osteoset®

4.3.3.1 4-Wochen-Gruppe

Übersichtsaufnahmen zur Darstellung der 3 Präparate, die anschließend einzeln dargestellt werden:



Übersicht Nr. 128

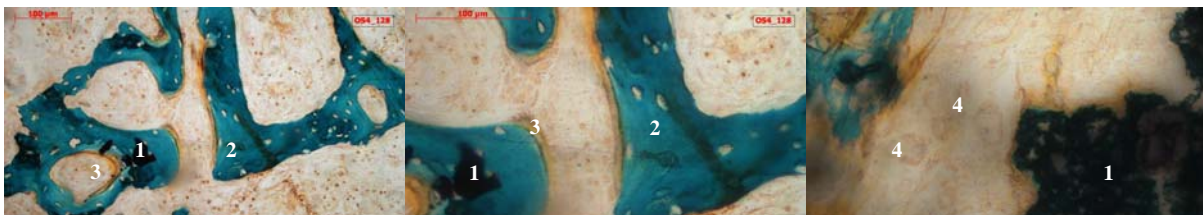
Übersicht Nr. 129

Übersicht Nr. 130

Abb. 78: Histologische Übersichtsaufnahmen Osteoset® nach 4 Wochen.

1 Kortikalis; 2 Medulla; 3 Implantat

Präparat 128:



20-fache Vergrößerung

40-fache Vergrößerung

40-fache Vergrößerung

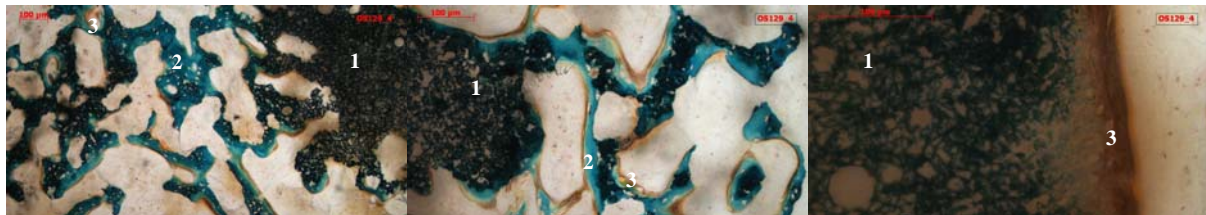
Abb. 79: Histologiepräparat Nr. 128.

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen; 3 Osteoblasten bei Osteoidsynthese; 4 mehrkernige Riesenzellen

Von 5 Implantaten wurde auf dieser Schnittebene nur 1 Körper erfasst. Dieser zeigt deutliche Zeichen der Resorption. Gleichzeitig hat sich ein trabekulärer Knochenring gebildet, der stellenweise im Implantatmaterial verankert ist. Der Trabekelring besteht aus bereits mineralisierten Knochen sowie in Richtung Implantatoberfläche aus Osteoid. Im distalen Bereich des Implantats findet gleichzeitig eine aktive, vitale Osteogenese auf dem Implantatmaterial statt. Zum geringen Teil sind auch Knochenzubildungen anderer Formkörper angeschliffen. Distal sind Implantatreste in die Knochenneubildungen integriert. Die nähere Betrachtung zeigt die Trabekel mit angelagerten Osteoblasten bei der Osteoidsynthese sowie beginnender Mineralisation. Im proximalen Areal der Tibia sind ebenfalls trabekuläre Neubildungen einschließlich Osteoblasten bei der Osteoidsynthese zu

erkennen. Das Markgewebe ist zellreich und im Bereich von Implantatresten granulomatös verdichtet. Auf neu gebildeten Knochen trabekel sind neben aktiver und vitaler Osteogenese lokal degenerative und nekrotische Areale zu erkennen.

Präparat 129:



10-fache Vergrößerung

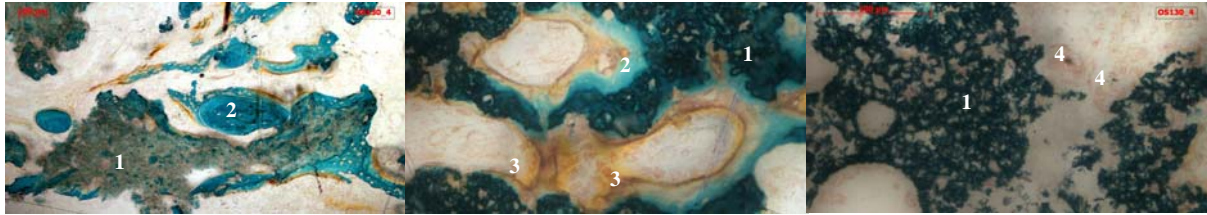
20-fache Vergrößerung

40-fache Vergrößerung

Abb. 80: Histologiepräparat Nr. 129.

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen; 3 Osteoblasten bei Osteoidsynthese

Alle 5 Implantate sind angeschliffen. Die Übersicht zeigt im Zentrum der Formkörper wie auch oberflächlich hochgradige Resorptionsvorgänge, während randständig deutlich knöcherne Strukturen auffallen. Bei 10-fach vergrößerter Betrachtung einer stark zerklüfteten Implantatoberfläche erkennt man sowohl überbrückende Knochenbildung, die Implantatanteile miteinander verbindet, als auch die knöcherne Integration ganzer Implantatbruchstücke. Die 20-fache Vergrößerung zeigt deutlich aktive Osteoidbildung mit anschließender Mineralisation in direktem Implantatkontakt. Osteoblasten wandern in tiefere Resorptionslakunen und kleiden sie mit Osteoid aus. Histopathologisch fällt das zellreiche und verdichtete Markgewebe auf. Neben aktiver Knochenbildung ist stellenweise Knochen degenerativ oder nekrotisch verändert.

Präparat 130:

10-fache Vergrößerung

40-fache Vergrößerung

40-fache Vergrößerung

Abb. 81: Histologiepräparat Nr. 130.

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen; 3 Osteoblasten bei Osteoidsynthese; 4 mehrkernige Riesenzellen

2 Implantate sind angeschliffen. Sie zeigen sowohl zentral als auch oberflächlich starke Anzeichen der Resorption. Um die Formkörper haben sich breite Trabekel gebildet. Schon bei 10-facher Vergrößerung einiger Trabekel wird sowohl integriertes Implantatmaterial als auch aktive Osteoidbildung an der Oberfläche deutlich. Die 40-fache Vergrößerung eines Implantatfragments zeigt einwandernde Osteoblasten und die Osteoidsynthese. Das Implantatmaterial wird zellulär resorbiert. Das Markgewebe weist entzündliche Zellinfiltrate auf und ist granulomatös verdichtet. Lokal zeigt neu gebildetes Osteoid und Knochen Zeichen des Vitalitätsverlusts. Teilweise findet man neben Osteoidbildung und Osteogenese gleichzeitig degenerierte und nekrotische Anteile des Knochens. Bei 40-facher Vergrößerung werden stellenweise Bakterien sichtbar.

Gesamtwertung der 4-Wochen-Gruppe

Die Resorption und Osteogenese wurde mit einer Skala von 1–4 bewertet, innerhalb dieser Gruppe wurde eine Feingraduierung vorgenommen.

Tab. 23: Histologische Gesamtwertung Osteoset® nach 4- Wochen.

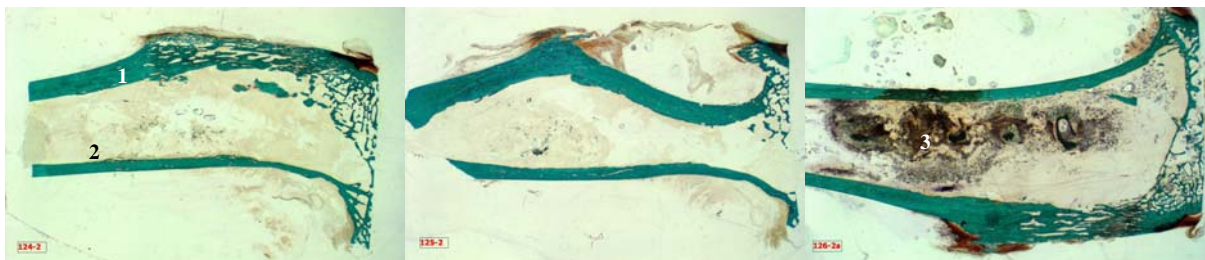
Versuchszeitraum	Präparat-Nr.	Anzahl sichtbarer Formkörper	Grad der Resorption*	Grad der Osteogenese*
4 Wochen	128	1	2,5	1,8
	129	5	3,0	2,5
	130	2	3,0	2,0
maximale Zahl		15	12,0	9,0
erreichte Zahl		8	8,5	6,3

* Feingraduierung

- 0 keine Resorption/Osteogenese
- 1 1,3 / 1,5 / 1,8 geringgradige Resorption/Osteogenese
- 2 2,3 / 2,5 / 2,8 mittelgradige Resorption/Osteogenese
- 3 3,3 / 3,5 / 3,8 hochgradige Resorption/Osteogenese
- 4 vollständige Resorption

4.3.3.2 6-Wochen-Gruppe:

Übersichtsaufnahmen zur Darstellung der 3 Präparate, die anschließend einzeln dargestellt werden:



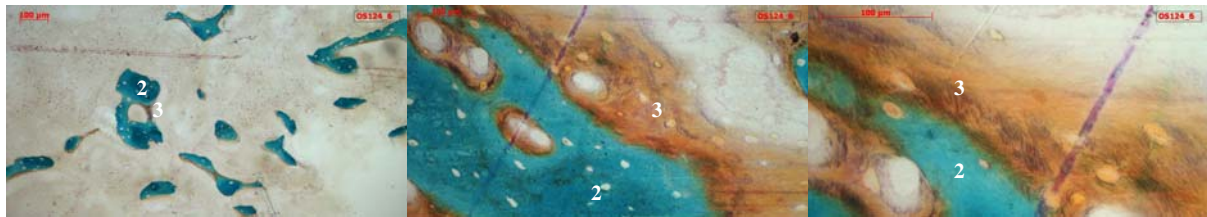
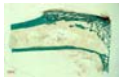
Übersicht Nr. 124

Übersicht Nr. 125

Übersicht Nr. 126

Abb. 82: Histologische Übersichtsaufnahmen Osteoset® nach 6 Wochen.

1 Kortikalis; 2 Medulla; 3 Implantat

Präparat 124:

10-fache Vergrößerung

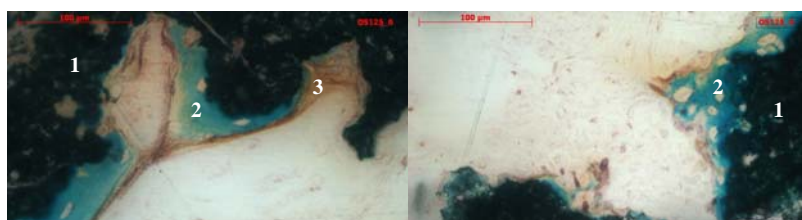
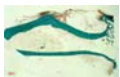
20-fache Vergrößerung

40-fache Vergrößerung

Abb. 83: Histologiepräparat Nr. 124.

2 mineralisierter Knochen; 3 Osteoblasten bei Osteoidsynthese

Die 5 Implantate sind vollständig resorbiert, es sind nur noch feine trabekuläre Knochenneubildungen im Markraum vorhanden. Die 10-fache Vergrößerung verdeutlicht die vereinzelt, medullär gelegenen mineralisierten Knochen trabekel mit aktiven Osteoidsäumen. 40-fach vergrößert sind vitale Osteoblasten erkennbar. Histopathologisch fällt verdichtetes und zellreiches Granulationsgewebe im Markraum auf. Die genauere Betrachtung eines Knochen trabekels lässt eine beginnende degenerative Veränderung erkennen, die 40-fache Vergrößerung zeigt dort Ansammlungen von Bakterien.

Präparat 125:

40-fache Vergrößerung

40-fache Vergrößerung

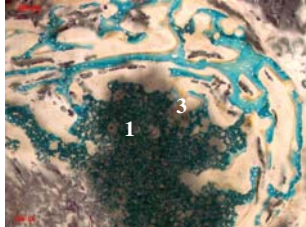
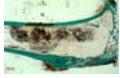
Abb. 84: Histologiepräparat Nr. 125.

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen; 3 Osteoblasten bei Osteoidsynthese

Es ist nur noch ein kleiner Implantatrest mit wenig trabekulären Knochenneubildungen vorhanden. Bei 40-facher Vergrößerung wird sowohl die oberflächliche Knochenbildung mit aktivem Osteoidsaum als auch der zellulärer Implantatabbau in kleine Resorptionslakunen deutlich. Pathologisch ist das Markgewebe verdichtet und zellreich, ein paar medulläre neu

gebildete Knochentrabekel weisen degenerative und nekrotische Anteile auf, an der endostalen Kortikalis sind lokal Bakterien angelagert.

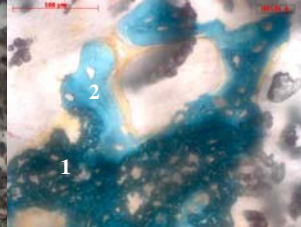
Präparat 126:



10-fache Vergrößerung



20-fache Vergrößerung



40-fache Vergrößerung

Abb. 85: Histologiepräparat Nr. 126.

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen; 3 Osteoblasten bei Osteoidsynthese

Im Gegensatz zu den anderen Präparaten sind hier deutlich mehr Implantatreste vorhanden. Gleichzeitig sind diese stark bindegewebig durchsetzt. Die Vergrößerung des maximal proximalen Implantats zeigt die hochgradig aufgelockerten Implantatreste mit deutlich infiltrierender Knochenbildung. Osteogenese mit aktivem Osteoidsaum findet direkt auf der Implantatoberfläche statt, Bruchstücke werden knöchern verbunden oder integriert. Die 40-fache Vergrößerung zeigt aktive, Kollagen synthetisierende Osteoblasten, die tief in die Implantatoberfläche eindringen. Das Markgewebe ist sehr zellreich. Neben der Osteoidsynthese und Knochenbildung findet gleichzeitig lokal eine Degeneration und Nekrose des Knochens mit anschließend zystischer Zelldegeneration statt. Die 40-fache Vergrößerung zeigt stellenweise Eiterherde mit Bakterienansammlungen.

Gesamtwertung der 6-Wochen-Gruppe

Die Resorption und Osteogenese wurde mit einer Skala von 1–4 bewertet, innerhalb dieser Gruppe wurde eine Feingraduierung vorgenommen.

Tab. 24: Histologische Gesamtwertung Osteoset® nach 6- Wochen.

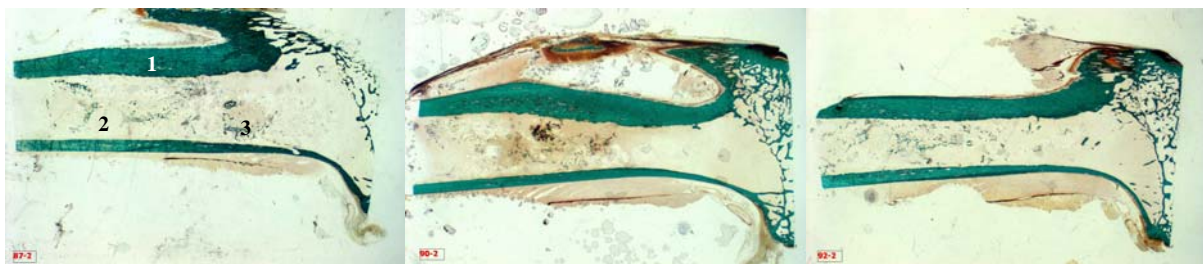
Versuchszeitraum	Präparat-Nr.	Anzahl sichtbarer Formkörper	Grad der Resorption*	Grad der Osteogenese*
6 Wochen	124	0	4,0	1,0
	125	0	3,8	0,5
	126	4	2,5	2,3
maximale Zahl		15	12,0	9,0
erreichte Zahl		4	10,3	3,8

* Feingraduierung

0	0,3/0,5/0,8	keine	Resorption/Osteogenese
1	1,3/1,5/1,8	geringgradige	Resorption/Osteogenese
2	2,3/2,5/2,8	mittelgradige	Resorption/Osteogenese
3	3,3/3,5/3,8	hochgradige	Resorption/Osteogenese
4		vollständige	Resorption

4.3.3.3 8-Wochen-Gruppe

Zusätzlich zur histomorphologischen Betrachtung werden die Präparate der 8-Wochen-Gruppe mittels polychromer Sequenzmarkierung bewertet. Übersichtsaufnahmen zur Darstellung der 3 Präparate, die im Anschluss einzeln dargestellt werden:



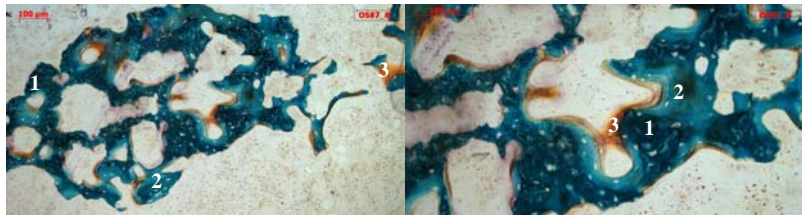
Übersicht Nr. 87

Übersicht Nr. 90

Übersicht Nr. 92

Abb. 86: Histologische Übersichtsaufnahmen Osteoset nach 8 Wochen.

1 Kortikalis; 2 Medulla; 3 Implantat

Präparat 87:

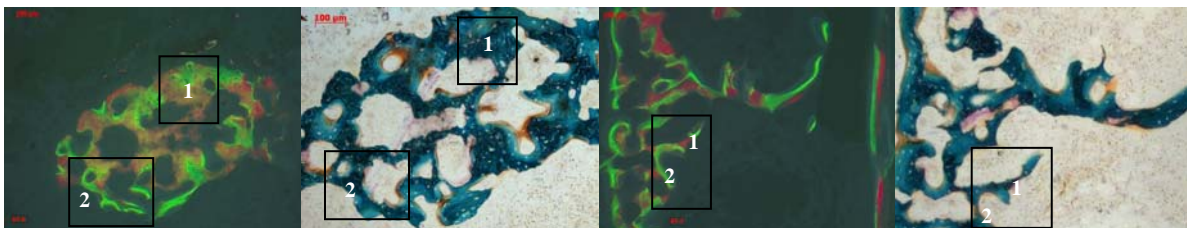
10-fache Vergrößerung

20-fache Vergrößerung

Abb. 87: Histologiepräparat Nr. 87.

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen; 3 Osteoblasten bei Osteoidsynthese

Die Formkörper sind weitgehend resorbiert. Um die einstigen Implantate bestehen trabekuläre Knochenbildungen, teilweise mit integrierten Implantatresten. Die Vergrößerung zeigt eine aktive Osteogenese mit vitalem Osteoidsaum auf dem Implantatmaterial. Gleichzeitig ist im Markgewebe eine erhöhte Zellinfiltration zu beobachten. Stellenweise weist neu gebildeter Knochen Zeichen des Vitalitätsverlusts und der Degeneration auf. Angrenzend sind Knochennekrosen deutlich erkennbar.

Polychrome Sequenzmarkierung

10-fache Vergrößerung

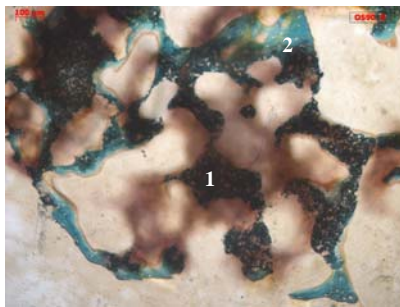
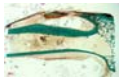
Abb. 88: Polychrome Sequenzmarkierung Präparat Nr. 87.

Polychrome Sequenzmarkierung und Histomorphologie im Vergleich

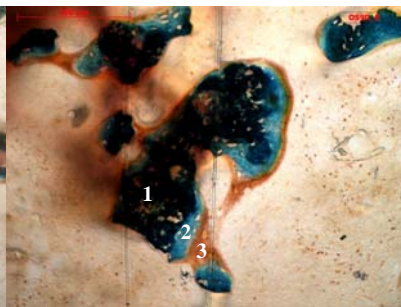
1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen

Die 2,5-fach vergrößerte Betrachtung des proximalen Tibia-Abschnitts zeigt die mit Farbstoffen markierten, trabekulären Knochenneubildungen. Die 10-fache Vergrößerung verdeutlicht die Einlagerung insbesondere von Calcein-Grün gefolgt von Alizarin-Rot. Auffällig ist, dass die Implantatanteile deutlich rot eingefärbt sind. Die mineralisierten Knochenneubildungen auf der Materialoberfläche sind hingegen grün markiert. Dies wird ebenfalls bei den distalen Implantatresten bestätigt.

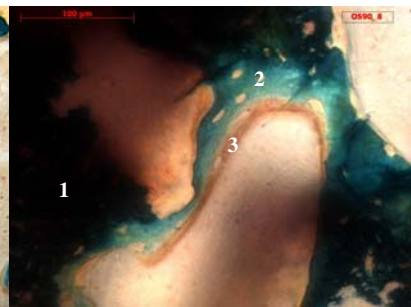
Präparat 90:



10-fache Vergrößerung



40-fache Vergrößerung



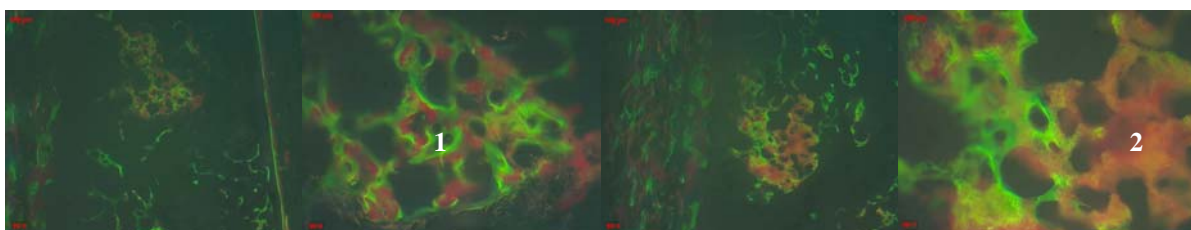
40-fache Vergrößerung

Abb. 89: Histologiepräparat Nr. 90.

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen; 3 Osteoblasten bei Osteoidsynthese

Lokal sind im Markraum Reste von vermutlich 2 Implantaten vorhanden. Die Fragmente sind knöchern miteinander verbunden oder vollständig trabekulär integriert. Die nähere Betrachtung verdeutlicht die Osteogenese mit aktivem Osteoidsaum auf der Materialoberfläche. Die Implantatreste sind von vermehrten Zellinfiltraten und granulomatös verdichtetem Markgewebe umgeben. Knochentrabekel unterliegen lokal unterschiedlichen Vitalitätsabstufungen bis hin zur Degeneration. An der endostalen Kortikalis wurden eitrig Zellenekrosen mit angelagerten Bakterienmassen gefunden.

Polychrome Sequenzmarkierung:



distales Implantat:
links 5-fache, rechts 10-fache Vergrößerung

proximales Implantat:
links 5-fache, rechts 10-fache Vergrößerung

Abb. 90: Polychrome Sequenzmarkierung, Präparat Nr. 90.

1 Implantat; 2 mineralisierter Knochen

Die 10-fache vergrößerte Betrachtung der Reste zweier ehemaliger Implantate zeigt die Einlagerung der Farbstoffe Calcein-Grün, Alizarin-Rot und Xylenol-Orange. Insbesondere das Implantatmaterial ist rötlich eingefärbt. Die auf der Oberfläche stattgefundenene

Osteogenese und die damit verbundene Mineralisation werden insbesondere mit Calcein-Grün dargestellt.

Präparat 92:



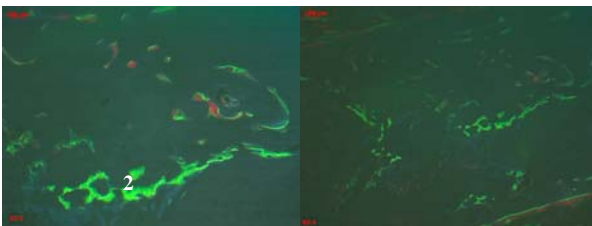
10-fache Vergrößerung

Abb. 91: Histologiepräparat Nr. 92.

2 mineralisierter Knochen; **3** Osteoblasten bei Osteoidsynthese

Alle Implantate sind vollends resorbiert. Medullär sind feine trabekuläre Strukturen erkennbar. Die 40-fache Vergrößerung zeigt die aktive Osteoidsynthese an den Trabekeln. Teilweise ist das Markgewebe stark verdichtet und infiltriert. Neben aktiver intensiver Osteoidsynthese finden wir gleichzeitig degenerierende, teils avitale, teils nekrotische Knochentrabekel.

Polychrome Sequenzmarkierung:



10-fache Vergrößerung 5-fache Vergrößerung

Abb. 92: Polychrome Sequenzmarkierung, Präparat Nr. 92.

2 mineralisierter Knochen

Die medullär vorhandenen trabekulären Knochenneubildungen sind mittels polychromer Sequenzmarkierung insbesondere durch die Einlagerung von Calcein-Grün dargestellt.

Gesamtwertung der 8-Wochen-Gruppe:

Die Resorption und Osteogenese wurde mit einer Skala von 1–4 bewertet, innerhalb dieser Gruppe wurde eine Feingraduierung vorgenommen.

Tab. 25: Histologische Gesamtwertung Osteoset® nach 8- Wochen.

Versuchszeitraum	Präparat-Nr.	Anzahl sichtbarer Formkörper	Grad der Resorption*	Grad der Osteogenese*
8 Wochen	87	0	3,5	1,5
	90	Rest	3,5	1,5
	92	0	4,0	1,5
maximale Zahl		15	12,0	9,0
erreichte Zahl		0	11,0	4,5

* Feingraduierung

0		keine Resorption/Osteogenese
1	1,3/1,5/1,8	geringgradige Resorption/Osteogenese
2	2,3/2,5/2,8	mittelgradige Resorption/Osteogenese
3	3,3/3,5/3,8	hochgradige Resorption/Osteogenese
4		vollständige Resorption

4.3.3.4 12-Wochen-Gruppe

Es liegen keine histologischen Dünnschliffe der 12-Wochen-Gruppe vor.

4.4 Zusammenfassende Bewertung der Röntgenbefunde, μ-Computertomographie und Histologie

Die umfassende Bewertung der Präparate mittels Röntgenbilder, μ-Computertomographie und Histologie wurde bei 3 Tieren je Überlebenszeitraum durchgeführt. Der Verlauf der verbleibenden Tiere pro Gruppe wurde lediglich mithilfe der Röntgenbilder bewertet (*kursiv* dargestellt). Die Unterteilung erfolgt nach Palasorb-G, Palasorb-V und Osteoset[®] sowie den jeweiligen Untersuchungszeiträumen. Je Gruppe erfolgt eine Zusammenfassung unter dem Aspekt der Untersuchungsmethoden sowie eine weitere hinsichtlich der Fragestellung dieser Studie. Letztere wird am Ende in einer „Gesamtwertung“ für jede Kalziumsulfat-Formulierung abschließend dargestellt.

4.4.1 Palasorb-G Zusammenfassung

4.4.1.1 4-Wochen-Gruppe

Präparat 10:

Röntgenologisch sind beide Implantate erkennbar und mit Ausnahme eines zentralen Kerns randständig in ihrer Röntgendichte reduziert.

Präparat 13:

Röntgenologisch ist das distale Implantat hochgradig in seiner Resorption fortgeschritten, der proximale Formkörper hingegen ist deutlich vorhanden und weist einen röntgendichten Kern auf. Die Bilder der μ-Computertomographie bestätigen diese Bilder und zeigen zusätzlich, dass der distale Formkörper fragmentiert vorliegt. Die nähere Betrachtung des proximalen Implantats lässt eine aufgelockerte Oberfläche sowie lokal mittelgradig mineralisierte Bereiche erkennen, die vor allem im proximalen Teil der Tibia stärker ausgeprägt ist. Auch histologisch wird insbesondere das proximale Implantat trabekulär abgestützt. Die Vergrößerung zeigt die zerklüftete Implantatoberfläche, breite Knochen trabekel mit aktiven Osteoidsäumen unmittelbar auf der Materialoberfläche sowie in das Implantat einwandernde Osteoblasten. Die Resorption des Materials findet durch mehrkernige Riesenzellen statt.

Präparat 89:

Beide Implantate zeigen röntgenologisch eine vom Rand ausgehende Resorption mit einem zentralen röntgendichten Kern. Die Bilder der μ -Computertomographie bestätigen diese Ergebnisse und verdeutlichen zusätzlich, dass der proximale Formkörper bezüglich der resorptiven Prozesse geringgradig dem distalen Implantat voraus ist. Auch die randständige Mineralisation des distalen Formkörpers ist kaum, die des proximalen Implantats geringgradig ausgeprägt. Histologisch ist vor allem der distale Formkörper angeschnitten, der auch hier sowohl eine nur geringe Resorption als auch Osteogenese aufweist. Das proximale Implantat hingegen zeigt auf dieser Schliffebene eine deutliche Trabekelbildung. Die Vergrößerung lässt breite Osteoidsäume mit aktiven Osteoblasten direkt auf der Implantatoberfläche erkennen. Gleichzeitig findet ein phagozytärer Abbau des Implantats statt.

Präparat 91:

Röntgenologisch sind beide Implantate sichtbar und weisen, insbesondere der distale Formkörper, einen röntgendichten Kern auf. Durch die Technik der μ -Computertomographie wird bestätigt, dass der Umfang dieses Kerns insbesondere im diaphysären Implantat ausgeprägt ist. Zusätzlich ist erkennbar, dass die Formkörper an ihren Oberflächen zerklüftet und deutlicher als bei den beiden anderen Präparaten mineralisiert sind. Knochenbrücken haben sich hochgradig zwischen dem proximalen Formkörper und der Kortikalis ausgebildet. Die histologischen Bilder verdeutlichen die Knochenbildung auf der Oberfläche wie in den Tiefen der Resorptionslakunen. Implantatfragmente werden knöchern umbaut. Die Vergrößerung zeigt Osteoblasten, die in das Material einwandern und osteoidsynthetisch aktiv werden. Das Implantatmaterial wird zellulär resorbiert.

