

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt  
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Labor für experimentelle Chirurgie und regenerative Medizin  
Direktor: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

**Biokompatibilität einer neuen Knochenfüllsubstanz auf der  
Basis von Chitosan und Hydroxylapatit *in vivo***

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin  
(Dr. med. dent.)  
an der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu München

vorgelegt von

Anna Katharina Neunhoeffler  
aus München

2010

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Schieker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Franz-Xaver Reichl

Prof. Dr. Hans Roland Dürr

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Elias Volkmer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2010

## Inhaltsverzeichnis

<b><u>1. Einleitung</u></b> .....	<b>6</b>
<u>1.1. Klinische Problematik: osteoporotische Frakturen</u> .....	6
<u>1.1.1. Osteoporose und osteoporotische Frakturen</u> .....	7
<u>1.1.2. Die osteosynthetische Versorgung der osteoporotischen Fraktur (Verbundosteosynthese)</u> .....	8
<u>1.1.3. Anforderungen an Knochenfüllmaterialien</u> .....	9
<u>1.1.4. Stand der Forschung: Knochenfüllstoffe</u> .....	11
<u>1.1.5. Stand der Forschung: Bioresorbierbare Knochenklebstoffe</u> .....	14
<u>1.1.6. Entwicklung eines bioresorbierbaren Knochenfüllmaterials</u> .....	16
<u>1.1.7. Untersuchung des Knochenfüllmaterials <i>in vitro</i></u> .....	19
<u>1.2. Aufgabenstellung</u> .....	19
<u>Untersuchung des Knochenfüllmaterials <i>in vivo</i></u> .....	19
<b><u>2. Material und Methoden</u></b> .....	<b>21</b>
<u>2.1. Knochenfüllmaterial</u> .....	21
<u>2.1.1. Herstellungsprozess</u> .....	22
<u>2.2. <i>In vivo</i> Testung</u> .....	23
<u>2.2.1. Versuchstiere</u> .....	23
<u>2.2.2. Narkose und Vorbereitung</u> .....	24
<u>2.2.3. Gruppeneinteilung</u> .....	26
<u>2.2.4. Operationen</u> .....	27
<u>2.2.5. Polychrome Fluoreszenzmarkierung</u> .....	30
<u>2.3. Histologische Aufarbeitung</u> .....	31
<u>2.3.1. Histologische Aufarbeitung der subkutanen Proben</u> .....	31
<u>2.3.1.1. Fixierung und Einbettung</u> .....	32

<u>2.3.1.2. Schneidetechnik</u> .....	32
<u>2.3.1.3. Histologische Färbemethoden</u> .....	32
<u>2.3.2. Histologische Aufarbeitung der intraossären Proben</u> .....	33
<u>2.3.2.1. Fixierung und Einbettung</u> .....	33
<u>2.3.2.2. Schneidetechnik</u> .....	34
<u>2.3.2.3. Histologische Färbemethoden</u> .....	35
<u>2.3.3. Qualitative Auswertung</u> .....	35
<u>2.3.4. Quantitative Auswertung</u> .....	35
<b><u>3. Ergebnisse</u></b> .....	<b>37</b>
<u>3.1. Etablierung eines Mausmodells</u> .....	37
<u>3.2. Zelluläre Reaktion auf das Knochenfüllmaterial im orthotopen Mausmodell</u> .	40
<u>3.3. Abbau der Knochenfüllsubstanz im orthotopen Mausmodell</u> .....	45
<u>3.4. Knochenanlagerung an die Knochenfüllsubstanz</u> .....	47
<u>3.5. Zelluläre Reaktion auf die Knochenfüllsubstanz im heterotopen Mausmodell</u>	49
<u>3.6. Quantifizierung der Entzündungsreaktion im heterotopen Mausmodell</u> .....	56
<b><u>4. Diskussion</u></b> .....	<b>59</b>
<u>4.1. In vitro Testung als Vorläuferstudie</u> .....	60
<u>4.2. Präklinische Tiermodelle</u> .....	60
<u>4.2.1. Wahl der geeigneten Tierart</u> .....	61
<u>4.2.2. Konzeption des Kleintiermodelles</u> .....	62
<u>4.3. Biokompatibilität des Knochenfüllmaterials</u> .....	66
<u>4.3.1. Degradationscharakteristik</u> .....	66
<u>4.3.2. Zelluläre Reaktion</u> .....	70
<u>4.3.2.1. Zelluläre Reaktion bei intraossärer Implantation</u> .....	70
<u>4.3.2.2. Zelluläre Reaktion bei subkutaner Implantation</u> .....	73



---

<a href="#">4.3.3. Weiterführende histologische Auswertungsmethoden</a> .....	74
<a href="#">4.4. Schlussfolgerung und Ausblick</a> .....	75
<b><a href="#">5. Zusammenfassung</a></b> .....	<b>77</b>
<b><a href="#">6. Literaturverzeichnis</a></b> .....	<b>82</b>
<a href="#">Anhang</a> .....	91
<a href="#">Abkürzungsverzeichnis</a> .....	98
<a href="#">Danksagung</a> .....	99
<a href="#">Lebenslauf</a> .....	100
<a href="#">Publikationen</a> .....	101

## 1. Einleitung

### 1.1. Klinische Problematik: osteoporotische Frakturen

Es existiert eine Vielzahl von Gründen, die den Einsatz eines Knochenfüllmaterials nötig macht. Hierzu gehören Trümmer- und Defektfrakturen, aber auch Versteifungseingriffe an der Wirbelsäule erfordern nicht selten den Einsatz eines Knochenfüllmaterials. Eine der häufigsten Ursachen für derartige Eingriffe ist die Krankheit Osteoporose. Patienten, die an Osteoporose leiden, erfahren besonders häufig Frakturen. Diese Frakturen werden meist durch inadäquate Traumata hervorgerufen, da der osteoporotische Knochen eine geringere mechanische Festigkeit aufweist. Die Osteoporose wird derzeit von der WHO als eine der 10 wichtigsten und teuersten Volkskrankheiten eingestuft. Ungefähr jede 2. Frau und jeder 5. Mann erleidet im Laufe seines Lebens eine Osteoporose bedingte Fraktur [1]. Die Krankheit manifestiert sich hauptsächlich bei Menschen in höherem Lebensalter. Deshalb wird aufgrund der prognostizierten demographischen Veränderungen die Relevanz osteoporotischer Frakturen in Zukunft massiv zunehmen (s. Abb. 1). Der Knochenverlust selbst geht meist ohne Symptome einher. Der Krankheitswert ergibt sich primär aus den Frakturen, die die Patienten während des Krankheitsverlaufes erleiden. Diese stellen für den betroffenen Patienten insofern ein Schlüsselereignis dar, als sie den Hauptfaktor in der Einschränkung der Lebensqualität bedeuten. Sie können zu einer erhöhten Invalidität führen. Im Falle einer Oberschenkelhalsfraktur ist die Mortalität enorm erhöht [2]. Die Osteoporose bedingten Frakturen stellen folglich gesundheitsökonomisch eine enorme Belastung dar [3]. Untersuchungen zeigen, dass zu den Folgen osteoporotischer Frakturen neben einem erhöhten Mortalitätsrisiko vor allem funktionale Defizite zählen. Diese führen bei den Überlebenden häufig zu gesteigerter Pflegebe-

dürftigkeit [4]. Insbesondere ein Blick auf den demographischen Wandel, der in Deutschland stattfindet, macht deutlich, dass diese Pflegebedürftigkeit in Zukunft ansteigen wird (s. Abb.1). Daher ist eines der großen Ziele der heutigen Osteoporoseforschung, neben der Prävention der Erkrankung, die effektive Behandlungsmöglichkeit osteoporotischer Frakturen zu verbessern.

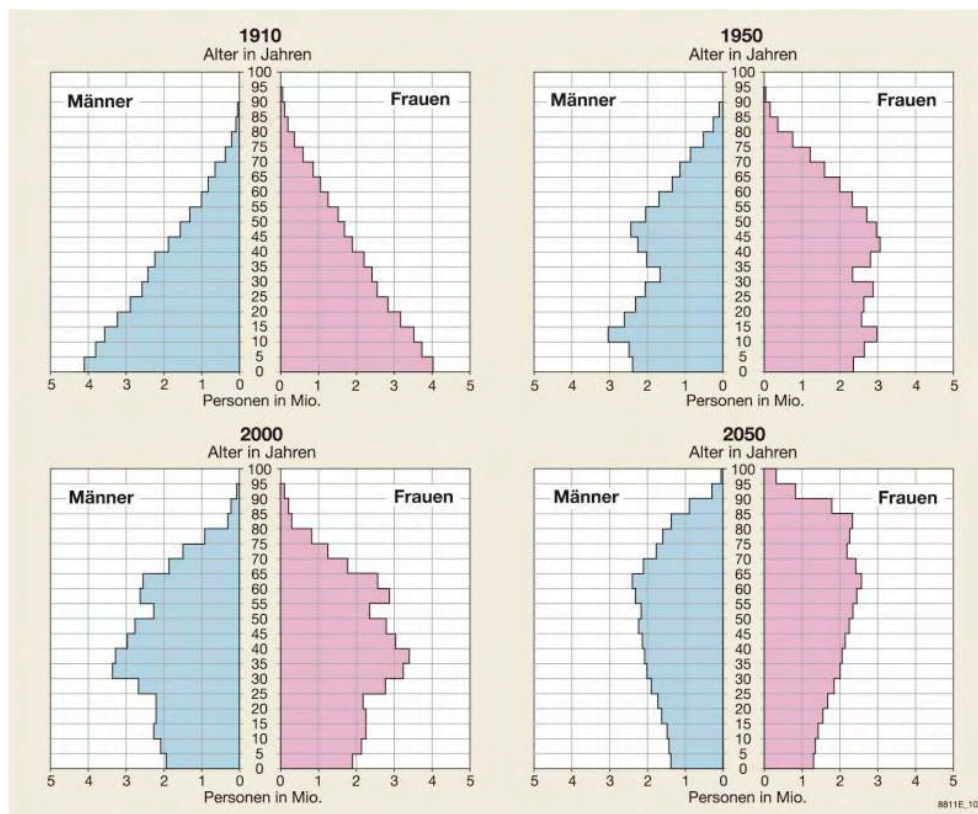


Abb. 1. Demographischer Wandel in Deutschland [5]: Aufgrund der niedrigeren Geburtenrate und der steigenden Lebenserwartung steigt der Anteil der über 65-jährigen stetig an

### 1.1.1. Osteoporose und osteoporotische Frakturen

Osteoporose ist per definitionem eine „systemische Erkrankung des Skelettsystems mit Verringerung der Knochenmasse und Veränderung der Mikroarchitektur des Knochengewebes sowie einer daraus folgenden Erhöhung der Knochenbrüchigkeit

und Zunahme des Frakturrisikos“ [2]. Die Verluste der Knochendichte führen zu einer drastischen Abnahme der Anzahl an Trabekeln in der Spongiosa, aber auch die Kortikalis ist betroffen. Aus dieser zerstörten Mikrostruktur resultiert eine Erhöhung der Brüchigkeit des Knochens [6]. Dies geht häufig mit einer degenerativen Verformung des Knochens einher und führt zu einem erhöhten Frakturrisiko [7]. Die am häufigsten von Frakturen betroffenen Regionen sind Wirbelkörper, Oberschenkelhals und distaler Radius. Frauen erleiden dreimal häufiger als Männer eine Osteoporosebedingte Fraktur. In dem Maße, in welchem die Inzidenz von Osteoporose ansteigt, steigt auch die Inzidenz von metaphysären und vertebrealen osteoporotischen Frakturen an [1].

#### 1.1.2. Die osteosynthetische Versorgung der osteoporotischen Fraktur (Verbundosteosynthese)

Die Therapie der Wahl von osteoporotischen Frakturen stellt meist die chirurgische Versorgung dar. Hierbei ergibt sich häufig das Problem, größere Knochendefekte überbrücken zu müssen. Als operatives Vorgehen hat sich die Verbundosteosynthese etabliert [8]. Hierbei wird ein Knochenfüllstoff eingebracht, um den Verbund der Fixation zu stabilisieren. Neben der Stabilisierung wird der Knochenfüllstoff auch zum Auffüllen des Defekts benötigt, um die Knochenheilung zu erleichtern. Insbesondere im metaphysären Knochen erweist sich die osteosynthetische Versorgung aufgrund der erniedrigten Knochenbälkchendichte häufig als schwierig. So ist es oft nicht möglich, einen suffizienten Schraubenhalt zu erreichen, was zu einem erhöhten Implantatversagen führt [9;10]. Die Aufgabe des Knochenfüllstoffes ist es in erster Linie, die Primärstabilität zu erhöhen. Die Frakturfragmente müssen dazu anatomisch korrekt reponiert werden. Diese Verbundosteosynthese soll die frühzeitige physiotherapeuti-

sche Belastung des entsprechenden Gelenks ermöglichen. Die aktuell einzige Substanz, die flächendeckend und regelhaft für derartige Eingriffe eingesetzt wird, ist PMMA. Neben seinen unbestreitbaren Vorteilen (beispielsweise eine extrem hohe Stabilität oder eine einfache Handhabung) hat PMMA den entscheidenden Nachteil, dass die Substanz nicht biologisch abbaubar ist, so dass Reparaturvorgänge daher nicht mehr möglich sind.

### 1.1.3. Anforderungen an Knochenfüllmaterialien

An Knochenfüllmaterialien wird heute eine Vielzahl von Anforderungen gestellt. Durch das Auffüllen von Knochendefekten mit Biomaterialien soll eine hohe Primärstabilität erreicht werden und die Kontinuität des Knochens wieder hergestellt werden. Durch diese Primärstabilität soll der Knochen möglichst früh wieder mechanisch belastbar sein. Ein weiteres Ziel ist die Resorbierbarkeit, die fordert, dass das Knochenfüllmaterial abgebaut werden kann. Im Zuge dieser Biodegradation soll das Knochenfüllmaterial innerhalb eines definierten Zeitraumes durch adäquat gebildeten körpereigenen Knochen ersetzt werden, welcher dem physiologischen Remodelling unterliegt [11]. Hierbei müssen die Geschwindigkeit der Resorption des Knochenfüllmaterials und die des körpereigenen Knochenaufbaus sich ungefähr entsprechen, da es sonst zur Bildung einer bindegewebigen Zwischenschicht zwischen Implantat und Knochen kommt [11]. Das Knochenfüllmaterial soll biokompatibel und bioaktiv sein [12]. Es wird gefordert, dass es osteoinduktive, besser aber osteostimulierende, mindestens aber osteokonduktive Eigenschaften aufweist [13]. Es darf weder immunogen noch kanzerogen noch toxisch sein. Das Material muss sterilisierbar sein und eine einfache Handhabung bieten, so dass der intraoperative Einsatz ermöglicht wird [14]. Die Festigkeit des Knochenfüllmaterials und damit die Festigkeit

der Fraktur sollte innerhalb weniger Minuten und bei Körpertemperatur gegeben sein, um eine unnötige Verlängerung der Operationszeit zu verhindern [15]. Die Hitze, die durch den Abbindevorgang entsteht (Polymerisationshitze), darf das angrenzende Gewebe nicht schädigen. Idealerweise zeigt das Knochenfüllmaterial auch in feuchter Umgebung eine hohe Festigkeit und eine gute chemische Bindung zum umliegenden Gewebe [16]. Weiterhin soll das Biomaterial alle Voraussetzungen der Wirtschaftlichkeit besitzen, so dass es im klinischen Alltag Verwendung finden kann.

Aus biologischer Sicht stellt autologer Knochen ein ideales Transplantat dar, einen Knochendefekt zu füllen, da er osteogene und osteokonduktive Eigenschaften besitzt. Außerdem weist er eine gewisse mechanische Stabilität auf [17]. Der Einsatz von autologem Knochen ist jedoch limitiert. Einerseits steht immer nur eine begrenzte Menge an Knochen zur Verfügung. Andererseits muss immer an einer weiteren Körperstelle, die als Spenderregion dient, ein zusätzlicher operativer Eingriff vorgenommen werden. Hierbei können Komplikationen wie Dysästhesien, chronische Schmerzen oder Wunddehiszenzen auftreten. Die Angaben zur Hebedefektmorbidität beispielsweise an der Fibula bewegen sich zwischen 17-38% [17].

Aufgrund dieser Nachteile wurde eine Vielzahl von synthetischen Knochenfüllstoffen und Knochenklebern entwickelt und optimiert. Diese sollen in ihren Eigenschaften denen des autologen Knochens möglichst nahe kommen [10;18;19]. Das Ziel ist es hierbei, Defekte im metaphysären Knochen zu füllen und so den Bedarf an Knochentransplantaten zu reduzieren [10]. Im Nachfolgenden werden die gängigen Knochenfüllmaterialien und bioresorbierbaren Knochenklebstoffe kurz erläutert.

#### 1.1.4. Stand der Forschung: Knochenfüllstoffe

Es gibt derzeit eine Vielzahl von Knochenfüllstoffen. In diesem Zusammenhang muss Polymethylmetacrylat (PMMA) erwähnt werden, wenngleich es sich eigentlich um einen Knochenzement handelt. PMMA wird seit geraumer Zeit vielfach in der Orthopädie und Unfallchirurgie eingesetzt. Es findet vor allem in der Endoprothetik zur Fixation von Endoprothesen Anwendung. Es entsteht durch Polymerisation des monomeren Methacrylsäuremethylesters [20]. Die Implantate sind direkt postoperativ belastbar, wodurch die Patienten frühzeitig mobilisiert werden können. PMMA besitzt extrem gute mechanische Eigenschaften wie beispielsweise eine hohe Festigkeit und Steifigkeit und erhöht weiterhin die mechanische Stabilität des Knochens [21]. Allerdings entwickelt PMMA eine hohe Polymerisationstemperatur. Diese thermische Schädigung des Gewebes, das mit dem Knochenfüllmaterial PMMA in Kontakt steht, kann zu Nekrosen führen [12;22]. Außerdem sind die Monomere des PMMAs toxisch [23]. Bei der Polymerisation kommt es nie zur vollständigen Umsetzung der Monomere. Der Restmonomergehalt von PMMA liegt bei etwa 2-6% [24], so dass diese auf das umliegende Gewebe toxisch wirken können. Somit kann PMMA nicht als biokompatibel eingestuft werden. Des Weiteren wird PMMA nicht degradiert und besitzt keine osteokonduktiven Eigenschaften [25]. Somit kommt dem PMMA bei der Defektrekonstruktion eine reine Platzhalterfunktion zu [26]. Dadurch ist der Einsatz von PMMA in Verbundosteosynthesen im Sinne eines Knochenfüllmaterials auf Frakturen bei alten Menschen sowie Tumorpatienten beschränkt. Bewährt hat sich PMMA auch zur Schraubenaugmentation, bei welcher der Schraubenhalt durch Einspritzen von PMMA über eine Hohlschraube verstärkt wird. Ein weiterer Einsatzbereich stellt die Vertebro- bzw. Kyphoplastie dar, wobei auch hier die Indikation bei jungen Patienten sehr zurückhaltend gestellt wird.

## Calciumphosphatkeramiken

Eine weitere große Gruppe der Knochenfüllstoffe stellen die Calciumphosphatkeramiken dar. Es gibt biologische und synthetische Calciumphosphatkeramiken. Beispiele für diese Keramiken sind synthetisches Hydroxylapatit (HA) und  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP), welche klinisch sehr häufig zum Einsatz kommen [27]. Ein Vorteil der Calciumphosphatkeramiken besteht darin, dass es während der Aushärtung zu keiner Hitzeentwicklung kommt. Somit wird die Gefahr von Nekrosen oder Nervschädigungen herabgesetzt. HA ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ) kann auf zwei unterschiedlichen Wegen gewonnen werden. Einerseits kann es synthetisch hergestellt werden. Andererseits kann es z. B. aus boviner Spongiosa oder aus Korallen durch Pyrolyse mit anschließenden Sinterprozessen gewonnen werden [11]. Durch den Sintervorgang wird die Porosität verringert, so dass zu einer Steigerung der Dichte und der Festigkeit kommt [28]. Es ist in Blöcken, Granulaten oder als Paste erhältlich und kann als dichtes oder poröses Material eingesetzt werden [29]. HA kann durch den umliegenden Knochen im Gegensatz zu PMMA durchbaut werden und weist osteokonduktive Eigenschaften auf [30]. HA stellt einen natürlichen Bestandteil des Knochengewebes dar und ist biokompatibel [31]. Es ist weder antigen, noch toxisch oder kanzerogen [31]. Die Oberfläche wird von vitalem Knochen benetzt [32;33], so dass HA im Gegensatz zu PMMA eine direkte Verbindung mit Knochen eingeht. Somit wird es gut in den vitalen Knochen integriert [32]. Jedoch geht es keine chemischen Bindungen mit dem Knochen ein [34]. Allerdings weist HA auch einige Nachteile auf. So ist implantiertes HA nur schlecht resorbierbar; lediglich Partikel bis zu einer Größe von  $50\mu\text{m}$  können von Phagozyten aufgenommen werden. Vor allem zuvor gesintertes HA wird schlecht degradiert [28]. So liegen oft nach Jahren noch Keramikpartikel innerhalb des Knochens vor, die dessen Stabilität negativ beeinflussen und chronische Entzündungen hervorrufen können [28]. Außerdem sind aufgrund der hohen Sprödigkeit



von HA Mikrofrakturen möglich. HA weist eine geringe Biege- und Torsionsbelastbarkeit auf [34].

$\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP,  $CA_3(PO_4)_2$ ) weist ähnliche biologische Eigenschaften auf wie HA. Verschiedene experimentelle Studien konnten zeigen, dass Implantate im osteoporotischen Knochen durch keramische Zemente stabilisiert wurden [35]. Primär stabile Knochendefekte können mit  $\beta$ -TCP oder HA versorgt werden, jedoch bedürfen instabile Knochendefekte einer osteosynthetischen Versorgung [11]. Es wird zwar besser resorbiert als HA, jedoch erstreckt sich die Dauer über einen relativ langen Zeitraum von sechs Monaten bis einigen Jahren [36]. Außerdem wird ein kompletter Abbau des Zementes durch die Abschirmung des neu gebildeten Knochens meist nicht erreicht [25]. Es konnte nicht nachgewiesen werden, dass  $\beta$ -TCP kovalente Bindungen mit Knochengewebe eingehen würde [34]. Ein weiterer Nachteil von  $\beta$ -TCP ist beispielsweise eine geringere Belastungsstabilität.

### Neue polymere Zemente

Schon seit vielen Jahren finden Polymere in der Medizin Anwendung. Beispielsweise werden Poly- $\alpha$ -Hydroxy-Säuren als resorbierbare Nähte oder Schrauben eingesetzt. Auch als Knochenfüllstoffe sollten sie zum Einsatz kommen. Jedoch gestaltete sich dies zunächst als unbefriedigend, denn sie wurden nicht gleichmäßig resorbiert und es kam zum Ausbrechen ganzer Stücke aus den Transplantaten. Somit wurde das Einwachsen des vitalen Knochens erschwert und etwaige gespeicherte Substanzen konnten nicht gleichmäßig freigesetzt werden [11]. Außerdem können Entzündungsreaktionen bis hin zu Fistelungen beobachtet werden [37]. Derzeit sind viele Polymere in der Entwicklung. Beispiele hierfür sind Poly-Orthoester, Polyanhydride [37] oder Polymere auf der Basis von Alkylenbismethacrylat [13]. Jedoch steht die erfolgreiche

Entwicklung eines neuen polymeren Zementes, der den Anforderungen Biokompatibilität, Osteokonduktivität und Degradationstendenz entsprechen würde, noch aus.

#### 1.1.5. Stand der Forschung: Bioresorbierbare Knochenklebstoffe

Neben den Knochenfüllstoffen sollten die Knochenklebstoffe genannt werden, da sie ein ähnliches Indikationsspektrum wie die Knochenfüllstoffe besitzen. In vergangener Zeit wurde eine Vielzahl von bioresorbierbaren Knochenklebstoffen entwickelt. Das Ziel ist es, kleine Fragmente, die insbesondere bei Trümmerfrakturen häufig vorliegen, zu stabilisieren. Somit könnte der Einsatz von Platten und Schrauben vermieden werden und das Gewebe möglicherweise weniger traumatisiert werden. Nachfolgende Tabelle (s. Tab. 1) zeigt eine Einteilung der Knochenklebstoffe in Stoffklassen an.

Synthetische Knochenklebstoffe	Epoxidharze Polyurethane Zyanoacrylate PMMA
Biologische Knochenklebstoffe	Fibrinklebstoffe (Gelatine-Resorcin-Aldehyde*) (Protein-Aldehyd-Systeme*)
Aktuelle und zukünftige Entwicklung	Klebstoffe auf Peptidbasis: - Peptoplaste - Marine Organismen: Muscheln  Klebstoffe auf Oligo- und Polylaktonbasis

	Alkylbis(oligolaktol)methacrylate
--	-----------------------------------

**Tab. 1** Einteilung der Knochenklebesysteme in Stoffklassen

\*diese Klebstoffe waren zunächst als potenzielle Knochenklebstoffe gedacht, wurden aber nie für die Knochenklebung getestet oder eingesetzt [38].

Viele Klebstoffe scheiterten jedoch an den Anforderungen, die an sie gestellt werden, um den Weg in den klinischen Einsatz zu meistern. Vor allem die bedeutenden Eigenschaften wie Biokompatibilität, Degradierbarkeit oder Verbundfestigkeit stellten Probleme dar. Einen interessanten Ansatzpunkt verkörpern die Klebstoffe mariner Organismen. Diese Klebstoffe auf Proteinbasis härten auch in wässrigem Milieu und bei unterschiedlichen Temperaturen aus. Außerdem ist die Verbundfestigkeit zu verschiedensten Materialien sehr hoch [39].

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass bei der klinischen Anwendung der meisten bisher verfügbaren Knochenfüllstoffe und Knochenkleber einige gravierende Nachteile deutlich werden [29]. Einen bedeutenden Nachteil stellt die oben beschriebene Polymerisationshitze dar, die viele Substanzen – insbesondere PMMA – entwickeln. Diese thermische Schädigung kann zu Nekrosen des umliegenden Gewebes führen. Schwierigkeiten ergeben sich des Öfteren auch durch die Anwendung in feuchtem Milieu, welches durch Blut und Gewebeflüssigkeit bedingt sein kann. Es kann hierbei zu Störungen der Adhäsion der Knochenkleber oder der Festigkeit der Knochenfüllstoffe kommen. Zwar weisen die meisten heute kommerziell verfügbaren Knochenzemente eine hohe Haltbarkeit auf. Allerdings führt eben diese hohe Haltbarkeit zu einer schlechteren Degradationsfähigkeit, so dass die endogene Knochenheilung verhindert wird. Nach wie vor können einige Biomaterialien allergen oder toxisch wirken und lokale Gewebereaktionen sowie die Induktion von Fremd-

körperreaktionen auslösen, was zu verzögerter Kallusbildung, Hautnekrosen oder Fistelungen führen kann. Die genannten Faktoren können schließlich zu einer sekundären Lockerung und somit zum Implantatversagen führen [38].

Nach wie vor ist es nicht gelungen, eine ideale Substanz zu entwickeln, die den hohen Anforderungen gerecht wird, die man an ein solches Knochenfüllmaterial stellen muss. Insbesondere im Bereich der Biokompatibilität und raschen Degradation stehen die entscheidenden Entwicklungen noch aus.

