

**Angefertigt am  
Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik  
der Universität Ulm  
Direktor: Prof. Dr. Anita Ignatius**

**Vorgelegt über die  
Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Ulrike Matis**

**Untersuchung von neuen injizierbaren makroporösen  
Knochenzementen im Tiermodell**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**von  
Melanie Göckelmann  
aus Langenau**

**München 2010**

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

**Dekan:** **Univ.-Prof. Dr. Braun**  
**Berichterstatter:** **Univ.-Prof. Dr. Matis**  
**Korreferent:** **Priv.-Doz. Dr. Maierl**

**Tag der Promotion: 13. Februar 2010**

**Für Ralph und Thorben**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1</b>	<b>Einsatz von Knochenersatzmaterialien.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2</b>	<b>Grundlagen .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Entstehung und Aufbau von Knochen.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Remodeling von Knochen .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Defektheilung und Regeneration von Knochen .....</b>	<b>7</b>
<b>2.3</b>	<b>Ersatzmaterialien .....</b>	<b>9</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Anforderungen.....</b>	<b>9</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Reaktion des Knochens auf ein Implantat.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Einteilung der Knochenersatzmaterialien.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.4</b>	<b>Existierende Knochenersatzmaterialien .....</b>	<b>16</b>
<b>2.4</b>	<b>Ziel der Arbeit .....</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2</b>	<b>Tierversuch .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Versuchstiere und Haltung .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Versuchsablauf .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Operation .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Röntgen, Nachsorge und Applikation von Fluoreszensfarbstoffen.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Präparation zur Probengewinnung .....</b>	<b>39</b>
<b>3.3</b>	<b>Auswertungsverfahren .....</b>	<b>43</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Biomechanik (Eindrücktest).....</b>	<b>43</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Knochendichtebestimmung durch periphere quantitative Computertomographie (pQCT) .....</b>	<b>45</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Histologische Auswertung .....</b>	<b>46</b>
<b>3.4</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>48</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
<b>4.1</b>	<b>Klinischer Verlauf.....</b>	<b>49</b>
<b>4.2</b>	<b>Makroskopische und histologische Untersuchung der Lymphknoten und Organproben</b>	<b>49</b>
<b>4.3</b>	<b>Auswertung der makroskopischen, histologischen, biomechanischen und pQCT-Analysen .....</b>	<b>49</b>

<b>4.3.1</b>	<b>CaP-Referenz-Z.....</b>	<b>50</b>
<b>4.3.2</b>	<b>CaP-Gelatine-Z.....</b>	<b>57</b>
<b>4.3.3</b>	<b>CaP-Gelatine-Soja-Z .....</b>	<b>65</b>
<b>4.3.4</b>	<b>CaP-Alginat-Z .....</b>	<b>72</b>
<b>4.3.5</b>	<b>Vergleich der Kompositmaterialien mit dem Referenz-Zement .....</b>	<b>80</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>85</b>
<b>5.1</b>	<b>Modell.....</b>	<b>85</b>
<b>5.2</b>	<b>Referenzmaterial aus Hydroxylapatit</b>	
	<b>(CaP-Referenz-Z) .....</b>	<b>86</b>
<b>5.3</b>	<b>Komposit aus kalziumdefizientem Hydroxylapatit und Gelatine</b>	
	<b>(CaP-Gelatine-Z).....</b>	<b>88</b>
<b>5.4</b>	<b>Komposit aus kalziumdefizientem Hydroxylapatit, Gelatine und Sojaextrakt</b>	
	<b>(CaP-Gelatine-Soja-Z) .....</b>	<b>92</b>
<b>5.5</b>	<b>Komposit aus kalziumdefizientem Hydroxylapatit und Alginat</b>	
	<b>(CaP-Alginat-Z).....</b>	<b>96</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>101</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>103</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>105</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>116</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>123</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>124</b>

# 1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BMP	Bone Morphogenetic Protein
Ca	Kalzium
Cl	Chlor
CaP	Kalziumphosphat
CDHA	kalziumdefizitäres Hydroxylapatit
EU	Europäische Union
Fa.	Firma
H	Wasserstoff
HA	Hydroxylapatit
KG	Körbergewicht
Lig.	Ligamentum
Lnn.	Lymphonodi
M	molar
M.	Musculus
Na	Natrium
NZW	New Zealand White Rabbit (Kaninchenrasse)
O	Sauerstoff
P	Phosphor
PMMA	Polymethylmethacrylat
pQCT	periphere quantitative Computertomographie
ROI	region of interest
Tab.	Tabelle
TCP	TriKalziumphosphat
Tr.	Tropfen
Vol.	Volumen

## 2 Einleitung

### 2.1 Einsatz von Knochenersatzmaterialien

Knochenersatzmaterialien finden ihren Einsatz bei der chirurgischen Versorgung von Knochendefekten. Solche Knochendefekte können traumatisch, tumor- oder infektionsbedingt sein. Sie können ihre Ursache in juvenilen Knochenzysten haben oder durch notwendige chirurgische Eingriffe entstehen, wie es bei rekonstruktivem Vorgehen, zum Beispiel beim Gelenkersatz oder der Fusion von Gelenken der Fall ist (Van Heest and Swionkowski 1999; Ditzen and Börner 2001). Eine ebenfalls weit verbreitete Ursache für Knochenverluste, vor allem bei älteren Menschen, stellt die Osteoporose dar. Hierbei nimmt die Knochenmasse auf Grund einer Knochendichteverringerung ab. Dies führt zu einer verringerten Festigkeit des Knochens, was häufig zu Spontanfrakturen an Hüfte, Wirbelkörper, Humerus und Radius führt (Gallagher 1990; Cohen 2006). Die spontane Knochenheilung ist alleine oft nicht in der Lage größere Defekte zu überbrücken. In diesen Fällen ist eine chirurgische Osteoplastik notwendig, um die Funktionalität des betroffenen Knochens wieder herzustellen (Mittelmeier et al. 1998).

Erste Versuche, Knochendefekte mit Ersatzmaterial zu reparieren, gab es vor mehr als 4000 Jahren (Frauendorf und Sünnig 2007). Dies belegen Schädelreste aus den peruanischen Anden, bei denen ein frontaler Defekt mit einer 1 mm starken Goldplatte bedeckt worden war. Im Laufe der Jahrtausende wurden sehr unterschiedliche Materialien als Knochenersatz verwendet. Dabei gab es auch Versuche, menschliche Knochendefekte mit Kokosnusschalen oder Hundeknochen zu füllen.

Heutzutage versucht man solche Knochenverluste chirurgisch mit Hilfe von autogenem, allogenem oder xenogenem Knochen zu behandeln (Schieker et al. 2008). Alternativ werden Knochenersatzstoffe benutzt, die zum größten Teil synthetisch hergestellt werden. Sie können alleine oder in Kombination mit Knochen eingesetzt werden. Für die verschiedensten Lokalisationen und Defekte sind sowohl präformierte harte Ersatzmaterialien als auch solche, die *intraoperativ* an die betroffene Stelle injiziert werden und *intrakorporal* aushärten (Zemente) auf dem Markt (Frauendorf und Sünnig 2007). Injizierbare Zemente haben den Vorteil, eine minimalinvasive chirurgische Vorgehensweise zu ermöglichen. Ein Nachteil der

bisher existierenden Zemente ist ihre mangelnde Porosität. Eine Osseointegration (siehe unter 1.3.1. Anforderungen) ist ohne Poren nur im Randbereich des Implantats möglich.

## **2.2 Grundlagen**

Um die Anforderungen, die an ein Knochenersatzmaterial gestellt werden, besser erläutern zu können, wird an dieser Stelle vorab kurz auf den Aufbau und die Physiologie des Knochens eingegangen.

### **2.2.1 Entstehung und Aufbau von Knochen**

Wie alle Stützgewebe geht auch das Knochen- und Knorpelgewebe aus dem mittleren Keimblatt, dem Mesoderm, hervor (König und Liebich 1999). Schon im Embryonalstadium differenzieren sich die Zellen im lockeren, faserarmen Bindegewebe im Bereich der Stamm- und der Gliedmaßenanlagen zu knorpelbildenden Chondroblasten und knochenbildenden Osteoblasten. Diese Zellen entwickeln sich daraufhin zu reifen Osteozyten oder Chondrozyten, die kollagene Bindegewebsfasern und ungeformte Interzellulärsubstanz bilden - die Grundbausteine des reifen skelettalen Knochens.

Grundsätzlich werden zwei Arten der Knochenentstehung unterschieden: Während bei der überwiegenden Zahl der Knochen eine knorpelige Grundlage als Platzhalter dient, die später in Kochengewebe umgebaut wird (enchondrale Ossifikation), entstehen die Knochen des Schädeldachs und die meisten Gesichtsknochen direkt aus embryonalem Bindegewebe (desmale Ossifikation) (König und Liebich 1999; Cohen 2006). Bei der Entstehung der langen Knochen und des menschlichen Schlüsselbeins ist eine Mischung dieser beiden Ossifikationsarten zu finden (Cohen 2006).

Als erster Knochen wird in jedem Fall der so genannte Geflechtknochen gebildet, der als der entwicklungsgeschichtlich einfachere angesehen wird (König und Liebich 1999). Dieser vergleichsweise ungeordnete Knochen wird nach der Geburt in den meisten Teilen des Körpers durch höher differenzierten Lamellenknochen ersetzt.

Eine Ausnahme bilden die knöchernen Teile des Ohres und die Ansatzstellen größerer Sehnen.

Der Lamellenknochen ist gekennzeichnet durch Kollagenbündel, die streng parallel angeordnete und konzentrisch gelagerte Lamellen bilden (König und Liebich 1999). Er setzt sich zu circa zwei Dritteln aus anorganischen und zu etwa einem Drittel aus organischen Bestandteilen zusammen (Hill 1998). Die organischen Bestandteile bestehen vor allem aus Kollagen Typ I (95 %) und zu circa 5 % aus nichtkollagenen Proteinen. Die anorganische Phase besteht überwiegend aus Hydroxylapatit und dient als Speicher von Carbonat, Magnesium, Natrium, Kalium, Chlor und Fluor (Wintermantel 2002).

Vor allem im Schaftbereich besitzt der Lamellenknochen einen sehr dichten Bezirk, der Kompakta genannt wird (Hench und Wilson 1993). Charakteristisch für die Kompakta sind Lamellen, die als so genannte Osteone angeordnet sind. Ein Osteon besteht aus einem blutgefäßführenden Zentralkanal (Havers-Kanal) und diesen konzentrisch umgebenden Lamellen. Eine Querverbindung der Havers-Kanäle erfolgt durch die ebenfalls blutführenden Volkmann-Kanäle. Beim Menschen hat ein Osteon einen Durchmesser von 190-230 µm. An den Knochenenden ist die Knochensubstanz weniger kompakt. Sie ist mit vielen Hohlräumen versehen, eher unregelmäßig schwammartig angeordnet und wird Spongiosa genannt. Diese Hohlräume haben einen Durchmesser von 500-600 µm.

Bei den Säugetieren ist der Knochenaufbau stark speziesabhängig (Ruth 1953). Die Anordnung der Kollagenfasern zu Lamellen ist bei phylogenetisch niederen Tieren, wie z.B. Maus und Ratte, zwar gegeben, die Ausbildung von Osteonen kann allerdings nur unter besonderen Bedingungen induziert werden. Phylogenetisch höher entwickelte Säugetiere hingegen besitzen in der Regel ein System aus einfach angeordneten so genannten primären Osteonen (Wang et al. 1998). Diese werden bei der Knochenentwicklung angelegt und bestehen zeitlebens. Beim Mensch werden diese sehr früh durch eine weitere Osteonengeneration ersetzt. Hierbei entsteht die so genannte sekundäre Osteonenstruktur, bei der zwischen den neuen Osteonen Bruchstücke der primären Osteone als so genannte Schaltlamellen erhalten bleiben. Die sekundäre Osteonenstruktur kann nur bei wenigen Säugetieren gefunden werden (Pearce et al. 2007). Unter den Versuchstierspezies besitzt der Hund einen Knochenaufbau, der dem des Menschen am ähnlichsten ist. Bisher ging

man davon aus, dass Kaninchen vor allem eine primäre Osteonenstruktur aufweisen (Wang et al. 1998; Martini et al. 2001). Hilier und Bell konnten allerdings 2007 zeigen, dass Kaninchen mit zunehmendem Alter ebenfalls sekundäre Osteone ausbilden (Hillier und Bell 2007).

## 2.2.2 Remodeling von Knochen

Im gesunden Knochen besteht ein Gleichgewicht zwischen Knochenauf- und Knochenabbau (Geneser 1990). Die Knochenumsatzrate ist stark altersabhängig und nimmt im Laufe des Lebens von 200 % jährlich beim Kleinkind auf etwa 1 % im Alter ab. Dieser physiologische Vorgang des ständigen Knochenumbaus wird Remodeling genannt. Damit das Remodeling ungestört stattfinden kann, bedarf es der Regulation und koordinierten Aktivität von knochenresorbierenden Osteoklasten und matrixbildenden Osteoblasten (Athanasou et al. 2000). Osteoklasten entwickeln sich aus hämatopoetischen, die Osteoblasten aus mesenchymalen Stammzellen (Hofbauer et al. 2004; Kobayashi und Kronenberg 2005). Für ihre Differenzierung sind verschiedene Zytokine, Hormone und Transkriptionsfaktoren notwendig. Beim Remodeling spielen mehrere Mechanismen eine Rolle, die bis heute allerdings noch nicht vollständig entschlüsselt werden konnten (Hill 1998). Hierzu gehört zum Beispiel die Produktion von Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) durch Osteoblasten, deren Aktivität für die Erhaltung des Gleichgewichts zwischen Knochenauf- und -abbau wichtig ist (Chen et al. 2004).

Im Zuge des Knochenremodeling hat der Knochen die Möglichkeit sich durch eine veränderte Binnenstruktur neuen mechanischen Gegebenheiten funktionell anzupassen (König und Liebich 1999). Hierbei folgt der Knochen dem von Julius Wolff 1892 formulierten „Gesetz der Transformation von Knochen“ (Chamay und Tschantz 1972).

## 2.2.3 Defektheilung und Regeneration von Knochen

Das Knochengewebe ist das einzige Gewebe im Körper, das Substanzverluste ohne Narbenbildung ausgleichen und seine ursprüngliche Funktion wieder vollständig aufnehmen kann (McKibbin 1978). Die Defektheilung und Regeneration des

geschädigten Knochens setzt sich aus einer Abfolge verschiedener Prozesse zusammen (Caplan 1987; Athanasiou et al. 2000). Prinzipiell kann man zwei Arten der Defektheilung unterscheiden (Caplan 1987; Thompson et al. 2002). Mechanisch instabile Knochendefekte heilen über eine knorpelige Zwischenstufe (enchondrale Ossifikation). Mechanisch stabile Defekte können zudem auch über desmale Ossifikation ohne knorpelige Zwischenstufe heilen (Probst und Spiegel 1997). Dabei spielt nicht nur die Stabilität des Defekts sondern auch die Durchblutung und damit die Sauerstoffversorgung im Defektbereich eine entscheidende Rolle (Claes et al. 2006). Ist diese nicht ausreichend gewährleistet, so heilen auch mechanisch stabile Defekte nur über enchondrale Ossifikation. Kommt es zu Heilungsstörungen durch mangelnde Stabilität und/oder unzureichende Blutversorgung, so können auch Pseudarthrosen entstehen.

Ein Knochendefekt wird unmittelbar nach seiner Entstehung mit einem aus Blut und Gewebeflüssigkeit bestehenden Hämatom aufgefüllt (Athanasiou et al. 2000; Claes et al. 2006). Eine Abfolge biochemischer und zellulärer Ereignisse leitet einen entzündlichen Prozess ein, der sowohl den Abbau avitalen Gewebes wie auch die Proliferation von Granulationsgewebe ermöglicht. Der Abbau des avitalen Gewebes erfolgt durch neutrophile Granulozyten, Makrophagen und neu gebildete Osteoklasten.

