

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung der LMU

Kommissarischer Direktor: Prof.Dr.med. U. Pohl

**Eine neue Methode zur Dampfsterilisierung von
Knochenmaterial unter Erhalt der mechanischen
Steifigkeit und Osteokonduktivität
- In vitro und tierexperimentelle Ergebnisse -**

**Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
von Dr.med. Guy Florian Draenert aus Ruit auf den Fildern**

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Dekan: _____ Prof. Dr. med. D. Reinhardt _____

1. Berichterstatter: _____ Prof. Dr. med. M. Delius _____

Mitberichterstatter: _____ Prof. Dr. med. P.E. Müller _____

Mitberichterstatter: _____ PD Dr. med. A. Frick _____

Tag der Promotion: _____ 07.12.2006 _____

Inhaltsverzeichnis

	Seite	
1.	<u>EINLEITUNG</u>	
1.1.	Knochenersatz	6
1.1.1.	Autologe Knochentransplantate	6
1.1.2.	Knochenersatzwerkstoffe	6
1.1.2.1.	Osteokonduktives Knochenersatzmaterial	6-7
1.1.2.2.	Osteoinduktives Knochenersatzmaterial	7-8
1.1.2.3.	Allogene Knochentransplantate	8
1.2.	Infektionsrisiken bei allogenen Knochentransplantaten	8
1.2.1.	Relevante Infektionsrisiken bei allogenen Knochentransplantaten	8-9
1.2.2.	Gegenwärtige Probleme bei der Prüfung von Spenderknochen	9-10
1.3.	Entkeimung von Knochentransplantaten	10
1.3.1.	Chemische Desinfektion von Knochentransplantaten	11
1.3.2.	Chemische Sterilisation von Knochentransplantaten	11
1.3.3.	Strahlensterilisation von Knochentransplantaten	11-12
1.3.4.	Thermische Entkeimungsverfahren von Knochentransplantaten	12-13
1.4.	Problemstellung	13-14
2.	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	
2.1.	Powerpore [®] duro Methode und Dampfsterilisierung	15
2.2.	Knochenmaterial für Versuche	15
2.2.1.	Knochenmaterial für in vitro Versuche	15
2.2.2.	Knochenmaterial für in vivo Versuche	16
2.3.	<u>Material für in vitro Versuche</u>	
2.3.1.	INSTRON-Kompressionsmessgerät	18
2.3.2.	Andere Geräte für in vitro Versuche	18
2.3.3.	Diamant-Fräsen	18
2.4.	<u>Material für in vivo Versuche</u>	
2.4.1.	Versuchstiere	20
2.4.2.	Bohrschablonen für Patellagleitlagerversuche	20
2.5.	<u>Methoden für in vitro Versuche</u>	
2.5.1.	Kompressionstest	21-22
2.5.2.	Berechnungsmethoden	22
2.5.3.	Statistik	23

2.6.	<u>Methoden für in vivo Versuche</u>	
2.6.1.	Narkose der Versuchstiere	24
2.6.2.	Operation am Knie der Versuchstiere	24
2.6.3.	Haltung der Tiere und Nachsorge	25
2.6.4.	Fluoreszenzmarkierung	25
2.6.5.	Perfusion und Tötung der Tiere	25
2.6.6.	Histologische Aufarbeitung der Präparate	26
3.	<u>ERGEBNISSE</u>	
3.1.	Kompressionsversuch in vitro	27-29
3.2.	Tierversuchsstudie im Patellagleitlagermodell des Kanninchens	
3.2.1.	Phase der Knochenbruchheilung (30 Tage)	30
3.2.1.1.	Phase der Knochenbruchheilung (30 Tage): qualitative Ergebnisse	30
3.2.1.2.	Phase der Knochenbruchheilung (30 Tage): quantitative Ergebnisse	30-31
3.2.2.	Phase der Adaption (100 Tage)	
3.2.2.1.	Phase der Adaption (100 Tage): qualitative Ergebnisse	32
3.2.2.2.	Phase der Adaption (100 Tage): quantitative Ergebnisse	33
4.	<u>DISKUSSION</u>	
4.1.	Diskussion von Material und Methoden	37-38
4.2.	Diskussion der in vitro Kompressionsversuche	38-39
4.3.	Diskussion der Tierversuchsergebnisse nach 30 Tagen	40
4.4.	Diskussion der Tierversuchsergebnisse nach 100 Tagen	40-42
4.5.	Schlussbetrachtungen	42-43
5.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	44
6.	<u>ABSTRACT (ENGLISH)</u>	45
7.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	46-54
8.	<u>DANKSAGUNGEN</u>	55
9.	<u>ANHANG</u>	56-58
10.	<u>CURRICULUM VITAE</u>	59-60

Abkürzungsverzeichnis

In alphabetischer Reihenfolge:

Abb. -Abbildung

D -Durchmesser

g -Gramm

kGy -Kilogray

kg -Kilogramm

l -Liter

mg -Milligramm

N -Newton

Pa -Pascal

Sec. -Sekunde

Tab. -Tabelle

1. EINLEITUNG

1.1. Knochenersatz

Knochenmaterial ist in Orthopädie, Zahnheilkunde, Gesichtschirurgie und Traumatologie als Ersatzwerkstoff weit verbreitet. Jährlich werden geschätzte 1,5 Mio allogene Knochentransplantate aus Gewebekbanken in den USA verwendet (Einhorn TA 2003). Kleinere Defekte werden vorzugsweise mit autologem Knochenmaterial gefüllt, während bei Eingriffen wie Tibiaplateaufrakturversorgungen, Hüftgelenkoperationen, Knochtumoren, Infektionen oder Wirbelkörperaugmentationsplastiken oft auch körperfremdes Material erforderlich ist (Mallinin T et al. 1985, Mankin H 1987, Matti H 1929, Wolter D 1976).

1.1.1. Autologe Knochentransplantate

Autologes Knochenmaterial, zumal einzeitig entnommen, hat die besten Eigenschaften der Osteogenität sowie optimale Osteoinduktivität und -konduktivität und ist daher der Goldstandard (Wolf K et al. 2000). Es bestehen hier keine immunologischen Probleme wie bei allo- und xenogenem Material. Das Angebot an autologem Knochenmaterial ist auf Grund der begrenzten Mengen an den geeigneten Entnahmestellen (Beckenkamm, Tibia, Kieferbereich) stark limitiert. Die Verwendung von mikrovaskulär reanastomosierten Knochentransplantaten ist eine Sonderform des Knochenersatzes und zu keiner der hier vorgestellten Techniken redundant (Marx RE 1994). Wegen der erheblichen Entnahmedefekte ist diese Rekonstruktionsform die ultima Ratio bei schweren Defekten wie Tumoren.

1.1.2. Knochenersatzwerkstoffe

Knochenersatzwerkstoffe, hierzu zählen anorganische und organische Materialien verschiedener Morphologie mit resorbierbaren und nicht resorbierbaren Eigenschaften, bieten nur eine unzureichende Lösung des Problems.

1.1.2.1. Osteokonduktives Knochenersatzmaterial

Es handelt sich entweder um rein mineralische Materialien wie gesinteren Knochen oder künstliche Keramiken aus z.B. Tricalciumphosphat oder Hydroxylapatit, oder demineralisierte Matrices, also mineralfreie Bindegewebsgerüste. Sie besitzen im Gegensatz zu Spenderknochen rein osteokonduktive Eigenschaften, das heisst sie fördern das Einwandern und -wachsen körpereigener Knochenvorläuferzellen und

deren Differenzierung zu Osteoblasten, ohne dass die Differenzierung und Knochenproduktion durch enthaltene Gewebefaktoren beeinflusst wird. Diese Reize führen dann zur schalenartigen Anlagerung von neuem Knochen am und im Material, sofern dieses durchgängig ist (interkonnektierende Poren) (Draenert K, Draenert Y 1992). Ermöglicht wird dies durch eine entsprechend geeignete Oberflächenrauigkeit und knochenähnliche Steifigkeit und Verformbarkeit (Draenert K, Draenert Y 1992). Diese beiden Parameter sind in der Literatur zwar beschrieben, aber nicht systematisch untersucht und eindeutig definiert worden (Kobayashi M et al. 2000, Pilliar RM 1998). Keines der osteokonduktiven Materialien weist darüberhinaus die Kombination der Protein/Proteoglykan und Mineralmatrix des natürlichen Knochens auf, was auf Grund der beschriebenen biologischen Eigenschaften eine optimale Osteokonduktivität zusätzlich bedingt.

1.1.2.2. Osteoinduktives Knochenersatzmaterial

Neben der morphologischen und biomechanischen Komponente der osteokonduktiven Leitstruktur einer Matrix spielen bei der Osteogenese auch lokale Gewebefaktoren eine wichtige Rolle. Es ist gelungen, solche zu identifizieren, die entsprechend geeignete Zellen zur Aktivierung und Differenzierung zu Osteoblasten anregen. Die meisten dieser Proteine gehören zur Familie der TGF- β -Wachstumsfaktoren und werden entsprechend ihrer Wirkung als Bone Morphogenetic Proteins (BMP) bezeichnet (z.B. BMP-2, BMP-7) (Urist MR 1965, Urist MR et al. 1979, Linkhart TA et al. 1996). Andere Signalpeptide fördern das Knochenwachstum auch durch Vaskularisation. Hierzu zählen nach heutigem Wissen neben systemischem Mineral- und Knochenmetabolismus besonders IGF-1, PDGF und bFGF (Amizuka N et al. 1998, Arm DM et al. 1996, Linkhart TA et al. 1996, Nakamura K et al. 1996, Nakamura T et al. 1995). Aus diesen Arbeiten resultierten zum einen Einzelwirkstoffe wie z.B. OP-1 (BMP-7) (Stryker Biotech) und BMP-2 (Genetics Institute), zum anderen Extrakte aus tierischen Geweben wie z.B. Colloss (Ossacur, ein bovines Knochenextrakt), Emdogain (Straumann AG, Schweinezahnfollikelextrakt) oder „BMP-Urmix“ (Urist MR 1965). Die Ergebnisse der vorliegenden Studien in verschiedenen Tierversuchsmodellen sind auf Grund der verschiedenen Gewebsregenerationspotentiale von Mensch und Tier nicht unumstritten. Es liegen zu den bisher isolierten und geklonten 12 BMPs insbesondere Daten zu den effektivsten Faktoren BMP-7(OP-1) und BMP-2 vor.

Publikationen zu klinischen Studien mit BMP-2 beschreiben nur die Unbedenklichkeit des Materials, aber keine positiven Ergebnisse gegenüber dem Autograft, was Knochenheilung und –einwachsen betrifft (Cochran DL et al. 2000, Howell TH et al. 1997, Riedel GE et al. 1999). Dies legt die Vermutung nahe, dass es keinen klinischen Erfolg gibt. Eine Studie mit OP-1 (BMP-7) bei Sinuslift-Operationen zeigte in einem von drei Fällen geeignete Knochenbildung für Implantatversorgung, in den zwei anderen keine oder ungeeignete Knochenbildung, während in der Autograftkontrollgruppe alle 5 Patienten gute, implantologisch brauchbare Ergebnisse zeigten (van den Bergh JP et al. 2000). Die bisherigen Ergebnisse mit Wachstumsfaktoren sind zusammenfassend betrachtet wenig positiv. Fragen zu Langzeitfolgen wie ein mögliches erhöhtes Krebsrisiko sind nicht geklärt. Eine breite Anwendung muss daher und auf Grund der hohen Kosten, welche 2 bis mehrfach höher sind als das notwendige Testverfahren für allogenen Spenderknochen, in Frage gestellt werden.

1.1.2.3. Allogene Knochentransplantate

Heute werden Defekte, welche aufgrund der Größe nicht mit körpereigenem Knochen versorgt werden können, vorzugsweise mit allogenen Knochen aus Knochenbanken versorgt. Erstmals beschrieben wurde die Konservierung und Lagerung von Knochenmaterial von Ollier (1867). Incan (1942) erprobte systematisch die klinische Effektivität von Knochentransplantaten und beschreibt erstmals eine gezielte Konservierung von Knochenmaterial, welche steril in gefrorenem Zustand unter 0°C erfolgte. Heute ist das Lagern von Spenderknochen in Knochenbanken eine komplexe Aufgabe, die viele Dokumentations- und Regulationsanforderungen erfüllen muss (American Association of Tissue Banks 1984 und 1987, Center for Disease Control 1994, European Association of Musculo-Skeletal Transplantation 1993). Spenderknochen wird nach mikrobiologischer Testung des Spenders wie im Folgenden beschrieben kryopräserviert gelagert.

1.2. Infektionsrisiken bei allogenen Knochentransplantaten

1.2.1. Relevante Infektionsrisiken bei allogenen Knochentransplantaten

Allogener, humaner Knochen birgt wie alle Gewebetransplantate das Risiko der Übertragung zahlreicher Keime. Zu diesen zählen sowohl vom Spender ausgehende Infektionen als auch bakterielle Kontamination (Ivory JP und Thomas IH 1993,

Tomford WW 1995, Kakaiya R et al. 1991). Wie von diesen Autoren beschrieben sind solche Erreger von besonderem Interesse, welche nicht durch eine prophylaktische Pharmakotherapie kontrolliert werden können und tödliche Krankheiten verursachen wie das Hepatitis-B-Virus (HBV), Hepatitis-C-Virus (HCV), HIV (Humane Immunodeficiency Virus) Typ 1 und 2 und Prionen. Da die von diesen Keimen verursachten Krankheiten lange Inkubationszeiten aufweisen, ist ein einfacher Spenderausschluss durch offensichtlich bestehende Krankheit nicht möglich (Kakaiya R et al. 1991).

HIV stellt ein besonderes Problem dar, da lange Inkubationszeit und venerische Übertragungswege zu einer weiten Verbreitung mit immer noch starken Neuinfektionszahlen führen (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) and World Health Organization (WHO) 2005). Demnach sind derzeit (2006) zirka 40 Millionen Menschen HIV-infiziert, dies bei einer jährlichen Zunahme um 5 Millionen Infizierte. In Schwarzafrika (südlich der Sahara) leben 26 Millionen dieser Infizierten. Aufgrund fehlender Geldmittel sind Tests für Gewebespende hier kaum möglich. Die Inkubationszeit beträgt durchschnittlich 5 Jahre, bevor die Krankheit mit ausnahmslos tödlichem Ausgang einsetzt, sofern keine adäquate medikamentöse Therapie stattfindet, was insbesondere in der dritten Welt nicht möglich ist (Hessol NA *et al.* 1987, Rees M 1987). In einem Fenster von 3 Wochen bis 3 Monaten unmittelbar nach Infektion ist ein Erregernachweis mit Antikörpersuchtests nicht möglich (Allain J-P *et al.* 1986). Darüber hinaus ist einer von 1000 HIV-positiven Personen dauerhaft seronegativ im Test, da sein Körper keine Antikörper produziert, was für das Restrisiko getesteter Spender verantwortlich ist (Poiesz BJ *et al.* 1987). Diese Faktoren machen HIV zu einem der Hauptprobleme bei Gewebetransplantaten insbesondere in der dritten Welt.

Prionen hingegen stellen im Zusammenhang mit Knochentransplantaten ein eher geringes Risiko dar, da gezeigt werden konnte, dass keine Infektivität bei diesen Transplantaten besteht und darüberhinaus im Knochenmark keine Ablagerungen von infektiösem Prionenprotein (PrP^{Sc}) nachweisbar sind (Caplazi P *et al.* 2004, Wenz B *et al.* 2001).