#### 1.1.6. Entwicklung eines bioresorbierbaren Knochenfüllmaterials

Am Friedrich-Baur-Forschungsinstitut für Biomaterialien der Universität Bayreuth wurde entsprechend den klinischen Anforderungen eine neue Knochenfüllmasse entwickelt, die Hydroxylapatit (HA) als Grundsubstanz verwendet. Dieses ist biokompatibel und biodegradierbar [25;40;41], nicht toxisch und weist eine geringe Antigenität auf [40]. HA wird als osteokonduktiv eingestuft [30,40] und häufig in Verbindung mit einer internen Fixation eingesetzt [30]. Außerdem besteht Knochen selbst zu ca. 50% HA [30], so dass HA die Knochenanlagerung induziert [33]. Liegt HA als gesintertes Material vor, wird es jedoch relativ schlecht resorbiert [27]. Die Besonderheit des neu entwickelten Materials liegt darin, dass es einerseits aus einem biokompatiblen Material besteht, und andererseits kovalent an das umgebene Gewebe bindet. Hierzu wurden zwei Typen von Hydroxylapatitpartikeln verwendet, wobei HA zum einen mit deacetyliertem Chitosan und zum anderen mit oxidiertem Stärke beschichtet wurde. Chitosan, ein Mucopolysaccharid, ist biodegradierbar, nicht-toxisch, antibakteriell [40;42;43] und besitzt hämostatische Eigenschaften [40;44]. Ferner beschleunigt es die Wundheilung, wirkt entzündungshemmend [44] und ist biokompatibel

[40;42]. Chitosan weist eine geringe Antigenität auf [42], jedoch fördert es die Zelladhäsion und besitzt osteokonduktive Eigenschaften [42]. Stärke ist ebenfalls biokompatibel und nicht toxisch [44]. Des Weiteren verbessert es die Knochenadaptation, fördert die Zelladhäsion [44] und ist biodegradierbar [45]. Chitosan stellt die aminogruppenhaltige Komponente (R-NH<sub>2</sub>) dar, wohingegen durch Oxidation der Stärke die aldehydruppenhaltige Komponente (R-CH=O) gewonnen wird. Nach Zugabe von Wasser erfolgt hierbei innerhalb von Sekunden eine kovalente Bindung zwischen den Partikeln unter Bildung sog. Schiff'scher Basen (Iminreaktion; s. Abb. 2).

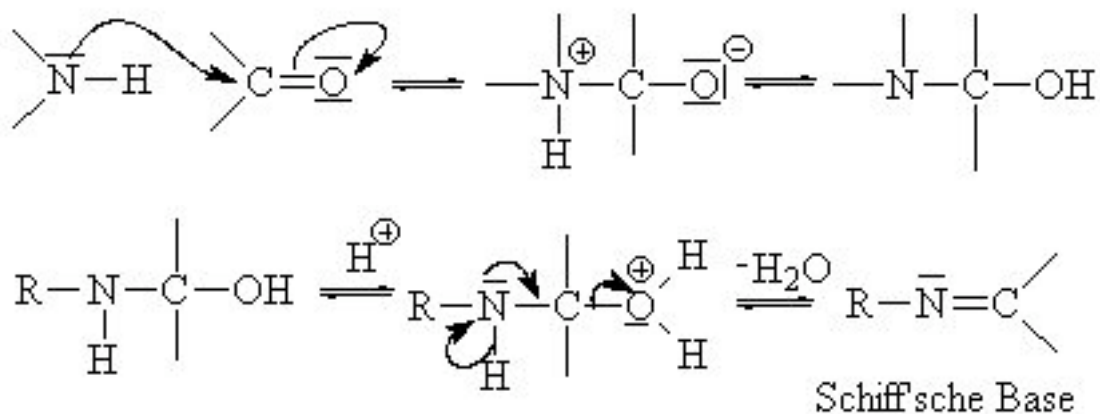


Abb. 2. Bildung einer Schiff'schen Base [46]

Gleichzeitig können Moleküle der oxidierten Stärke eine kovalente Bindung zu Aminogruppen eingehen, die von dem umgebenden Knochengewebe zur Verfügung gestellt werden (s. Abb. 3), was eine erhöhte Primärstabilität bedingt.

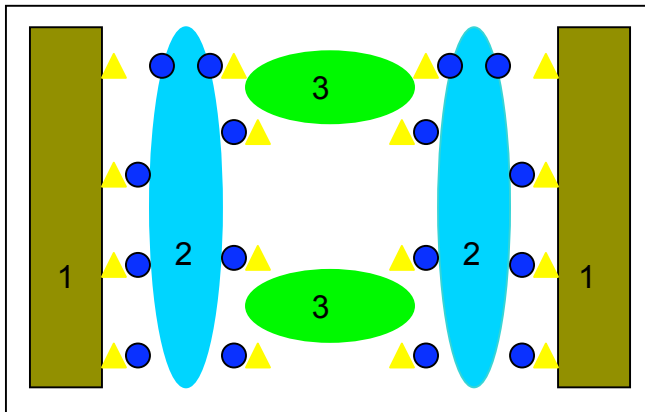


Abb. 3. Klebprinzip: 1) Knochen; 2) stärkebeschichtetes HA; 3) chitosanbeschichtetes HA;

● Aldehydgruppe, ▲ Aminogruppe. Moleküle der oxidierten Stärke können kovalente Bindungen zu Aminogruppen des Knochens eingehen

Ein Vorteil des neu entwickelten Füllstoffes gegenüber den bislang vorhandenen Knochenersatzmaterialien ist, dass die Partikel untereinander und mit dem umliegenden Knochengewebe auch in feuchtem Milieu Bindungen eingehen können. Wichtig ist ferner, dass das ausgehärtete Knochenfüllmaterial in feuchtem Milieu physikalisch beständig bleibt. Außerdem entsteht während der Aushärtungsphase keine Polymerisationshitze. Das Knochenfüllmaterial ist ebenso wie seine Einzelbestandteile biokompatibel und erfüllt damit eine der wesentlichen Anforderungen, die man an eine Knochenfüllsubstanz stellen muss. Weiterhin kann die Viskosität leicht durch Änderung des Verhältnisses Wasser:Pulver variiert werden und so den Bedürfnissen des Chirurgen angepasst werden. Ferner ist das Knochenfüllmaterial weder toxisch noch allergen und die Komponente Chitosan weist antibakterielle und hämostatische Eigenschaften auf. Liegt HA in Pulverform vor, so ist es schneller resorbierbar als gesintertes HA.

### 1.1.7. Untersuchung des Knochenfüllmaterials *in vitro*

Im Rahmen von Vorversuchen wurde die Toxizität des Knochenfüllmaterials *in vitro* untersucht [47]. Hierbei wurde das Knochenfüllmaterial mit Mausfibroblasten (MC3T3) besiedelt. Die MC3T3 wurden in direkten Kontakt zu dem neuen Knochenfüllmaterial gebracht und unter standardisierten Bedingungen kultiviert. Nach 1, 3 und 6 Tagen wurde jeweils eine Probe mit einer Vitalfärbung markiert. Es zeigte sich, dass die Zellen auf der Oberfläche des Knochenfüllmaterials vital waren, sich ausbreiteten und vermehrten. Dies deutet auf eine gute Interaktion zwischen den Zellen und der Oberfläche des Knochenfüllmaterials hin. Das Knochenfüllmaterial wurde als biokompatibel eingestuft.

## 1.2. Aufgabenstellung

### Untersuchung des Knochenfüllmaterials *in vivo*

Um einen Einsatz beim Menschen zu ermöglichen, ist es notwendig, die Biokompatibilität eines neuen Knochenfüllmaterials zunächst im Rahmen von präklinischen Studien *in vivo* zu untersuchen. Für die Materialtestung stehen sowohl Kleintier- als auch Großtiermodelle zur Verfügung. Beide Modelle sind ausreichend beschrieben und etabliert. Jedes Modell, das seine spezifischen Vorteile und Nachteile besitzt, ist für unterschiedliche wissenschaftliche Fragestellungen geeignet. Da unsere Studie darauf abzielte, Informationen über die grundlegenden Eigenschaften des Knochenfüllmaterials zu erlangen, entschieden wir uns aus ethischen Gründen für ein Kleintiermodell. Für die Testung des Knochenfüllmaterials wurde ein neuartiges Mausmodell entworfen, das ein heterotopes, subkutanes Tiermodell mit einem orthotopen,

intraossären Defektmodell kombiniert (Übersicht s. Abb. 7). In dem orthotopen Modell sollte unter anderem die Biodegradation quantitativ erfasst werden, da frühere Studien zeigten, dass Hydroxylapatit-basierte Materialien eine geringe Biodegradation aufweisen. Weiterhin sollte hier die Knochenneubildung untersucht werden. Es wurde ein Defekt in die distale Femurmetaphyse gesetzt und das Knochenfüllmaterial eingebracht. Das heterotope Modell wurde gewählt, um die Biokompatibilität qualitativ zu erfassen, indem die zelluläre Reaktion um das Knochenfüllmaterial herum untersucht werden sollte. Dies geschah in einem subkutanen Mausmodell, in welchem das Knochenfüllmaterial paravertebral implantiert wurde. In beiden Modellen wurde Polyethylen als Kontrollkörper implantiert. Es wurden athymische Mäuse als Versuchstiere verwendet. Mittels histologischer Methoden sollten Gewebereaktion, Degradation und Knochenheilung nach Implantation der Knochenfüllsubstanz überprüft und daraus Rückschlüsse auf die Verträglichkeit beim Menschen gezogen werden.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis der Gewebeverträglichkeit eines neuartigen resorbierbaren Knochenfüllmaterials zur Unterfütterung von metaphysären Frakturen im osteoporotischen Knochen sowie zur Stabilisierung von Wirbelkörperfrakturen im Rahmen von Vertebroplastie und Kyphoplastie. Hierbei soll die Biokompatibilität im Kleintiermodell untersucht werden, um einen langfristigen Einsatz beim Menschen zu ermöglichen. Es sollen Gewebereaktion, Degradation und Knochenheilung nach Implantation der Knochenfüllsubstanz überprüft werden. Im Rahmen dieser Studie soll ein neuartiges Kleintiermodell etabliert werden, das es ermöglicht, eben diese Eigenschaften zu untersuchen.



## 2. Material und Methoden

Der experimentelle Teil der Arbeit wurde in den Räumen der experimentellen Chirurgie und regenerativen Medizin (ExperiMed) an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik - Innenstadt, Klinikum der Universität München durchgeführt. Die Entwicklung des Knochenfüllmaterials erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Friedrich-Baur-Institut der Universität Bayreuth. Die Operation und Unterbringung der Tiere erfolgte in der Zentralen Versuchstierhaltung der LMU München. Die histologische Aufarbeitung der Präparate erfolgte in den Laboren der Anatomischen Anstalt - Lehrstuhl Anatomie I, LMU München.

### 2.1. Knochenfüllmaterial

Als Zielvorgabe sollte ein gewebeverträgliches, resorbierbares Knochenfüllmaterial zur Unterfütterung metaphysärer Frakturen im osteoporotischen Knochen entstehen. Als Basis diente Hydroxylapatit (HA) in Pulverform, welches in Analogie zu einem zuvor entwickelten Knochenklebstoff [47] derart beschichtet wurde, dass das Pulver unter Bildung einer Schiff'schen Base unter Zugabe von Wasser kovalent vernetzt wird. Die Beschichtung besteht zu gleichen Teilen einerseits aus der aminogruppenhaltigen Komponente Chitosan und andererseits aus der aldehydgruppenhaltigen Komponente Stärke. Bei Kontakt der Kleberkomponenten in wässriger Lösung erfolgt innerhalb von Sekunden eine kovalente Bindung unter Bildung Schiff'scher Basen (s. Abb. 2). Die Beschichtung von Hydroxylapatitmolekülen mit dem Gewebekleber bedingt die zähe Haftung der Moleküle des Knochenfüllmaterials untereinander. Gleichzeitig können Aminogruppen des umliegenden Gewebes in die Reaktion ein-

gebunden werden, wodurch das Material vor Ort fest abbindet. Als Kontrolle für die Implantation wurde das weitgehend inerte Material Polyethylen eingesetzt. Dieses ruft bekanntermaßen keinerlei Reaktion hervor. Wir verwendeten Polyethylen, da es sich um einen Kunststoff von hoher chemischer und physikalischer Beständigkeit handelt, welcher gleichzeitig eine gute Bioverträglichkeit aufweist.

### 2.1.1. Herstellungsprozess

Der genaue Herstellungsprozess sowie die *in vitro*-Testung des Materials wurden ausführlich in der Publikation Hoffmann et al. [47] beschrieben. Zusammengefasst lässt sich dieser wie folgt beschreiben. Es wurden Hydroxylapatit (HA, Merck), Chitosan (Sigma Aldrich; niedrig molekular, Molekulargewicht: 50.000-190.000; Grad der Deacetylierung: 75-85%) und lösliche Stärke (Merck) verwendet. Chitosan wurde deacetyliert und Stärke oxidiert. Beide Stoffe wurden für 72 Stunden einer Dialyse unterzogen und anschließend gefriergetrocknet. In Folge dessen wurde des Hydroxylapatit mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (2 Vol%) in Ethanol/Wasser vermischt, so dass auf der Oberfläche Aminogruppen kovalent gebunden wurden. Nach zwei Reinigungsschritten wurde dieses veränderte HA mit oxidierte Stärke (5ml, Lösung 3%) und deacetyliertem Chitosan (5ml, Lösung 3%) funktionalisiert. Insgesamt wurde dieses Vorgehen 18x wiederholt, wobei deacetyliertes Chitosan die äußerste Schicht bildete. Die Hälfte des Pulvers wurde wiederum mit einer abschließenden Schicht von oxidierte Stärke funktionalisiert, so dass zwei verschiedene Gemische entstanden, welche separat getrocknet wurden. Anschließend wurde das Pulver in einem Verhältnis von 1:1 gemischt, das heißt es lagen 50% deacetyliertes Chitosan und 50% oxidierte Stärke als funktionelle Gruppen vor. Für die Versuche wurde 1g Pulver mit 1,7ml Aqua ad. Inj. angemischt.

Für die Kontrollgruppen wurden aus einem standardisierten Polyethylenblock (3mm Dicke) Zylinder (3mmx3mm für die subkutane Implantation und 3mmx0,9mm für die intraossäre Implantation) ausgestanzt und bei 121°C für 20 min autoklaviert.

## **2.2. *In vivo* Testung**

### 2.2.1. Versuchstiere

Das Versuchsvorhaben wurde gemäß § 8 TSchG der Regierung von Oberbayern zur Genehmigung vorgelegt und bewilligt (amtliches Aktenkennzeichen 01-06). Alle Eingriffe an Tieren wurden unter strikter Berücksichtigung der geltenden Rechtsbestimmungen (TSchG i. d. F. vom 18. Mai 2006) durchgeführt. Alle Versuchstiere wurden speziell für Versuchszwecke gezüchtet und von einer zugelassenen Firma (Janvier, LeGenest St Isle, Frankreich) bezogen. Als Versuchstiere gingen insgesamt 72 weibliche athyme HsdWin:NMRI Auszucht-Mäuse in einem Alter von 10 Wochen (Lebendgewicht ca. 30 g) in den Versuch ein.

Für die Haltung der Mäuse wurden Standardkäfige aus Makrolon, Typ 1500 (Tecniplast, Italien) verwendet. Die Besatzdichte je Käfig betrug fünf Tiere. Die gesamte Haltung erfolgte in sogenannten Typ-III Longkäfigen in klimatisierten Räumen (20-25°C Raumtemperatur, relative Luftfeuchtigkeit 60-70%, Hell-Dunkel-Rhythmus von zwölf Stunden mit Dämmerungsphase). Futter (Alleinfuttermittel Haltung von sniff, Deutschland) und Wasser wurden ad libitum angeboten. Als Einstreu wurden in der Zentralen Versuchstierhaltung (ZVH) LIGNOCEL Naturfaser-Compounds (Firma J.

Rettenmaier & Söhne, Rosenberg) verwendet. Vor Besatz der Käfige wurden diese, ebenso wie Einstreu, Futter und Wasser autoklaviert. Alle Räume waren speziell für die Tierhaltung (gem. § 11 Abs. 1 Nr. 1 TSchG) zugelassen und die artgerechte Pflege wurde von ausgebildetem Tierpflegepersonal gewährleistet. Eine Umsetzung der Tiere erfolgte im Wochenrhythmus. Alle Tiere wurden durch die versuchsdurchführenden Personen regelmäßig kontrolliert. Für die Nutzung der gesamten Anlage galten generell eine personenlimitierte Zutrittskontrolle und hohe Hygienestandards. Somit war das Anlegen spezieller Schutzkleidung bei Betreten der Haltungs- und Operationsräume vorgeschrieben. Zur Überprüfung des Hygienestatus wurden im Betrieb vierteljährlich Sentineltiere mikrobiologisch untersucht, um sicherzustellen, dass die Tiere nicht an Erkrankungen leiden, die die Versuchsergebnisse beeinflussen könnten. Die Tiere durchliefen eine Akklimatisationszeit von zwei Wochen vor Beginn der Versuche.

### 2.2.2. Narkose und Vorbereitung

Für die Narkose kam eine Kombination aus Fentanyl (0,005mg/kg KGW), Midazolam (2mg/kg KGW) und Medetomidin (0,15mg/kg KGW) zum Einsatz. Die Kombination wurde unverdünnt in einer Mischspritze intramuskulär appliziert (s. Tab. 2).

Zur Antagonisierung der MMF-Kombinationsnarkose wurde eine Mischung aus Naloxon (0,12mg/kg KGW), Flumazenil (0,2mg/kg KGW) und Atipamezol (0,75mg/kg KGW) verwendet; die Applikation erfolgte ebenfalls intramuskulär (s. Tab. 2).

Wirkstoff	Konzentration
Narkose	
Medetomidin	0,15 mg/kg
Midazolam	2 mg/kg
Fentanyl	0,005 mg/kg
Antagonisierung	
Atipamezol	0,75 mg/kg
Flumazenil	0,2 mg/kg
Naloxon	0,12 mg/kg

**Tab. 2** Eingesetzte Narkose und Antagonisierung

Bei allen Versuchsreihen erhielten die Tiere bis unmittelbar vor dem Eingriff freien Zugang zu Futter und Wasser. Um die Stressbelastung so gering als möglich zu halten, erfolgte das präanästhetische Handling ruhig und beschränkte sich auf eine adspektorische Untersuchung zur Feststellung der Narkosetauglichkeit sowie die Gewichtsbestimmung. Die Zuteilung zu den unterschiedlichen Versuchsgruppen erfolgte gemäß eines vorab festgelegten Randomisierungsschemas. Nach intramuskulärer Applikation des Narkosegemisches wurden die Tiere bis zum Wirkungseintritt in leere Käfige gesetzt. Die Vorbereitung für die Operation fand nach Verlust der Stellreflexe statt. Durch sofortiges Aufbringen von Augensalbe (Bepanthen®, Roche, Deutschland) konnte eine Schädigung der Cornea durch Austrocknung verhindert werden. Der zu operierenden Bereich wurde geschoren, gereinigt und mit Hautdesinfektionsmitteln vorbereitet (Octenisept, Kodan, Schülke & Mayr, Deutschland). Die Lagerung zur Operation erfolgte nach Abschluss der Vorbereitung in Bauchlage (heterotope Implantation) bzw. in Rückenlage (orthotope Implantation) auf dem Ope-

rationstisch auf einer elektrischen beheizbaren Unterlage. Eine Sauerstoffmaske mit einer Durchflussrate von 2,0 l/min gewährleistete während der Narkose eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Tiere. Das gesamte Operationsfeld wurde steril abgedeckt.

### 2.2.3. Gruppeneinteilung

Es erfolgte die Etablierung eines geeigneten Tiermodells für die intravitale Testung des zuvor entworfenen und getesteten Knochenfüllmaterials. Dieses entworfene Modell besteht aus zwei unterschiedlichen Implantationen. Einerseits wurde das Knochenfüllmaterial subkutan implantiert (heterotope Implantation), andererseits wurde es intraossär injiziert (orthotope Implantation). Für das heterotope Tiermodell wurden insgesamt 24 Tiere wie zuvor beschrieben anästhesiert (s. Tab. 3). Pro Tier wurden paravertebral vier subkutane Taschen präpariert. Bei 12 Tieren wurden jeweils vier luftgetrocknete Zylinder des Knochenfüllmaterials eingebracht. Analog wurden wiederum bei 12 Tieren jeweils 4 sterile Polyethylenzylinder (3x3mm) implantiert. Nach einer, drei und neun Wochen wurden schließlich jeweils 8 Tiere euthanasiert. Für die intraossäre Implantation wurden insgesamt 48 Tiere anästhesiert (s. Tab. 4). Als Implantationsort wurde die distale Metaphyse gewählt, wobei ein Defekt von 0,9mm Durchmesser geschaffen wurde. Bei 24 Tieren wurde in beiden Femora das frisch angemischte Knochenfüllmaterial eingebracht. Bei 24 weiteren Tieren wurde analog Polyethylen implantiert. Hier wurden wiederum nach einer, drei und neun Wochen jeweils 16 Tiere euthanasiert.

Explantation (Wochen post operationem)	Anzahl der Tiere für die Implantation des Knochenfüllmaterials	Anzahl der Tiere für die Implantation des Polyethylens
1	4	4
3	4	4
9	4	4

**Tab. 3** Heterotopes Tiermodell: die Implantation des Knochenfüllmaterials erfolgte subkutan

Explantation (Wochen post operationem)	Anzahl der Tiere für die Implantation des Knochenfüllmaterials	Anzahl der Tiere für die Implantation des Polyethylens
1	8	8
3	8	8
9	8	8

**Tab. 4** Orthotopes Tiermodell: die Implantation des Knochenfüllmaterials erfolgte intraossär

#### 2.2.4. Operationen

Für das heterotope Tiermodell wurde das Knochenfüllmaterial zunächst angemischt und in Form von 3x3mm messenden Zylindern luftgetrocknet. Zur Implantation wurde die Haut über der Wirbelsäule mit zwei ca. 8mm langen Inzisionen kranial und kaudal eröffnet. Nach vorsichtiger Präparation zur Bildung von je zwei subkutanen Taschen wurde die Substanz insgesamt 4x paravertebral links und rechts eingebracht. Die Kontrollgruppen wurden in gleicher Weise mit einem Kontrollimplantat (Polyethylen-

zylinder, 3x3mm) versorgt. Die Hautnaht erfolgte mit einem nicht-resorbierbarem Material (5-0 Prolene) in Einzelknopfnahntechnik.

Bei der intraossären Implantation erfolgte der Hautschnitt am lateralen distalen Oberschenkel in Längsrichtung, beginnend auf Höhe des oberen Patellapoles, 8mm nach kranial ziehend (s. Abb. 4A). In gleicher Länge wurden die oberflächliche Faszie und das interfasziale Fettgewebe durchtrennt, stumpf gelöst und gespreizt. Anschließend wurde die Fascia lata am kranialen Rand des M. biceps femoris durchtrennt und der Schnitt bogenförmig seitlich des lateralen Rollkamms bis zur Tuberositas tibiae durch die Fascia genus verlängert. Nun wurden die Fascia genus und der M. vastus lateralis mobilisiert und gespreizt. Der Femurschaft wurde in einem Areal von 2x2mm frei präpariert. Anschließend wurde mit einem Bohrer der Stärke 0,9mm ein bikortikaler zylindrischer Defekt in rechtem Winkel zur Femurachse in die distale Femurmetaphyse gesetzt (s. Abb. 4B). Das Knochenfüllmaterial wurde frisch angemischt und in einem noch weichen Zustand über eine Kanüle in den Defekt eingebracht (s. Abb. 4C). Die Kontrollgruppen wurden in gleicher Weise mit einem festen Körper aus Polyethylen (0,9x3mm) versorgt. An die Platzierung des Implantats schloss sich die schichtweise Adaptation der Wundränder in Einzelknopfnahnt mit resorbierbarem Nahtmaterial (5-0 Vicryl) an. Die Hautnaht erfolgte mit nichtresorbierbarem Material (5-0 Prolene), ebenfalls in Einzelknopfnahnt (s. Abb. 4D). Eine postoperative Bewegungseinschränkung der Tiere war nicht zu beobachten. Die Tiere wurden im Verlauf der ersten postoperativen Woche täglich klinisch untersucht, danach erfolgte eine Visite zweimal wöchentlich.

Postoperativ wurden alle Tiere regelmäßig tierärztlich untersucht, um deren Wohlbefinden zu kontrollieren. Um eine ausreichende Analgesie zu gewährleisten, erhielten



die Tiere das nichtsteroidale Antiphlogistikum Rimadyl® (Carprofen, 50 mg/kg KGW) s. c.. Die erste Applikation erfolgte bereits präoperativ, da dieses Medikament einen Wirkungseintritt von ca. 1-2 Stunden hat. Für die nachfolgenden drei Tage wurde die Applikation täglich wiederholt. Nach einer, drei und neun Wochen wurden die Mäuse mittels Kohlenstoffdioxid-Begasung euthanasiert. Hierauf folgte die makroskopische Untersuchung der Implantationsstellen sowie in der Folge die Explantation der Testkörper mit umgebenden Gewebe.

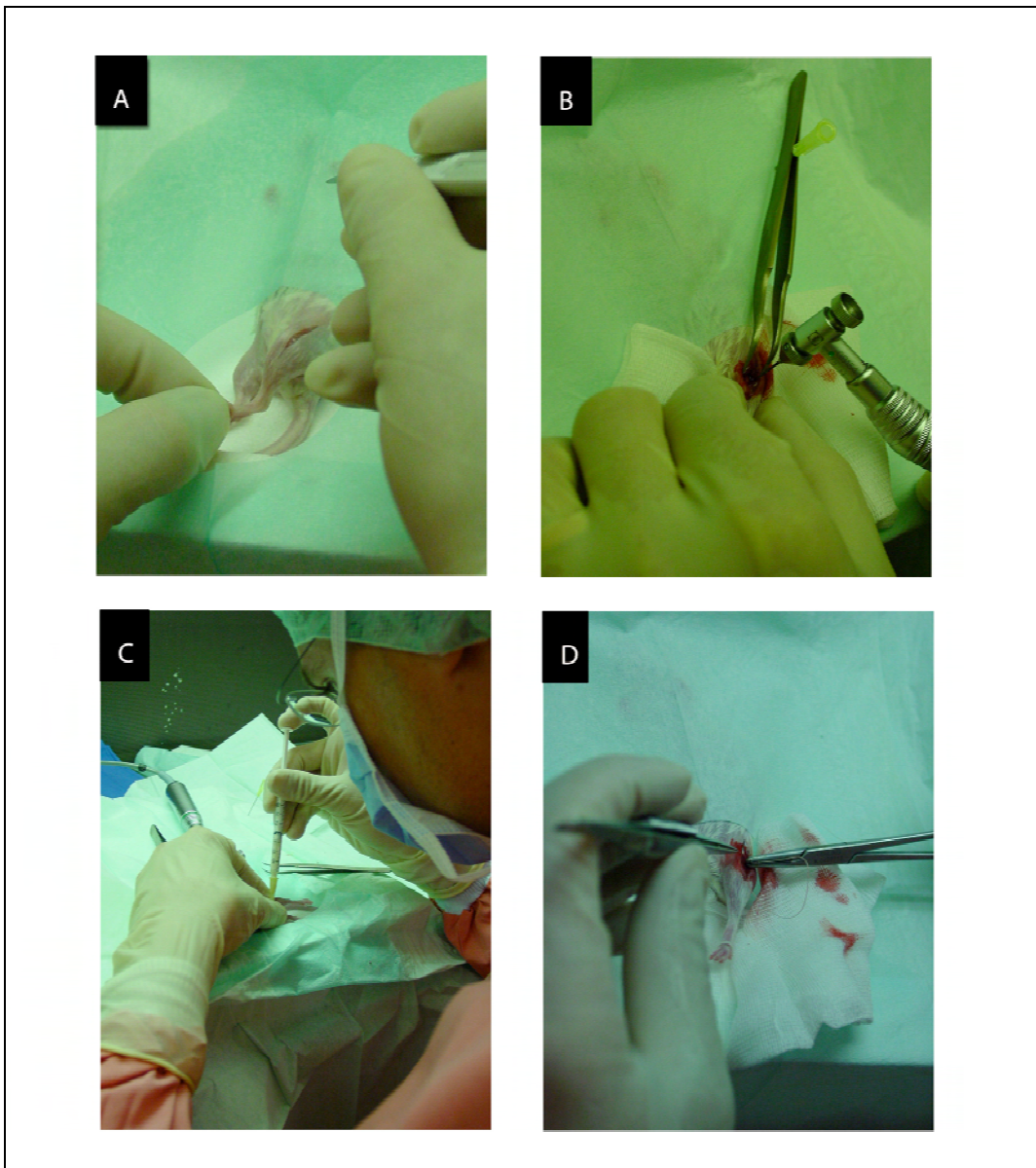


Abb. 4: Operatives Vorgehen bei der intraossären Implantation (orthotopes Mausmodell):

A) Zugang zum distalen Femur, beginnend auf Höhe des oberen Patellapoles, 8 mm nach kranial ziehend; B) der bikortikale, zylindrische Defekt in der Femurmetaphyse von 0,9mm wurde mittels eines Bohrers geschaffen; C) Einbringen des noch weichen, frisch angemischten Knochenfüllmaterials über eine Kanüle; D) der abschließende Verschluss der Haut erfolgte mit 5-0 nicht resorbierbarem Nahtmaterial (Prolene) in Einzelknopftechnik

### 2.2.5. Polychrome Fluoreszenzmarkierung

Die polychrome Fluoreszenzmarkierung dient zur Identifikation sowie zur sequenziellen Analyse der An- und Umbauprozesse am Knochen. Fluorochrome sind Chelatbildner, welche mit Calcium Komplexe bilden und innerhalb von 24 bis 48 Stunden in wachsendes Knochengewebe eingelagert werden. Auf diese Art können die Lokalisation sowie der Zeitpunkt der Knochenneubildung genau bestimmt werden. In der vorliegenden Studie wurden die fluoreszierenden Marker im orthotopen Tiermodell in einem Zeitraum von zwölf bis 22 Tagen (3-Wochen-Gruppe) bzw. vier bis neun Wochen (9-Wochen-Gruppe) post operationem subkutan verabreicht (s. Tab. 5 und Tab. 6). Es wurden die Marker Calcein, Alizarincomplexone und Rolitetrazyklin verwendet. Zu diesem Zweck wurden die Farbstoffe in den angegebenen Dosierungen (s. Tab. 5 und Tab.6) in einem Volumen von 0,5 ml je Tier in Injektionswasser gelöst und der pH- Wert durch Titration mit Natronlauge auf 7,2 eingestellt. Vor der Injektion wurde die Farbstofflösung steril filtriert. Die Auswertung wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Axioskop 2, Carl Zeiss, Berlin) durchgeführt.