Bei der enchondralen Ossifikation wird das aus dem Hämatom entstandene Granulationsgewebe durch Fibroblasten und Chondroblasten zu straffem Bindegewebe und Knorpel umgebaut (Geneser 1990). Es entsteht schließlich ein weitgehend avaskulärer knorpeliger Kallus (Vu et al. 1998). Erst wenn der Kallus stabil genug ist, dass durch mechanische Belastung neu gebildete Gefäße nicht gleich reißen, wird er vaskularisiert (Probst und Spiegel 1997). Der nächste Schritt, der nur bei ausreichender Vaskularisation und Sauerstoffversorgung des Defektgebietes stattfindet, ist die Überbrückung des Defekts mit neuem Knochen (Claes et al. 2006). Es entsteht zunächst ein primitiver Geflechtknochen mit ungeordneten Kollagenfasern (Probst und Spiegel 1997). Der Geflechtknochen wird im finalen Schritt zu neuem, voll funktionsfähigen lamellären Knochen umgebaut (Athanasiou et al. 2000).

Ist der Defekt mechanisch stabil und ausreichend vaskularisiert, so kann aus dem Granulationsgewebe straffes Bindegewebe und direkt im Anschluss neuer Knochen

gebildet werden (Claes et al. 2006). Die knorpelige Zwischenstufe bleibt bei dieser Art der Defektheilung aus (*desmale Ossifikation*). Allerdings ist ein mechanisch stabiler gut vaskularisierter Defekt kein Garant für eine kallus- und knorpelfreie Heilung (Probst und Spiegel 1997). Chemische oder bakterielle Reize können zu Entzündungsreaktionen führen, die eine Kallusreaktion und Knorpelbildung hervorrufen können.

Überschreitet ein Defekt eine gewisse Größe, spricht man von einem Defekt kritischer Größe (Schmitz und Hollinger 1986; Hollinger und Kleinschmidt 1990). Ein Defekt kritischer Größe wird von Schmitz und Hollinger als ein Defekt definiert, der nicht in der Lage ist, während der Lebensspanne eines Individuums von alleine zu heilen. Die Größe eines Defekts kritischer Größe ist abhängig von der Spezies und von der Lokalisation des Defekts. Im Tierversuch ist die Lebensspanne des Tieres auf den Versuchszeitraum begrenzt. In diesem Fall wird von einem Defekt kritischer Größe gesprochen, wenn der experimentell erzeugte Defekt während des vorgegebenen Versuchszeitraums nicht spontan zur Heilung kommt.

## 2.3 Ersatzmaterialien

### 2.3.1 Anforderungen

Knochenersatzmaterialien müssen eine Reihe von Eigenschaften erfüllen, um eine gute Defektheilung zu ermöglichen. Die wichtigsten in der Literatur genannten Anforderungen werden im Folgenden dargestellt.

#### Biokompatibilität

Eine sehr bedeutende Anforderung an ein Knochenersatzmaterial ist die Biokompatibilität (Chapekar 2000; Claes et al. 1997; Ditzen und Börner 2001; Epple und Bäuerlein 2007). Weder das Ersatzmaterial noch seine Abbauprodukte sollten toxisch, kanzerogen oder teratogen sein. Es sollten von ihm weder in der direkten Implantatumgebung, noch systemisch im gesamten Körper eine entzündliche Reaktionen ausgelöst werden. Eine starke entzündliche Reaktion stellt eine Abwehrreaktion des Körpers dar (Chapekar 2000; Ditzen und Börner 2001). Das Implantat wird in der Folge bindegewebig ein- und somit vom restlichen Körper

abgekapselt. Eine Bindegewebskapsel um das implantierte Material kann dessen Abbau und die Bildung von neuem Knochen im Defekt verhindern. Die Kapsel aus Bindegewebe stellt eine Barriere für die Bildung von Gefäßen und somit den Sauerstoff- und Nährstofftransport dar. Durch die gebildete Bindegewebsschicht wird eine Osseointegration (siehe auf Seite 13) des Implantats verhindert (Zarb und Albrektsson 1991).

### Immunogenität

Weder das implantierte Material noch seine Abbauprodukte sollten eine ausgeprägte Immunantwort des Körpers hervorrufen (Claes et al. 1997). Dies könnte zu Abstoßungsreaktionen führen, wodurch die Regeneration des Knochens verzögert oder gar verhindert wird.

### Strukturelle Beschaffenheit

Betrachtet man die Beschaffenheit eines Knochenersatzstoffs, so ist für die Einheilung des Implantats die Oberflächenstruktur maßgebend (Masuda et al. 1998). Die Art und Weise, wie Osteoblasten mit dem Material interagieren, beeinflusst deren Fähigkeit eine osteoide Matrix um das Implantat zu bilden, was wiederum das „Schicksal“ des Implantats entscheidend beeinflusst (Puleo und Bizios 1992). Wichtig ist hierbei, dass die Materialoberfläche dem physiologischen Knochen ähnelt, da dies ein entscheidendes Merkmal für die Osteoinduktion und Osteokonduktion (siehe auf Seite 12) darstellt (Paul und Sharma 2007).

Knochengewebe ist in der Lage, Defekte durch „*restitutio ad integrum*“, also ohne Narbenbildung, vollständig auszuheilen (Uhr 2007). Um dies auch bei Defekten zu gewährleisten, die mit einem Implantat versorgt wurden, fordert Uhr, nur solche Matrices zur verwenden, die in ihrer substanziellen Zusammensetzung dem Knochen ähneln.

## Osteokonduktion

Unter Osteokonduktion versteht man die Fähigkeit, Knochenwachstum entlang der Oberfläche zu unterstützen (Frauendorf und Sünnig 2007). Das implantierte Material stellt hierbei eine Leitschiene für die knochenbildenden Zellen dar. Dabei ist sowohl die Materialbeschaffenheit wie auch die Anordnung, Verteilung und Größe von Furchen, Poren und Kanälen von Bedeutung (Chapekar 2000; Hardouin et al. 2000; Roach et al. 2007). Über deren optimale Größe gibt es in der Literatur verschiedene Angaben, welche von 100-500 µm reichen (Boyan et al. 1999; Crane et al. 1995; Holmes 1979; Klawitter und Hulbert 1971; Langer und Vacanti 1993; Tsuruga et al. 1997). Eine Osteokonduktion in das Implantat wird erleichtert, wenn das Material ein Einsprossen von Blutgefäßen ermöglicht, was durch interkonnektierte Poren wesentlich verbessert wird (Lu et al. 1999; Otsuki et al. 2006). Diese interkonnektierenden Verbindungsstücke sollten einen Durchmesser von mehr als 50 µm aufweisen. Um hierbei eine stabile Blutgefäßbeinsprössung zu gewährleisten, sollten die Poren selbst mindestens 100 µm groß und das Implantat stabil im Implantatlager verankert sein (Hench und Wilson 1993). Ist das Implantat nicht fest verankert, entstehen Bewegungen durch die neu gebildete Blutgefäße an den Scherkanten sofort wieder zerreißen können.

## Osteoinduktion

Die Osteoinduktion bezeichnet einen Prozess, bei dem die Osteogenese induziert und die Differenzierung mesenchymaler Zellen zu Osteoblasten unterstützt wird (Masuda et al. 1998; Frauendorf und Sünnig 2007). Durch die osteoinduktiven Eigenschaften des Implantats wird die Knochenbildung und Knochenheilung angeregt (Crane et al. 1995; Ditzen und Börner 2001). Osteoinduktive Eigenschaften eines Knochenersatzmaterials kann man zum Beispiel durch Zugabe so genannter Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) erreichen. BMPs sind Wachstumsfaktoren, die auch physiologisch *in vivo* die Knochenneubildung stimulieren. Durch den Einsatz von osteoinduktiven Implantaten kann der Ersatz des resorbierten Materials durch neu gebildeten Knochen schneller vorstatten gehen (Hardouin et al. 2000). Ein Material ist nachweislich osteoinduktiv, wenn es Knochenbildung in heterotropem Gewebe induziert (Albrektsson und Johansson 2001).

## Osseointegration

Die Osseointegration, so Zarb und Albrektson, beschreibt einen Vorgang, bei dem eine klinisch asymptomatisch stabile Befestigung des Fremdmaterials im Knochen erreicht und während funktionaler Belastung beibehalten wird (Zarb und Albrektsson 1991). Das Ergebnis einer guten Osseointegration ist folglich ein enger und stabiler Material-Knochen-Verbund.

## Osteogenität

Ein osteogener Knochenersatzstoff ist aus „eigener Kraft“ in der Lage, neuen Knochen zu bilden (Greenwald et al. 2001). Er besitzt hierfür selbst schon alle notwendigen Komponenten, wie z.B. Osteoblasten und BMPs. Zusätzlich weist ein osteogener Knochenersatzstoff die strukturelle Beschaffenheit auf, die notwendig ist, um eine zur Knochenbildung ausreichende Nährstoff- und Sauerstoffzufuhr aus dem Implantatlager zu gewährleisten.

## Biodegradation/Resorption

Es ist von großem Vorteil, wenn ein Knochenersatzstoff mit der Zeit abgebaut und durch körpereigene Knochensubstanz ersetzt wird. Man kann grundsätzlich zwei Arten des Implantatabbaus unterscheiden. Bei der ersten Variante wird das implantierte Material durch Gewebeflüssigkeit aufgelöst und die gelösten Abbauprodukte zusammen mit Stoffwechselprodukten abtransportiert und verstoffwechselt oder unverändert ausgeschieden. Der zelluläre Abbau über Phagozytose stellt die zweite Variante des Materialabbaus dar. Des Weiteren sind auch Mischformen beider zu finden (Hench and Wilson 1993).

Wichtig ist, dass die Degradation mit der Regenerationsrate des Empfängergewebes übereinstimmt. Ein zu schneller Abbau hinterlässt unter Umständen abermals einen Defekt, welchen der Körper nicht von alleine überbrücken kann (Epple und Bäuerlein 2007; Hench und Wilson 1993). Ein zu langsamer Abbau behindert hingegen die Regeneration des Knochens (Hardouin et al. 2000).

## Mechanische Belastbarkeit

Für den Einsatz in mechanisch belasteten Defekten sollte das Knochenersatzmaterial eine ausreichende, der Empfängerlokalisation angepasste mechanische Stabilität aufweisen (Chapekar 2000; Frauendorf und Sünnig 2007). Bei unzureichender Belastbarkeit des Materials ist eine zusätzliche Defektstabilisierung notwendig, ohne die es zu Folgeschäden durch Material- und Knochenbrüche kommen kann (Epple und Bäuerlein 2007). Eine zu starke mechanische Belastbarkeit des Implantats führt allerdings zum Phänomen des Stress-Shielding mit Knochenabbau des implantatnahen Knochens.

Dauerimplantate müssen die geforderte mechanische Stabilität zeitlebens aufweisen. Resorbierbare Implantate hingegen müssen der Belastung nur so lange standhalten, bis sie durch ausreichend stabilen Knochen ersetzt sind (Ditzen und Börner 2001).

## Anwendungseigenschaften

Wichtige Anforderungen für den klinischen Einsatz sind die Sterilisierbarkeit des Materials (Claes et al. 1997; Epple und Bäuerlein 2007), lange Lagerungsfähigkeit ohne Funktionsverlust und sowohl Patienten- wie auch Defektunabhängigkeit (Chapekar 2000). Für den Chirurgen ist eine einfache Handhabung und gute Verarbeitungseigenschaften des Materials besonders vorteilhaft (Frauendorf und Sünnig 2007). Die Injizierbarkeit des Knochenersatzstoffes ermöglicht ein minimalinvasives chirurgisches Vorgehen, das schonender für den Patienten ist. Durch die Injizierbarkeit kann das Implantat dem Defekt leicht angepasst werden. Das Material verteilt sich selbstständig gleichmäßig im Defekt und führt somit auch in der Tiefe des Defekts zu einem guten Knochenkontakt. Durch die gute Passform des injizierten Materials wird die Gefahr der Bildung einer bindegewebigen Zwischenschicht minimiert. Um allerdings eine Denaturierung im randständigen Wirtslager zu verhindern, sollte ein isotherm aushärtender Knochenersatzstoff verwendet werden (Ditzen und Börner 2001).

In Deutschland waren im Mai 2007 43 verschiedene Knochenersatzmaterialien auf dem Markt, von denen keines die gewünschten Anforderungen zu 100 % erfüllte (Frauendorf und Sünnig 2007).

### **2.3.2 Reaktion des Knochens auf ein Implantat**

Nach der Implantation von Ersatzmaterialien in den Knochen wird eine immer ähnlich ablaufende Kaskade von Reaktionen auf molekularer und zellulärer Ebene in Gang gesetzt (Roach et al. 2007). In den ersten Nanosekunden nach der Implantation lagert sich Gewebeflüssigkeit an und bildet eine Hülle um das Material. Dann folgt innerhalb der ersten Sekunden bis hin zu einigen Stunden nach der Implantation die Adhäsion von Proteinen an die Materialoberfläche. Wenige Minuten bis mehrere Tage nach Beginn der Proteinanlagerung erreichen Zellen die Proteinhülle. Die Zellen stammen aus der näheren Umgebung oder werden über das Blut herbeitemporiert (Hench und Wilson 1993). Es handelt sich zunächst um unspezifische Abwehr- und Entzündungszellen wie Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und später auch Fremdkörperriesenzellen, die mit der Materialoberfläche interagieren. Eine leichte entzündliche Reaktion des Gewebes in dieser Phase ist als „physiologisch“ einzustufen und hat ihre Ursache in der Reizung des Gewebes durch die Operation und das Einbringen des Implantats. Erst eine über diese Phase hinausgehend länger anhaltende Entzündung ist auf die Materialeigenschaften des Implantats zurückzuführen.

In der folgenden Phase, die wenige Stunden bis Tage nach der Implantation durchlaufen wird, migrieren undifferenzierte oder teildifferenzierte mesenchymale Zellen zum Implantationsort (Roach et al. 2007). Diese differenzieren weiter zu Osteoblasten und adhärieren an das Implantat. Ist das Material porös, so können sowohl die mesenchymalen Vorläuferzellen wie auch die Osteoblasten selbst in das Implantat einwandern. Mit der Bildung von Osteoid durch die Osteoblasten und dessen Reifung zu mineralisiertem Knochen wird die Einheilung des Implantats abgeschlossen. Im besten Fall endet dieser Prozess bei nicht resorbierbaren Implantaten in einem stabilen Implantat-Knochen-Verbund und bei resorbierbaren Implantaten in der vollständigen Resorption des Materials und Ersatz durch neuen Knochen. Verläuft die Heilung des implantattragenden Knochendefekts allerdings nicht optimal, so bildet sich eine wenig stabile Bindegewebeskapsel um das Implantat. Diese macht den Implantat-Knochen-Verbund instabil und verhindert ein Einwachsen von Knochen in das Material.

### 2.3.3 Einteilung der Knochenersatzmaterialien

Knochenersatzmaterialien werden entweder auf Grund ihrer Interaktion mit dem Wirtsgewebe oder auf Grund ihrer Zusammensetzung eingeteilt.

Einteilung auf Grund ihrer Interaktion mit dem Wirtsgewebe

#### Biotolerante Implantate

Biotolerante Implantate werden zwar vom Empfängergewebe nicht abgestoßen, es bildet sich aber eine mehr oder weniger dicke Bindegewebsmembran zwischen dem implantierten Material und dem Empfängergewebe (Willmann 1999). Das Empfängergewebe hat somit keinen direkten Kontakt zum Implantat. Dies macht die Verbindung instabil und kann den Ab- bzw. Umbau des implantierten Materials verhindern (Hench und Wilson 1984). Diese Art der Einheilung entspricht der so genannten Distanzosteogenese (Osborn 1987). Die Stärke der Bindegewebsschicht ist neben der Art des Materials und dessen Oberfläche auch abhängig von der Bewegung und der Passform im Implantatlager (Hench und Wilson 1993). Ein Beispiel für biotolerante Implantate sind Knochenersatzmaterialien aus Polymethylmetacrylat (PMMA) (Willmann 1999). Zur Osteosynthese verwendete Platten und Schrauben aus Edelstahl werden ebenfalls zu den biotoleranten Implantaten gezählt.