1.2.2. Gegenwärtige Probleme bei der Prüfung von Spenderknochen

Der mikrobiologische und serologische Testprozess ist insbesondere im Hinblick auf HIV als nicht sicher zu bezeichnen. Dies ist durch die bereits erwähnte Problematik

der Nonresponder-Personen ohne nachweisbare Antikörper bedingt. Die Literatur beschreibt Fälle von HIV-Übertragung durch Gewebematerial geprüft seronegativer Spender (Simonds RJ et. al. 1992). Es wurden auch Fälle von HIV-Übertragung durch Knochentransplantate beschrieben, in welchen das vorgeschrieben mikrobiologische Procedere nicht eingehalten wurde und das Knochenmaterial vor Abschluss aller Tests verwendet wurde (Simonds RJ 1993). Vor Einführung einer mikrobiologischen Überprüfung des Spenders kam es zu zahlreichen, in einigen Fällen nunmehr nachgewiesenen Übertragungen von HIV und HCV durch Knochentransplantate (Center for Disease Control 1988, Conway B et al. 1990). Das beschriebene Vorgehen ist überdies sehr kostenintensiv. Torwesten G et al. (1993) beschreiben einen Preis von umgerechnet 200 bis 400 Euro pro Spender für die notwendigen Untersuchungen. Dieser Preis beinhaltet, dass viele derzeitige Tests wie die Untersuchung auf HIV mittels ELISA eine zweite Blutentnahme erfordern, die manche Spender ablehnen, was zum Ausschluss des zugehörigen Materials führt. Diese Probleme haben sich bis heute nicht geändert. Die meisten Spender liefern nur einen Hüftkopf im Rahmen einer Hüftendoprothesenversorgung als Material, für welchen das ganze Prozedere durchzuführen ist. Dies verdeutlicht den hohen Preis pro Volumen Spenderknochen.

1.3. Entkeimung von Knochentransplantaten

Auf Grund der unübertroffenen Eigenschaften von natürlichem humanem Knochenmaterial wurde an verschiedenen Methoden zur Desinfektion oder Sterilisierung gearbeitet, um allogenen Spenderknochen sicher und kostengünstig aufzubereiten. Einige von diesen haben sich bewährt und finden praktische Anwendung, andere wurden auf Grund von Problemen nicht weiterverfolgt. Generell stellt die Entkeimung von Knochenmaterial die einzige Alternative zum beschriebenen Testprocedere dar, sie ist überdies mikrobiologisch sicherer. Da eine Desinfektion eine unvollständige Entkeimung ist, wird sie hier nur der Vollständigkeit und Historie halber angesprochen und ist im Hinblick auf die beschriebenen Infektionsprobleme nicht für die Anwendung geeignet. Es kann bei Desinfektion und Sterilisation jeweils zwischen chemischen und physikalischen Verfahren unterschieden werden.

1.3.1. Chemische Desinfektion von Knochentransplantaten

Mellonig JT *et al.* 1992 beschreiben eine Kombination von Salzsäure und einem Desinfektionsmittel. Es ist auffällig, dass der Autor die schädlichen Einflüsse auf die mechanischen und osteoinduktiven Eigenschaften des Knochenmaterials nicht untersucht oder diskutiert. HIV-Provirus DNA ist sogar nach Behandlung mit Salzsäure, welche DNA hydrolysiert und zur DNA-Beseitigung in Laborgefäßen verwendet wird, immer noch nachweisbar (Mellonig JT *et al.* 1992). Daher sind Desinfektionsverfahren wegen der unvollständigen Entkeimung für chirurgische Implantate wie Knochentransplantate ungeeignet. Neben einer Restkeimmenge sind die meisten der verwendeten Substanzen toxisch und bedürfen, wenn überhaupt möglich, einer langen Entgiftungslagerung (Bodenschatz W 1989).

1.3.2. Chemische Sterilisation von Knochentransplantaten

Ethylendioxid nimmt als echte Sterilisationsmethode eine Sonderstellung unter den chemischen Verfahren ein. Auf Grund der karzinogenen Zerfallsprodukte Ethylenglycol und Ethylenchlorhydrin ist die Substanz jedoch problematisch (Bettin D *et al.* 1994). In der Disposablesterilisation weit verbreitet, bringt die lange Ausgasdauer von bis zu 90 Tagen logistische Probleme im Knochenbankmanagement mit sich (Bettin D *et al.* 1994). Überdies ist dann lediglich die gesetzlich geforderte Mindestkonzentration von 1ppm erreicht (Bettin D *et al.* 1994). Es wird bei Ethylendioxid-sterilisiertem Knochen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe über eine retardierte Transplantateinheilung ebenso berichtet, wie über komplette Transplantatverluste (Tshamala M *et al.* 1999, Herron LD, und Newman MH 1991, Kudryk VL *et al.* 1992, Aspenberg P *et al.* 1990). Wie bei Strahlensterilisationen ist eine entsprechende Anlage notwendig, welche wegen der toxischen Gase ebenfalls kostenintensiv ist. Trotz dieser Problematik wird die Methode in regionalen Knochenbanken angewendet, wie beispielsweise der Pacific Coast Tissue Bank, Los Angeles, USA.

1.3.3. Strahlensterilisation von Knochentransplantaten

Ein weiterer, intensiv erprobter Ansatz ist die Strahlensterilisation. Insbesondere wurden Bestrahlungsparameter wie Strahlenart, -dosis, Schädigung des Knochenmaterials und Strahlungsaktivität des Materials nach der Bestrahlung untersucht (Bright RW *et al.* 1989). Es gibt 6 Strahlenarten, welche für die

Sterilisation in Frage kommen: Röntgen-, Gamma-, Beta-, Alpha-, Neutronen- und Protonenstrahlung. Neutronen und Protonenstrahlung führen zu einer hohen Strahlenaktivität des Materials durch die Generierung instabiler Isotope und sind daher nicht geeignet. Auch Alpha-Strahlung führt zu einer zumindest moderaten Eigenaktivität des Sterilisationsgutes. Elektronen sind auf Grund Ihrer geringen Durchdringungstiefe von etwa 5cm nur bedingt zu einer Sterilisation geeignet. Wegen Ihrer guten Gamma- und Röntgenstrahlungsfreisetzung im Material ermöglichen sie jedoch eine schnelle Sterilisation. Daher werden sie vereinzelt eingesetzt (Bright RW et al. 1989). Röntgenstrahlung erfordert eine exorbitant lange Bestrahlungsdauer von etwa einem Jahr um eine suffiziente Strahlendosis zu erreichen und ist daher nicht geeignet (Bright RW et al. 1989). Am weitesten verbreitete ist die Gammastrahlung, welche meist mit einer Cobalt-60-Kanone durchgeführt wird (Bright RW et al. 1989). Bettin D *et al.* (1994) beschreiben, dass eine Strahlendosis von mindestens 25 kGy zur Strahlensterilisation von Knochen benötigt wird. Andere Autoren berichten, dass eine weit höhere Dosis von 89 kGy erforderlich ist (Campbell DG und Li P 1999). Überdies entstehen bei der Gammabestrahlung aus Fetten im Knochen giftige Substanzen (Moreau MF et al. 2000). Die Behandlung durch die Firma Ethicon in Hamburg dauert hier 9 Stunden unter Kühlung mit Trockeneis. Ein beschriebener Nachteil der Bestrahlung ist der Verlust osteoinduktiver Eigenschaften des Knochens durch Strahlendosen von 10 kGy und mehr (Buring et al. 1967). Das Hauptproblem der Bestrahlung ist generell, dass eine entsprechende Einrichtung vorhanden sein muss, was einen enormen personellen und finanziellen Aufwand bedingt. Bei Auftragssterilisation besteht das Hauptproblem in zusätzlichen Kosten und mangelnder Flexibilität durch die Logistik.

1.3.4. Thermische Entkeimungsverfahren von Knochentransplantaten

Thermische Behandlungsverfahren sind biologisch und toxikologisch unproblematischer. Eine bekannte Keimreduzierungsmethode ist die thermische Behandlung unter 100 °C und bei atmosphärischem Druck, welche mikrobiologisch nicht sicher ist und daher die Testung des Spenders in vollem Umfang erfordert; sie sei deshalb nur der Vollständigkeit halber erwähnt (Bundesgesundheitsblatt 30 Nr.1-5, WHO 1986, Bundesgesundheitsblatt 24 Nr.1).

Die Dampfsterilisierung, auch Autoklavierung genannt, ist dagegen eine mikrobiologisch sichere Sterilisierungsmethode (Boehm P und Stihler J 1995).

Allerdings wird hierbei die Steifigkeit des Knochens, welche für die osteokonduktiven Eigenschaften bedingend ist, aufgehoben (Borchers RE et al. 1995, Koehler P et al. 1986, Koehler P und Kreicbergs A. 1987). Der Knochen ist dann ein weiches, durch Fingerdruck plastisch verformbares Material. Dies führt zu dem beschriebenen Einheilungsversagen solcher Transplantate (Ehara S et al. 2000, Hallfeldt KKJ et al. 1992, Hallfeldt KKJ et al. 1994, Saraf SK et al. 1991). Bei den bekannten klinischen Anwendungen von dampfsterilisiertem Knochen war daher in allen Fällen eine mechanische Fixierung notwendig, um zumindest eine verzögerte Einheilung zu erreichen, dennoch war die Rate des Einheilungsversagens deutlich erhöht (Asada N et al. 1997, Boehm P und Scherer MA. 1997, Boehm P et al. 1998, Ewers R und Wangerin K 1986, Kao JT und Comstock C. 1995, Koehler P und Kreicbergs A 1987, Pittman MR et al. 1975, Sanjay BKS et al 1997, Smith WS, und Struhl S 1988, Taguchi Y et al. 1995, Young TQ et al. 1996).

1.4. Problemstellung

Da die Dampfsterilisation, insbesondere wegen der apparativen Einfachheit und des geringen Preises, auch in der dritten Welt überall anzuwenden und einmalig ist, wurde von mir eine Lösung des damit verbundenen Steifigkeitsproblems bei Knochentransplantaten angestrebt.

Es wurde ein neues Knochentransplantatmaterial entwickelt und patentiert, welches wegen einer Vorbehandlung bei der darauf folgenden Dampfsterilisierung nicht seine Steifigkeit verliert und in vivo gut einwächst (Draenert GF 1997). Das Besondere ist dabei, dass es sich um ein mineralisiertes und sterilisiertes Knochenprodukt mit der natürlichen Matrixzusammensetzung handelt und nicht um ein rein keramisches, demineralisiertes oder künstliches Material. Der Markenname Powerpore® duro wurde für das Material geschützt und soll zur klareren Differenzierung im Folgenden verwendet werden. Für diese neue Entwicklung wurden die Kenntnisse über die Eigenschaften des Knochens ausgenutzt (Weiner S und Traub W 1992, Wright NT und Humphrey JD 2002). Bedingt durch den hohen Anteil kovalenter Bindungen (Disulfidbrücken) in Knochenkollagen ist eine thermische Denaturierung hier nahezu irreversibel. Darüberhinaus kann eine Rehydratation durch starke Entwässerung fast vollständig verhindert werden. Dadurch ist durch eine entsprechende Denaturierung ein Zustand des Knochens erreicht, der auch bei einer Dampfsterilisierung einer Rehydratation und damit verbundener Erweichung widerstehen kann.

Powerpore[®] duro wurde in einer dreiteiligen Studie untersucht. Der erste Abschnitt evaluiert die Steifigkeit in einem in vitro Versuch in Schweineknöchel. In Teil zwei und drei wird das Einwachsverhalten des neuen Knochenmaterials im Vergleich zu frischem Knochen im Patellagleitlagermodell des Kaninchens histomorphologisch untersucht.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Powerpore® duro Methode und Dampfsterilisierung

Das Knochenmaterial wurde, wie in der Patentanmeldung DE19543110 beschrieben hergestellt (Draenert GF 1997) und bei -30°C gelagert. Die Sterilisation erfolgte mit 20 Minuten bei 137°C und 2,5 bar und einem Trocknungsprogramm von 20 Minuten in einem H+P Thermoelectron Tischsterilisator 25 T (VWR Labortechnik, Darmstadt, Germany) (Bodenschatz W 1989). Das erhaltene Material war fettfrei, weiss und fest (siehe Abb. 1). Die Bälkchenstruktur war freigelegt und weitestgehend von Knochenmarksresten befreit, was das Einwandern von Zellen begünstigen und die inflammatorischen Nebenwirkungen vermindern sollte (siehe Abb. 2).

2.2. Knochenmaterial für Versuche

2.2.1. Knochenmaterial für in vitro Versuche

Aus 50 Schweine Oberschenkelknochen (Hahn Fleisch, Münchner Schlachthof, Zanettistr.10, 80337 München) von 5 Monate alten Tieren wurden wie im folgenden beschrieben 100 Spongiosazylinder mit 20 mm Höhe und 8,5 mm Durchmesser hergestellt. Die Schweine Oberschenkel wurden im Kondylenbereich von Bindegewebe der Kapsel und den Menisci durch saubere Präparation mit dem Skalpell befreit. Die Oberschenkel wurden dann in einem Drei-Backen-Schraubstock sicher fixiert. Die verwendeten Spongiosaprobe wurden aus dem Kondylenbereich des Kniegelenkes entnommen, wobei pro Kondyle ein Zylinder gewonnen wurde. Hierbei wurde die 9,40/8,50 Diamantfräse verwendet. Nach Entnahme der Knorpel-Knochenprobe wurde im Abstand von 1mm zur Knorpelgrundplatte ein 20mm Spongiosazylinder mit einer Diamantblattsäge abgeschnitten. Die Proben wurden immer in einem Neigungswinkel von 25° aus den Kondylen des Schweine Oberschenkels herausgefräst. Durch standardisierte Ausrichtung des Schraubstocks und des Knochens konnte dies erreicht werden. Die Zuordnung zu den Untersuchungsgruppen erfolgte randomisiert nach Pools aller 100 Zylinder. Es wurden drei Gruppen mit je 30 Zylindern gebildet: unbehandelte Knochen, dampfsterilisierte Knochen und dampfsterilisierte Powerpore® duro Knochen (jeweils n=30). Die Powerpore® duro Behandlung und die Dampfsterilisierung wurden unter 2.1. beschrieben. Vor den Versuchen wurden die Zylinder bei -30°C für 30 Tage gelagert und vor den Versuchen in +20°C warmer 0,9%iger Kochsalzlösung aufgetaut.

2.2.2. Knochenmaterial für in vivo Versuche

Für die Tierversuche wurden aus den distalen Epiphysen von 20 Chinchilla-Bastard-Kaninchen (Firma Charles Rivers, Bad Kieslegg) insgesamt 40 Knochenblöckchen (10mm³) gewonnen. Es wurden, kurz nach der Tötung der Tiere, unter sterilen Bedingungen zunächst die Femora entnommen und dann parallel zur Axe der Diaphyse Scheiben gesägt, die dann zu den Blöckchen zugeschnitten wurden. Diese Tiere dienten in einem anderen Experiment als Null-Kontrollen und wurden deshalb nicht für dieses Experiment getötet (Pharmakologisches Institut der LMU München). Die Blöckchen wurden einzeln steril verpackt.

Es wurden den zwei Gruppen jeweils 17 Proben zugeteilt: unbehandelter Knochen und dampfsterilisierter Powerpore[®] duro Knochen (jeweils n=17). Dann erfolgte die Powerpore[®] duro Behandlung, einschließlich Dampfsterilisierung, der entsprechenden Gruppe.

Danach wurden aus beiden Gruppen die Proben für die Vorversuche und den Hauptversuch randomisiert getrennt: Vorversuch (n=5 pro Gruppe); Hauptversuch (n=12 pro Gruppe). Die Lagerung erfolgte dann bei -30°C für alle Proben für etwa 30 Tage.

Die Knochenzylinder (D: 4,5 mm) wurden dann, nach der entsprechenden Vorbehandlung, während des eigentlichen Eingriffs aus diesen Blöckchen gefräst (siehe 2.6.2.) und direkt implantiert um Schrumpfungsverluste während Lagerung und Vorbehandlung zu vermeiden (siehe Beschreibung unten).



Abb.1: Powerpore® duro Knochenmaterial in verschiedenen Formen: Granulat, Zylinder, Blöcke, Scheiben.