Farbstoff	Applikation (Tage post operationem)	Dosierung (s. c. mg/kg KGW)
Calcein	12	15
Alizarincomplexone	20	30
Rolitetrazyklin	22	25

**Tab. 5** 3-Wochen-Gruppe: Farbstoffe der polychromen Fluoreszenzmarkierung mit Angabe des Injektionszeitpunktes nach der Operation sowie der Dosierung

Farbstoff	Applikation (Wochen post operationem)	Dosierung (s. c. mg/kg KGW)
Calcein	4	15
Alizarincomplexone	6	30
Rolitetrazyklin	9	25

**Tab. 6** 9-Wochen-Gruppe: Farbstoffe der polychromen Fluoreszenzmarkierung mit Angabe des Injektionszeitpunktes nach der Operation sowie der Dosierung

## 2.3. Histologische Aufarbeitung

### 2.3.1. Histologische Aufarbeitung der subkutanen Proben

Die subkutanen Proben wurden für die Histologie gemäß etablierten, standardisierten Protokollen in Paraffin eingebettet (Protokoll 1, s. Anhang). Dies ermöglicht unter Zuhilfenahme geeigneter Färbetechniken (s. 2.3.1.3.) eine realistische Beurteilung der

Zellmorphologie, vor allem der Übergangszonen zwischen Implantat und körpereigenem Gewebe.

#### 2.3.1.1. Fixierung und Einbettung

Die explantierten subkutanen Proben wurden für die histologische Aufarbeitung zunächst in 4%igem Formalin fixiert. Anschließend wurden die Proben für 2 Stunden fließend gewässert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (Protokoll 1, s. Anhang). Dann wurden die Proben 4 Stunden in Paraffin, einem Gemisch aus Alkanen, durchtränkt und schließlich in Paraffin definitiv eingebettet.

#### 2.3.1.2. Schneidetechnik

Es wurden mit einem Mikrotom (Mikrotom Supercut 2050, Reichert-Jung) 8µm dünne Schnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden auf Objektträger der Marke Superfrost Plus (Menzel) aufgeklebt und auf einer Heizplatte bei 40°C getrocknet. Bis zur Färbung wurden die Objektträger in einem Wärmeschrank (Jouan, Frankreich) bei 37°C aufbewahrt.

#### 2.3.1.3. Histologische Färbemethoden

Zur lichtmikroskopischen Untersuchung erfolgte die Färbung der 8µm dünnen Schnitte mit der Hämatoxilin-Eosinfärbung für Paraffinschnitte (Protokoll 2, s. Anhang). Es wurden hierbei die Färbungen Mayer's Hämalaun und Eosin 0,1% ver-

wendet. Die Schnitte wurden zuvor bei 60°C auf der Wärmebank eingebrannt. Das Eindeckeln erfolgte schließlich mit DPX (Fluka).

### 2.3.2. Histologische Aufarbeitung der intraossären Proben

Die intraossären Proben wurden für die Histologie in Methylmetacrylat (MMA) eingebettet (Protokoll 3, s. Anhang). Dies ermöglicht unter Zuhilfenahme geeigneter Färbetechniken (s. 2.3.2.3.) eine realistische Beurteilung der Zellmorphologie, vor allem der Übergangszonen zwischen Implantat und körpereigenem Gewebe. Schrumpfungs- und Zerreißungsartefakte, die als Folge einer Entkalkung der explantierten Knochen und Implantate auftreten können, wurden so vermieden.

#### 2.3.2.1. Fixierung und Einbettung

Die explantierten Femora wurden für die histologische Aufarbeitung in Methylmetacrylat (MMA) eingebettet. Im Vorfeld der Einbettung wurden die Proben für 24 Stunden in Formalin (4% Formaldehyd) fixiert. Nach der Fixierung wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (Protokoll 3, s. Anhang). Die Aufbewahrung der Proben erfolgte während dieser Zeit bei Raumtemperatur. An die Entwässerung der Proben schloss sich eine Präinfiltration bei 4°C in MMA und die Infiltration der Proben in einem MMA-Einbettgemisch (100ml MMA, 25ml Plastoid N (Monophenyl-Polyethyl-Glycol-Acetat) und 3,5g Benzoylperoxid) an. Um eine bessere Infiltration der Proben zu gewährleisten, wurde jeweils nach dem Wechsel von MMA und MMA-Einbettgemisch im Exsikkator für 20 min ein Vakuum erzeugt. Im Anschluss wurden alle Proben im Wasserbad bei 22°C polymerisiert. Die Aufbewahrung der

Proben bis zu dem Zeitpunkt des Schneidens erfolgte in einem Wärmeschrank bei 22°C (Jouan, Frankreich).

#### 2.3.2.2. Schneidetechnik

Nach der vollständigen Aushärtung des Kunststoffgemisches wurden die polymerisierten Kunststoffblöcke auf die Dimensionen der eingebetteten Proben mit einer Bandsäge zugetrimmt. Die Blöcke wurden mittels eines Sekundenklebers (Cyanolit Kleber 201 von Bürklin) auf einen Messinghalter aufgeklebt. Mit einer Innenlochsäge (Leitz, Wetzlar) wurden die Präparate auf die gewünschte Schnittebene zugeschnitten und 100 µm dünne Schnitte hergestellt. Diese Schnitte wurden anschließend für 15 Tage gepresst. Außerdem wurden 4µm dünne Schnitte mit einem Polycut-Schneidegerät (Polycut-E, Reichert-Jung) angefertigt. Der Probenblock wurde hierzu in die Vorrichtung gesetzt und gleichmäßig festgezogen. Anschließend wurde die Schnittdicke auf 4µm und der Rückhub auf 60µm eingestellt. Nach Einstellen der Schnittgeschwindigkeit erfolgte das Schneiden gesteuert durch Betätigen des Fußpedals. Der Block wurde regelmäßig mit 30% Ethanol bestrichen. Schließlich wurden die fertigen Schnitte mit einer Dumont Spitzzangpinzette entnommen, auf einen Objektträger Superfrost Plus (Menzel-Gläser) gelegt und mit 96% Ethanol glatt gestrichen. Die Objektträger wurden in einem Metallständer gestapelt und über Nacht in einem Wärmeschrank (Jouan, Frankreich) bei 60°C getrocknet.

### 2.3.2.3. Histologische Färbemethoden

Zur lichtmikroskopischen Untersuchung der 100µm und 4µm dünnen Schnitte wurden zwei verschiedene Färbungen verwendet. Eine Färbung stellte eine Trichromfärbung nach Masson-Goldner für MMA Schnitte dar (Protokoll 4, s. Anhang). Die Kernfärbung erfolgte mit Weigert's Eisenhämatoxin. Anschließend wurden die Schnitte mit Säurefuchsin-Ponceau gefärbt und mit Phosphorwolframsäure-Orange G differenziert. Die letzte Färbung erfolgte mit 1% Lichtgrün. Außerdem wurde eine Hämalan-Erythrosin-Färbung für MMA-Schnitte verwendet (Protokoll 5, s. Anhang). Die 4µm dünnen Schnitte waren zuvor über 24 Stunden mit Methoxyethylacetat (Merck) entacryliert worden. Im Anschluss an die Färbungen wurden die 4µm dünnen Schnitte mit DPX (Fluka) mit Deckgläsern (Menzel) eingedeckelt. Die 100µm dünnen Schiffe wurden für sieben Tage gepresst und anschließend mit Eukitt (O. Kindler GmbH & Co KG, Freiburg) auf Objektträgern Superfrost Plus (Menzel) mit Deckgläsern eingedeckelt.

### 2.3.3. Qualitative Auswertung

Die lichtmikroskopische Betrachtung und Auswertung erfolgte mittels eines Axioskops (Axioskop 2, Zeiss), die Erstellung von Fotos erfolgte mittels der Kamera AxioCam Jcc3 (Zeiss).

### 2.3.4. Quantitative Auswertung

Der intraossäre Abbau des Knochenfüllmaterials und des Kontrollkörpers Polyethylen nach jeweils einer, drei und neun Wochen wurden mit dem Programm Osteo-

measure Histomorphometrie System (Osteometrics, Atlanta, GA, USA) gemessen. Um eine quantitative Auswertung der Entzündungszellen zu erhalten, wurden von jedem subkutanen Präparat (Vergrößerung 20x) jeweils fünf zufällige Bildausschnitte (500x500 $\mu$ m) verwendet. Diese Abschnitte wurden durch ein Gitter der Größe 10x10 $\mu$ m in Kästchen untergliedert. Zwei unabhängige Personen zählten in fünf Kästchen pro Bildausschnitt die mononukleären Zellen, wobei jedes Kästchen direkt an das Implantat angrenzen musste. Alle statistischen Auswertungen erfolgten durch das Programm Sigmaplot 8.0 für Windows.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Etablierung eines Mausmodells

Im Zuge dieser experimentellen Arbeit wurde ein Mausmodell etabliert, welches es erlaubte, den Abbau und die Biokompatibilität eines neuen Knochenfüllstoffes zu untersuchen (s. Abb. 5).

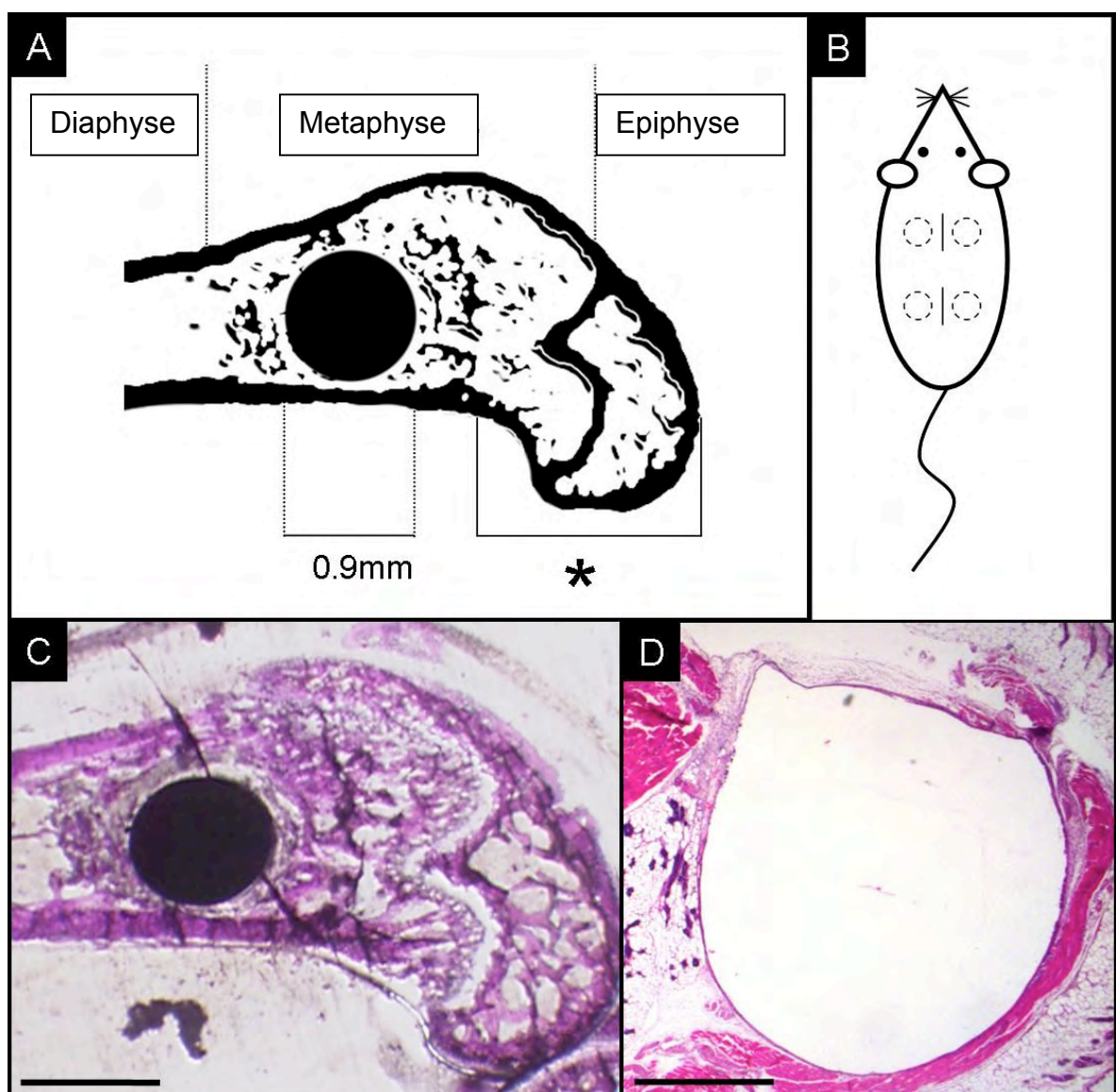


Abb. 5. Darstellung des *in vivo* Mausmodells, das für diese Studie konzipiert wurde: in A) ist die orthotope intraossäre Implantation der Prüfkörper in einen Bohrdefekt von 0,9mm Durchmesser in der

distalen Metaphyse eines Mausfemurs dargestellt (\* bezeichnet die Kondyle des Femurs). B) zeigt die subkutane Implantation von 4 Prüfkörpern, welche nach 2 Hautschnitten und darauf folgender Präparation paravertebral implantiert wurden. In C) ist ein exemplarischer histologischer Schnitt zu sehen, welcher die Metaphyse des distalen Femurs darstellt, wobei ein 0,9x3mm großer Zylinder Polyethylen implantiert worden war (Paragon-Färbung). D) zeigt einen histologischen Schnitt der subkutanen Proben, wobei ein 3x3mm großer Polyethylenzylinder eingebracht worden war.

Während die subkutane paravertebrale Implantation im Mausmodell gut beschrieben ist [48], ist die Beschreibung der orthotopen intraossären Implantation in der Literatur seltener zu finden. In der vorliegenden Studie wurde für die orthotope Implantation die distale Metaphyse des Mausfemurs gewählt. Dieses Modell wurde in Anlehnung an Uusitalo et al. entwickelt [49], der mittels eines scharfen Kirschner-Drahtes ein Loch bohrte, welches er dann mit einem stumpfen Bohrer auf eine Größe von 0,9mm erweiterte. Wir setzten einen bikortikalen Bohrlochdefekt von 0,9mm, jeweils in den rechten und linken Femur, und brachten das noch zähflüssige Knochenfüllmaterial ein (s. Abb. 4). Für die subkutane Implantation wurde das luftgehärtete Knochenfüllmaterial paravertebral kranial und kaudal jeweils rechts und links eingebracht.

Die Ergebnisse hinsichtlich der Durchführbarkeit und der Erfolgsrate werden im Folgenden beschrieben. Bei der Präparation musste insbesondere während der intraossären Implantation sehr vorsichtig vorgegangen werden, um bei der Darstellung des distalen Femurs nicht wichtige Nachbarstrukturen wie das Lig. collaterale fibulare oder das Lig. patellae zu verletzen. Gleichzeitig wurde streng darauf geachtet, das Kniegelenk nicht zu eröffnen. Zur Erzeugung standardisierter Defekte wurde eine vorgefertigte Bohrschablone eingesetzt. Diese erleichterte es uns, den Defekt so zu setzen, dass der Abstand zur ventralen und dorsalen kortikalen Begrenzung immer konstant war. Des Weiteren wurde ein zahnärztlicher Bohrer eingesetzt, wodurch

präziser als mit dem K-Draht gebohrt werden konnte. Dieses weiterentwickelte intra-ossäre Mausmodell wurde nun mit einem subkutanen paravertebralen Modell kombiniert. Hierbei wurden über zwei mediane Schnitte je subkutane Taschen gebildet und das luftgetrocknete Knochenfüllmaterial paravertebral kranial und kaudal jeweils links und rechts eingebracht. Somit wurden bei jedem Versuchstier subkutan vier Implantate eingebracht. Dieses Vorgehen ermöglichte eine Reduktion der Gesamtanzahl (s. Abb. 5B und D).

Bei einer Maus (1,04 % aller operierten Femora) kam es während der Operation zu einer Fraktur des distalen Femurs (s. Tab. 7). Diese Maus wurde sofort eingeschläfert. Bei zwei Tieren (2,08 % aller operierten Femora) wurden während der histologischen Aufarbeitung Frakturen festgestellt, welche klinisch nicht diagnostiziert worden waren, obwohl die Tiere regelmäßig von einem Veterinärmediziner untersucht worden waren (s. Tab 7). Eine Maus (1,39% aller operierten Tiere) der 3-Wochen-Gruppe erlitt eine systemische Infektion und starb (s. Tab. 7). Bis auf diese wenigen Ausnahmen wurden die chirurgischen Eingriffe gut toleriert. Bei zwei Femora (4,16% aller implantierten Polyethylenzylinder) war es nicht möglich, die Polyethylenzylinder korrekt zu platzieren, so dass diese Präparate nicht für die histologische Auswertung herangezogen werden konnten (s. Tab. 7). Die Mäuse bewegten sich schon am Tag der Operation bei unauffälligem Gangbild und Belastung wie nicht operierte Tiere.

Totalverluste	2 von 72 (2,78%)
Davon tödliche postoperative Infektionen	1 von 72 (1,39%)
Davon Femurfrakturen während des chi-	1 von 96 (1,04%)

urgischen Eingriffes	
Femurfrakturen, die während der histologischen Aufarbeitung festgestellt wurden	2 von 96 (2,08%)
Inkorrekte Platzierung des Implantates (Polyethylen-Gruppe)	2 von 48 (4,16%)

**Tab. 7** Evaluation des neu etablierten Mausmodelles mit einem Defekt in der Metaphyse des Femurs. Die Zahlen in Klammern repräsentieren den prozentualen Anteil von insgesamt 72 operierten Mäusen (Zeile 1 und 2) oder von insgesamt 96 operierten Femora (Zeile 3 und 4) oder von insgesamt 48 implantierten Polyethylenzylindern (Zeile 5).

### 3.2. Zelluläre Reaktion auf das Knochenfüllmaterial im orthotopen Mausmodell

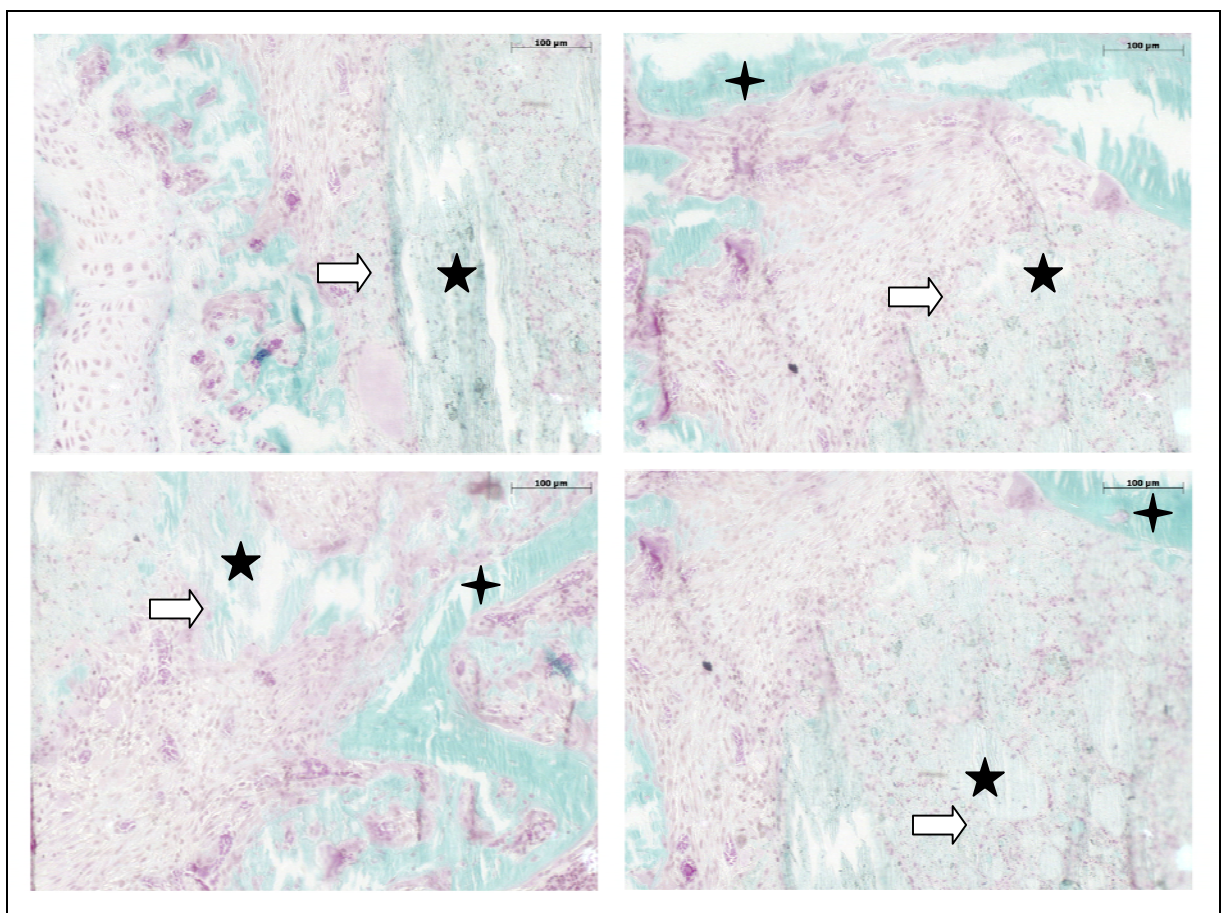




Abb. 6. Qualitative Auswertung der 1-Wochen-Gruppe bei intraossärer Implantation der Knochenfüllsubstanz: es wurden 4  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte auf die zelluläre Reaktion hin untersucht (Färbung: Trichrom nach Masson-Goldner, Vergrößerung 20-fach). Kortikaler Knochen stellt sich als leuchtend grün dar (✦), die Knochenfüllsubstanz als hellgrün (★), teilweise von rötlichen Knochenmarkszellen durchsetzt; um das Knochenfüllmaterial hat sich eine granulierende Entzündung gebildet (⇨)

Die Betrachtung der 1-Wochen-Gruppe unter dem Lichtmikroskop zeigte, dass sich um das Knochenfüllmaterial eine granulierende Entzündung gebildet hatte, die relativ zellreich war (s. Abb. 6). Es waren Granulozyten, Histozyten, Makrophagen und Fibroblasten zu erkennen. Des Weiteren zeigten sich hyperämische kleine Blutgefäße. Das Knochenfüllmaterial, das injiziert worden war, hatte sich mit Zellen des Knochenmarks vermischt und erschien hierdurch teilweise rötlich (s. Abb. 6).

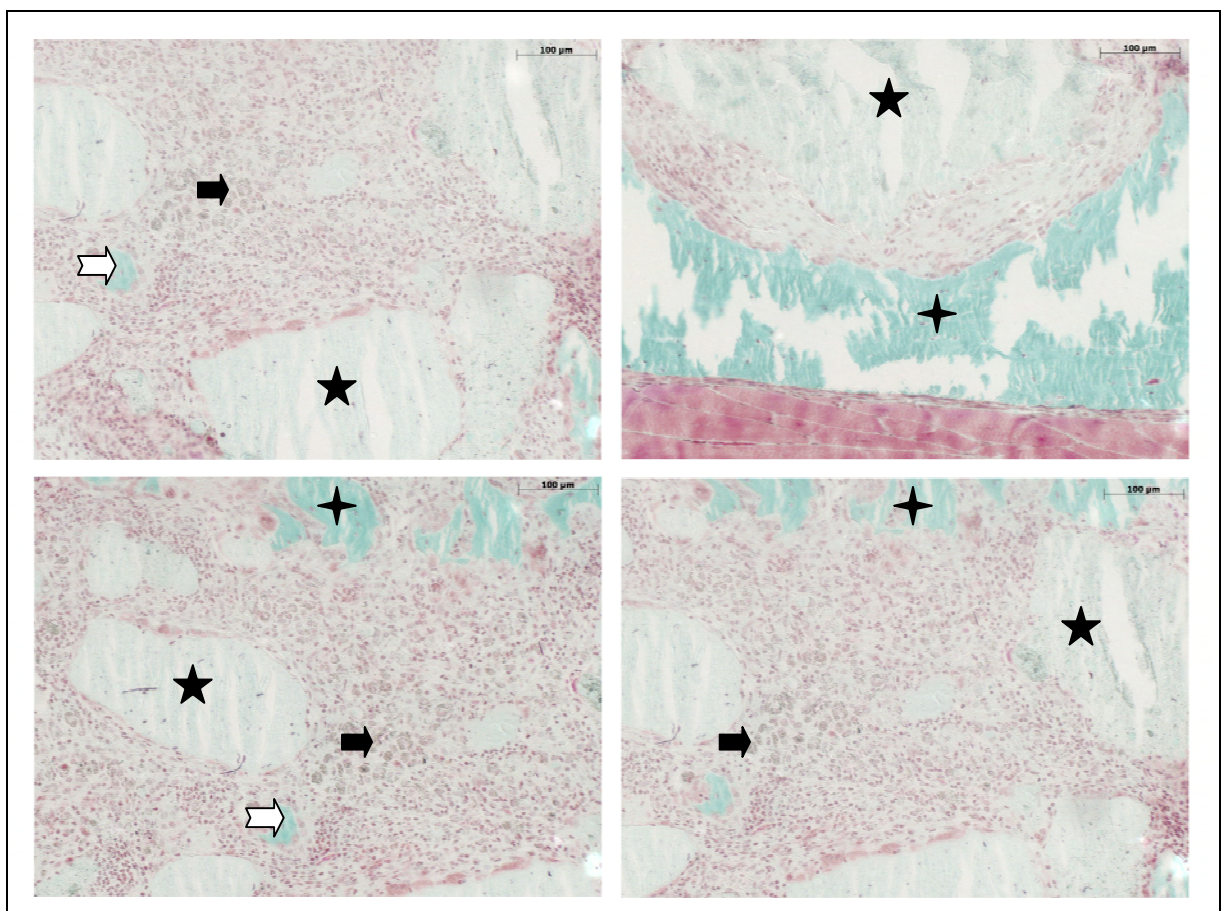


Abb. 7. Qualitative Auswertung der 3-Wochen-Gruppe bei intraossärer Implantation der Knochenfüllsubstanz: es wurden 4  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte auf die zelluläre Reaktion hin untersucht (Färbung: Trichrom nach Masson-Goldner, Vergrößerung 20-fach). Kortikaler Knochen stellt sich als leuchtend grün dar (✦), die Knochenfüllsubstanz als hellgrün (★). Die bräunlichen Ablagerungen in den Makrophagen stellen Reste der Knochenfüllsubstanz dar (➡). Außerdem ist neu gebildeter Knochen zu sehen (⇨).