#### Bioinerte Implantate

Diese Implantate sind biokompatibel, aber nicht abbaubar (Willmann 1999). Sie haben in der Regel eine enge Verbindung zum Empfängergewebe ohne bindegewebige Zwischenschicht. Bioinerte Implantate besitzen zumeist gute mechanische Eigenschaften und sind nicht toxisch. Der Knochen geht mit bioinerten Implantaten eine formschlüssige Verbindung ein. Diese Art der Einheilung entspricht der so genannten Kontaktosteogenese. Bioinerte Implantate sind biologisch nicht aktiv und besitzen somit keine osteoinduktiven Eigenschaften. Es ist lediglich eine Übertragung von Druckbelastung vom Knochen auf das Implantat möglich. Beispiele für bioinerte Materialien sind Legierungen aus Titan, Aluminium, Kobalt oder Chrom, so wie einige Keramiken, Biogläser oder Implantate aus Polyethylen.

## Bioaktive Implantate

Bioaktive Implantate lösen im Organismus eine biologische Reaktion aus (Willmann 1999). Es entsteht eine chemische Verbindung zwischen Implantat und Knochen, die sehr eng und stabil ist. Diese Gruppe von Implantaten ist biokompatibel und zudem biologisch aktiv. Ihre biologische Aktivität kann osteokonduktiv und/oder osteoinduktiv sein. Manche bioaktiven Implantate besitzen auch osteostimulative Effekte auf den umliegenden Knochen. Bioaktive Knochenimplantate sind meistens resorbierbar und besitzen sehr unterschiedliche mechanische Eigenschaften. Sie lösen eine biologische/chemische Reaktion aus, die zu einem Stoffverbund mit dem knöchernen Implantatlager führt. Diese Art der Einheilung entspricht der so genannten Verbundosteogenese. Nach Einheilung von bioaktiven Materialien ist sowohl eine Druck- wie auch Zugübertragung vom Knochen auf das Material möglich. Zu den bioaktiven Implantaten gehören Materialien wie Hydroxylapatit, TriKalziumphosphat und einige Biogläser.

## Einteilung auf Grund ihrer Zusammensetzung

Man unterscheidet bei dieser Form der Einteilung vier Klassen (Rueger 1998). Es werden organische Materialien biologischen Ursprungs, synthetisch hergestellte anorganische und synthetisch hergestellte organische Materialien sowie Mischformen unterschieden. Die Mischformen werden Komposite genannt. Zu den organischen Materialien biologischen Ursprungs werden sowohl mineralisierte und demineralisierte Knochenmatrices, wie auch extrahierte Knochenwachstumsfaktoren wie BMPs gezählt. Kalziumphosphatkeramiken unterschiedlicher Stöchiometrie sind die Hauptvertreter der synthetisch anorganischen Materialklasse. In der Klasse der synthetisch organischen Verbindungen werden organische Polymere und deren Kombinationen zusammengefasst.

### **2.3.4 Existierende Knochenersatzmaterialien**

Im Folgenden werden nun die bisher existierenden Knochenersatzmaterialien mit einigen Beispielen unter Berücksichtigung ihrer Ausgangsverbindungen und Eigenschaften aufgeführt.

## **Knochen**

### **Autogener Knochen**

Autogener Knochen, also Knochen vom selben Individuum, stellt heutzutage nach wie vor den „goldenen Standard“ dar (Ditzen und Börner 2001; Frauendorf und Sünnig 2007; Rueger 1998; Van Heest und Swiontkowski 1999). Häufige Entnahmestellen sind das Becken, die Tibia, die Ulna, Fibula, Rippen und für *intraorale* Anwendungen auch die Unterkiefersymphyse (Damien und Parsons 1991; Frauendorf und Sünnig 2007). Autogener Knochen kann bei kleineren Defekten alleine, bei größeren auch in Kombination mit anderen Knochenersatzmaterialien eingesetzt werden (Frauendorf und Sünnig 2007). Er besitzt osteokonduktive, osteoinduktive, osteostimulative und, da er schon alle zur Knochenbildung notwendigen Bestandteile, wie z.B. Osteoblasten und BMPs, enthält, auch osteogene Effekte. Durch die osteogenen Eigenschaften des autogenen Knochens ist das Transplantat direkt an der Bildung und Entwicklung von neuem Knochen beteiligt. Weitere Vorteile sind das in der Regel gute Einwachsverhalten, der rasche mikrovaskuläre Gefäßanschluss und die gute Verträglichkeit auf Grund der fehlenden immunogenen Abwehrreaktionen (Ditzen und Börner 2001; Greenwald et al. 2001). Mit dem autogenen Knochen werden körpereigene Strukturen mit entsprechender Festigkeit übertragen und gleichzeitig das Risiko des Übertragens einer Krankheit verhindert. Autogener Knochen besitzt somit als Knochenersatzmaterial die höchste biologische Wertigkeit (Wippermann et al. 1997).

Trotz der vielen Vorteile bringt die autogene Knochentransplantation auch einige Nachteile mit sich (Rueger 1998; Wippermann et al. 1997). An erster Stelle stehen Zweiteingriffe und die durch die Entnahmememaßnahmen einhergehende längere Operationszeit mit all ihren entsprechenden Risiken. An der Spenderstelle können Infektionen entstehen und Schmerzen zurückbleiben. Auch Sensibilitätsstörungen, Herniationen oder sogar Frakturen sind keine Seltenheit an der Entnahmestelle. Hierdurch sind häufig lange und kostenintensive Krankenhausaufenthalte notwendig. Ein weiterer Nachteil ist die mengenmäßig begrenzte Verfügbarkeit (Crane et al. 1995; Mittelmeier et al. 1998). Die Resorption des eingebrachten autogenen Knochens geht manchmal schneller vonstatten als die Bildung neuen Knochens, was

wiederum einen Defekt nach sich ziehen kann (Burchardt et al. 1975; Epple und Bäuerlein 2007).

### **Allogener Knochen**

Allogener Knochen wird nicht vom gleichen Individuum, aber von der gleichen Spezies gewonnen (Frauendorf und Sümnig 2007). Die Hauptnachteile des allogen Knochens sind die Gefahr der Krankheitsübertragung und die mehr oder weniger starke Immunreaktion, die er auslöst (Frauendorf and Sümnig 2007; Mittelmeier et al. 1998). Hinzu kommt die im Vergleich zum autogenen Knochen geringere Revaskularisationsrate (Damien und Parsons 1991). Die vorhandene Antigenität wird durch Gefriertrocknung reduziert (Frauendorf und Sümnig 2007). Zur Keimabtötung und Lagerung des allogen Knochens ist zusätzlich ein Sterilisieren und Einfrieren notwendig. Durch diese Verfahren werden die osteogenen Eigenschaften reduziert (Bohr et al. 1968; Greenwald et al. 2001). Die osteokonduktiven und osteoinduktiven Eigenschaften bleiben bei dieser Vorbehandlung jedoch erhalten (Frauendorf und Sümnig 2007). Als weiterer Nachteil kommt die kostenintensive Archivierung, Lagerung und Verwaltung der Implantate in Knochenbanken hinzu. Die Vorteile verglichen mit autogenem Knochen sind die Verkürzung der Operationszeit und die Vermeidung einer Entnahmoperation (Frauendorf und Sümnig 2007; Greenwald et al. 2001). Hinzu kommt, dass allogener Knochen in nahezu jeder beliebigen Form, Größe und Menge lieferbar ist .

### **Xenogener Knochen**

Xenogener Knochen stammt von einer anderen Spezies (Ditzen und Börner 2001). Beispielsweise kommt bovine Spongiosa als xenogenes Knochenimplantat zum Einsatz. Seine Vorteile liegen in der großen verfügbaren Menge und in der geringen Gefahr der Krankheitsübertragung (Ausnahme: Prionen) (Frauendorf und Sümnig 2007). Die Nachteile sind eine geringe osteogene Wirkung und stärkere Immun- und Entzündungsreaktionen (Heiple et al. 1967; Mittelmeier, Mittelmeier et al. 1998).

### **Keramiken**

Die auf dem Markt befindlichen anorganischen Keramiken bestehen vor allem aus den Grundsubstanzen Hydroxylapatit und Trikalziumphosphat (Schnürer et al. 2003).

Sie können entweder einzeln oder gemischt als biphasische Keramik vorkommen. Die eingesetzten Keramiken werden entweder aus biologischen oder synthetischen Ausgangsmaterialien gewonnen und unter hohem Druck bei Temperaturen von 1000-1500°C gesintert. Ein Nachteil aller Keramiken ist die langsame Resorptionszeit, weshalb sie als Langzeitimplantate angesehen werden können (Epple und Bäuerlein 2007). Des Weiteren sind Keramiken sehr spröde, weshalb sie mangelnde biomechanische Eigenschaften besitzen. Die biomechanischen Eigenschaften des Implantats sind zusätzlich abhängig von der jeweiligen Anzahl und Größe der Poren (LeHuec et al. 1995).

Die meisten Keramiken liegen in Form von festen, nicht formbaren Körpern als Blöcke, Zylinder, Granulat oder Pulver vor (Schnürer et al. 2003). Sie können sowohl kompakt wie auch porös sein. Da sie *intraoperativ* dem Defekt schwer anpassbar sind, ist dessen vollständige Auffüllung nicht immer gewährleistet. Benutzt man Granulat oder pulverförmige Keramiken, so besteht die Gefahr, dass sie vom Ort der Implantation abdriften.

Hydroxylapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ );

Hydroxylapatite haben ein Ca:P-Verhältnis von 1,67:1. Dies entspricht in etwa dem Verhältnis, das bei allen Säugetieren im Knochen anzutreffen ist (Schnürer et al. 2003). Werden Hydroxylapatite natürlichen Ursprungs zur Implantation herangezogen, so greift man hauptsächlich auf bovine, equine Ausgangsprodukte oder Korallen zurück (LeGeros 2002). Keramiken aus biologischen Ausgangsmaterialien weisen häufig interkonnektierende Poresysteme auf. Synthetische Keramiken müssen hingegen über spezielle Herstellungsverfahren porös gemacht werden (Schnürer et al. 2003). Sie sind als porenlöse dichte Struktur, als Block mit verschiedenen großen Poren, welche blind endend oder interkonnektierend sind, aber auch als Granulat erhältlich (Jarcho 1981; Damien und Parsons 1991). Massive Implantate oder solche mit unzureichend kleinen Poren bieten dem Knochen nur die Möglichkeit des Anwachsens. Ein vollständiges Durchdringen des Implantats mit neuem Knochen ist nur bei interkonnektierendem Poresystem möglich (Schnürer et al. 2003). Poröse Implantate (> 5 Vol.-% Poren) werden im Vergleich zu dichtem Hydroxylapatit etwas schneller abgebaut (Hench und Wilson 1993).

Alle Hydroxylapatite rufen nur sehr geringe und somit vernachlässigbare Entzündungsreaktionen hervor (Oonishi et al. 1997). Sie verbinden sich in der Regel sehr gut mit benachbartem Hart- und Weichgewebe. Nur in Einzelfällen ist eine bindegewebige Einkapselung zu beobachten (Frauendorf und Sünnig 2007)). Hydroxylapatite sind sowohl biokompatibel wie auch osteokonduktiv (Mittelmeier et al. 1998). Sie werden entweder gar nicht, oder nur sehr langsam abgebaut (Schnürer et al. 2003).

Beispiele handelsüblicher Hydroxylapatitimplantate sind: Bio-Oss<sup>®</sup>, BIO-GEN<sup>®</sup>, ALGIPORE<sup>®</sup>, NanoBone<sup>®</sup>, Calcitite<sup>TM</sup> (LeGeros 2002; Frauendorf und Sünnig 2007), ProOsteon<sup>TM</sup> (Fa. Interpore), Endobon<sup>®</sup> (Fa. Biomet Merck), Pyrost<sup>®</sup> (Fa. Stryker), Synatite<sup>®</sup> (Fa. Aesculap), Synthacer<sup>®</sup> (MedArtis AG), Cerapatite<sup>®</sup> (Fa. Ceraver Osteal), oder Cerabone<sup>®</sup> (Fa. Mebio) (Schnürer et al. 2003). Sie sind alle sowohl biokompatibel als auch osteokonduktiv (Mittelmeier, Mittelmeier et al. 1998). Der Abbau von Hydroxylapatiten findet entweder gar nicht oder sehr langsam statt (Schnürer et al. 2003). Hydroxylapatite verbinden sich in der Regel sehr gut mit benachbartem Hart- und Weichgewebe. In einzelnen Fällen sind entzündliche Reaktionen und bindegewebige Einkapselungen möglich (Frauendorf und Sünnig 2007).

#### Trikalziumphosphat ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )

Trikalziumphosphat-Implantate besitzen ein Ca:P-Verhältnis von 1,5:1 und werden synthetisch über Sinterung hergestellt (Schnürer et al. 2003). Sie haben sowohl eine gute Biokompatibilität als auch gute osteokonduktive Eigenschaften. Implantate aus Trikalziumphosphat können abbaubar sein, resorbieren dann aber wie alle Keramiken langsam (Frauendorf und Sünnig 2007). Beispiele für handelsübliche TriKALZIUMPHOSPHAT-Implantate sind: BioBase<sup>®</sup> (Fa. Sulzer Medica), CERASORB<sup>®</sup> (Fa. Curasan) (Frauendorf und Sünnig; 2007 Schnürer et al. 2003), Vitoss<sup>TM</sup> (Fa. Orthovita) (LeGeros 2002; Schnürer et al. 2003), Biosorb<sup>®</sup> (Fa. Aesculap), Calciresorb<sup>®</sup> (Fa. Ceraver Osteal), chronOs<sup>®</sup> (Fa. Mathys Medical), Synticer<sup>®</sup> (Fa. MedArtis AG) oder Fortoss-resorb<sup>TM</sup> (Fa. Biocomposites).

## Biphasische Keramiken

Biphasische Keramiken sind Gemische aus Hydroxylapatit und Trikalziumphosphat (Schnürer et al. 2003). Die Gemische existieren in beliebigem Mischungsverhältnis, welches dem Implantat eher die Eigenschaften von Hydroxylapatit oder Trikalziumphosphat verleiht. Biphasische Keramiken haben eine gute Biokompatibilität und sind weder immunogen noch toxisch. Sie sind osteokonduktiv, aber nicht osteoinduktiv (Schnürer et al. 2003).

Beispiele für handelsübliche derartige Gemische sind: BONIT matrix®, BoneCeramic® (Frauendorf und Sünnig 2007), Triosite® (Fa. Zimmer), Biocer® R (Fa. DePuy), Calciresorb® 35 und Cerapatite® 65 (beides Fa. Ceraver Osteal), Eurocer® (Fa. Bioland), Ceraform® (Fa. Teknimed), Bi-Ostetic™ (Fa. Berkeley Advanced Biomaterials) und Alaska® (Fa. Argomedical) (Schnürer et al. 2003).

## Kalziumsulfate

Die Vorteile von Kalziumsulfat-Implantaten sind eine gute Biokompatibilität, eine einfache Handhabung und eine *intraoperativ* leichte Anpassbarkeit an den Defekt (Damien und Parsons 1991; Hollinger et al. 1996). Eingesetzt werden sie als ammischbare, formbare Masse (Kalziumsulfat-Hemihydrat ( $\text{CaSO}_4(0,5\text{H}_2\text{O})$ )), die zu Kalziumsulfat-Dihydrat ( $\text{CaSO}_4(2\text{H}_2\text{O})$ ) aushärtet oder direkt als Kalziumsulfat-Dihydrat in festen Formkörpern oder als Granulat (Schnürer et al. 2003).