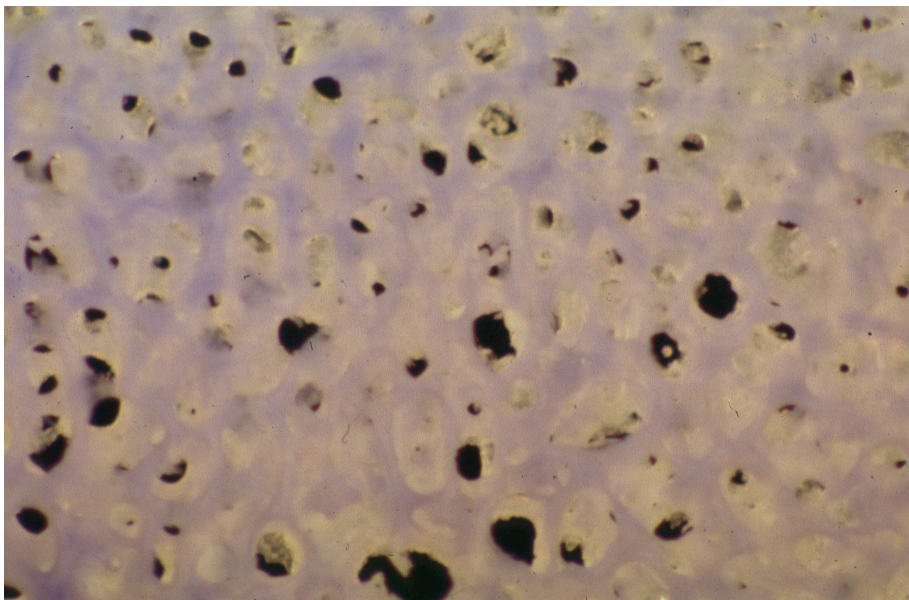


Abb.2: Die Markräume des Powerpore® duro Materials sind gereinigt (32x).

2.3. Material für in vitro Versuche

2.3.1. INSTRON-Kompressionsmessgerät

Es wurde eine INSTRON Modell 1000, Seriennummer 2008 mit Papierschreibgerät (Instron Ltd., Coronation Road, Buckinghamshire HP12 3SY, United Kingdom) für die Kompressionsversuche verwendet.

2.3.2. Andere Geräte für in vitro Versuche

Drei-Backen-Schraubstock des ZOW München (Gabriel-Max-Str.3, München); Wassergekühlte Diamantsäge; Dampfsterilisationsgerät CE-zertifiziertes Standardgerät.

2.3.3. Diamant-Fräsen

Es wurde zur Knochenzylinderentnahme und Implantation das Diamantfräsen-System, Hohlschleifinstrumente der Firma Medartis (Altnau, Schweiz), verwendet (siehe Abb. 3). Das System bestand aus einer AO-Bohrmaschine (Art.Nr. 1.3101), einem DCT-AO-Adapteraufsatz (Art.Nr. 1.200-2), Druckluftmanschette (Art.Nr. 2.502), einer Diamant-Fräse (Aussendurchmesser/Innendurchmesser in mm: 9,40/8,50) (Art.Nr. 2.0TM07), einem Extraktor 8,50mm x 40mm (Art.Nr. 2.1TM07), DCT-Handgriff 12mm (Art.Nr. 2.301), Stößel Durchmesser: 6,3mm (Art.Nr. 2.2TM06/08) und Hammer (Art.Nr. 2.401), einer Diamant-Fräse (Aussendurchmesser/Innendurchmesser in mm: 5,40/4,60) (Art.Nr. 2.8TM07), einem Extraktor 4,60mm x 40mm (Art.Nr. 2.9TM07), einer Diamant-Fräse (Aussendurchmesser/Innendurchmesser in mm: 4,60/3,70) (Art.Nr. 2.8TM06), einem Extraktor 3,70mm x 40mm (Art.Nr. 2.9TM06). Das Prinzip basiert darauf, dass der Inneradius einer Fräse, inklusive Verschleiß, exakt zum Aussendurchmesser seiner Zwillingssfräse passt. Zu jeder DCT-Fräse gehörte ein passender Extraktor. Es handelt sich um ein Nassschleifverfahren, welches in Präzision und Schonung des Gewebes herkömmlichen Trepanbohrern überlegen ist. Hitzenekrosen und Mikrofrakturen, wie sie bei herkömmlichen Fräsen vorkommen, waren in einer Tierexperimentellen Studie ausgeschlossen worden (Draenert K et al. 1987). Ausserdem erlaubte das System durch das Zwillingssfräsen-System die Generierung eines Implantatzylinders der exakt in ein dafür vorgesehenes Bohrloch passt und dort press-fit eingebracht werden konnte. Das System war druckluftgetrieben, rotierend und arbeitete mit einem Aufsatzsystem auf einer AO-Bohrmaschine.

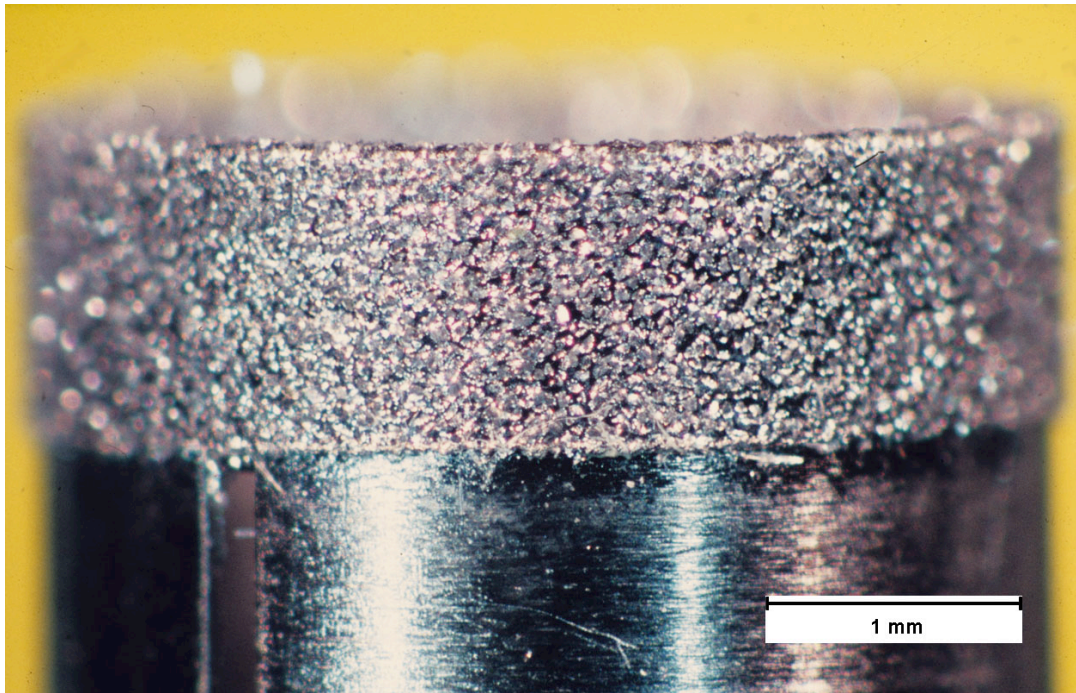


Abb.3: Die Diamantfräse hat einen Bohrkopf mit innen- und aussenwandiger Diamantbeschichtung.

2.4. Material für in vivo Versuche

2.4.1. Versuchstiere

Die Tierversuche wurden an ausgewachsenen (ex-breeder) Riesenkaninchen der Rasse New-Zealand-White (NZW) mit einem Gewicht zwischen 3,2 und 4,2 kg durchgeführt und von der Firma Charles Rivers, Bad Kieslegg bezogen. Es wurden im 30-Tage Versuch 5 und im 100-Tage Versuch 12 Tiere operiert.

2.4.2. Bohrschablonen für Patellagleitlagerversuche

Es wurden Führungsinstrumente für die Diamant-Fräsen (Abb.4) verwendet.

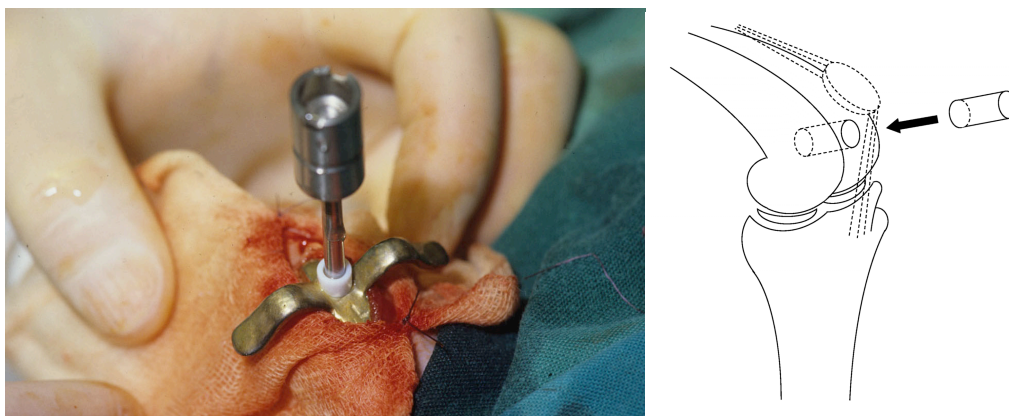


Abb. 4: links: Schablone für die Bohrung am Patellagleitlager des Kaninchens, hier dem Patellagleitlager aufgesetzt. Die langen Ausleger sind senkrecht zur Achse des Femurs ausgerichtet und werden mit den Fingern zur Stabilisierung festgehalten. rechts: Lokalisation des Implantates im Patellagleitlager.

2.5. Methoden für den in vitro Versuch

2.5.1. Kompressionstest

Der Kompressionstest erfolgte im Instron 1000 Gerät.

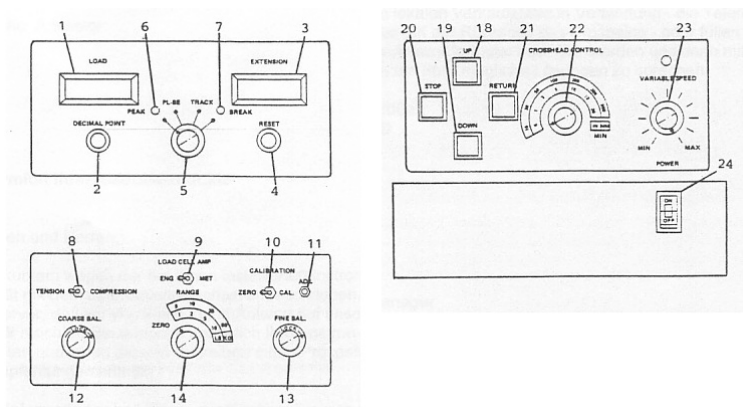


Abb. 5: Beschreibung der Kontrollen des Instron 1000 Gerätes

Es erfolgte die Vorbereitung des Gerätes wie von der Firma Instron vorgegeben (siehe Abb. 5). Das Gerät wurde eingeschaltet (24) und mindestens 15 Minuten Aufwärmzeit abgewartet. Der Kippschalter (9) wurde in Stellung "MET" für metrischer Bereich, der Kippschalter (8) in Stellung "Compression" für Druckversuche, der Drehschalter (5) auf "Track" und der Drehschalter (14) auf Messbereich "1/5" gebracht. Es erfolgte die Entfernung der Drucktellerhalterung aus der oberen Maschinenhalterung durch Entfernung des Verriegelungsbolzens und Entnahme der Tellerhalterung. Anschliessend wurde der Verriegelungsbolzen wieder eingesetzt. Es folgte die Kontrolle der Anzeige "Load" (1) durch Drücken des Kippschalters (10) in die Position "Zero", dabei sollte die Anzeige den Wert "000" anzeigen. Ansonsten wurde der Wert durch Verstellen des Potentiometers (12)(grob) und (13)(fein) auf "000" eingestellt. Der Drehschalter (14) wurde auf den Messbereich "10/50" gestellt. Bei Kontrolle der Anzeige "Load", während der Kippschalter (10) in die Position "CAL" gedrückt war, wurde der Wert der Anzeige für Druckversuche auf "-1014" eingestellt, damit war die Maschine gleichzeitig für die Ausgabe in Newton geeicht. Falls der Wert nicht "-1014" angab, so wurde er, während der Kippschalter (10) auf der Position "CAL" gehalten wurde, mit der Trimmerschraube "ADJ" (11) korrekt eingestellt. Nun wurde die Drucktellerhalterung wieder in die obere Maschinenhalterung eingebaut und die Anzeige "Load" ohne eine Fixierung des Kippschalters (10) auf den Wert "000" eingestellt (Potentiometer (12) und (13)). Dieser Abgleich kompensierte das zusätzlich auf der Probe lastende Gewicht durch die Drucktellerhalterung. Die Kalibrierung wurde hierbei jedoch nicht geändert. Für den eigentlichen Druckversuch wurde nun der eigentliche Messbereich mit dem Drehschalter (14) auf den Bereich "2/10" für

Messwerte bis 1000 N eingestellt. Es folgte die Wahl der Belastungsgeschwindigkeit mit dem Regler "CrossHead-Control" (22) auf 5 mm/min "0,5/10". Der Plotter wurde auf die Geschwindigkeit 10 cm/min eingestellt.

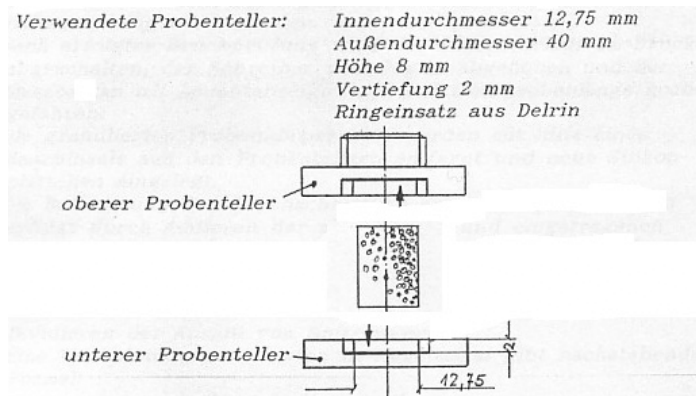


Abb. 6: Einsetzen der Probe in den Probeteller

Nun wurde die Probe in den Probeteller eingesetzt (siehe Abb. 6). Da der Stempelaufleger mit einer Eigengewichtskraft von 500N die Proben von unbehandeltem, dampfsterilisierten Knochen zerquetschte, wurde dieser hierfür ausgebaut und der Druckkopf direkt an das Gerät geschraubt. Es erfolgte die Einstellung der Anzeige- und Belastungsfunktion (5) auf "PEAK" und die Nullstellung der Anzeige "Extension" (3) mit dem "Reset"-Knopf (4). Nun wurde der Versuch durch Starten des Messbalkens mit dem Knopf (19) ("Down") begonnen. Der Zeitbezug ergab sich aus der Papieraufzeichnung des Schreibers

2.5.2. Berechnungsmethoden

Aus der Maximalbelastungswerten in Newton (N) und den Schreiberkurven ergaben sich die Werte zur Berechnung der Druckfestigkeit (Pa) (siehe Abb. 7).

$$p \text{ (Druck)} = \frac{F \text{ (Kraft)}}{A \text{ (Fläche)}}; \quad [p] = 1 \text{ Pa} = 1 \frac{\text{N}}{\text{m}^2}$$

Abb. 7: Definition Druck (Kuchling H 1995)

2.5.3. Statistik

Die Daten der drei Gruppen wurden einer Varianzanalyse unterzogen. Es folgte ein Post-hoc-Test der signifikanten Unterschiede beider Gruppen. Anwendung fand die Software PRISM 4.02 (Graphpad, San Diego, CA, USA). Die Signifikanz wurde mit $p < 0,05$ festgelegt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte und deren Standardabweichung dargestellt.

2.6. Methoden für die in vivo Versuche

Alle Tierversuche waren von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Az.: 209.1/211-25631-64/02). Eine geplante dritte Versuchsgruppe mit rein dampfsterilisiertem Knochen von der Regierung von Oberbayern mit dem Verweis auf die wissenschaftlich eindeutig belegten schlechten Heilungsergebnisse solchen Materials nicht genehmigt.