Die Betrachtung der 3-Wochen-Gruppe unter dem Lichtmikroskop zeigte, dass die Entzündung weiterhin bestand, jedoch im Vergleich zur 1-Wochen-Gruppe zellärmer und faserreicher war (s. Abb. 7). Sie war zellulär relativ stark abgegrenzt. Reste des Knochenfüllmaterials waren als bräunliche Ablagerungen innerhalb von Makrophagen zu sehen. Das Knochenfüllmaterial war deutlich abgebaut. Außerdem konnte neu gebildeter trabekulärer Knochen identifiziert werden (s. Abb. 7).

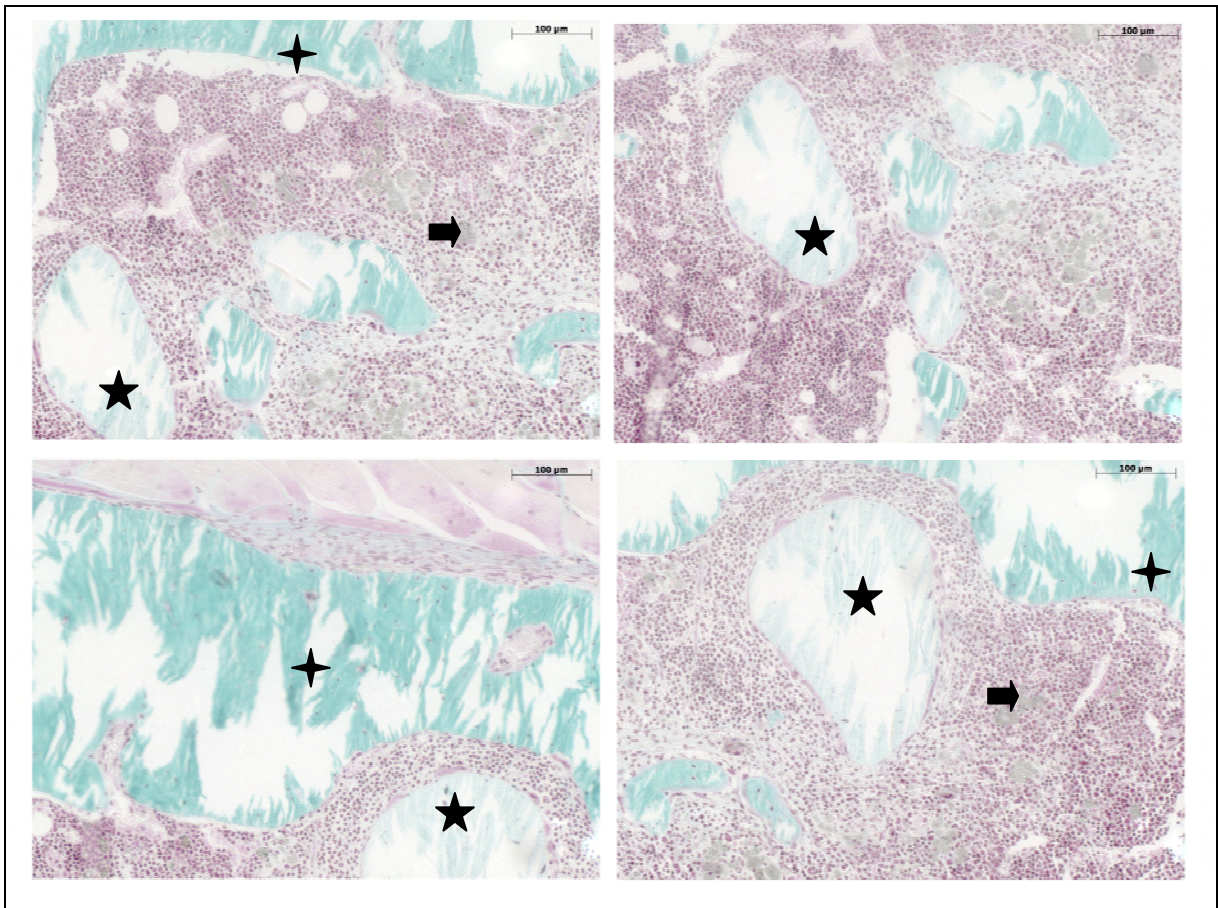


Abb. 8. Qualitative Auswertung der 9-Wochen-Gruppe bei intraossärer Implantation der Knochenfüllsubstanz: es wurden 4  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte auf die zelluläre Reaktion hin untersucht; (Färbung: Trichrom nach Masson-Goldner, Vergrößerung 20-fach). Kortikaler Knochen stellt sich als dunkelgrün dar (✦), die Knochenfüllsubstanz als hellgrün (★). Reste der Knochenfüllsubstanz stellen sich als bräunliche Ablagerungen in Makrophagen dar (■).

Die Betrachtung der 9-Wochen-Gruppe unter dem Lichtmikroskop zeigte ferner, dass die Entzündung deutlich abgeklungen war (s. Abb. 8). Abgeplattete Makrophagen waren als dunkelrosa Zellen um die Knochenfüllmasse zu erkennen. Makrophagen, die das Knochenfüllmaterial abbauten, waren als bräunliche Schaumzellen ersichtlich und markierten eine resorptive Reaktion. Das Knochenfüllmaterial war zu einem sehr großen Teil abgebaut (s. Abb. 8).

In keinem der Präparate konnten mehrkernige Riesenzellen erkannt werden.



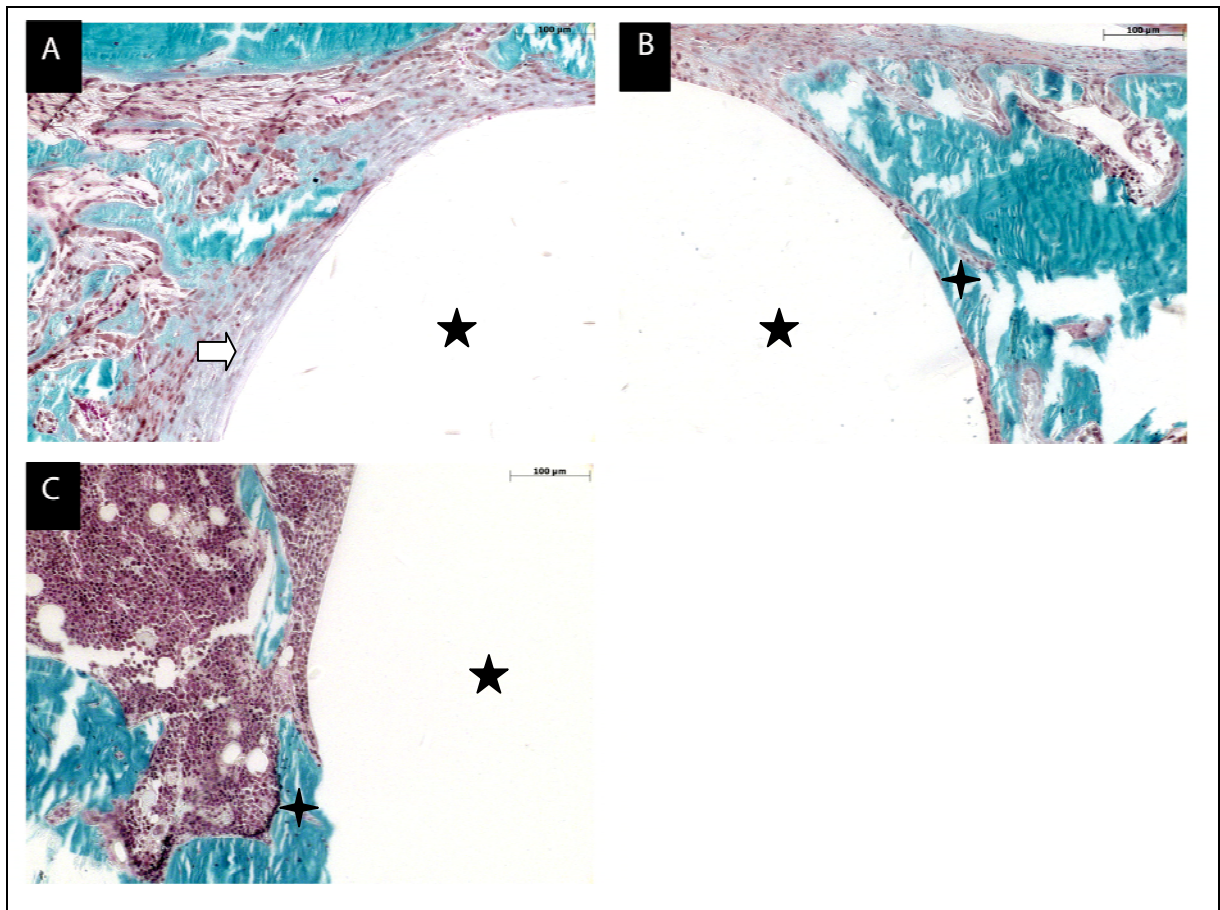


Abb. 9. Qualitative Auswertung der A) 1-Wochen-Gruppe, B) 3-Wochen-Gruppe und C) 9-Wochen-Gruppe bei intraossärer Implantation des Polyethylens: es wurden 4 µm dicke Schnitte auf die zelluläre Reaktion hin untersucht; (Färbung: Trichrom nach Masson-Goldner, Vergrößerung 20-fach). Die Polyethylenzylinder sind während des Schneidevorganges verloren gegangen und stellen sich nun als leere Fläche dar (★). Nach einer Woche besteht ein schmaler Entzündungssaum um das Implantat (⇨). Um die Polyethylenzylinder hat eine Knochenneubildung stattgefunden (★).

Die Polyethylenzylinder, die als Kontrollkörper implantiert worden waren, sind während des Schneidevorganges verloren gegangen. Das Polyethylen war auch nach neun Wochen nicht abgebaut. Die Betrachtung der Kontrollgruppen unter dem Lichtmikroskop ergab, dass sich zunächst ein schmaler Entzündungssaum gebildet hatte (s. Abb. 9). Diese Entzündung war jedoch nach neun Wochen abgeklungen (s. Abb. 9C). Weiterhin hatte eine Knochenneubildung stattgefunden. Diese wurde zu-



nächst durch einen schmalen fibrösen Randsaum von dem Polyethylen getrennt (s. Abb. 9B). Im Präparat der 9-Wochen-Gruppe war jedoch eine direkte Knochenanlagerung an den Polyethylenzylinder zu erkennen (s. Abb. 9C).

### 3.3. Abbau der Knochenfüllsubstanz im orthotopen Mausmodell

Ein Anliegen der Studie war es, zu untersuchen, ob und wie schnell das Knochenfüllmaterial nach intraossärer Applikation resorbiert wird. Hierzu wurde eine histomorphometrische Analyse durchgeführt (s. Abb. 10).

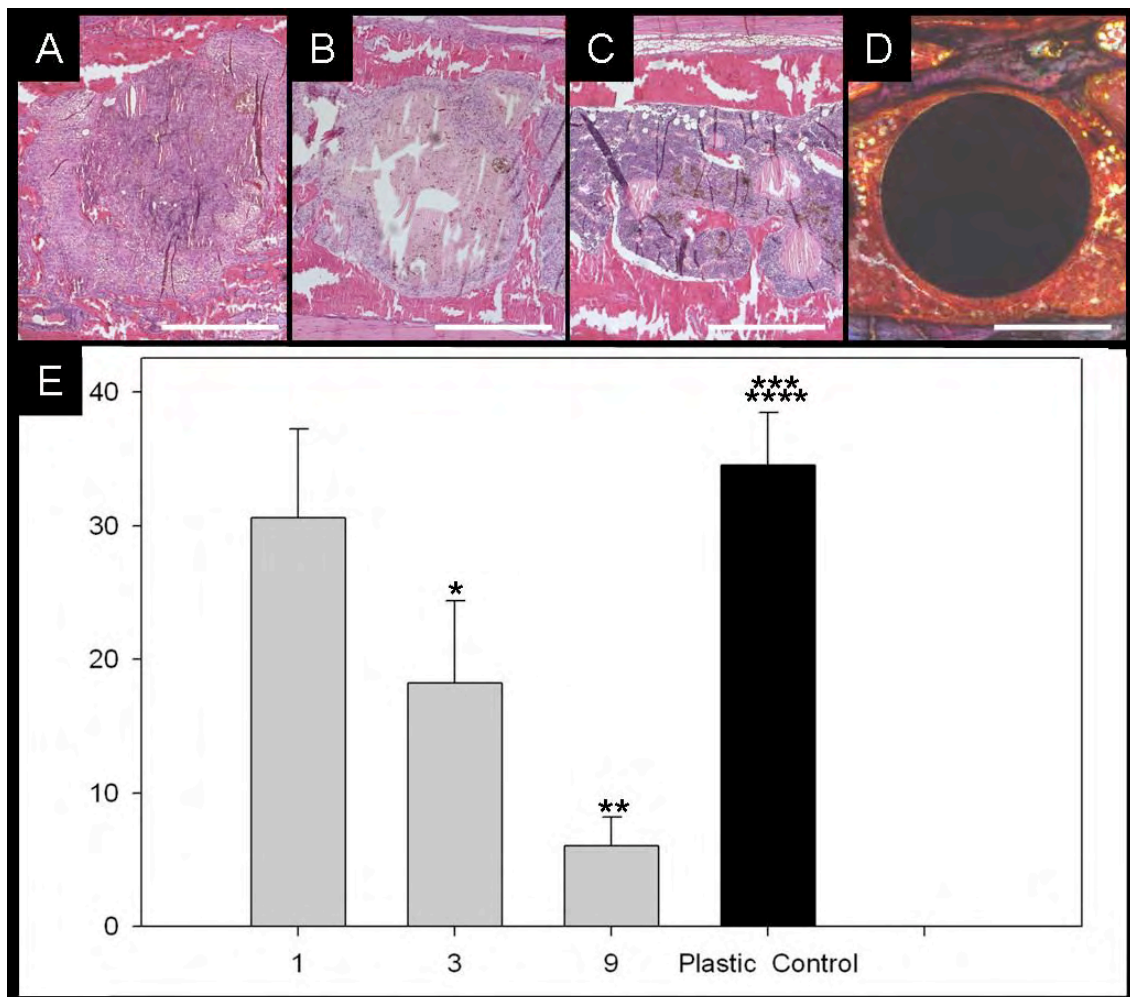


Abb. 10. Quantifizierung des Abbaus des Knochenfüllmaterials. Es wurden histologische Schnitte von 4µm Dicke nach A) einer Woche, B) drei Wochen und C) neun Wochen nach intraossärer Implantation der Knochenfüllsubstanz untersucht (Färbung: H&E). Im Vergleich hierzu wurden 50µm dicke Schnitte des Kontrollkörpers Polyethylen ausgewertet (Färbung: Trichrom nach Masson-Goldner). E) zeigt die histomorphometrische Analyse, in welcher die relative Fläche der verbliebenen Knochenfüllsubstanz nach einer Woche, drei Wochen und neun Wochen sowie die Fläche des Kontrollkörpers Polyethylen miteinander verglichen werden. Die Ergebnisse sind statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ): die 1-Wochen-Gruppe im Vergleich zur 3 Wochen-Gruppe ergibt ein  $p = 0,021$  (\*), die 3-Wochen-Gruppe im Vergleich zur 9-Wochen-Gruppe ergibt ein  $p = 0,030$  (\*\*), die 3-Wochen-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ergibt ein  $p = 0,0068$  (\*\*\*) und die 9-Wochen-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ergibt ein  $p = 0,0024$  (\*\*\*\*).

Pro Zeitpunkt wurden jeweils fünf Tiere, welchen die Knochenfüllsubstanz appliziert worden war, sowie fünf Tiere der Kontrollgruppen untersucht. Die Degradierung des entsprechenden Materials wurde quantitativ erfasst, indem die Fläche des Materials im Verhältnis zu der Gesamtfläche des Bildausschnitts der Probe ausgemessen wurde (Y-Achse). Die Bildausschnitte wurden bei jeder Probe gleich groß gewählt. Wir konnten zeigen, dass die Knochenfüllsubstanz innerhalb von neun Wochen kontinuierlich abgebaut wurde (s. Abb. 10E). Im Gegensatz hierzu wurde das Polyethylen nicht degradiert. Nach neun Wochen war das Knochenfüllmaterial zu ca. 75% abgebaut (s. Abb. 10E), was als gute Voraussetzung für das Remodeling des Knochens anzusehen ist. Die bräunliche Substanz, welche in den Schnitten der 9-Wochen-Gruppe (s. Abb. 10C) ersichtlich war, deutete auf eben diese Biodegradation hin.

### 3.4. Knochenanlagerung an die Knochenfüllsubstanz

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung der Präparate, bei welchen das Knochenfüllmaterial intraossär implantiert worden war, konnte eine direkte Anlagerung des Knochens an das Knochenfüllmaterial beobachtet werden. Die Knochenneubildung war als leuchtend grün zu erkennen (s. Abb. 13). Das Knochenfüllmaterial, das bereits zu einem großen Teil degradiert worden war, war als hellgrün zu erkennen (s. Abb. 13).

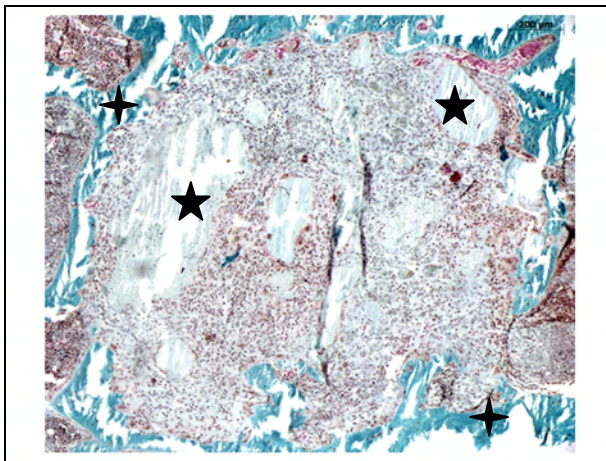


Abb. 11. Qualitative Auswertung der 3-Wochen-Gruppe bei intraossärer Implantation: (Färbung: Trichrom nach Goldner, Vergrößerung 10-fach). Die Knochenanlagerung am Rand des Knochenfüllmaterials ist als dunkelgrün (✦) im Vergleich zu dem als hellgrün imponierendem Knochenfüllmaterial (★) zu erkennen.

Zur weiteren Untersuchung der Knochenanlagerung wurden ungefärbte Schnitte der Dicke 100µm mittels eines Fluoreszenzmikroskopes untersucht. Den Mäusen der 3- und 9-Wochen-Gruppe waren, wie in 2.2.5. beschrieben, die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe injiziert worden. Diese Fluoreszenzfarbstoffe, welche mit Kalzium Komplexe bilden, werden in wachsendes Knochengewebe eingelagert. In Abbildung 12 sind Fluoreszenzbilder der 1-Wochen-Gruppe (hier wurden keine Fluoreszenz-

farbstoffe injiziert), der 3-Wochen-Gruppe und der 9-Wochen-Gruppe zu sehen (s. Abb. 12).

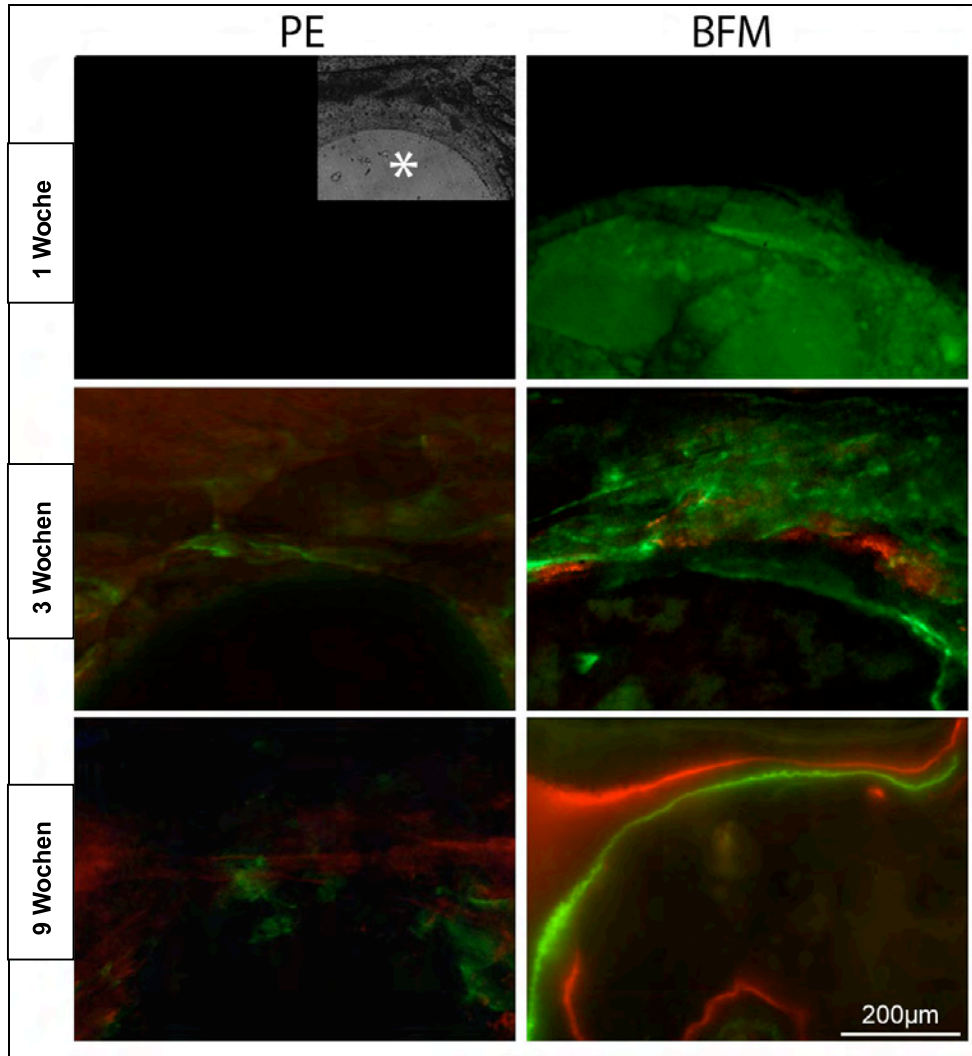


Abb. 12. Die *in vivo* Fluorochrom-Färbung zeigt, dass um das Knochenfüllmaterial (BFM) herum eine Knochenneubildung stattgefunden hat: den Mäusen der 3- und 9-Wochen-Gruppen waren rote und grüne Fluoreszenzfarbstoffe injiziert worden, welche Kalzium binden. Die eingelagerten Fluoreszenzfarbstoffe konnten mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes sichtbar gemacht werden. Bei der 1-Wochen-Gruppe, bei welcher keine Fluoreszenzfarbstoffe injiziert worden waren, lässt sich eine starke Autofluoreszenz des Knochenfüllmaterials erkennen. Das linke obere Bild zeigt einen verkleinerten Ausschnitt der entsprechenden Region der Kontrollgruppe, wobei keine Fluoreszenz um das Polyethylen (PE) nach einer Woche zu erkennen ist; der Stern markiert das Polyethylen. Die 3- und 9-

Wochen-Gruppen zeigen Anreicherungen der Fluoreszenzfarbstoffe; diese sind um das Knochenfüllmaterial deutlicher zu erkennen als um die Polyethylenkontrollen.

Eine Woche nach der Implantation zeigte das Knochenfüllmaterial eine starke Autofluoreszenz (s. Abb. 12). Nach drei und neun Wochen konnten sowohl um die Polyethylenimplantate als auch um das Knochenfüllmaterial rote und grüne Fluoreszenzbanden erkannt werden (s. Abb. 12). Diese zeigen eine Knochenneubildung an, die in direktem Kontakt zu den Implantaten stattgefunden hatte. In der 9-Wochen-Gruppe des Knochenfüllmaterials konnten außergewöhnlich stark leuchtende Banden erkannt werden, welche für einen aktiven Prozess des Remodelings des Knochens sprechen.

### **3.5. Zelluläre Reaktion auf die Knochenfüllsubstanz im heterotopen Mausmodell**

Wir implantierten Zylinder des Knochenfüllmaterials in paravertebrale dorsale Taschen, um Kenntnisse über die Reaktion des Weichgewebes auf das Knochenfüllmaterial zu erlangen. Ein exemplarischer Schnitt der Polyethylen-Kontrollgruppe ist in einer Übersicht in Abb. 5 gezeigt (s. Abb. 5D).

Während der Explantation konnte makroskopisch eine diskrete Vaskularisation festgestellt werden, welche bei der 9-Wochen-Gruppe am stärksten ausgeprägt war. Makroskopisch konnte weiterhin festgestellt werden, dass das Knochenfüllmaterial im Gegensatz zu den intraossären Implantationen nicht abgebaut wurde. Die Polyethylenzylinder gingen während des Schneidevorganges verloren, während das Knochenfüllmaterial teilweise erhalten blieb.

Zunächst zeigte sich um das Knochenfüllmaterial bei der 1-Wochen-Gruppe eine ausgeprägte abgegrenzte zelluläre Reaktion (s. Abb. 13A). Diese Reaktion nahm jedoch nach drei Wochen und weiter nach neun Wochen stark ab (s. Abb. 13C und E), wobei nach neun Wochen eine deutliche Vaskularisierung durch zahlreiche Gefäßneubildungen gezeigt werden konnte (s. Abb. 16). Bei einer stärkeren Vergrößerung wurde deutlich, dass es sich um ein granulozytäres Infiltrat um das Knochenfüllmaterial herum handelte (s. Abb. 14). In den Präparaten der Kontrollgruppe war ein faserreicher, schmaler Saum von Granulozyten erkennbar (s. Abb. 17). In keinem der Präparate konnten Fremdkörperriesenzellen beobachtet werden.