Ergebnis Palasorb-G nach 4 Wochen hinsichtlich der Untersuchungsmethodik:

- Röntgenbild: Die Implantate aller Präparate sind röntgenologisch deutlich zu erkennen. Randständig ist die Röntgendichte reduziert, während sie sich im Zentrum erhöht darstellt.
- μ-CT: Alle Implantate der 3 Präparate weisen röntgendichte Kerne auf. Die Formkörper sind lokal an der Oberfläche mineralisiert, wobei der Grad im proximalen Bereich der Tibia zunimmt. Insbesondere Präparat Nr. 91 zeigt trabekuläre Strukturen zwischen Kortikalis und proximalem Formkörper, in nur geringem Ausmaß auch Präparat Nr. 13.
- Histologie: Die Formkörper sind zwar erkennbar, allerdings in unterschiedlichem Maß angeschnitten. Nr. 91 scheint strukturell aufgelockert und fällt gemeinsam mit Nr. 13 durch trabekuläre Ummantelung auf. Die vergrößerte Betrachtung zeigt aktive Implantat-assoziierte Osteogenese. Vitale Osteoblasten wandern in das Material ein und sind osteoidsynthetisch aktiv. Alle 3 Präparate zeigen mehrkernige Riesenzellen beim Abbau der Implantate.

Ergebnis Palasorb-G nach 4 Wochen hinsichtlich der Fragestellung dieser Studie:

- Degradation: Die Implantate sind deutlich vorhanden. Während randständig eine Abnahme der Röntgendichte zu verzeichnen ist, ist sie im Zentrum der Implantate noch unverändert. Der Abbau geschieht zellulär durch mehrkernige Riesenzellen.
- Osteogenese/Biokompatibilität: Es hat eine Knochenbildung unmittelbar auf der Implantatoberfläche stattgefunden, die Implantatanteile werden knöchern überbrückt oder vollständig umschlossen, die Implantate trabekulär (13 und 91) abgestützt. Die Osteoblasten sind direkt auf dem Material angesiedelt und Osteoid-synthetisch aktiv neben bereits mineralisiertem Knochen.
- Nebenbefund: Das Präparat Nr. 89 ist infiziert. Präparat Nr. 91 weist zellreiches Markgewebe auf.

4.4.1.2 6-Wochen-Gruppe

Präparat 2:

Röntgenologisch sind beide Implantate nachweisbar. Im Gegensatz zu der 4-Wochen-Gruppe ist zentral kein röntgendichter Bereich mehr zu erkennen. Auf den Bildern der μ-Computertomographie zeigen sich beide Formkörper mit einer zerklüfteten Oberfläche und stellenweise tiefen Resorptionslakunen. Die Konturen beider Implantate sowie die

Begrenzungen der Resorptionslakunen sind mineralisiert, geringgradig haben sich Knochenbrücken zwischen den Formkörpern und der Kortikalis gebildet. Histologisch wird bestätigt, dass auf der aufgelockerten Oberfläche sowie in den Resorptionslakunen eine Knochenbildung stattfindet. Zwischen dem proximalen Implantat und der Kortikalis sowie zwischen beiden Implantaten haben sich Knochen trabekel gebildet. Die Vergrößerung zeigt aktive Osteoblasten bei der Osteoidsynthese, bereits mineralisierten Knochen sowie mehrkernige Riesenzellen unmittelbar auf dem Implantatmaterial.

Präparat 5:

Auch bei diesem Präparat sind die 2 Formkörper röntgenologisch nachweisbar und lediglich einheitlich in ihrer Röntgendichte reduziert. Die Untersuchung mittels μ -CT zeigt, dass die Oberflächen strukturell deutlich aufgelockert und stellenweise in ihrer Kontur mineralisiert sind. Die Histologie bestätigt ebenfalls zerfurchte Implantatoberflächen, Resorptionslakunen ziehen tief ins Innere. Beide Formkörper sind hochgradig trabekulär ummantelt, kortikal führen knöcherne Strukturen in die Implantate. Vergrößert wird die aktive Knochensynthese auf der Implantatoberfläche sowie in den Resorptionslakunen deutlich. Die 40-fache Vergrößerung zeigt neben zahlreichen aktiven Osteoblasten unmittelbar auf dem Implantatmaterial auch die zelluläre Resorption des Materials.

Präparat 116:

Röntgenologisch sind die Formkörper erhalten und scharf von ihrer Umgebung abgrenzbar. Mittels μ -Computertomographie zeigt sich bei beiden Implantaten eine zerklüftete Oberfläche, die stellenweise weiter fortgeschritten ist. Die Konturen sind mittelgradig mineralisiert und schließen auch hier die Resorptionsbuchten mit ein, hoch proximal haben sich zwischen Implantat und Kortikalis Knochenbrücken gebildet. Histologisch sind beide Formkörper angeschnitten. Die Implantate weisen auf dieser Schnittebene eine zerfurchte Oberfläche auf, trabekuläre Neubildungen fehlen. Auf der Implantatoberfläche wird die vitale Osteogenese mit aktiven Osteoblasten deutlich, Implantatfragmente werden knöchern integriert und Resorptionslakunen ausgekleidet sowie überbrückt. Mehrkernige Riesenzellen sind in das aufgelockerte Material eingewandert.

Präparat 118:

vorzeitige Euthanasie.

Ergebnis Palasorb-G nach 6 Wochen hinsichtlich der Untersuchungsmethodik:

- Röntgenbild: Die Implantate sind immer noch deutlich erkennbar und lediglich einheitlich in ihrer Röntgendichte reduziert. Der röntgendichte Kern der 4-Wochen-Gruppe ist nicht mehr vorhanden.
- μ-CT: Im Vergleich zur 4-Wochen-Gruppe weist lediglich Präparat Nr. 116 im distalen Implantat nur noch geringfügig eine röntgendichte Struktur auf. Die Oberflächen aller Implantate sind durch Zerrüttung und Zerrfurchung gekennzeichnet. Eine Mineralisierung hat in unterschiedlicher Intensität bei allen Implantaten stattgefunden und ist insgesamt im Vergleich zu der 4-Wochen-Gruppe, insbesondere im Fall von Präparat Nr. 2 und Nr. 116, vorangeschritten. Es sind kortikale Trabekelbildungen zu erkennen.
- Histologie: Die Implantate sind in allen 3 Präparaten gleichermaßen angeschnitten. Die Oberflächen sind durch Resorptionsvorgänge zerrüttet und zerrfurcht. Insbesondere Präparat Nr. 5 ist deutlich trabekulär ummantelt und kortikal abgestützt. Es findet eine Knochenbildung unmittelbar auf der Implantatoberfläche statt, Resorptionslakunen werden knöchern ausgekleidet oder überbrückt. Aktive Osteoblasten sowie mehrkernige Riesenzellen sind neben bereits mineralisierten Knochen unmittelbar auf dem Material angesiedelt.

Ergebnis Palasorb-G nach 6 Wochen hinsichtlich der Fragestellung dieser Studie:

- Degradation: Im Vergleich zur 4-Wochen-Gruppe sind die Implantate einheitlich in ihrer Röntgendichte reduziert. Der Implantatabbau geschieht zellulär durch mehrkernige Riesenzellen.
- Osteogenese/Biokompatibilität: Es findet eine Knochenbildung mit aktiven Osteoidsäumen unmittelbar auf den Implantatmaterialien statt. Zwischen Kortikalis und Implantaten haben sich Knochenbrücken gebildet. Vitale Osteoblasten sowie mehrkernige Riesenzellen sind direkt auf dem Material angesiedelt.
- Nebenbefund: Präparat Nr. 2 weist Zeichen einer Infektion auf.

4.4.1.3 8-Wochen-Gruppe

Präparat 9:

Beide Implantate sind auf den Röntgenbilder deutlich zu sehen und lediglich in ihrer Röntgendichte einheitlich reduziert. Die Bilder der μ-Computertomographie zeigen, dass die Implantatoberflächen zerrüttet sind und vereinzelt Resorptionslakunen aufweisen. Die

Konturen sind gleichmäßig und deutlich mineralisiert, feine Knochen trabekel führen von der Kortikalis in die Formkörper. Histologisch betrachtet sind auf dieser Schliffebene beide Formkörper an ihrer Oberfläche teilweise erhalten und weisen lokal Resorptionsbuchten auf. Auf den Implantaten sowie in der Tiefe der Resorptionslakunen wird Osteoid und mineralisierter Knochen gebildet. Die Vergrößerung zeigt dem Osteoid sowie unmittelbar auf der Implantatoberfläche angelagerte, aktive Osteoblasten. Mehrkernige Riesenzellen resorbieren lokal das Implantatmaterial.

Präparat 11:

Beide Formkörper sind röntgenologisch vorhanden, erscheinen aber im Gegensatz zu Präparat Nr. 9 nicht so scharf abgrenzbar und strukturell verwaschen. Tatsächlich bestätigt die μ -Computertomographie die vorangeschrittene Resorption insbesondere des proximalen Implantats in Form von tiefen Resorptionslakunen sowie einer zerrütteten Oberfläche. Gleichzeitig fällt das proximale Implantat durch fortgeschrittene Mineralisationsvorgänge auf, hoch proximal greifen von kortikal breite Trabekel in das Material. Auch histologisch ist insbesondere das proximale Implantat hochgradig mit Lysezonen durchzogen und wird mit feinen trabekulären Strukturen ummantelt. Bei vergrößerter Betrachtung wird Knochenbildung auf dem Implantat sowie in den Resorptionslakunen deutlich, Osteoblasten lagern sich direkt dem Implantatmaterial an.

Präparat 17:

Beide Formkörper sind vorhanden. Während das proximale Implantat einheitlich in seiner Röntgendichte reduziert ist, weist der distale Formkörper noch einen röntgendichten Kern auf.

Präparat 114:

Beide Implantate sind kreisrund und scharf abgegrenzt im Röntgenbild erkennbar. Die Bilder der μ -Computertomographie zeigen beide Formkörper mit deutlich resorbierten Randarealen. Insbesondere das proximale Implantat ist mineralisiert, zwischen Implantat und Kortikalis haben sich Knochenbrücken ausgebildet. Die Histologie verdeutlicht die tiefen Resorptionslakunen sowie Knochenneubildung auf der Implantatoberfläche, zwischen den Formkörpern sowie zwischen Implantat und Kortikalis. Implantatbruchstücke werden knöchern verbunden sowie Resorptionslakunen ausgekleidet. Unmittelbar auf dem Implantatmaterial befinden sich sowohl Osteoid synthetisierende Osteoblasten sowie Osteozyten in bereits mineralisierten Knochen.

Präparat 115:

Beide Implantate sind erkennbar und einheitlich in ihrer Röntgendichte reduziert.

Ergebnis Palasorb-G nach 8 Wochen hinsichtlich der Untersuchungsmethodik:

- Röntgenbild: Die Implantate sind immer noch deutlich erkennbar und einheitlich in ihrer Röntgendichte reduziert.
- μ-CT: Textur der Oberfläche, Resorptionslakunen sowie Röntgendichte und Struktur des Implantatmaterials zeigen ein Fortschreiten der Degradation. In Bezug auf Präparat Nr. 11 und Nr. 114 scheinen insbesondere die proximalen Implantate in randständiger Mineralisation sowie trabekulärer Knochenbildung weiter vorangeschritten zu sein als die distalen Formkörper.
- Histologie: Insbesondere die Implantate von Präparat Nr. 11 und Nr. 114 sind in ihrer Resorption fortgeschritten. Alle 3 Präparate weisen eine deutliche Knochenbildung auf der Oberfläche sowie in der Tiefe von Resorptionslakunen auf. Die vergrößerte Betrachtung zeigt aktive Osteoblasten bei der Osteoidbildung sowie bereits mineralisierten Knochen auf dem Implantatmaterial. Mehrkernige Riesenzellen bauen das Implantatmaterial ab.

Ergebnis Palasorb-G nach 8 Wochen hinsichtlich der Fragestellung dieser Studie:

- Degradation: Geringgradig ist ein Fortschreiten der Resorption, insbesondere bei den Präparaten Nr. 11 und Nr. 114, zu erkennen. Mehrkernige Riesenzellen bauen das Material ab.
- Osteogenese/Biokompatibilität: Es findet eine Knochenbildung unmittelbar auf den Implantatmaterialien sowie in der Tiefe der Resorptionslakunen statt, zwischen Kortikalis und Implantaten haben sich Knochenbrücken ausgebildet. Vitale Osteoblasten sind dem synthetisierten Osteoid sowie in direkten Kontakt der Implantatoberfläche angelagert.
- Nebenbefund: Präparat Nr. 114 weist Zeichen einer Infektion auf.

4.4.1.4 12-Wochen-Gruppe

Präparat 4:

Die 2 Implantate sind auf dem Röntgenbild deutlich zu sehen und in ihrer Form erhalten. Auf den Bildern der μ-Computertomographie werden zusätzlich die zerklüfteten Implantatoberflächen sowie Resorptionslakunen deutlich. Allerdings treten hier besonders die

Ausdehnung der randständigen Mineralisation sowie die kräftige Trabekelbildung zwischen Kortikalis und Implantat hervor. Die histologischen Ergebnisse zeigen eine Osteogenese mit vitalen Osteoblasten und Osteozyten auf der Implantatoberfläche sowie in Resorptionslakunen, Fragmente werden knöchern integriert oder miteinander verbunden.

Präparat 6:

Die Formkörper sind vorhanden und lediglich in ihrer Röntgendichte reduziert.

Präparat 12:

Beide Formkörper sind röntgenologisch deutlich zu erkennen. Auf den Bildern der μ -Computertomographie sind die Oberflächen der Implantate zerklüftet, einige Resorptionslakunen ziehen tief in das Innere des Materials oder dehnen sich in ihrer Breite aus. Auch hier sind die Randareale deutlich mineralisiert, Trabekel führen von der Kortikalis in die Implantate. Die Ergebnisse der Histologie zeigen Implantat-assoziierte Osteogenese. Knochen trabekel umgeben die Implantate und ziehen stellenweise in die Tiefe der Resorptionslakunen. Die Vergrößerung zeigt Osteoblasten bei der Osteoidsynthese sowie bereits mineralisierten Knochen unmittelbar auf dem Material. Implantatabbau findet zellulär statt.

Präparat 41:

Röntgenologisch ist der proximale Formkörper deutlich zu erkennen, distal hingegen erscheint das Implantat fragmentiert. Die Ergebnisse der μ -Computertomographie bestätigen diese Aussage, die verbliebenen Implantatfragmente sind größtenteils deutlich mineralisiert. Der proximale Formkörper weist eine zerrufte Oberfläche sowie Resorptionslakunen auf, die Kontur ist hochgradig mineralisiert, es besteht eine deutliche Trabekelbildung zwischen Kortikalis und Implantat. Auch histologisch ist der distal gelegene, fragmentierte Formkörper zu erkennen, während das proximale Implantat weitgehend in seiner Form erhalten und vereinzelt mit Resorptionslakunen durchsetzt ist. Beide Formkörper weisen eine Implantat-assoziierte Knochenbildung auf, insbesondere im inneren Resorptionsbereich des distalen Implantats. Es findet eine Knochenbildung mit aktivem Osteoidsaum unmittelbar auf der Implantatoberfläche statt, Resorptionslakunen werden knöchern ausgekleidet. Gleichzeitig wird das Implantatmaterial zellulär abgebaut.

Präparat 82:

Beide Implantate sind röntgenologisch nachweisbar und lediglich in ihrer Röntgendichte reduziert.

Ergebnis Palasorb-G nach 12 Wochen hinsichtlich der Untersuchungsmethodik:

- Röntgenbild: Die Formkörper sind immer noch deutlich erkennbar.
- μ-CT: Im Vergleich zur 8-Wochen-Gruppe sind die Implantate nicht wesentlich in ihrer Resorption vorangeschritten. Hingegen augenscheinlich ist die randständige Mineralisierung in Ausdehnung sowie Intensität der Röntgendichte. Ebenfalls ausgeprägt ist die Ausbildung von Knochenbrücken zwischen Kortikalis und Implantaten.
- Histologie: Die Implantate der Präparate Nr. 41 und 12 sind gleichmäßig angeschnitten, die in Präparat Nr. 4 nur oberflächlich. Bis auf den distalen Formkörper in Nr. 41, der fragmentiert vorliegt und deutliche Zeichen der Resorption zeigt, sind die Formkörper immer noch erhalten und zeigen lediglich zerfurchte Oberflächen und in die Tiefe ziehende Resorptionslakunen. Alle 3 Präparate weisen eine Implantat-assoziierte Knochenbildung auf. Es findet Osteogenese durch vitale Osteoblasten unmittelbar auf der Implantatoberfläche statt, Osteoid ist bereits zu neuem Knochen mineralisiert. Mehrkernige Riesenzellen bauen das Implantatmaterial ab.

Ergebnis Palasorb-G nach 12 Wochen hinsichtlich der Fragestellung dieser Studie:

- Degradation: Der Grad der Resorption unterscheidet sich nicht sonderlich von der 8-Wochen-Gruppe. Die Formkörper sind als solche immer noch erhalten. Mehrkernige Riesenzellen bauen das Implantatmaterial ab (Präparat 12 und 41).
- Osteogenese/Biokompatibilität: Die Bilder der μ-CT zeigen deutlich eine Zunahme der randständigen Mineralisation sowie Ausbildung von ausgeprägten Knochenbrücken zwischen Implantaten und Kortikalis. Die Histologie macht eine aktive Osteogenese mit vitalen Osteoblasten auf dem Implantatmaterial sichtbar.
- Nebenbefund: Alle 3 Präparate weisen in verschiedenen Ausprägungen eine Infektion auf.

4.4.1.5 GESAMTWERTUNG der Palasorb-G-Untersuchungen

Degradation: In der 4. Woche ist noch ein deutlich röntgendichter Kern zu erkennen. In der 6. Woche ist dieser nicht mehr vorhanden und die Implantate gleichmäßig in ihrer Röntgendichte reduziert. Bis zur 8. Woche ist die Resorption geringgradig vorangeschritten, bis zur 12. Woche wird dies nicht mehr gesteigert. Es wurden mehrkernige Riesenzellen beim Implantatabbau gefunden.

Osteogenese/Biokompatibilität: Schon in der 4. Woche post operationem ist eine aktive Knochenbildung durch vitale Osteoblasten und -zyten unmittelbar auf der Implantatoberfläche oder in der Tiefe von Resorptionslakunen zu verzeichnen. Implantatanteile werden knöchern überbrückt oder verbunden. Auch bilden sich schon feine kortikale Knochenbrücken aus, die sich in der 12. Woche deutlich verstärken.

Nebenbefund: 6 von 12 Präparaten weisen in unterschiedlicher Ausprägung Zeichen einer Infektion auf.

4.4.2 Palasorb-V Zusammenfassung

4.4.2.1 4-Wochen-Gruppe

Präparat 123:

Röntgenologisch sind 4 Wochen nach Implantation die Formkörper vorhanden und lediglich gleichmäßig in ihrer Röntgendichte reduziert. Die Betrachtung der μ -CT-Bilder ergibt zusätzlich, dass die Implantate oberflächlich zerklüftet und lokal mineralisiert sind. Auch histologisch sind die Anzeichen der Resorption sowie die Implantat-assoziierte Knochenbildung deutlich erkennbar. Vergrößert findet man aktive Osteoblasten bei der Osteoidbildung sowie bereits mineralisierten Knochen auf den Implantatoberflächen und in den Resorptionslakunen, Fragmente werden knöchern integriert oder miteinander verbunden.

Präparat 127:

Die Implantate sind auf den Röntgenbilder einerseits deutlich in ihrer Resorption fortgeschritten, andererseits – insbesondere distal des knöchernen Zugangs – in ihrer Röntgendichte verstärkt. Die Bilder der μ -Computertomographie bestätigen, dass sich die Formkörper in unterschiedlichen Stadien der Resorption befinden. Insbesondere im kaudalen Bereich der Diaphyse sind noch röntgendichte Kerne vorhanden, während weiter proximal und vor allem im Bereich des tibialen Implantationszugangs die Resorption vorangeschritten ist. Die Konturen sind insgesamt nur geringgradig und lokal in ihrer Mineralisation ausgeprägt. Während hoch proximal keine weiteren zweidimensionalen μ -CT Bilder ausgewertet werden konnten, fallen histologisch bei der Übersichtsaufnahme im proximalen Teil der Tibia die stark zerklüfteten Oberflächen sowie die trabekuläre Ummantelung der Implantate auf. Auch die Vergrößerung bestätigt Knochenbildung sowie -brücken mit aktiven Osteoidsäumen auf der Implantatoberfläche bis hin zu feinen Osteoidläufern, die in die Tiefe der Resorptionslakunen ziehen.

Präparat 131:

Röntgenologisch sind die Implantate vorhanden und einheitlich der Resorption unterworfen. Die Ergebnisse der μ -Computertomographie bestätigen diese Ergebnisse und ergeben zusätzlich, dass zur Kortikalis gewandte Flächen deutlicher in die randständige Resorption und die Mineralisationsvorgänge einbezogen sind als sich gegenüberliegenden Oberflächen. Insgesamt ist die Mineralisation eher gering ausgeprägt. Die histologische Übersicht zeigt, dass auf dieser Schnittebene angeschliffene Implantatkörper insbesondere distal Zeichen der

Resorption und randständigen Ossifikation aufweisen. Die Vergrößerung zeigt Trabekel, die Implantate umfassen und an der Oberfläche verankert sind, Knochenlamellen ziehen in die Tiefe der Resorptionslakunen. Vitale Osteoidsäume sind dem Implantatmaterial direkt angelagert.

Präparat 132:

Die Röntgendichte der Implantate ist gleichmäßig reduziert.

Ergebnis Palasorb-V nach 4 Wochen hinsichtlich der Untersuchungsmethodik:

- Röntgenbild: Die Formkörper sind auf den Röntgenbildern aller Tiere deutlich erkennbar und gleichmäßig in ihrer Röntgendichte reduziert. Nur 1 Präparat zeigt vereinzelt röntgendichtere Anteile (Nr. 127).
- μ-CT: Bei allen 3 Präparaten sind die Formkörper im Markraum vorhanden und weisen Zeichen der Resorption auf. Sie sind insgesamt in ihrer Röntgendichte reduziert und nur Präparat Nr. 127 lässt stellenweise hochgradig röntgendichte Implantatkerne erkennen. Insbesondere in Präparat Nr. 123 sind Randbereiche der Implantate mineralisiert. Die 2 verbliebenen weisen nur eine geringe Mineralisation auf.
- Histologie: Die Implantate aller 3 Präparate sind als solche in ihrer Form erhalten, weisen aber Resorptionslakunen und -buchten auf. Es kann eine Implantat-assoziierte Knochenbildung mit vitalen Osteoidsäumen direkt auf dem Implantatmaterial nachgewiesen werden sowie Knochen trabekel, die diese in unterschiedlichem Maße ummanteln. Mehrkernige Riesenzellen bauen das Implantatmaterial ab.

Ergebnis Palasorb-V nach 4 Wochen hinsichtlich der Fragestellung dieser Studie:

- Degradation: Die Formkörper aller 3 Präparate sind vorhanden. Sie sind noch in ihrer Form erhalten, allerdings in ihrer Röntgendichte einheitlich reduziert. Lediglich in Präparat Nr. 127 sind noch röntgendichte Kerne nachweisbar. Mehrkernige Riesenzellen bauen das Implantatmaterial ab.
- Osteogenese/Biokompatibilität: Bei allen 3 Präparaten hat eine Implantat-assoziierte Osteogenese stattgefunden. Neben bereits mineralisiertem Knochen synthetisieren vitale Osteoblasten Osteoid auf der Implantatoberfläche.
- Nebenbefund: Alle Präparate weisen Zeichen einer Infektion auf.

4.4.2.2 6-Wochen-Gruppe

Präparat 118:

Die Implantate sind röntgenologisch erkennbar und gleichmäßig in ihrer Röntgendichte reduziert. Die μ -Computertomographie zeigt zusätzlich, dass distale Formkörper zum Teil noch einen röntgendichten Kern aufweisen, während die weiter proximal gelegenen in Resorption und randständiger Mineralisation fortgeschritten sind. Insgesamt sind die Implantate nur geringgradig mineralisiert. Histologisch betrachtet zeigen hingegen insbesondere die distalen Implantate auf dieser Schliffebene Resorptionszeichen. Die Implantat-assoziierte Knochenneubildung ist bis auf eine Ausnahme bei allen Formkörpern zu erkennen. Die Vergrößerung macht Trabekel mit aktiven Osteoidsäumen unmittelbar auf den Implantaten sowie in unmittelbarer Nähe deutlich.

Präparat 119:

Auf den Röntgenbildern sind die Implantate erhalten, die Röntgendichte erscheint stellenweise erhöht. Mittels μ -Computertomographie ist deutlich erkennbar, dass die Formkörper in ihrer Resorption fortgeschritten sind, während die Konturen lokal stark mineralisierte Bereiche aufweisen. Auch histologisch betrachtet weisen die angeschliffenen Implantatkörper auf dieser Ebene mehrheitlich starke Resorptionszeichen auf. Deutlich ist auch die randständige Ossifizierung sowie Trabekelbildung. Bei 40-facher Vergrößerung wird die aktive Osteoidsynthese durch aufgereichte Osteoblasten sowie Osteogenese in dem stark aufgelockerten Implantat sichtbar.

Präparat 120:

Auch in diesem Präparat sind die Implantate röntgenologisch erhalten und haben gleichmäßig in ihrer Röntgendichte abgenommen. Auf den Bildern der Kontaktradiographie erkennt man, dass sich die Implantate teilweise überlagern und somit röntgendichter erscheinen. Mittels μ -Computertomographie wird deutlich, dass die Formkörper an den Oberflächen zerklüftet sind sowie tiefe Resorptionslakunen aufweisen. Auch der randständige Grad an Mineralisation ist lokal hochgradig vorangeschritten. Histologisch hingegen sind die 4 angeschliffenen Implantate weitgehend in Form und Struktur erhalten und weisen mehrheitlich nur geringe Anzeichen der Resorption sowie der randständigen Ossifikation auf. Bei näherer Betrachtung ist die aktive Einwanderung von Osteoblasten und Osteoidbildung sowohl auf der Implantatoberfläche als auch in den Resorptionslakunen deutlich erkennbar.

Präparat 121:

Die Implantate sind röntgenologisch nur noch schemenhaft zu erkennen.

Ergebnis Palasorb-V nach 6 Wochen hinsichtlich der Untersuchungsmethodik:

- Röntgenbild: Die Formkörper sind ähnlich der 4-Wochen-Gruppe einheitlich und deutlich in ihrer Röntgendichte reduziert. Präparat Nr. 121 weist nur noch schemenhaft Formkörper auf.
- μ-CT: Die Implantate sind noch vorhanden. Die Resorption sowie die randständige Mineralisierung sind bei den Präparaten Nr. 119 und Nr. 120 stärker vorangeschritten als bei Präparat Nr. 118 und insgesamt deutlicher als bei der 4-Wochen-Gruppe.
- Histologie: Die Aussagen der histologischen Schnittebene scheinen bezüglich der Resorption (Nr. 118) bzw. der Osteogenese (Nr. 120) in Kontrast zur μ-Computertomographie zu stehen. Insgesamt sind die Formkörper erhalten und geringer oder stärker mit Resorptionslakunen durchsetzt. Insbesondere Nr. 119, gefolgt von Nr. 118 und an letzter Stelle Nr. 120, weisen eine Implantat-assoziierte Osteogenese mit aktiven Osteoblasten auf. In 2 von 3 Präparaten wurden mehrkernige Riesenzellen beim Implantatabbau beobachtet.

Ergebnis Palasorb-V nach 6 Wochen hinsichtlich der Fragestellung dieser Studie:

- Degradation: Formkörper sind als solche erhalten und im Vergleich zur 4-Wochen-Gruppe in ihrer Degradation in geringen Maß vorangeschritten. Mehrkernige Riesenzellen bauen das Implantatmaterial ab.
- Osteogenese/Biokompatibilität: Alle Präparate weisen eine Osteogenese mit aktiven Osteoblasten direkt auf der Implantatoberfläche auf. Insbesondere die Vorgänge in Präparat Nr. 119 bestätigen sowohl mittels μ-CT sowie Histologie die Osteogenese. Während Präparat Nr. 120 auf den Bildern der μ-CT deutlich eine randständige Mineralisierung aufweist, sind die histologischen Ergebnisse diesbezüglich nur wenig aussagekräftig.
- Nebenbefund: Alle 3 Präparate weisen Zeichen einer Infektion auf.

4.4.2.3 8-Wochen-Gruppe

Präparat 96:

Röntgenologisch sind insbesondere distal des Implantationszugangs röntgendichte Anteile der Formkörper zu erkennen, während proximal die Implantate nur noch undeutlich sichtbar sind. Unterstützend zeigen die Bilder der μ -Computertomographie, dass diaphysär einige Implantate noch röntgendichte Anteile aufweisen, während proximal insbesondere auf Höhe des knöchernen Zugangs die Resorption weiter fortgeschritten ist. Die randständige Mineralisation ist insgesamt gering ausgeprägt. Auch histologisch betrachtet besteht auf dieser Schliffebene ein deutlicher Unterschied zwischen den proximalen und distalen Implantaten. Von den proximalen Formkörpern sind nur mehr Reste vorhanden, während distal die Implantatkörper als solche deutlich erkennbar sind und auch das zentral ursprüngliche Implantatmaterial („röntgendichter Kern“) auffällt. Feine, neu gebildete Knochen trabekel finden sich assoziiert mit den Implantaten verteilt im Markraum. Die 40-fache Vergrößerung bestätigt eine vitale Knochenneubildung mit aktivem Osteoidsaum.