2.6.1. Narkose der Versuchstiere

Die Tiere blieben während des gesamten Eingriffs in Vollnarkose. Die Prämedikation erfolgte mit Atropin und Xylazin (Rompun) / Ketavet (Ketavet 100mg / Xylazin 20mg). Danach wurde zunächst an der Ohrvene ein Zugang gelegt. An ihn wurde ein Perfusor mit Ketavet/Xylazin angeschlossen, über den die Narkose während des gesamten Eingriffs direkt gesteuert wurde (Ketavet 4mg / Xylazin 0.8mg / min). Über eine Sauerstoffmaske wurde kontinuierlich 100% Sauerstoff zugeführt. Jedes Tier wurde bei dem etwa 45 Minuten dauernden Eingriff über den Zugang mit ca. 150 ml einer Ringerlösung infundiert. Die Tiefe und Qualität der Anaesthetie wurden durch Lidschlussreflex und Kontrolle der Atmung, Atemgase und Herzfrequenz gemessen.

2.6.2. Operation am Knie der Versuchstiere

Es wurden die oben genannten Diamantfräsen verwendet. Nach Hautschnitt und Freilegung des Patellagleitlagers wurde eine Schablone angesetzt (siehe Abb. 4). Mithilfe dieser Zentrierung wurde ein Bohrloch (Durchmesser 4,6 mm, Tiefe 6 mm) mit der CE-zertifizierten Diamanthohlfräse 4,5/3,7mm (Medartis AG, München) gesetzt. Mit dem zugehörigen Extraktor wurde der Knochenzylinder entnommen. In das Entnahmeloch wurde die jeweilige Probe (nativer Knochen oder Powerpore[®] duro Knochen), welcher bereits mit der zugehörigen Diamantfräse 5,40/4,60mm vorbereitet ist, eingesetzt. Hierbei sorgt der Unterschied von 0,1 mm im Durchmesser zwischen Bohrloch (4,5mm) und Implantat (4,6mm) für eine solide Press-fit-Fixierung, bei der die Spongiosabälkchen hundertfach fest verkeilt werden. Es erfolgte eine sachgemäße Wundversorgung, die insbesondere auch ein Aufbeissen der Wundverbände vermeiden sollte (geflochtene Fäden, stark klebende Pflaster). Eine schematische Darstellung der Implantatlokalisierung ist in Abb. 4 dargestellt.

2.6.3. Haltung der Tiere und Nachsorge

Die Kaninchen wurden in der Bodenhaltung des Instituts für Chirurgische Forschung gehalten und versorgt. Die Grundfläche eines Stalls betrug 2 m², es wurden maximal 4 Tiere in einem Stall untergebracht. Die Tiere hatten Auslauf zu einem Hof auf dem Dach, der 8 m² groß war und den Zugang zu einem oder zwei weiteren Ställen ermöglichte. Auf diese Art konnte man maximal 12 Kaninchen in drei zusammenhängenden Boxen in einer Gruppe halten. Die Tiere hatten im Tierstall freien Zugang zu Futter und Wasser ad libitum und wurden von den Tierpflegern versorgt. Jedes Tier bekam post-OP und am folgenden Tag 30 mg Phenylbutazon subkutan injiziert.

2.6.4. Fluoreszenzmarkierung

Um die Dynamik der Knochenneubildung und –apposition beurteilen zu können, wurden alle Tiere vital mit einer Fluoreszenzmarkierung versehen. Diese Färbung wurde bei Bestrahlung des Präparates unter Fluoreszenzlicht, wie beispielsweise bei der Fluoreszenzmikroskopie, sichtbar gemacht. Wir verwendeten vom 5. bis zum 11. Tag post-OP sowie als Schlussmarkierung am 28. und 29. Tag beziehungsweise am 99. und 98. und 99. Tag Oxytetracyclin, was im Fluoreszenzlicht zu einer Gelbfärbung gegenüber dem blau fluoreszierenden übrigen Knochen hervortritt. Die Tage 5 bis 11 post-OP entsprachen dem Beginn der Knochenbruchheilung nach Abschluss der initialen Entzündungsreaktion. Die Injektion einer Dosis von 12 mg/kg/Tag Oxytetracyclin erfolgte subkutan.

2.6.5. Perfusion und Tötung der Tiere

Nach Laufzeiten von 30 und 100 Tagen wurden die Tiere perfundiert und getötet. Unter Narkose, wie oben beschrieben, erfolgte eine Eröffnung des Peritonealraumes und eine stumpfe Präparation der Arteria aorta abdominalis und Vena cava inferior bis zu deren Darstellung. Die Arterie wurde ligiert und ein grosslumiger Katheter in dieser platziert. Die Vene wurde in entsprechender Weise kanüliert. Es folgte die Perfusion mit 300 ml physiologischer Kochsalzlösung bei pH 7,34 zur Entblutung der Beine. Während der Injektion erfolgte eine passive Bewegung der Hinterläufe zur besseren Perfusion des Gewebes. Nach Tötung des Tieres durch Verabreichung einer letalen Dosis von Phenobarbital erfolgte die Fixierung des Gewebes. Es wurden 300 ml Karnovsky's Lösung injiziert. Es erfolgte im Anschluss eine Entnahme der Femoralknochen beidseits und eine Lagerung in Karnovsky's Lösung.

2.6.6. Histologische Aufarbeitung der Präparate

Zur weiteren Bearbeitung wurden die Präparate nach einer Immersionsfixierung von 4 Wochen in Karnovsky's Lösung mit einem Korundblatt (400 µm) auf einer Conrad-Säge Typ WOCO 50 zugesägt. Die Schnittfläche wurde nach Kenntnis der Bohrrichtung senkrecht zum Zylinder geführt. Die erhaltenen Knochenstücke wurden in einem Kugelgelenkhalter in einem Leitz-Sägemikrotom 1600 mittels einer Wasserwaage ausgerichtet. Danach erfolgte der erste Schnitt 700 µm unter der Knorpeloberfläche, was der Knorpelgrundplatte entspricht. Ausgehend von dieser Referenzebene 000 wurden 9 Schnitte mit einer Schichtdicke von 500 µm generiert. Der Verschnitt durch das Sägeblatt beträgt 300 µm. Hieraus ergeben sich folgende Untersuchungsebenen jeweils oben und unten an der Präparatscheibe: 0 (parallel zur Knorpeloberfläche) - 500µm; 800/1300µm; 1600/2100µm; 2400/2900µm. Für die lichtmikroskopische Untersuchung der Knochenschliffe in der hochintensiven Auflicht-/Übersichtsfluoreszenz wurden die einzelnen Schnitte überschliffen. Das Prinzip dieser hochintensiven Fluoreszenzmikroskopie beruht darauf, dass Knochen eine Eigenfluoreszenz im blau-grünen Spektrum besitzt. Diese ist bei einer Bestrahlungswellenlänge von 240-270 nm am stärksten. Durch die Sequenzmarkierungen wurde diese Eigenfluoreszenz in ihrer Farbqualität verändert, was bei dem verwendeten Oxytetracyclin im gelben Farbbereich liegt. Diese Veränderung wurde durch die Einlagerung der entsprechenden Fluorochrome in den neugebildeten Knochen während der Markierungsphase erreicht. Darauf folgend wurden die Scheiben zusammengelegt und eingebettet, sowie erneut gesägt und auf eine Dicke von 50 µm geschliffen, sowie eingebettet. Die Präparate wurden dann im Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskop untersucht.

3. ERGEBNISSE

3.1. Kompressionsversuch in vitro

Die maximale Druckbelastbarkeit von dampfsterilisiertem Powerpore® duro, dampfsterilisiertem Knochen und unbehandeltem Knochen wurde an Schweineknöchelzylindern getestet. Als Vergleichswert und Idealvorgabe für die biomechanischen Eigenschaften eines Knochenersatzwerkstoffes wurde eine Reihe von unbehandelten Knochenzylindern in der beschriebenen Versuchsanordnung untersucht. Nach Lagerung bei -30°C wurden die Zylinder in $+20^{\circ}\text{C}$ warmem Wasser aufgetaut und einem Pressversuch unterzogen. Die Ergebnisse wurden grafisch mit dem Papierausdruck im Verlauf festgehalten und die Maximalwerte über die Anzeigentafel des INSTRON-Gerätes dokumentiert und weiter ausgewertet (siehe Abb.8 und 9). Die Kurven des unbehandelten Knochens zeigten alle einen steilen Verlauf und meist einen Zwischenpeak vor dem eigentlichen Bruch der Probe (Abb. 9). Der Verlauf der Belastungskurven des Powerpore® duro Knochenmaterials zeigte einen ähnlichen Verlauf wie die des unbehandelten Knochens mit einer klaren Spitze und einem steilen Verlauf vor und nach dem Erreichen des Maximalwertes (siehe Abb. 9). Auch die entsprechenden Zwischenpeaks, welche typisch für die pseudoplastische Deformation sind, werden bei den meisten Proben beobachtet. In einer weiteren Versuchsreihe wurden die dampfsterilisierten Knochenproben nach Lagerung bei -30°C in $+20^{\circ}\text{C}$ warmem Wasser aufgetaut und ebenso geprüft. Es zeigte sich hier eine typische plastische Verformung mit einer aufgehobenen Druckfestigkeit. Die Daten zeigten eine plastische Verformung ohne Kompressionswiderstand mit breiten Schultern, ohne Spitze (Abb. 9). Das Material kann mit dem Finger mit geringem Druck verformt werden. Die durchgeführte statistische Analyse zeigt eine signifikant höhere Kompressionsfestigkeit von Powerpore® duro Knochenmaterial und unbehandeltem Knochen im Vergleich zu dampfsterilisiertem Knochen (Abb. 8).

Box und Whiskers plots der drei Versuchsgruppen

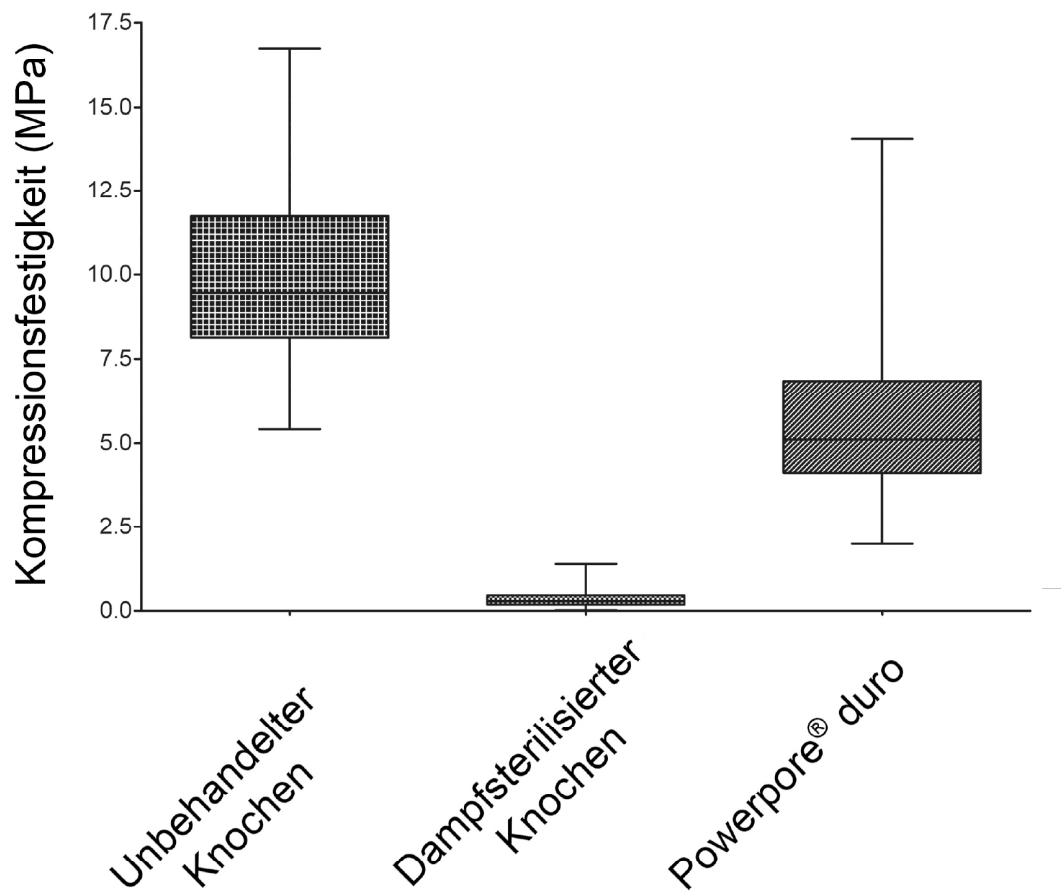


Abb.8: Kompressionsversuch der drei Gruppen

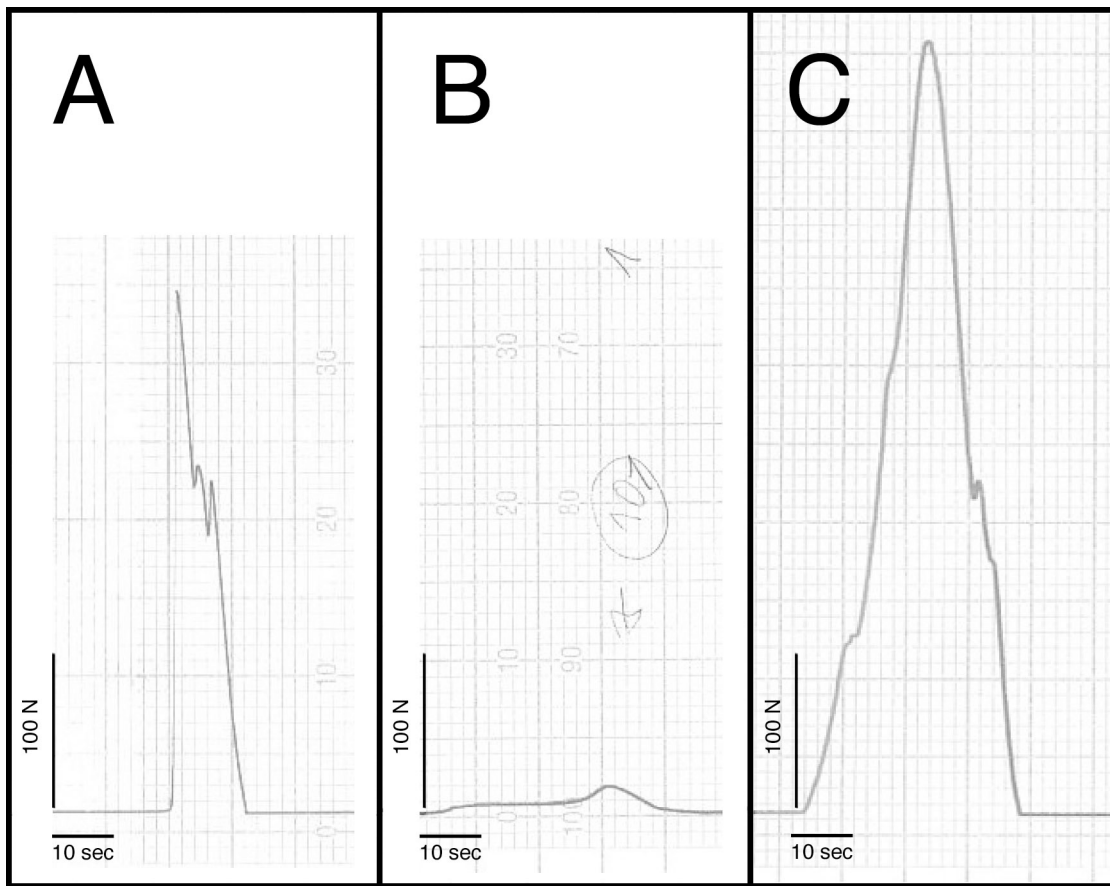


Abb.9: Form der Kurven des Kompressionsversuchs: A: Powerpore® duro, B: dampfsterilisiert, C: nativer Knochen

3.2. Tierversuchsstudie im Patellagleitlagermodell des Kanninchens

Das Transplantatmaterial Powerpore[®] duro wurde in einer weiteren Versuchsreihe im Tiermodell mit unbehandelten allogenen Konochentransplantaten verglichen.