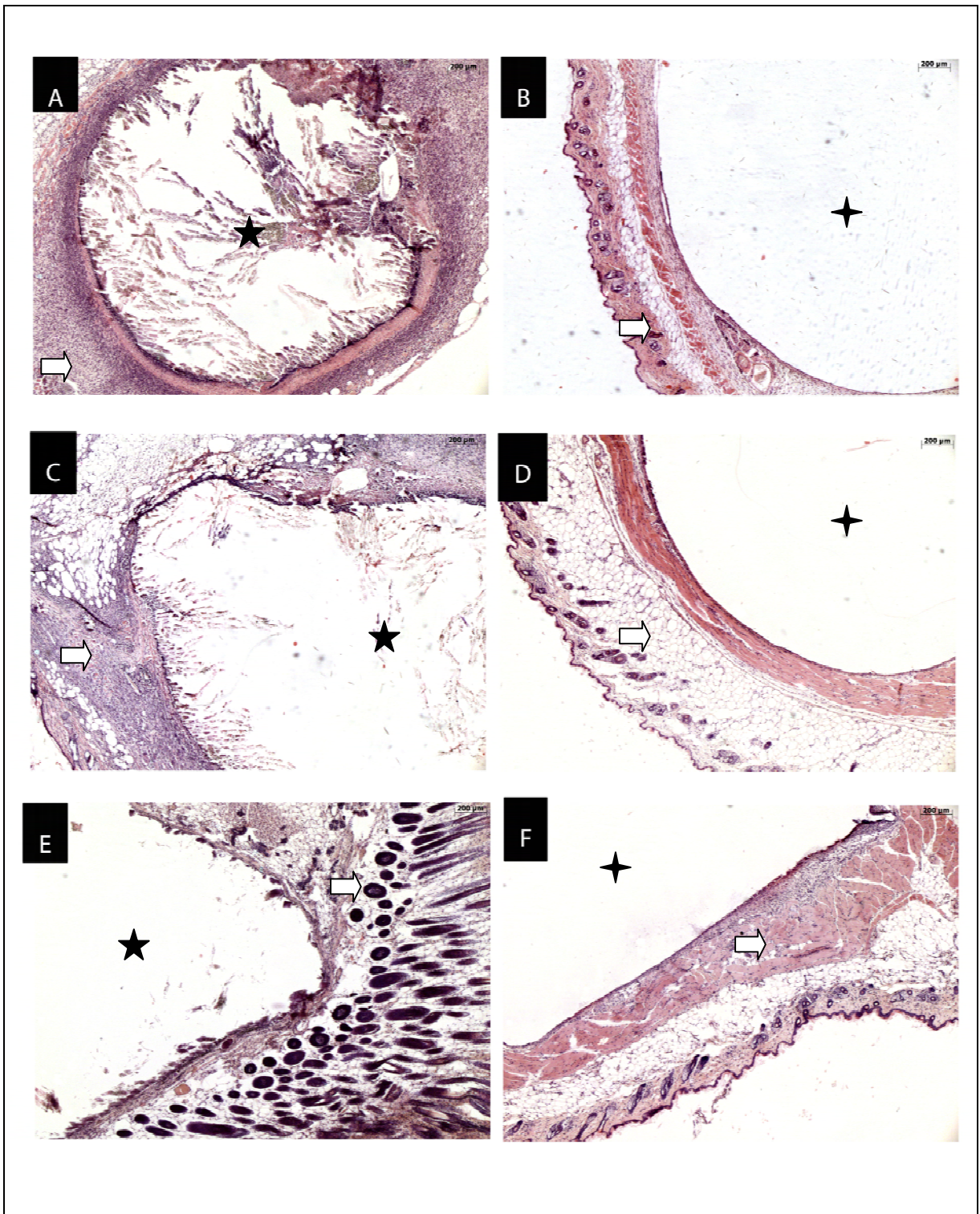


Abb. 13. Übersichtsaufnahmen aller Gruppen bei subkutaner Implantation. Zu sehen sind 8 µm dicke Schnitte des subkutanen Gewebes (□→), welche die betreffende Region der Implantation enthalten. In der linken Spalte sind Proben mit Knochenfüllmaterial (★) nach einer (A), drei (C) und neun (E) Wochen dargestellt, in der rechten Spalte Proben mit den Kontrollen Polyethylen (✦) nach einer (B),

drei (D) und neun (F) Wochen. Die Polyethylenzylinder sind während des Schneidevorganges verloren gegangen. Das Knochenfüllmaterial und das Polyethylen werden nicht abgebaut. (HE-Färbung, Vergrößerung 5-fach).

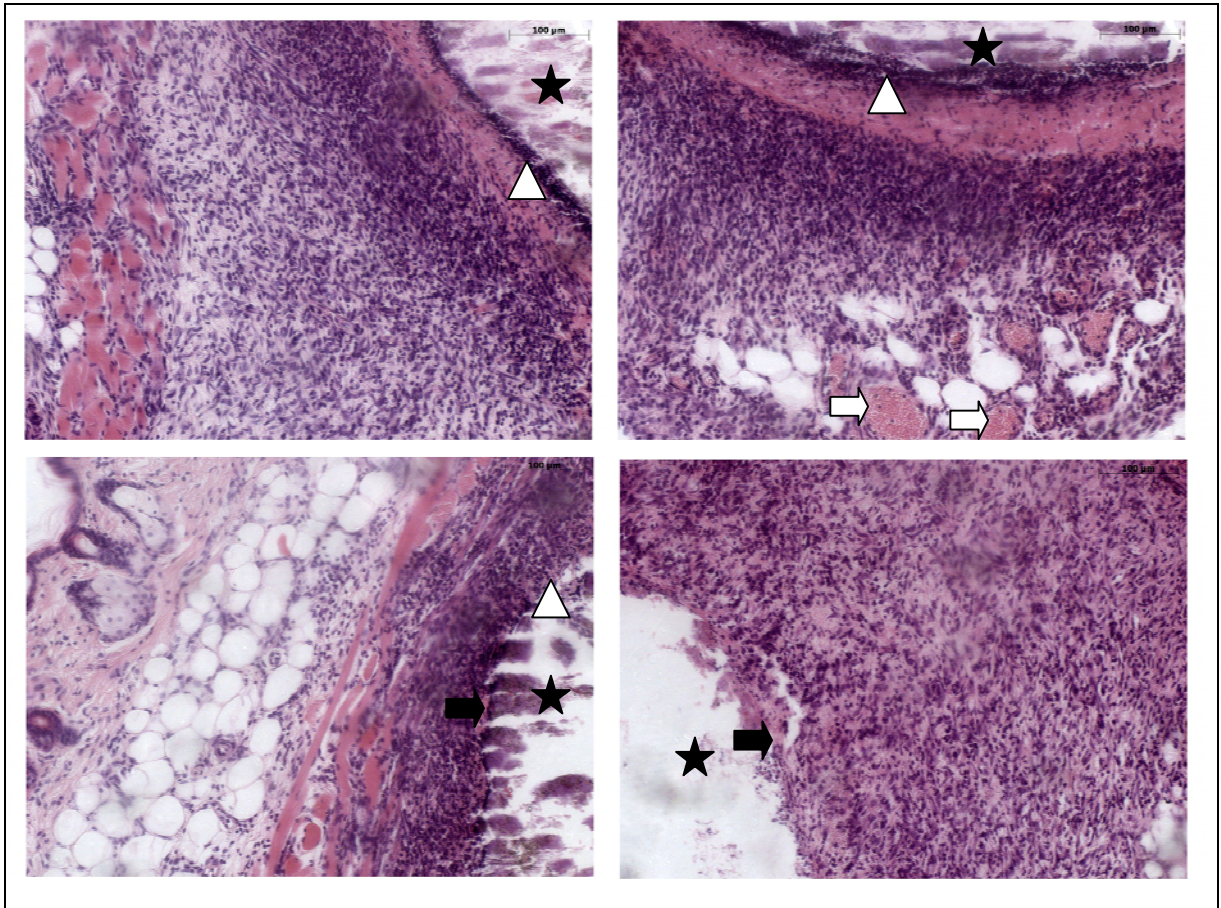


Abb. 14. Qualitative Auswertung der 1-Wochen-Gruppe bei subkutaner Implantation der Knochenfüllsubstanz: es wurden 8 µm dicke Schnitte auf die zelluläre Reaktion hin untersucht (HE-Färbung, Vergrößerung 20-fach). Es sind Kapillaren (□), Fibroblasten (■) und Granulozyten (△) zu sehen. Das Knochenfüllmaterial (★) wird nicht abgebaut.

Im Folgenden werden die einzelnen Gruppen näher beschrieben.

Die Betrachtung der 1-Wochen-Gruppe unter dem Lichtmikroskop ergab, dass sich eine deutliche zelluläre Entzündungsreaktion um das Knochenfüllmaterial gebildet hatte (s. Abb. 14). Diese Entzündung stellte sich als granulierende Entzündung mit



Kapillaren, Fibroblasten und Granulozyten dar. Granulozyten, die zugrunde gehen, waren als lilafarbener Saum zu erkennen (s. Abb. 14). Das Knochenfüllmaterial wurde nicht degradiert.

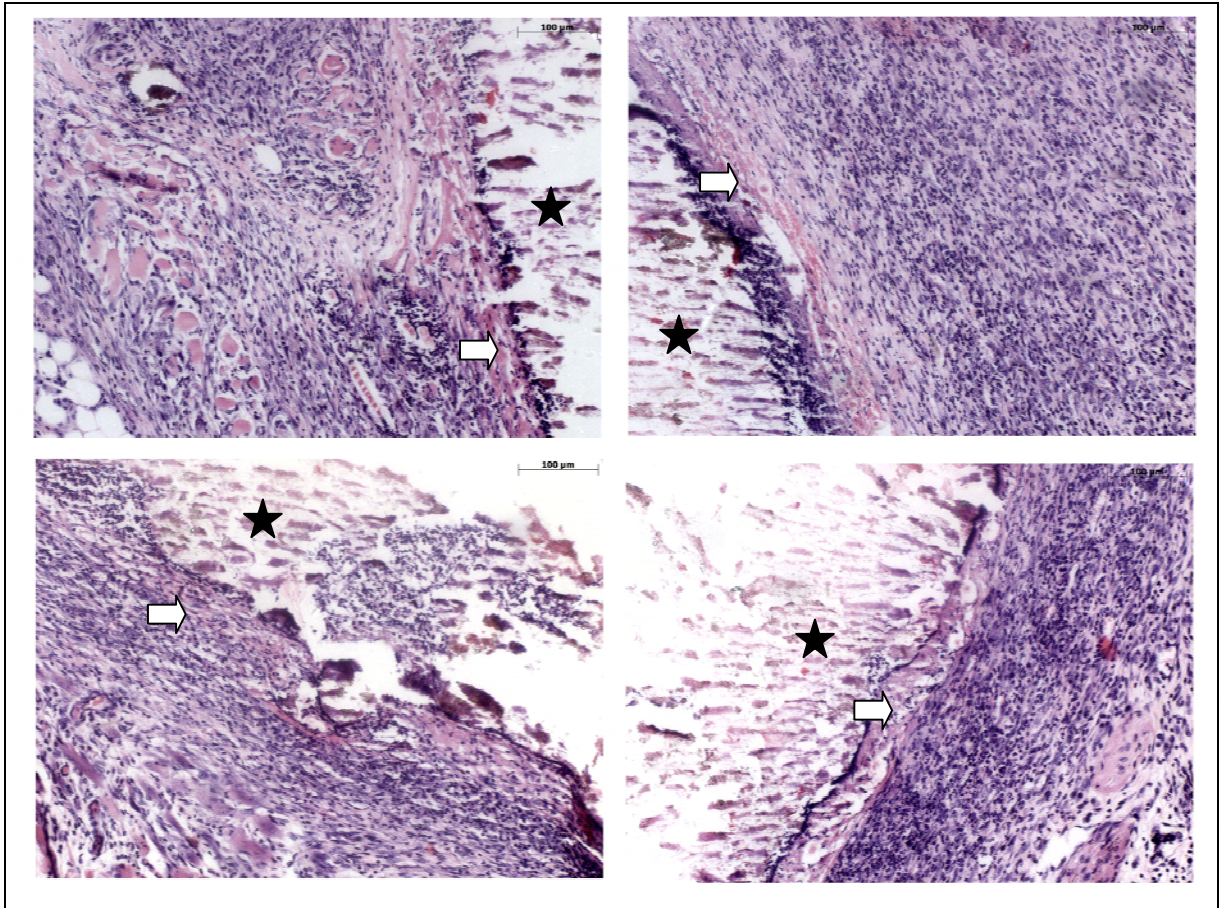


Abb. 15. Qualitative Auswertung der 3-Wochen-Gruppe bei subkutaner Implantation der Knochenfüllsubstanz (★): es wurden 8 µm dicke Schnitte auf die zelluläre Reaktion hin untersucht (HE-Färbung, Vergrößerung 20-fach). Es ist weiterhin eine inflammatorische Reaktion (⇨) zu sehen. Diese stellt sich als faserreich und zellärmer dar.

Die Betrachtung der 3-Wochen-Gruppe unter dem Lichtmikroskop ergab ferner, dass die Entzündung etwas abgeklungen, jedoch immer noch deutlich ausgeprägt war (s. Abb. 15). Hierbei war ein faserreiches Granulationsgewebe mit Kapillaren zu erkennen. Das Entzündungsgewebe war im Vergleich zu der 1-Wochen-Gruppe faserrei-

cher und zellärmer, was auf eine beginnende Narbenbildung hindeutete. Es waren weniger Granulozyten und mehr Histozyten zu sehen. Das Knochenfüllmaterial wurde nicht degradiert (s. Abb. 15).

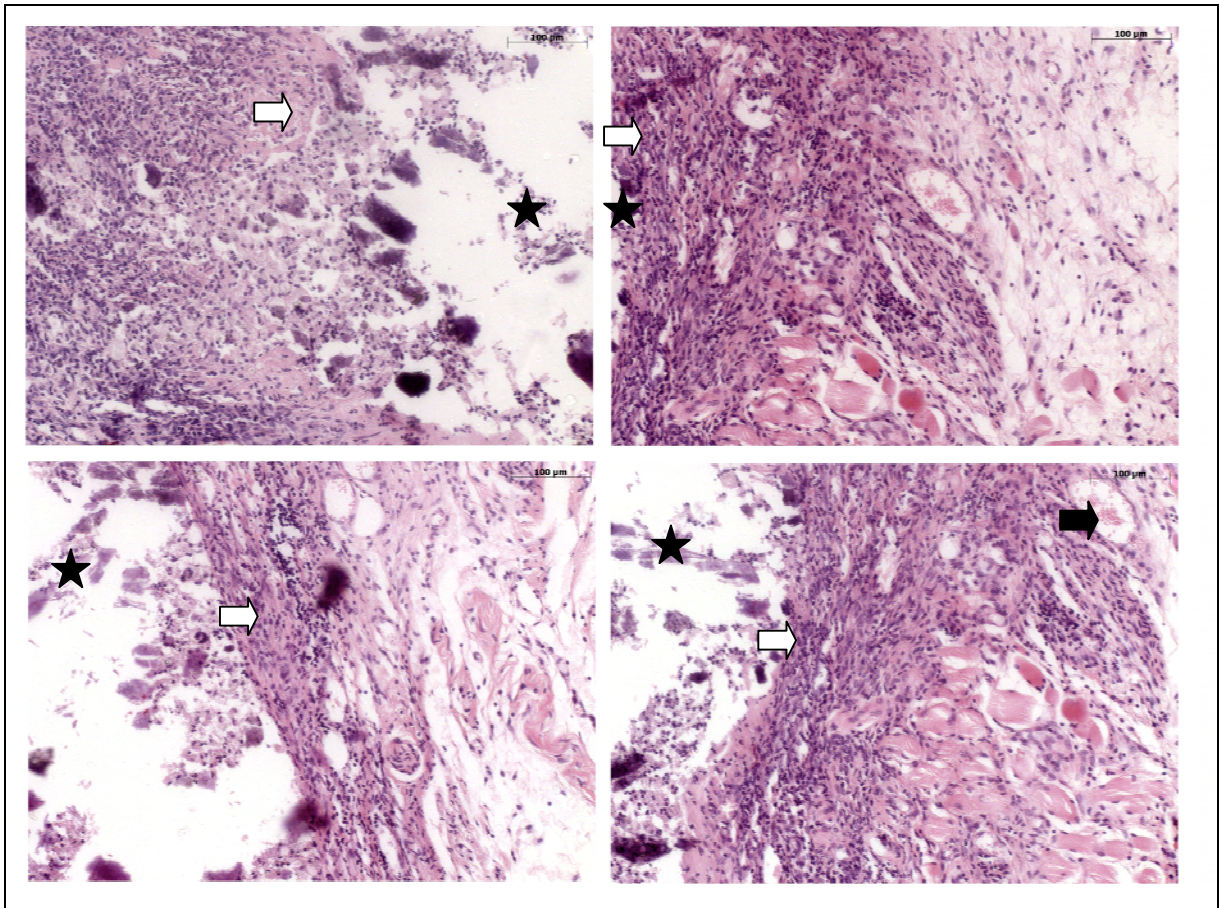


Abb. 16. Qualitative Auswertung der 9-Wochen-Gruppe bei subkutaner Implantation der Knochenfüllsubstanz (★): es wurden 8 µm dicke Schnitte auf die zelluläre Reaktion hin untersucht (HE-Färbung, Vergrößerung 20-fach). Die Entzündungsreaktion (↪) ist deutlich abgeklungen und viel zellärmer und es lassen sich Gefäßneubildungen (➡) erkennen.

Die Betrachtung der 9-Wochen-Gruppe unter dem Lichtmikroskop ergab weiter, dass die Entzündung nun deutlich abgeklungen war (s. Abb. 16). Sie stellte sich als viel zellärmer als nach einer Woche oder nach drei Wochen dar. Das Knochenfüllmaterial wurde fibrös umkapselt, jedoch wurde es nicht degradiert (s. Abb. 16). Weiterhin wa-



ren Gefäßneubildungen erkennbar.

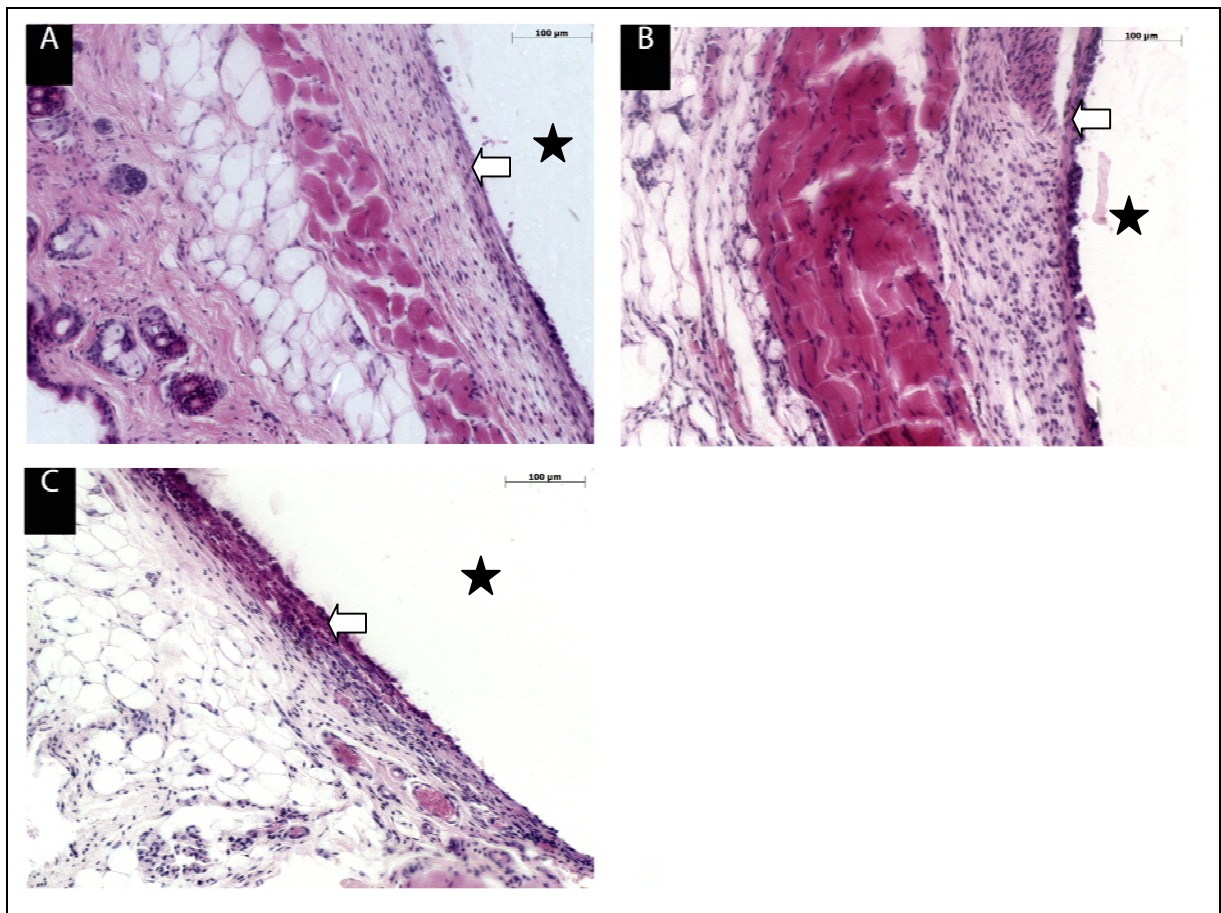


Abb. 17. Qualitative Auswertung der A) 1-Wochen-, B) 3-Wochen- und C) 9-Wochen-Gruppe bei subkutaner Implantation des Polyethylens (★): es wurden 8 µm dicke Schnitte auf die zelluläre Reaktion hin untersucht (HE-Färbung, Vergrößerung 20-fach). Die Entzündungsreaktion ist sehr gering; es ist ein schmaler Saum von Granulozyten (↔) erkennbar, der sehr faserreich ist.

Im Gegensatz zu der Untersuchung des Knochenfüllmaterials war bei Betrachtung der Kontrollgruppen unter dem Lichtmikroskop ersichtlich, dass hier die Entzündungsreaktion weitaus geringer ausfiel (s. Abb. 17). Es war ein schmaler Saum von Granulozyten erkennbar, welcher sehr faserreich war. Des Weiteren waren lymphoide Zellen, Plasmazellen und Histiozyten zu erkennen. Das Polyethylen wurde nicht degradiert (s. Abb. 17).

### 3.6. Quantifizierung der Entzündungsreaktion im heterotopen Mausmodell

Bei der qualitativen Auswertung der subkutanen Proben zeigte sich, dass die Entzündungsreaktion um das Knochenfüllmaterial nach neun Wochen offensichtlich deutlich abgeklungen war. Zur Bestätigung dieser Tatsache quantifizierten wir die Zellen in direkter Nachbarschaft zu den Implantaten (s. Abb. 18).

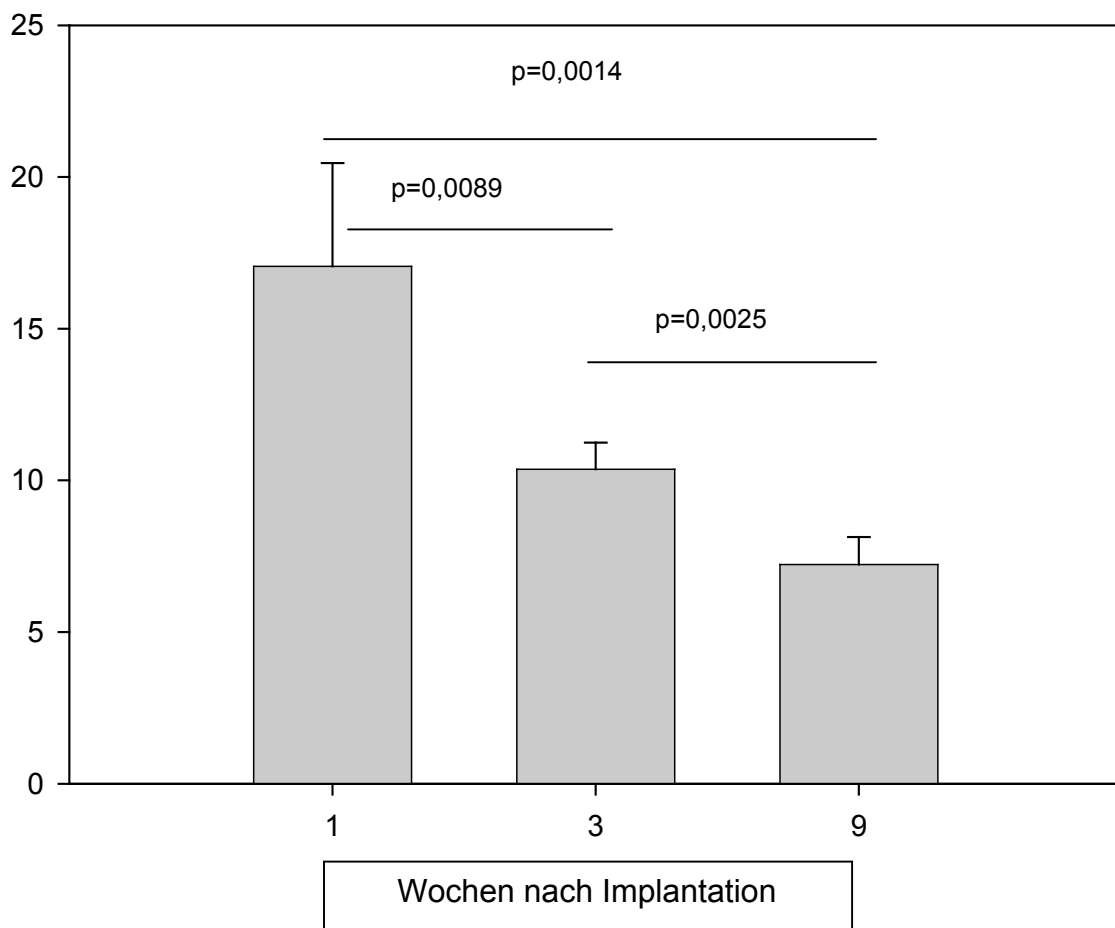


Abb. 18. Quantifizierung der Entzündungsreaktion um das subkutan implantierte Knochenfüllmaterial: die Y-Achse zeigt die absolute Zellzahl, die X-Achse zeigt die Zeit nach der Implantation. Die Zählung der mononukleären Zellen in der Nachbarschaft der Implantate zeigt eine signifikante Abnahme der Anzahl der Zellen, wenn die 1-Wochen-Gruppe mit der 3-Wochen-Gruppe verglichen wird ( $p=0,0089$ ), ebenso wenn die 3-Wochen-Gruppe mit der 9-Wochen-Gruppe verglichen wird ( $p=0,0025$ ).

Es wurde hierfür jeweils eine subkutane Gewebeprobe eines jeden Tieres quantifiziert (n=4). Es wurden 5 zufällige Bildausschnitte gewählt und 5 Kästchen einheitlicher Größe, die direkt an das Implantat angrenzen, ausgezählt. Diese Zellzählungen ergaben eine signifikant höhere Zellzahl um das Knochenfüllmaterial nach einer und nach drei Wochen im Gegensatz zu der Zellzahl nach neun Wochen (s. Abb. 18). Die Entzündungsreaktion war nach 9 Wochen deutlich abgeklungen und näherte sich der Zellzahl der Kontrollgruppe an. Die Ergebnisse sind statistisch signifikant (s. Abb. 18).