Präparat 100:

Röntgenologisch sind die Implantatkörper nachweisbar, jedoch gleichmäßig in ihrer Röntgendichte reduziert. Auf den Bildern der μ -Computertomographie finden wir mehrheitlich Implantate mit deutlichen Resorptionslakunen sowie stark mineralisierte Randbereiche. Dieses Ergebnis wird histologisch bestätigt. In Anbetracht der Implantate bestimmen tiefe Resorptionslakunen sowie die Bildung von Trabekeln das histologische Bild. Die vergrößerte Betrachtung bestätigt die oberflächliche sowie überbrückende Knochenbildung mit aktivem Osteoidsaum.

Präparat 103:

Die Implantate sind als solche röntgenologisch erkennbar und einheitlich in ihrer Röntgendichte reduziert. Auch auf den Bildern der μ -CT sind sie ebenfalls lediglich in ihrer Röntgendichte reduziert, aber als solche erhalten. Randständige Mineralisation fällt ebenfalls eher geringfügig aus. Die histologische Übersicht zeigt proximal gelegene Implantate mit ausgeprägteren Resorptionszeichen als die weiter distal gelegenen, was jedoch durch die Schnittebene bedingt sein kann. Die Mineralisation sowie Trabekelbildung ist nur geringfügig ausgeprägt. Die 40-fache Vergrößerung macht eine leichte Knochenbildung mit eingemauerten Osteozyten und Osteoidsaum auf der Oberfläche sowie als Verbindungsstück zwischen den Implantatanteilen deutlich.

Präparat 97:

Es sind keine Röntgenbilder 8 Wochen nach der Implantation verfügbar, da das Tier frühzeitig in der 6. Woche verstorben ist.

Präparat 102:

Auf den Röntgenbildern sind die Formkörper schattenhaft zu erahnen, allerdings erlitt das Tier zuvor eine Epiphysen-Stauungsfraktur.

Ergebnis Palasorb-V nach 8 Wochen hinsichtlich der Untersuchungsmethodik:

- Röntgenbild: Die Formkörper haben an Röntgendichte verloren und sind nur noch undeutlich erkennbar. Nr. 96 weist Areale mit erhöhter Röntgendichte auf.
- μ-CT: Die Ergebnisse dieser Gruppe sind sehr inhomogen. Die Formkörper des Präparats Nr. 96 liegen im Status der Resorption sowie der randständigen Mineralisation weit zurück und sind eher mit den Implantaten der 4-Wochen-Gruppe zu vergleichen. Nachfolgende Position nimmt Präparat Nr. 103 ein, während Nr. 100 den beiden Anderen deutlich in Resorption sowie Mineralisation voraus ist.
- Histologie: Die Formkörper sind im unterschiedlichen Maße der Resorption unterworfen und es findet eine Implantat-assoziierte Knochenbildung statt. Auch hier fällt Präparat Nr. 100 durch deutliche Zeichen der Resorption sowie Knochenbildung auf, gefolgt von Nr. 96 und Nr. 103. Es wurde in keinem der 3 Präparate mehrkernige Riesenzellen gefunden.

Ergebnis Palasorb-V nach 8 Wochen hinsichtlich der Fragestellung dieser Studie:

- Degradation: Die Formkörper unterliegen in unterschiedlicher Ausprägung der Resorption. Insbesondere Nr. 100 fällt durch deutliche Degradationszeichen auf, gefolgt von Nr. 103 und Nr. 96, dessen Implantate teilweise noch röntgendichte Anteile im Zentrum erkennen lassen.
- Osteogenese/Biokompatibilität: Alle Präparate zeigen eine Implantat-assoziierte Osteogenese mit aktiven Osteoidsaum. Allerdings fällt auch hier insbesondere Präparat Nr. 100 auf.
- Nebenbefund: Alle 3 Präparate sind einer Infektion in besonders gesteigerten Maß unterworfen.

4.4.2.4 12-Wochen-Gruppe

Präparat 104:

Röntgenologisch ist mit Ausnahme des operativen Zugangs in den Markraum der Tibia nichts mehr von den Implantaten zu erkennen. Der Blick auf die μ -CT-Bilder zeigt nur noch geringe Implantatreste, die lokal mineralisiert sind. Auch histologisch sind nur kleine trabekuläre Knochenneubildungen auf einem weitgehend aufgelösten Implantatrest zu erkennen.

Präparat 108:

Von den Implantaten ist röntgenologisch nichts mehr nachweisbar. Hingegen sind mittels der μ -Computertomographie noch Implantatfragmente erkennbar, die auf die einstige Form schließen lassen und lokal Zeichen der Mineralisation zeigen. Histologisch wird ebenfalls bestätigt, dass die Formkörper weitgehend resorbiert sind. Neben geringen Implantatresten von vermutlich 4 Formkörpern sind einzelne Knochen trabekel mit aktiven Osteoidsäumen zu erkennen.

Präparat 112:

Röntgenologisch sind die Implantate nicht mehr nachweisbar. Ebenfalls sind auf den Bildern der μ -Computertomographie nur noch geringfügig Implantatreste vorhanden, die allerdings einen hohen Mineralisierungsgrad zeigen. Die Betrachtung der histologischen Bilder zeigt eine Knochenlamelle, die von einer Kortikalis zur gegenüberliegenden zieht. Vergrößert wird deutlich, dass in dieser Lamelle Implantatreste durch vitale Osteoblasten und Osteozyten knöchern integriert wurden.

Präparat 106:

Im Gegensatz zu den Röntgenbildern der anderen Tiere dieser Gruppe sind die Implantate noch schattenhaft zu erahnen.

Präparat 109:

Die Formkörper sind röntgenologisch nicht mehr nachweisbar.

Ergebnis Palasorb-V nach 12 Wochen hinsichtlich der Untersuchungsmethodik:

- Röntgenbild: Mit Ausnahme eines Tieres sind röntgenologisch keine Formkörper mehr erkennbar. Röntgenbilder des Präparats Nr. 106 zeigen noch geringgradig die Implantate.
- μ-CT: Insgesamt ist die Resorption bei allen 3 Präparaten deutlich fortgeschritten und es sind nur mehr einzelne Reste vorhanden, die mineralisiert sind, insbesondere bei Präparat Nr. 112.
- Histologie: Bei allen 3 Präparaten sind nur noch geringgradig Implantatreste sowie feine medulläre Knochenneubildungen zu erkennen. Insbesondere Nr. 108 und Nr. 112 zeigen noch feine Osteoidsäume. Es wurden keine mehrkernigen Riesenzellen gefunden.

Ergebnis Palasorb-V nach 12 Wochen hinsichtlich der Fragestellung dieser Studie:

- Degradation: Die Formkörper sind größtenteils resorbiert. Nur die Betrachtung der μ-Computertomographie sowie Histologie lassen einige, diffuse Reste erkennen.
- Osteogenese/Biokompatibilität: Es sind immer noch vereinzelte, feine Knochen trabekel im Markraum vorhanden, die mit Ausnahme von Präparat Nr. 104 aktive Osteoidsäume aufweisen.
- Nebenbefund: Alle Präparate zeigen in geringerer Ausprägung Zeichen einer Infektion. Augenscheinlich ist vor allem die erhöhte Zellinfiltration.

4.4.2.5 GESAMTWERTUNG der Palasorb-V-Untersuchungen

Degradation: Ab der 12. Woche sind die Formkörper röntgenologisch nicht mehr nachweisbar, während im μ-Computertomographen sowie auf den histologischen Präparaten geringgradig fragmentierte Reste zu erkennen sind. In 5 Präparaten sind mehrkernige Riesenzellen beim Implantatabbau nachweisbar.

Osteogenese/Biokompatibilität: Ab der 4. Woche post operationem ist Knochenbildung mit aktiven Osteoidsäumen unmittelbar auf dem Implantatmaterial zu verzeichnen. Ab der 12. Woche befinden sich nur noch vereinzelt feine Knochen trabekel, mehrheitlich mit Osteoidsäumen, isoliert oder assoziiert mit geringen Implantatresten im Markraum.

Nebenbefund: Alle 12 Präparate sind in unterschiedlicher Form von einer Infektion betroffen.

4.4.3 Osteoset®-Zusammenfassung

Die Untersuchung mittels Technik der μ -Computertomographie der 8- und 12-Wochen-Gruppe sowie die histologische Bewertung der 12-Wochen-Gruppe entfällt.

4.4.3.1 4-Wochen-Gruppe

Präparat 128:

Auf dem Röntgenbild sind die Implantate nur noch geringgradig erkennbar, auffällig sind randständige Verdichtungen. Auf den Schnittbildern der μ -Computertomographie wird deutlich, dass die Implantate sowohl von ihrer Oberfläche ausgehend als auch im Inneren resorbiert werden. Dadurch hat sich eine Art Resorptionszone zwischen Implantatkern und Oberfläche gebildet. Stellenweise ist randständig die Röntgendichte erhöht. Histologisch ist auf dieser Ebene nur ein Implantatkörper angeschnitten. Deutlich ist ein trabekulärer Knochenring, der sich um das Implantat gebildet hat. Auch Knochenzubildungen der anderen Formkörper sind oberflächlich angeschliffen. Die Vergrößerung bestätigt trabekuläre Knochenneubildungen mit aktiven Osteoblasten, Osteoidsaum sowie Mineralisation. Teilweise sind kleinere Implantatfragmente knöchern integriert.

Präparat 129:

Deutlich sind auf dem Röntgenbild die Implantate zu erkennen, wobei zentral die Röntgendichte reduziert und randständig verdichtet ist. Die Bilder der μ -Computertomographie bestätigen deutlich die Resorption von innen heraus, während der Rand lokal stark mineralisiert ist. Auch die histologische Übersicht zeigt die oberflächlichen und zentralen Resorptionsvorgänge sowie die trabekuläre Ummantelung. Vergrößert wird Knochenbildung direkt auf der Implantatoberfläche erkennbar, Implantatfragmente werden durch Knochenbrücken miteinander verbunden oder vollständig knöchern integriert. 20-fach vergrößert werden Osteoblasten bei der aktiven Osteoidbildung sichtbar.

Präparat 130:

Die 5 Implantate sind auf dem Röntgenbild deutlich sichtbar. Sie sind randständig verdichtet und zentral aufgehellt. Die Auswertung der μ -Computertomographie bestätigt die vorangegangene Resorption sowohl im Inneren als auch an der Implantatoberfläche. Randständig sind vor allem distal deutlich mineralisierte Bereiche erkennbar. Auf dem histologischen Übersichtspräparat sind 2 Implantatkörper angeschliffen. Ebenfalls wird hier

die hochgradige Resorption vom Implantatinnern wie an der Oberfläche deutlich. Beide Formkörper sind von breiten trabekulären Knochenneubildungen ummantelt, teilweise sind in diesen Trabekeln Implantatfragmente vollkommen knöchern integriert. Ebenfalls findet Knochenbildung direkt auf der zerrütteten Implantatoberfläche statt. Die nähere Betrachtung der Trabekel zeigt Osteoblasten sowie eine aktive Osteoidsynthese.

Präparat 133:

Im Gegensatz zu den röntgenologischen Befunden der anderen Tiere weisen 2 Formkörper noch deutlich röntgendichte Areale auf.

Ergebnis Osteoset® nach 4 Wochen hinsichtlich der Untersuchungsmethodik:

- **Röntgenbild:** Die Röntgenbilder zeigen stark resorbierte Implantate. Auffällig sind die randständige Verdichtung und die zentrale Reduktion der Röntgendichte. Nur Präparat Nr. 131 weist lokal zusätzlich deutlich röntgendichtere Areale auf.
- **μ-CT:** Alle 3 Präparate zeigen sowohl eine randständige als auch eine zentrale Resorption. Vor allem die Präparate Nr. 129 und 130 weisen deutlich mineralisierte Randbereiche auf.
- **Histologie:** Während lediglich im Präparat Nr. 129 alle 5 Implantate angeschliffen sind, sind es im Fall von Präparat Nr. 128 nur einer bzw. bei Nr. 130 2 Formkörper. Alle 3 weisen das gleiche histologische Bild auf. Die Implantate zeigen deutliche Resorptionsvorgänge sowohl von der Oberfläche als auch vom Zentrum aus. Sie sind trabekulär ummantelt, es findet Knochenbildung mit angelagerten Osteoblasten unmittelbar auf der Implantatoberfläche statt. Die Präparate Nr. 128 und Nr. 130 weisen mehrkernige Riesenzellen beim Implantatabbau auf.

Ergebnis Osteoset® nach 4 Wochen hinsichtlich der Fragestellung dieser Studie:

- Degradation: Die Implantate sind noch vorhanden, aber deutlich in ihrer Resorption vorangeschritten. Auffällig sind die Resorptionsvorgänge sowohl von der Oberfläche sowie vom Zentrum aus. Der Implantatabbau geschieht zellulär durch mehrkernige Riesenzellen.
- Osteogenese/Biokompatibilität: Die Implantate aller 3 Präparate zeigen ummantelnde Trabekelbildung sowie Knochenbildung mit einwandernden Osteoblasten unmittelbar auf dem Implantatmaterial.
- Nebenbefund: Alle 3 Präparate weisen in unterschiedlicher Intensität Zeichen einer Infektion auf.

4.4.3.2 6-Wochen-Gruppe

Präparat 124:

Röntgenologisch sind die Implantate in der Tibia nicht mehr nachweisbar, nur auf den Bildern der Kontaktradiographie zeigen sich medullär geringgradig diffuse Verschattungen. Die Bilder der μ -Computertomographie zeigen lediglich Implantatreste, die strukturell hochgradig aufgelockerte sind und nur noch geringgradig an die ursprüngliche Form erinnern. Im distalen Bereich der Tibia finden sich lokal mineralisierte Implantatanteile. Das histologische Bild zeigt auf dieser Schliiffebene nur wenige feine trabekuläre Knochenneubildungen im Markraum. Sie weisen an ihrer Oberfläche einen aktiven Osteoidsaum auf.

Präparat 125:

Auf dem Röntgenbild sind nur noch unterhalb des knöchernen Implantationszugangs sehr schattenhaft Reste von Implantaten zu erkennen. Die Bilder der μ -Computertomographie zeigen nur noch in geringer Form Materialreste, die allerdings deutlich mineralisiert sind. Auf den histologischen Bildern ist ebenfalls ein geringgradiger Implantatrest mit wenigen Implantat-assoziierten, trabekulären Knochenneubildungen im Markraum zu sehen. Bei 40-facher Vergrößerung wird die oberflächliche Knochenbildung mit aktivem Osteoidsaum sowie zellulärer Implantatabbau deutlich.

Präparat 126:

Röntgenologisch sind Reste der Implantate nur noch schattenhaft zu erahnen. Die Bilder der μ -Computertomographie zeigen, dass die Resorption randständig sowie zentral deutlich vorangeschritten ist. Im Vergleich zu den anderen 2 Präparaten sind die Implantatanteile

deutlicher erkennbar und die verbliebenen „Implantatkränze“ mineralisiert. Auch histologisch fällt auf, dass hier deutlich mehr Implantatreste vorhanden sind. Die Vergrößerung zeigt eine infiltrierende Knochenbildung mit aktivem Osteoidsaum, Osteoblasten dringen tief in das Material ein.

Präparat 122:

Auf den Röntgenbildern sind keine Implantate mehr zu erkennen.

Ergebnis Osteoset® nach 6 Wochen hinsichtlich der Untersuchungsmethodik:

- Röntgenbild: Auf den Röntgenbildern sind die Formkörper nicht mehr zu erkennen.
- μ-CT: Insgesamt ist bei allen 3 Präparaten die Resorption deutlich vorangeschritten, insbesondere Präparat Nr. 125 fällt durch das nur noch geringfügige Vorhandensein von Materialresten auf, gefolgt von Nr. 124. Präparat Nr. 126 hingegen weist noch röntgendichte „Implantatkränze“ auf.
- Histologie: In 2 Präparaten sind die Formkörper bis auf einen minimalen Implantatrest nicht mehr vorhanden. Präparat Nr. 126 hingegen weist deutlich Implantatanteile von vermutlich 4 Formkörpern auf. Während die beiden Ersteren nur noch geringe feine Trabekel mit aktiven Osteoidsaum zeigen, sind die Implantatanteile von Nr. 126 deutlich trabekulär durchsetzt, Osteoblasten dringen tief in das Material ein. Nr. 125 weist mehrkernige Riesenzellen beim Implantatabbau auf.

Ergebnis Osteoset® nach 6 Wochen hinsichtlich der Fragestellung dieser Studie:

- Degradation: Insgesamt ist die Resorption hochgradig vorangeschritten. In den Präparaten Nr. 124 und 125 sind nur mehr geringe Materialreste vorhanden, gefolgt von Präparat Nr. 126. Der Implantatabbau geschieht zellulär (Nr. 125).
- Osteogenese/Biokompatibilität: Bei allen 3 Präparaten hat eine Osteogenese stattgefunden. Während bei 2 Präparaten (Nr. 124 und 125) nur noch medullär feine Trabekel mit aktiven Osteoidsaum zu erkennen sind, sind die Implantatreste in Nr. 126 deutlich knöchern infiltriert mit tiefer Einwanderung von Osteoblasten.
- Nebenbefund: Alle 3 Präparate zeigen Zeichen einer Infektion.

4.4.3.3 8-Wochen-Gruppe

Bei den Präparaten der 8-Wochen-Gruppe liegen KEINE Bilder der μ -Computertomographie vor. Zusätzlich zur Histomorphologie wird die polychrome Sequenzmarkierung qualitativ ausgewertet (siehe dort).

Präparat 87:

Röntgenologisch gibt es keinerlei Hinweise mehr auf die implantierten Formkörper. Auch histologisch betrachtet sind die Formkörper weitgehend resorbiert. Um die einstigen Implantate bestehen feine trabekuläre Neubildungen, teilweise mit integrierten Implantatresten. Die Vergrößerung zeigt eine aktive Osteogenese mit vitalem Osteoidsaum.

Präparat 90:

Röntgenologisch sind keine Implantate mehr nachweisbar. Histologisch sind geringfügig Materialreste erkennbar, die knöchern integriert oder verbunden sind. Die Vergrößerung zeigt die Osteogenese mit aktiven Osteoidsäumen auf der Materialoberfläche.

Präparat 92:

Auf den Röntgenbildern sind keine Implantate mehr erkennbar. Auch histologisch betrachtet sind die Implantate vollständig resorbiert. Lediglich im Markraum verteilt sind feine Knochen trabekel vorhanden, an deren Oberfläche eine aktive Osteoidsynthese stattfindet.

Präparat 88 und 101:

Die Implantate sind röntgenologisch nicht mehr vorhanden.

Ergebnis Osteoset® nach 8 Wochen hinsichtlich der Untersuchungsmethodik:

- Röntgenbild: Auf den Röntgenbildern sind keine Formkörper mehr vorhanden.
- μ-CT: -
- Histologie: Die Implantate sind weitgehend resorbiert. Lediglich kleine verstreute Materialreste sind bei 2 Präparaten (Nr. 87, Nr. 90) erkennbar. Alle 3 Präparate weisen medullär feine Knochen trabekel mit aktiver Osteogenese auf.

Ergebnis Osteoset® nach 8 Wochen hinsichtlich der Fragestellung dieser Studie:

- Degradation: Die Implantate sind weitgehend resorbiert, nur noch histologisch sind minimale Materialreste erkennbar.
- Osteogenese/Biokompatibilität: Es sind immer noch feine Trabekel mit aktiver Knochensynthese im Markraum vorhanden.
- Nebenbefund: Alle 3 Präparate zeigen in unterschiedlicher Ausprägung Zeichen einer Infektion.

4.4.3.4 12-Wochen-Gruppe

Die Osteoset®-Implantate liegen bei allen Tieren, mit Ausnahme vom Präparat Nr. 86, übereinander. Im Präparat Nr. 86 der 12-Wochen-Gruppe sind 2 Implantate parallel zum Liegen gekommen. Zur Auswertung liegen NUR RÖNTGENOLOGISCHE Ergebnisse vor, Bilder der μ-Computertomographie und Histologie fehlen. Bei allen Tieren dieser Gruppe sind röntgenologisch keine Implantate mehr nachweisbar.

Ergebnis Osteoset® nach 12 Wochen hinsichtlich der Untersuchungsmethodik:

- Röntgenbild: Auf keiner der Röntgenbilder sind Formkörper vorhanden.
- μ-CT: -
- Histologie: -

Ergebnis Osteoset® nach 12 Wochen hinsichtlich der Fragestellung dieser Studie:

- Degradation: Die Formkörper sind vollständig degradiert.
- Osteogenese/Biokompatibilität: Aussage nicht möglich.
- Nebenbefund: Aussage nicht möglich.

4.4.3.5 GESAMTWERTUNG der Osteoset[®]-Untersuchungen

Degradation: Die Implantate zeigen schon in der 4. Woche post operationem deutliche Zeichen der Resorption, die sowohl randständig als auch zentral ihren Ausgangspunkt haben. In der 6. Woche sind mehrheitlich die Restanteile der Formkörper nur noch mittels μ -CT zu erkennen (Ausnahme Nr. 126: auch histologisch). In der 8. Woche sind bei entsprechender Vergrößerung nur noch minimale Materialreste histologisch nachweisbar. Das Implantatmaterial wird in 3 Präparaten durch mehrkernige Riesenzellen abgebaut.

Osteogenese/Biokompatibilität: Osteogenese mit aktivem Osteoidsaum findet ab der 4. Woche unmittelbar auf der Implantatoberfläche statt. In der 6. und 8. Woche sind – mit Ausnahme von Nr. 126 – nur noch vereinzelt feine Knochenneubildungen in der Markhöhle vorhanden (von der 12-Woche-Gruppe ist keine histologische Auswertung gemacht worden).

Nebenbefund: Alle 9 Präparate weisen in unterschiedlicher Ausprägung eine Infektion auf.

4.5 Pharmakokinetik der Antibiotika

Tab. 26: Antibiotikagehalt in einem Formkörper und nach Implantation insgesamt in der Tibia.

				INSGESAMT in der Tibia
Palasorb-G				
Gentamicin	1 Formkörper	2,5 mg	2 Formkörper	5 mg
Palasorb-V				
Vancomycin	1 Formkörper	0,35 mg	14 Formkörper	4,9 mg
Osteoset®				
Tobramycin	1 Formkörper	2,86 mg	5 Formkörper	14,3 mg

Therapeutischer und toxischer Bereich der Antibiotika

Gentamicin: Therapeutische Breite 4–12 µg/ml, toxischer Bereich ab 10–12 µg/ml.

Vancomycin: Therapeutische Breite 5–40 µg/ml, toxischer Bereich > 80 µg/ml.

Tobramycin: Therapeutische Breite 4–8 µg/ml, toxischer Bereich > 12 µg/ml.

4.5.1 Antibiotika-Freisetzung – In-vitro-Daten

In den Untersuchungen zur In-vitro-Elution der Antibiotika wiesen die in den Formkörpern Osteoset® und Palasorb-V enthaltenen Antibiotika eine geringfügig höhere Konzentration als deklariert auf. Dies ist auf eine gängige Überdosierung bei pharmazeutischen Formulierungen zurückzuführen, die bis zu 10 % betragen kann. Das beauftragte Labor verwendete eine Zusammenfassung von „5–7 Tage“ (Palasorb-G und -V) bzw. „2–3 Tage“ (Osteoset®). Für die Auswertung wurde der angegebene Wert für die Tage einzeln eingetragen. Der Begriff „Spuren“ ist durch das Labor nicht näher definiert, die entsprechende Konzentration ist abhängig von den einzelnen Antibiotika. Daher wurde der entsprechende Grenzwert für das jeweilige Antibiotikum zur Erstellung der Graphiken eingesetzt.

4.5.1.1 Gentamicin (Palasorb-G)

Freisetzung Gentamicinbase $\mu\text{g/ml}$ aus einem Formkörper in Abhängigkeit der Zeit [d]. Laut Abbott Diagnostics liegt der untere Messbereich bei $0,27 \mu\text{g/ml}$.

Tab. 27: Elution Gentamicin (Palasorb-G).

Zeit [d]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Gentamicinbase	1323	616	115	92	54	54	54	19	17	6

Ein Formkörper enthält $2500 \mu\text{g}$ Gentamicinbase. Am 1. Tag werden bereits 53 % des enthaltenen Antibiotikums eluiert, am 3. Tag sind es 82 %, am 7. Tag 92 % und am 10. Tag 94 %. Zwischen dem 10. und 20. Tag sind nur noch Spuren feststellbar.

4.5.1.2 Vancomycin (Palasorb-V)

Freisetzung Vancomycin $\mu\text{g/ml}$ aus einem Formkörper in Abhängigkeit der Zeit [d]. Laut Abbott Diagnostics liegt der untere Messbereich bei $2 \mu\text{g/ml}$.

Tab. 28: Elution Vancomycin (Palasorb-V).

Zeit [d]	1	2	3	4	5	6	7	8
Vancomycin	269	43	14	6	10	10	10	Spuren

Insgesamt werden innerhalb von 8 Tagen $362 \mu\text{g}$ freigesetzt. Am 1. Tag sind bereits 77 % des enthaltenen Vancomycin eluiert, bis zum 3. Tag 93 % und nach dem 7. Tag werden nur noch Spuren freigesetzt.

4.5.1.3 Tobramycin (Osteoset[®])

Freisetzung Tobramycin $\mu\text{g/ml}$ aus einem Formkörper in Abhängigkeit der Zeit [d]. Laut Abbott Diagnostics liegt der untere Messbereich bei $0,18 \mu\text{g/ml}$.

Tab. 29: Elution Tobramycin (Osteoset[®]).

Zeit [d]	1	2	3	4
Tobramycin	2596	149	149	Spuren

Ein Formkörper enthält deklariert $2860 \mu\text{g}$ Tobramycin, gefunden wurden innerhalb von 3 Tagen $2894 \mu\text{g/ml}$. Am 1. Tag werden 91 % freigesetzt. Nach dem 3. Tag ist nur noch die Freisetzung von Spuren zu verzeichnen.

4.5.1.4 Zusammenfassung

Vergleich Freisetzung Gentamicin, Vancomycin und Tobramycin in $\mu\text{g/ml}$ in Abhängigkeit der Zeit [d].

Tab. 30: Elution Gentamicin, Vancomycin und Tobramycin im Vergleich.

Zeit [d]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Gentamicin	1323	616	115	92	54	54	54	19	17	6
Vancomycin	269	43	14	6	10	10	10	Spuren		
Tobramycin	2596	149	149	Spuren						

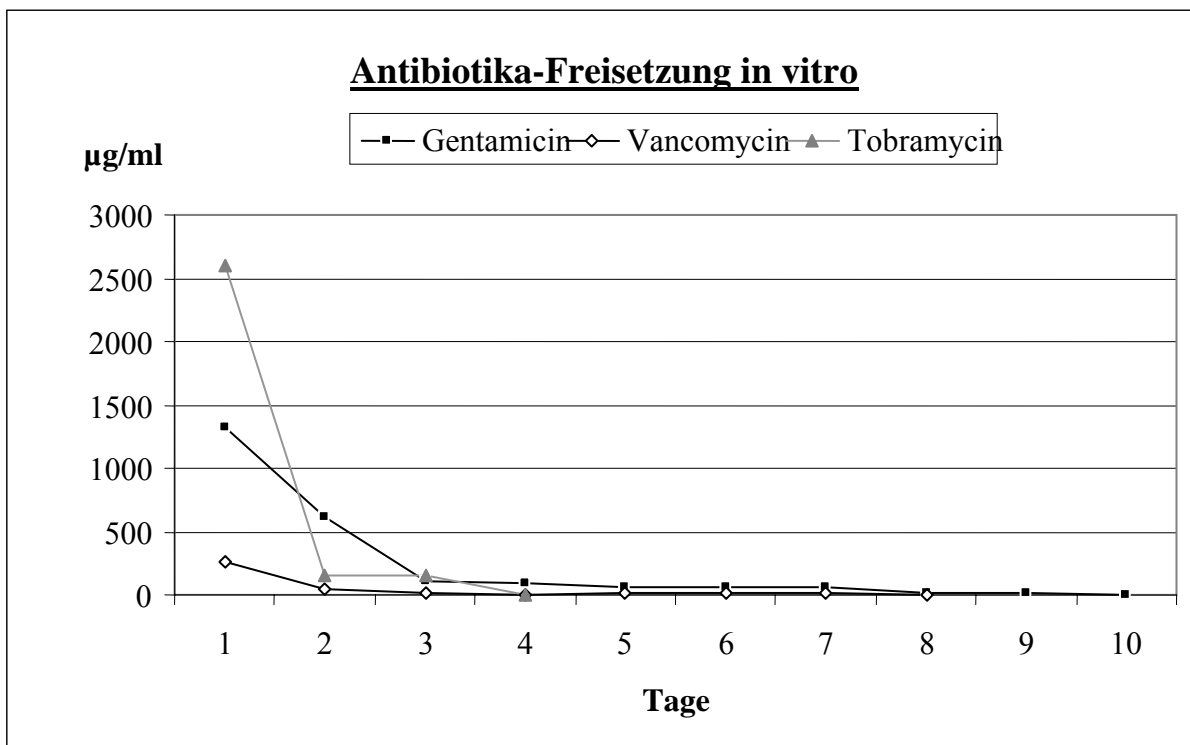


Abb. 93: Elution Gentamicin, Vancomycin und Tobramycin im Vergleich.

Elution prozentual (%) zur Ausgangskonzentration

Tab. 31: Elution (%) zur Ausgangskonzentration Gentamicin, Vancomycin und Tobramycin im Vergleich.

Antibiotikum	Ausgangswert	1. Tag	3. Tag	7. Tag	10. Tag
Gentamicin	2500 µg	53 %	82 %	92 %	94 %
Vancomycin	350 µg	77 %	93 %	103 %	103 %
Tobramycin	2860 µg	91 %	101 %	101 %	101 %

Osteoset® eluiert am 1. Tag bereits 91 %, ab dem 3. Tag sind nur noch Spuren ermittelbar. Palasorb-V setzt am 1. Tag rund 77 % und bis zum 3. Tag 93 % frei, ab dem 8. Tag werden nur noch Spuren freigesetzt. Palasorb-G weist die längste Elutionsdauer auf. Am 1. Tag sind es rund 53 %, am 3. Tag 82 %, bis zum 7. Tag 92 % und am 10. Tag 94 %. Bis zum 20. Tag werden auch hier nur noch Spuren des Antibiotikums freigesetzt.