3.2.1. Phase der Knochenbruchheilung (30 Tage)

Dieser Teil der Studie bestand aus 5 Tieren. Die Implantate (n=5 pro Gruppe) wurden in unbehandelten Knochen (Kontrollgruppe) und dampfsterilisiertes Powerpore[®] duro (Testgruppe) mit jeweils 5 Proben aufgeteilt und für linkes oder rechtes Knie randomisiert (Münzwurf) und implantiert. Die Tiere rannten sofort nach Abklingen der Narkose wieder und zeigten keine Schmerzsymptome. Dies wurde durch Kontrolle von Seiten der Regierung von Oberbayern bestätigt. Es zeigte sich eine regelrechte Wundheilung ohne postoperative Komplikationen. Die explantierten Proben zeigten eine beginnende Heilung des Knorpeldefektes an der Implantationsstelle.

3.2.1.1. Phase der Knochenbruchheilung (30 Tage): qualitative Ergebnisse

Die knöcherne Einheilung wurde an unentkalkten Knochenschliffen untersucht. In der Referenzebene -2900 µm wurde die Art des Einwuchses als Kriterium für eine Biokompatibilität untersucht, hierbei wird zwischen fibrotischer Einheilung und direkter Ossifikation unterschieden. Es zeigte sich in allen Proben eine direkte Ossifikation. Alle qualitativen Parameter sind in Kontroll- und Versuchsgruppe gleich: Die chromatische Fluoreszenzmarkierung zeigte nach 30 Tagen deutliche Knochenneubildung in unmittelbarer Implantatnähe. Es konnten die Farbmarkierungen zeitgerecht identifiziert werden. Knochen wächst in das Implantat ein und hat direkten Kontakt zum Transplantatmaterial.

3.2.1.2. Phase der Knochenbruchheilung (30 Tage): quantitative Ergebnisse

Aufgrund der Fluoreszenzmarkierung konnte die Einwuchstiefe des neu gebildeten Knochens in des Implantat histomorphometrisch gemessen werden. Die durchschnittliche Einwuchstiefe nach 30 Tagen betrug für Powerpore[®] duro 1,59 +/- 0,42 mm und für unbehandelten Knochen 1,38 +/- 0,22 mm (siehe Abb. 10). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit jeweils 5 Proben im t-Test (p=0,34).

Knocheneinwuchs nach 30 Tagen

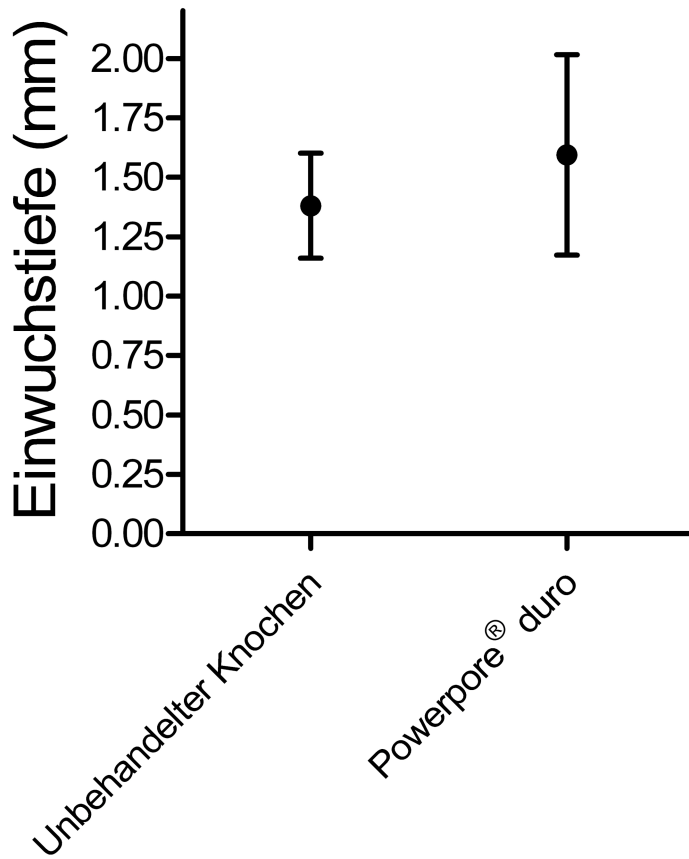


Abb. 10: Einwuchstiefe neu gebildeten Knochens nach 30 Tagen (n=5). Für beide Versuchsgruppen sind hier Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

3.2.2. Phase der Adaption (100 Tage)

Dieser Teil der Studie bestand aus 12 Tieren (n=12 Implantate pro Gruppe) und wurde in gleicher Weise wie die 30 Tage Studie durchgeführt. Die explantierten Proben zeigten einen vollständig geschlossenen Knorpeldefekt an der Implantationsstelle.

3.2.2.1. Phase der Adaption (100 Tage): qualitative Ergebnisse

Die Referenzebene für die Untersuchung der knöchernen Einheilung der Implantate war ebenfalls -2900 µm. Wie bei den 30 Tage-Proben wurde der direkte Anwuchs von neuem Knochen an des Transplantatmaterials in der beschriebenen hochintensiven Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Außerdem wurden die Proben darauf folgend eingebettet und dünn geschliffen. Es folgte eine lichtmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchung bei höheren Vergrößerungen.

Kriterien für eine regelrechte Knochenbruchheilung waren abermals die Art der Knochenheilung (fibrotisch gegen direkte Ossifikation), aber durch die lichtmikroskopischen Histologien auch weitere morphologische Parameter: Lebende Knochenzellen in neu gebildetem Knochengewebe, der Mineralisationsgrad der ossifizierenden Matrix, Resorptionszonen und leichte Markreaktion als Zeichen des Knochenumbaus.

Es zeigte sich in allen Untersuchungen ein fortgeschrittenes knöchernes Remodelling mit fast vollständiger Durchwachsung des Transplantatmaterials mit neugebildetem Knochen (siehe Abb. 11, 12 und 13). Dieser wurde regelrecht in lamelläre Weise angelagert. Kontroll- und Testgruppe zeigten hier gleiche Heilungsergebnisse (Abb. 11 und 13).

Die eingebetteten Histologien zeigten Osteoblasten inmitten des neu gebildeten Knochens, welcher bei einer Mineralisation von unter 70% noch rötlich angefärbt wurde (Abb. 11 und 13). Dies war im gesamten Implantatbereich zu beobachten. Gut mineralisierter Knochen wurde ebenfalls im Implantat gefunde, dieser zeigte vitale Osteoblasten aber keine Rotfärbung der Matrix und war ohne klare Abgrenzung überwiegend implantatlagernah zu beobachten (Abb. 11 und 13). Die Fuchsinfärbung, welche sich gut zum Darstellen von Matrix eignet, ist für die Darstellung von Entzündungszellen schlecht geeignet. Jedoch kann man die Marklagerreaktion anhand der lockeren Markraumfibrosierung, welche sich rot

darstellte, gut erkennen. Auch hier war kein Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen zu erkennen (Abb. 11 und 13).

3.2.2.2. Phase der Adaption (100 Tage): quantitative Ergebnisse

Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte die Einwuchstiefe neu gebildeten Knochens als messbare Grösse auch hier histomorphometrisch untersucht werden. Die durchschnittliche Einwuchstiefe nach 100 Tagen betrug für powerpore[®] duro 3,05 +/- 0,91 mm und für unbehandelten Knochen 3,21 +/- 0,60 mm (siehe Abb. 13). Die Einwuchstiefe zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (n=12) im t-Test (p=0,61).

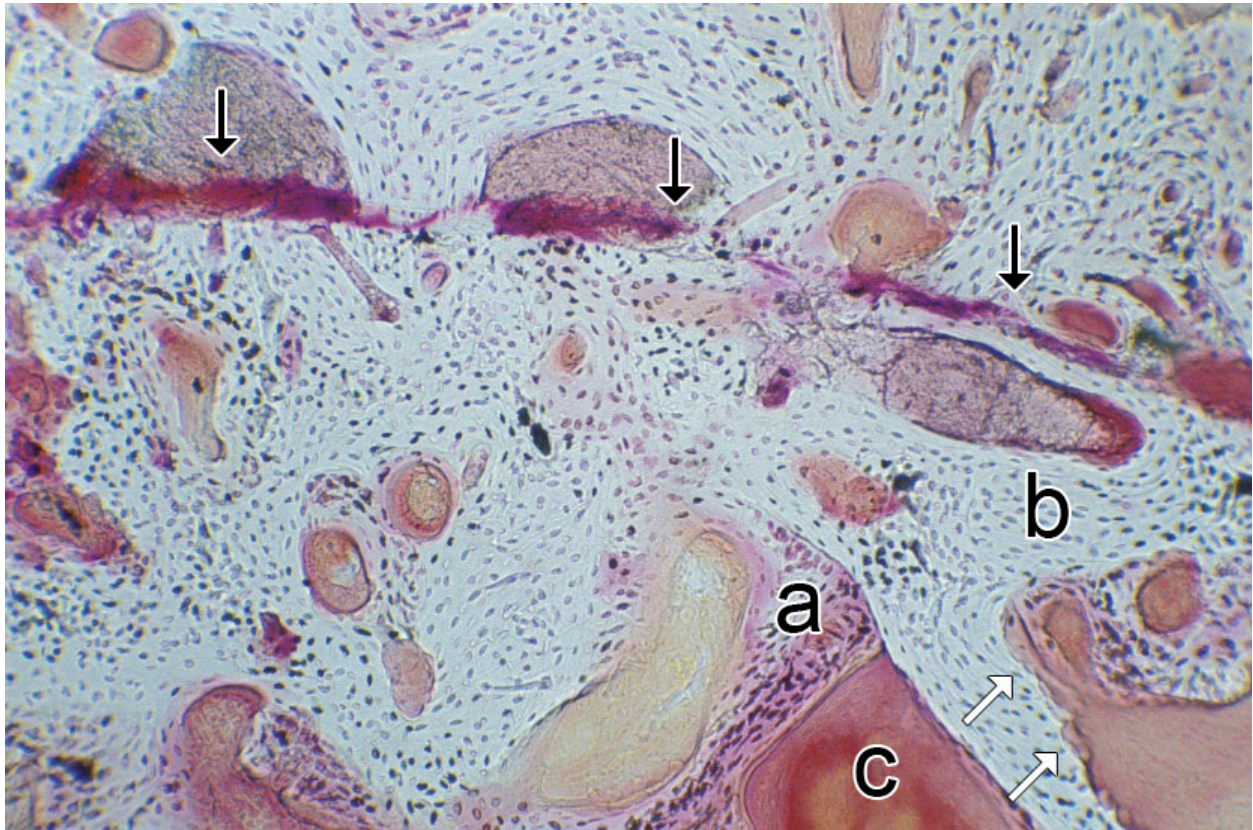


Abb. 11: Das powerpore[®] duro Material nach 100 Tagen: Es zeigte sich eine regelrechte Knochenbruchheilung (250x): schwarze Pfeile: Marklagerreaktion; weisse Pfeile: Resorptionszonen; a: neu gebildeter Knochen; b: zellfreies powerpore[®] duro Transplantatmaterial; c: Knochenmarkreaktion. Das zugehörige Präparat der Gegenseite mit dem unbehandelten Kontrollmaterial zeigte einen entsprechenden Befund.

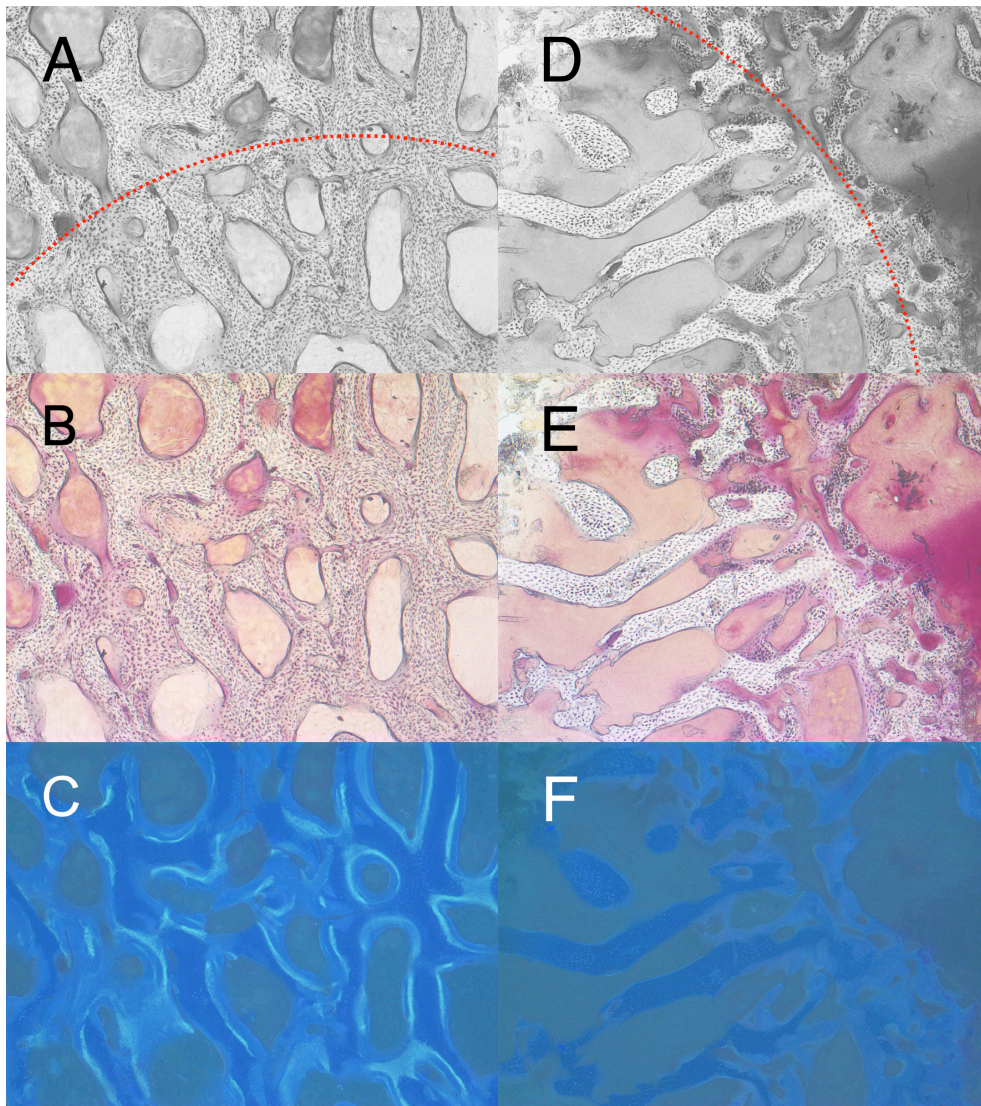


Abb. 12: Nach 100 Tagen ist ein fortgeschrittenes Remodelling zu beobachten (100x): A, B und C: powerpore[®] duro Material; D, E und F: unbehandelte Kontrolltransplantate. Neu gebildeter Knochen ist wegen der geringeren Mineralisierung rötlich gefärbt. Ebenfalls zu erkennen ist die rötlich gefärbte Marklagerreaktion. Die Sequenzmarkierung ist in C deutlich zu erkennen und stellt den neugebildeten Knochen während der Einheilungszeit dar. Durch die Dünnschliffe geht die Fluoreszenz zum Teil verloren (vergleiche C und F), weswegen diese Untersuchung als separater Schritt an frischen Sägeschnitten durchgeführt wird. Die Fluoreszenz hier ist nur eine Zusatzuntersuchung der Dünnschliffpräparate.