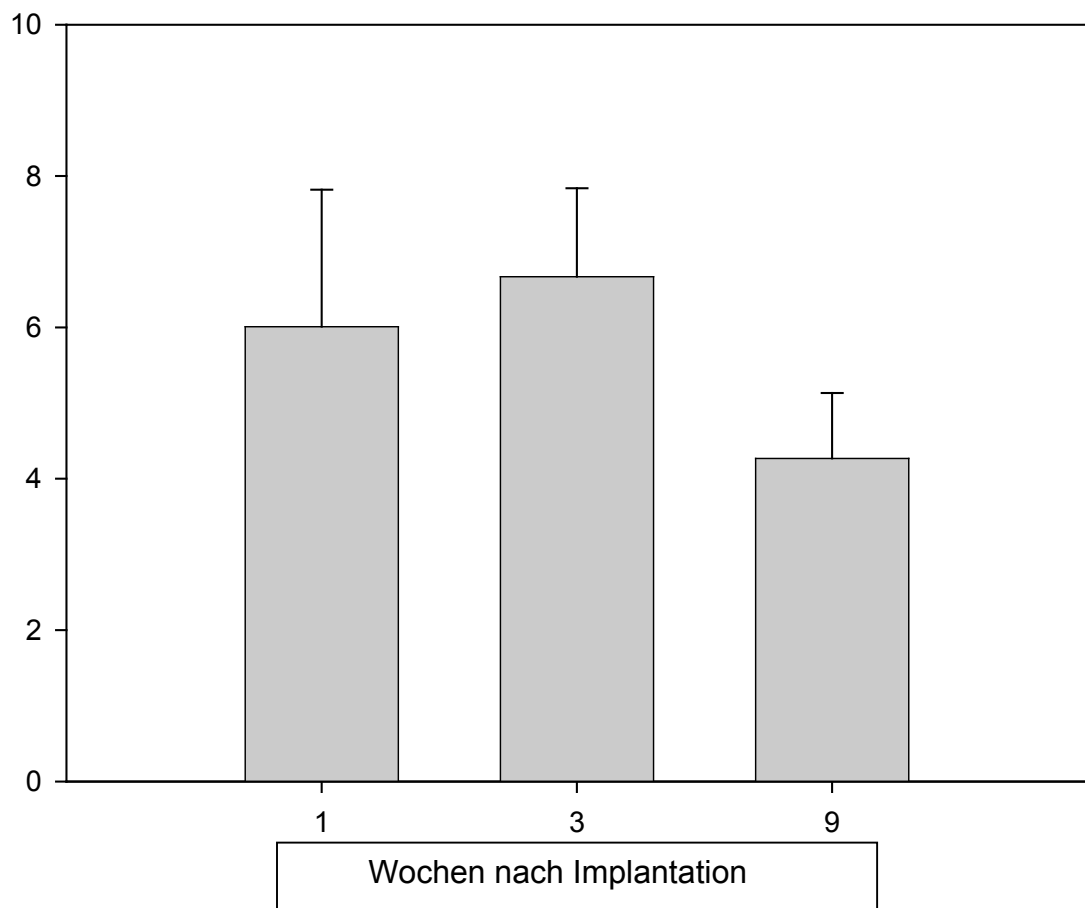


Abb. 19 Quantifizierung der Entzündungsreaktion um die subkutan implantierten Kontrollen Polyethylen. Die Y-Achse zeigt die absolute Zellzahl, die X-Achse die Zeit nach der Implantation. Die Zählung der mononukleären Zellen um die Implantate herum zeigt keine signifikante Abnahme der Anzahl der

Zellen, wenn die 1-Wochen-Gruppe mit der 3-Wochen-Gruppe verglichen wird, ebenso wenn die 3-Wochen-Gruppe mit der 9-Wochen-Gruppe verglichen wird.

Bei der Untersuchung der Kontrollgruppen konnte hingegen kein statistisch signifikanter Rückgang der Entzündung festgestellt werden. Vielmehr stieg die Zahl der Zellen zwischen der 1-Wochen- und 3-Wochen-Gruppe an und nahm dann bis nach 9 Wochen nach der Implantation des Polyethylens wieder ab (s. Abb. 19).

## 4. Diskussion

Knochenfüllstoffe sind seit geraumer Zeit Gegenstand der Forschung in der Unfallchirurgie und Orthopädie [25;50;51]. Viele intraartikuläre Trümmerfrakturen stellen die Operateure häufig vor die Entscheidung, autologe oder allogene Knochen transplantationen vorzunehmen oder nicht [10;17]. Der Einsatz von Knochenfüllmaterialien könnte die Transplantationshäufigkeit und die damit verbundenen Risiken reduzieren und gleichzeitig zu einer erhöhten Stabilität der Verbundosteosynthese führen. Eine wesentliche Ursache jener Frakturen, die den Einsatz eines Knochenfüllstoffes fordern, stellt die Krankheit Osteoporose dar. Ein Blick auf den demographischen Wandel Deutschlands verdeutlicht, dass der Altersdurchschnitt der deutschen Bevölkerung immer weiter ansteigen wird. Somit wird sich auch die Inzidenz der Patienten, die an Osteoporose erkranken, erhöhen, was wiederum steigende Zahlen von osteoporotischen Frakturen bedingt. Aufgrund der guten klinischen Resultate gilt die Transplantation von autogenem Knochen nach wie vor als Goldstandard, um ausgedehnte knöchernerne Defekte zu decken. Jedoch birgt diese Methode einige Nachteile. Vor allem der zweite operative Eingriff und die begrenzte Verfügbarkeit limitieren häufig den Einsatz. Das Ziel bei der Entwicklung neuer Knochenfüllstoffe ist es, ein Material mit ähnlichen Eigenschaften denen des autogenen Knochens hervorzubringen, um eine gleichwertige Behandlungsmöglichkeit zu garantieren [10;52]. Jedoch ist bis heute kein Knochenfüllstoff auf dem Markt, der sich klinisch etabliert hat und allen Anforderungen gerecht würde, die an einen solchen gestellt werden müssen [25;30;50;51;53].

#### **4.1. *In vitro* Testung als Vorläuferstudie**

In einer Vorläuferstudie haben wir ein neuartiges Knochenfüllmaterial auf der Basis von Hydroxylapatit, Stärke und Chitosan entwickelt und *in vitro* auf Toxizität getestet [47]. Dieses neuartige zähflüssige Knochenfüllmaterial basiert auf Hydroxylapatitpartikeln, die zum einen mit deacetyliertem Chitosan und zum anderen mit oxidierte Stärke beschichtet wurden. Nach Zugabe von Wasser erfolgt hierbei innerhalb von Sekunden eine kovalente Bindung unter Bildung Schiff'scher Basen (Iminreaktion). Da diese Reaktion grundsätzlich reversibel ist, erhofften wir uns eine verbesserte Biodegradation des Materials in Verbindung mit einer guten Biokompatibilität. Ziel dieser Studie war es, die Biokompatibilität und das Degradationsverhalten eines neuartigen Knochenfüllmaterials *in vivo* zu untersuchen. Zu diesem Zweck haben wir ein kombiniertes orthotopes und heterotopes Mausmodell entwickelt. In unserem Modell wurden zum einen die Gewebereaktionen auf das Implantat nach einer, drei und neun Wochen qualitativ beurteilt, und zum anderen die Degradierbarkeit des Materials im Knochen erfasst. Im Folgenden sollen der Einsatz des neuartigen Tiermodells für Untersuchungen von Knochenfüllstoffen sowie die Biokompatibilität und das Degradationsverhalten des neu entwickelten Knochenfüllstoffes kritisch diskutiert werden.

#### **4.2. Präklinische Tiermodelle**

Bevor ein Knochenfüllmaterial klinisch am Menschen eingesetzt werden darf, muss es in präklinischen *in vivo* Tiermodellen ausreichend charakterisiert und untersucht werden. Diese Tiermodelle stellen einen unverzichtbaren Schritt dar, da nur hier die Gesamtreaktion des Organismus suffizient beurteilt werden kann. Da eine große e-



thische Verantwortung auf der Durchführung solcher Tierversuche lastet, ist es wichtig, sie zunächst ausführlich auszuwählen und zu planen [54].

#### 4.2.1. Wahl der geeigneten Tierart

Vor der Durchführung solcher Tierversuche muss für jede einzelne Fragestellung zu Beginn abgewogen werden, welche Tierart und welches Modell am brauchbarsten erscheinen [55]. Grundsätzlich stehen Groß- und Kleintiermodelle zur Verfügung. Großtiermodelle bieten insofern Vorteile, als sie hinsichtlich des Gewichts, der Größe und den biomechanischen Eigenschaften den Eigenschaften des Menschen näher kommen als Kleintiermodelle. Jedoch ist es sehr aufwändig, eine solch groß angelegte Studie zu konzipieren, da die Unterbringung der Tiere viel Platz beansprucht. Des Weiteren ergibt sich häufig auch eine wirtschaftliche Einschränkung, da die Kosten für Großtiermodelle natürlicherweise höher sind als für Kleintiermodelle. Insbesondere wenn man bedenkt, welche Anzahl von Tieren in eine solche Studie einbezogen werden muss, um statistisch signifikante Werte zu erhalten, und um das zu untersuchende Biomaterial ausreichend zu untersuchen, verdeutlicht die hohen Kosten. Im Gegensatz hierzu ergeben die Studien, bei welchen die „typischen“ Labortiere verwendet werden, weniger Probleme bezüglich der Kosten und der Unterbringung. Dies erleichtert es, Studien zu entwerfen, die eine hohe Anzahl von nützlichen und statistisch signifikanten Ergebnissen erbringen. Wir entschieden uns, die Untersuchungen an HsdWin:NMRI Auszucht-Mäusen vorzunehmen. Der mikroskopische Aufbau des Knochens von Menschen und Nagetieren ist nicht vollkommen identisch. Trotzdem werden Mausmodelle sehr häufig verwendet, um ein reproduzierbares Tiermodell zu entwerfen, denn die biologische Reaktion des Knochens der Maus ist bedingt auf die Situation des Menschen übertragbar. Mausmodelle sind au-

ßerdem beliebt, da es möglich ist, verschiedenartige Knock-out-Mäuse zu verwenden. Hierbei können gezielt Deletionen von Knochen spezifischen Genen vorgenommen werden, so dass eine noch detailliertere Analyse des Knochenmetabolismus möglich ist [49]. Mäuse werden im Allgemeinen auch aufgrund ihrer hohen Reproduktionsrate für Tierversuche verwendet, da sie alle zehn Wochen eine neue Generation hervorbringen. Außerdem sind Mäuse aufgrund der Übereinstimmung mit dem Menschen in vielen grundlegenden Prozessen ideal für die vorgenommenen Untersuchungen zur Beurteilbarkeit der Gewebereaktion auf verschiedene Materialien geeignet. Auszucht-Mäuse im speziellen sind aufgrund ihres Heterozygotiegrades grundsätzlich für Substanztestungen gut geeignet. Weiterhin ist der Platzbedarf von Mäusen gering. Das Anliegen dieser Studie war es, die grundlegenden biologischen Eigenschaften des Biomaterials und die Reaktion eines Organismus auf dieses zu ergründen, wobei das Knochenfüllmaterial im Vorfeld *in vitro* untersucht worden war. Für diesen Zweck erbringt ein gut durchdachtes Mausmodell, das eine subkutane und eine intraossäre Implantation miteinander kombinierte, zusammen mit der Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen eine beträchtliche Anzahl nützlicher Daten. Diese Daten ermöglichen eine weiterführende Analyse. Weiterhin berücksichtigt dieser Denkansatz auch ethische Überlegungen, da die Maus in der Evolution nicht so weit fortgeschritten ist, wie beispielsweise das Schaf, trotzdem aber brauchbare Ergebnisse liefert. Deshalb haben wir diesem Tiermodell den Vorzug vor Großtierversuchen gegeben.

#### 4.2.2. Konzeption des Kleintiermodelles

In vorliegender Studie wurden eine heterotope, subkutane Implantation und eine orthotope, intraossäre Implantation miteinander kombiniert.

Als Tiermodell für die heterotope Implantation verwendeten wir ein modifiziertes Mausmodell, wobei die Implantationen des Testmaterials in das subkutane Gewebe rechts und links paravertebral jeweils kranial und kaudal vorgenommen wurden (s. 2.2.4.) [48]. Dieses Modell bietet insofern Vorteile, als sowohl die Implantation als auch die Explantation von bis zu vier Testkörpern einfach durchzuführen sind. Des Weiteren kann die Gewebereaktion uneingeschränkt direkt im Vergleich der rechten und linken Implantationen beurteilt werden.

Die Hauptanliegen der Studie bestanden darin, einerseits die Reaktion des Knochengewebes auf den Knochenfüllstoff zu untersuchen, andererseits sollte die Degradation des Knochenfüllmaterials quantitativ erfasst werden. Als Tiermodell für diese orthotopen Implantationen verwendeten wir ein modifiziertes Mausmodell. Hierbei wurde das Knochenfüllmaterial in den distalen Mausfemur implantiert. Dieses Modell ist ursprünglich als Knochenheilungsmodell beschrieben [49], bei dem 0,9 mm große zylinderförmige Hohlräume in die Femurmetaphyse der Maus gebohrt wurden. Anschließend wurde die Knochenheilung beobachtet. In unserer Modifikation wurde nach der Bohrung das Knochenfüllmaterial über eine Kanüle in den zylinderförmigen Defekt eingebracht (s. 2.2.4.). Während dieses Vorganges befand sich das Knochenfüllmaterial noch in einem weichen Zustand. Uns erschien diese Methode als sinnvoll, da die chirurgische Intervention sehr gering gehalten werden konnte. Durch die Manipulation wurde die Biomechanik der betroffenen Gliedmaße nicht beeinträchtigt und somit die histologische Aufarbeitung möglich, ohne in der Zwischenzeit die Mobilität der Mäuse einzuschränken. Die Größe der Femurkondyle der Maus erschien uns als ausreichend. Außerdem ist diese Region gut zu erreichen und es steht genügend Weichgewebe zur Verfügung, um einen suffizienten Wundverschluss

zu garantieren. Aus ethischen Gründen implantierten wir den Knochenfüllstoff bei jeder der Mäuse sowohl in den rechten als auch in den linken Femur. Die beidseitige Operation bedeutete im Gegensatz zur unilateralen Manipulation mit Sicherheit eine höhere Belastung für das einzelne Tier. Um allerdings mit einer einseitigen Operation gleichermaßen statistisch signifikante Ergebnisse gewährleisten zu können, hätte die doppelte Anzahl an Tieren operiert werden müssen. Basierend auf den Ergebnissen der Forschungsgruppe, die vergleichbare Experimente durchgeführt hatte, gingen wir davon aus, dass der beidseitige Eingriff von den Tieren gut toleriert werden würde [49]. Wog man nun die durch eine bilaterale Manipulation entstehenden zusätzlichen Schmerzen und Schäden gegen die dadurch halbierte Gesamtanzahl ab, hielten wir es für sinnvoller, bilateral zu operieren und auf eine gute postoperative Schmerztherapie besonderen Wert zu legen. Da nicht davon auszugehen war, dass die Mäuse durch die Implantationen eingeschränkt sein würden, nahmen wir an, dass sich hieraus kein Nachteil ergeben würde, was sich postoperativ auch bestätigte. Ein Nachteil des hier vorgestellten Mausmodells besteht sicher darin, dass der Mausfemur sehr klein ist. Somit musste die Bohrung exakt vorgenommen und auch das Knochenfüllmaterial genau platziert werden. Die Größe des Femurs stellte wahrscheinlich einen Grund dafür dar, dass es trotz sehr vorsichtigen chirurgischen Vorgehens zu insgesamt drei Frakturen kam (s. 3.1.). Außerdem war die korrekte Platzierung des Biomaterials Polyethylen als Kontrollkörper in zwei Fällen nicht möglich (s. 3.1.). Trotz der aufgeführten Nachteile erscheint dieses neuartige intraossäre Mausmodell als geeignet, da es darum ging, die grundlegenden biologischen Eigenschaften des Knochenfüllmaterials und die Reaktion eines Organismus auf dieses zu ergründen. In Kombination mit der subkutanen Implantation und der Applikation von Fluoreszenzmarkern konnten Schnitte produziert werden, mit Hilfe derer die gewünschten Ergebnisse erlangt werden konnten.

Um statistisch signifikante Ergebnisse zu erlangen ist es nötig, eine bestimmte Anzahl von Tieren in die Versuchsreihen mit einzubeziehen. Eine Studie wird umso aussagekräftiger, je mehr Tiere in diese Studie aufgenommen werden. Auf der anderen Seite wird natürlich gefordert, ethische Gesichtspunkte zu beachten. Außerdem muss auch der Wirtschaftlichkeit Rechnung getragen werden. Von dieser Sichtweise aus betrachtet wird gefordert, möglichst wenige Tiere einzuplanen. Larsen [52] verwendete 10-13 Versuchstiere pro Gruppe. Uusitalo [49], an dessen Knochenheilungsmodell sich unser orthotopes Tiermodell anlehnte, nahm 8 Versuchstiere pro Gruppe in seine Studie auf. Nach einer statistischen Beratung zur gewählten Gruppengröße durch Herrn Prof. Mansmann vom Institut für Medizinische Informationsberatung, Biometrie und Epidemiologie der LMU München, entschieden wir uns dafür, jeweils 8 Versuchstiere pro Gruppe in das orthotope Tiermodell aufzunehmen. Für die subkutane Implantation erschienen uns 4 Versuchstiere pro Gruppe als ausreichend, da bei jedem Tier 4 Implantationen vorgenommen werden konnten. Sowohl für die intraossäre als auch für die subkutane Implantation wurden drei Versuchsgruppen zu bilden. Diese Anzahl reichte aus, signifikante und aussagekräftige Ergebnisse hinsichtlich der Quantifizierung des Abbaus der Knochenfüllsubstanz zu erzielen (s. 3.3.). Weiter gelang es uns, die Gewebereaktion auf das Knochenfüllmaterial zu den unterschiedlichen Zeitpunkten zu erfassen (s. 3.2.).

Das Ziel der Studie war es, die Gewebereaktion *in vivo* zu beurteilen, wobei besonders der Tatsache Rechnung getragen werden sollte, dass komplexe Stoffwechselforgänge im Gesamtorganismus Einfluss auf die Gewebereaktion haben. Um beurteilen zu können, inwieweit der Knochenfüllstoff eine Reaktion des Gesamtorganismus hervorruft, war es nötig, diesen mit einem Kontrollkörper zu vergleichen. In die

Versuchstiere der Kontrollgruppen sollte ein weitestgehend inertes Material eingebracht werden, welches bekanntermaßen keinerlei Reaktion hervorruft und chemisch und physikalisch beständig ist. Auf diese Weise sollte es ermöglicht werden, zu beurteilen, in welchem Ausmaß eine Gewebereaktion auf den implantierten Werkstoff zurückzuführen ist, beziehungsweise welcher Anteil der Gewebereaktion durch die Operation selbst induziert wird. Als Testmaterial für die Kontrollgruppen entschieden wir uns für Polyethylen. Dieser Kunststoff besitzt eine hohe chemische und physikalische Beständigkeit. Gleichzeitig weist er eine gute Bioverträglichkeit auf. Polyethylen kommt bereits seit vielen Jahren in der Medizin zum Einsatz. Beispiele hierfür sind die Implantation als künstlicher Ersatz für Knorpel bei der Behandlung von Ohrknorpeldefekten oder im Bereich der Prothesen-Chirurgie in Form von Prothesen-Inlays. Dieser häufige Einsatz des Kunststoffes ist unter anderem auf die gute Biokompatibilität und die geringe Antigenität zurückzuführen.

### **4.3. Biokompatibilität des Knochenfüllmaterials**

#### 4.3.1. Degradationscharakteristik

Die chemische Struktur von synthetischem Hydroxylapatit (HA) ist der chemischen Struktur des Knochens sehr ähnlich. Es ist bekannt, dass HA normalerweise langsam resorbiert wird. Dies führt zu der Annahme, dass der Prozess des Remodelings nach der Implantation von HA möglicherweise gehemmt wird [56;57]. Die meisten Knochenersatzmaterialien, die auf HA basieren, unterliegen zudem vor der Implantation Sinterungsprozessen, was deren Resorptionseigenschaften verschlechtert. Es

hat sich gezeigt, dass die Resorptionseigenschaften verbessert werden können, wenn HA-Partikel miteinander vernetzt werden [41]. In unserer Studie konnten wir zeigen, dass das neue Knochenfüllmaterial nach intraossärer Implantation in einer Mausfemur schnell resorbiert wird (s. 3.3.). Bei Betrachtung der Kontrollgruppen, denen Polyethylen implantiert worden war, konnte keinerlei Degradationstendenz festgestellt werden (s. 3.3.). Die implantierten Polyethylenzylinder hatten vielmehr nach neun Wochen dieselbe Größe wie zum Zeitpunkt der Implantation. Die Tatsache, dass das Knochenfüllmaterial resorbiert worden war, lässt sich vermutlich auf die vorherrschende chemische Bindung zurückführen. Diese chemische Bindung, die unter Bildung einer Schiff'schen Base zustande kommt, ist reversibel. Eben diese Iminreaktion ermöglicht es wahrscheinlich, dass das Knochenfüllmaterial hydrolysiert werden kann. Eine weitere Hypothese, die das Degradationsverhalten des untersuchten Knochenfüllstoffes erklären kann, ist, dass die organischen Substanzen, mit denen HA beschichtet wurde, die Biodegradation beschleunigen könnten. Murugan befürwortet diese Überlegung in seiner Studie [40]. Er beschichtete HA mit Chitosan und untersuchte dieses Composite anschließend *in vitro*. Es wurden hierbei die freigesetzten Calciumionen in den PBS-Lösungen gemessen. Murugan stellte die Hypothese auf, dass die Bioresorption mit der Zahl an Calciumionen korreliert. Die Menge der Calciumionen, die von den Compositen freigesetzt wurde, wurde mit den Calciumionen, die von reinem HA freigesetzt wurden, verglichen. Die Menge der Calciumionen, die durch Composite freigesetzt wurde, war höher. Hieraus wurde gefolgert, dass die Bioresorption von HA durch den Zusatz von Chitosan gesteigert werden könne [40]. Eine weitere interessante Studie führte Schneiders durch [58]. Er beschichtete HA-Partikel mit Chondroitinsulfat und konnte zeigen, dass dies zu einer signifikant höheren Anzahl von Osteoklasten und mononukleären Zellen um das Implantat herum führte. Weiterhin konnte er zeigen, dass der direkte Knochenkontakt

und der prozentuale Anteil an neu gebildetem Knochen um die Implantate, die mit Chondroitinsulfat beschichtet worden waren, signifikant höher waren, als um die Kontrollgruppen [58]. Schneider kam zu dem Schluss, dass Chondroitinsulfat als Zusatz das Remodeling des Knochens und die Knochenneubildung um Implantate auf der Basis von Hydroxylapatit in den frühen Phasen der Knochenheilung beschleunige [58]. In der Tat identifizierten wir mononukleäre Zellen um die Implantate herum. Weiterhin konnten wir Reste des resorbierten Knochenfüllstoffes in Schaumzellen erkennen. Jedoch war es uns nicht möglich, Osteoklasten in direkter Nähe des Knochenfüllstoffes zu klassifizieren. Chitosan ist biodegradierbar und besitzt eine hydrophile Oberfläche, die die Adhäsion von Zellen fördert [42]. Aufgrund dieser Eigenschaften und aufgrund der oben beschriebenen Studien gehen wir davon aus, dass die Beschichtung von HA mit Chitosan die Resorptionsrate des Knochenfüllmaterials deutlich beschleunigt. Andererseits spielt sicher auch die Fähigkeit des Knochenfüllmaterials, hydrolysiert zu sein, eine Rolle.

Interessanterweise ergab sich bei der Untersuchung der subkutanen Proben hinsichtlich der Resorptionsrate ein anderes Ergebnis. Das Knochenfüllmaterial, das subkutan implantiert worden war, wurde in keiner erkennbaren Weise degradiert (s. 3.5.). Hierfür gibt es mehrere mögliche Erklärungsansätze. Zum einen könnte es daran liegen, dass im Weichgewebe keine Osteoklasten vorhanden sind. Diese Osteoklasten bewerkstelligen möglicherweise den Abbau von kalzifiziertem Material. Jedoch wurden auch um das intraossär implantierte Knochenfüllmaterial keine Osteoklasten identifiziert (s. 3.2.), sondern hauptsächlich mononukleäre Zellen. Deshalb gehen wir davon aus, dass ein anderer Grund dafür verantwortlich sein muss, dass das subkutan applizierte Biomaterial nicht degradiert wurde. Das Knochenfüllmaterial, das subkutan implantiert worden war, war in seinem Umfang größer (3x3mm, s.



2.2.4.) als jenes, das intraossär implantiert worden war. Dennoch hätte das subkutan implantierte Knochenfüllmaterial zumindest zu einem gewissen Prozentsatz degradiert werden müssen. Eine Resorption war jedoch nicht im Ansatz zu erkennen. Ein weiterer Unterschied zu dem intraossären Mausmodell war jener, dass das Knochenfüllmaterial nicht in zähflüssigem Zustand injiziert worden war. Vielmehr wurde das Biomaterial vor der Applikation an der Luft ausgehärtet (s. 2.2.4.). Dies geschah, um das operative Vorgehen zu erleichtern, da sich das Knochenfüllmaterial ansonsten im Weichgewebe aller Voraussicht nach unkontrolliert verteilt hätte. In 3.2. wurde gezeigt, dass nach intraossärer Implantation innerhalb des Knochenfüllmaterials Knochenmarkzellen zu sehen sind. Da das Knochenfüllmaterial hier nicht in ausgehärtetem Zustand, sondern vielmehr in zähflüssiger Konsistenz in den Knochendefekt injiziert worden war, konnte sich das Knochenfüllmaterial mit den Knochenmarkszellen vermischen. Somit stand den Zellen mehr Oberfläche für die Resorption zur Verfügung. Dies würde auf der anderen Seite jedoch auch bedeuten, dass das Knochenfüllmaterial durch diese Beimengung der Knochenmarkzellen möglicherweise nicht vollständig aushärten konnte. Dies würde einerseits das raschere Degradationsverhalten erklären. Andererseits ist es dann allerdings auch möglich, dass die Bildung der Schiff'schen Basen nicht erfolgt. Somit wären aber auch die Ergebnisse, die wir hinsichtlich der mechanischen Eigenschaften des Biomaterials erlangten, nicht auf die Situation *in vivo* übertragbar. Gerade die Eigenschaft Stabilität, die für den klinischen Einsatz wichtig ist, könnte somit nicht sicher bestimmt werden. Wahrscheinlich aber sind die Knochenmarkzellen, die sich um die intraossär applizierten Implantate anlagern können, im Gegensatz zu den Zellen, die um die subkutanen Implantate vorherrschen, einfach in der Lage, das Knochenfüllmaterial zu resorbieren. Dies wird Ihnen weiterhin wohl dadurch erleichtert, dass sie mit dem zähflüssi-

gen Biomaterial vermischt wurden, und ihnen so mehr Angriffsfläche zur Verfügung steht.

Die Tatsache, dass die subkutanen Implantate größer waren und eine andere Vorbehandlung erfahren hatten, indem sie zunächst an der Luft aushärteten, ist sicherlich ein Schwachpunkt der vorliegenden Studie. In folgenden Studien zu diesem Knochenfüllmaterial müssen identische Versuchsbedingungen gefordert werden, um die Vergleichbarkeit zu verbessern. Dennoch lässt sich aufgrund dieser Versuchsbedingungen einerseits erklären, weshalb das subkutan applizierte Knochenfüllmaterial nicht degradiert wird. Andererseits führt die Tatsache, dass die Implantate luftgetrocknet waren wahrscheinlich dazu, dass um die subkutanen Proben ein entzündliches Infiltrat vorgefunden wurde, das ausgeprägter war.