4.5.2 Antibiotika-Freisetzung – In-vivo-Daten

4.5.2.1 Gentamicin (Palasorb-G)

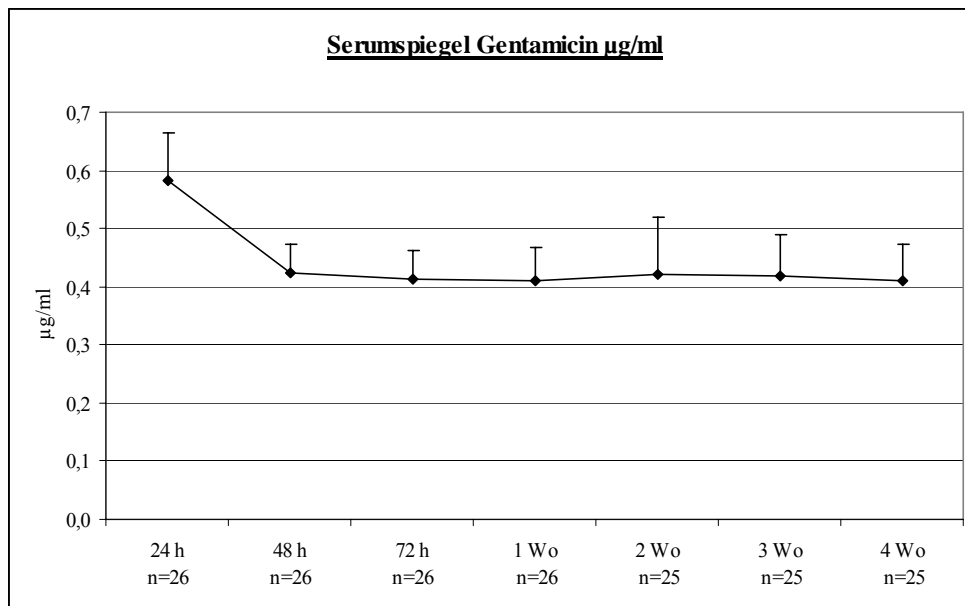


Abb. 94: Serumspiegel nach Implantation von Palasorb-G.

h Stunde; **Wo** Woche(n); **n** Anzahl Proben

Im Serum werden über den gesamten Untersuchungszeitraum nur geringe Gentamicin-Konzentrationen gemessen.

4.5.2.2 Vancomycin (Palasorb-V)

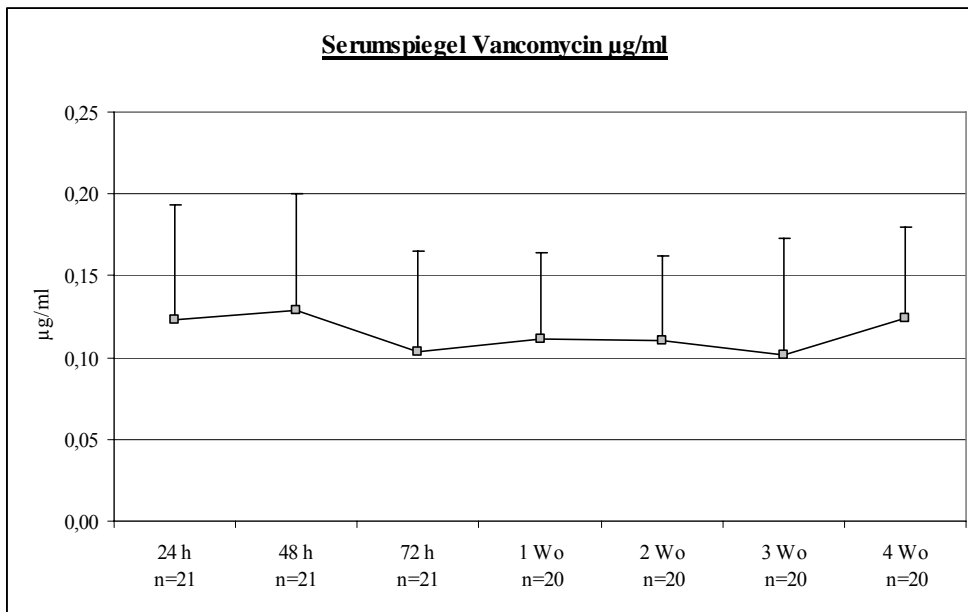


Abb. 95: Serumspiegel nach Implantation von Palasorb-V.

h Stunde; **Wo** Woche(n); **n** Anzahl Proben

Im Serum werden über den gesamten Untersuchungszeitraum nur geringe Vancomycin-Konzentrationen gemessen.

4.5.2.3 Tobramycin (Osteoset®)

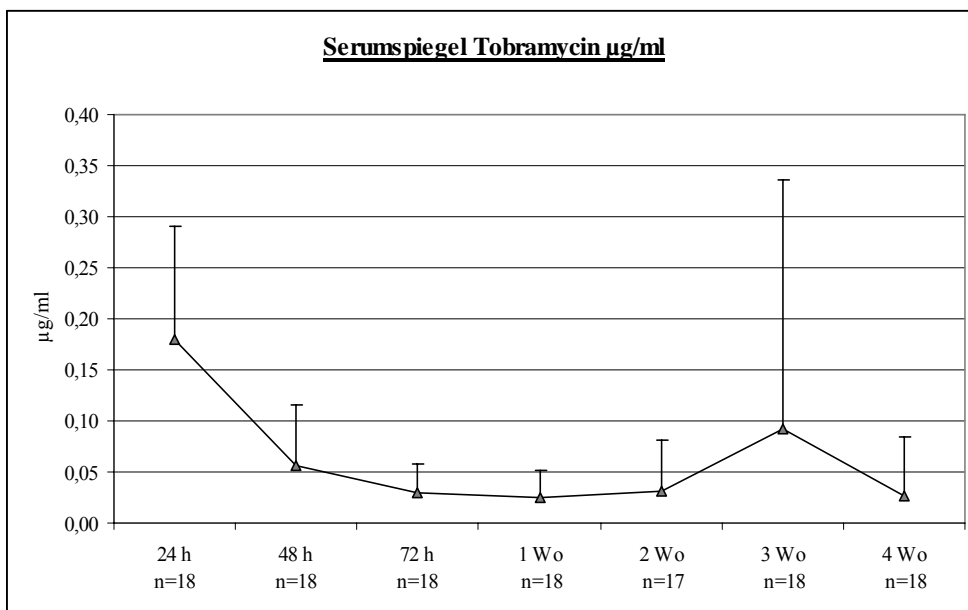


Abb. 96: Serumspiegel nach Implantation von Osteoset®.

h Stunde; **Wo** Woche(n); **n** Anzahl Proben

Die Serumwerte für Tobramycin sind nicht einheitlich. Der Höchstwert ist nach 24 Stunden mit 0,18 µg/ml erreicht, sinkt dann stetig bis auf 0,02 µg/ml in der 1. Woche, nimmt in der 2. Woche mit 0,03 µg/ml geringfügig wieder zu, um dann mit 0,09 µg/ml in der 3. Woche noch mal deutlich anzusteigen und in der 4. Woche auf 0,03 µg/ml abzufallen.

4.5.2.4 Zusammenfassung

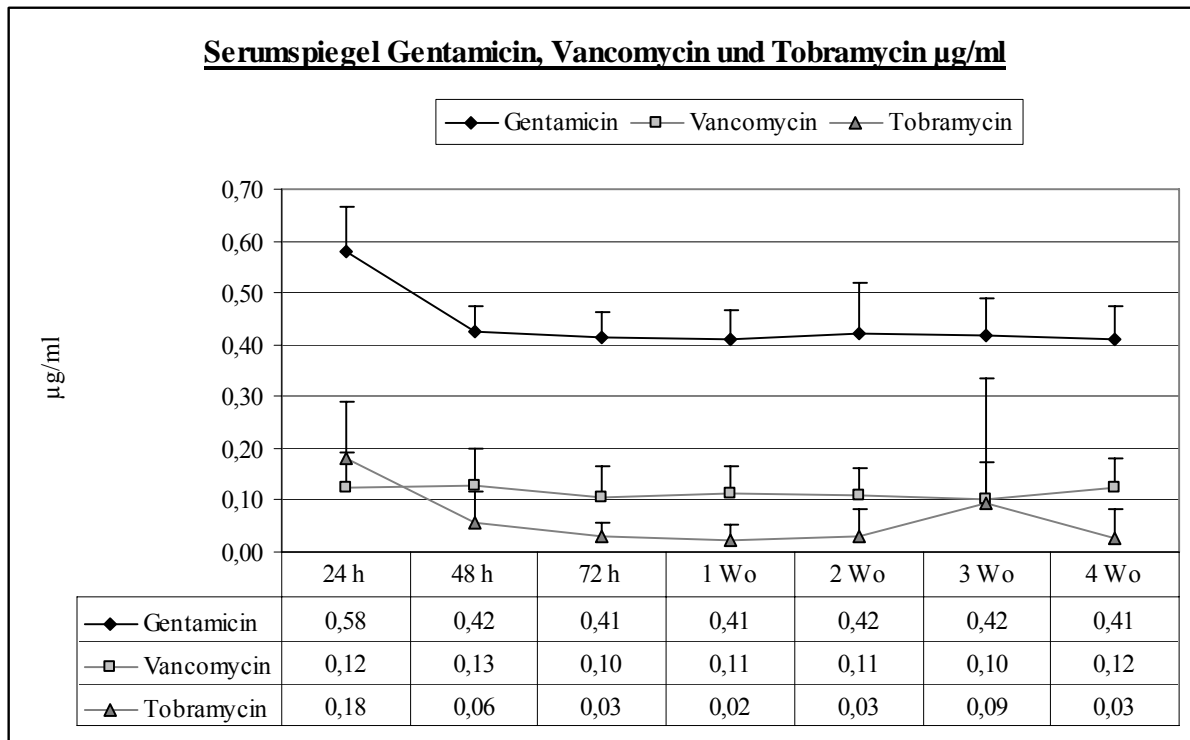


Abb. 97: Vergleich der Serumspiegel nach Implantation der entsprechenden Formkörper.

h Stunde; Wo Woche(n); n Anzahl Proben

Im gesamten Zeitraum von 4 Wochen, in denen die Serumkonzentrationen der Antibiotika ermittelt wurden, liegen die gemessenen Antibiotika-Konzentrationen im Bereich der Nachweisgrenze. Für die einzelnen Antibiotika gelten folgende Werte: Gentamicin zwischen 0,41–0,58 µg/ml, Vancomycin 0,10–0,13 µg/ml und Tobramycin 0,03–0,18 µg/ml. Somit liegen die Konzentrationen der einzelnen Antibiotika im Serum weit unter dem entsprechenden toxischen Spiegel.

4.5.3 Antibiotika-Konzentrationen in Medulla und Kortikalis

Implantiert wurden jeweils 2 Palasorb-G-Formkörper mit einem Gesamtgehalt an Gentamicin von 5 mg, 14 Palasorb-V-Implantate mit einer Vancomycin-Konzentration von 4,9 mg und 5 Osteoset[®]-Pellets mit einem Gehalt von 14,3 mg Tobramycin. Die Kortikalis-Proben wurden jeweils in 20 ml, die Medulla-Proben in 10 ml Pufferlösung inkubiert und der Überstand extrahiert. Schwierigkeiten ergab die Ermittlung der Konzentrationen der Aminoglykoside in der Medulla. Das beauftragte Labor hatte Probleme den Gehalt an Gentamicin und Tobramycin im Knochenmark zu bestimmen. Es laufen derzeit weitere Untersuchungen zur korrekten Analyse der Antibiotika aus den Medulla-Proben.

Gentamicin (Palasorb-G)

Implantiert wurden 2 Formkörper mit jeweils 250 mg und insgesamt 500 mg Masse. Waren die Formkörper noch vorhanden, wurden diese entfernt und ausschließlich Medulla und Kortikalis isoliert.

Tab. 32: Extrahierte Masse in Gramm [g] nach Implantation von Palasorb-G.

Überlebenszeit	Probennummer	Kortikalis	Medulla
1 Tag	157	4,305	0,666
	158	4,437	1,031
	177	5,012	1,486
3 Tage	149	3,661	1,054
	150	5,113	0,778
	173	4,302	0,739
14 Tage	151	5,278	0,822
	152	6,596	0,887
	153	5,514	0,935
84 Tage	110	4,625	0,967
	111	6,073	0,478

Vancomycin (Palasorb-V)

Implantiert wurden 14 Formkörper mit jeweils 35 mg und insgesamt 490 mg Masse. Wenn noch vorhanden, wurden die Formkörper entfernt und nur Medulla und Kortikalis isoliert.

Tab. 33: Extrahierte Masse in Gramm [g] nach Implantation von Palasorb-V.

Überlebenszeit	Probennummer	Kortikalis	Medulla
1 Tag	159	5,297	1,289
	160	4,836	1,356
	178	4,652	0,952
3 Tage	147	4,276	1,075
	148	6,144	0,213
	156	6,204	1,002
14 Tage	155	6,778	0,814
	182	6,811	1,238
	183	7,399	1,287
84 Tage	107	4,549	1,031
	99	3,722	0,516

Tobramycin (Osteoset®)

Implantiert wurden 5 Formkörper mit jeweils 107,5 mg und insgesamt 537 mg Masse. Wenn noch vorhanden, wurden die Formkörper entfernt und nur Medulla und Kortikalis isoliert.

Tab. 34: Extrahierte Masse in Gramm [g] nach Implantation von Osteoset®.

Überlebenszeit	Probennummer	Kortikalis	Medulla
1 Tag	179	5,861	0,848
	180	4,989	1,444
	181	3,332	1,438
3 Tage	174	6,908	1,203
	175	4,889	1,272
	176	5,824	1,189
14 Tage	184	6,277	0,479
	185	5,440	1,186
	186	5,570	0,886

4.5.3.1 Antibiotika-Konzentration Kortikalis

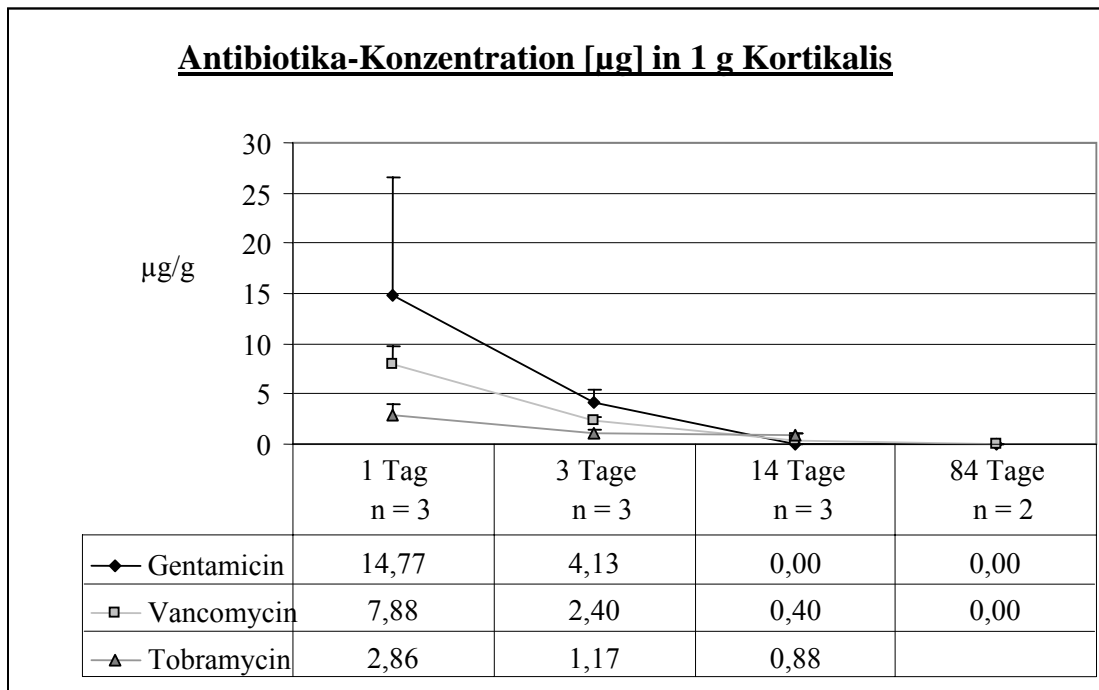


Abb. 98: Konzentrationen der einzelnen Antibiotika in µg/g Kortikalis in Abhängigkeit von der Beobachtungszeit (dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung).

4.5.3.2 Antibiotika-Konzentration Medulla

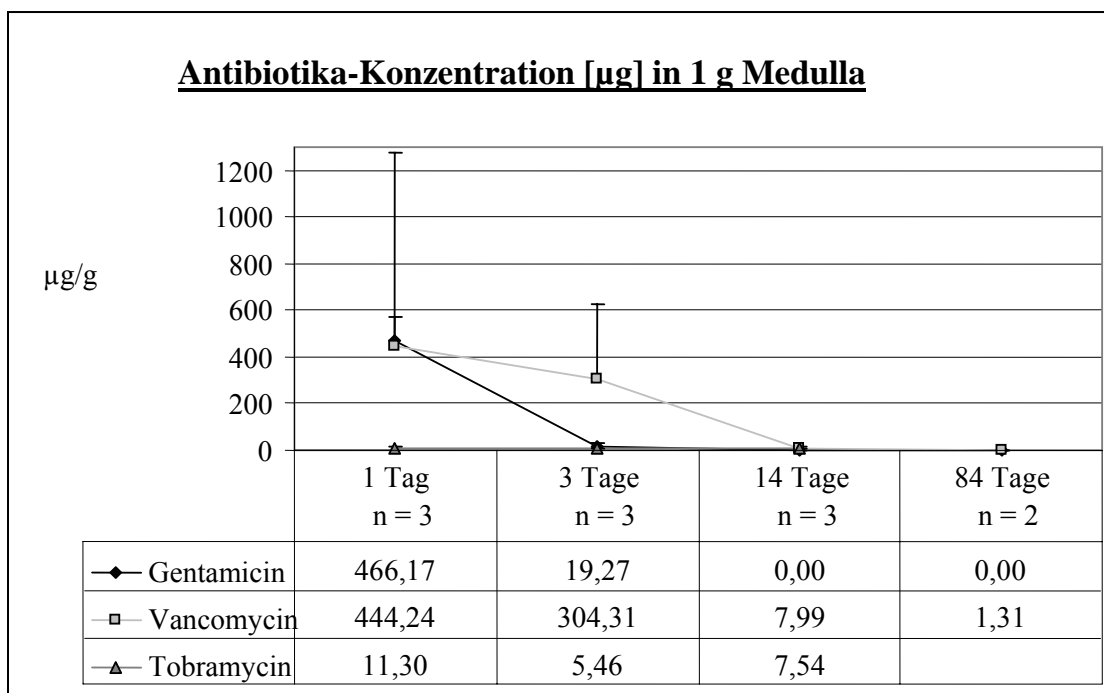


Abb. 99: Konzentrationen der einzelnen Antibiotika in µg/g Medulla in Abhängigkeit von der Beobachtungszeit (dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung).

Zusammenfassung

Es wurden die Mittelwerte der einzelnen Antibiotika in μg pro 1 g Kortikalis sowie in 1 g Medulla ermittelt. Abb. 98 zeigt, dass am 1. Tag 14,77 $\mu\text{g/g}$ Gentamicin, 7,88 $\mu\text{g/g}$ Vancomycin und 2,86 $\mu\text{g/g}$ Tobramycin in der Kortikalis gemessen wurden. Bereits 3 Tage nach Implantation sind die Werte deutlich gesunken, 14 Tage p.op. ist kein Gentamicin mehr nachweisbar und mit 0,4 bzw. 0,88 $\mu\text{g/g}$ sind nur noch geringe Konzentrationen an Vancomycin bzw. Tobramycin vorhanden.

Die Werte der Aminoglykoside in der Medulla sind derzeit nur eingeschränkt brauchbar, da aufgrund labortechnischer Probleme die Ermittlung der Konzentrationen mit Schwierigkeiten verbunden war. Hingegen verlief die Messung von Vancomycin problemlos und zeigt hohe Medullaspiegel mit 444,24 $\mu\text{g/g}$ bereits am 1. Tag. Im weiteren Verlauf sinkt die lokale Konzentration und ist nach 84 Tagen in nur noch sehr geringen Mengen vorhanden.

4.6 Möglicher Einfluss der Kalziumsulfatträger auf die Gerinnung

Um den möglichen Einfluss des Kalziumträgers durch Freisetzung von Kalzium-Ionen auf die Blutgerinnung zu ermitteln, werden Untersuchungen mittels roTEG (Rotationsthromboelastographie) durchgeführt und Marker der aktivierten Gerinnung nach 8-minütiger Inkubation der Probenkörper in nicht koaguliertem, humanen Vollblut ermittelt. Bei der Auswertung der Globalmethode wie auch der Bestimmung der Gerinnungsmarker wurden die Ergebnisse der 3 Probanden zusammengefasst und der Mittelwert errechnet. Basierend auf diesen Daten zeigen die nachfolgenden Diagramme die einzelnen Knochenersatzstoffe im Vergleich zueinander sowie in Relation zu einer unbehandelten Blutprobe. Die Säulen zeigen sowohl die einzelnen Werte an wie auch die Standardabweichung. Die Balken grenzen den Referenzbereich ein, in dem unter physiologischen Bedingungen die entsprechenden Konzentrationen liegen.

4.6.1 Untersuchungen mit dem roTEG

4.6.1.1 Clotting Time

Gerinnungsanalyse mit dem roTEG und Darstellung der Gerinnungszeit in Sekunden nach 8-minütiger Inkubation von humanen Blut mit den entsprechenden Knochenersatzstoffen sowie zur Kontrolle eine nicht manipulierte Blutprobe. Der Referenzbereich liegt zwischen 100 und 240 Sekunden.

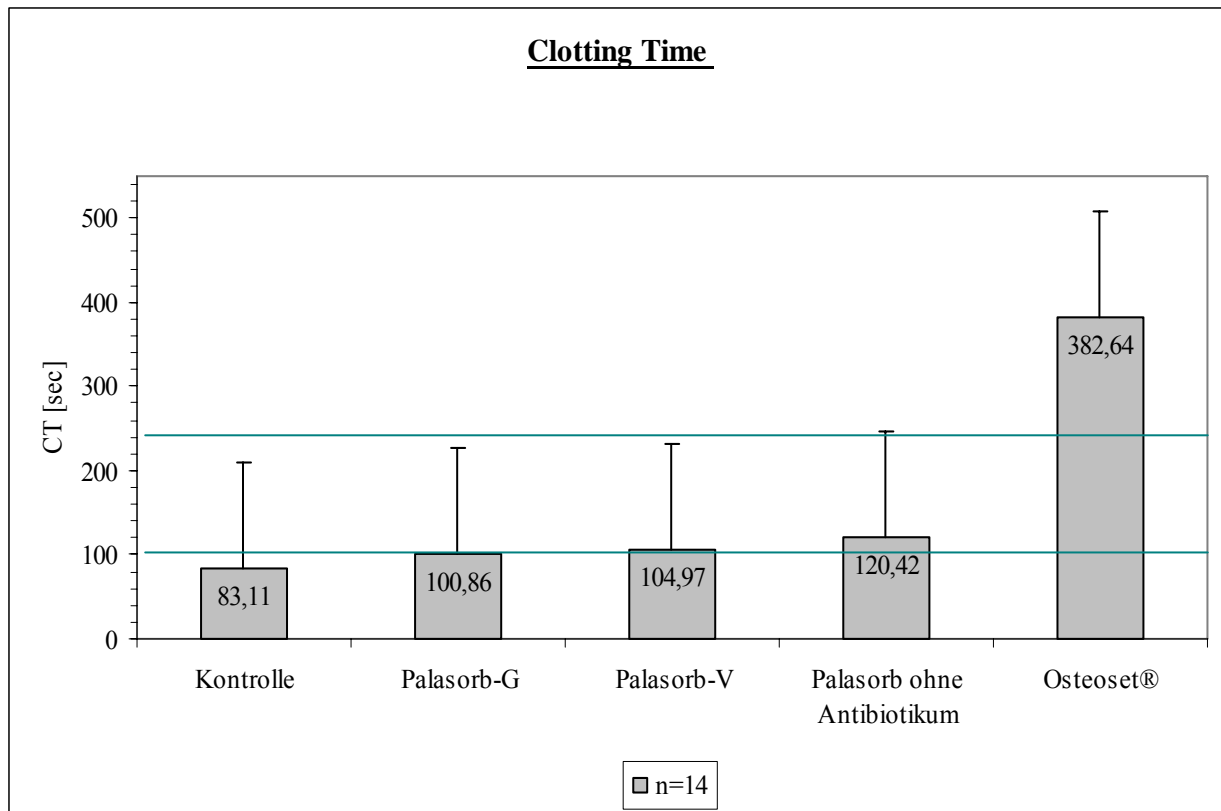


Abb. 100: Gerinnungsanalyse mittels roTEG: Ermittlung der CT.

Ergebnis der Gerinnungszeit:

Die Gerinnungszeit liegt mit den verschiedenen Palasorb-Präparationen im Referenzbereich, während die zur Kontrolle dienende Blutprobe mit 83,11 Sekunden unterhalb der Minimalzeit von 100 Sekunden und Osteoset® mit 382,64 Sekunden oberhalb der Maximalzeit von 240 Sekunden liegt.

4.6.1.2 Clot Formation Time

Gerinnungsanalyse mit dem roTEG und Darstellung der Gerinnelbildungszeit in Sekunden nach 8-minütiger Inkubation von humanen Blut mit den entsprechenden Knochenersatzstoffen sowie zur Kontrolle eine nicht manipulierte Blutprobe. Der Referenzbereich liegt zwischen 30 und 110 Sekunden.

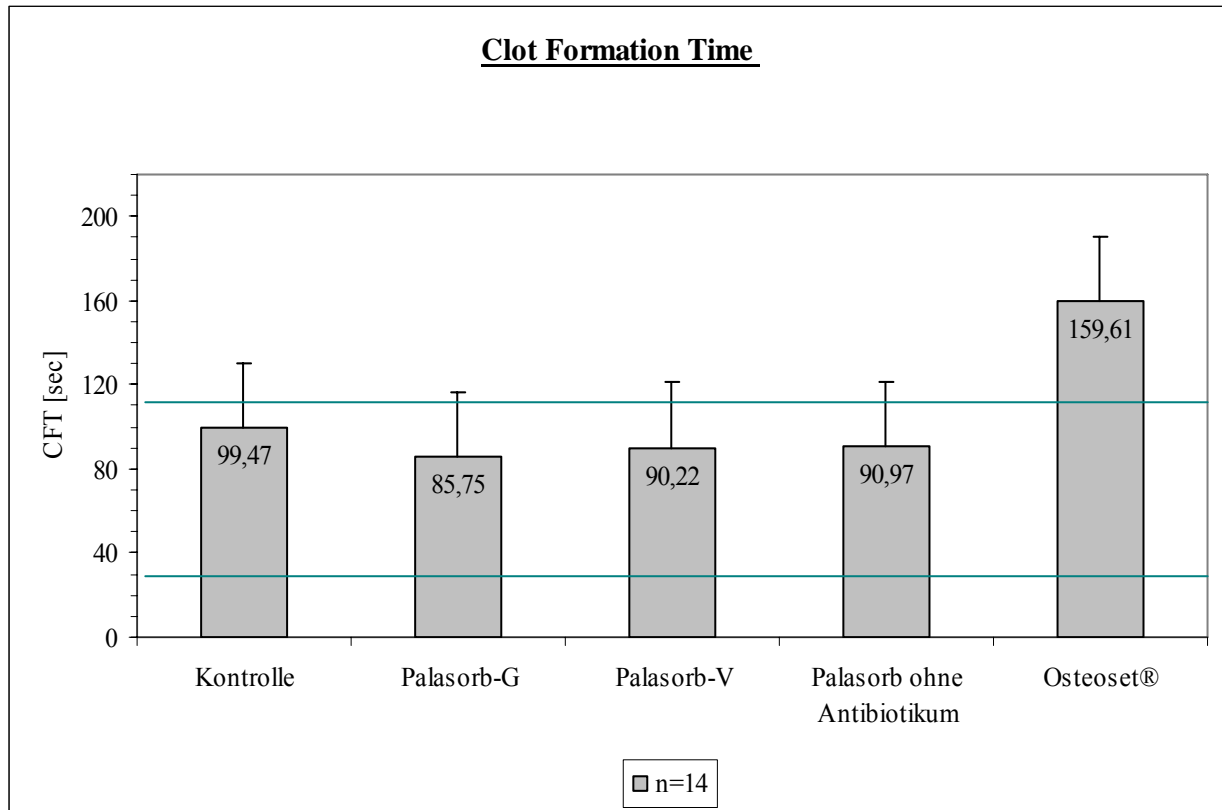


Abb. 101: Gerinnungsanalyse mittels roTEG: Ermittlung der CFT.

Ergebnis Clot Formation Time:

Die Gerinnelbildungszeiten liegen bei allen Palasorb-Proben im physiologischen Wertebereich, während die Osteoset®-Probe mit 159,61 Sekunden den Maximalwert von 110 Sekunden übersteigt.

4.6.1.3 Maximum Clot Firmness

Gerinnungsanalyse mit dem roTEG und Darstellung der maximalen Gerinnselfestigkeit in mm nach 8-minütiger Inkubation von humanen Blut mit den entsprechenden Knochenersatzstoffen sowie zur Kontrolle eine nicht manipulierte Blutprobe. Der Referenzbereich liegt zwischen 50 und 72 mm.