Knocheneinwuchs nach 100 Tagen

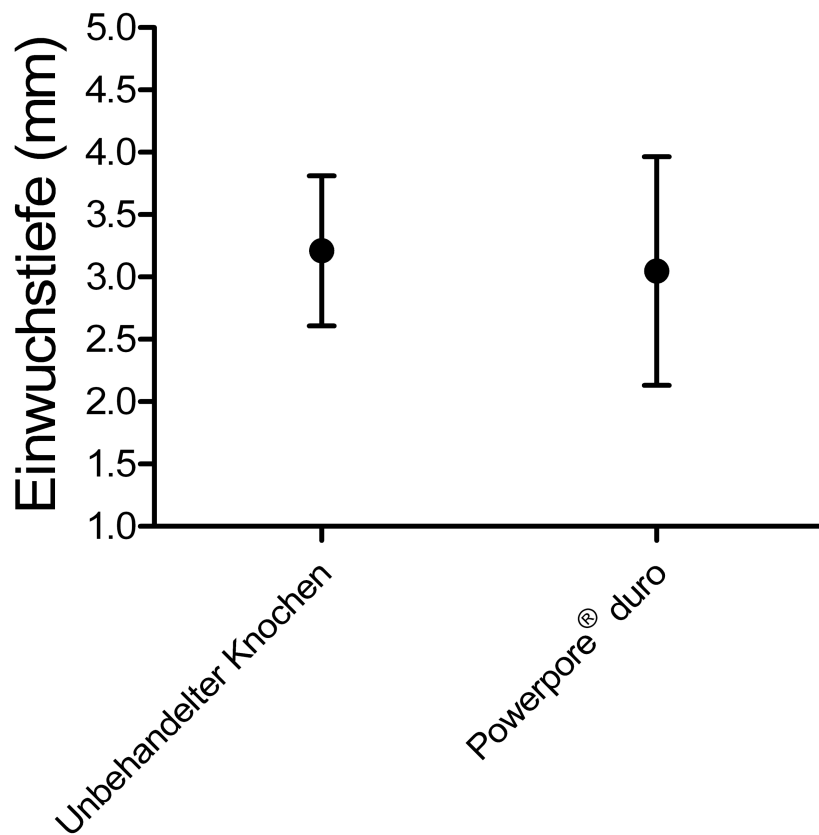


Abb. 13: Einwuchstiefe neu gebildeten Knochens nach 100 Tagen (n=12). Für beide Versuchsgruppen sind hier Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

4. DISKUSSION

Dampfsterilisierung, auch Autoklavieren genannt, ist eine einfache und sichere Art zur Entkeimung allogener Knochentransplantate im klinischen Alltag. Die Methode ist durch die Kombination von feuchter Hitze über 100°C und überatmosphärischen Druck, wie beispielsweise 2,5 bar und 121°C für eine Zeit von 30 Minuten, definiert (Rutala WA und Weber DJ 1999, Boehm P und Stihler J 1995). Allerdings führt die Autoklavierung von Knochen in dieser Art und Weise zum Verlust der Steifigkeit und folglich der osteokonduktiven Eigenschaften, was eine fibröse Heilung zur Folge hat und damit ein Versagen der regelrechten Bruchheilung bedeutet (Ehara S et al. 2000, Hallfeldt KKJ et al. 1994, Saraf SK et al. 1991, Schrott HE and Spyra JL 1997). Ich entwickelte wie einleitend beschrieben, auf dem molekularen Aufbau der Knochematrix basierend eine Methode zur Stabilisierung von Knochen gegen die Aufweichung durch die Dampfsterilisierung (Draenert GF 1997). Dieses neue Knochenmaterial wurde Powerpore® duro genannt. Ergebnisse von in vitro Versuchen belegten dies in Kompressionstests. Die in vitro Versuche zeigten statistisch signifikant eine Kompressionsstabilität des Powerpore® duro Material im Gegensatz zur plastischen Verformbarkeit des unvorbehandelt dampfsterilisierten Knochens.

Um die Biokompatibilität dieses Knochenmaterials vor einer klinischen Anwendung zu belegen, wurde darauf folgend eine Tierversuchsstudie im Patellagleitlagermodell des Kaninchens durchgeführt. Die in vivo Versuche zeigten nach 30 und 100 Tagen eine gleiche und gute Einheilung des neuen Materials im Vergleich zu allogenen Kontrolltransplantaten.

4.1. Diskussion von Material und Methoden

Die histomorphologische Untersuchung von Gewebeproben aus Tierversuchen ist die wichtigste Untersuchungsmethode zur Prüfung der Biokompatibilität und des Einwachsverhaltens von Biomaterialien in der Knochenchirurgie (Seeherman H et al. 2003, Nunamaker DM 1998). Derzeitige Studien über dampfsterilisierte Knochentransplantate verwendeten meist Studiendesigns mit dem Risiko externer mechanischer Belastung an den Osteotomiestellen entlang der langen Röhrenknochen, was die Knochenbruchheilung negativ beeinflusst (Boehm P und Scherer MA 1997, Schrott HE und Spyra JL 1997, Taguchi Y et al. 1995, Koehler P

und Kreicbergs A. 1987, Koehler P et al. 1987, Koehler P et al. 1986, Wangerin K et al. 1986). Zahlreiche Untersuchungen verwendeten überdies Ratten, welche eine einfache Knochenstruktur ohne Havers'sche Systeme aufweisen und daher eine bessere Heilungstendenz mit geringer Aussagekraft zeigen (Nunamaker DM 1998, Enlow DH 1963). Das Patellagleitlagermodell des Kaninchens hingegen ist ein stressfreies, geschlossenes System mit reiner Press-fit-Fixierung ohne Osteosynthesematerial (Draenert K und Draenert Y 1987, Draenert K und Draenert Y 1992). Es ist offiziell zur Biokompatibilitätsprüfung von der amerikanischen Zulassungsbehörde FDA (Food and Drug Administration) zur Zulassung von Medizinprodukten anerkannt (US Food and Drug Administration 2005). Das Implantatbett im abgeschlossenen Patellagleitlager schliesst störende periostale und endostale Knochenbildung aus. Es erlaubt, die Einheilung ausschließlich durch Gefässsprossung aus der Markhöhle zu untersuchen (Draenert K und Draenert Y 1987, Draenert K und Draenert Y 1992). Führungsinstrumente erlauben reproduzierbare biomechanische Verhältnisse. Das zweiseitige Studiendesign erlaubte einen direkten Vergleich mit der Kontrollgruppe. Hierbei wurden beide Patellagleitlager operiert, wobei eine Seite das unbehandelte Kontrollimplantat und die andere das Powerpore® duro Material erhielt. Die Randomisierung der Proben für rechte oder linke Seite berücksichtigte die ungleiche Belastung durch Rechts- oder Linksfüßer (Draenert K und Draenert Y 1987, Draenert K und Draenert Y 1992). Das heisst, es war zufällig zugeteilt worden, welche Seite mit welcher Probe versorgt wurde. Um eine Vergleichbarkeit zur klinischen Situation zu erreichen, wurden für beide Gruppen (Powerpore® duro und unbehandelten Knochen) ausschliesslich allogene Knochentransplantate einer anderen Kaninchenspezies verwendet. Die selbst entwickelte Powerpore® duro Methode ist der erste Versuch, Knochen gegen den Steifigkeitsverlust durch Dampfsterilisation zu stabilisieren (Draenert GF 1997). Dies ist bedeutet folglich, die Osteokonduktivität des Knochens trotz Dampfsterilisierung zu erhalten.

4.2. Diskussion der in vitro Kompressionsversuche

Die Aufweichung des unbehandelten Knochens beim Dampfsterilisieren wurde durch eine unphysiologische hydrolytische Quellung des organischen Matrixanteils (Kollagen, Proteoglykane, Verbindungsproteine) bedingt, was eine Desintegration des tragenden Mineral-Protein-Komplexes zur Folge hatte (Weiner S und Traub W

1992, Wright NT und Humphrey JD 2002). Daher war die mechanische Belastbarkeit drastisch verändert, was die Ergebnisse belegen. Der rein dampfsterilisierte Knochen zeigte eine geringe Druckbelastbarkeit, sogar bei manueller Kompression, und eine klassische plastische Deformation. Dieser Prozess ist irreversibel. Zahlreiche Autoren berichteten über einen derartigen Verlust der mechanischen Steifigkeit von Knochen nach einer Dampfsterilisierung (Borchers RE et al. 1995, Koehler P et al. 1986, Koehler P und Kreichbergs A. 1987, Speirs AD et al. 1999, Viceconti M et al. 1996, Voggenreiter G et al. 1994). Darüberhinaus wurde von einer Zerstörung der fibrillären Kollagenstruktur des Knochens nach Autoklavieren in einer Rasterelektronenmikroskopiestudie berichtet (Voggenreiter G et al. 1994). Ähnliche Steifigkeitsverluste bestanden auch bei bestrahltem Knochen (Moreau MF et al. 2000, Campbell DG und Li P 1999, Voggenreiter G et al. 1995).

Der unbehandelte Knochen zeigte die erwartete Steifigkeit und hohe Druckbelastbarkeit. Auch die bekannten Vorpeaks als Zeichen einer pseudoplastischen Deformation waren erkennbar. Diese resultieren von Verkeilungen der gebrochenen Spongiosabälkchen vor deren vollständigem Bruch (Draenert K und Draenert Y 1992).

Powerpore[®] duro zeigte ähnliche mechanische Eigenschaften wie frischer Knochen bei etwas geringerer maximaler Druckfestigkeit und ebenfalls die beschriebenen Vorpeaks. Bei Powerpore[®] duro wurde vor der Dampfsterilisierung eine Behandlung zur Verminderung der hydrolytischen Quellung der Matrix wie einleitend beschrieben durchgeführt, aufgrund deren der Verband von organischer und anorganischer Matrix nicht hydrolysiert wurde. Infolge dessen waren das Steifigkeitsverhalten von Powerpore[®] duro im in vitro Versuch der Studie mit frischem Knochen vergleichbar, was den Hauptfaktor für dessen Osteokonduktivität darstellt (Draenert K und Draenert Y 1992, Perren SM und Boitzy A 1978). Grund hierfür ist der steifigkeitsbedingte Reiz zur Knochenneubildung, welcher folglich bei dampfsterilisiertem Knochen, ohne Steifigkeit, fehlt und dessen Einheilungsversagen bedingt (Ehara S et al. 2000, Hallfeldt KKJ et al. 1994, Saraf SK et al. 1991). Im Umkehrschluss kann man wegen der erhaltenen Steifigkeit von Powerpore[®] duro von osteokonduktiven Eigenschaften ausgehen und daher eine primäre Osseointegration in vivo erwarten.

4.3. Diskussion der Tierversuchsergebnisse nach 30 Tagen

Die Ergebnisse der 30 Tage Versuche zeigten eine direkte Ossifikation in beiden Gruppen. Dies belegt eine gute Biokompatibilität und Osteokonduktivität des neuen Transplantatmaterials. Eine fibrotische Einheilung hätte für mangelnde Biokompatibilität und Osteokonduktivität gesprochen. Im Vergleich zum unbehandelten Knochen konnte auch keine verzögerte direkte Ossifikation festgestellt werden, was dann eine leicht verminderte Biokompatibilität bedeutet hätte. Der Heilungsverlauf war in beiden Untersuchungsgruppen gleich.

Die Einwuchstiefen belegten diese Ergebnisse und zeigten auch keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Es zeigten sich durchschnittlich 1,59 mm (Powerpore® duro) und 1,38 mm (unbehandelter Knochen) Einwuchstiefe.

Die Untersuchung nach 30 Tagen untersucht eine frühe Phase der Knochenheilung (Schenk RK und Willenegger HR 1977, Perren SM und Boitzy A 1978). Boehm P und Scherer MA (1997) verglichen bestrahlte (5 kGy) mit dampfsterilisierten autologen Knochentransplantaten im Tibiadefektmodell des Hundes an 25 Tieren. Nach drei Wochen zeigte die bestrahlte Gruppe einen schnelleren Heilungsverlauf in der polychromen Sequenzmakierung. Hier war eine zu niedrige Strahlendosis angewendet worden. Der dampfsterilisierte Knochen heilte mit deutlicher Verzögerung ein.

Die in meiner Arbeit durchgeführte histomorphometrische Quantifizierung der Einwuchstiefe ist bei dampfsterilisierten Knochentransplantaten bislang noch nicht angewendet worden. Allerdings ist dies generell bei der Prüfung von Biomaterialien Standard (Akay G et al. 2004). Akay G et al. (2004) beschreiben hier bei einem osteokonduktiven Biomaterial eine Einwuchstiefe von 1,4 mm maximal nach 35 Tagen in einem in vitro Zellkultursystem unter idialisierten Bedingungen. In vivo Untersuchungen an den Kondylen des Femurs von Japanese white rabbits mit osteokonduktiven Biogläsern zeigen ebenfalls vergleichbare Einwuchstiefen nach 3 Wochen (Fujibayashi S et al. 2003).

4.4. Diskussion der Tierversuchsergebnisse nach 100 Tagen

Die 100 Tage Ergebnisse zeigen den Konsolidierungsstatus in einer späten Phase der Knochenheilung (Schenk RK und Willenegger HR 1977, Perren SM und Boitzy A 1978). Der Heilungsverlauf belegte abermals die osteokonduktiven Eigenschaften von Powerpore® duro. Hierbei sind Revaskularisierung, Knocheneinwuchs,

Knochenneubildung mit direktem Knochen-Implantat-Kontakt und Remodelling mit Resorptionszonen die wichtigsten Faktoren (Schenk RK und Willenegger HR 1977, Perren SM und Boitzky A 1978). Die Ergebnisse zeigten, dass diese Kriterien erfüllt sind. Die primäre Osseointegration wurde durch das kontinuierliche Tetrazyklinlabelling verdeutlicht. Die Knochenneubildung war von einer leichten Marklagerreaktion begleitet und belegte damit eine normale Bruchheilung, da diese Entzündung mit der verbundenen Neovaskularisation die Grundlage für Osseointegration, Resorption und Remodelling des Implantatmaterials ist (Schenk RK und Willenegger HR 1977, Perren SM und Boitzky A 1978).

Wie eingehend beschrieben (siehe Seite 24) wurde die geplante dritte Versuchsgruppe mit rein dampfsterilisiertem Knochen von der Regierung von Oberbayern mit dem Verweis auf die wissenschaftlich eindeutig belegten schlechten Heilungsergebnisse solchen Materials nicht genehmigt. Autologe, autoklavierte Knochentransplantate im Ulna-Defektmodell des Kaninchens zeigten ein völliges knöchernes Heilungsversagen trotz Osteosynthese nach 16 Wochen (Koehler P et al. 1986 und 1987). Es wurden hier typische fibrotische Heilungen beobachtet. Schratt and Spyra (1997) berichten ein völliges Ausbleiben einer knöchernen Heilung im Tibiadefektmodell der Ratte nach 12 Wochen. Sie verglichen allogene dampfsterilisierte Transplantate mit bestrahltem (25 kGy) und frischem Knochen. Taguchy et al. (1995) untersuchten ebensolche Transplantate im Tibiadefektmodell des Kaninchens und verglichen sie mit freien, mikrovaskulär reanastomosierten Knochentransplantaten. Sie beschreiben eine Nichtverknöcherung bei allen Proben mit rein dampfsterilisiertem Knochen. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen beobachteten Wangerin et al. (1986) eine gute knöcherne Heilung nach 28 und 35 Wochen bei dampfsterilisiertem Rippenknochen nach Transplantation in den Unterkiefer des Hundes (Wangerin K et al. 1986). Hierbei wurden allerdings autotransplantate verwendet. Ausserdem sind Rippenknochenstücke massive Kortikalis und keine Spongiosa, so dass hier auch nach der Dampfsterilisierung eine entscheidene Reststeifigkeit vorgelegen haben kann. Daten hierzu gibt es nicht. Die Vorstudie hierzu erfolgte in einem allogenen Rattenmodell und heilte ebenfalls gut knöchern ein, allerdings wurde die Problematik von Rattenversuchen an Knochen bereits oben diskutiert. Generell ist Cortikalis als Gewebe für Vergleichsstudien schlecht geeignet, da die Umbauvorgänge im Rahmen einer Osseointegration sehr viel langsamer, als bei Spongiosa ablaufen. Young et al. (1996) verglichen

autologen, dampfsterilisierten Knochen mit einer Kombination aus diesem mit demineralisierter Knochenmatrix (demineralized bone matrix -DBM, auch bekannt als AAA-bone) im Scheitelbein-Rattenmodell. Hier zeigte sich, wie in den Rattenversuchen anderer Autoren keine Heilungsverzögerungen in beiden Gruppen nach 2 Wochen. Hier wurde allerdings rein morphologisch beobachtet. Eine sinnvolle Histomorphologie fehlte. Abermals muss hier auf die unvergleichbare und sehr hohe Heilungstendenz des Rattenknochens und seine besondere Morphologie hingewiesen werden.