Nachteile der Kalziumsulfate sind die fehlende Osteoinduktivität und Osteokonduktivität (Damien und Parsons 1991). Häufig werden sie zu schnell resorbiert. Sie degradieren innerhalb weniger Wochen und können somit ihre Platzhalterfunktion nur bedingt erfüllen (Schnürer et al. 2003).

Im Handel erhältliche Kalziumsulfat-Implantate sind: CALFORMA® (Fa. Livecore Biomedical) (Frauendorf und Sünnig 2007), Osteoset® (Fa. Wright Medical Technology), Capset® (Fa. Livecore Biomedical) und Fortoss Cema™ (Fa. Biocomposites) (Schnürer et al. 2003).

## Biogläser

Als Ausgangsmaterialien zur Herstellung von Biogläsern werden saure (Phosphorpentoxid, Siliciumoxid, manchmal auch Aluminiumoxid) und basische Oxide (Kalziumoxid, Natriumoxid, Kaliumoxid Magnesiumoxid, Zinkoxid etc.)

verwendet (Schnürer et al. 2003). Sie werden gemischt und bei einer Temperatur von ca. 1500 °C einem mehrstündigen Schmelzprozess unterzogen. Es entstehen hierbei amorphe, anorganische Materialien mit einem ungeordneten dreidimensionalen Phosphoroxid-Siliciumoxid-Netzwerk, an das sich die basischen Oxide anlagern. Je nach Herstellungsverfahren existieren die Biogläser als kompakte oder poröse Materialien mit einem interkonnektierenden Poresystem. Sie sind als Pulver oder gesinterte Formkörper erhältlich. Die Oberflächen der Biogläser sind bioaktiv, was ein Anwachsen von vitalem Gewebe oder Knochen an der Oberfläche ermöglicht (Kaufmann et al. 2000). Außerdem besitzen sie gute osteokonduktive Eigenschaften (Hench und Wilson 1984; Oonishi et al. 1997).

Je nach Zusammensetzung können Biogläser resorbierbar sein (Hench und Wilson 1993). Im Allgemeinen sind sie spröde und deshalb wie die Keramiken nicht für große, belastete Defekte ohne zusätzliche Stabilisierung geeignet (Jarcho 1981).

### **Kalziumphosphat-Zemente**

Kalziumphosphat-Zemente bestehen aus 1-2 soliden und einer liquiden Komponente, die vor ihrer Anwendung zusammengemischt werden (Chow 2001; LeGeros 2002; Schnürer et al. 2003). Hierbei entsteht eine Paste, die in den Defekt mit entsprechendem Werkzeug, wie Spatel oder Spritze, eingebracht beziehungsweise injiziert werden kann (Claes et al. 1997). Auf Grund ihrer pastösen Konsistenz können sie *intraoperativ* gut dem Defekt angepasst werden. Das Gemisch härtet *in situ* durch Sedimentation von Kalziumphosphat-Verbindungen aus (Chow 2001).

Die solide Komponente der Ausgangsverbindungen besteht aus Kalziumphosphat mit oder ohne Beimischung anderer Kalzium-Verbindungen (LeGeros 2002). Der liquide Anteil des Zements kann entweder aus Natriumphosphat-Lösungen, aus anorganischen Stoffen (z.B. Schwefelsäure, Phosphorsäure), aber auch aus organischen Säuren (z.B. Milchsäure, Weinsäure) bestehen. Zudem sind auch Mischformen möglich.

Die Aushärtungsreaktion von Kalziumphosphat-Zementen ist leicht exotherm oder endotherm und pH-neutral (Chow 2001). Durch die geringe Temperaturentwicklung ist mit keiner Schädigung des defektnahen Gewebes zu rechnen (Schnürer et al. 2003). Die mechanischen Eigenschaften, das Aushärtungs- und Abbauverhalten von

Kalziumphosphat-Zementen sind abhängig von der Zusammensetzung der Ausgangsmaterialien und deren Verarbeitung (Chow 2001). Sie sind wie die Keramiken im ausgehärteten Zustand spröde und deshalb für die Versorgung großer belasteter Defekte ohne zusätzliche Stabilisierung nicht geeignet. Im ausgehärteten Zement lassen sich je nach eingesetzten Ausgangsmaterialien und pH-Wert folgende Setzprodukte finden: DiKalziumphosphat-Dihydrat, OctaKalziumphosphat, amorphes Kalziumphosphat, Kalziumdefizitäres Apatit und Hydroxylapatit (LeGeros 2002).

Der Hauptnachteil der bisher existierenden injizierbaren Kalziumphosphat-Zemente ist ihr Mangel an Makroporosität und das Fehlen interkonnektierender Strukturen (Chow 2001). Die Biodegradation kann hierdurch nur langsam schichtweise von peripher nach zentral verlaufen, da die Auflösung von Kalziumphosphatzementen nur im sauren Milieu, wie es von Osteoklasten oder anderen säureproduzierenden Zellen gebildet wird, stattfinden kann.

Beispiele für kommerziell erhältliche Kalziumphosphat-Zemente sind:  $\alpha$ BSM<sup>®</sup> (Etex Corporation, Boston, MA), Biobon<sup>®</sup> (Fa. Biomet Merck), Norian SRS<sup>®</sup> (Fa. Noria Corp./STRATEC Medical), Cementek<sup>®</sup> (Fa. Teknimed), BoneSource<sup>®</sup> (Fa. Stryker Leibinge), Mimix<sup>™</sup> (Fa. W. Lorenz Surgical) und chronOS Inject (Fa. Synthes) (Schnürer et al. 2003).

## Polymere

Als Knochenersatz kommen sowohl Polymere biologischen Ursprungs als auch synthetisch hergestellte Polymere zum Einsatz (Langer und Vacanti 1993). Bei deren Entwicklung liegt die Schwierigkeit darin, ihnen zugleich optimale Festigkeits- und Abbaueigenschaften zu verleihen. Ein erheblicher Nachteil der Polymere ist, dass ihre Abbauprodukte (Oligomere und Monomere) im Körper häufig unerwünschte, zum Teil auch toxische Reaktionen hervorrufen (Böstman und Pihlajamäki 2000).

Die als Knochenersatzstoffe eingesetzten Polymere können in zwei Gruppen gegliedert werden: polyesterbasierende und PMMA-basierende (PMMA = Polymethylmetacrylat) Polymere (Fraendorf und Sünnig 2007). Zu den polyesterbasierenden Polymeren gehören zum Beispiel Polyglycolid, Poly-L-lactid und Poly-D,L-lactid sowie Copolymeren aus diesen Materialien (Schnürer et al. 2003). Ob ein Polymer vollständig abbaubar ist, hängt von seiner Struktur und der Vernetzung der Moleküle ab (Gutwald et al. 1994; Mainil-Varlet und Gogolewski

1996). Häufig werden sie nicht vollständig abgebaut und es bleiben Mikrokristallite zurück, die im Organismus Entzündungsherde hervorrufen. Hinzu kommt die Freisetzung von Säuren als Abbauprodukte, die den pH-Wert im umgebenden Gewebe senken (Santavirta et al. 1990). Dies kann ebenfalls Entzündungen und Fremdkörperreaktionen auslösen, die die Heilung behindern.

Die zweite Gruppe der als Knochenersatzstoff anzutreffenden Polymere sind die PMMA-basierenden (Epple und Bäuerlein 2007). PMMA ist ein sehr stabiles Polymer, das weder resorbierbar noch osteoinduktiv ist. Die PMMA-basierenden Materialien haben den Vorteil, dass sie injizierbar sind, was ein minimalinvasives chirurgisches Vorgehen ermöglicht. Ein großer Nachteil ist jedoch die während des Aushärtungsprozesses *in vivo* entstehende Wärmeentwicklung, die eine potentielle Schädigung des umliegenden Gewebes mit sich bringt. Dies kann zu Zelluntergängen in bis zu 1 mm Implantatentfernung führen (Hench und Wilson 1993). Ein weiterer Nachteil ist die Freisetzung von Polymeren und Monomeren, die kurz nach der Implantation im Blut nachweisbar sind (Walenkamp und Murray 2001). Dies könnte eine mögliche Ursache für Lungenembolien sein, die schon häufiger zum Beispiel nach Vertebroplastiken mit PMMA aufgetreten sind (Quesada und Mutlu 2006).

## **Metalle**

An Metallimplantaten findet man häufig poröses Titanium, Tantal, Nickel-Titanium- und Magnesiumlegierungen (Epple und Bäuerlein 2007). Eingesetzt werden sie entweder mit oder ohne Beschichtung (Hench und Wilson 1993; Masuda et al. 1998). Als Beschichtung kommen bioaktive Keramiken, wie zum Beispiel Hydroxylapatit, infrage. Metallimplantate sind in der Regel zwar sehr stabil und belastbar, allerdings nicht abbaubar, nicht osteogen, *intraoperativ* dem Defekt schwer anpassbar und häufig korrosionsanfällig. Metallionen oder gar Späne, die sich aus dem Implantat lösen und ins Gewebe wandern, können eine Reihe medizinischer Probleme nach sich ziehen (Hench und Wilson 1993). Unbeschichtete Metallimplantate sind in der Regel biotolerant oder bioinert.

## **Komposite**

Da keines der oben genannten Materialien alle Anforderungen erfüllt, wurden so genannte Komposite entwickelt (Alexander 1996). Unter Kompositen versteht man Materialien, die durch die Kombination zweier oder mehrerer Einzelkomponenten entstehen. Der Begriff Komposit umfasst eine Vielzahl von Materialien und Stoffvariationen (Schnürer et al. 2003). Für den Einsatz im Knochen wurden mit unterschiedlichen Zielvorstellungen Mischungen sowohl aus synthetischen Komponenten verschiedener Stoffklassen als auch Mischungen von synthetischen und biologischen Komponenten entwickelt. Die mit der Herstellung von Kompositen verfolgten Ziele sind die Verbesserung der mechanischen Eigenschaften von Materialien, die Verbesserung der Biokompatibilität und Osteokonduktivität oder auch die biologische Aktivierung synthetischer Materialien durch die Kombination mit osteoinduktiv wirkenden Substanzen, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Blut oder Knochenmarkaspiraten.

## **2.4 Ziel der Arbeit**

Von den bisher entwickelten Knochenersatzstoffen kommen die Komposite der Idealvorstellung am nächsten. Bis zu Beginn des EU geförderten Projekts „SmartCaP“ (Mai 2005) war es noch nicht gelungen, ein Kompositmaterial herzustellen, das alle Anforderungen an ein Knochenersatzmaterial erfüllen konnte. In dem oben genanntem Projekt wurden mehrere Kalziumphosphat-Zemente entwickelt, die mit Polymeren bestückt waren. Sie wiesen ein interkonnektierendes Poresystem auf, das bei der Passage durch eine Injektionsspritze erhalten blieb. Die Literaturrecherche vor dem Anfertigen dieser Studie zeigte, dass dies erst der zweite Versuch ist, einen makroporösen Zement herzustellen, der *in situ* aushärtet (del Valle, Mino et al. 2007). Alle zuvor entwickelten Zemente wurden vor der Implantation ausgehärtet. Die Aushärtung *in situ* erlaubt ein minimalinvasives chirurgisches Vorgehen, bei dem das Material dem Defekt *intraoperativ* einfach anzupassen ist. Die in diesem Projekt eingesetzten Polymere waren Gelatine, Sojabohnenextrakt und Alginat. Von ihnen wurde erwartet, dass sie die Poren im Zement während der Injektion erhalten und/oder dem Zement *in vivo* osteoinduktive Eigenschaften verleihen.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese neu entwickelten Zemente erstmals *in vivo* untersucht und mit einem Kalziumphosphat-Zement ohne Polymer und ohne Poresystem verglichen. Ein besonderes Augenmerk fiel hierbei sowohl auf die Verarbeitungseigenschaften wie auch auf die Biokompatibilität und das Resorptionsverhalten. Weitere untersuchte Parameter waren die biomechanischen Eigenschaften (Steifigkeit) des Implantat-Knochen-Verbunds und die Osteoinduktion, Osteokonduktion und Osseointegration der Zemente.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Materialien**

Die verwendeten Implantatmaterialien wurden von den Projektpartnern des EU-Projektes „SmartCaP“ entwickelt und bezüglich ihrer Materialeigenschaften charakterisiert. Alle Materialien waren Kalziumphosphat-Zemente (*CaP-Zemente*). Sie wurden direkt vor der Implantation aus einer pulverförmigen und einer flüssigen Komponente gemischt. Das Pulver bestand aus  $\alpha$ -Trikalziumphosphat ( $\alpha$ -TCP), das beim Aushärten der Zemente weitestgehend in kalziumdefizitäres Hydroxylapatit (CDHA) umgewandelt wurde. Die flüssige Komponente bestand bei allen Materialien aus gereinigtem, zweifach destilliertem Wasser und einem Aushärtungsbeschleuniger ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).

#### **CaP-Gelatine-Z**

Bei dieser Materialvariante wurde der flüssigen Phase vor dem Anmischen bovine Gelatine beigemengt. Der fertige Zement bestand zu 15 % aus boviner Gelatine. Die Porosität des *in vitro* ausgehärteten Zements betrug 10,7 %. Von diesen Poren waren etwa 6 % interkonnektierend. *In vitro* hatten die meisten Poren einen Durchmesser im Bereich von 180  $\mu\text{m}$ . Einige wenige erreichten einen Durchmesser von bis zu 520  $\mu\text{m}$ .

#### **CaP-Gelatine-Soja-Z**

Der flüssigen Phase dieser Materialvariante wurde vor dem Anmischen ein Polymergemisch aus boviner Gelatine und einem Extrakt aus der Sojabohne zugegeben. Der fertig gemischte Zement bestand zu 5 % aus boviner Gelatine und zu 20 % aus Sojabohnenextrakt. Die Porosität des *in vitro* ausgehärteten Zements betrug 32,6 %. Von diesen Poren waren etwa 90 % interkonnektierend. Die Porengröße, -struktur und -verteilung war sehr homogen. Die größten Poren wiesen einen Durchmesser von 360  $\mu\text{m}$  auf.

#### **CaP-Alginat-Z**

Bei dieser Materialvariante wurde der flüssigen Phase vor dem Anmischen außer dem Polymer Alginat noch ein *Surfactant* (Tween 80) zugegeben, um die Poren zu

stabilisieren. Der fertig gemischte Zement bestand zu 2 % aus sulfoniertem Natriumalginat und zu 0,5 % aus Tween 80. Die Porosität des *in vitro* ausgehärteten Zements betrug 21,7 %. Die Poren waren zu etwa 40 % interkonnektierend. Die Porengröße war sehr inhomogen. Der Durchmesser der größten Poren lag im Bereich von 660 µm.

### **CaP-Referenz-Z**

Als Referenzmaterial wurde ein Kalziumphosphat-Zement verwendet, welchem kein Polymer zugegeben wurde. Diese Materialvariante wies keine nennenswerten Poren auf.

## **3.2 Tierversuch**

### **3.2.1 Versuchstiere und Haltung**

Die Durchführung des Tierversuchs zur Erprobung der oben beschriebenen CaP-Zemente (CaP-Gelatine-Z, CaP-Gelatine-Soja-Z, CaP-Alginat-Z, CaP-Referenz-Z) wurde vom Regierungspräsidium Tübingen am 21.3.2007 unter der Tierversuchsnummer 837 genehmigt.

#### **Versuchstiere**

Als Versuchstiere dienten skelettal ausgewachsene, weibliche, weiße Neuseeland-Kaninchen (NZW). Die Tiere waren zu Versuchsbeginn 28 Wochen alt und im Mittel 3,8 kg schwer (3,3-4,3 kg). Gezüchtet und geliefert wurden sie ausschließlich von der Firma Charles River Laboratories Research Models and Services Germany GmbH (Stolzenseeweg 32-36, 88353 Kißlegg).