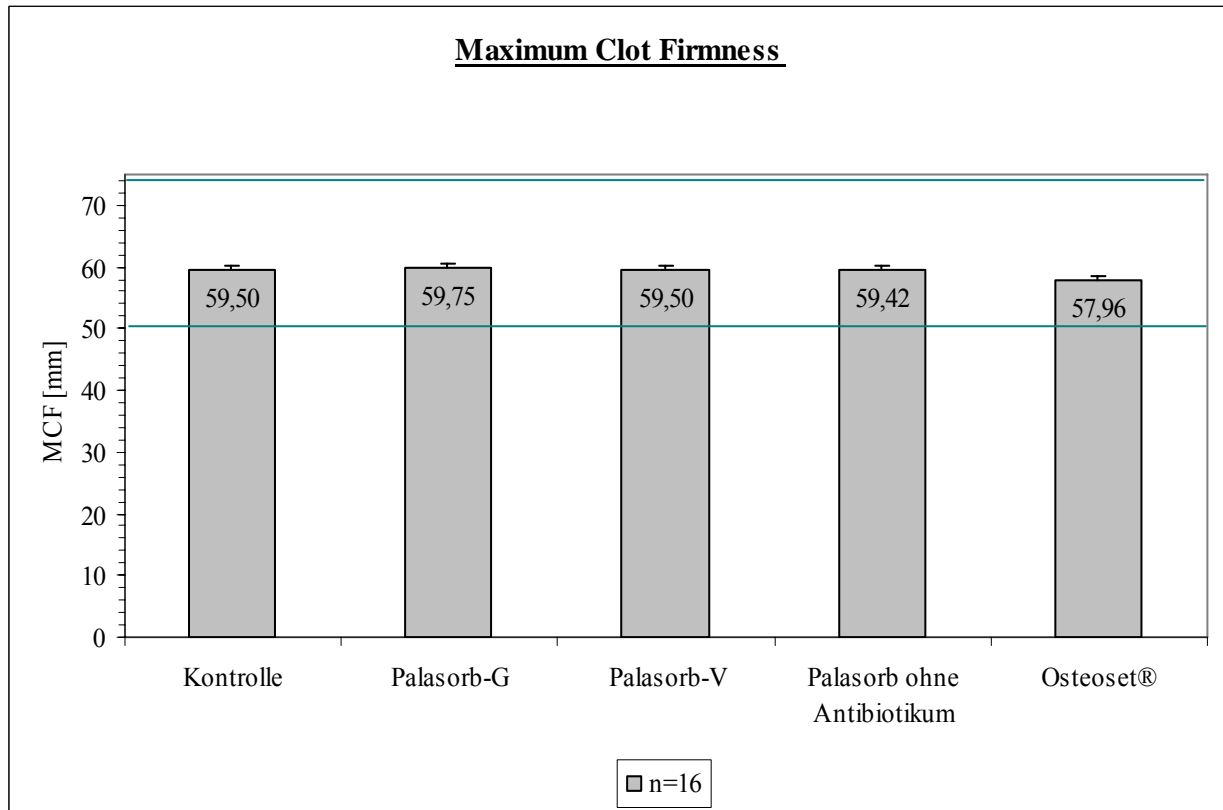


Abb. 102: Gerinnungsanalyse mittels roTEG: Ermittlung der MCF.

Ergebnis der Maximum Clot Firmness:

Die Werte der maximalen Gerinnselfestigkeit befinden sich bei allen Proben mit Werten zwischen 57,96 und 59,75 mm im Referenzbereich.

4.6.2 Marker der aktivierten Gerinnung

4.6.2.1 Prothrombinfragment F_{1+2}

Das Fragment „ F_{1+2} “ ist ein Peptid und wird bei dem Gerinnungsprozess vom inaktiven Prothrombin abgespalten, wodurch das aktive Thrombin gebildet wird. Die Menge des entstandenen Thrombins ist proportional zum Gehalt an F_{1+2} . Dadurch kann das Thrombin quantifiziert und auf den Gerinnungsprozess geschlossen werden.

Die nachfolgende Graphik zeigt die F_{1+2} -Konzentrationen nach 8-minütiger Inkubation von humanem Blut mit den entsprechenden Knochenersatzstoffen und als Kontrolle eine nicht inkubierte Blutprobe. Der Referenzbereich liegt zwischen 69 und 229 pmol/l.

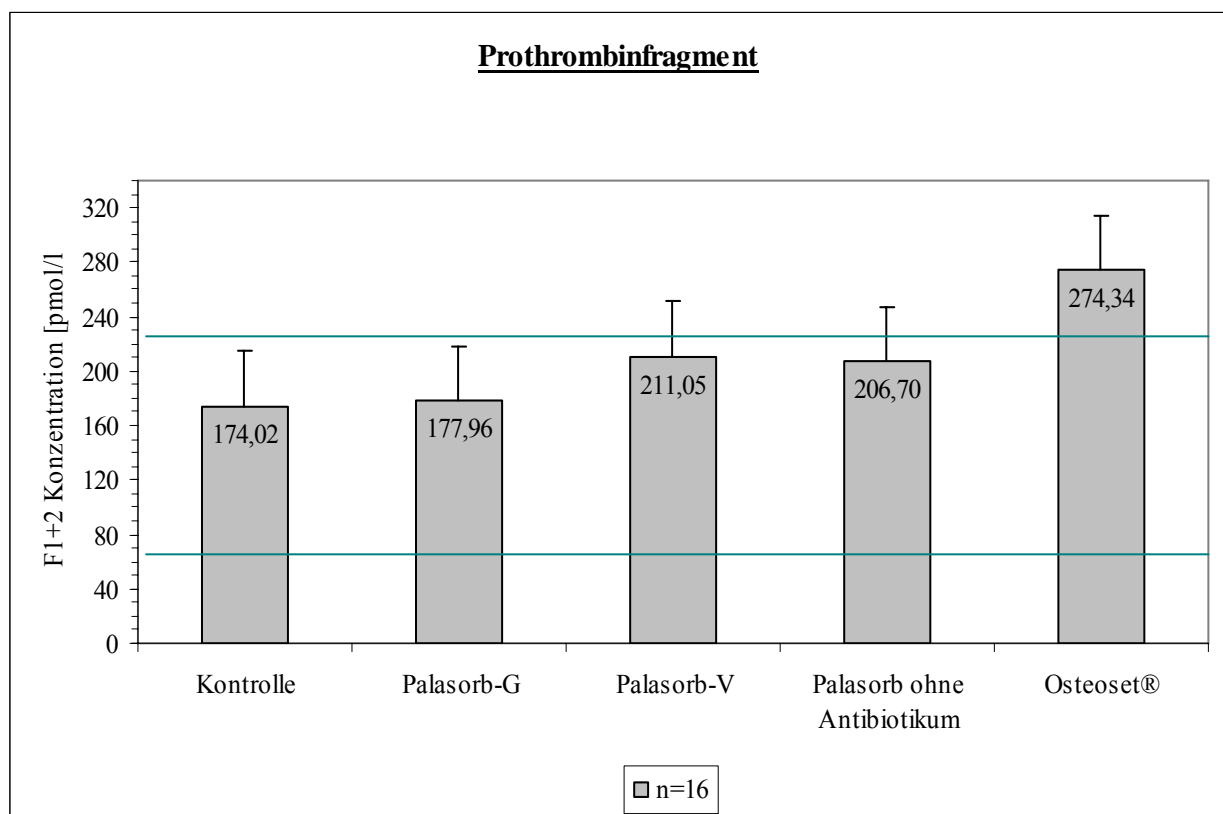


Abb. 103: Marker der aktivierten Gerinnung: Prothrombinfragment.

Ergebnis F_{1+2} -ELISA:

Die mit Osteoset® inkubierte Blutprobe zeigt mit 274,34 pmol/l die höchste F_{1+2} -Konzentration und liegt oberhalb des Referenzbereichs, während die Palasorb-Proben mit Werten zwischen 177,96 und 211,05 pmol/l unauffällig sind.

4.6.2.2 Faktor XIIa

Die Aktivierung des Faktors XII führt in der endogenen Gerinnungskaskade letztendlich über die Abspaltung des Fragments F_{1+2} zu der Überführung von Prothrombin in das aktive Thrombin, welches wiederum die Fibrinbildung aus Fibrinogen katalysiert.

Nachfolgende Graphik zeigt die Faktor-XIIa-Aktivität nach 8-minütiger Inkubation von humanem Blut zweier Probanden mit den entsprechenden Knochenersatzstoffen sowie zur Kontrolle eine nicht manipulierte Blutprobe. Der Referenzbereich liegt zwischen 14 und 27 u/l.

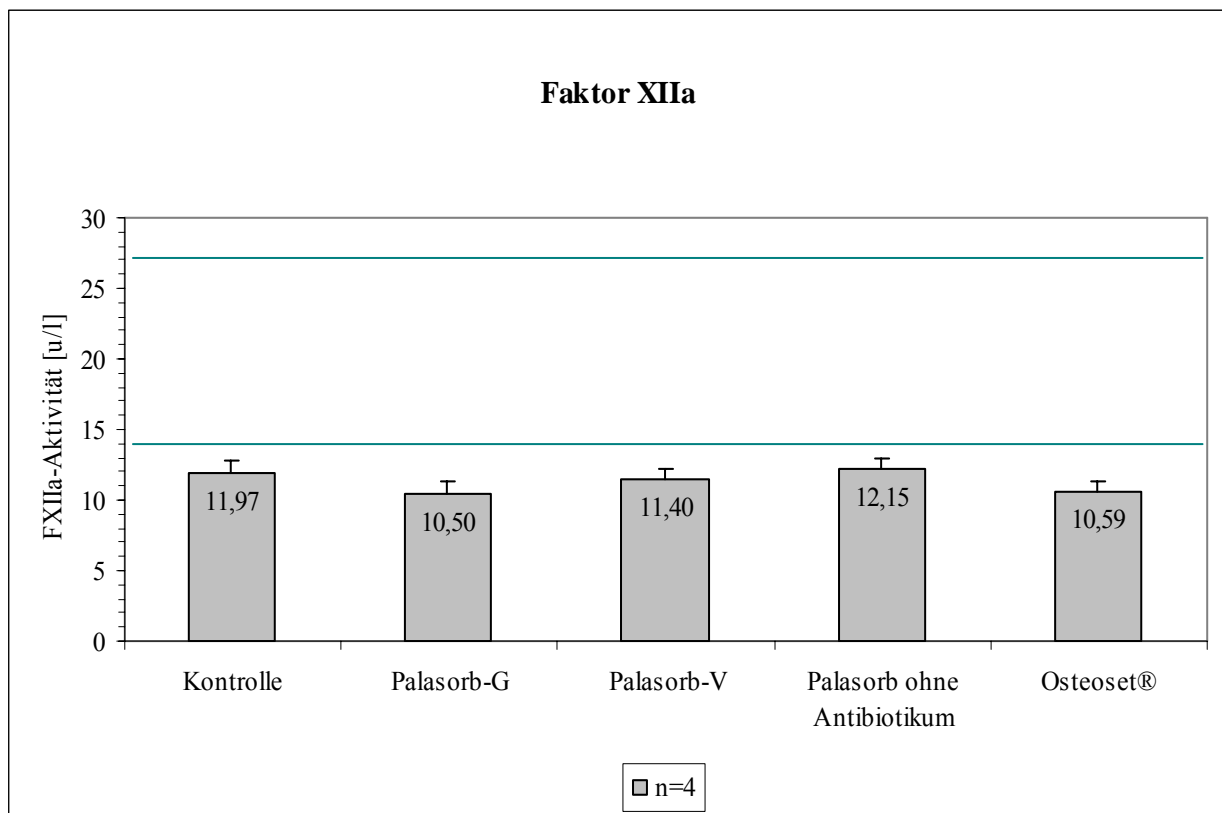


Abb. 104: Marker der aktivierten Gerinnung: FaktorXIIa.

Ergebnis FXIIa-like Activity Test:

Die FXIIa-Aktivität aller liegt mit Werten zwischen 10,5 und 12,15 u/l unterhalb des Referenzbereichs und ist somit unauffällig.

4.6.2.3 Complement C3-desArg

Mithilfe des Complement C3a-desArg ELISA (Firma Progen Biotechnik, Heidelberg) wird der Gehalt an C3a-desArg als stabile Form des kurzlebigen C3a im Plasma quantifiziert und somit Rückschlüsse auf die Gerinnungsaktivität ermöglicht.

Die nachfolgende Graphik zeigt die Complement C3a-desArg-Konzentration nach 8-minütiger Inkubation von humanem Blut mit den entsprechenden Knochenersatzstoffen sowie zur Kontrolle eine nicht manipulierte Blutprobe. Der Referenzbereich liegt zwischen 0 und 200 ng/ml.

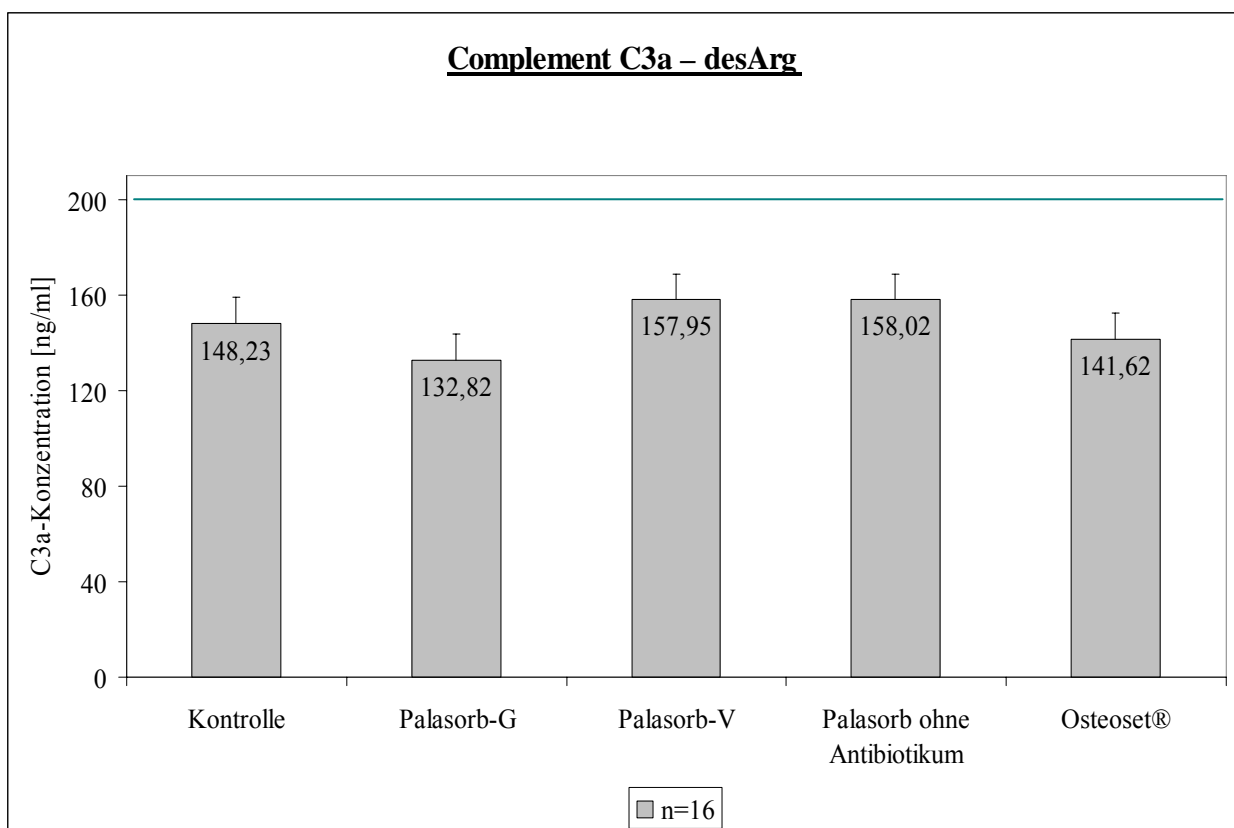


Abb. 105: Marker der aktivierten Gerinnung: Complement C3a-desArg.

Ergebnis Complement C3a-desArg-ELISA:

Die Complement C3a-desArg-Konzentration befindet sich bei allen Proben mit Werten zwischen 132,82 und 158,02 ng/ml im Referenzbereich.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methode

5.1.1 Tiermodell

Der Einsatz von Kaninchen zum Nachweis der pharmakologischen Wirkung und Unbedenklichkeit des neu entwickelten Kalziumsulfatträgers wurde bereits für vergleichbare Fragestellungen in der Literatur dokumentiert (Dahners und Funderburk 1987; Ljubovic und Nikulin 1956; Orsini et al. 2004). Es ist leicht in der Handhabung sowie in der Haltung, zusätzlich weist das Skelettsystem die Voraussetzung zur Implantation der notwendigen Menge und Größe der Formkörper auf. Es wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet, um geschlechtsspezifische Unterschiede auszuschließen.

Der Nachteil bei der Verwendung dieser Spezies ist die kutane Empfindlichkeit gegenüber Injektionen, insbesondere die der Antibiotika, und den damit verbundenen Hautnekrosen. Auch die Entfernung des Fells an der Gliedmaße erweist sich als schwierig. Ein zu zurückhaltendes Vorgehen bewirkt, dass die Haare nicht ausreichend entfernt werden können, im gegensätzlichen Falle zieht die sorgfältige Rasur oder Enthaarung Hautläsionen und Empfindlichkeitsreaktionen nach sich. Auch ist die Gefahr von einer Besiedlung mit einem Kaninchen-spezifischen Staphylokokken-Stamm nicht auszuschließen, die durch minimale Haut- und Schleimhautläsionen Zugang in den Organismus finden (Hermans et al. 2000; Hermans et al. 2003; Meulemans et al. 2007; Vancraeynest et al. 2004a; Vancraeynest et al. 2004b; Vershigora et al. 1986).

5.1.2 Operationsmethode

Die Implantation in die Tibia ist ebenfalls ein gängiges Verfahren (Orsini et al. 2004). Der Osteotomiedefekt wurde mithilfe einer wassergekühlten Diamant-Hohlfräse gesetzt, um einem thermischen Einfluss auf das Implantatlager entgegenzuwirken. Allerdings gestaltete sich das gleichzeitige Bohren sowie Kühlen für den Operateur als Herausforderung. Die Hautinzision wurde mittels Hautplastik lateral gesetzt, um eine direkte Manipulation des Tieres durch Nagen oder Lecken medial über dem tibialen Zugang zu vermeiden. Die

Platzierung der implantierten Formkörper unterlag durch die unterschiedliche Größe und den anatomischen Verhältnisse individuellen Schwankungen.

5.1.3 Arzneimittelträger

Verglichen wurden 3 auf Kalziumsulfat basierende Knochenersatzstoffe als Träger von Antibiotika. Osteoset[®], das bereits kommerziell erhältlich ist, besteht ausschließlich aus Kalziumsulfat in Form des α -Hemihydrates, während die zu untersuchenden Präparate als Kalziumsulfat-Dihydrat den Zusatz Tripalmitat und Kalziumkarbonat enthalten. Letzteres soll der in der Literatur beschriebenen pH-Absenkung im Implantationsgebiet durch die Degradation der Formkörper und den damit verbundenen Wundheilungsstörungen sowie osteolytischen Prozessen (Coetzee 1980) durch Abpufferung entgegenwirken. Ziel der Einarbeitung des Tripalmitats besteht in einer retardierten Freisetzung der Antibiotika Gentamicin sowie Vancomycin. Die Verwendung von Lipiden zur Beeinflussung der Freisetzungskinetik ist bereits in der Literatur dokumentiert (Radin et al. 1997). Weiterhin ist in dieser Vergleichsstudie nicht zu vernachlässigen, dass die Implantate der 3 Präparationen unterschiedliche Größen aufweisen und daher eine unterschiedliche Anzahl implantiert wurde. Dementsprechend kann die Platzierung innerhalb der Markhöhle anatomisch unterschiedlich ausfallen mit einem möglichen Einfluss auf die Prozesse der Degradation. Ebenfalls zu beachten ist, dass die Implantation lose in die Knochenhöhle erfolgte und kein definierter Defekt als Vergleichsmöglichkeit quantifiziert werden kann.

5.1.4 Analysemethoden

Die Tibiae wurden mittels unterschiedlicher Methoden untersucht. Während bereits intravital anhand der Röntgenbilder eine Aussage über die Resorptionsrate gemacht werden kann, dient die Analyse mittels μ -CT dem genauen Einblick in den Knochen. Beurteilt werden können Grad und Lokalisation von Resorption sowie Mineralisation. Während die 3-D-Konstruktionen eine Übersicht über die Vorgänge im Inneren des gesamten Knochens erlauben, besteht der wesentliche Nachteil in der eigenen Einflussnahme auf das Bild durch Einstellung der Schwarz-Weiß-Werte. Die 2-D-Bilder hingegen geben unverfälscht die Tatsachen wieder, sind allerdings in ihrer hohen Anzahl als Übersicht ungeeignet. Daher bietet sich die Kombination beider zur Analyse an. Aus wirtschaftlichen Gründen ist jeweils nur eine Schnittebene pro Präparat in die histologische Auswertung eingegangen. Der Schnitt

wurde sagittal gewählt, um möglichst viele Strukturen zu erfassen. Die Betrachtung ist vor allem qualitativ deskriptiv zu verstehen, ohne allerdings zu vernachlässigen, dass es eine Schnittebene höher oder tiefer bereits anders aussehen kann. Daher konzentrieren sich die histologischen Auswertungen insbesondere auf zelluläre Interaktionen mit den Implantaten sowie der Fragestellung nach der Osteogenese.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Biokompatibilität

Die Bewertung der Gewebeverträglichkeit erfolgte in engen Rahmen mittels klinischer sowie histologischer Befunde. Klinisch ausschlaggebend waren die Befundung der Implantationsstelle, die Gewichtsentwicklung, die Körpertemperatur sowie die Leukozytenwerte. Histologisch wurden insbesondere die Verträglichkeit von Osteoblasten und Osteozyten mit dem Implantatmaterial bewertet. Aufgrund der Infektionsrate ist die weitere Untersuchung der Biokompatibilität nur eingeschränkt möglich, da physiologische Vorgänge nur schwer von den pathologischen Prozessen abgrenzbar sind.

Klinisch

Nach Implantation der 3 unterschiedlichen Präparate konnte zu 83 % der Tiere in Fall von Osteoset[®], zu 50 % bei Palasorb-V und zu 33 % bei Palasorb-G eine Umfangsvermehrung im Bereich der Implantationsstelle beobachtet werden. Es wurden keine Proben aus diesen teils fluktuierenden, teils derben Schwellungen zur weiteren Analyse entnommen. Aufgrund der Sektion der Tiere aus der Pharmakokinetik-Gruppe konnte 1, 3 und 14 Tage nach der Implantation unabhängig vom Präparat und somit operationsbedingt eine ausgeprägte Hämatombildung beobachtet werden. Dieser Zustand wurde im weiteren Verlauf organisiert und fühlte sich derb an. Auch das Gewebe um die subkutanen, resorbierbaren Fäden zeigte sich verändert, teilweise verhärtet mit reaktiven Zubildungen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Umfangsvermehrungen im Zusammenhang mit der Hämatombildung und dessen Organisation sowie den resorptiven Vorgängen der Polylaktid-Fäden und der damit bekannten pH-Absenkung stehen. Die Gewichtsentwicklung unterlag insgesamt insbesondere nach der Operation sowie teilweise nach Applikation der Fluorochrome einer Abnahme, welches mit dem damit verbundenen Unbehagen der Tiere zu erklären ist. Temperatur sowie Gehalt an Leukozyten befanden sich stets innerhalb des Referenzbereichs.

Histologisch

Bei allen 3 Präparationen findet ab der 4. Woche unmittelbar auf der Implantatoberfläche eine Osteogenese mit vitalen Osteoblasten statt, Osteozyten mauern sich in Osteoidsäumen ein und bilden mineralisierten Knochen. In Resorptionslakunen sind aktive, mehrkernige Riesenzellen beim Abbau des Implantatmaterials zu beobachten. Diese zelluläre Anlagerung unmittelbar auf dem Implantatmaterial lässt darauf schließen, dass die Kalziumsulfat-Formulierungen keinen zytotoxischen Effekt haben und somit gewebeverträglich sind.

Bei einzelnen Tieren nachweisbare Keime haben zur Folge, dass diese sowie einwandernde Granulozyten proteolytische Enzyme freisetzen. Gewebe wie Knochenmark oder Trabekel degenerieren oder werden nekrotisch und anschließend zellulär abgebaut. Durch die Anhäufung an Material, das abtransportiert werden muss, degenerieren die phagozytär aktiven Zellen und hinterlassen zystische Vakuolen sowie unvollständig resorbiertes Material. Dies steht nicht im direkten Zusammenhang mit dem Implantatmaterial und sollte gesondert bewertet werden.

Zusammenfassung

Die Anlagerung von Osteoblasten auf der Oberfläche der Kalziumsulfat-Pellets wurde bereits von anderen Forschern dokumentiert (Blaha 1998; Kelly et al. 2001) und kann in dieser Studie bestätigt werden. Alle 3 Formulierungen weisen histologisch eine zelluläre Kompatibilität auf, indem sich Osteoblasten unmittelbar auf dem Material anlagern und Osteoid produzieren. Während Peltier histologisch eine Fremdkörperreaktion ausschließt (Peltier et al. 1957), schlussfolgern andere Forscher, dass die Dissolution in eine kalziumreiche Flüssigkeit für Entzündungsreaktionen verantwortlich ist (Coetzee 1980; Robinson et al. 1999). Klinisch bildete sich bei einigen Tieren eine Umfangsvermehrung über der Implantationsstelle, die im weiteren Verlauf derb wurde. Aufgrund der Sektion von Tieren mit einer kürzeren Überlebensdauer von 1, 3 und 14 Tagen, konnte eine deutliche Hämatombildung beobachtet werden, welches sich im weiteren Verlauf organisierte. Auch der Abbau der resorbierbaren Fäden im Bereich des Osteotomiedefekts führte zu geweblichen Reaktionen.

5.2.2 Biodegradation

In der Literatur sind sich die Forscher einig, dass Kalziumsulfat nach Implantation vollständig degradiert. Allerdings variieren nicht nur die Angaben über den Zeitraum der Degradation, sondern auch über die Abbaumechanismen. Bell vertritt die Ansicht, dass die rasche Resorption für die Knochenheilung förderlich ist (Bell 1964). Petruskevicius hingegen schlussfolgert in seinen Studien am Menschen, dass die Verwendung von Osteoset[®] für die Implantation nicht empfehlenswert ist, da der Zeitraum von 6 Wochen für die vollständige Resorption zu kurz sei. Das Knochenvolumen in der Kontrollgruppe zeigte sich zwischen 6 Wochen und 3 Monate größer als beim Einsatz von Osteoset[®]. Er räumt unter anderem die Möglichkeit ein, dass die Studien am Tier deswegen erfolgreicher seien, da diese vermutlich über schnellere Mechanismen der Heilung und des Remodelings verfügen als der Mensch. Um die Resorption zu verzögern, rät Petruskevicius zu einem Zusatz, wie z.B. Kalziumphosphat (Petruskevicius et al. 2002).

Gehalt an Kalzium und alkalischer Phosphatase

In einigen Studien wurde eine Erhöhung des Serum-Kalziumgehalts (Bahn 1966; Beeson 1981; Lillo und Peltier 1956; Ljubovic und Nikulin 1956) sowie der alkalischen Phosphatase (Lillo und Peltier 1956; Ljubovic und Nikulin 1956) berichtet. Die im Tierversuch ermittelte Erhöhung des Kalziums konnten Peltier sowie auch Coetzee in Studien an Menschen nicht bestätigen (Coetzee 1980; Peltier 1959). In unserer Versuchsreihe unterlag der Gehalt an Kalzium und alkalischer Phosphatase natürlichen Schwankungen und stand in keinerlei Zusammenhang mit der Implantation der Formkörper.

Zeitlicher Ablauf der Degradation

Folgende Degradationszeiten für Kalziumsulfat werden in der Literatur angegeben: 3–4 Wochen (Lebourg und Biou 1961), 4–10 Wochen (Geldmacher 1986), 6 Wochen (Petruskevicius et al. 2002), 5–7 Wochen (Bell 1964), 45–72 Tage (Lillo und Peltier 1956; Peltier et al. 1957), 8 Wochen (Tay et al. 1999), 2–4 Monate (Coetzee 1980) und 6 Monate (Kelly et al. 2001). Diese Unterschiede können zum einen durch die Applikationsform des Gipses erklärt werden. Beispielsweise verwendeten Geldmacher et al. eine Gipspaste, Peltier et al. hingegen Kalziumsulfat-Zylinder. Zusätzlich haben die Größe der Formkörper sowie deren Lokalisation einen entscheidenden Einfluss auf die Degradationsrate. Letztendlich kann die Bewertung durch Röntgenbilder (Lebourg und Biou 1961) nur einen einseitigen Einblick

geben und zusätzliche Untersuchungsmethoden, wie die Histologie (Lillo und Peltier 1956) oder CT (Petruskevicius et al. 2002), erfordern.

Die Resorptionszeiten für die in dieser Studie untersuchten Produkte unterscheiden sich deutlich voneinander. Die lediglich aus Kalziumsulfat bestehenden Osteoset[®]-Formkörper weisen bereits in der 4. Woche randständig sowie zentral deutliche Zeichen der Resorption auf, in der 6. Woche sind mehrheitlich nur noch Restanteile mittels μ -CT und Histologie zu erkennen und in der 8. Woche nur noch minimale Materialreste bei entsprechender histologischer Vergrößerung vorhanden. Die Palasorb-V-Implantate sind ab der 12. Woche röntgenologisch nicht mehr nachweisbar, während im μ -Computertomographen sowie in der Histologie Reste mit geringgradigen knochenspezifischen Aufbauvorgängen der Implantate zu beobachten sind, wie auch die Daten der polychromen Sequenzmarkierung belegen. Die Untersuchungen der Palasorb-G-Formkörper ergeben, dass in der 4. Woche noch ein deutlich röntgendichter Kern erkennbar ist. In der 6. Woche ist dieser nicht mehr vorhanden und die Implantate sind gleichmäßig in ihrer Röntgendichte reduziert. Bis zur 8. Woche ist die Resorption geringgradig vorangeschritten, bis zur 12. Woche wird diese nicht mehr gesteigert. Zusammenfassend sind die aus lediglich Kalziumsulfat bestehenden Osteoset[®]-Formkörper 6 Wochen nach Implantation röntgenologisch nicht mehr nachweisbar und in der 8. Woche nur noch minimale Reste histologisch zu erkennen. Die sehr kleinen, aber dafür zahlreichen Palasorb-V-Implantate sind ab der 12. Woche röntgenologisch nicht mehr nachweisbar, dafür in äußerst geringer Ausprägung noch mittels μ -CT und Histologie, während die großen Palasorb-G-Formkörper bis zur 6. Woche Vorgänge der Resorption aufweisen, die aber bis zur 12. Woche nicht mehr deutlich gesteigert werden.