Untersuchungen mit anderen dampfsterilisierten, autologen Transplantaten nach kürzeren Einheilungszeiten zeigten, wie bereits oben diskutiert, ähnliche Ergebnisse: Boehm P und Scherer MA (1997) fanden bei dampfsterilisierten autologen Knochentransplantaten im Tibiadeфекtmodell des Hundes nach drei Wochen eine deutliche Heilungsverzögerung in der polychromen Sequenzmarkierung.

Die histomorphometrische Quantifizierung der Einwuchstiefe, wie auch bei den 30 Tage Versuchen durchgeführt, zeigt im Vergleich beider Gruppen keinen signifikanten Unterschied und war entsprechend dem Zeitverlauf mit beschriebenen Werten konsistent (Fujibayashi S et al. 2003).

4.5. Schlussbetrachtungen

Einige Arbeiten berichten über die klinische Anwendung von dampfsterilisiertem Knochen. Viele Fälle betrafen Segmentdefekte bei Knochtumoren (Enneking WF et al. 1980, Mankin HJ et al. 1976, Ottolenghi CE 1972). Alle wurden mit einer internen oder externen Osteosynthese versorgt und wiesen eine deutlich verzögerte Knochenbruchheilung und eine hohe Komplikationsrate auf (Harding RL 1957, Boehm P et al. 1998, Kao and Comstock 1995, Smith WS and Struhl S 1988, Asada N et al. 1997, Koehler P and Kreicbergs A 1987, Sanjay BKS et al. 1997). Hier wurde durchschnittlich ein Heilungsversagen bei 12-23% und eine Knochenbruchrate von etwa 50% genannt. Ausserdem benötigten etwa 50% der Patienten bis zu 4 Revisionsoperationen. Diese Komplikationen limitieren den klinischen Einsatz dampfsterilisierter Knochentransplantate. Aufgrund der Ergebnisse unserer Studie erwarten wir im Gegensatz hierzu ein gutes Einwuchsverhalten von Powerpore® duro Material auch im klinischen Einsatz beim Menschen.

Das neue, vorbehandelte Knochenmaterial bewahrt trotz Dampfsterilisierung eine hohe Steifigkeit und zeigt gute, osteokonduktive Eigenschaften. Das allogene

Powerpore[®] duro material wurde im Verlauf resorbiert und durch neugebildeten Knochen, wie frisches Transplantatmaterial, ersetzt. Es ist eine Möglichkeit, Knochenmaterial einfach und kostengünstig zu sterilisieren, und bietet eine alternative Möglichkeit zum Führen einer Knochenbank. Insbesondere in der dritten Welt und Ländern mit mangelnden finanziellen Möglichkeiten zur korrekten serologischen und bakteriologischen Prüfung der Spender ist die Methode sehr wertvoll. Als Teil eines sinnvollen Entwicklungshilfeprogrammes kann sie bei überschaubarem Aufwand und geringen Kosten umgesetzt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Knochenaufbau mittels Biomaterialien und Transplantaten gehört zur Standardmethodologie in vielen chirurgischen Fachgebieten. Dampfsterilisiertes Knochenmaterial zeigt, trotz Attraktivität der Entkeimungsmethode überwiegend ein Verknöcherungsversagen bei stark verminderter Steifigkeit. Es wurde in dieser dreigeteilten Studie ein neues Knochentransplantatmaterial untersucht, Powerpore[®] duro, welches seine Steifigkeit bei einer Dampfsterilisierung nicht verliert,. Das Material zeigte eine primäre Osseointegration und eine lamelläre Knochenneubildung. In einer geschlossenen Tierversuchsstudie an 17 Kanninchen wurde am Patellagleitlagermodell das Einwachsverhalten des neuen Materials untersucht. Nicht entkalkte Knochenhistologien zeigen nach 30 (n=5) und 100 (n=12) Tagen eine regelrechte Osseointegration in allen untersuchten Proben. Hierbei waren die allogenen Powerpore[®] duro Transplantate im Vergleich zur allogenen, unbehandelten Kontrollgruppe (frischer Knochen) adäquat im Hinblick auf Einwuchstiefe, Resorption und Remodelling. Die Technologie ist eine Möglichkeit, Knochenmaterial einfach und kostengünstig zu sterilisieren, und bietet eine alternative Möglichkeit zum Führen einer Knochenbank.

6. ABSTRACT (ENGLISH)

Introduction. Bone allografts are the standard in augmentative bone surgery yet steam sterilized bone shows low mechanical stability and limited ossification based on a low strain adapted bone remodelling. A new pre-treatment technique which allows the autoclavation of bone without the loss of its mechanical stability and osteoconductivity was developed. We compared the stiffness of the novel bone graft material (powerpore[®] duro) with conventionally steam sterilized and fresh bone, and monitored in two rabbit experiments its short and long term ingrowth.

Materials and Methods. In a first experiment out of three, the mechanical stability of porcine bone cylinders from distal femora (diameter 8.5 by length 20 mm) was determined in a free compression test (n=30 per group) with cylinders of the new material, steam sterilized and fresh frozen bone in vitro. Direct ossification and toxicity were assessed 30 days after implantation in a second study in vivo. Cylinders (diameter 4.6 by length 6 mm) of test material or fresh bone were implanted in a randomised crossover design in press fit technique into both knees of five New Zealand White rabbits. Osseous integration and remodelling 100 days after implantation were investigated in an equal third study with 12 rabbits. Histomorphological examination of the calcified, sequentially labelled samples by fluorescent light and conventional microscopy enabled the monitoring of the bony ingrowth.

Results. Conventional steam sterilization revealed almost no mechanical stability. The new material was mechanically stable and the dynamics of the compression strength curves equalled fresh frozen bone suggesting good osteoconductivity yet the average maximum compression strength was lower than fresh frozen samples. Direct ossification from the implant interface into the implant was seen after 30 days in the powerpore[®] and the fresh bone group without difference. An almost vanished implant-interface border, further bone ingrowth and advanced remodelling characterised the result after 100 days. There was no difference between treated and control samples.

Conclusion. A new method to sterilize bone by autoclavation preserved its mechanical stability and resulted in excellent bone ingrowth. The bone keeps its original microstructure, mineralisation and composition, and is easily used in bone banking and tissue research.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Akay G, Birch MA, Bokhari MA (2004): Microcellular polyHIPE polymer supports osteoblast growth and bone formation in vitro. *Biomaterials* **25(18)**: 3991-4000.
- Allain J-P, Laurian Y, Paul DA, Senn D, Members of the AIDS-Haemophilia French Study Group (1986): Serological markers in early stages of human immunodeficiency virus infection in haemophilies. *Lancet* **II**: 1233-1236.
- American Association of Tissue Banks (1984): Standards for tissue banking. Arlington, Virginia, USA.
- American Association of Tissue Banks (1987): Technical manual for surgical bone banking. Arlington, Virginia, USA.
- Amizuka N, Yamada M, Watanabe JI, Hoshi K, Fukushi M, Oda K, Ikehara Y, Ozawa H (1998): Morphological examination of bone synthesis via direct administration of basic fibroblast growth factor into rat bone marrow. *Microsc Res Tech* **41(4)**: 313-22
- Arm DM; Tencer AF; Bain SD; Celino D (1996): Effect of controlled release of platelet-derived growth factor from a porous hydroxyapatite implant on bone ingrowth. *Biomaterials* **17(7)**: 703-9
- Asada N, Tsuchiya H, Kitaoka K, Mori Y, Tomita K. (1997): Massive autoclaved allografts and autografts for limb salvage surgery. A 1-8 year follow-up of 23 patients. *Acta Orthop Scand* **68(4)**: 392-95.
- Aspenberg P, Johnsson E, Thorngren K-G (1990): Dose-dependent reduction of bone inductive properties by ethylene oxide. *J Bone Joint Surg Br* **72**: 1036 – 37.
- Bettin D, Dethloff M, Steinbeck J, Polster J (1994): Organisation einer Knochen- und Gewebebank. *Z Orthop* **132**: 453-458
- Biggs B, Newton-John HF (1986): Acute HTLV-III infection: a case followed from onset to seroconversion. *Med J Aust* **144**: 545-547.
- Blum HE, Stowring L, Figus A, Montgomery CK, Haase AT, Vyas GN (1983): Detection of hepatitis B DNA in hepatocytes, bile duct epithelium, and vascular elements by in situ hybridization. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **80**: 6685-6688.
- Bodenschatz W (1989): Handbuch für den Desinfektor. 1. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- Boehm P, Stihler J (1995): Intraosseous temperature during autoclaving. *J Bone Joint Surg Br* **77**: 649-53.

- Boehm P, Scherer MA (1997): Incorporation of devitalised autografts in dogs. *Int Orthop* **21**: 283-90.
- Boehm P, Springfield R, Springer H (1998): Re-implantation of autoclaved bone segments in musculoskeletal tumor surgery. *Arch Trauma Surg* **118**: 57-65.
- Borchers RE, Gibson LJ, Burchardt H, Hayes WC (1995): Effects of selected thermal variables on the mechanical properties of trabecular bone. *Biomaterials* **16**: 545-51.
- Bright RW, Smarsh JD, Gambill VM (1989): Sterilization of human bone by irradiation. In Friedlaender GE et al. (1989): *Osteochondral Allografts: Biology, Banking, and clinical applications*. Little Brown and Company, Boston, Toronto. Seite 223-232.
- Bundesgesundheitsblatt 24 Nr.1. August 1987. Sonderdruck. Heymanns Verlag, Köln.
- Bundesgesundheitsblatt 30 Nr.1-5. August 1987. Sonderdruck. Heymanns Verlag, Köln.
- Bundesgesundheitsminister (Herausgeber) (1993): *Daten des Gesundheitswesens*. Schriftenreihe des Bundesministeriums für Gesundheit, Band 25. Nomos Verlagsgesellschaft, Baden-Baden.
- Buring K, Urist MR (1967): Effects of ionizing radiation on the bone induction principle in matrix on bone implants. *Clin Orth* **55**: 225-234.
- Campbell DG, Li P (1999): Sterilization of HIV with irradiation: relevance to infected bone allografts. *Aust N Z J Surg* **69**: 517-21.
- Caplazi P, O'Rourke K, Wolf C, Shaw D, Baszler TV (2004): Biology of PrP^{Sc} accumulation in two natural scrapie-infected sheep flocks. *J Vet Diagn Invest* **16(6)**: 489-96.
- Center for Disease Control (1988): Transmission of HIV through bone transplantation: Case report and public health recommendation. *MMWR* **37**: 597-599.
- Center for Disease Control (1994): Guidelines for preventing transmission of human immunodeficiency virus through transplantation of human tissue organs. *MMWR* **43**: 8.
- Cochran DL; Jones AA; Lilly LC; Fiorellini JP; Howell H (2000): Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in oral applications including the use of endosseous implants: 3-year results of a pilot study in humans. *J Periodontol* **71(8)**: 1241-1257.
- Coffin J, Haase A, Levy J, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, Temin H, Toyoshima K, Varmus H, Vogt P, Weiss R (1986): What to call the AIDS virus? *Nature* **321**: 10.
- Conway B, Tomford WW, Hirsch MS (1990): Effects of gamma irradiation on HIV-1 in a bone allograft model. *Trans Orthop Res Soc* **15**: 225.

- Darnell J, Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P (1995): Molecular Cell Biology; 3rd edition; W.H. Freeman & Co, New York.
- Draenert GF (1997): Steriles Knochenmaterial nativen Ursprungs für die Transplantation und Verfahren zur Hitzesterilisierung des Knochenmaterials. Offenlegungsschrift DE19543110, Deutsches Patentamt, München.
- Draenert K, Draenert Y (1987): [A new technology for bone biopsies and bone-to-bone transplants]. Sandorama **2**: 31-38.
- Draenert K, Draenert Y (1992): Forschung und Fortbildung in der Chirurgie des Bewegungsapparates 3: Stain-adaptive bone remodelling. Munich, Germany: Art & Science; p. 13-21.
- Ehara S, Nishida J, Shiraishi H, Tamakawa Y (2000): Pasteurized intercalary bone graft: radiographic and scintigraphic features. Skeletal Radiol **29**: 335-39.
- Einhorn TA (2003): Clinical applications of recombinant human BMPs: early experience and future development. J Bone Joint Surg Am **85A** (Suppl.3): 82-88.
- Enlow DH (1963): The Canal system in bone. In: Enlow DH, editor. Principles of bone remodelling. Springfield, IL, USA: Charles C Thomas Publisher; p. 60-74.
- Enneking WF, Eady JL, Burchardt H (1980): Autogenous cortical bone grafts in the reconstruction of segmental skeletal defects. J Bone Joint Surg Am **62(7)**: 1039-58.
- European Association of Musculo-Skeletal Transplantation. Second Annual Meeting, April 1993, Paris, France.
- Evans FG (1957): Stress and strain in bones. 1st edition; Charles C. Thomas Publishers, Springfield.
- Evatt BL, Gromperts ED, McDougal JS, Ramsey RB (1985): Coincidental appearance of LAV/HTLV III antibodies in haemophiliacs and the onset of the AIDS epidemic. N Engl J Med **312**: 483-486.
- Fujibayashi S, Neo M, Kim HM, Kokubo T, Nakamura T (2003): A comparative study between in vivo bone ingrowth and in vitro apatite formation on Na₂O-CaO-SiO₂ glasses. Biomaterials **24(8)**:1349-1356.
- Hahn H, Falke D, Klein P (1990): Medizinische Mikrobiologie. 1.Auflage. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Hallfeldt KKJ, Kessler S, Puhlmann M, Mandelkow H, Schweiberger L (1992): Der Einfluss verschiedener Sterilisationsverfahren auf die osteoinduktiven Eigenschaften demineralisierter Knochenmatrix. Unfallchirurg **95**: 313-318.

- Hallfeldt KKJ, Stuetzle H, Puhlmann M, Kessler S, Schweiberer L (1994): Sterilisation of partially demineralized bone matrix: The effects of different sterilization techniques on osteogenic properties. *J Surg Res* **59**: 614-20.
- Harding (1957): Replantation of the mandible in cancer surgery. *Plast Reconstr Surg* **19(5)**: 373-383.
- Herron LD, Newman MH (1991): The failure of ethylene oxide gas-sterilized freeze-dried bone graft for thoracic and lumbar spinal fusion. *Spine* **16(5)**: 600-01
- Hessol NA, Rutherford GW, O'Malley PM, Doll LS, Darrow WW, Jaffe HW, *et al.* (1987): The natural history of human immunodeficiency virus infection in a cohort of homosexual and bisexual men: a 7-year prospective study. 3rd International conference on AIDS, Washington D.C., 1-5 June 1987. Abstract M31.
- Howell TH; Fiorellini J; Jones A; Alder M; Nummikoski P; Lazaro M; Lilly L; Cochran D (1997): A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge device for local alveolar ridge preservation or augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent* **17(2)**: 124-139.
- Huber J, Plitz W (2000): Biomechanischer Vergleich von Knochenersatzmaterial mit humaner Spongiosa. *Trauma Linc* **2(1)**: 81-83
- Incan A (1942): The use of preserved bone graft in orthopaedic surgery. *J Bone and Joint Surg* **24**: 81-96.
- IvoryJP, Thomas IH (1993): Audit of a bone bank. *J Bone Joint Surg Br* **75(3)**: 355-357.
- Jerosch J, Castro WHM, Granrath M, Rosin H (1990): Knochenbanken in der BRD- Ergebnisse einer Befragung. *Unfallchirurg* **93**: 334.
- Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) and World Health Organization (WHO) (2005): AIDS epidemic update. Special report on AIDS prevention. December 2005. UNAIDS, Genf, Schweiz.
- Kao JT, Comstock C (1995): Reimplantation of a contaminated and devitalized bone fragment after autoclaving in an open fracture. *J Orthop Trauma* **9(4)**: 336-40.
- Kakaiya R, Miller WV, Gudino MD (1991): Tissue transplant-transmitted infections. *Transfusion* **31(3)**: 277-284.
- Knaepler H, von Garrel T, Seipp HM, Ascherl R (1992): Experimentelle Untersuchungen zur thermischen Desinfektion und Sterilisation allogener Knochentransplantate und deren Auswirkungen auf die biologische Wertigkeit. *Unfallchirurg* **95(10)**: 477-484.