#### **Haltung**

Die Tiere wurden 2 Wochen vor Versuchsbeginn in der zentralen Tierforschungseinrichtung der Universität Ulm (Standort Oberberghof) in Gruppen zu je 3-4 Tieren in Bodenhaltung aufgestellt. Haltung, Fütterung und Pflege der Kaninchen erfolgte streng nach den Vorgaben des Tierschutzgesetzes (§§ 1, 2, 9 und 9a) und den Richtlinien der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations). Die Käfiggröße je Gruppe betrug 5,7 m<sup>2</sup>. Der Boden bestand

aus griffigen Fliesen mit zusätzlicher Sägespanneinstreu. Eine Versteckmöglichkeit aus Metall, unter der 4 Kaninchen gleichzeitig Unterschlupf finden konnten, war in jedem Käfig vorhanden. Wasser aus handelsüblichen Selbsttränken, die an die städtische Wasserversorgung angeschlossen waren und autoklaviertes Heu aus Metallraufen bekamen die Tiere *ad libitum*. Pelletiertes Kaninchenhaltungsfutter (V2333-000 ssniff K-H, 4 mm; ssniff Spezialdiäten GmbH) wurde 1-mal täglich (abhängig vom Gewicht der Kaninchen 80-120 g/Kaninchen) zugefüttert.

Die Raumtemperatur betrug 20-24 °C bei einer Luftfeuchtigkeit von 35-65 %. Abgeschirmt von natürlichem Tageslicht wurden die Kaninchen bei künstlichem Licht in einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12:12 Stunden gehalten.

Die tägliche versuchsunabhängige Pflege und Fütterung der Tiere übernahmen ausgebildete Tierpfleger des Ulmer Tierforschungszentrums.

### 3.2.2 Versuchsablauf

#### Versuchsdesign

Es wurden 3 verschiedene Implantationsperioden (4, 12 und 20 Wochen *post operationem*) festgelegt, die für alle Materialvarianten gleich waren. Randomisiert wurden 6 Tiere je Materialvariante jeder Implantationsperiode zugeteilt. Weitere 2 Tiere je Materialvariante wurden als Reserve operiert, um mögliche versuchsunabhängige Verluste ausgleichen zu können. Es ergab sich somit eine Gesamtzahl von 80 Kaninchen. Da keine Verluste auftraten, wurden die Reservetiere verwendet, um einzelne Gruppen auf eine Gruppenstärke von 7 Tieren aufzustocken. Die resultierende Größe der einzelnen Gruppen kann der folgenden Tabelle entnommen werden.

Tab. 1: Verteilung der Versuchstiere in Abhängigkeit des implantierten Materials und der Implantationsperiode

	Implantationsperioden		
	4 Wochen	12 Wochen	20 Wochen
CaP-Gelatine-Z	6	7	7
CaP-Gelatine-Soja-Z	6	7	7
CaP-Alginat-Z	7	6	7
CaP-Referenz-Z	6	7	7

Jedem Kaninchen wurde standardisiert bilateral in die laterale Femurkondyle je ein Bohrlochdefekt gesetzt, dessen Durchmesser 5 mm und dessen Tiefe 10 mm betrug (Abb. 1). In die Bohrlochdefekte wurde auf beiden Seiten derselbe Zement implantiert. Zur Überprüfung der Osteoinduktion der Materialien wurde ein ausgehärteter Formkörper desselben Zements bilateral subkutan implantiert. Das subkutane Implantat hatte die Form eines flachen Zylinders mit einem Durchmesser von 5 mm und einer Höhe von 3 mm (Abb. 6).



Abb. 1:

Linke Femurkondyle eines NZW mit Bohrlochdefekt (Durchmesser 5 mm, Tiefe 10 mm); Sicht von lateral.

Zusätzlich kamen 11 intakte Femora nicht operierter Kaninchen gleicher Rasse, Geschlechts und Alters als gesunde Vergleichsproben mit in die Auswertung. Diese

Femora stammten von zur Organentnahme getöteter Kaninchen anderer Arbeitsgruppen und wurden uns freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

### 3.2.3 Operation

#### Narkose

Es erfolgte eine subkutane Prämedikation mit 0,2 mg/kg KG Atropinsulfat (Atropinsulfat Braun 0,5 mg<sup>®</sup>, Fa. B.Braun Melsungen).

Nach Schur und Desinfektion (mit 70 %igem Ethanol) der Ohraußenseite erfolgte die Allgemeinanästhesie etwa 10 Minuten nach Atropingabe durch eine intravenöse Mischinjektion von Ketaminhydrochlorid (Ketamin 10 %<sup>®</sup>, Fa. WDT, Garbsen) und Xylazinhydrochlorid (Rompun<sup>®</sup>, 2 %, Fa. Bayer Health Care) in die laterale Ohrrandvene. Hierfür wurde ein Butterfly der Größe 0,8 x 20 mm (ECOFL<sup>®</sup>, Dispomed WITT oHG) verwendet, der mit Leukoplast<sup>®</sup> hospital (BSN medical GmbH, Breite 2,5 cm) am Kaninchenohr fixiert wurde.

Die Anästhesie-Mischinjektion setzte sich wie folgt zusammen:

5 ml Rompun<sup>®</sup> + 15 ml Ketamin 10%<sup>®</sup> + 80 ml isotone NaCl-Lösung<sup>®</sup> (Fa. Diaco, Deutschland)

Von dieser Mischinjektion wurde jedem Kaninchen eine Initialgabe langsam intravenös nach Wirkung im Bereich 0,5-1 ml/kg KG verabreicht. Die Verlängerung und Vertiefung der Narkose erfolgte nach Bedarf mit derselben Mischinjektion unabhängig vom Körpergewicht in 0,1-0,2 ml-Schritten.

Sobald das Kaninchen nach der Initialgabe vollständig anästhesiert war, bekam es zum Schutz der Augen vor Austrocknung beidseits Vidisic<sup>®</sup> (Fa. Dr. Gerhard Mann GmbH) auf der Kornea verteilt. Da die Augenlider während der Narkose geöffnet blieben, wurden die Augen zur Schonung der Sehsinneszellen mit einem Tupfer abgedunkelt.

Die Tiere erhielten während der Narkosedauer zur Energie- und Flüssigkeitssubstitution eine 0,9 %ige NaCl- (Isotone Kochsalzlösung 0,9 %<sup>®</sup>, 1 Tr./4 sec, Fa. B.Braun Melsungen) und Glucose-Infusion (G5<sup>®</sup>, Fa. B.Braun

Melsungen; insgesamt 10 ml) intravenös verabreicht. Die Kaninchen wurden während der gesamten Narkosedauer zur Verhinderung einer Hypothermie auf einem Wärmekissen gelagert.

### Vorbereitung zur Operation

Den Kaninchen wurden nach ihrer vollständigen Anästhesierung beide Hintergliedmaßen im Bereich der Tibia und des Femurs medial und lateral geschoren. Das Fell distal des Tarsalgelenks wurde zur Schonung der Lauffläche ausgespart. Die restlichen Haare an der distalen Hintergliedmaße und am Rumpf wurden mittels Stülpa®-Schlauchverband (Größe 1 und 5R, Fa. Paul Hartmann AG, Heidenheim) am Körper fixiert. Auf Grund der diuretischen Wirkung der Narkosemittel wurde den Kaninchen während der Operation eine Windel (Pampers® Micro, 1,5-3 kg, Fa. Procter & Gamble Paper Products Co, USA) angelegt (Abb. 2). Anschließend wurden die von Haaren befreiten Hautpartien mit 70 %igem Ethanol desinfiziert und das Kaninchen in rechter Seitenlage auf den Operationstisch verbracht. Es wurde mit sterilen Tüchern unter Aussparung des Operationsgebiets der linken Hintergliedmaße abgedeckt. An den nicht bedeckten Hautstellen erfolgte eine erneute großflächige Desinfektion mit Frekaderm® (Fa. Fresenius Kabi Deutschland GmbH).



Abb. 2:

Zur Operation vorbereitetes Kaninchen (noch nicht mit sterilen Tüchern abgedeckt)

## Zugang

Vor dem Anlegen des ungefähr 3 cm langen Hautschnitts über der Implantationsstelle wurde die Haut von medial in Richtung lateral verschoben und vom Assistenten fixiert. Dies hatte den Vorteil, dass die später angefertigte Hautnaht medial implantatfern und nicht lateral direkt über der Implantationsstelle zu liegen kam.

Anschließend erfolgten die Durchtrennung der in diesem Bereich stark ausgebildeten subkutanen Faszie sowie der darunterliegenden distalen Ursprungsaponeurose des M. biceps femoris. Bei den meisten Kaninchen wurde hierbei automatisch die Endsehne des M. abductor cruris cranialis mit durchtrennt, bei manchen musste dies im Anschluss daran separat durchgeführt werden.

Es war nun der Blick auf die Bohrstelle an der distalen Femurkondyle frei. Zur Orientierung dienten beim Bohren die Ursprungssehne des lateralen Anteils des M. gastrocnemius und das Lig. collaterale laterale. Mittig zwischen diesen beiden anatomischen Strukturen wurde mit einem schmalen Raspatorium vorsichtig das Periost entfernt und der spätere Bohrlochmittelpunkt mit einem sterilen Stift (Devon®, Tyco Healthcare group LP) markiert (Abb. 3).



Abb. 3:

*Die Bohrstelle ist frei präpariert und der Mittelpunkt des geplanten Defekts markiert.*

## **Bohren**

Der Defekt wurde mittels einer Druckluft betriebenen AirDrive®-Bohrmaschine (Synthes) angelegt. Während des gesamten Bohrvorgangs wurde die Bohrstelle mit physiologischer NaCl-Lösung (Isotone Kochsalzlösung 0,9 %® von B.Braun) gekühlt. Bevor mit einem 2,4 mm-Bohrer ein 9 mm tiefes Loch in den Defektmittelpunkt gebohrt wurde, war mit Hilfe eines Zentrierbohrers (Durchmesser 1,25 mm) der Bohrlochmittelpunkt auf eine Tiefe von ungefähr 1-2 mm angekerbt worden. In das 2,4 mm breite Bohrloch wurde ein runder Draht gesteckt (Durchmesser 2,4 mm, Länge 50 mm), welcher im nächsten Bohrschritt als Führung diente. Eine Erweiterung des Defekts auf 5 mm Durchmesser und 8 mm Tiefe erfolgte anschließend mittels eines kanülierten 5 mm-Bohrers (Abb. 4). Um einen planen Grund des Defekts zu erhalten, wurde das Loch mit Hilfe einer 5 mm-Fräse auf eine Tiefe von 10 mm vertieft. Außer dem Zentrierbohrer hatten alle Bohrer und die Fräse zur exakten Tiefenbestimmung einen „Anschlagring“ in entsprechender Höhe befestigt.



*Abb. 4:*

*Erweiterung des Defekts auf 5 mm Durchmesser und 8 mm Tiefe mit Hilfe eines mit Anschlagring versehenen kanülierten 5 mm-Bohrers*

Zur Entfernung der beim Bohren entstandenen Knochenspäne wurde der Defekt anschließend gründlich mehrfach mit physiologischer NaCl-Lösung (Isotone Kochsalzlösung 0,9 %®, B.Braun) gespült. Blut und Flüssigkeitsreste wurden mit Hilfe einer sterilen Komresse entfernt.

## **Implantation**

Der frisch gemischte Zement wurde mittels einer 2 ml Spritze in den Defekt verbracht (Abb. 5). Hierbei wurde streng darauf geachtet, dass das gesamte Loch mit Zement

befüllt war und alle überstehenden oder übergelaufenen Zementreste gründlich entfernt wurden.

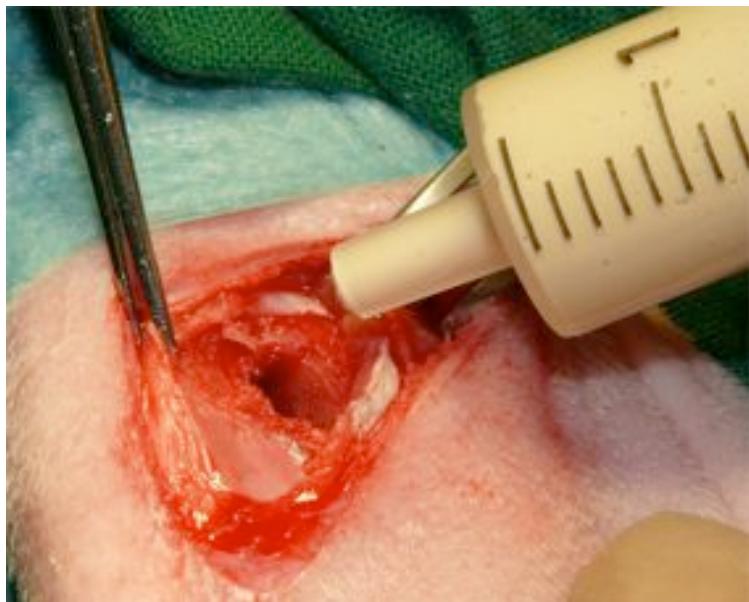


Abb. 5:

*Einfüllen des Zements in den Defekt mit Hilfe einer 2 ml Spritze.*

### **Wundverschluss**

Die durchtrennten sehnigen Muskelanteile und die subkutane Faszie wurden mit resorbierbarem Faden (4-0 Vicryl® von Ethicon, Nadel RB-1 Plus) durch Einzelhefte adaptiert. Die Hautnaht erfolgte mit einem nichtresorbierbaren Faden (Resolon® 5-0, Resorba, Nadel: DS16) in Form einer Intrakutannaht.

### **Subkutanes Implantat**

Vor dem Anfertigen der Hautnaht wurde durch die offene Hautwunde ein subkutanes vorgeformtes und ausgehärtetes Implantat (Abb. 6) so unter die Haut verbracht, dass es lateral ungefähr 3-4 cm kaudal der Implantationsstelle zu liegen kam.

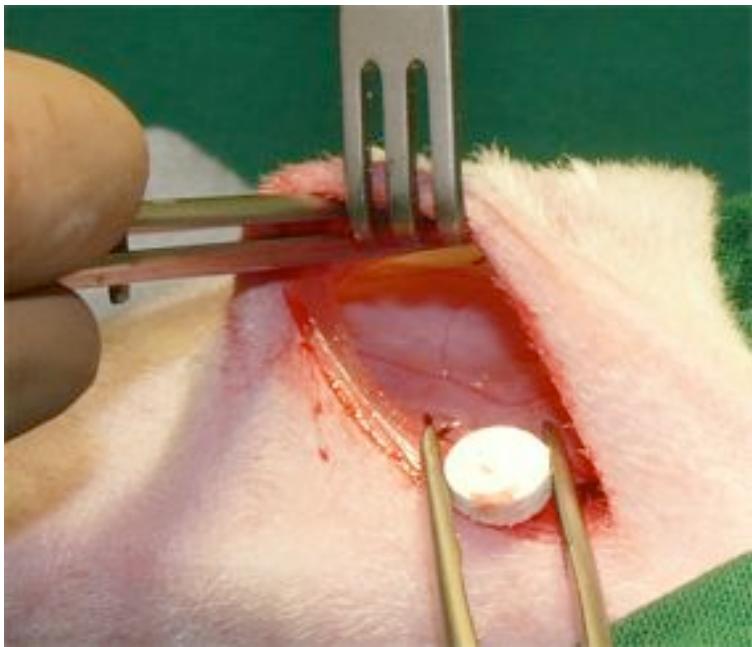


Abb. 6:

*Einbringen des vorgeformten subkutanen Implantats.*

Im Anschluss daran wurden die sterilen Tücher entfernt, das Kaninchen auf die andere Seite gewendet und mit neuen sterilen Tüchern unter Aussparung des Operationsgebiets des zweiten Beins wieder eingedeckt. Die freien Hautstellen des Beins wurden ebenfalls mit Frekaderm® (Fresenius Kabi Deutschland GmbH) desinfiziert und mit diesem Bein in gleicher Art und Weise verfahren wie mit dem ersten.