Augenscheinlich hat auch in dieser Studie sowohl die Größe als auch die Zusammensetzung einen Einfluss auf die Degradationsrate. Kalziumsulfat allein degradiert schneller als die Gemische mit Tripalmitat und Kalziumkarbonat. Innerhalb letzt genannter Gruppe scheint die Größe der Implantate dann die entscheidende Rolle in dieser Fragestellung zu spielen, bei der die kleinen Palasorb-V-Implantate schneller resorbiert werden als die großen Palasorb-G-Pellets. Auch bestätigt die Untersuchungsmethode oben genannte Vermutung. Die alleinige Betrachtung von Röntgenbildern bescheinigt nicht die vollständige Degradation. Weiterhin muss in Betracht gezogen werden, dass die Dauer der Degradation sowohl von der Lokalisation der implantierten Kugeln wie in Radius (Peltier et al. 1957), Tibia (Blaha 1998), Femur (Blaha 1998) oder Ober- und Unterkiefer (Calhoun et al. 1963, 1965; Lebourg und

Biou 1961; McKee und Bailey 1984) als auch vom Model abhängt. Es gibt viele Studien, die an verschiedenen Tiermodellen, wie Hund (Calhoun et al. 1963, 1965; McKee und Bailey 1984; Peltier et al. 1957; Turner et al. 1999) oder Kaninchen (Lebourg und Biou 1961), untersucht sowie im klinischen Einsatz (Coetzee 1980; Kelly et al. 2001; Lebourg und Biou 1961; Petruskevicius et al. 2002) bewertet wurden.

Art der Degradation

Die Ergebnisse anderer Forscher betrachtend stellt sich die Frage, ob die Degradation durch zelluläre Resorption oder mittels einfacher Auflösung (Dissolution) verläuft. Bell wie auch Tay et al. vertreten die Ansicht, dass Kalziumsulfat durch den Prozess der Dissolution abgebaut wird (Bell 1964; Tay et al. 1999). Das würde die These von Bahn und Lebourg untermauern (Bahn 1966; Lebourg und Biou 1961), die die beschleunigte Knochenbildung durch der Bereitstellung von Kalziumionen erklären. Weiterhin erklärt Lebourg, dass die Kalziumionen zu einer pH-Absenkung führen und eine mögliche Ursache von Wundheilungsstörungen darstellen (Lebourg und Biou 1961). Walsh et al. schlussfolgern, dass die pH-Absenkung zu einer Demineralisierung des benachbarten Knochens und somit zu einer Freisetzung von BMP führt, welche wiederum die Knochenregeneration anregt (Walsh et al. 2003). Auch Sidqui et al. bemerken in ihrer Studie, dass die Aktivität von Osteoklasten durch einen sauren pH-Wert angeregt wird (Sidqui et al. 1995). Andere Autoren hingegen vertreten die Ansicht, dass Kalziumsulfat zellulär durch Phagozytose abgebaut wird. Peltier et al. erkennen unter dem Mikroskop den Abbau des Kalziumsulfats durch Osteoklasten (Peltier et al. 1957). Sidqui demonstriert deutlich in seinen In-vitro-Studien, dass Osteoklasten das Kalziumsulfat resorbieren und dabei tiefe Lakunen hinterlassen (Sidqui et al. 1995). Orsini et al. berichten in ihrer Studie von einer Kombination von sowohl durch Dissolution als auch durch Zell-vermittelte Degradation des Kalziumsulfats (Orsini et al. 2004).

Mittels der histologischen Bilder konnten in den Formkörpern aller 3 Formulierungen Resorptionslakunen als Zeichen der zellulären Degradation nachgewiesen werden. Bei entsprechender Vergrößerung wird durch das Vorhandensein von mehrkernigen Riesenzellen auf oder in dem Implantatmaterial auch der zelluläre Abbau der 3 Implantatmaterialien bestätigt. Ob es sich dabei um Osteoklasten handelt, müsste immunohistochemisch bestätigt werden. Bei nur einer Schlifffebene konnten nicht in jedem einzelnen Präparat Riesenzellen beim Abbau ermittelt werden, teilweise wurde die Interpretation durch pathologische Vorgänge erschwert. Letzteres ging nicht in die Bewertung der Degradation mit ein. In der für

jede Gruppe abschließend erstellten Tabelle wurde versucht, die Resorptionsvorgänge sowie Osteogenese durch die Skalierung und Feingraduierung semiquantitativ auszuwerten. Mit deren Addition kann vorsichtig eine Tendenz ermittelt werden. Ob Kalziumsulfat zusätzlich durch Dissolution abgebaut wird, kann in dieser Studie nicht bewertet werden.

5.2.3 Osteogenese

Der Begriff des osteogenetischen Potentials kann unterteilt werden in Osteoinduktion und Osteokonduktion.

Osteoinduktion

Die Fähigkeit zur Osteoinduktion wird Materialien zugesprochen, die in ektopischer Umgebung die Differenzierung zu knochenbildenden Zellen stimulieren und somit die Osteogenese, z.B. in Muskelgewebe, induzieren können (Urist 1965). Solche Materialien sollten im Besitz sogenannter Wachstumsfaktoren sein, wie z.B. der BMP-Familie (Blitch und Ricotta 1996; Stevenson 1999). Kalziumsulfat als Trägermaterial therapeutischer BMP-Präparationen wurde bereits untersucht (Yamazaki et al. 1988). In der Literatur wird angegeben, dass Kalziumsulfat nur in Kontakt mit Periost oder Endost zur Knochenbildung anregen kann (Bahn 1966; McKee und Bailey 1984; Peltier et al. 1957). In dieser Studie bestand ein Kontakt der Implantate zum Knochen, insbesondere zum Endost. Daher ist eine Beurteilung über das osteoinduktive Potential in ektopischer Umgebung ausgeschlossen.

Osteokonduktion

Kalziumsulfat gilt als Leitschiene zum Einwandern von Zellen und dem Einwachsen von Knochengewebe sowie als Platzhalter, damit der nach gründlichem Débridement entstandene „dead space“ weder durch Blutkoagula, die wiederum einen Nährboden für Bakterien darstellen noch durch Einwachsen von Bindegewebe aufgefüllt wird. Weiterhin zeigen Untersuchungen, dass Kalziumsulfat eine gewisse mechanische Stabilität durch Druckfestigkeit gewährleistet (Moore et al. 2001).

Die osteokonduktive Eigenschaft konnte von vielen Forschern bestätigt werden. Coetzee postuliert in seiner Studie an 110 Patienten mit knöchernen Defekten, dass jedes Molekül Kalziumsulfat durch ein Molekül Hydroxylapatit ersetzt wird (Coetzee 1980). Auch Beeson findet in seinen Studien nach 24 Wochen Resorption und Knochenbildung (Beeson 1981).

Turner et al. erkennen 6 Wochen nach der Operation dünne Trabekel zwischen den Formkörpern, nach 24 Wochen sind diese vollständig resorbiert und der Knochen an Volumen und histomorphologisch nicht mehr von dem nach Verwendung von Autograft zu unterscheiden (Turner et al. 1999).

In dieser Studie konnte das osteokonduktive Potential von Kalziumsulfat eindeutig nachgewiesen werden. Alle 3 Formulierungen zeigen in das Material einwandernde Osteoblasten bei der Osteoidsynthese sowie bereits eingemauerte Osteozyten in knöchernen Säumen unmittelbar auf dem Implantat sowie in Tiefen von Resorptionslakunen. Bei den Osteoset[®]-Formkörpern findet Osteogenese mit aktivem Osteoidsaum ab der 4. Woche unmittelbar auf der Implantatoberfläche statt. In der 6. und 8. Woche sind mit einer Ausnahme nur noch vereinzelt feine Knochenneubildungen in der Markhöhle vorhanden, von Präparaten der 12. Woche sind keine histologischen Schnitte angefertigt worden. Auch die Palasorb-V-Implantate weisen ab der 4. Woche post operationem Knochenbildung mit aktiven Osteoidsäumen unmittelbar auf dem Implantatmaterial auf. Ab der 12. Woche befinden sich nur noch vereinzelt feine Knochen trabekel isoliert oder assoziiert mit geringen Implantatresten im Markraum. Palasorb-G-Formkörper zeigen ebenfalls schon in der 4. Woche post operationem aktive Knochenbildung durch vitale Osteoblasten und -zyten unmittelbar auf der Implantatoberfläche oder in der Tiefe von Resorptionslakunen. Implantatanteile werden knöchern überbrückt oder verbunden. Auch bilden sich schon feine kortikale Knochenbrücken aus, die sich ab der 12. Woche deutlich verstärken.

Wie bereits unter dem Aspekt der Degradation beschrieben, wurde ebenfalls hinsichtlich der Osteogenese eine semiquantitative Auswertung zur Ermittlung einer Tendenz aufgestellt. Insbesondere im Fall von Osteoset[®] und Palasorb-V verschwinden die innerhalb von 4 Wochen gebildeten knöchernen Strukturen in den folgenden Zeiträumen gleichermaßen wie die Implantate. Lediglich Palasorb-G weist immer noch eine deutliche Knochenbildung auf. Um der Fragestellung des weiteren Verlaufes nachzugehen, läuft eine weitere Studie über die Implantation von Palasorb-G mit einer Überlebenszeit von 24 Wochen.

Durch die polychrome Sequenzmarkierung ist in der Kortikalis die Abfolge der subkutan applizierten Fluorochrome um die Osteone zu erkennen. Bewertet wurden aufgrund der röntgenologischen Ergebnisse die Osteoset[®]-Proben bereits nach 8 Wochen, die Palasorb-Formulierungen nach 12 Wochen. Diffuse Einlagerungen entstanden durch die

Chelat-Bindung mit dem Kalziumsulfat der Implantate. Osteogenetisch aktive Einlagerungen der Farbstoffe konnte man bei allen 3 Präparationen erkennen, es kommt offensichtlich zur Ossifikation. Allerdings sind die aktiven Auf- und Umbauvorgänge im Bereich des Knochenmarks als unspezifische Ossifikation in Implantatanteilen nicht vergleichbar mit den in der Kortikalis ablaufenden geordneten Vorgängen.

5.2.4 Kalziumsulfat als Wirkstoffträger

Der Einsatz lokaler Wirkstoffträger zur Behandlung und Prophylaxe von Knochendefekten und -infekten erfordert gewisse Ansprüche an Träger sowie verwendete Wirkstoffe. Kalziumsulfat ist kostengünstig, leicht zu sterilisieren, biokompatibel, biodegradierbar und zeigt eine brauchbare Freisetzung der eingearbeiteten Wirkstoffe. Es ist daher ideal als Trägermaterial einzusetzen. Bereits kombiniert wurden Wachstumsfaktoren auf Basis von BMP (Bai et al. 1996; Rosenblum et al. 1993; Yamazaki et al. 1988) sowie Antibiotika (Benoit et al. 1997; Bowyer und Cumberland 1994; Miclau et al. 1993; Mousset et al. 1995). Bai et al. erforschten BMP bestücktes Kalziumsulfat im klinischen Einsatz an 16 Patienten (Bai et al. 1996), Varlet untersuchte mit Erfolg unterschiedliche Kalzium-Antibiotika-Formulierungen an 13 von 15 Patienten (Varlet und Dauchy 1983). Bouillet behandelte 16 von 18 Patienten erfolgreich mit einem Amoxicillin-imprägniertem Kalziumsulfat (Bouillet et al. 1989).

Antibiotika-Freisetzung in vitro

Da die Anzahl der pro Tier implantierten Formkörper nach der Masse bestimmt wurde, unterscheiden sich die resultierenden Antibiotika-Konzentrationen. Palasorb-G und Palasorb-V befinden sich mit Gentamicin 5 bzw. 4,9 mg Vancomycin ungefähr in gleicher Größenordnung, während Osteoset[®] mit insgesamt 14,3 mg Tobramycin deutlich abweicht.

Während Tobramycin bereits am 1. Tag eine 91%ige Freisetzung zu verzeichnen hat und bereits nach dem 3. Tag komplett eluiert ist, beträgt die Freisetzung von Vancomycin am 1. Tag im Vergleich rund 77 % und am 3. Tag 93 %, erst nach 1 Woche ist keine Freisetzung mehr zu ermitteln. Gentamicin weist mit fast 53 % am 1. Tag, 82 % am 3. Tag und 92 % am 7. Tag die besten Freisetzungsergebnisse auf. Entscheidend für die Freisetzungskonzentrationen sind sowohl der Anfangsgehalt an Antibiotika als auch die Größe des Implantats und die Zusammensetzung. Während die Palasorb-G-Formkörper mit

einem Durchmesser von 6 mm die größten Arzneistoffträger sind, folgen die Osteoset[®]-Pellets mit 4,8 mm und Palasorb-V mit 3 mm. Palasorb-G weist somit die kleinste Oberfläche auf und zeigt die längste Freisetzungskinetik, gefolgt von Palasorb-V. Obwohl letztere eine größere Oberfläche als die Osteoset[®]-Implantate besitzen, sind die Osteoset[®]-Pellets bereits am 3. Tag komplett eluiert. Dies lässt sich durch die Zusammensetzung erklären. Osteoset[®] besteht lediglich aus Kalziumsulfat, die Palasorb-Formulierungen hingegen zusätzlich aus Tripalmitat. Bereits Radin und Mitarbeiter setzten Lipide in Kombination mit Hydroxylapatit zu einer retardieren Freisetzung ein (Radin et al. 1997).

Antibiotika-Freisetzung in vivo

Die Freisetzungskinetik der Antibiotika in vitro unterscheidet sich von der in traumatisiertem Gewebe. Eine gestörte Blutversorgung und organische Barrieren verhindern eine rasche Diffusion in das umliegende Gewebe. Ausschlaggebend ist, dass lokal hohe Antibiotika-Konzentrationen für mindestens 48 Stunden und systemisch keine toxischen Serumspiegel erreicht werden.

Tobramycin weist mit Werten zwischen 0,02 und 0,18 µg/ml die niedrigsten Serumwerte auf, gefolgt von Vancomycin mit 0,10–0,13 µg/ml und Gentamicin mit Werten von 0,41–0,58 µg/ml auf. Die Palasorb-Formulierungen zeigen keinen auffälligen Peak, während Osteoset[®] insbesondere 24 Stunden nach Implantation seinen höchsten Wert erreicht hat. Dies ist eventuell damit zu erklären, dass dieser entweder bereits in dem Zeitraum vor der 1. Blutabnahme gelegen hat oder dass die neue Rezeptur kombiniert mit verzögerten Resorptionsraten eine kontinuierliche Antibiotika-Abgabe verursacht. Dahners und Funderburk ermittelten 1 Stunde nach Implantation die höchsten Werte mit einer deutlichen Abnahme nach 8 Stunden (Dahners und Funderburk 1987).

Weiterhin auffällig ist, dass Osteoset[®] in der 3. Woche einen Anstieg zu verzeichnen hat, der in der 4. Woche wieder auf vorherige Werte abfällt. Da es sich allerdings um Mittelwerte handelt und sowohl der Wert nach 24 Stunden als auch in der 3. Woche eine deutliche Standardabweichung aufweist, sind die Ergebnisse bezüglich der Spitzenkonzentration sowie der Erhöhung in der 3. Woche vorsichtig zu interpretieren.

Insgesamt liegt der Serumgehalt der 3 Antibiotika deutlich unter den Werten, die bei systemischer Applikation toxische Wirkungen verursachen. Damit wird die These von

Dahners und Funderburk bestätigt, die zu dem Schluss kamen, dass trotz einer hohen Beladung von „Plaster of Paris“ mit Gentamicin (12 mg/kg) nur geringe Serumlevel von 4,3 µg/ml erreicht werden (Dahners und Funderburk 1987).

Antibiotikagehalt in der Tibia

In der Kortikalis werden in den ersten 24 Stunden mit Gentamicin 14,77 µg/g, Vancomycin 7,88 µg/g und Tobramycin 2,86 µg/g die höchsten Konzentrationen des jeweiligen Antibiotikums gemessen. Nach 3 Tagen sind die Werte abgefallen. Gentamicin führt mit 4,13 µg/g und zeigt damit noch therapeutische Spiegel. Nach 14 Tagen werden keine Gentamicin-Werte mehr gemessen und nur geringe Vancomycin-Konzentrationen von 0,4 µg/g und 0,88 µg/g Tobramycin. Nach 12 Wochen sind keine Spiegel mehr nachweisbar. In diesem Zusammenhang wären die Antibiotika-Konzentrationen in der Medulla von besonderem Interesse. Die ermittelten Daten sind nicht zu verwenden, da es nicht gelungen ist die Aminoglykoside aus der Medulla zu isolieren. Auch Untersuchungen mittels Inkubation der Proben mit Proteinase K inklusive Erwärmung waren nicht erfolgreich. Lediglich die Ermittlung der Werte von Vancomycin ist aussagekräftig. Mit 444,24 µg/g am 1. Tag, 304,31 µg/g am 3. Tag sowie 7,99 µg/g nach 14 Tagen weist Palasorb-V nach Implantation eine ausreichend hohe lokale antibiotische Versorgung auf.

Verwendete Antibiotika

Die im Knochen auftretenden Keime sind für die Wahl eines geeigneten Antibiotikums von großer Bedeutung. Der an Knocheninfektionen am häufigsten beteiligte Keim ist *Staphylococcus aureus*, gefolgt von Streptokokken und Pseudomonaden. Nach Taylor ist zu 33 % *Staphylococcus aureus* als einzig auslösender Keim für die Infektion verantwortlich, zu 16 % nur Koagulase-negative Staphylokokken und zu 51 % Mischinfektionen mit wiederum einer 83%igen Beteiligung der Staphylokokken (Taylor et al. 1990).

Gentamicin ist bereits erfolgreich in Tierexperimenten (Cornell et al. 1993; Dahners und Funderburk 1987) und in der Klinik für die lokale Behandlung eingesetzt worden (Ascherl et al. 1990; Klemm 1979). Es zeigt eine gute Wirksamkeit gegenüber gramnegativen Keimen sowie *Staphylococcus aureus*. Außerdem weist es eine gute Thermostabilität bei Körpertemperatur (Mousset et al. 1995), Polymerisation von PMMA und Sterilisation auf.

Im Vergleich zu Aminoglykosiden zeigt das Glykopeptid Vancomycin hingegen eine geringere Thermostabilität und ist daher für Formulierungen mit Knochenzement aufgrund verbundener Hitzeentwicklung ungeeignet. Vancomycin ist derzeit ein Reserveantibiotika gegen MRSA und zeigt Wirksamkeit gegen *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* sowie Enterokokken. Allerdings verlangt das zunehmende Auftreten weltweiter Multiresistenzen den Einsatz alternativer Antibiotika.

5.2.5 Knocheninfektionen

Intrazellulärer *Staphylococcus aureus*

Bei den operierten Tieren wurden Knocheninfekte festgestellt. Körpertemperatur und Leukozyten-Werte lagen stets innerhalb des Referenzbereichs. Die Tiere befanden sich in einem guten Allgemeinzustand und waren klinisch unauffällig. Die in der Literatur je nach Verlauf akut oder chronisch angegebenen Symptome, wie Schmerzen, Eiterung, Fistelbildung, Bewegungseinschränkung, erhöhte Entzündungsparameter sowie Körpertemperatur (Schwameis et al. 1996), konnten nicht belegt werden. Trotzdem konnte histologisch in einem hohen Anteil der Proben pathologische Vorgänge innerhalb des Knochens dokumentiert werden, teilweise wurden Bakterien gefunden. Dabei muss erwähnt werden, dass eine Färbung entwickelt und angewandt wurde, die einen differenzierteren Blick auf Vorgänge und Zellen gewähren ließ, welche bei gängiger Methode nicht darzustellen sind.

Wie schon bei der Diskussion des Tiermodells erwähnt, erwies es sich als schwierig, die Gliedmaße in angebrachter Weise zu scheren. Bei zurückhaltendem Vorgehen wurden nicht alle Haare erfasst, bei zu forscher Rasur wurde die Haut erheblich verletzt. Nach Bencini et al. verbleiben trotz gründlicher Desinfektion bis zu 20 % der Standortflora in Haarfollikeln und Talgdrüsen (Bencini et al. 1991). Mithilfe einer Hautplastik sollte die inzisierte Haut nicht unmittelbar über den knöchernen Zugang liegen, damit Bakterien nicht durch Lecken oder Knabbern in den Knochen eindringen. Wurde zusätzlich ein Halskragen verwendet, hörten Tiere oft auf zu fressen und verwehrlosten aufgrund mangelnder Fellpflege augenscheinlich. Weiterhin zeigten sich Kaninchen gegenüber der Injektionen äußerst sensibel und entwickelten teilweise großflächige Hautnekrosen.

Ein direkter Zusammenhang von Ursache und Wirkung konnte nicht ermittelt werden. In der Literatur wird von Kaninchen-spezifischen Staphylokokken-Stämmen berichtet, die bereits

durch kleine Haut- und/oder Schleimhautläsionen eindringen können (Hermans et al. 2000; Hermans et al. 2003; Meulemans et al. 2007; Vancraeynest et al. 2004a; Vancraeynest et al. 2004b; Vershigora et al. 1986). Die in dieser Studie verwendeten Tiere wurden von der betreffenden Zuchtanstalt zuvor nicht auf Staphylokokken untersucht. Da die Formkörper mit Antibiotika imprägniert sind, muss die Besiedlung zu einem Zeitpunkt nach kompletter Elution der Antibiotika erfolgt sein.

Interessant sind in diesem Zusammenhang die Forschungsergebnisse von Garzoni (Garzoni und Kelley 2009). Er deklariert die besondere Anpassungsfähigkeit von Staphylokokken, die immer wieder zu einer Vielfalt und Schwere von Infektionen führt. Bekannt sind Mechanismen, z.B. durch Bildung von Biofilmen, der Immunantwort zu trotzen. Die Fähigkeit an Proteinen zu binden wie auch andere Virulenzfaktoren erhöhen seine Pathogenität. Während *Staphylococcus aureus* genauso kommensalisch auf der Haut leben kann, ist er bei Penetration des Gewebes mit Erreichen des Blutstroms in der Lage, gefährdete und insbesondere Implantat-assoziierte Infektionen auszulösen.

Zu den oben genannten Pathogenitätsfaktoren gesellt sich hinzu, dass *Staphylococcus aureus* auch in der Lage ist, intrazellulär zu überleben. Nach Eindringen in die Zellen verfällt der Keim in eine Art Ruhepause und kann sich dann nach Wochen erneut ausbreiten. Neben Untersuchungen mit Endothel-, Epithelzellen, Fibroblasten und Osteoblasten berichten weitere Studien von dem Überleben in Phagozyten, wie Makrophagen und Granulozyten. Durch diese Strategie ist es dem Keim möglich, dem Immunsystem sowie der Antibiose zu entgehen, um zu einem geeigneten Moment einen Auslöser einer Reinfektion darzustellen. Schwierig gestaltet sich die Behandlung intrazellulär lebendem *Staphylococcus aureus* mit einem Antibiotikum. Es muss intrazellulär wirksam sein und darf nicht zur Entwicklung von Resistenzen führen, wie z.B. bei der Monotherapie mit Rifampicin. Anzumerken ist, dass Rifampicin als einziges bisher zellgängiges Antibiotikum die Zellmembran passieren kann.

Die weitere Erforschung des intrazellulären Keimes sowie Behandlung mit einem wirksamen Antibiotikum sollten Kernpunkt weiterer Studien sein. Gleichzeitig ist zu bedenken, ob sich das Kaninchen wegen seiner Empfindlichkeit gegenüber Injektionen sowie der Kaninchen-spezifischen Staphylokokken-Stämme als Model für derartige Studien eignet.

5.2.6 Der Einfluss der Kalziumsulfatträger auf die Gerinnung

Bei der Inkubation des Blutes mit den verschiedenen Knochenersatzstoffen stellt sich die Frage, ob die Gerinnung durch den Oberflächenkontakt und/oder durch die Zusammensetzung aus Kalzium beschleunigt wird. Eine oberflächeninduzierte Gerinnung wird durch den Faktor XIIa ausgelöst, der seinerseits Einfluss auf das Komplementsystem wie auch die Fibrinolyse hat, wobei eine Aktivierung des Komplementsystems mit dem Marker C3a unerwünscht ist. In der Gerinnungsanalytik ist die Rekalzifizierungszeit eine gängige Methode und auch hier kann die Gefahr durch Kalzium die Gerinnung zu beschleunigen bestehen. Die vorliegenden Daten belegen nun, dass bei allen Palasorb-Präparationen weder die Globalmethode noch die einzelnen Marker beschleunigt bzw. erhöht sind. Es ist also davon auszugehen, dass Palasorb-G und Palasorb-V keine unerwünschten thrombogenen Eigenschaften aufweisen. Bei denen mit Osteoset[®] inkubierten Proben wurde eine beschleunigte Gerinnung festgestellt, bestätigt durch einen höheren F_{1+2} -Wert, der die gesteigerte Thrombinbildung anzeigt. Jedoch ist gleichzeitig keine Erhöhung der FXIIa-Aktivität zu messen. Die beobachtete Beschleunigung der plasmatischen Gerinnung könnte daher nicht durch Oberflächenwirkung, sondern durch verfügbare Kalzium-Ionen der Osteoset[®]-Präparation bedingt sein. Diese Befunde müssten durch den Nachweis von löslichem Kalzium für dieses Präparat bestätigt werden.

Complement C3-desArg

Das Komplementsystem umfasst mehr als 30 Plasmaproteine, die gelöst oder zellgebunden im Blutplasma der Abwehr von Mikroorganismen dienen. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Opsonierung von Oberflächen der Krankheitserreger, um sie somit für die Phagozytose zu markieren. Über verschiedene Möglichkeiten der Komplementaktivierung entstehen C3-Konvertasen, die C3 in C3a und C3b spalten. Als Anaphylatoxin kann C3a insbesondere Spasmen glatter Muskulatur, die Erhöhung der Permeabilität von Kapillaren sowie die Chemotaxis von Leukozyten bewirken. Es wurde daher der Plasmagehalt von C3a gemessen, da die Entstehung von Anaphylatoxinen auch durch Plasmin und Kallikrein ausgelöst werden kann. Kallikrein spielt eine wichtige Rolle in der endogenen Gerinnungskaskade und beschleunigt die Aktivierung des Faktor XII. Plasmin wird durch Abspaltung aus der inaktiven Vorstufe Plasminogen gebildet und katalysiert die Fibrinolyse. Die gemessenen Werte zeigen, dass alle 3 untersuchten Formkörper unabhängig vom Gehalt der unterschiedlichen Antibiotika sowie der verschiedenen Formulierungen der Kalziumsulfatträger keinen Einfluss auf die Aktivierung des Komplementsystems aufweisen.

5.3 Schlussbetrachtung und Ausblick

Die neu konzipierten Formulierungen aus Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat und Tripalmitat zeigten im Vergleich zum reinen Kalziumsulfat eine retardierte Freisetzung des Antibiotikums sowie eine verzögerte Resorption. Als Arzneimittelträger wies insbesondere Palasorb-G in den Elutionsuntersuchungen eine retardierte Freisetzung des Gentamicins bis zum 10. Tag auf, der Gehalt in der Kortikalis befand sich mit 4,13 µg/g am 3. Tag noch im therapeutischen Bereich. Da in diesem Zusammenhang die Antibiotika-Konzentrationen in der Medulla von nicht unerheblichem Interesse sind, sollten die Untersuchungen zur Isolierung von Aminoglykosiden aus Knochen mit neuen Methoden durchgeführt werden, um die lokalen Konzentrationen eindeutig zu ermitteln.

Weiterhin ermöglichten insbesondere die Palasorb-G-Formkörper als osteokonduktive Matrix das Einwachsen von Knochengewebe sogar noch nach 3 Monaten, während die Palasorb-V-Implantate nach 12 Wochen und die Osteoset[®]-Formkörper nach 6 Wochen resorbiert wurden und auch die initial Implantat-assoziierten Knochenneubildungen nicht mehr vorhanden waren. Um den weiteren Verlauf des osteogenetischen Potentials der Palasorb-G-Implantate zu verfolgen und zu bewerten, läuft derzeit eine weitere Studie mit einem Zeitrahmen von 24 Wochen.

Ein resorbierbarer Knochenersatzstoff als Träger von Arzneimitteln, der sowohl Menge und Qualität des neu gebildeten Knochens verbessert als auch die Knochenheilung beschleunigt, ist von großem volkswirtschaftlichem Nutzen. Therapiekosten aus stationärer Behandlung wie auch weitere Folgekosten könnten drastisch gesenkt werden. In der Prävention sowie Behandlung von Osteomyelitiden ist ein antiinfektiver Schutz des Implantatlagers ohne systemische Belastung für die betroffenen Patienten von entscheidender Bedeutung.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Untersuchungen bestand in der Bewertung der Biokompatibilität und Degradation neu formulierter Kalziumsulfat-Präparationen hinsichtlich ihres osteogenetischen Potentials nach Implantation in die Tibia von Kaninchen. Des Weiteren sollte die Pharmakokinetik der eingearbeiteten Antibiotika in vitro, in vivo sowie die lokale Konzentration im Knochen ermittelt und die Kalziumsulfat-Präparationen hinsichtlich ihrer Eignung als Arzneimittelträger bewertet werden. Da Kalzium ein wesentlicher Bestandteil in Gerinnungsabläufen darstellt, wurde der mögliche Einfluss der Kalziumsulfat-Implantate auf die Gerinnung durch roTEG und mittels Analyse von Markern der aktivierten Gerinnung untersucht.