#### 4.3.2. Zelluläre Reaktion

##### 4.3.2.1. Zelluläre Reaktion bei intraossärer Implantation

Wenn ein neues Knochenfüllmaterial entwickelt wird, sind Biokompatibilität und Biodegradation wichtige Schlüsselpunkte. Weiterhin ist es jedoch auch wichtig, diese Eigenschaften mit guten mechanischen Eigenschaften zu vereinen. Die Entwicklung dieses Knochenfüllmaterials zielte deshalb ebenfalls darauf ab, die Stabilität des Implantates zu erhöhen. Wir hofften dies aufgrund der Tatsache zu erreichen, dass Moleküle der oxidierten Stärke eine kovalente Bindung zu Aminogruppen eingehen können, die von dem umgebenden Knochengewebe zur Verfügung gestellt werden (s. 1.1.6.). Somit gingen wir davon aus, dass der umliegende Knochen das Implantat

stabilisieren würde. Jedoch muss auch die Forderung an ein Knochenfüllmaterial berücksichtigt werden, dass es über einen Zeitraum hinweg degradiert werden kann, was wir, wie oben beschrieben, zeigen konnten (s. 3.3.). Eine unabdingbare Voraussetzung hierfür ist es, dass zunächst eine entzündliche zelluläre Reaktion in Gang gesetzt wird. Tatsächlich induzieren alle Biomaterialien in irgendeiner Art und Weise eine immunologische Antwort. Diese entzündliche Reaktion konnten wir über den Zeitraum von neun Wochen bei der Betrachtung des intraossär injizierten Knochenfüllstoffes erkennen (s. 3.2.). Die Entzündung stellte sich bei der 1-Wochen-Gruppe als granulierende Entzündung dar, die relativ zellreich war. Nach neun Wochen war die Reaktion deutlich abgeklungen. Diese immunologische Reaktion führt dann schließlich dazu, dass das Implantat vom Körper abgebaut werden kann. Während dieser zellulären Reaktion wird die Stabilität jedoch in negativer Weise beeinflusst [29]. Trotzdem ist für die Biodegradation von Implantaten eine immunologische Reaktion unverzichtbar. Dies verdeutlicht, dass immer ein Gleichgewicht zwischen der Stabilität und der Forderung nach Bioresorption vorherrscht. Folglich ist es das Ziel der Forschung, Biomaterialien zu entwickeln, die die Fraktur initial für einen bestimmten Zeitabschnitt stabilisieren. In Folge dessen müssen die Biomaterialien aber resorbiert werden, so dass es dem Körper erlaubt wird, diesen Defekt auf endogenem Wege zu reparieren. Dieser Vorgang wird als Remodeling bezeichnet. Das hier untersuchte Knochenfüllmaterial war nach neun Wochen fast vollständig degradiert (s. 3.3.). Dieser zeitliche Rahmen kann als eher kurz angesehen werden. Die zelluläre Reaktion, die um die intraossär implantierten Implantate zu sehen war, fand während des Zeitraumes dieser Biodegradation statt. Wir zogen hieraus den Schluss, dass diese Entzündung als Teil der Resorption des Knochenfüllmaterials stattfand. Es wird deshalb nicht davon ausgegangen, dass das Knochenfüllmaterial in irgendeiner Weise nicht biokompatibel sein könnte und deshalb inflammatorische Reaktio-

nen begründen könnte. Eine weitere wichtige Frage ist, wie lange ein Knochenfüllmaterial nach Implantation stabil bleiben soll, bevor es resorbiert wird. Hierüber liegen allerdings bis zum heutigen Zeitpunkt keine wissenschaftlichen Belege vor. Einen Hinweis darauf liefert die Frakturheilung, die normalerweise stattfindet. Hierbei benötigt eine Fraktur ungefähr sechs Wochen, bis die knöcherne Integrität wieder hergestellt ist. Wir konnten zeigen, dass nach drei Wochen und mehr noch nach neun Wochen in direktem Kontakt zu dem Knochenfüllmaterial eine Knochenneubildung stattgefunden hatte. Diesen Beweis lieferte die *in vivo* Fluoreszenz-Färbung (s. 3.4.). Die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe, welche mit Kalzium Komplexe bilden, werden in wachsendes Knochengewebe eingelagert [59;60]. Pautke setzte in seiner Studie bei Rattenfemora Defekte nicht-kritischer Größe [59]. Er wies nach, dass sich nach 28 Tagen sieben verschiedene Fluoreszenzbanden gebildet hatten. Diese Banden zeigten die Knochenneubildung und das Remodeling um die Defekte herum. In unserer Studie konnten wir zeigen, dass sich eine rote und eine grüne Fluoreszenzbande direkt an das Knochenfüllmaterial angelagert hatten (s. 3.4.). Um die Kontrollen Polyethylen konnten ebenfalls fluoreszierende Banden nachgewiesen werden. Diese waren jedoch schwächer zu erkennen. Diese Banden machen den neu gebildeten Knochen sichtbar und so liegt es also nahe, dass aktive Prozesse des Remodelings um das neue Knochenfüllmaterial herum stattfanden. Auch um die Polyethylenzylinder fanden anscheinend aktive Prozesse statt, jedoch in einem weniger ausgeprägten Maße. Dies suggeriert, dass die Knochenneubildung simultan mit der Degradation des Biomateriales einherging. Wenn neue Knochenfüllmaterialien entwickelt werden, gilt es, die wichtigen Eigenschaften Osteokonduktivität, Osteoinduktivität und Osteostimulation näher zu charakterisieren. HA kann durch den umliegenden Knochen durchbaut werden und wird als osteokonduktiv beschrieben [30]. Unser Knochenfüllmaterial besteht aus HA, das mit Chitosan einerseits und Stärke

andererseits beschichtet wurde. Die Fluoreszenzfärbung machte die Knochenneubildung, die sich um das Implantat gebildet hatte, sichtbar. Dies lässt den Schluss zu, dass auch unser Knochenfüllmaterial osteokonduktive Eigenschaften besitzt.

#### 4.3.2.2. Zelluläre Reaktion bei subkutaner Implantation

Einen weiteren wichtigen Punkt stellte die Auswertung der zellulären Reaktion um den subkutan implantierten Knochenfüllstoff dar. Li stellte Leitschienen aus Chitosan und Alginat her [42]. Er untersuchte unter anderem die Biokompatibilität dieser Leitschienen, indem diese in Rattenmuskulatur implantiert wurden. Er charakterisierte seine Leitschienen als biokompatibel. Auch Wang [34] untersuchte Chitosan, indem er Calciumphosphatzemente mit phosphoryliertem Chitosan beschichtete. Anschließend wurde die Biokompatibilität in einem Hasenmodell untersucht. In seinen Ergebnissen wird der mit Chitosan beschichtete Zement als biokompatibel eingestuft [34]. Chitosan gilt allgemein als biokompatibel, nicht antigen und nicht toxisch [42]. Auch im Rahmen der *in vitro* Charakterisierung unseres Knochenfüllmaterials konnte durch Life-dead-Assays die Biokompatibilität bestätigt werden (s. 1.1.7.). Auch Hydroxylapatit wird als biokompatibel angesehen (s.1.1.4.). Deshalb erhofften wir uns, dass auch die subkutanen Proben ähnliche Ergebnisse wie die intraossären Proben zeigen würden. Bei der Betrachtung der subkutanen Implantate konnten keine mehrkernigen Riesenzellen um die Implantate herum gefunden werden. Dennoch war deutlich, dass sich ein unspezifisches zelluläres Infiltrat um das subkutan implantierte Knochenfüllmaterial gebildet hatte (s. 3.5.). Durch quantitative Auswertungen konnten wir jedoch zeigen, dass diese Entzündungsreaktion nach drei Wochen und weiter nach neun Wochen abgeklungen war (s. 3.6.). Das Knochenfüllmaterial wurde im subkutanen Mausmodell jedoch nicht degradiert. Deshalb kann diese Entzündungs-

reaktion nicht als notwendige immunologische Reaktion gedeutet werden, die dazu dient, das Knochenfüllmaterial abzubauen. Im Gegensatz hierzu konnte bei der Untersuchung der Kontrollgruppen, denen Polyethylen implantiert worden war, kein statistisch signifikanter Rückgang der Entzündungsreaktion beobachtet werden (s. 3.6.). Vielmehr war die absolute Anzahl der Entzündungszellen um die Knochenfüllsubstanz nach neun Wochen in etwa so hoch, wie die absolute Anzahl der Entzündungszellen um das Polyethylen nach drei Wochen. Polyethylen weist bekanntermaßen eine gute Bioverträglichkeit und geringe Antigenität auf. Deshalb kommt es bereits seit vielen Jahren in der Medizin zum Einsatz (s. 4.2.). Da keine mehrkernigen Riesenzellen um die Implantate herum beobachtet werden konnten (s. 3.5.), ist nicht davon auszugehen, dass es sich um eine Fremdkörperreaktion auf das Knochenfüllmaterial handelt. Vergleicht man weiter die Entzündungsreaktion um das Knochenfüllmaterial mit der um den Kontrollkörper Polyethylen und berücksichtigt, dass Polyethylen seit vielen Jahren im klinischen Alltag eingesetzt wird, lässt sich diese Entzündungsreaktion als akzeptabel und tolerierbar deuten. Diese Annahme wird weiterhin dadurch verstärkt, dass die Entzündungsreaktion über die Zeit deutlich abklingt. Wenn das Knochenfüllmaterial in Zukunft weiter in Großtiermodellen untersucht werden sollte, sollte dennoch mit Blick auf die Biokompatibilität versucht werden, das Biomaterial dahingehend zu verändern, diese initiale Entzündungsreaktion etwas zu vermindern.

#### 4.3.3. Weiterführende histologische Auswertungsmethoden

Einen weiteren interessanten Ansatzpunkt für die qualitative histologische Auswertung stellen immunhistochemische Färbungen dar. Hierbei können bestimmte Zellen, die spezifische Antigene auf ihrer Oberfläche tragen, mit Hilfe von Antikörpern sicht-

bar gemacht werden. Von besonderem Interesse für unsere Studie wäre die Anfärbung von Osteoklasten gewesen. Diese können beispielsweise mit Hilfe einer TRAP-Färbung (tartrate-resistant acid phosphatase) identifiziert werden, wie es auch Schneider durchgeführt hat [58]. Hierfür sind jedoch spezifische Vorgehensweisen während des Einbettvorganges nötig. Um die Antigene zur Darstellung bestimmter Gewebestrukturen zugänglich zu machen, muss der Knochen entkalkt werden [58]. Anschließend erfolgt eine Einbettung in Paraffin [58]. Da in unserer Studie der Knochen nicht entkalkt worden war und in herkömmlicher Weise in PMMA eingebettet wurde (s. 2.3.1.1.), war eine solche immunhistochemische Färbung nicht möglich. Bei folgenden Studien sollte dieser Versuchsansatz jedoch berücksichtigt werden.

#### **4.4. Schlussfolgerung und Ausblick**

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Biokompatibilität eines neuen Knochenfüllmaterials im Kleintiermodell, um einen langfristigen Einsatz beim Menschen zu ermöglichen. Es wurden Gewebereaktion, Degradation und Knochenheilung nach Implantation der Knochenfüllsubstanz analysiert. Hierfür wurde ein neuartiges Kleintiermodell entworfen.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass das neue Knochenfüllmaterial im intraossären Tiermodell gute Eigenschaften hinsichtlich der Resorption zeigte. Es war nach neun Wochen zu einem hohen Prozentsatz resorbiert. Bei Betrachtung der subkutanen Proben stellten wir fest, dass eine Entzündungsreaktion um das Knochenfüllmaterial vorherrschte. Diese immunologische Reaktion betrachten wir – verglichen mit der Entzündungsreaktion um die Kontrollkörper Polyethylen - als akzeptabel.

Quantitative Auswertungen erbrachten weiterhin, dass die Entzündungsreaktion nach neun Wochen deutlich abgeklungen war. Nun müssen abschließende biomechanische Untersuchungen folgen, um die diesbezüglichen Eigenschaften des Knochenfüllmaterials zu klassifizieren.

Das Mausmodell zur Testung von neuen Biomaterialien, das für diese Untersuchungen entwickelt wurde, bewährte sich in vorliegender Studie. Es gab Aufschluss über die grundlegenden Eigenschaften des untersuchten Materials und brachte quantitative Resultate hervor. Besonders die Kombination mit der polychromen Fluoreszenzmarkierung kann wichtige Ergebnisse hinsichtlich der Knochenneubildung demonstrieren. Das Mausmodell bietet eine ideale Kombination von intraossärer und subkutaner Implantation. Es stellt somit ein exzellentes, reproduzierbares Hilfsmittel dar, um die Eigenschaften von neuen Biomaterialien zu untersuchen. Außerdem bewegen sich die aufzuwendenden Kosten in einem akzeptablen Rahmen. Um neuen Materialien den Weg in die klinische Anwendung zu ebnen, müssen weitere Versuche folgen. Neben den erwähnten biomechanischen Untersuchungen stehen schließlich Großtierversuche an, um dem Biomaterial den Weg in die klinische Praxis zu ermöglichen.



## 5. Zusammenfassung

### Zielsetzung und Fragestellung

Bei der Behandlung osteoporotischer Frakturen werden die behandelnden Chirurgen häufig vor das Problem gestellt, dass Knochendefekte vorliegen und kein suffizienter Schraubenhalt erreicht werden kann. Deshalb hat sich als operatives Vorgehen die Verbundosteosynthese etabliert. Hierbei wird ein Knochenfüllstoff eingebracht, um den Verbund der Fixation zu stabilisieren. Für diese Behandlung steht eine Vielzahl von Knochenfüllstoffen zur Verfügung, wobei es nach wie vor noch nicht gelungen ist, eine ideale Substanz zu entwickeln, die den hohen Anforderungen gerecht wird, die man an ein solches Knochenfüllmaterial stellen muss.

Ziel der vorliegenden Studie war es, eine biokompatible Knochenfüllsubstanz mit guter Degradierbarkeit zu entwickeln, die für oben beschriebene Frakturversorgungen eingesetzt werden kann. Die Knochenfüllmasse war am Friedrich-Baur-Forschungsinstitut für Biomaterialien der Universität Bayreuth entsprechend den klinischen Anforderungen entwickelt worden. Durch Beschichtung von Hydroxylapatit mit einem neuen biologischen Zweikomponentenkleber konnte eine zähe, in wässrigem Milieu stabile Knochenfüllmasse hergestellt werden. Der Zweikomponentenkleber besteht aus einer aminogruppenhaltigen Komponente (Chitosan) und einer aldehydgruppenhaltigen Komponente (Stärke). Unter Zugabe von Wasser erfolgt innerhalb weniger Sekunden eine kovalente Bindung zwischen den Partikeln unter Bildung Schiff'scher Basen (Iminreaktion). Gleichzeitig können Moleküle der oxidierten Stärke eine kovalente Bindung zu Aminogruppen eingehen, die von dem umgebenden Knochengewebe zur Verfügung gestellt werden.

Um einen Einsatz beim Menschen zu ermöglichen, sollte zunächst die Biokompatibilität in einem geeigneten Tiermodell überprüft werden. Es wurden Gewebereaktion, Degradation und Knochenheilung nach Implantation der Knochenfüllsubstanz überprüft. Hierfür wurde ein neuartiges Mausmodell konzipiert, das die orthotope Implantation mit der heterotopen Implantation kombiniert. Dieses Tiermodell stellt einen weiteren Schritt auf dem Weg zur klinischen Etablierung eines Knochenfüllstoffes zur Behandlung Osteoporose bedingter Frakturen dar.

### Material und Methoden

Die Arbeiten zur Herstellung des Knochenfüllmaterials wurden am Friedrich-Baur-Forschungsinstitut in Bayreuth durchgeführt. Die biologische Testung in der Zellkultur erfolgte in der Experimentellen Chirurgie und Regenerativen Medizin (ExperiMed) an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik - Innenstadt, Klinikum der Universität München. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die nötigen *in vivo* Untersuchungen durchgeführt. Als Versuchstiere gingen insgesamt 72 weibliche athymische HsdWin:NMRI Auszucht-Mäuse mit einem Alter von 10 Wochen (Lebendgewicht ca. 30 g) in den Versuch ein. Es wurde eine intraossäre Implantation mit einer subkutanen Implantation kombiniert. Bei der subkutanen Implantation wurden pro Tier jeweils vier Implantate eingebracht, und zwar paravertebral kranial und kaudal jeweils rechts und links eines. In dem intraossären Modell wurde ein zylindrischer Defekt von 0,9mm in die Femurmetaphyse gesetzt und anschließend das zähflüssige Knochenfüllmaterial injiziert. Weiterhin wurden im Rahmen der polychromen Fluoreszenzmarkierung fluoreszierende Marker in einem Zeitraum von zwölf Tagen bis neun Wochen post operationem subkutan verabreicht. Wir bildeten drei Versuchsgruppen, wobei die Tiere nach einer, drei und neun Wochen euthanasiert wurden. In dem heterotopen Modell bildeten vier Tiere eine Gruppe, in dem orthotopen Modell hingegen acht

Tiere. Als Kontrolle wurde Polyethylen analog dem Knochenfüllmaterial implantiert. Anschließend folgte die histologische Aufarbeitung. Die subkutanen Proben wurden in Paraffin eingebettet, woraufhin 8µm dicke Schnitte mit einem Mikrotom (Mikrotom Supercut 2050, Reichert-Jung) angefertigt wurden. Die Färbung erfolgte mit Hämatoxylin-Eosin. Die intraossären Proben wurden in MMA eingebettet. Hier wurden einerseits mit einer Innenlochsäge (Leitz, Wetzlar) 100µm dicke Schnitte angefertigt. Andererseits wurden 4µm dicke Schnitte mit einem Polycut-Schneidegerät (Polycut-E, Reichert-Jung) hergestellt. Als Färbung verwendeten wir eine Trichromfärbung nach Masson-Goldner sowie eine Hämalaun-Erythrosin-Färbung. Die lichtmikroskopische Betrachtung und Auswertung erfolgte mittels eines Axioskops (Axioskop 2, Zeiss), die Erstellung von Fotos erfolgte mittels der Kamera AxioCam Jcc3 (Zeiss). Der intraossäre Abbau des Knochenfüllstoffes wurde mit dem Programm Osteomeasure Histomorphometrie System (Osteometrics, Atlanta, GA, USA) gemessen. Die Quantifizierung der Entzündungszellen wurde mit Hilfe des Programms Power Point vorgenommen. Alle statistischen Auswertungen erfolgten durch das Programm Sigmaplot 8.0 für Windows.

## Ergebnisse

Ein Anliegen der Studie war es, ein neuartiges Mausmodell zu etablieren, welches es erlauben sollte, den Abbau und die Biokompatibilität eines neuen Knochenfüllstoffes zu untersuchen. Hierfür entwarfen wir ein neues Modell für die orthotope intraossäre Implantation, wobei in der distalen Metaphyse ein Defekt für die Injektion des Knochenfüllmaterials gesetzt wurde. Dies wurde mit einem subkutanen Modell kombiniert, das bereits beschrieben war. Die Operationen ließen sich reproduzierbar durchführen, wobei aufgrund der limitierten Größe mit äußerster Vorsicht vorgegangen werden musste. Letztendlich kam es bei 1,04 % aller operierten Femora intrao-

perativ zu einer Fraktur des distalen Femurs. Bei 2,08 % aller operierten Femora wurden während der histologischen Aufarbeitung Frakturen festgestellt. Schließlich erlitt eine Maus (1,39% aller operierten Tiere) der 3-Wochen-Gruppe eine systemische Infektion und starb.

Es konnten statistisch signifikante Ergebnisse hinsichtlich der Degradation der Knochenfüllsubstanz nach intraossärer Implantation gewonnen werden. Die Knochenfüllsubstanz wurde innerhalb der neun Wochen kontinuierlich abgebaut, wohingegen das Polyethylen nicht degradiert wurde. Die Entzündung, die sich bei Betrachtung der intraossären Präparate zeigte, nahm über neun Wochen hinweg ab, und wird als notwendige Voraussetzung für den Abbau der Knochenfüllsubstanz gedeutet.

Es konnte eine direkte Knochenanlagerung an das Knochenfüllmaterial beobachtet werden. Dies war bei Betrachtung der mit einer Trichromfärbung gefärbten Präparate zu sehen, und wurde durch die polychrome Fluoreszenzmarkierung bestätigt.

Bei Betrachtung der subkutanen Präparate war eine entzündliche Reaktion zu erkennen. Es zeigte sich, dass diese Reaktion statistisch signifikant über neun Wochen hinweg abnahm. Außerdem stellte sich heraus, dass das Knochenfüllmaterial bei subkutaner Implantation nicht degradiert wurde.

### Schlussfolgerungen

Zusammengefasst zeigte das neue Knochenfüllmaterial im intraossären Tiermodell gute Eigenschaften hinsichtlich einer raschen Resorption. Die entzündliche Reaktion, die bei Auswertung der subkutanen Proben zu erkennen war, betrachten wir - verglichen mit der Entzündungsreaktion um die Kontrollkörper Polyethylen - als akzeptable

bel. Quantitative Auswertungen erbrachten weiterhin, dass diese Entzündungsreaktion nach neun Wochen deutlich abgeklungen ist.

Das Mausmodell, das zur Testung des neuen Biomateriales entwickelt worden war, bewährte sich in dieser Studie. Wir konnten den Abbau des Knochenfüllmaterials quantifizieren und die zellulären Reaktionen ausreichend beurteilen. Dieses Modell bietet eine ideale Kombination von intraossärer und subkutaner Implantation und ermöglicht es so, mit einer relativ geringen Anzahl von Tieren nützliche Ergebnisse zu erlangen. Es stellt aber nur einen Schritt bei der Untersuchung von Biomaterialien dar, so dass Großtierversuche folgen müssen, um Biomaterialien den Weg in die klinische Anwendung zu ebnen.

## 6. Literaturverzeichnis

- (1) Vogel T, Dobler T, Bitterling H, Biberthaler P, Kanz KG, Pfeifer KJ, Bartl R, Mutschler W. [Osteoporosis in traumatology. Prevalence and management]. *Unfallchirurg* 2005; 108(5):356-364.
- (2) Studer S, die osteoporotische Fraktur, *Orthopädie-Technik* 7/2000
- (3) Gotte S, Dittmar K. [Epidemiology and costs of osteoporosis]. *Orthopade* 2001; 30(7):402-404.
- (4) AWMF Online, *Leitlinie Osteologie*. [http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/II\\_osteo.htm](http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/II_osteo.htm) (2005).
- (5) [www.diercke.de/bilder/omeda/800/8811E\\_10.jpg](http://www.diercke.de/bilder/omeda/800/8811E_10.jpg)
- (6) Marcus R. Understanding osteoporosis. *West J Med* 1991; 155(1):53-60.
- (7) Kleerekoper M, Villanueva AR, Stanciu J, Rao DS, Parfitt AM. The role of three-dimensional trabecular microstructure in the pathogenesis of vertebral compression fractures. *Calcif Tissue Int* 1985; 37(6):594-597.
- (8) Langendorff HU, Sauer HD, Schottle H. [The connecting osteosynthesis and its problems in unstable pertrochanteric fractures of the femur (author's transl)]. *Unfallchirurgie* 1981; 7(1):20-24.
- (9) Cornell CN, Lane JM, Poynton AR. Orthopedic management of vertebral and long bone fractures in patients with osteoporosis. *Clin Geriatr Med* 2003; 19(2):433-455.
- (10) Larsson S. Treatment of osteoporotic fractures. *Scand J Surg* 2002; 91(2):140-146
- (11) C. Niedhart, F.U. Niethard: Klinische Anforderungen an Knochenersatzstoffe, In: Puhl W (Hrsg): *Bioceramics in orthopaedics – New Applications*, Ferdinand Enke; Stuttgart, 1998, S. 46-50
- (12) Heini PF, Berlemann U. Bone substitutes in vertebroplasty. *Eur Spine J* 2001; 10 Suppl 2:S205-S213.
- (13) Ignatius AA, Augat P, Hollstein E, Schorlemmer S, Peraus M, Pokinskyj P, Claes L. Biocompatibility and functionality of the degradable polymer alkylene bis(dilactoyl)-methacrylate for screw augmentation in vivo. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005; 75(1):128-136.
- (14) Otani Y, Tabata Y, Ikada Y. Sealing effect of rapidly curable gelatin-poly (L-glutamic acid) hydrogel glue on lung air leak. *Ann Thorac Surg* 1999; 67(4):922-926.

- (15) Smith DC: Lutes, glues, cements and adhesives in medicine and dentistry. *Biomed Eng* 1973, 8(3): 108-115
- (16) Montanaro L, Arciola CR, Cenni E, Ciapetti G, Savioli F, Filippini F, Barsanti LA. Cytotoxicity, blood compatibility and antimicrobial activity of two cyanoacrylate glues for surgical use. *Biomaterials* 2001; 22(1):59-66.
- (17) Schieker M, Mutschler W. [Bridging posttraumatic bony defects. Established and new methods]. *Unfallchirurg* 2006; 109(9):715-732.
- (18) Hasegawa K, Yamamura S, Dohmae Y. Enhancing screw stability in osteosynthesis with hydroxyapatite granules. *Arch Orthop Trauma Surg* 1998; 117(3):175-176.
- (19) Szpalski M, Descamps PY, Hayez JP, Raad E, Gunzburg R, Keller TS, Kosmopoulos V. Prevention of hip lag screw cut-out by cement augmentation: description of a new technique and preliminary clinical results. *J Orthop Trauma* 2004; 18(1):34-40.
- (20) <http://de.wikipedia.org/wiki/Polymethylmethacrylat>
- (21) Flahiff CM, Gober GA, Nicholas RW. Pullout strength of fixation screws from polymethylmethacrylate bone cement. *Biomaterials* 1995; 16(7):533-536.
- (22) Deramond H, Wright NT, Belkoff SM. Temperature elevation caused by bone cement polymerization during vertebroplasty. *Bone* 1999; 25(2 Suppl):17S-21S.
- (23) Vale FM, Castro M, Monteiro J, Couto FS, Pinto R, Gao Toscano Rico JM. Acrylic bone cement induces the production of free radicals by cultured human fibroblasts. *Biomaterials* 1997; 18(16):1133-1135.
- (24) Kühn KD: Bone cements. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, S.272 (2000).
- (25) Schieker M, Heiss C, Mutschler W. [Bone substitutes.]. *Unfallchirurg* 2008; 111(8):613-620.
- (26) <http://edoc.hu-berlin.de/habilitationen/soost-frank-2001-03-06/HTML/chapter3.html#N10210>
- (27) Henkel KO, Gerber T, Dietrich W, Bienengraber V. [Novel calcium phosphate formula for filling bone defects. Initial in vivo long-term results]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2004; 8(5):277-281
- (28) Henkel KO, Gerber T, Lenz S, Gundlach KK, Bienengraber V. Macroscopical, histological, and morphometric studies of porous bone-replacement materials in minipigs 8 months after implantation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102(5):606-613.
- (29) Bauer TW. An overview of the histology of skeletal substitute materials. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131(2):217-224.

- (30) Bauer TW, Smith ST. Bioactive materials in orthopaedic surgery: overview and regulatory considerations. *Clin Orthop Relat Res* 2002;(395):11-22.
- (31) [edoc.hu-berlin.de/habilitationen/soost-frank-2001-0306/HTML/chapter7.html](http://edoc.hu-berlin.de/habilitationen/soost-frank-2001-0306/HTML/chapter7.html) - 67k
- (32) Caulier H, Hayakawa T, Naert I, Van Der Waerden JP, Wolke JG, Jansen JA. An animal study on the bone behaviour of Ca-P-coated implants: influence of implant location. *J Mater Sci Mater Med* 1997; 8(9):531-536.
- (33) Hayakawa T, Yoshinari M, Nemoto K, Wolke JG, Jansen JA. Effect of surface roughness and calcium phosphate coating on the implant/bone response. *Clin Oral Implants Res* 2000; 11(4):296-304.
- (34) Wang X, Ma J, Wang Y, He B. Bone repair in radii and tibias of rabbits with phosphorylated chitosan reinforced calcium phosphate cements. *Biomaterials* 2002; 23(21):4167-4176.
- (35) Kawagoe K, Saito M, Shibuya T, Nakashima T, Hino K, Yoshikawa H. Augmentation of cancellous screw fixation with hydroxyapatite composite resin (CAP) in vivo. *J Biomed Mater Res* 2000; 53(6):678-684.
- (36) Knabe C, Berger G, Gildenhaar R, Meyer J, Howlett CR, Markovic B, Zreiqat H. Effect of rapidly resorbable calcium phosphates and a calcium phosphate bone cement on the expression of bone-related genes and proteins in vitro. *J Biomed Mater Res A* 2004; 69(1):145-154.
- (37) Hofmann GO. Biodegradable implants in traumatology: a review on the state-of-the-art. *Arch Orthop Trauma Surg* 1995; 114(3):123-132.
- (38) Heiss C, Schnettler R. [Bioresorbable bone adhesives. Historical perspective and current status]. *Unfallchirurg* 2005; 108(5):348-355.
- (39) Frank BP, Belfort G. Adhesion of *Mytilus edulis* foot protein 1 on silica: ionic effects on biofouling. *Biotechnol Prog* 2002; 18(3):580-586.
- (40) Murugan R, Ramakrishna S. Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite. *Biomaterials* 2004; 25(17):3829-3835.
- (41) Tadic D, Beckmann F, Schwarz K, Epple M.: A novel method to produce hydroxyapatite objects with interconnecting porosity that avoids sintering, *Biomaterials*, Volume 25, Issue 16, July 2004, Pages 3335-3340.
- (42) Li Z, Ramay HR, Hauch KD, Xiao D, Zhang M. Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2005; 26(18):3919-3928.
- (43) Yang Y, He Q, Duan L, Cui Y, Li J. Assembled alginate/chitosan nanotubes for biological application. *Biomaterials* 2007; 28(20):3083-3090.
- (44) Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 2004; 4(8):743-765.