### **3.2.4 Röntgen, Nachsorge und Applikation von Fluoreszensfarbstoffen**

#### **Röntgen**

Direkt nach der Operation, aber noch unter Vollnarkose, wurden die operierten Beine beidseits im mediolateralen Strahlengang geröntgt (portables Röntgengerät AJEX 140 H, Fa. Blach; Belichtung: 56 kV, 0,8 mAs).

#### **Antibiose**

Antibiotisch wurden die Kaninchen am Tag der Operation und die nächsten 2 Tage *post operationem* mit je einer subkutanen Injektion von 0,3 ml/kg KG Baytril® 2,5 % Injektionslösung (Bayer Vital GmbH) versorgt.

#### **Wundtoilette**

Die Wunden wurden 14 Tage *post operationem* täglich kontrolliert und gegebenenfalls mit einem Frekaderm®-getränkten (Fresenius Kabi Deutschland GmbH) Tupfer einer Wundtoilette unterzogen. Die anschließenden 3 Wochen erfolgte eine Kontrolle des Operationsgebiets jeden 2. Tag und in der restlichen Standzeit 2-mal die Woche. Bei Bedarf wurde die Frequenz der Kontrollen und Wundtoiletten den Anforderungen entsprechend erhöht.

#### **Applikation von Fluoreszensfarbstoffen**

Um bei der histologischen Auswertung der Proben das Einwachsverhalten des Knochens in die Materialien oder die Anlagerung neuen Knochens an die Implantatoberfläche besser beurteilen zu können, wurden den Kaninchen zu verschiedenen Zeitpunkten Fluoreszensfarbstoffe injiziert, die sich ausschließlich in den zum Zeitpunkt der Applikation neu gebildeten Knochen (Mineralisationsphase) einlagern.

Der erste Farbstoff war Calceingrün (Firma Synopharm; 20 mg/kg KG), der den Kaninchen intravenös verabreicht wurde. Hierzu wurde das Pulver in destilliertem Wasser gelöst (20 mg/ml). Diese Stammlösung wurde mit einem Sterilfilter

(Porengröße 0,2 µm) steril filtriert und den Kaninchen 1 ml/kg KG injiziert.

Der zweite Farbstoff, der den Kaninchen zu einem späteren Zeitpunkt verabreicht wurde, war Oxytetracyklin (Ursocyclin® 10 % pro inj., medistar, Holzwickede, 30 mg/kg KG). Er wurde den Kaninchen unverdünnt (0,3 ml/kg KG) subkutan appliziert. Da dieses Medikament subkutan verabreicht Schmerzreaktionen auslösen kann, wurde zur Schonung der Tiere vor der Injektion des Oxytetracyklins ein mit physiologischer NaCl-Lösung 1:1 verdünntes Lokalanästhetikum (Ursocain 5 %®, Fa. Albrecht) an die Injektionsstelle injiziert (0,2-0,4 ml der Verdünnung je Kaninchen abhängig vom zu injizierenden Volumen Ursocyclin®).

Bei der histologischen Auswertung unter dem Mikroskop stellte sich mit Hilfe einer Fluoreszenzlampe und eines Fluoreszenzfilters bei einer Wellenlänge von 450–490 nm Calceingrün durch eine grüne und Oxytetracyklin durch eine gelbe bis orangefarbene Mineralisationsbande dar.

Die Zeitpunkte der Injektion der einzelnen Fluorochrome in Abhängigkeit von der Implantationsperiode kann der folgenden Tabelle (Tabelle 2) entnommen werden.

*Tab. 2: Injektion von Fluorochromfarbstoffen post operationem in Abhängigkeit von der Implantationsperiode*

Implantationsperiode in Wochen	Injektionszeitpunkte in Wochen post operationem	
	Calceingrün	Oxytetracyklin
4	2	3
12	6	10
20	16	18

### Tötung

Nach Ende der jeweiligen Implantationsperiode (4, 12, 20 Wochen) wurden die Kaninchen mit Hilfe eines Bolzenschussapparats betäubt und anschließend durch Entbluten getötet. Dies wurde von befugten Tierpflegern des Tierforschungszentrums Ulm vorgenommen.

### **3.2.5 Präparation zur Probengewinnung**

Die Kaninchen wurden direkt im Anschluss an die Tötung für die verschiedenen Auswertungsverfahren präpariert.

#### **Organproben**

Als erstes erfolgte eine makroskopische Adspektion der inneren Organe, wobei Organproben (etwa 0,5 x 1,5 cm groß) von einer Niere, der Milz und der Leber entnommen und in Formaldehyd (4 %) verbracht wurden.

Die weitere Aufbereitung dieser Proben war wie folgt: Nach mindestens 48 Stunden im Formaldehyd wurden sie unter fließendem Leitungswasser gewässert, um dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe 40–100 % entwässert und entfettet zu werden. Es folgte die Einbettung in warmes Paraffin, welches beim Abkühlen aushärtete. Daraufhin wurden die Probe in etwa 5 µm dicke Scheiben für die histologische Auswertung geschnitten (Mikrotom®, Media) und auf einen Objektträger verbracht. Anschließend wurden sie einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen und mit einem Deckglas abgedeckt. Das bei dieser Färbemethode eingesetzte Hämalaun färbte alle sauren beziehungsweise basophilen Strukturen blau, insbesondere Zellkerne mit der darin enthaltenen Desoxyribonukleinsäure (DNS) und das rau endoplasmatische Retikulum (rER). Der zweite bei dieser Färbung verwendete Farbstoff war das Eosin. Dies ist ein synthetisch hergestellter saurer Farbstoff und färbt alle acidophilen beziehungsweise basischen (eosinophilen) Strukturen insbesondere Zellplasmaproteine rot.

Nach der Organprobenentnahme wurden an den Hintergliedmaßen die Haut abpräpariert und die *Lnn. poplitei* aufgesucht, makroskopisch betrachtet und mindestens einer davon ebenfalls in Formaldehyd (4 %) verbracht. Die weitere Aufbereitung der Lymphknoten erfolgte in gleicher Weise wie die der Organproben.

#### **Subkutanes Implantat**

Die subkutanen Implantate wurden zuerst makroskopisch beurteilt, mit einer digitalen Spiegelreflexkamera fotografiert und eines von beiden ebenfalls für mindestens 48 Stunden in Formaldehyd (4 %) verbracht und anschließend unter fließendem Leitungswasser gewässert. Entwässert und entfettet wurden diese Proben ebenfalls in einer aufsteigenden Alkoholreihe 40-100 %.

Anschließend wurde sie in einen lichthärtenden Methacrylat-Kunststoff (VLC 7200<sup>®</sup>, Firma Technovit) eingelegt und für 1 Woche dunkel gelagert. Nach dieser Zeit wurde die Kunststofflösung gewechselt und die Probe so nochmals eine Woche dunkel gelagert. Anschließend wurde der Kunststoff erst 2 Stunden unter Einwirkung von Gelblicht und anschließend 8 Stunden unter Einfluss von Blaulicht in einer Histolux<sup>®</sup>-Einbettungsmaschine (Exakt-PSI, Fa. Exakt, Norderstedt) ausgehärtet. Es folgte die Anfertigung der histologischen Schnitte (80-100 µm dick) mittels Sandwichmethode mit einer Diamant-Bandsäge (Trennschleifsystem, Fa. Exakt, Norderstedt). Die histologischen Schnitte wurden auf eine Dicke von ungefähr 70 µm geschliffen und poliert (Mikroschleifsystem, Fa. Exakt) und anschließend nach Giemsa gefärbt. Bei dieser Färbemethode erscheinen Zellkerne durch eine Komplexbildung der Farbstoffe mit der DNS purpurrot. Das Zytoplasma wird durch diese Färbemethode meistens bläulich dargestellt.

## Femora

Die Femora wurden explantiert und sorgfältig vom Weichgewebe befreit. Vor der weiteren Verarbeitung wurde eine Röntgenaufnahme im Faxitron-Tischröntgengerät (Faxitron 43805N X-Raysystem Fa. Hewlett-Packard, USA; Belichtung: 40 kV, 5 Minuten, lateromedialer Strahlengang) angefertigt. Die weitere Aufarbeitung war für das linke und das rechte Femur für die verschiedenen Auswerteverfahren unterschiedlich.

linkes Femur	Dichtebestimmung (pQCT)
	biomechanische Messungen
rechtes Femur	histologische Untersuchungen

Das linke Femur wurde wie folgt weiter verarbeitet:

Das distale Ende (Kondylen und zusätzlich 0,5–1 cm der Diaphyse) wurde mittels eines Sägeschnitts (Diamant-Bandsäge der Firma PSI Grünwald) vom restlichen Knochen abgetrennt. Der proximale Sägerest wurde verworfen. Bevor der distale Teil des Knochens weiter verarbeitet wurde, wurde eine pQCT-Aufnahme (siehe unter 3.2.2 Knochendichtebestimmung durch periphere quantitative Computertomographie) angefertigt.

Anschließend wurde in sagittaler Schnittrichtung eine 3 mm dicke Scheibe ungefähr aus der Mitte des Implantats mit einer Diamant-Bandsäge herausgesägt (Abb. 7) und bis zur biomechanischen Messung mit physiologischer NaCl-Lösung (Isotone Kochsalzlösung 0,9 %®, B.Braun) feucht gehalten.

Die rechte Femurkondyle wurde in gleicher Weise wie die linke vom restlichen Knochen getrennt, welcher ebenfalls verworfen wurde.

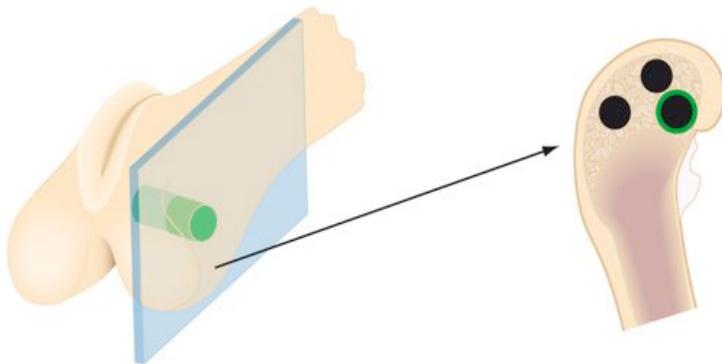


Abb. 7:

Schnittebene zur Anfertigung einer Knochenscheibe für den biomechanischen Test. Die schwarzen Markierungen sind die verschiedenen Messpunkte im Implantatbereich (grüner Rand) und in der Umgebung (ohne Umrundung)

Die Aufbereitung für die histologische Untersuchung ging wie folgt vonstatten: Nach der Entnahme aus dem Formaldehyd wurde die Probe unter fließendem Leitungswasser gewässert. Entwässert und entfettet wurden diese Proben anschließend ebenfalls in einer aufsteigenden Alkoholreihe 40–100 %.

Nach Entnahme aus dem Alkohol wurde die Probe in Methylmetacrylat (Fa. Röhm) verbracht, welches nach einer Woche erneuert wurde. Nach Ablauf einer zusätzlichen Woche wurde das Methylmetacrylat durch Methylmetacrylat ersetzt, das mit einem Beschleuniger (Benzylproxid 40 g/l) und einem Weichmacher (Nonylphenyl-Polyethylenglykol-Acetat, Fluka, 250 ml/l) versetzt war. Die Aushärtung erfolgte in 3-6 Wochen. Die eingebetteten Proben wurden ebenfalls in sagittaler Ebene mit der oben genannten Diamant-Bandsäge mittels Sandwichmethode geschnitten (Trennschleifsystem, Fa. Exakt, Norderstedt) und auf ungefähr 70 µm Dicke geschliffen und poliert (Mikroschleifsystem, Fa. Exakt). Anschließend wurden die Präparate nach Paragon gefärbt. Hierbei färben sich die Zellkerne, das basophile Zytoplasma, die Osteoidsäume und das Weichgewebe in unterschiedlichen Blautönen, während sich die mineralisierte Knochenmatrix rosa bis violett färbt (Abb. 8).

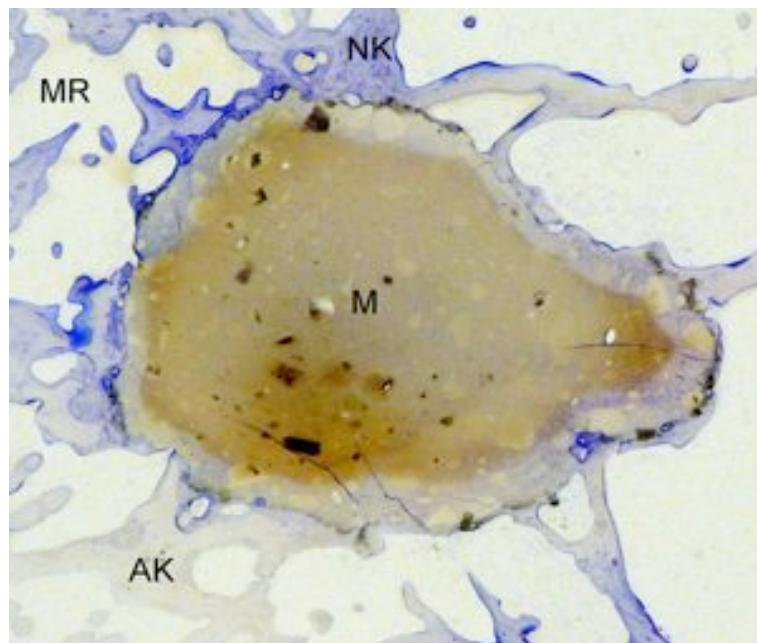


Abb. 8:

Beispiel für ein nach Paragon gefärbtes histologisches Präparat der Probe aus der rechten Femurkondyle (CaP-Referenz-Z, 20 Wochen Standzeit post operationem)

M = Material

NK = neuer schwächer mineralisierter Knochen

AK = älterer stärker mineralisierter Knochen

MR = Markraum mit Knochenmark

### **3.3 Auswertungsverfahren**

#### **3.3.1 Biomechanik (Eindrücktest)**

Die mechanische Belastbarkeit des Implantat-Knochen-Verbunds wurde an einer Materialprüfmaschine (Mod. Z010, Fa. Zwick, Ulm) getestet (Abb. 9). Hierfür wurde die bereits unter Punkt 2.2.5. (Präparation zur Probengewinnung, Abb. 7) beschriebene Knochenscheibe verwendet.

Verwendet wurden für diese Messung ein zylindrischer Druckstempel mit einem Durchmesser von 4 mm (Eigenbau Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Ulm), ein Kraftaufnehmer  $\leq 500$  N (Typ KAF-TC, Fa. A.S.T./Zwick) mit einer Genauigkeit von  $\leq 0,3\%$  und ein Wegaufnehmer (Messbereich 25 mm, Typ MT 25, Heidenhain) mit einer Genauigkeit von  $\pm 3 \mu\text{m}$ . Es wurde eine Vorkraft von 0,5 N angelegt und anschließend mit einer Prüfgeschwindigkeit von 2 mm/min mit oben genanntem Stempel senkrecht auf die waagerecht auf dem Prüftisch liegende Knochenprobe gedrückt. Mit der angebrachten Kraftmessdose wurde die Kraft gemessen, die benötigt wurde, um den Stempel 2 mm je Minute in die Probe zu drücken. Der seitlich angebrachte Wegaufnehmer erfasste den Weg, den der Stempel vom Beginn der Messung (Probenoberseite bei einer Vorlast von 0,5 N) bis zum Ende der Messung zurücklegte.