Für die Studie wurden Kaninchen eingesetzt und das folgende operative Verfahren gewählt: Medial wurde der Markraum der Tibia mittels Diamant-Hohlfräse eröffnet und aufgrund vergleichbarer Masse eine entsprechende Anzahl der 3 Präparate Palasorb-G (2 Stk.), Palasorb-V (14 Stk.) bzw. Osteoset[®] (5 Stk.) implantiert. Hinsichtlich der Verwendung als Knochenersatzmaterial wurden mittels Röntgenbefunde, μ -Computertomographie und Histologie der Verlauf nach 4 Wochen, 6 Wochen, 8 Wochen und 12 Wochen dokumentiert und nach Kriterien der Gewebeerträglichkeit, Degradation sowie Osteogenese bewertet. Die Pharmakokinetik der eingearbeiteten Antibiotika wurden anhand von Elutionsstudien, Ermittlung der Serumwerte nach 24, 48, 72 Stunden und nach 1, 2, 3 und 4 Wochen sowie anhand der Bestimmung der lokalen Knochenkonzentrationen untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass hinsichtlich der Biokompatibilität klinisch keine negativen Auswirkungen beobachtet werden konnten. Histologisch lagerten sich Zellen unmittelbar den Materialien an, wodurch ein zytotoxischer Effekt ausgeschlossen und auf eine Gewebeerträglichkeit geschlossen werden kann.

Alle 3 Kalziumsulfat-Formulierungen zeigten bereits nach 4 Wochen Knochenbildung auf dem Implantatmaterial. Osteoblasten hatten sich unmittelbar angelagert und Osteoid produziert, Osteozyten sich bereits in mineralisierten Knochen eingemauert. Während die Osteoset[®]-Implantate schon nach 4 Wochen deutliche Zeichen der Degradation zeigten und in der 6.–8. Woche nur noch Reste mit geringer Knochenbildung mittels Histologie erkennbar waren, befanden sich die Palasorb-V-Implantate erst in der 12. Woche in einem

vergleichbaren Stadium. Hingegen waren die Formkörper von Palasorb-G auch nach 12 Wochen noch vorhanden und wiesen eine deutlich Implantat-assoziierte Knochenneubildung auf. Alle 3 Präparationen zeigten Riesenzellen beim Implantatabbau auf der Materialoberfläche sowie in der Tiefe von Resorptionslakunen.

In den Elutionsstudien zeigte Palasorb-G mit 53 % am 1. Tag, 82 % am 3. Tag und 94 % am 10. Tag die beste Verfügbarkeit des Antibiotikums. Osteoset[®] wies bereits nach dem 3. Tag und Palasorb-V nach dem 7. Tag nur noch Spuren der Antibiotika auf. Die Serumspiegel befanden sich bei allen 3 Präparationen im gesamten Versuchszeitraum von 24 Stunden bis einschließlich 4 Wochen in subtoxischen Konzentrationen. Hinsichtlich der Antibiotika-Konzentration im Knochen wurden die Werte in der Medulla sowie Kortikalis getrennt ermittelt. Insbesondere Palasorb-G zeigte kortikal therapeutische Gentamicin-Spiegel bis zum 3. Tag. Da die Isolierung der Aminoglykoside aus der Medulla mit labortechnischen Schwierigkeiten verbunden war, konnte nur Vancomycin nach Implantation von Palasorb-V ermittelt werden. Diese Werte wiesen mit 444 µg/g am 1. Tag, 304 µg/g am 3. Tag sowie 8 µg/g am 14. Tag hohe therapeutische Spiegel auf.

Die Palasorb-Formulierungen zeigten keinerlei Einfluss auf eine Aktivierung der Blutgerinnung, bei Osteoset[®] wurde eine Beschleunigung der plasmatischen Gerinnung beobachtet, die nicht durch Kontaktaktivierung verursacht wurde.

Hinsichtlich der Eignung als Knochenersatzmaterial sowie als Arzneimittelträger zeigt sich die neue Formulierung, insbesondere die Palasorb-G-Präparation, vielversprechend. In der Elutionsstudie weist Palasorb-G eine retardierte Freisetzungskinetik auf und bietet in der Kortikalis bis zum 3. Tag therapeutische Spiegel ohne systemisch toxische Konzentrationen zu erreichen. Das Material ist biokompatibel, zeigt eine positive Degradationsrate und kann somit als osteokonduktiver Platzhalter die Knochenheilung unterstützen und die mechanische Stabilität verbessern.

6.1 Summary

Aim of this study was the evaluation of biocompatibility and degradation of newly formulated calcium sulphate preparations concerning to their osteogenetic properties following implantation in tibia of rabbits. In order to investigate their suitability as local drug delivery system pharmacokinetics of incorporated antibiotics were analysed by in-vitro and in-vivo studies and the resulting concentration in medulla and cortical bone. As calcium plays a main role in coagulation, influence of the implants consisting of calcium sulphate was evaluated by overall coagulations assays and analysis of coagulation markers.

For the experimental study with rabbits operation procedure as follows were chosen. According to their mass appropriate quantity of calcium sulphate beads named Palasorb-G (2 pcs.), Palasorb-V (14 pcs.) and Osteoset[®] (5 pcs.) were implanted in medial tibia. Their use as bone graft substitute was examined by x-ray, μ -computertomography and histology after 4, 6, 8 and 12 weeks including evaluation of compatibility, degradation and osteogenetic potential. Questions concerning pharmacokinetics of incorporated antibiotics were analysed by elution studies, evaluation of serum concentration after 24, 48, 72 hours and 1, 2, 3 and 4 weeks as well as resulting local bone concentration.

Regarding beads' compatibility no adverse reaction was observed in a clinical manner. Histology showed vital cells attached directly to the implanted materials, no potential cytotoxic effect of implanted material was detected.

All calcium sulphate preparations demonstrated osteogenesis associated to implanted material. Osteoblasts directly attached on the implant surface and revealed osteoid production whereas osteocysts were found in newly mineralised bone. Osteoset[®] implants were subject of quick degradation within 4 weeks, after 6-8 weeks there were only minor remnant with little osteogenesis demonstrated by histological investigations. Palasorb-V implants revealed similar degradation within 12 weeks. In contrast Palasorb-G implants were still detectable after 12 weeks and showed implant-associated osteogenesis. In all of these preparations phagocytes were found during implant degradation on surface and inside of resorption lacunae.

Due to elution studies Palasorb-G demonstrated a complete availability of the incorporated gentamicin releasing 53 % on 1st day, 82 % on day 3 and 94 % on 10th day. Tobramycin of Osteoset[®] was eluted within 3 and vancomycin within 7 days from Palasorb-V formulation. Serum concentrations of the various antibiotics were tested in a time frame of 24 hours until 4 weeks with antibiotic concentrations far below subtoxic levels. Content of antibiotics were investigated separately in medulla and cortical bone. Palasorb-G showed therapeutic Gentamicin level until 3rd day. Determination of aminoglycosides from medulla was associated with some laboratory problems. Vancomycin was detectable demonstrating therapeutic levels of 444 µg/g on 1st day, 304µg/g on 3rd day and 8µg/g on day 14.

There was no induction of coagulation in case of Palasorb formulations, the investigated Osteoset[®] beads showed accelerated coagulation. None of analysed calcium sulphate preparations triggered contact activation.

Palasorb-G provides promising properties concerning its use as drug delivery system for gentamicin revealing high cortical levels. This material demonstrated excellent biocompatibility may support as osteoconductive scaffold bone healing and improves mechanical stability.

7 Literaturverzeichnis

Allababidi, S. and Shah, J.C. (1998)

Efficacy and pharmacokinetics of site-specific cefazolin delivery using biodegradable implants in the prevention of post-operative wound infections.

Pharm Res **15**, 325-333.

Ambrose, C.G., Gogola, G.R., Clyburn, T.A., Raymond, A.K., Peng, A.S. and Mikos, A.G. (2003)

Antibiotic microspheres: preliminary testing for potential treatment of osteomyelitis.

Clin Orthop Relat Res, 279-285.

Anwar, H., Strap, J.L. and Costerton, J.W. (1992)

Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy.

Antimicrob Agents Chemother **36**, 1347-1351.

Ascherl, R., Stemberg, A., Lechner, F. und Blümel, G. (1990)

[Local treatment of infection with collagen gentamicin].

Aktuelle Probl Chir Orthop **34**, 85-93.

Ascherl, R., Stemberger, A., Lechner, F., Plaumann, L., Rupp, G., Machka, K., Erhardt, W., Sorg, K.H. und Blümel, G. (1986)

[Treatment of chronic osteomyelitis with a collagen-antibiotic compound--preliminary report].

Unfallchirurgie **12**, 125-127.

Bahn, S.L. (1966)

Plaster: a bone substitute.

Oral Surg Oral Med Oral Pathol **21**, 672-681.

Bai, M.H., Liu, X.Y., Ge, B.F., Yallg, C. und Chen, D.A. (1996)

An implant of a composite of bovine bone morphogenetic protein and plaster of paris for treatment of femoral shaft nonunions.

Int Surg **81**, 390-392.

Baro, M., Sánchez, E., Delgado, A., Perera, A. und Evora, C. (2002)

In vitro-in vivo characterization of gentamicin bone implants.

J Control Release **83**, 353-364.

Beeson, W.H. (1981)

Plaster of paris as an alloplastic implant in the frontal sinus.

Arch Otolaryngol **107**, 664-669.

Belcarz, A., Ginalska, G., Zalewska, J., Rzeski, W., Slósarczyk, A., Kowalczyk, D., Godlewski, P. und Niedzwiadek, J. (2009)

Covalent coating of hydroxyapatite by keratin stabilizes gentamicin release.

J Biomed Mater Res B Appl Biomater **89**, 102-113.

- Bell, W.H. (1964)
Resorption characteristics of bone and bone substitutes.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol **17**, 650-657.
- Bencini, P.L., Galimberti, M., Signorini, M. und Crosti, C. (1991)
Antibiotic prophylaxis of wound infections in skin surgery.
Arch Dermatol **127**, 1357-1360.
- Benoit, M.A., Mousset, B., Delloye, C., Bouillet, R. und Gillard, J. (1997)
Antibiotic-loaded plaster of Paris implants coated with poly lactide-co-glycolide as a controlled release delivery system for the treatment of bone infections.
Int Orthop **21**, 403-408.
- Blaha, J.D. (1998)
Calcium sulfate bone-void filler.
Orthopedics **21**, 1017-1019.
- Blitch, E.L. and Ricotta, P.J. (1996)
Introduction to bone grafting.
J Foot Ankle Surg **35**, 458-462.
- Bonfiglio, M. und Jeter, W.S. (1972)
Immunological responses to bone.
Clin Orthop Relat Res **87**, 19-27.
- Bos, G.D., Goldberg, V.M., Zika, J.M., Heiple, K.G. und Powell, A.E. (1983)
Immune responses of rats to frozen bone allografts.
J Bone Joint Surg Am **65**, 239-246.
- Bouillet, R., Bouillet, B., Kadima, N. und Gillard, J. (1989)
[Treatment of chronic osteomyelitis in Africa with plaster implants impregnated with antibiotics].
Acta Orthop Belg **55**, 1-11.
- Bowyer, G.W. und Cumberland, N. (1994)
Antibiotic release from impregnated pellets and beads.
J Trauma **36**, 331-335.
- Boxma, H., Broekhuizen, T., Patka, P. und Oosting, H. (1996)
Randomised controlled trial of single-dose antibiotic prophylaxis in surgical treatment of closed fractures: the Dutch Trauma Trial.
Lancet **347**, 1133-1137.
- Buchholz, H.W., Elson, R.A., Engelbrecht, E., Lodenkämper, H., Röttger, J. und Siegel, A. (1981)
Management of deep infection of total hip replacement.
J Bone Joint Surg Br **63-B**, 342-353.
- Buchholz, H.W. und Engelbrecht, H. (1970)
[Depot effects of various antibiotics mixed with Palacos resins].
Chirurg **41**, 511-515.

- Bucholz, R.W. (2002)
Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes.
Clin Orthop Relat Res, 44-52.
- Buranapanitkit, B., Srinilta, V., Ingviga, N., Oungbho, K., Geater, A. und Ovatlarnporn, C. (2004)
The efficacy of a hydroxyapatite composite as a biodegradable antibiotic delivery system.
Clin Orthop Relat Res, 244-252.
- Calhoun, J.H. und Mader, J.T. (1989)
Antibiotic beads in the management of surgical infections.
Am J Surg **157**, 443-449.
- Calhoun, J.H. und Mader, J.T. (1997)
Treatment of osteomyelitis with a biodegradable antibiotic implant.
Clin Orthop Relat Res, 206-214.
- Calhoun, N.R., Greene, G.W., Jr. und Blackledge, G.T. (1963)
Effects of Plaster of Paris Implants on Osteogenesis in the Mandible of Dogs.
J Dent Res **42**, 1244.
- Calhoun, N.R., Greene, G.W., Jr. und Blackledge, G.T. (1965)
Plaster: a bone substitute in the mandible of dogs.
J Dent Res **44**, 940-946.
- Carek, P.J., Dickerson, L.M. und Sack, J.L. (2001)
Diagnosis and management of osteomyelitis.
Am Fam Physician **63**, 2413-2420.
- Carlson, D.A. und Dobozi, W.R. (1994)
Hematogenous Salmonella typhi osteomyelitis of the radius. A case report.
Clin Orthop Relat Res, 187-191.
- Characklis, W.G. und James, D.B.I.B. (2009)
Bioengineering Report. Fouling biofilm development: a process analysis. *Biotechnol Bioeng.*, Vol. XXIII, Pp. 1923-60 (1981).
Biotechnol Bioeng **102**, 309, 310-347.
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bisno, A.L. und Beachey, E.H. (1983)
Experimental foreign body infections in mice challenged with slime-producing Staphylococcus epidermidis. *Infect Immun* **40**, 407-410.
- Cierny, G., 3rd und Mader, J.T. (1987)
Approach to adult osteomyelitis.
Orthop Rev **16**, 259-270.
- Cierny, G., 3rd, Mader, J.T. und Penninck, J.J. (2003)
A clinical staging system for adult osteomyelitis.
Clin Orthop Relat Res, 7-24.

- Coetzee, A.S. (1980)
Regeneration of bone in the presence of calcium sulfate.
Arch Otolaryngol **106**, 405-409.
- Cornell, C.N., Tyndall, D., Waller, S., Lane, J.M. und Brause, B.D. (1993)
Treatment of experimental osteomyelitis with antibiotic-impregnated bone graft substitute.
J Orthop Res **11**, 619-626.
- Costantino, P.D. und Friedman, C.D. (1994)
Synthetic bone graft substitutes.
Otolaryngol Clin North Am **27**, 1037-1074.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R. und Lappin-Scott, H.M. (1995)
Microbial biofilms.
Annu Rev Microbiol **49**, 711-745.
- Cypher, T.J. und Grossman, J.P. (1996)
Biological principles of bone graft healing.
J Foot Ankle Surg **35**, 413-417.
- Dahners, L.E. und Funderburk, C.H. (1987)
Gentamicin-loaded plaster of Paris as a treatment of experimental osteomyelitis in rabbits.
Clin Orthop Relat Res, 278-282.
- Damien, C.J. und Parsons, J.R. (1991)
Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications.
J Appl Biomater **2**, 187-208.
- De Bruijn, J.D., Bovell, Y.P. und van Blitterswijk, C.A. (1994)
Structural arrangements at the interface between plasma sprayed calcium phosphates and bone.
Biomaterials **15**, 543-550.
- Diez-Pena, E., Frutos, G., Frutos, P. und Barrales-Rienda, J.M. (2002)
Gentamicin sulphate release from a modified commercial acrylic surgical radiopaque bone cement. I. Influence of the gentamicin concentration on the release process mechanism.
Chem Pharm Bull (Tokyo) **50**, 1201-1208.
- Dreesmann, H. (1892)
Über Knochenblombierung.
Beitr. Klin. Chir., 804-810.
- El-Zaatari, M.M., Hulten, K., Fares, Y., Baassiri, A., Balkis, M., Almashhrawi, A. und El-Zaatari, F.A. (2002)
Successful treatment of *Candida albicans* osteomyelitis of the spine with fluconazole and surgical debridement: case report.
J Chemother **14**, 627-630.

Espehaug, B., Engesaeter, L.B., Vollset, S.E., Havelin, L.I. und Langeland, N. (1997)
Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty. Review of 10,905 primary cemented total hip replacements reported to the Norwegian arthroplasty register, 1987 to 1995.
J Bone Joint Surg Br **79**, 590-595.

Evans, R.C. und Holmes, C.J. (1987)
Effect of vancomycin hydrochloride on Staphylococcus epidermidis biofilm associated with silicone elastomer.
Antimicrob Agents Chemother **31**, 889-894.

Faupel, L., Kunze, K. und Ecke, H. (1986)
[Autologous blood-antibiotic filling as effective therapy of chronic osteomyelitis].
Unfallchirurgie **12**, 110-113.

Friedlaender, G.E., Strong, D.M., Tomford, W.W. und Mankin, H.J. (1999)
Long-term follow-up of patients with osteochondral allografts. A correlation between immunologic responses and clinical outcome.
Orthop Clin North Am **30**, 583-588.

Garzoni, C. und Kelley, W.L. (2009)
Staphylococcus aureus: new evidence for intracellular persistence.
Trends Microbiol **17**, 59-65.

Geiger, M. und Friess, W. (2002)
Collagen sponge implants - applications, characteristics and evaluation: Part I.
Pharm Tech Europe **14**, 48-56.

Geldmacher, J. (1986)
[Therapy of enchondroma with a plaster implant--renaissance of a treatment principle].
Handchir Mikrochir Plast Chir **18**, 336-338.

Giannoudis, P.V., Dinopoulos, H. und Tsiridis, E. (2005)
Bone substitutes: an update.
Injury **36 Suppl 3**, S20-27.

Gitelis, S. und Brebach, G.T. (2002)
The treatment of chronic osteomyelitis with a biodegradable antibiotic-impregnated implant.
J Orthop Surg (Hong Kong) **10**, 53-60.

Gracia, E., Fernández, A., Conchello, P., Laclériga, A., Paniagua, L., Seral, F. und Amorena, B. (1997)
Adherence of Staphylococcus aureus slime-producing strain variants to biomaterials used in orthopaedic surgery.
Int Orthop **21**, 46-51.

Gristina, A.G. (1987)
Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration.
Science **237**, 1588-1595.

- Gristina, A.G. und Costerton, J.W. (1985)
Bacterial adherence to biomaterials and tissue. The significance of its role in clinical sepsis.
J Bone Joint Surg Am **67**, 264-273.
- Gristina, A.G., Hobgood, C.D., Webb, L.X. und Myrvik, Q.N. (1987)
Adhesive colonization of biomaterials and antibiotic resistance.
Biomaterials **8**, 423-426.
- Gristina, A.G., Oga, M., Webb, L.X. und Hobgood, C.D. (1985)
Adherent bacterial colonization in the pathogenesis of osteomyelitis.
Science **228**, 990-993.
- Guicheux, J., Gauthier, O., Aguado, E., Heymann, D., Pilet, P., Couillaud, S., Faivre, A. und Daculsi, G. (1998)
Growth hormone-loaded macroporous calcium phosphate ceramic: in vitro biopharmaceutical characterization and preliminary in vivo study.
J Biomed Mater Res **40**, 560-566.
- Habash, M. und Reid, G. (1999)
Microbial biofilms: their development and significance for medical device-related infections.
J Clin Pharmacol **39**, 887-898.
- Hasegawa, M., Doi, Y. und Uchida, A. (2003)
Cell-mediated bioresorption of sintered carbonate apatite in rabbits.
J Bone Joint Surg Br **85**, 142-147.
- Hasegawa, M., Sudo, A., Komlev, V.S., Barinov, S.M. und Uchida, A. (2004)
High release of antibiotic from a novel hydroxyapatite with bimodal pore size distribution.
J Biomed Mater Res B Appl Biomater **70**, 332-339.
- Hendricks, K.J., Lane, D., Burd, T.A., Lowry, K.J., Day, D., Phaup, J.G. und Anglen, J.O. (2001)
Elution characteristics of tobramycin from polycaprolactone in a rabbit model.
Clin Orthop Relat Res, 418-426.
- Henman, P. und Finlayson, D. (2000)
Ordering allograft by weight: suggestions for the efficient use of frozen bone-graft for impaction grafting.
J Arthroplasty **15**, 368-371.
- Hermans, K., De Herdt, P., Devriese, L.A., Godard, C. und Haesebrouck, F. (2000)
Colonisation of rabbits with *Staphylococcus aureus* after experimental infection with high and low virulence strains.
Vet Microbiol **72**, 277-284.
- Hermans, K., Devriese, L.A. und Haesebrouck, F. (2003)
Rabbit staphylococcosis: difficult solutions for serious problems.
Vet Microbiol **91**, 57-64.

- Hettfleisch, J. und Schöttle, H. (1993)
[Local preventive antibiotic treatment in intramedullary nailing with gentamycin impregnated biomaterials].
Aktuelle Traumatol **23**, 68-71.
- Horowitz, S.M., Gautsch, T.L., Frondoza, C.G. und Riley, L., Jr. (1991)
Macrophage exposure to polymethyl methacrylate leads to mediator release and injury.
J Orthop Res **9**, 406-413.
- Itokazu, M., Aoki, T., Nonomura, H., Nishimoto, Y. und Itoh, Y. (1998)
Antibiotic-loaded porous hydroxyapatite blocks for the treatment of osteomyelitis and postoperative infection. A preliminary report.
Bull Hosp Jt Dis **57**, 125-129.
- Itokazu, M., Matsunaga, T., Kumazawa, S. und Yang, W. (1995)
novel drug delivery system for osteomyelitis using porous hydroxyapatite blocks loaded by centrifugation.
J Appl Biomater **6**, 167-169.
- Itokazu, M., Yamamoto, K., Yang, W.Y., Aoki, T., Kato, N. und Watanabe, K. (1997)
The sustained release of antibiotic from freeze-dried fibrin-antibiotic compound and efficacies in a rat model of osteomyelitis.
Infection **25**, 359-363.
- Jansen, B. und Peters, G. (1993)
Foreign body associated infection.
J Antimicrob Chemother **32 Suppl A**, 69-75.
- Joseph, T.N., Chen, A.L. und Di Cesare, P.E. (2003)
Use of antibiotic-impregnated cement in total joint arthroplasty.
J Am Acad Orthop Surg **11**, 38-47.
- Kanellakopoulou, K. und Giamarellos-Bourboulis, E.J. (2000)
Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections.
Drugs **59**, 1223-1232.
- Keating, J.F. und McQueen, M.M. (2001)
Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma.
J Bone Joint Surg Br **83**, 3-8.
- Kelly, C.M., Wilkins, R.M., Gitelis, S., Hartjen, C., Watson, J.T. und Kim, P.T. (2001)
The use of a surgical grade calcium sulfate as a bone graft substitute: results of a multicenter trial.
Clin Orthop Relat Res, 42-50.
- Kendall, R.W., Duncan, C.P., Smith, J.A. und Ngui-Yen, J.H. (1996)
Persistence of bacteria on antibiotic loaded acrylic depots. A reason for caution.
Clin Orthop Relat Res, 273-280.

- Klawitter, J. und Hulbert, S. (1971)
Application of porous ceramics for the attachment of load bearing internal orthopedic applications.
J Biomed Mater Res Symp **2**, 161-229.
- Klein, C.P., Driessen, A.A., de Groot, K. und van den Hooff, A. (1983)
Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue.
J Biomed Mater Res **17**, 769-784.
- Klemm, K. (1979)
[Gentamicin-PMMA-beads in treating bone and soft tissue infections (author's transl)].
Zentralbl Chir **104**, 934-942.
- Klemm, K.W. (1993)
Antibiotic bead chains.
Clin Orthop Relat Res, 63-76.
- Koort, J.K., Mäkinen, T.J., Suokas, E., Veiranto, M., Jalava, J., Knuuti, J., Törmälä, P. und Aro, H.T. (2005)
Efficacy of ciprofloxacin-releasing bioabsorbable osteoconductive bone defect filler for treatment of experimental osteomyelitis due to *Staphylococcus aureus*.
Antimicrob Agents Chemother **49**, 1502-1508.
- Korendiasev, M.A. (1959)
[Significance of plaster of paris plombage in healing of bony cavities and defects; clinical experimental study].
Ortop Travmatol Protez **20**, 18-23.
- Korkusuz, F., Uchida, A., Shinto, Y., Araki, N., Inoue, K. und Ono, K. (1993)
Experimental implant-related osteomyelitis treated by antibiotic-calcium hydroxyapatite ceramic composites.
J Bone Joint Surg Br **75**, 111-114.
- Kovacevic, B. (1953)
[Problem of hematogenous osteomyelitis].
Langenbecks Arch Klin Chir Ver Dtsch Z Chir **276**, 432-443.
- Kresken M, Hafner D, und Schmitz F. (2003)
Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in Deutschland und im mitteleuropäischen Raum. Bonn: Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. 2003.
www.p-e-g.de.
- Kurz, L.T., Garfin, S.R. und Booth, R.E., Jr. (1989)
Harvesting autogenous iliac bone grafts. A review of complications and techniques.
Spine **14**, 1324-1331.
- Lang, S. (1996)
Osteomyelitis. A morphological and histological review.
Der Radiologe **36**, 781-785.

- Lebourg, L. und Biou, C. (1961)
[The imbedding of plaster of paris in surgical cavities of the maxilla.].
Sem Med Prof Med Soc **37**, 1195-1197.
- Lee, G.H., Khoury, J.G., Bell, J.E. und Buckwalter, J.A. (2002)
Adverse reactions to OsteoSet bone graft substitute, the incidence in a consecutive series.
Iowa Orthop J **22**, 35-38.
- Letsch, R., Rosenthal, E. und Joka, T. (1993)
[Local antibiotic administration in osteomyelitis treatment--a comparative study with two different carrier substances].
Aktuelle Traumatol **23**, 324-329.
- Lew, D.P. und Waldvogel, F.A. (1997)
Osteomyelitis.
N Engl J Med **336**, 999-1007.
- Lew, D.P. und Waldvogel, F.A. (2004)
Osteomyelitis.
Lancet **364**, 369-379.
- Lewandrowski, K.U., Gresser, J.D., Wise, D.L. und Trantol, D.J. (2000)
Bioresorbable bone graft substitutes of different osteoconductivities: a histologic evaluation of osteointegration of poly(propylene glycol-co-fumaric acid)-based cement implants in rats.
Biomaterials **21**, 757-764.
- Lillo, R. und Peltier, L.F. (1956)
The substitution of plaster of Paris rods for portions of the diaphysis of the radius in dogs.
Surg Forum **6**, 556-558.
- Lin, S.S., Ueng, S.W., Liu, S.J., Chan, E.C., Chao, E.K., Tsai, C.H., Chen, K.T., Wei, F.C. und Shih, C.H. (1999)
Development of a biodegradable antibiotic delivery system.
Clin Orthop Relat Res, 240-250.
- Lindsey, R.W., Probe, R., Miclau, T., Alexander, J.W. und Perren, S.M. (1993)
The effects of antibiotic-impregnated autogeneic cancellous bone graft on bone healing.
Clin Orthop Relat Res, 303-312.
- Ljubovic, E. und Nikulin, A. (1956)
[Plastic plombage in experimental bone regeneration.].
Acta Med Jugosl **10**, 1-36.
- Mackey, D., Varlet, A. und Debeaumont, D. (1982)
Antibiotic loaded plaster of Paris pellets: an in vitro study of a possible method of local antibiotic therapy in bone infection.
Clin Orthop Relat Res, 263-268.

- Mader, J.T., Ortiz, M. und Calhoun, J.H. (1996)
Update on the diagnosis and management of osteomyelitis.
Clin Podiatr Med Surg **13**, 701-724.
- Mayberry-Carson, K.J., Tober-Meyer, B., Smith, J.K., Lambe, D.W., Jr. und Costerton, J.W. (1984)
Bacterial adherence and glycocalyx formation in osteomyelitis experimentally induced with *Staphylococcus aureus*.
Infect Immun **43**, 825-833.
- McKee, J.C. und Bailey, B.J. (1984)
Calcium sulfate as a mandibular implant.
Otolaryngol Head Neck Surg **92**, 277-286.
- McLaren, A.C. (2004)
Alternative materials to acrylic bone cement for delivery of depot antibiotics in orthopaedic infections.
Clin Orthop Relat Res, 101-106.
- Melcher, G.A., Claudi, B., Schlegel, U., Perren, S.M., Printzen, G. und Munzinger, J. (1994)
Influence of type of medullary nail on the development of local infection. An experimental study of solid and slotted nails in rabbits.
J Bone Joint Surg Br **76**, 955-959.
- Meulemans, L., Hermans, K., Duchateau, L. und Haesebrouck, F. (2007)
High and low virulence *Staphylococcus aureus* strains in a rabbit skin infection model.
Vet Microbiol **125**, 333-340.
- Miclau, T., Dahners, L.E. und Lindsey, R.W. (1993)
In vitro pharmacokinetics of antibiotic release from locally implantable materials.
J Orthop Res **11**, 627-632.
- Mirzayan, R., Panossian, V., Avedian, R., Forrester, D.M. und Menendez, L.R. (2001)
The use of calcium sulfate in the treatment of benign bone lesions. A preliminary report.
J Bone Joint Surg Am **83-A**, 355-358.
- Moore, D.C., Chapman, M.W. und Manske, D. (1987)
The evaluation of a biphasic calcium phosphate ceramic for use in grafting long-bone diaphyseal defects.
J Orthop Res **5**, 356-365.
- Moore, W.R., Graves, S.E. und Bain, G.I. (2001)
Synthetic bone graft substitutes.
ANZ J Surg **71**, 354-361.
- Mousset, B., Benoit, M.A., Delloye, C., Bouillet, R. und Gillard, J. (1995)
Biodegradable implants for potential use in bone infection. An in vitro study of antibiotic-loaded calcium sulphate.
Int Orthop **19**, 157-161.