- (45) Mendes SC, Reis RL, Bovell YP, Cunha AM, van Blitterswijk CA, de Bruijn JD. Biocompatibility testing of novel starch-based materials with potential application in orthopaedic surgery: a preliminary study. *Biomaterials* 2001; 22(14):2057-2064.
- (46) [www.namensreaktionen.de/schiffsche-base.html](http://www.namensreaktionen.de/schiffsche-base.html)
- (47) Hoffmann B, Volkmer E, Kokott A, Weber M, Hamisch S, Schieker M, Mutschler W, Ziegler G: A new biodegradable bone wax substitute with the potential to be used as a bone filling material, *J Mater Chem.* 2007 Oct, 17:4028-33.
- (48) Ferrera D, Poggi S, Biassoni C, Dickson GR, Astigiano S, Barbieri O, Favre A, Franzi AT, Strangio A, Federici A, Manduca P. Three-dimensional cultures of normal human osteoblasts: proliferation and differentiation potential in vitro and upon ectopic implantation in nude mice. *Bone* 2002; 30(5):718-725.
- (49) Uusitalo H, Rantakokko J, Ahonen M, Jamsa T, Tuukkanen J, KaHari V, Vuorio E, Aro HT. A metaphyseal defect model of the femur for studies of murine bone healing. *Bone* 2001; 28(4):423-429.
- (50) Jansen J, Ooms E, Verdonschot N, Wolke J. Injectable calcium phosphate cement for bone repair and implant fixation. *Orthop Clin North Am* 2005; 36(1):89-95, vii.
- (51) Mattsson P, Larsson S. Calcium phosphate cement for augmentation did not improve results after internal fixation of displaced femoral neck fractures: a randomized study of 118 patients. *Acta Orthop* 2006; 77(2):251-256
- (52) Larsen ST, Lund RM, Thygesen P, Poulsen OM, Nielsen GD. Investigation of the adjuvant and immuno-suppressive effects of benzyl butyl phthalate, phthalic acid and benzyl alcohol in a murine injection model. *Food Chem Toxicol* 2003; 41(3):439-446.
- (53) Bajammal SS, Zlowodzki M, Lelwica A, Tornetta P, III, Einhorn TA, Buckley R, Leighton R, Russell TA, Larsson S, Bhandari M. The use of calcium phosphate bone cement in fracture treatment. A meta-analysis of randomized trials. *J Bone Joint Surg Am* 2008; 90(6):1186-1196.
- (54) Zamir T. Killing for knowledge. *J Appl Philos* 2006; 23(1):17-40.
- (55) Forni M. Laboratory animal science: a resource to improve the quality of science. *Vet Res Commun* 2007; 31 Suppl 1:43-47.
- (56) A. Almirall, G. Larrecq, J. A. Delgado, S. Martinez, J. A. Planell, M.P. Gineba;: Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an  $\beta$ -TCP paste, *Biomaterials*, Volume 25, Issue 17, August 2004, Pages 3671-3680
- (57) F. Monchau, A. Lefèvre, M. Descamps, A. Belquin-myrdycz, P. Laffargue, H. F. Hildebrand: in vitro studies of human and rat osteoclast activity on hydroxyapatite,  $\beta$ -tricalcium phosphate, calcium carbonate

- (58) Schneiders W, Reinstorf A, Ruhnnow M, Rehberg S, Heineck J, Hinterseher I, Biewener A, Zwipp H, Rammelt S. Effect of chondroitin sulphate on material properties and bone remodelling around hydroxyapatite/collagen composites. *J Biomed Mater Res A* 2008; 85(3):638-645.
- (59) Pautke C, Vogt S, Tischer T, Wexel G, Deppe H, Milz S, Schieker M, Kolk A. Polychrome labeling of bone with seven different fluorochromes: enhancing fluorochrome discrimination by spectral image analysis. *Bone* 2005; 37(4):441-445.
- (60) Pautke C, Tischer T, Vogt S, Haczek C, Deppe H, Neff A, Horch HH, Schieker M, Kolk A. New advances in fluorochrome sequential labelling of teeth using seven different fluorochromes and spectral image analysis. *J Anat* 2007; 210(1):117-121.
- (61) Kneser U, Stangenberg L, Ohnolz J, Buettner O, Stern-Straeter J, Mobest D, Horch RE, Stark GB, Schaefer DJ. Evaluation of processed bovine cancellous bone matrix seeded with syngenic osteoblasts in a critical size calvarial defect rat model. *J Cell Mol Med* 2006; 10(3):695-707.
- (62) Meirelles LS, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol* 2003; 123(4):702-711.
- (63) Trout AT, Kallmes DF. Does vertebroplasty cause incident vertebral fractures? A review of available data. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006; 27(7):1397-1403.
- (64) Waite JH. Reverse engineering of bioadhesion in marine mussels. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 875:301-309.
- (65) Yin Y, Ye F, Cui J, Zhang F, Li X, Yao K. Preparation and characterization of macroporous chitosan-gelatin/beta-tricalcium phosphate composite scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2003; 67(3):844-855.
- (66) Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford DS, Frondoza CG. Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. *J Biomed Mater Res* 2000; 51(4):586-595.
- (67) Waite JH, Qin XX, Coyne KJ. The peculiar collagens of mussel byssus. *Matrix Biol* 1998; 17(2):93-106.
- (68) Eriksson F, Mattsson P, Larsson S. The effect of augmentation with resorbable or conventional bone cement on the holding strength for femoral neck fracture devices. *J Orthop Trauma* 2002; 16(5):302-310.
- (69) Willems BA, Melnick RL, Kohn MC, Portier CJ. A physiologically based pharmacokinetic model for inhalation and intravenous administration of naphthalene in rats and mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 176(2):81-91.
- (70) Mark H, Bergholm J, Nilsson A, Rydevik B, Stromberg L. An external fixation method and device to study fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 2003; 74(4):476-482.

- (71) Peh WC, Gilula LA. Percutaneous vertebroplasty: an update. *Semin Ultrasound CT MR* 2005; 26(2):52-64.
- (72) Srikumaran U, Wong W, Belkoff SM, McCarthy EF. Histopathologic analysis of human vertebral bodies after vertebral augmentation with polymethylmethacrylate with use of an inflatable bone tamp. A case report. *J Bone Joint Surg Am* 2005; 87(8):1838-1843.
- (73) Jasper LE, Deramond H, Mathis JM, Belkoff SM. Material properties of various cements for use with vertebroplasty. *J Mater Sci Mater Med* 2002; 13(1):1-5.
- (74) Hadjipavlou AG, Tzermiadianos MN, Katonis PG, Szpalski M. Percutaneous vertebroplasty and balloon kyphoplasty for the treatment of osteoporotic vertebral compression fractures and osteolytic tumours. *J Bone Joint Surg Br* 2005; 87(12):1595-1604.
- (75) Filgueira L. Fluorescence-based staining for tartrate-resistant acidic phosphatase (TRAP) in osteoclasts combined with other fluorescent dyes and protocols. *J Histochem Cytochem* 2004; 52(3):411-414.
- (76) Laurencin CT, Ambrosio AM, Borden MD, Cooper JA, Jr. Tissue engineering: orthopedic applications. *Annu Rev Biomed Eng* 1999; 1:19-46.
- (77) Waite JH, Housley TJ, Tanzer ML. Peptide repeats in a mussel glue protein: theme and variations. *Biochemistry* 1985; 24(19):5010-5014.
- (78) Burzio LO, Burzio VA, Silva T, Burzio LA, Pardo J. Environmental bioadhesion: themes and applications. *Curr Opin Biotechnol* 1997; 8(3):309-312.
- (79) Knabe C, Driessens FC, Planell JA, Gildenhaar R, Berger G, Reif D, Fitzner R, Radlanski RJ, Gross U. Evaluation of calcium phosphates and experimental calcium phosphate bone cements using osteogenic cultures. *J Biomed Mater Res* 2000; 52(3):498-508.
- (80) Du C, Cui FZ, Feng QL, Zhu XD, de Groot K. Tissue response to nano-hydroxyapatite/collagen composite implants in marrow cavity. *J Biomed Mater Res* 1998; 42(4):540-548.
- (81) Du C, Cui FZ, Zhang W, Feng QL, Zhu XD, de Groot K. Formation of calcium phosphate/collagen composites through mineralization of collagen matrix. *J Biomed Mater Res* 2000; 50(4):518-527.
- (82) Jin QM, Takita H, Kohgo T, Atsumi K, Itoh H, Kuboki Y. Effects of geometry of hydroxyapatite as a cell substratum in BMP-induced ectopic bone formation. *J Biomed Mater Res* 2000; 51(3):491-499.
- (83) Deacon MP, Davis SS, Waite JH, Harding SE. Structure and mucoadhesion of mussel glue protein in dilute solution. *Biochemistry* 1998; 37(40):14108-14112.
- (84) Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg* 1998; 9(4):310-316.

- (85) Jager M, Sager M, Lensing-Hohn S, Krauspe R. The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (II): implant evolution and surgical technique on a rat's femur. *Biomed Tech (Berl)* 2005; 50(5):137-142.
- (86) Vacanti CA. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med* 2006; 10(3):569-576.
- (87) Erben RG. Embedding of bone samples in methylmethacrylate: an improved method suitable for bone histomorphometry, histochemistry, and immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1997; 45(2):307-313.
- (88) Kettler M, Kuhn V, Schieker M, Melone CP. Do We need to include osteoporosis in today's classification of distal radius fractures? *J Orthop Trauma* 2008; 22(8 Suppl):S79-S82.
- (89) Drosse I, Volkmer E, Seitz S, Seitz H, Penzkofer R, Zahn K, Matis U, Mutschler W, Augat P, Schieker M. Validation of a femoral critical size defect model for orthotopic evaluation of bone healing: a biomechanical, veterinary and trauma surgical perspective. *Tissue Eng Part C Methods* 2008; 14(1):79-88.
- (90) Forni M. Laboratory animal science: a resource to improve the quality of science. *Vet Res Commun* 2007; 31 Suppl 1:43-47.
- (91) Ignatius AA, Augat P, Ohnmacht M, Pokinskyj P, Kock HJ, Claes LE. A new bioresorbable polymer for screw augmentation in the osteosynthesis of osteoporotic cancellous bone: a biomechanical evaluation. *J Biomed Mater Res* 2001; 58(3):254-260.
- (92) Pawlicki JM, Pease LB, Pierce CM, Startz TP, Zhang Y, Smith AM. The effect of molluscan glue proteins on gel mechanics. *J Exp Biol* 2004; 207(Pt 7):1127-1135.
- (93) Larsson S, Bauer TW. Use of injectable calcium phosphate cement for fracture fixation: a review. *Clin Orthop Relat Res* 2002;(395):23-32.
- (94) Heiss C, Schieker M, Schnettler R. [Implantation of bone substitutes for tibial head fractures.]. *Unfallchirurg* 2008; 111(8):621-627.
- (95) Navarro M, Ginebra MP, Planell JA, Zeppetelli S, Ambrosio L. Development and cell response of a new biodegradable composite scaffold for guided bone regeneration. *J Mater Sci Mater Med* 2004; 15(4):419-422.
- (96) Zhang Y, Xu HH, Takagi S, Chow LC. In-situ hardening hydroxyapatite-based scaffold for bone repair. *J Mater Sci Mater Med* 2006; 17(5):437-445.
- (97) Goto T, Kojima T, Iijima T, Yokokura S, Kawano H, Yamamoto A, Matsuda K. Resorption of synthetic porous hydroxyapatite and replacement by newly formed bone. *J Orthop Sci* 2001; 6(5):444-447.
- (98) Jager M, Wilke A. Comprehensive biocompatibility testing of a new PMMA-hA bone cement versus conventional PMMA cement in vitro. *J Biomater Sci Polym Ed* 2003; 14(11):1283-1298.

- (99) Arkudas A, Beier JP, Heidner K, Tjiawi J, Polykandriotis E, Srour S, Sturzl M, Horch RE, Kneser U. Axial prevascularization of porous matrices using an arteriovenous loop promotes survival and differentiation of transplanted autologous osteoblasts. *Tissue Eng* 2007; 13(7):1549-1560.
- (100) Hoang NT, Kloeppel M, Staudenmaier R, Werner J, Biemer E. Prefabrication of large fasciocutaneous flaps using an isolated arterialised vein as implanted vascular pedicle. *Br J Plast Surg* 2005; 58(5):632-639.
- (101) Projekt "Osteoporose und Stürze im Alter-Fakten und Handlungsbedarf 31.7.2004; Bundesamt für Gesundheit
- (102) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411):143-147.
- (103) Bolland BJ, Tilley S, New AM, Dunlop DG, Oreffo RO. Adult mesenchymal stem cells and impaction grafting: a new clinical paradigm shift. *Expert Rev Med Devices* 2007; 4(3):393-404.
- (104) Hsu WK, Sugiyama O, Park SH, Conduah A, Feeley BT, Liu NQ, Krenek L, Virk MS, An DS, Chen IS, Lieberman JR. Lentiviral-mediated BMP-2 gene transfer enhances healing of segmental femoral defects in rats. *Bone* 2007; 40(4):931-938.
- (105) Jager M, Degistirici O, Knipper A, Fischer J, Sager M, Krauspe R. Bone healing and migration of cord blood-derived stem cells into a critical size femoral defect after xenotransplantation. *J Bone Miner Res* 2007; 22(8):1224-1233.
- (106) Mueller-Stahl K, Kofidis T, Akhyari P, Wachsmann B, Lenz A, Boublik J, Heine M, Muehlfait V, Haverich A, Mertsching H. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester facilitates cell tracing and colocalization studies in bioartificial organ engineering. *Int J Artif Organs* 2003; 26(3):235-240.
- (107) Dellling G. [Pathohistology of femoral head necrosis]. *Orthopade* 2007; 36(5):404, 406-3.
- (108) Stangenberg L, Schaefer DJ, Buettner O, Ohnolz J, Mobest D, Horch RE, Stark GB, Kneser U. Differentiation of osteoblasts in three-dimensional culture in processed cancellous bone matrix: quantitative analysis of gene expression based on real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Tissue Eng* 2005; 11(5-6):855-864.
- (109) Cumming G, Fidler F, Vaux DL. Error bars in experimental biology. *J Cell Biol* 2007; 177(1):7-11.
- (110) [www.uni-duesseldorf.de/.../11-miesm\\_byssus.jpg](http://www.uni-duesseldorf.de/.../11-miesm_byssus.jpg)

- (111) Klebstoffe und Polymerchemie: Proteinbasierte Materialien und Bioadhäsion:  
[www.ifam.fraunhofer.de/2804/polymerchemie/projekte/bioadhaesion/projekt\\_polymerchemie\\_bioadhaesion.pdf](http://www.ifam.fraunhofer.de/2804/polymerchemie/projekte/bioadhaesion/projekt_polymerchemie_bioadhaesion.pdf)
- (112) Zantop T, Gilbert TW, Yoder MC, Badylak SF. Extracellular matrix scaffolds are repopulated by bone marrow-derived cells in a mouse model of achilles tendon reconstruction. *J Orthop Res* 2006; 24(6):1299-1309.
- (113) Goto T, Kojima T, Iijima T, Yokokura S, Kawano H, Yamamoto A, Matsuda K. Resorption of synthetic porous hydroxyapatite and replacement by newly formed bone. *J Orthop Sci* 2001; 6(5):444-447.
- (114) Einhorn TA. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma* 2005; 19(10 Suppl):S4-S6.
- (115) Drosse I, Volkmer E, Capanna R, De Biase P, Mutschler W, Schieker M. Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach. *Injury* 2008; 39 Suppl 2:S9-20.
- (116) *Biomolecular Engineering*, Volume 19, Issues 2-6, August 2002, Pages 143-152

## Anhang

### Protokoll 1

Anfertigung der Paraffineinbettung für die Histologie:

Manipulation	Temperatur	Dauer
Wässerung	21°C	2h
Tränken in 50% Ethanol	21°C	2h
Tränken in 70% Ethanol	21°C	2h
Tränken in 70% Ethanol	21°C	2h
Tränken in 80% Ethanol	21°C	2h
Tränken in 90% Ethanol	21°C	2h
Tränken in 100% Ethanol	21°C	2h
Tränken in 100% Ethanol	21°C	2h
Tränken in Xylol	21°C	2h
Tränken in Xylol	21°C	2h
Tränken in Xylol	21°C	2h
Tränken in Paraffin	60°C	2h
Tränken in Paraffin	60°C	2h
Einbetten in Paraffin	60°C	

### Protokoll 2

Färbung mit HE für Paraffinschnitte:

Spülung in Aqua dest.

Färbung in Mayer's Hämalaun für 10 min

Fließende Wässerung für 10 min

Färbung in Eosin 0,1 % für 10 min

Spülung in Aqua dest.

Spülung in 80%, 90%, 100% Ethanol für 1, 2, und 5 min

Spülung mit Xylol für 2x2 min

### Protokoll 3

Anfertigung der MMA-Einbettung für die Histologie

Manipulation	Lagerung	Dauer
50% Ethanol		1 Tag
80% Ethanol		1 Tag
90% Ethanol		1 Tag
100% Ethanol	Raumtemperatur	2 Tage
100% Ethanol		2 Tage
Aceton		2 Tage
Aceton		2 Tage
Präinfiltration		1 Tag
Infiltration I	Exsikkator,	1 Tag
Infiltration II	Raumtemperatur	1 Tag



---

Polymerisation	Kühlschrank	1 Tag
Polymerisation	Wärmeschrank, 22°C	14 Tage

---

#### Protokoll 4

Trichrom-färbung nach Masson-Goldner für MMA-Schnitte:

Die Schnitte/Objektträger wurden kurz zur Entfettung in Aceton100%-Ethanol100% Gemisch (1:1) eingetaucht.

Spülung in Aqua dest

Kernfärbung in Weigert's Eisenhämatoxilin für 21 min

Spülung in Aqua dest.

Fließende Wässerung in Leitungswasser für 15 min

Spülung in Aqua dest.

Färbung in Säurefuchsin-Poncau für 20 min

Spülung in 1 % Essigsäure

Differenzierung in Phosphorwolframsäure-Orange G für 8 min

Färbung in 1% Lichtgrün für 20 min

Spülung in 1% Essigsäure für 4 min

Spülung in Aqua dest.

Spülung in Ethanol 100% für 4 min

Protokoll 5

Hämalaun - Erythrosin - Färbung für MMA – Schnitte:

Die Schnitte/Objektträger wurden kurz zur Entfettung in Aceton100%-Ethanol100% Gemisch (1:1) eintgetaucht.

Kernfärbung in Mayer s Hämalaun für 10 min

Fließende Wässerung in Leitungswasser für 10 min

Färbung in Erythrosin (0,1 %ig) für 7 min

Spülung in Aqua dest.

Spülung in Ethanol 96 % für 1 min

Übersicht über die verwendeten Materialien:

Analysenwaage Kern 770-12  
Autoklav Varioklav 300

Axiocam Jcc3  
Axiocam MR  
Duran Glasware (Flaschen, Bechergläser,...)  
Exsikkator  
Flüssigkeitsabsaugssystem  
Innenlochsäge  
Mikroskop, Typ Axiovert S100  
Mikroskop Axiophot  
Mikroskop, Axioskop 2  
Mikrotom 2050  
Pipette, Typ Pipetman 2, 10, 20, 200, 1000 µl  
Pipettierhilfe Pipettus akku  
pH-Meter, Typ pH 525  
Polycut-E

Kern, Balingen  
H+P Labortechnik, Ober-  
schleißheim  
Carl Zeiss, Berlin  
Carl Zeiss, Berlin  
Schott, Mainz  
Schott, Mainz  
Roth, Karlsruhe  
Leitz, Wetzlar  
Carl Zeiss, Berlin  
Carl Zeiss, Berlin  
Carl Zeiss, Berlin  
Reichert-Jung  
Gilson, Middleton, USA  
Hirschmann, Eberstadt  
WTW, Weilheim  
Reichert-Jung

Tiefkühlschrank (- 80 °C), Typ 6485	GFL, Burgwedel
Trockenschrank	Jouan, Frankreich
Vakuum- Konzentrator, Typ RC 10-10 mit Vakuum- Pumpe, Typ AEPF63BL-4-SO	ATMA, Schwarzenbach/ Saale
Wasserbad Typ 1012	GFL, Burgwedel
Wärmeplatte 37 °C	
Wärmeschrank 37°C	Jouan, Frankreich
Zentrifuge Typ Univ. 16R, Rotor 1624	Hettlich, Tuttlingen

**Tab. 8** Verwendete Laborgeräte

Alufolie, Typ Universal 30	VWR, Darmstadt
Deckgläser 24x50 mm	Menzel, Braunschweig
Einmal- Handschuhe Typ sempercare edition	Semperit, Techn.Prod., Wien
Einmal-Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Eppendorf, D
Einmal-Skalpelle	Feather, Japan
Einmal-Spritzen (1ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Becton Dickinson, USA
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, D
Faltenfilter	Schleicher&Schuell, Dassel
Glasobjektträger, Superfrost Plus	Menzel, Braunschweig
Kanülen, BD Microlane 3	Becton Dickinson, Heidelberg
Pasteur-Pipetten (230 mm)	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen (10 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 200 $\mu$ l, 1.000 $\mu$ l)	Eppendorf, Hamburg
Plastikspritzen, 2, 5, 10, 20 ml	Becton Dickinson Heidelberg
Safe-seal Reagiergefäße	Sarstedt, D
Sterilfilter	Nalgene, USA
Skalpelle, Fig. 15	Feather Safety Razor, Japan
Wägeschälchen	Roth, D

**Tab. 9** Verwendete Verbrauchsmaterialien

Aceton	Merck, Darmstadt
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
Benzoylperoxid	Merck, Darmstadt
Chitosan	Sigma, Deisenhofen
DPX	Fluka, D
Essigsäure, Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut (EtOH)	Merck, Darmstadt
Ethanol 70 % in Aqua dest.	Klinikapotheke
Eukitt	O. Kindler GmbH, Freiburg
Eosin 0,1 %	Merck, Darmstadt
Fluoresceindiacetat	Fluka, CH
Formaldehyd (37%)	Merck, Darmstadt
Hämalaun (Mayer´s)	Fluka, CH
Hydroxylapatit	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Lichtgrün	Fluka, CH

Methanol	Merck, Darmstadt
Methylmetacrylat (MMA)	Merck, D
Methoxyethylacetat	Merck, D
Methylenblau	Merck, D
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Plastoid N	Fluka, CH
Phosphorwolframsäure-Orange G	Sigma, Deisenhofen
Propidiumiodid	Fluka, CH
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Säurefuchsin-Ponceau	Sigma, Deisenhofen
Sekundenkleber Cyanolit	Bürklin
Stärke	Merck, Darmstadt
Xylol 100 %	Merck, D
Weigert's Eisenhämatoxilin	Fluka, CH

**Tab. 10** Verwendete Substanzen und Nährmedien

Bipolare Pinzette	KLS Martin, D
Chirurgisches Implantologiegerät Implantmed SI-923	W&H, A
Chirurgische Pinzetten (1:2 Zähne)	Aesculap, D
Chirurgisches Winkelstück, 1:1	W&H, A
Einmalskalpelle	Feather, Japan
Handgriff mit Schnellspannfutter	Stryker, D
Lidhalter Modell Barraquer	Heiland, D
Nadelhalter	Aesculap, D
Nadelhalter für Mikrochirurgie	Aesculap, D
Narkosegerät	Aesculap, D
Präparierschere	Aesculap, D
Prolene (5-0) nichtresorbierbares Nahtmaterial	Ethicon, D
Schere	Aesculap, D
Spannzange	Stryker, D
Spannhülse	Stryker, D
Vicryl (5-0) resorbierbares Nahtmaterial	Ethicon, D
Wundspreizer nach Gelpi	Heiland, D

**Tab. 11** Verwendetes Chirurgisches Instrumentarium

Wirkstoff

Konzentration

---

**Narkose**

---

Medetomidin	0,15 mg/kg
-------------	------------

---

Midazolam	2 mg/kg
-----------	---------

---

Fentanyl	0,005 mg/kg
----------	-------------

---

**Antagonisierung**

---

Atipamezol	0,75 mg/kg
------------	------------

---

Flumazenil	0,2 mg/kg
------------	-----------

---

Naloxon	0,12 mg/kg
---------	------------

---

**Analgesie**

Carprofen	50 mg/kg
-----------	----------

---

**Tab. 12** Verwendete Medikamente

athyme HsdWin:NMRI Auszucht-Mäuse

| Janvier, LeGenest St Isle, F

**Tab. 13** Verwendete Tiere

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ad. Inj.	Ad injectabilia
$\beta$ -TCP	$\beta$ -Tricalciumphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ETOH	Ethanol
HA	Hydroxylapatit
i. m.	intramuskulär
Kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
Lig.	Ligamentum
Mefp-1	Mytilus edulis Fussprotein 1
MMA	Methylmetacrylat
MPa	Megapascal
PMMA	Polymethylmetacrylat
PVC	Polyvinylchlorid
s. c.	subkutan
TSchG	Tierschutzgesetz
ZVH	Zentrale Versuchstierhaltung

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Matthias Schieker bin ich für die Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen, sehr zu Dank verpflichtet.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Reinhard Putz für die Bereitstellung der erforderlichen Geräte und Räumlichkeiten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Elias Volkmer für seine unermüdliche, intensive und freundschaftliche Unterstützung. Ohne seinen Ansporn und seine Bemühungen wäre es mir nicht möglich gewesen, die Dissertation in dieser Form durchzuführen.

Ich danke Frau Dr. Inga Drosse, die immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte, und viel zu dieser Arbeit beigetragen hat.

Außerdem danke ich Frau Claudia Harbauer für ihre Hilfe bei der histologischen Aufarbeitung und Färbung der Präparate.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Sebastian Seitz für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Ich danke allen Mitarbeitern der Experimentellen Chirurgie, die mir stets bei Fragen zur Seite standen und immer für Anregungen zu dieser Dissertation sorgten.

Mein Dank gilt meinen Eltern, die mich während meines Studiums und bei der Fertigstellung dieser Dissertation immer unterstützt haben.

Außerdem danke ich meinem Mann Leo für seine moralische Unterstützung und für die Hilfe bei der Anfertigung der histologischen Schnitte.

## Lebenslauf

### *Persönliche Daten:*

*Name:* Anna Katharina Neunhoeffer

*Geburtsdatum:* 31.08.1983

*Geburtsort:* München

*Nationalität:* Deutsch

*Familienstand:* verheiratet

*Eltern:* Harald Richter, Rechtsanwalt

Uta Richter, Orthoptistin

### *Schulbildung:*

1990-1994: Grundschule Vaterstetten

1994-2003: Humboldt-Gymnasium Vaterstetten

25.06.2003: Allgemeine Hochschulreife (Note 1,2)

### *Studium:*

2003-2009: Studium der Zahnheilkunde, Ludwig-Maximilians-Universität München

Juli 2008 – Januar 2009: Staatsexamen (Gesamtnote 1.6)

seit Oktober 2006: Mitarbeiterin im Labor Experimentelle Chirurgie und Regenerative Medizin ([www.ExperiMed.de](http://www.ExperiMed.de)), Chirurgische Klinik - Innenstadt, Klinikum der LMU München;

Thema der Dissertation: Biokompatibilität einer neuen Knochenfüllsubstanz auf der Basis von Chitosan und Hydroxylapatit *in vivo*



## Publikationen

Volkmer E, Hoffmann B, Kokott A, Drosse I, **Neunhoefffer AK**, Haasters F, Seitz S, Stengele M, Ziegler G, Mutschler W, Schieker M

A short-term bioresorbable bone filling material tested in a novel orthotopic metaphyseal mouse model

Adv Eng Mater. 2009, 11(8):B114-B121