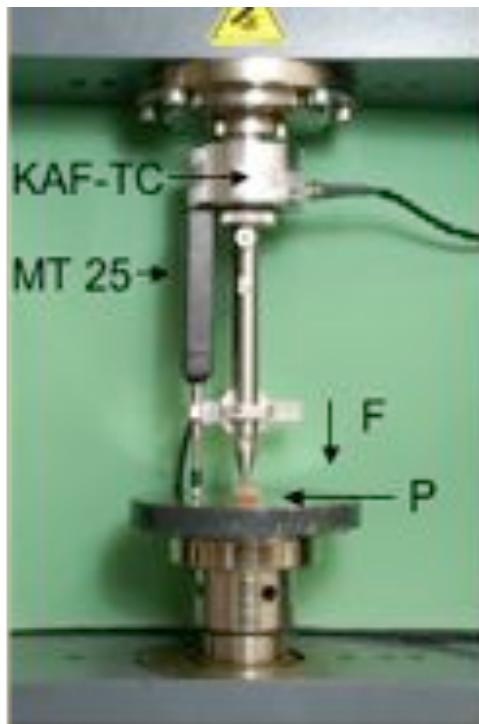


Abb. 9:

*3 mm dicke Knochenprobe (P) während der biomechanischen Messung in der Materialprüfmaschine*

*F = einwirkende Kraft durch den 4 mm Stempel. Die Kraft wirkt senkrecht auf die waagrecht auf dem Prüftisch liegende Knochenprobe.*

*P = Probe aus dem Knochen auf dem Prüftisch*

*MT 25 = Wegaufnehmer Typ MT 25*

*KAF-TC = Kraftaufnehmer Typ KAF-TC*

Die Messung wurde beendet, wenn der Stempel 1,5 mm in die Probe eingedrückt oder eine Kraft von mehr als 400 N erreicht wurde. Die ermittelten Werte wurden in einer Kraft-Weg-Kurve aufgetragen. Aus der Steigung dieser Kurve ergab sich die Steifigkeit der Probe in N/mm.

Die Steifigkeit wurde für 3 Messpunkte ermittelt (Abb. 10). Messpunkt 1 im Defektmittelpunkt ergibt die Steifigkeit des Knochen-Implantat-Verbunds. Die Messpunkte 2 und 3 in der Defektumgebung wurden herangezogen, um den Einfluss des Materials auf die Steifigkeit des umgebenden spongiösen Knochens zu untersuchen.

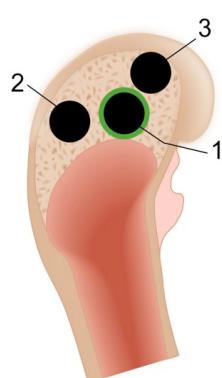


Abb. 10:

*Schematische Darstellung der Druckpunkte für die Messung der Steifigkeit des Implantat-Knochen-Verbunds. (Ansicht von medial).*

*1 = Messpunkt im Implantatbereich*

*2+3 = Messpunkte in der Implantatumgebung*

In gleicher Art und Weise wurde mit den Proben aus den Femora der 11 nicht operierten Kaninchen verfahren.

Zur Bestimmung der initialen Steifigkeit der Materialien in vitro wurden die Zemente in eine mit Löchern versehene Teflonplatte injiziert. Die Platte war wie die Knochenscheibe 3 mm hoch und die Löcher hatten einen Durchmesser von 5 mm (Abb. 11). Die Aushärtung der Zemente erfolgte unter sterilen Bedingungen in PBS (Phosphate Buffered Saline, Fa. PAA, Pasching) bei 37 °C für 12-19 Tage. Die Messung erfolgte in jeder befüllten Mulde analog zu den Messungen an den Knochenproben.

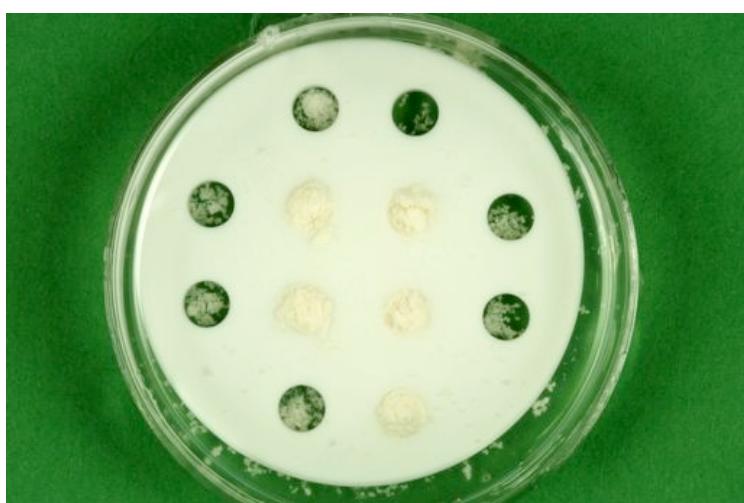


Abb. 11:  
*CaP-Z in Teflonplatte ausgehärtet in PBS bei 37 °C.*

### 3.3.2 Knochendichthebestimmung durch periphere quantitative Computertomographie (pQCT)

Anhand der peripheren quantitativen Computertomographie (pQCT) lässt sich die Mineraldichte des Knochengewebes bzw. des Knochen-Implantat-Verbunds bestimmen. Mit hochauflösenden CT-Schnitten mit einer Voxelgröße von 0,295 x 0,295 x 1 mm konnte der Zielparameter bestimmt werden. Dieser war Mineraldichte (Dichte) in mg Hydroxylapatit/ccm. Vor jedem Gebrauch des Gerätes wurde eine Referenzmessung an einem Standardphantom aus Hydroxylapatit (Phantom 0,495, Nr. 91068) zur Kalibrierung durchgeführt. Die Abweichungen der einzelnen Referenzmessungen lagen bei unter 3 %.

Zur Bestimmung der Mineraldichte wurde die komplette distale Kondyle des linken Femurs verwendet. Diese wurde zentral im pQCT (XCT 960A, Fa. Stratec Medizintechnik, Pforzheim) auf einer Acrylglasschiene, die als Probenhalter diente, fixiert. Als Startpunkt für den anfänglichen 30 mm langen Übersichtsscan („Scoutview“) wurde das laterale Ende des Knochens gewählt. Der Übersichtsscan bestand aus 15 lotrechten Schnitten in unterschiedlichen parallelen Sagittalebenden des Knochens. Die Schnitte hatten eine Schichtdicke von 1 mm und einen Abstand von 1 mm. Mit Hilfe der farbcodierten Rasteraufnahme des zweidimensionalen Scoutviews wurde die Position des eigentlichen Querschnitts manuell festgelegt. Zur Bestimmung der Mineraldichte wurde 1 Querschnitt in der Mitte des zylindrischen Implantats gewählt, eine CT-Aufnahme gemacht und mit Hilfe der zum Gerät gehörenden Software (Version 5.20) ausgewertet.

Die Auswertung erfolgte bei einem Schwellenwert von 0 mg/ccm. Der Schwellenwert gab dem Rechner vor, ab welchem Schwächungskoeffizienten die erhaltenen Bildpunkte als Objekt zu werten waren. Bildpunkte, deren Schwächungskoeffizient unter dem angegebenen Schwellenwert lag, wurden als „Hintergrund“ gewertet und gingen nicht in die Auswertung mit ein.

Auf dem angefertigten Schnitt wurden je 3 quadratische Auswertungsfenster, auch „region of interest“ (ROI) genannt, festgelegt und ausgewertet. Die Auswertungsfenster hatten eine Größe von 3,53 x 3,53 mm. Das erste wurde mittig im Defektbereich platziert, um die Mineraldichte des Knochen-Implantat-Verbunds zu bestimmen. Die beiden anderen Auswertungsfenster wurden in den defektnahen spongiösen Knochen der Kondyle gelegt, um die Mineraldichte der Defektumgebung zu bestimmen. Mit den 11 intakten Femora der nicht operierten Kaninchen (siehe Kapitel 2.2.2. „Versuchsdesign“) wurde in gleicher Art und Weise verfahren.

### 3.3.3 Histologische Auswertung

Die histologischen Schnitte wurden deskriptiv qualitativ bei einer 200-fachen Vergrößerung und quantitativ über die Punktezählmethode bei 100-facher Vergrößerung unter dem Axiophot-Photomikroskop (Axiophot<sup>®</sup>, Fa. Zeiss, Oberkochen) ausgewertet. Zur Anwendung kam hierbei ein Rasterobjektiv mit 10 x 10 Zählpunkten, wobei der Abstand der Punkte 0,125 mm betrug. Es wurden die

gesamte Fläche des Bohrkanals (im folgenden Implantatbereich genannt) und im direkten Umkreis ein Bereich von 1,25 mm Breite (im folgenden Umgebung genannt) ausgezählt (Abb. 12). In der Umgebung wurden genau 1000 Zählpunkte ausgezählt. Der Implantatbereich wurde vollständig ausgezählt, was je nach Schnittebene eine Punktezahl von 1000 bis etwa 1600 ergab. Die histologisch quantitative Auswertung erfolgte analog an den 11 intakten Vergleichsfemora der nicht operierten Kaninchen (siehe Kapitel 2.2.2. „Versuchsdesign“).

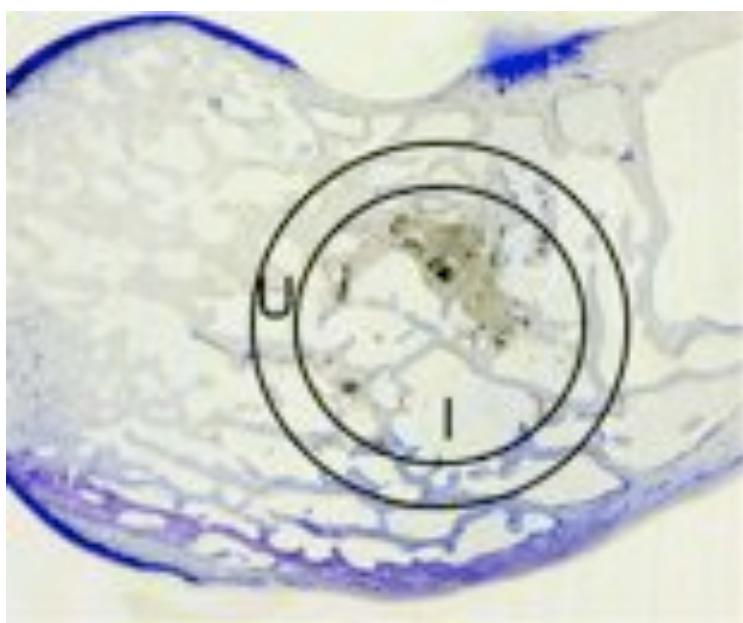


Abb. 12:

*Histologisches Präparat der Materialvariante CaP-Gelatine-Soya-Z nach 20-wöchiger Implantation.*

*Die eingezeichneten Kreise zeigen die jeweils ausgewerteten Bereiche.*

*I = Implantatbereich*

*U = Umgebung*

Ausgezählt wurden im Implantatbereich: Rest des implantierten Materials, neu gebildeter Knochen und Weichgewebe (= Bindegewebe, Knorpel, Knochenmark, etc.). In der Umgebung wurden gezählt: Knochen und Weichgewebe. Die gezählten Punkte wurden in Flächen-% des jeweiligen Bereichs umgerechnet und anschließend statistisch ausgewertet.

Bei der qualitativ deskriptiven Auswertung wurde ein besonderes Augenmerk auf den Kontakt des verbliebenen Materials zum neu gebildeten Knochen und auf Anzeichen entzündlicher Reaktionen (z.B. Makrophagen, Fremdkörperriesenzellen) gelegt. Zusätzlich wurden die histologischen Schnitte aus der Femurkondyle unter Fluoreszenzlicht ausgewertet. Durch die verschiedenen Injektionszeitpunkte der Fluoreszenzfarbstoffe konnte qualitativ deskriptiv das Einwachsverhalten des neu gebildeten Knochens in das Material und der Knocheneinbau in die vom abgebauten Material hinterlassenen Hohlräume erfasst werden. Die fluoreszenzhistologische

Auswertung erfolgte mit Hilfe des Axiophot-Photomikroskops (Axiophot®, Fa. Zeiss, Oberkochen) bei 25- und 50-facher Vergrößerung. Hierfür wurde ein Fluoreszenzfilter verwendet, welcher die beiden Fluoreszenzfarbstoffe Calceingrün und Tetracyklin zusammen abbilden kann (Wellenlänge 450-490 nm).

### **3.4 Statistik**

Bei allen quantitativen Auswerteverfahren (Biomechanik, pQCT, histologische Gewebedifferenzierung) wurden die ermittelten Werte zur Berechnung der Signifikanzen in das Statistikprogramm JMP® (Version 5.0.1.2, SAS Institute, Cary, N.C., USA) übertragen. Waren durch das Auswerteverfahren bedingt je Kaninchen 2 Werte vorhanden (z.B. Biomechanik Messpunkt 2 und 3 in der Umgebung), so wurden die Werte zuvor gemittelt. Die Berechnung statistisch signifikanter Unterschiede erfolgte für den Vergleich von zwei Materialien nach derselben Implantationsperiode und den Vergleich mit den intakten Knochen nicht operierter Kaninchen anhand des „Wilcoxon Rank Sum Tests“. Da dieser Test nur geeignet ist, zwei Gruppen miteinander zu vergleichen, wurde für den Vergleich eines Materials zu den verschiedenen Implantationszeitpunkten der Test nach Kruskal und Wallis durchgeführt. Diese Tests wurden ausgewählt, da auf Grund der geringen Tierzahl (6-7 Tiere je Gruppe) nicht von einer Normalverteilung der Werte ausgegangen werden konnte.

## **4 Ergebnisse**

### ***4.1 Klinischer Verlauf***

Die Operationen verliefen weitestgehend ohne Zwischenfälle. Lediglich ein Kaninchen verstarb während der Narkoseeinleitung. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde hierfür ein Ersatzkaninchen operiert. Alle anderen Kaninchen kamen nach der Operation schnell zu sich und zeigten 24 Stunden post operationem wieder ein ungestörtes Allgemeinbefinden.

Unabhängig vom implantierten Material zeigten alle Kaninchen zwischen dem 7. und dem 15. Implantationstag für 3-4 Tage eine leichte Schwellung des Weichgewebes. Diese war 0,5-1 cm breit, 2-4 cm lang und entlang der Schnitttrichtung des Weichgewebes orientiert. Die Schwellung war nicht verschieblich und es konnte weder eine Rötung noch ein Temperaturunterschied zur Umgebung beobachtet werden.

### ***4.2 Makroskopische und histologische Untersuchung der Lymphknoten und Organproben***

Die makroskopische und histologische Untersuchung sowohl der Lnn. poplitei wie auch der untersuchten Organe (Milz, Leber, Niere) verlief unauffällig. Es konnten weder Ablagerungen von implantiertem Material noch ein gesteigertes Abwehrgeschehen oder eine anderweitige Irritation der Organe oder der Lymphknoten durch die Materialien festgestellt werden.

### ***4.3 Auswertung der makroskopischen, histologischen, biomechanischen und pQCT-Analysen***

Im Folgenden werden die Materialien zuerst im Einzelnen dargestellt und mit intaktem Knochen nicht operierter Kaninchen verglichen. Im letzten Abschnitt erfolgt ein Vergleich der Komposit-Zemente mit dem Referenz-Zement.

### 4.3.1 CaP-Referenz-Z

#### Makroskopische Auswertung

Den Defekt in der Femurkondyle bedeckte ein flacher Kallus. Soweit dies makroskopisch zu beurteilen war, bestand der Kallus zum größten Teil aus Knochen. Der Zement war gut in den Knochen integriert. Makroskopisch sichtbare Anzeichen einer Entzündung konnten nicht gefunden werden. Bei manchen Kaninchen war ein Austritt des Zements aus dem Bohrkanal in den Markraum hinein zu beobachten (Abb. 13). Da der Bohrkanal trotzdem nahezu vollständig gefüllt war, kann davon ausgegangen werden, dass der Austritt des Materials in den Markraum *intra operationem* stattgefunden hatte. Auch nach 20-wöchiger Implantationszeit war noch ein Großteil des Zements sichtbar.