- Muschler, G.F., Negami, S., Hyodo, A., Gaisser, D., Easley, K. und Kambic, H. (1996)
Evaluation of collagen ceramic composite graft materials in a spinal fusion model.
Clin Orthop Relat Res, 250-260.
- Nazarov, A.D., Firsov, A.A., Navashin, P.S., Fomina, I.P. und Rudenko, T.G. (1988)
[Pharmacokinetic study of implantable gentamycin preparations. I. Antibiotic
pharmacokinetics in the implantation area and an evaluation of the prolonged effect of the
preparations].
Antibiot Khimioter **33**, 605-612.
- Nelson, C.L. (2004)
The current status of material used for depot delivery of drugs.
Clin Orthop Relat Res, 72-78.
- Nelson, C.L., Griffin, F.M., Harrison, B.H. und Cooper, R.E. (1992)
In vitro elution characteristics of commercially and noncommercially prepared antibiotic
PMMA beads.
Clin Orthop Relat Res, 303-309.
- Nelson, C.L., Hickmon, S.G. und Harrison, B.H. (1994)
Elution characteristics of gentamicin-PMMA beads after implantation in humans.
Orthopedics **17**, 415-416.
- Nelson, C.L., McLaren, S.G., Skinner, R.A., Smeltzer, M.S., Thomas, J.R. und Olsen, K.M.
(2002)
The treatment of experimental osteomyelitis by surgical debridement and the implantation of
calcium sulfate tobramycin pellets.
J Orthop Res **20**, 643-647.
- Nelson, R.C., Hoffman, R.O. und Burton, T.A. (1978)
The effect of antibiotic additions on the mechanical properties of acrylic cement.
J Biomed Mater Res **12**, 473-490.
- Neut, D., van de Belt, H., Stokroos, I., van Horn, J.R., van der Mei, H.C. und Busscher, H.J.
(2001)
Biomaterial-associated infection of gentamicin-loaded PMMA beads in orthopaedic revision
surgery.
J Antimicrob Chemother **47**, 885-891.
- Neut, D., van de Belt, H., van Horn, J.R., van der Mei, H.C. und Busscher, H.J. (2003)
Residual gentamicin-release from antibiotic-loaded polymethylmethacrylate beads after 5
years of implantation.
Biomaterials **24**, 1829-1831.
- Nickel, J.C., Wright, J.B., Ruseska, I., Marrie, T.J., Whitfield, C. und Costerton, J.W. (1985)
Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* colonizing a urinary catheter in vitro.
Eur J Clin Microbiol **4**, 213-218.

Orsini, G., Ricci, J., Scarano, A., Pecora, G., Petrone, G., Iezzi, G. und Piattelli, A. (2004)
Bone-defect healing with calcium-sulfate particles and cement: an experimental study in rabbit.

J Biomed Mater Res B Appl Biomater **68**, 199-208.

Ostermann, P.A., Seligson, D. und Henry, S.L. (1995)

Local antibiotic therapy for severe open fractures. A review of 1085 consecutive cases.

J Bone Joint Surg Br **77**, 93-97.

Ozalp, Y., Ozdemir, N., Kocagöz, S. und Hasirci, V. (2001)

Controlled release of vancomycin from biodegradable microcapsules.

J Microencapsul **18**, 89-110.

Palmer, S.H., Gibbons, C.L. und Athanasou, N.A. (1999)

The pathology of bone allograft.

J Bone Joint Surg Br **81**, 333-335.

Panlilio, A.L., Culver, D.H., Gaynes, R.P., Banerjee, S., Henderson, T.S., Tolson, J.S. und Martone, W.J. (1992)

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals, 1975-1991.

Infect Control Hosp Epidemiol **13**, 582-586.

Papagelopoulos, P.J., Mavrogenis, A.F., Tsiodras, S., Vlastou, C., Giamarellou, H. und Soucacos, P.N. (2006)

Calcium sulphate delivery system with tobramycin for the treatment of chronic calcaneal osteomyelitis.

J Int Med Res **34**, 704-712.

Patel, R. (2005)

Biofilms and antimicrobial resistance.

Clin Orthop Relat Res, 41-47.

Patti, J.M., Allen, B.L., McGavin, M.J. und Höök, M. (1994)

MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues.

Annu Rev Microbiol **48**, 585-617.

Patzakis, M.J., Mazur, K., Wilkins, J., Sherman, R. und Holtom, P. (1993)

Septopal beads and autogenous bone grafting for bone defects in patients with chronic osteomyelitis.

Clin Orthop Relat Res, 112-118.

Pelker, R.R. und Friedlaender, G.E. (1987)

Biomechanical aspects of bone autografts and allografts.

Orthop Clin North Am **18**, 235-239.

Peltier, L.F. (1959)

The use of plaster of paris to fill large defects in bone.

Am J Surg **97**, 311-315.

- Peltier, L.F. (1961)
The use of plaster of Paris to fill defects in bone.
Clin Orthop **21**, 1-31.
- Peltier, L.F., Bickel, E.Y., Lillo, R. und Thein, M.S. (1957)
The use of plaster of paris to fill defects in bone.
Ann Surg **146**, 61-69.
- Peltier, L.F. und Jones, R.H. (1978)
Treatment of unicameral bone cysts by curettage and packing with plaster-of-Paris pellets.
J Bone Joint Surg Am **60**, 820-822.
- Peltier, L.F. und Orn, D. (1957)
The effect of the addition of plaster of paris to autogenous and homogenous bone graft in dogs.
Surg Forum **8**, 571-574.
- Perry, C.R. und Pearson, R.L. (1991)
Local antibiotic delivery in the treatment of bone and joint infections.
Clin Orthop Relat Res, 215-226.
- Petrova, A. (1928)
Gipsfüllung von Knochenhöhlen bei Osteomyelitis.
Zentr. Org. ges. Chir., 485.
- Petruskevicius, J., Nielsen, S., Kaalund, S., Knudsen, P.R. und Overgaard, S. (2002)
No effect of Osteoset, a bone graft substitute, on bone healing in humans: a prospective randomized double-blind study.
Acta Orthop Scand **73**, 575-578.
- Petty, W., Spanier, S., Shuster, J.J. und Silverthorne, C. (1985)
The influence of skeletal implants on incidence of infection. Experiments in a canine model.
J Bone Joint Surg Am **67**, 1236-1244.
- Prosser, B.L., Taylor, D., Dix, B.A. und Cleeland, R. (1987)
Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm.
Antimicrob Agents Chemother **31**, 1502-1506.
- Pujalte, J., Wicklund, B. und Tsukayama, D. (1998)
Elution of tobramycin from plaster of paris pellets.
Proceedings from the 44th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society.
- Radin, S., Campbell, J.T., Ducheyne, P. und Cuckler, J.M. (1997)
Calcium phosphate ceramic coatings as carriers of vancomycin.
Biomaterials **18**, 777-782.
- Ramshaw, J.A., Werkmeister, J.A. und Glattauer, V. (1996)
Collagen-based biomaterials.
Biotechnol Genet Eng Rev **13**, 335-382.

- Richelsof, K.C., Petersen, D. und Haggard, W. (1998)
Elution characteristics of tobramycin-impregnated medical grade calcium sulfate hemihydrate.
Proceedings from the 44th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society.
- Rissing, J.P. (1997)
Antimicrobial therapy for chronic osteomyelitis in adults: role of the quinolones.
Clin Infect Dis **25**, 1327-1333.
- Robinson, D., Alk, D., Sandbank, J., Farber, R. und Halperin, N. (1999)
Inflammatory reactions associated with a calcium sulfate bone substitute.
Ann Transplant **4**, 91-97.
- Romeis, B. (1989)
Mikroskopische Technik, 145-147
- Rosenblum, S.F., Frenkel, S., Ricci, J.R. und Alexander, H. (1993)
Diffusion of fibroblast growth factor from a plaster of Paris carrier.
J Appl Biomater **4**, 67-72.
- Rushton, N. (1997)
Applications of local antibiotic therapy.
Eur J Surg Suppl, 27-30.
- Ruszczak, Z. und Friess, W. (2003)
Collagen as a carrier for on-site delivery of antibacterial drugs.
Adv Drug Deliv Rev **55**, 1679-1698.
- Rutten, H.J. und Nijhuis, P.H. (1997)
Prevention of wound infection in elective colorectal surgery by local application of a gentamicin-containing collagen sponge.
Eur J Surg Suppl, 31-35.
- Saito, T., Takeuchi, R., Hirakawa, K., Nagata, N., Yoshida, T., Koshino, T., Okuda, K., Takema, M. und Hori, T. (2002)
Slow-releasing potential of vancomycin-loaded porous hydroxyapatite blocks implanted into MRSA osteomyelitis.
J Biomed Mater Res **63**, 245-251.
- Salmenlinna, S., Lyytikäinen, O., Kotilainen, P., Scotford, R., Siren, E. und Vuopio-Varkila, J. (2000)
Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Finland.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis **19**, 101-107.
- Sánchez, E., Baro, M., Soriano, I., Perera, A. und Evora, C. (2001)
In vivo-in vitro study of biodegradable and osteointegrable gentamicin bone implants.
Eur J Pharm Biopharm **52**, 151-158.
- Sánzen, L. und Linder, L. (1995)
Infection adjacent to titanium and bone cement implants: an experimental study in rabbits.
Biomaterials **16**, 1273-1277.

- Sarria, J.C., Vidal, A.M. und Kimbrough, R.C., 3rd (2001)
Haemophilus influenzae osteomyelitis in adults: a report of 4 frontal bone infections and a review of the literature.
Scand J Infect Dis **33**, 263-265.
- Sasaki, S. und Ishii, Y. (1999)
Apatite cement containing antibiotics: efficacy in treating experimental osteomyelitis.
J Orthop Sci **4**, 361-369.
- Schurman, D.J., Trindade, C., Hirshman, H.P., Moser, K., Kajiyama, G. und Stevens, P. (1978)
Antibiotic-acrylic bone cement composites. Studies of gentamicin and Palacos.
J Bone Joint Surg Am **60**, 978-984.
- Schwameis, E., Abdolvahab, F. und Wurnig, C. (1996)
[Osteomyelitis. Clinical aspects, diagnosis and therapy].
Radiologe **36**, 823-833.
- Shinto, Y., Uchida, A., Korkusuz, F., Araki, N. und Ono, K. (1992)
Calcium hydroxyapatite ceramic used as a delivery system for antibiotics.
J Bone Joint Surg Br **74**, 600-604.
- Shirtliff, M.E., Calhoun, J.H. und Mader, J.T. (2002)
Experimental osteomyelitis treatment with antibiotic-impregnated hydroxyapatite.
Clin Orthop Relat Res, 239-247.
- Sidqui, M., Collin, P., Vitte, C. und Forest, N. (1995)
Osteoblast adherence and resorption activity of isolated osteoclasts on calcium sulphate hemihydrate.
Biomaterials **16**, 1327-1332.
- Sivakumar, M. und Panduranga Rao, K. (2002)
Preparation, characterization and in vitro release of gentamicin from coralline hydroxyapatite-gelatin composite microspheres.
Biomaterials **23**, 3175-3181.
- Siverhus, DJ. und Edmiston CE, S.J. (1991)
Microbial adherence and colonization of antibiotic impregnated PMMA bon cement.
Trans Orthop Res Soc.
- Skinner, E. und Phillips, R. (1967)
The Science of Dental Material. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 51-69.
- Snyders, R.V., Jr., Eppley, B.L., Krukowski, M. und Delfino, J.J. (1993)
Enhancement of repair in experimental calvarial bone defects using calcium sulfate and dextran beads.
J Oral Maxillofac Surg **51**, 517-524.
- Sopyan, I. (2008)
Recent development on porous calcium phosphate ceramics for biomedical application.
Med J Malaysia **63 Suppl A**, 14-15.

- Sorensen, T.S., Sorensen, A.I. und Merser, S. (1990)
Rapid release of gentamicin from collagen sponge. In vitro comparison with plastic beads.
Acta Orthop Scand **61**, 353-356.
- Stemberger, A., Grimm, H., Bader, F., Rahn, H.D. und Ascherl, R. (1997)
Local treatment of bone and soft tissue infections with the collagen-gentamicin sponge.
Eur J Surg Suppl, 17-26.
- Stevenson, S. (1999)
Biology of bone grafts.
Orthop Clin North Am **30**, 543-552.
- Stigter, M., Bezemer, J., de Groot, K. und Layrolle, P. (2004)
Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy.
J Control Release **99**, 127-137.
- Stratov, I., Korman, T.M. und Johnson, P.D. (2003)
Management of Aspergillus osteomyelitis: report of failure of liposomal amphotericin B and response to voriconazole in an immunocompetent host and literature review.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis **22**, 277-283.
- Tay, B.K., Patel, V.V. und Bradford, D.S. (1999)
Calcium sulfate- and calcium phosphate-based bone substitutes. Mimicry of the mineral phase of bone.
Orthop Clin North Am **30**, 615-623.
- Taylor, G.J., Bannister, G.C. und Calder, S. (1990)
Perioperative wound infection in elective orthopaedic surgery.
J Hosp Infect **16**, 241-247.
- Thomas, M.V. und Puleo, D.A. (2009)
Calcium sulfate: Properties and clinical applications.
J Biomed Mater Res B Appl Biomater **88**, 597-610.
- Toma, M.B., Smith, K.M., Martin, C.A. und Rapp, R.P. (2006)
Pharmacokinetic considerations in the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus osteomyelitis.
Orthopedics **29**, 497-501.
- Tsukayama, D.T. (1999)
athophysiology of posttraumatic osteomyelitis.
Clin Orthop Relat Res, 22-29.
- Turner, T., Urban, R. und Gitelis, S. (1999)
Efficacy of calcium sulfate: A synthetic bone graft material in healing a large canine medullary defect.
Trans Orthop Res Soc **45**, 522.

- Uchida, A., Shinto, Y., Araki, N. und Ono, K. (1992)
Slow release of anticancer drugs from
porous calcium hydroxyapatite ceramic.
J Orthop Res **10**, 440-445.
- Urist, M.R. (1965)
Bone: formation by autoinduction.
Science **150**, 893-899.
- van de Belt, H., Neut, D., Schenk, W., van Horn, J.R., van der Mei, H.C. und Busscher, H.J. (2000)
Gentamicin release from polymethylmethacrylate bone cements and *Staphylococcus aureus* biofilm formation.
Acta Orthop Scand **71**, 625-629.
- Vancraeynest, D., Hermans, K. und Haesebrouck, F. (2004a)
Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs.
Vet Microbiol **103**, 241-247.
- Vancraeynest, D., Hermans, K., Martel, A., Vaneechoutte, M., Devriese, L.A. und Haesebrouck, F. (2004b)
Antimicrobial resistance and resistance genes in *Staphylococcus aureus* strains from rabbits.
Vet Microbiol **101**, 245-251.
- Varlet, A. und Dauchy, P. (1983)
[Plaster of Paris pellets containing antibiotics in the treatment of bone infection. New combinations of plaster with antibiotics].
Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot **69**, 239-244.
- Verhoef, J., Beaujean, D., Blok, H., Baars, A., Meyler, A., van der Werken, C. and Weersink, A. (1999)
A Dutch approach to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis **18**, 461-466.
- Vershigora, A.E., Ovod, V.V., Vikhot, N.E. und Mikhal'skii, L.A. (1986)
[Staphylococcal adherence to rabbit epithelial cells].
Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, 37-41.
- von Eiff, C., Reinert, R.R., Kresken, M., Brauers, J., Hafner, D. und Peters, G. (2000)
Nationwide German multicenter study on prevalence of antibiotic resistance in staphylococcal bloodstream isolates and comparative in vitro activities of quinupristin-dalfopristin.
J Clin Microbiol **38**, 2819-2823.
- Voss, A., Milatovic, D., Wallrauch-Schwarz, C., Rosdahl, V.T. und Braveny, I. (1994)
Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis **13**, 50-55.

- Wachol-Drewek, Z., Pfeiffer, M. und Scholl, E. (1996)
Comparative investigation of drug delivery of collagen implants saturated in antibiotic solutions and a sponge containing gentamicin.
Biomaterials **17**, 1733-1738.
- Walenkamp, G. und Karsemaker, S. (1998)
Pharmacokinetics of two gentamicin collagen fleeces in animal experiments.
Biomaterials in Surgery. Georg Thieme Verlag, 18-20.
- Walsh, W.R., Morberg, P., Yu, Y., Yang, J.L., Haggard, W., Sheath, P.C., Svehla, M. und Bruce, W.J. (2003)
Response of a calcium sulfate bone graft substitute in a confined cancellous defect.
Clin Orthop Relat Res, 228-236.
- Wen, J., Leng, Y., Chen, J. und Zhang, C. (2000)
Chemical gradient in plasma-sprayed HA coatings.
Biomaterials **21**, 1339-1343.
- Wirth, C.J. und Windhagen, H. (2004)
[New technologies in tissue engineering. Visions of an unlimited bone generation without problems].
Orthopade **33**, 1335-1337.
- Yamashita, Y., Uchida, A., Yamakawa, T., Shinto, Y., Araki, N. und Kato, K. (1998)
Treatment of chronic osteomyelitis using calcium hydroxyapatite ceramic implants impregnated with antibiotic.
Int Orthop **22**, 247-251.
- Yamazaki, Y., Oida, S., Akimoto, Y. und Shioda, S. (1988)
Response of the mouse femoral muscle to an implant of a composite of bone morphogenetic protein and plaster of Paris.
Clin Orthop Relat Res, 240-249.

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: An Knocheninfektionen beteiligte Mikroorganismen (Lew and Waldvogel 2004).	6
Tab. 2: Antibiotikaregime zur systemischen Verabreichung (Lew and Waldvogel 2004).	8
Tab. 3: Implantate im Vergleich	22
Tab. 4: Versuchsgruppe 1.	24
Tab. 5: Versuchsgruppe 2.	25
Tab. 6: Fluorochrome: Anregung, Emission, Fluoreszenzfarbe.	28
Tab. 7: Dosierungsschema Fluorochrome	28
Tab. 8: Übersicht der Proben für die Analyse mittels μ -Computertomograph	30
Tab. 9: Farbliche Darstellung einzelner Bestandteile nach Einbettung und Färbung.	31
Tab. 10: Fluorochrome: Anregung, Emission, Fluoreszenzfarbe.	32
Tab. 11: Bewertung der Röntgengedichte Palasorb-G.	40
Tab. 12: Bewertung der Röntgengedichte Palasorb-V.	41
Tab. 13: Bewertung der Röntgengedichte Osteoset [®] .	43
Tab. 14: Zusammenfassende Bewertung der Röntgengedichte Palasorb-G, Palasorb-V und Osteoset [®] .	44
Tab. 15: Histologische Gesamtwertung Palasorb-G 4-Wochen.	64
Tab. 16: Histologische Gesamtwertung Palasorb-G 6-Wochen.	67
Tab. 17: Histologische Gesamtwertung Palasorb-G 8-Wochen.	71
Tab. 18: Histologische Gesamtwertung Palasorb-G nach 12- Wochen.	75
Tab. 19: Histologische Gesamtwertung Palasorb-V 4-Wochen.	79
Tab. 20: Histologische Gesamtwertung Palasorb-V nach 6- Wochen.	82
Tab. 21: Histologische Gesamtwertung Palasorb-V nach 8- Wochen.	85
Tab. 22: Histologische Gesamtwertung Palasorb-V nach 12- Wochen.	90
Tab. 23: Histologische Gesamtwertung Osteoset [®] nach 4- Wochen.	94
Tab. 24: Histologische Gesamtwertung Osteoset [®] nach 6- Wochen.	97
Tab. 25: Histologische Gesamtwertung Osteoset [®] nach 8- Wochen.	101
Tab. 26: Antibiotikagehalt in einem Formkörper und nach Implantation insgesamt in der Tibia.	127
Tab. 27: Elution Gentamicin (Palasorb-G).	128
Tab. 28: Elution Vancomycin (Palasorb-V).	128
Tab. 29: Elution Tobramycin (Osteoset [®]).	128
Tab. 30: Elution Gentamicin, Vancomycin und Tobramycin im Vergleich.	129
Tab. 31: Elution (%) zur Ausgangskonzentration Gentamicin, Vancomycin und Tobramycin im Vergleich.	130
Tab. 32: Extrahierte Masse in Gramm [g] nach Implantation von Palasorb-G.	133
Tab. 33: Extrahierte Masse in Gramm [g] nach Implantation von Palasorb-V.	134
Tab. 34: Extrahierte Masse in Gramm [g] nach Implantation von Osteoset [®] .	134

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Herausfräsen des Knochendeckels. _____	26
Abb. 2: Implantationszugang. _____	26
Abb. 3: Implantation eines Formkörpers. _____	26
Abb. 4: Schema Ansatz a bzw. b: _____	35
Abb. 5: Gewinnung der Proben für die Gerinnungsversuche. _____	36
Abb. 6: Röntgenbefunde Palasorb-G. _____	39
Abb. 7: Röntgenbefunde Palasorb-V. _____	41
Abb. 8: Röntgenbefunde Osteoset®. _____	43
Abb. 9: μ -CT-Schnittebenen. _____	46
Abb. 10: μ -CT Nr. 13. _____	47
Abb. 11: μ -CT Nr. 89. _____	47
Abb. 12: μ -CT Nr. 91. _____	47
Abb. 13: μ -CT Nr. 2. _____	48
Abb. 14: μ -CT Nr. 5. _____	48
Abb. 15: μ -CT Nr. 116. _____	49
Abb. 16: μ -CT Nr. 9. _____	49
Abb. 17: μ -CT Nr. 11. _____	49
Abb. 18: μ -CT Nr. 114. _____	50
Abb. 19: μ -CT Nr. 4. _____	51
Abb. 20: μ -CT Nr. 12. _____	51
Abb. 21: μ -CT Nr. 41. _____	51
Abb. 22: μ -CT Nr. 123. _____	53
Abb. 23: μ -CT Nr. 127. _____	53
Abb. 24: μ -CT Nr. 13. _____	53
Abb. 25: μ -CT Nr. 118. _____	54
Abb. 26: μ -CT Nr. 119. _____	54
Abb. 27: μ -CT Nr. 120. _____	54
Abb. 28: μ -CT Nr. 96. _____	55
Abb. 29: μ -CT Nr. 100. _____	55
Abb. 30: μ -CT Nr. 103. _____	55
Abb. 31: μ -CT Nr. 104. _____	56
Abb. 32: μ -CT Nr. 108. _____	56
Abb. 33: μ -CT Nr. 112. _____	56
Abb. 34: μ -CT Nr. 128. _____	57
Abb. 35: μ -CT Nr. 129. _____	57
Abb. 36: μ -CT Nr. 130. _____	57
Abb. 37: μ -CT Nr. 124. _____	58
Abb. 38: μ -CT Nr. 125. _____	58
Abb. 39: μ -CT Nr. 126. _____	58

Abb. 40: Histologische Übersichtsaufnahmen Palasorb-G 4 Wochen.	61
Abb. 41: Histologiepräparat Nr. 13.	61
Abb. 42: Histologiepräparat Nr. 89.	62
Abb. 43: Histologiepräparat Nr. 91.	63
Abb. 44: Histologische Übersichtsaufnahmen Palasorb-G 6 Wochen.	65
Abb. 45: Histologiepräparat Nr 2.	65
Abb. 46: Histologiepräparat Nr. 5.	66
Abb. 47: Histologiepräparat Nr. 116.	67
Abb. 48: Histologische Übersichtsaufnahmen Palasorb-G 8 Wochen.	68
Abb. 49: Histologiepräparat Nr. 9.	68
Abb. 50: Histologiepräparat Nr. 11.	69
Abb. 51: Histologiepräparat Nr. 114.	70
Abb. 52: Histologische Übersichtsaufnahmen Palasorb-G nach 12 Wochen.	71
Abb. 53: Histologiepräparat Nr. 4.	72
Abb. 54 Polychrome Sequenzmarkierung Präparat Nr.4	72
Abb. 55: Histologiepräparat Nr. 12.	73
Abb. 56: Polychrome Sequenzmarkierung Präparat Nr. 12.	73
Abb. 57: Histologiepräparat Nr. 41.	74
Abb. 58: Polychrome Sequenzmarkierung Präparat Nr. 41.	75
Abb. 59: Histologische Übersichtsaufnahmen Palasorb-V nach 4 Wochen.	76
Abb. 60: Histologiepräparat Nr. 123.	76
Abb. 61: Histologiepräparat Nr. 127.	77
Abb. 62: Histologiepräparat Nr. 131.	78
Abb. 63: Histologische Übersichtsaufnahmen Palasorb-V nach 6 Wochen.	80
Abb. 64: Histologiepräparat Nr. 118.	80
Abb. 65: Histologiepräparat Nr. 119.	81
Abb. 66: Histologiepräparat Nr. 120.	81
Abb. 67: Histologische Übersichtsaufnahmen Palasorb-V nach 8 Wochen.	83
Abb. 68: Histologiepräparat Nr. 96.	83
Abb. 69: Histologiepräparat Nr. 100.	84
Abb. 70: Histologiepräparat Nr. 103.	84
Abb. 71: Histologische Übersichtsaufnahmen Palasorb-V nach 12 Wochen.	86
Abb. 72: Histologiepräparat Nr. 104.	86
Abb. 73: Polychrome Sequenzmarkierung, Präparat Nr. 104.	87
Abb. 74: Histologiepräparat Nr. 108.	88
Abb. 75: Polychrome Sequenzmarkierung, Präparat Nr. 108.	88
Abb. 76: Histologiepräparat Nr. 112.	89
Abb. 77: Polychrome Sequenzmarkierung, Präparat Nr. 112.	89
Abb. 78: Histologische Übersichtsaufnahmen Osteoset® nach 4 Wochen.	91
Abb. 79: Histologiepräparat Nr. 128.	91
Abb. 80: Histologiepräparat Nr. 129.	92

Abb. 81: Histologiepräparat Nr. 130. _____	93
Abb. 82: Histologische Übersichtsaufnahmen Osteoset® nach 6 Wochen. _____	94
Abb. 83: Histologiepräparat Nr. 124. _____	95
Abb. 84: Histologiepräparat Nr. 125. _____	95
Abb. 85: Histologiepräparat Nr. 126. _____	96
Abb. 86: Histologische Übersichtsaufnahmen Osteoset nach 8 Wochen. _____	97
Abb. 87: Histologiepräparat Nr. 87. _____	98
Abb. 88: Polychrome Sequenzmarkierung Präparat Nr. 87. _____	98
Abb. 89: Histologiepräparat Nr. 90. _____	99
Abb. 90: Polychrome Sequenzmarkierung, Präparat Nr. 90. _____	99
Abb. 91: Histologiepräparat Nr. 92. _____	100
Abb. 92: Polychrome Sequenzmarkierung, Präparat Nr. 92. _____	100
Abb. 93: Elution Gentamicin, Vancomycin und Tobramycin im Vergleich. _____	129
Abb. 94: Serumspiegel nach Implantation von Palasorb-G. _____	130
Abb. 95: Serumspiegel nach Implantation von Palasorb-V. _____	131
Abb. 96: Serumspiegel nach Implantation von Osteoset®. _____	131
Abb. 97: Vergleich der Serumspiegel nach Implantation der entsprechenden Formkörper. _____	132
Abb. 98: Konzentrationen der einzelnen Antibiotika in µg/g Kortikalis in Abhängigkeit von der Beobachtungszeit (dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung). _____	135
Abb. 99: Konzentrationen der einzelnen Antibiotika in µg/g Medulla in Abhängigkeit von der Beobachtungszeit (dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung). _____	135
Abb. 100: Gerinnungsanalyse mittels roTEG: Ermittlung der CT. _____	138
Abb. 101: Gerinnungsanalyse mittels roTEG: Ermittlung der CFT. _____	139
Abb. 102: Gerinnungsanalyse mittels roTEG: Ermittlung der MCF. _____	140
Abb. 103: Marker der aktivierten Gerinnung: Prothrombinfragment. _____	141
Abb. 104: Marker der aktivierten Gerinnung: FaktorXIIa. _____	142
Abb. 105: Marker der aktivierten Gerinnung: Complement C3a-desArg. _____	143

10 Danksagung

Die vorliegende Doktorarbeit wurde am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung im Klinikum rechts der Isar sowie am Zentralinstitut für Medizintechnik der Technischen Universität München erstellt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. vet. U. Matis für die Übernahme der Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München sowie für die mit der Durchsicht verbundene Arbeit.

Weiterhin danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher für die Möglichkeit am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung die Arbeit durchführen zu können.

Herzlichst danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. A. Stemberger für die Überlassung des Themas, die stets gewährte wissenschaftliche und freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Studie sowie Durchsicht des Manuskriptes und für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Ebenfalls danke ich der Fa. Heraeus Medical GmbH für die Bereitstellung und Finanzierung des Projektes sowie im Besonderen Herrn Dr. phil. nat. H. Büchner und Herrn Dr. rer. nat. S. Vogt, die mir als Ansprechpartner stets helfend zur Verfügung standen.

Für die chirurgische Arbeit in dieser Studie möchte ich sehr herzlich Herrn Dr. med. M. Lucke danken, der auch trotz engen Terminkalenders stets mit fachlichem Rat zur Seite stand. Weiterhin gilt meinen Dank Herrn Dr. med. D. Pfförringer, Herrn Dr. med. H. Gollwitzer sowie Frau Dr. med. vet. M. Rößner.

Ebenfalls danke ich der Abteilung für Biomechanik der Unfallklinik Murnau unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. P. Augat für die Hilfe bei der Erstellung der μ -CT-Bilder.

Frau Dr. med. vet. S. Kerschbaumer danke ich für die Anfertigung der histologischen Präparate und stetigen Hilfe bei der Interpretation.

Auch Herrn PD Dr. rer. nat. J. Aigner danke ich für seine stets freundschaftliche Beratung und fachliche Unterstützung.

Ebenso danke ich herzlichst der Belegschaft des ZPFs sowie den Mitarbeitern des Institutes für Experimentelle Onkologie am Klinikum rechts der Isar für ihre Hilfe und Unterstützung.