- Knaepler H, v. Garrel T, Seipp HM, Ascherl R, Gotzen L (1992b): Autoklavierung von allogenen Knochentransplantaten als Alternative zur konventionellen Knochenbank? Orthop Prax **1**: 18-22.
- Knauss (1981): Materialkennwerte und Festigkeitsverhalten des spongiösen Knochengewebes am coxalen Human-Femur. Biomed. Technik **26**: 9.
- Kobayashi M, Shinzato S, Kawanabe K, Neo M, Matsushita M, Kokubo T, Kikutani T, Nakamura T (2000): Alumina powder/Bis-GMA composite: effect of filler content on mechanical properties and osteoconductivity. J Biomed Mater Res. **49(3)**: 319-327.
- Koehler P, Kreicbergs A, Stroemberg L (1986): Physical properties of autoclaved bone. Acta Orthop Scand **58**: 141-45.
- Koehler P, Glas JE, Larsson S, Kreicbergs A (1987): Incorporation of nonviable bone grafts. Autoclaved autogeneic and frozen allogeneic bone grafts compared in the rabbit. Acta Orthop Scand **58(1)**: 54-60.
- Koehler P, Kreicbergs A (1987): Incorporation of autoclaved autogenic bone supplement with allogenic demineralised bone matrix. Clin Orthop Rel Res **218**: 247-58.
- Kuchling H (1995): Taschenbuch der Physik. 15. Auflage, Fachbuchverlag Leipzig, Leipzig, Köln.
- Kudryk VL, Scheidt MJ, McQuade MJ, Sutherland DE, VanDyke TE, Hollinger JO (1992): Toxic effect of ethylene-oxide-sterilized freeze-dried bone allograft on human gingival fibroblasts. J Biomed Mater Res **26(11)**: 1477-88.
- Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ (1996): Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF-beta, BMP. Bone **19(1 Suppl.)**: 1S-12S.
- Mankin HJ, Fogelson FS, Thrasher AZ, Jaffer F (1976): Massive resection and allograft transplantation in the treatment of malignant bone tumors. N Engl J Med **294(23)**: 1247-55.
- Mason WS, Seeger C (1991): Hepadnaviruses, Molecular Biology and Pathogenesis. Current Topics in Microbiology and Immunology, Band 168. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest.
- Matti H (1929): Über Modellierende Osteotomie und Spongiosatransplantation. Schweiz Med Wschau **49**: 1254.
- Mallinin T, Martinez O, Brown M (1985): Banking of massive osteoarticular and intercalary bone allografts-12 years experience. Clin Orthop and Rel Res **197**: 44-57.

- Mankin H, Gebhardt M, Tomford W (1987): The use of frozen cadaveric allografts in the management of patients with bone tumors of the extremities. *Orthop Clin of North Amer* **18(2)**: 275-289.
- Marx RE (1994): Clinical application of bone biology to mandibular and maxillary reconstruction. *Clin Plast Surg*. 1994 **21(3)**: 377-92.
- Mellonig JT, Prewitt AB, Moyer MP (1992): HIV inactivation in a bone allograft. *J Periodontol* **63**: 979-983.
- Moreau MF, Gallois Y, Basle MF, Chappard D (2000): Gamma irradiation of human bone allografts alters medullary lipids and releases toxic compounds for osteoblast-like cells. *Biomaterials* **21(4)**: 369-76.
- Nakamura K, Kurokawa T, Kato T, Okazaki H, Mamada K, Hanada K, Hiyama Y, Aoyama I, Nakamura T, Tamura M (1996): Local application of basic fibroblast growth factor into the bone increases bone mass at the applied site in rabbits. *Arch Orthop Trauma Surg* **115(6)**: 344-346
- Nakamura T, Hanada K, Tamura M, Shibunushi T, Nigi H, Tagawa M, Fukumoto S, Matsumoto T (1995): Stimulation of endosteal bone formation by systemic injections of recombinant basic fibroblast growth factor in rats. *Endocrinology* **136(3)**:1276-84
- Nunamaker DM (1998): Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop* **355** Suppl: S56-65.
- Ollier L (1867): *Traite experimental et clinique de la regeneration des os et de la production artificielle du tissue osseux*. Paris, Masson.
- Ottolenghi CE (1972): Massive osteo and osteo-articular bone grafts. Technic and results of 62 cases. *Clin Orthop Relat Res* **87**: 156-64.
- Perren SM, Boitzy A (1978): Cellular differentiation and bone biomechanics during the consolidation of a fracture. *Anat Clinica* **1**: 13-28.
- Pilliar RM (1998): Overview of surface variability of metallic endosseous dental implants: textured and porous surface-structured designs. *Implant Dent*. **7(4)**: 305-314.
- Pittman MR, Tolman DE, Jowsey J (1975): An experimental study of autoclaved autogenous mandible in combination with cancellous bone and marrow. *J Oral Surg* **33(3)**: 171-79.
- Poiesz BJ, Ehrlich G, Papsidero L, Montagna R, Kwok S, Sninsky J, *et al.* (1987): Incidence of seronegativity to HIV and HTLV-I in individuals infected with either virus. 3rd International conference on AIDS, Washington D.C., 1-5 June 1987. Abstract WP23.

- Rees M (1987): The sombre view of AIDS. *Nature* **326**: 343-345.
- Resnick L, Veren K, Salahuddin SZ, Tondreau S, Markham PD (1986): Stability and inactivation of HTLV III/LAV under clinical and laboratory environments. *JAMA* **255**: 1887-1891.
- Riedel GE; Valentin-Opran A (1999): Clinical evaluation of rhBMP-2/ACS in orthopedic trauma: a progress report. *Orthopedics* **22(7)**: 663-665.
- Rutala WA, Weber DJ (1999): Infection control: the role of disinfection and sterilization. *J Hosp Infect* **43** Suppl: S43-55.
- Salter RB (1984): *Textbook of disorders and injuries of the musculoskeletal system*. 2nd edition; Williams & Wilkins, Baltimore, London, Los Angeles, Sydney.
- Sanjay BKS, Moreau PG, Younge DA (1997): Reimplantation of autoclaved tumor bone in limb salvage surgery. *Int Orthop* **21**: 291-97.
- Saraf SK, Agarwal K, Tuli SM, Khanna S (1991): Autoclaved partially decalcified bone as osteogenic substances – an experimental study. *Indian J exp Biol* 1991; 29: 39-42.
- Schenk RK, Willenegger HR (1977): Zur Histologie der primären Knochenbruchheilung. *Unfallheilkunde* **80(5)**: 155-60.
- Schratt HE; Spyra JL (1997): Experimental studies of healing and antigenicity of sterilized bone transplants. *Chirurg* **68(1)**: 77-83
- Schüpbach J (1989): *Human Retrovirology, Facts and Concepts*. Current Topics in Microbiology and Immunology, Band 142. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.
- Seeherman H, Li R, Wozney J (2003): A review of preclinical program development for evaluating injectable carriers for osteogenic factors. *J Bone Joint Surg Am* **85A** Suppl: S96-108.
- Simonds RJ, Holmberg SD, Hurwitz RL, Coleman TR, Bottenfield S, Conley LJ, Kohlenberg SH, Castro KG, Dahan BA, Schable CA, et al. (1992): Transmission of human immunodeficiency virus type1 from seronegative organ and tissue donor. *N Engl J Med* **326(11)**: 726-732.
- Simonds RJ (1993): HIV transmission by organ and tissue transplantation. *AIDS Suppl.2*: S35-S38.
- Smith WS, Struhl S (1988): Replantation of an autoclaved autogenous segment of bone for treatment of chondrosarcoma. Long-term follow up. *J Bone Joint Surg Am* **70(1)**: 70-75.

- Speirs AD, Hotz MA, Oxland TR, Haeusler R, Nolte LP (1999): Biomechanical properties of sterilized human auditory ossicles. *J Biomech* **32**: 485-91.
- Taguchi Y, Pereira BP, Kour AK, Pho RW, Lee YS (1995): Autoclaved autograft bone combined with vascularized bone and bone marrow. *Clin Orthop Relat Res* **320**: 220-30.
- Tomford WW (1995): Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts. *J Bone Joint Surg Am* **77(11)**: 1742-1754.
- Torwesten G, Braun M (1993): Kostenanalyse einer Knochenbank. *Z Orthop* **131**: 51-56.
- Tshamala M; Cox E; De Cock H; Goddeeris BM; Mattheeuws D (1999): Antigenicity of cortical bone allografts in dogs and effect of ethylene oxide-sterilization. *Vet Immunol Immunopathol* **69(1)**: 47-59
- Urist MR (1965): Bone: Formation by autoinduction. *Science* **150**: 893-899.
- Urist MR, Mikulski A, Lietze A (1979): Solubilized and insolubilized bone morphogenic protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 1828-1932.
- US Food and Drug Administration (2005): 510(k) Premarket Notification #K041177; Regulation number 888.3045; SYNTHACER, SYNTRICER; june 23th 2005.
- van den Bergh JP; ten Bruggenkate CM; Groeneveld HH; Burger EH; Tuinzing DB (2000): Recombinant human bone morphogenetic protein-7 in maxillary sinus floor elevation surgery in 3 patients compared to autogenous bone grafts. A clinical pilot study. *J Clin Periodontol* **27(9)**: 627-36.
- Viceconti M, Toni A, Brizio L, Rubbini L, Borelli A (1986): The effect of autoclaving on the mechanical properties of bank bovine bone. *Chir Organi Mov* **81(1)**: 63-68.
- Voggenreiter G, Ascherl R, Blumel G, Schmit-Neuerburg KP (1994): Effects of preservation and sterilization on cortical bone grafts. A scanning electron microscopic study. *Arch Orthop Trauma Surg* **113(5)**: 294-96.
- Voggenreiter G, Ascherl R, Fruh HJ, Blumel G, Schmit-Neuerburg KP (1995): Preservation and sterilization of cortical bone – biomechanical studies of the rat. *Unfallchirurg* **98(2)**: 53-58.
- Wangerin K, Ewers R, Wottge HU, Randzio G (1986): The autoclaved autogenous bone graft as a re-implant. Results of animal experiments. *J Maxillofac Surg* **14(3)**: 138-42.
- Weiner S, Traub W (1992): Bone structure: from angstroms to microns. *FASEB J* **6**: 879-885.

- Wenz B, Oesch B, Horst M (2001): Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials* **22(12)**: 1599-606.
- WHO (Mai 1986): Guidelines for the prevention and control of infection with LAV/HTLV III. World Health Organisation, Genf, Schweiz.
- WHO Collaborating Center on AIDS (1987): AIDS surveillance in Europe. Report No. 13. Situation by 31st of March 1987.
- Wiese FG (1998): Histomorphologie einer synthetisch hergestellten Hydroxylapatit-Positivkeramik –Knochenersatzwerkstoff- mit reproduzierbarer definierter Porengrösse im interkonnektierenden Porensystem –tierexperimentelle Ergebnisse. Dissertation. Fakultät Humanmedizin. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Wolf K, Hamar J, Höcherl E, Farkas T, Pfister C (2000): Knochenneubildung-Osteokonduktion-Osteoinduktion. *TraumaLinc* **2(1)**: 54-69.
- Wolter D (1976): Das komprimierte und geformte autologe Spongiosatransplantat. Habilitationsschrift, Universität Ulm, Ulm, Deutschland.
- Wright NT, Humphrey JD (2002): Denaturation of collagen via heating: an irreversable rate process. *Annu Rev Biomed Eng* **4**: 109-128.
- Young TQ, Matsuda M, Takekawa M, Ohsubo S, Tsuyama K, Kita S (1996): Morphological changes of autoclaved autogenic bone implantation and autoclaved autogenic bone supplemented with allogenic demineralised bone matrix in rat parietal bone. *Histol Histopathol* 1996; 11(2): 361-69.

8. Danksagungen

Ich danke Herrn Prof.Dr.med. M. Delius für die Unterstützung bei diesem Projekt. Insbesondere die Hilfe bei der Beantragung des Tierversuches und das gemeinsame Schreiben der Veröffentlichung, welche sich im Peer-Prozess befindet.

Herrn Prof.Dr.med. K. Meßmer danke ich für die Aufnahme in sein Institut und die Möglichkeit somit die tierexperimentelle Prüfung des neuen Materials durchzuführen.

10. CURRICULUM VITAE

Vor- und Zuname: Dr.med. Florian Guy Draenert, Arzt und Zahnarzt
geboren am: 12.10.1970 in Ruit, Kreis Esslingen, Deutschland
15.5.1990: Theodor-Heuss-Gymnasium, Aalen (Allgemeine Hochschulreife - Abitur)
1990.1997: Studium der Medizin; Universität Ulm.
10.07.1997 Promotion zum Dr.med. Magna Cum Laude: Etablierung eines Tiermodells zum Studium von *in vivo* Gentransferstrategien in den Ösophagus, Prof. G. Adler; Klinik für Innere Medizin I; Universität Ulm
18.02.2003 Approbation zum Arzt
1997-2002 Studium der Zahnmedizin, Universität München.
02.07.2002 Approbation zum Zahnarzt
Seit 01.11.02 Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Draenert GF (27.10.88): PCT/EP88/00968; Verbindung mit antibiotischer cytostatischer und/oder antiviraler Wirkung aus karnivoren Pflanzen. Patentanmeldung.

Draenert GF (1989): Dionin-Entdeckung und Erforschung eines Chemotherapeutikums. *Junge Wissenschaft* **15**: 32-37.

Draenert GF (1990): Dionin-discovery and investigation of a therapeutic chemical from Venus's-Flytrap. *BASE journal* **8(1)**: 41-46.

Draenert GF (1992): A theory on the replication mechanisms of prions. *BASE journal* **10(1)**: 42-45.

Draenert GF (17.11.1995): DE 195 43 110.3; Steriles Knochenmaterial nativen Ursprungs für die Transplantation und Verfahren zur Hitzesterilisierung des Knochenmaterials. Patentanmeldung.

Schmid RM, Weidenbach H, **Draenert GF**, Lerch MM, Liptay S, Schorr J, Beck KH, Adler G. (1994): Liposome mediated *in vivo* gene transfer into different tissues of the gastrointestinal tract. *Z. Gastroenterol.* **32**: 665-670.

Schmid RM, Weidenbach H, **Draenert GF**, Liptay S, Luhrs H, Adler G (1997): Liposome mediated gene transfer into the rat oesophagus. *GUT* **41(4)**: 549-556.

Draenert GF, Mathys jr. R, Ehrenfeld M, Draenert Y, Draenert K (2007): Histological examination of drill sites in bovine rib bone after grinding *in vitro* with eight different devices. *Br J Oral Maxillofac Surg* **xx**: xxx-xxx.

- Draenert GF**, Coppenrath E, Herzog P, Müller S, Ehrenfeld M, Mueller-Lisse UG (2007):
Artifacts at dental implant scans with the CBCT compared to the dental
multidetectorrow CT. Dentomaxillofac Radiol xx: xxx-xxx.
- Draenert GF**, Delius M (2007): The mechanically stable steam sterilization of bone grafts.
Biomaterials xx: xxx-xxx.
- Draenert GF**, Ehrenfeld M, Eisenmenger W (2007): Eine neue Technik zur indirekten
Sinusbodenelevation mit Knochendübeln in Press-fit Technik (Dowel-Lift): erste in vitro
Ergebnisse. MKG Chir xx: xxx–xxx.
- Draenert GF**, Eisenmenger W (200x): A new technique for the transcrestal sinus
floor elevation with press-fit bone dowels: dowel-lift. submitted for publication.