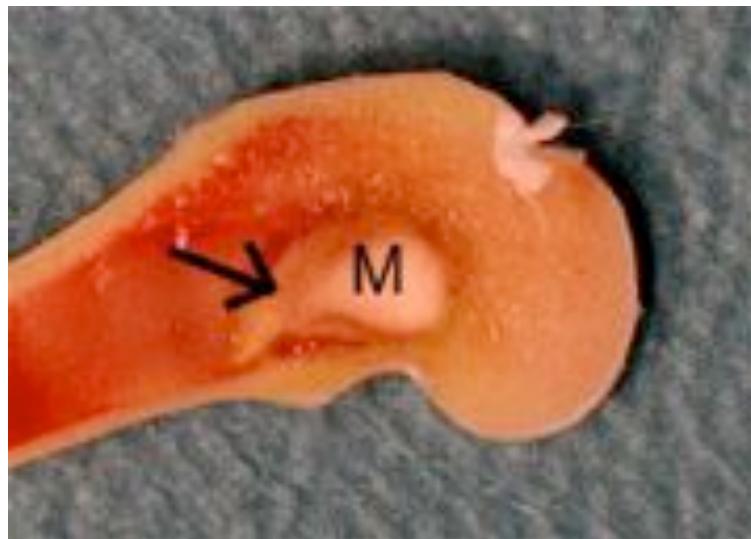


Abb. 13:

Knochenscheibe mit CaP-Referenz-Z nach 4-wöchiger Implantation.

Makroskopisch sichtbar sind die große Menge an Material (M) und der Austritt des Materials in den Markraum (Pfeil).

#### Histologische Auswertung

##### Qualitative Auswertung

Im Zentrum des Defekts war auch nach 20 Wochen noch ein hoher Anteil an Material vorhanden. Der Zement wies wenige kleine Poren auf und war zu allen Implantationszeitpunkten vollständig von neu gebildetem Knochen umgeben.

Abbildung 14 zeigt den engen Kontakt des Materials zum umliegenden Knochen. Es konnte keine oder nur eine sehr dünne Zwischenschicht aus Weichgewebe gefunden werden. Der neu geformte Knochen bildete eine dichte Lamelle um das verbliebene Material. Allerdings erfolgte keine Knochenneubildung im Material selbst. Die kleinen

Poren des CaP-Referenz-Z waren weder mit neuem Knochen noch mit Weichgewebe gefüllt. Der Knochen in der Umgebung des Defekts wies vitale Osteozyten, Osteoblasten, Osteoid und vor allem nach 12 Wochen auch Osteoklasten auf. Dies spricht für ein reges Knochenremodeling.

Nach 12 Wochen konnten in der Nähe der Zementoberfläche auch einige chondroblastenähnliche Zellen gefunden werden (3 von 7 Kaninchen).

Obwohl die Resorptionsrate des Referenzmaterials insgesamt sehr niedrig war, konnte auf der Materialoberfläche ein zellulärer Abbau des Zements beobachtet werden (Abb. 15). Hierbei waren vor allem Makrophagen beteiligt.

Zu keinem Implantationszeitpunkt waren ausgeprägte Entzündungsreaktionen, sondern lediglich wenige Entzündungszellen, wie z.B. Makrophagen oder einzelne Fremdkörperriesenzellen, erkennbar.



Abb. 14:

*Histologischer Schnitt des CaP-Referenz-Z nach 12-wöchiger Implantation im Knochen. Zu sehen ist der enge Material-Knochen-Kontakt.*

*M = implantiertes Material*

*NK = neu gebildeter Knochen*

*Färbung nach Paragon*

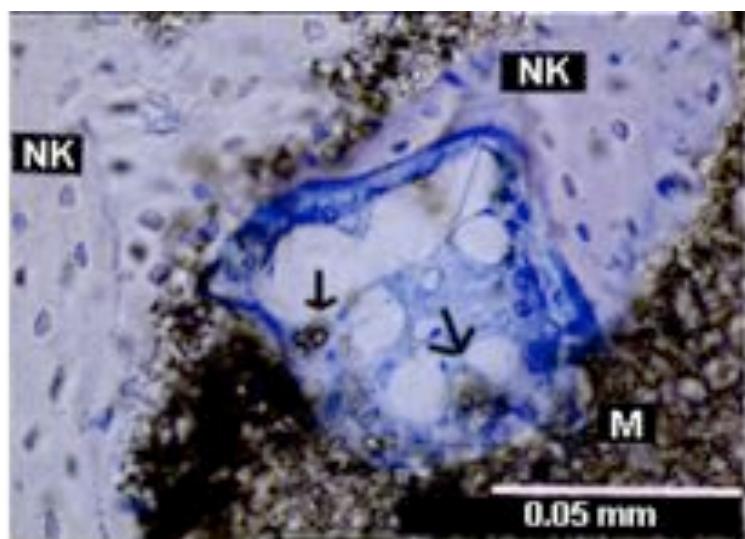


Abb. 15

*Histologischer Schnitt des CaP-Referenz-Z nach 4-wöchiger Implantation im Knochen. Der zelluläre Abbau ist gekennzeichnet durch Zellen mit inkorporierten Materialpartikeln (Pfeile).*

*M = implantiertes Material*

*NK = neu gebildeter Knochen*

*Färbung nach Paragon*

## Quantitative Auswertung

Im intakten trabekulären Knochen der Femurkondyle nicht operierter Kaninchen betrug der relative Anteil an Knochensubstanz 20–30 % und an Weichgewebe (Knochenmark) 70–80 % (Abb. 16).

War das Referenzmaterial implantiert, so war der Defekt sogar nach 20 Wochen noch zu ungefähr 90 % mit Zement gefüllt (Abb. 16). Der Anteil an verbliebenem Material war zu den verschiedenen Implantationszeitpunkten etwa gleich. Der Anteil an Weichgewebe und neu gebildetem Knochen im Defektbereich war folglich sehr gering (< 10 %) und veränderte sich während der Implantationsdauer nicht signifikant.

Die intakten Knochen nicht operierter Kaninchen enthielten, im Vergleich zu den operierten und mit Zement behandelten, in der Defektregion signifikant mehr Knochen und Weichgewebe (Abb. 16).

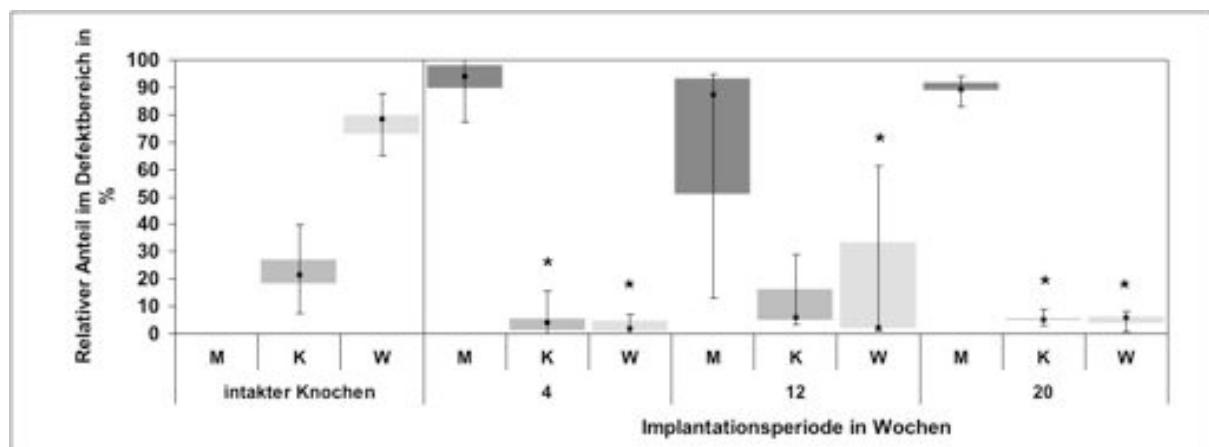


Abb. 16:

CaP-Referenz-Z: Relativer Anteil (%) an Material (M), Knochen (K) und Weichgewebe (W) im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.

\* signifikanter Unterschied zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen ( $p < 0,05$ )

In der Implantatumgebung erschien der Knochen im histologischen Schnitt sehr dicht. Der relative Anteil an Knochen war im Vergleich zum nicht operierten trabekulären Knochen erhöht und änderte sich über die Implantationszeit nicht signifikant. Der relative Anteil an Weichgewebe war hingegen im Vergleich zum nicht operierten trabekulären Knochen erniedrigt (Abb. 17).

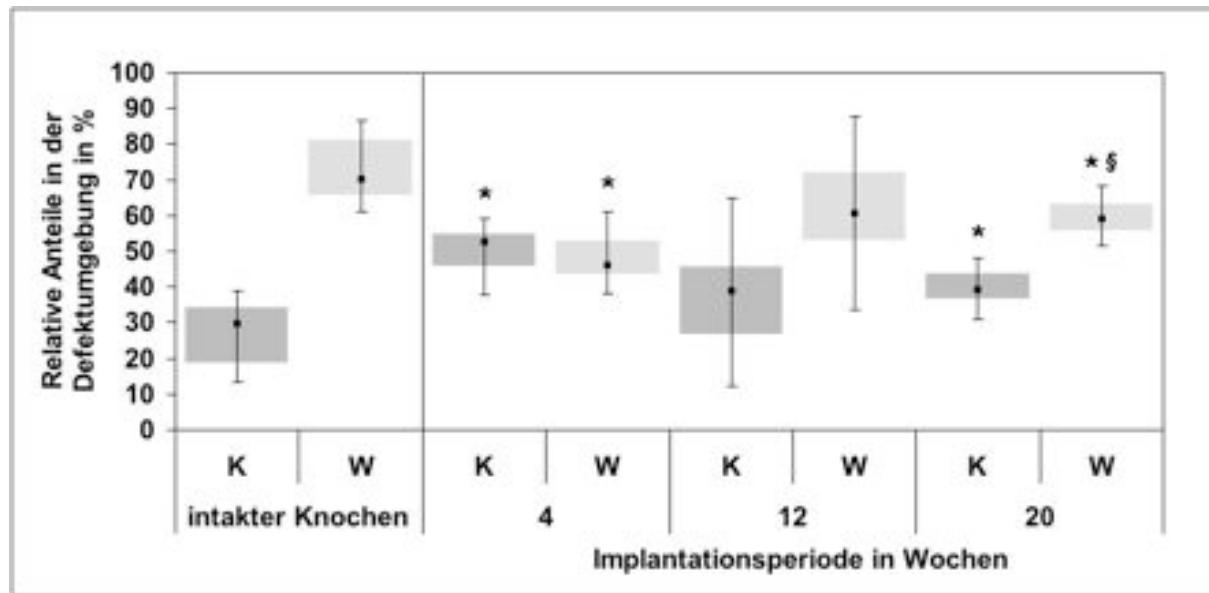


Abb. 17

CaP-Referenz-Z: Relativer Anteil (%) an Knochen (K) und Weichgewebe (W) in der Defektumgebung nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.

\* signifikanter Unterschied zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen ( $p < 0,05$ )

§ signifikanter Unterschied zu 4 Wochen Implantationszeit ( $p < 0,05$ )

## Biomechanische Prüfung

Im Vergleich zum trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen war die Steifigkeit im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen signifikant erhöht (Abb. 18).

In der Umgebung des Defekts war die Steifigkeit nach 20 Wochen höher als die des gesunden Knochens, nach 4 und 12 Wochen bestand jedoch kein signifikanter Unterschied (Abb. 19).

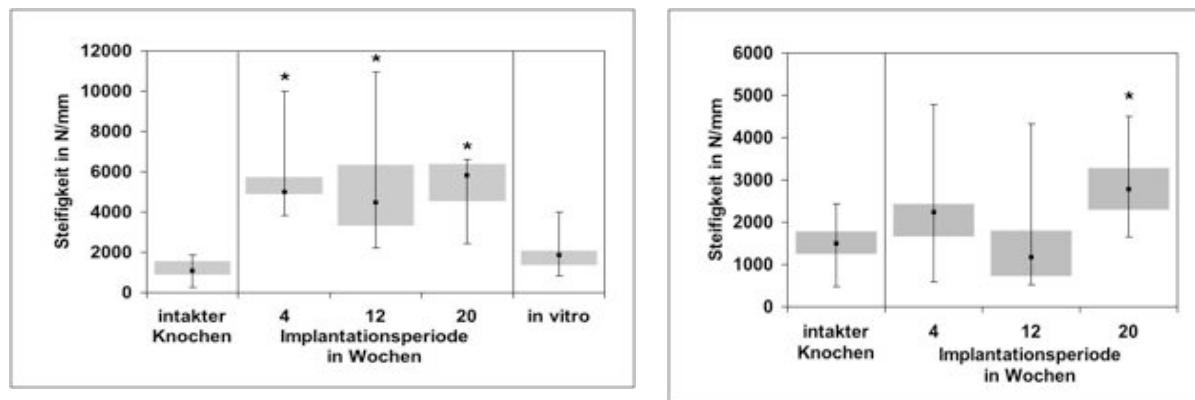


Abb. 18:

CaP-Referenz-Z: Steifigkeit (N/mm) im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.

\* signifikanter Unterschied zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen ( $p < 0,05$ )

Zusätzlich aufgetragen ist die Steifigkeit des in vitro ausgehärteten Zements. Hierfür wurden keine statistischen Berechnungen durchgeführt.

Abb. 19:

CaP-Referenz-Z: Steifigkeit (N/mm) in der Defektrumgebung nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.

\* signifikanter Unterschied zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen ( $p < 0,05$ )

## pQCT-Auswertung

Im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen war die Dichte im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen signifikant erhöht (Abb. 20). Ebenfalls signifikant erhöht im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen war die Dichte in der Umgebung nach 20 Wochen (Abb. 21).

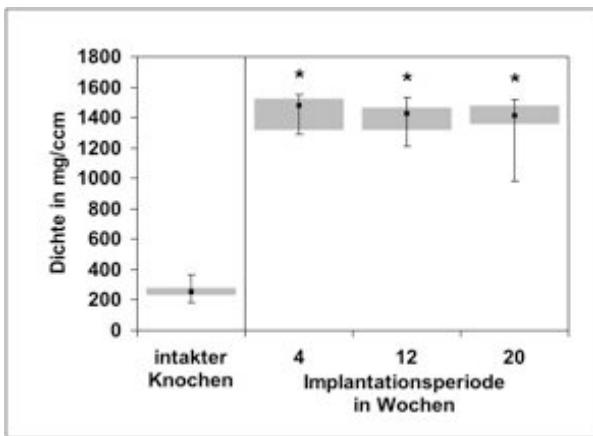


Abb. 20:

*CaP-Referenz-Z: Dichte (mg/ccm) im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.*

*\*signifikanter Unterschied zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen ( $p < 0,05$ )*

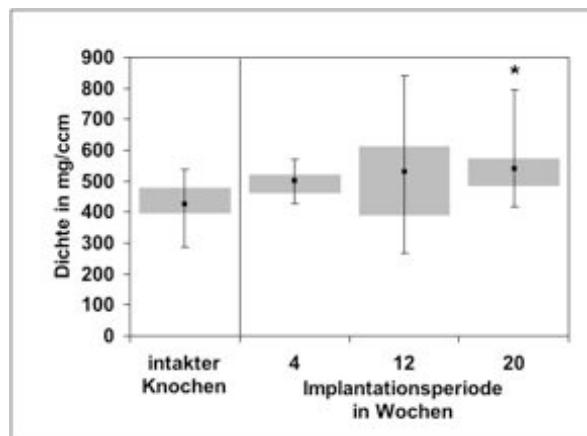


Abb. 21:

*CaP-Referenz-Z: Dichte (mg/ccm) in der Defektumgebung nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.*

*\*signifikanter Unterschied zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen ( $p < 0,05$ )*

### Subkutanes Implantat (qualitative Auswertung)

Die Menge des subkutan implantierten Referenzmaterials verringerte sich über die Implantationszeit kaum (Abb. 22). Nach 12- und 20-wöchiger Implantationsdauer konnte im histologischen Schnitt ein zellulärer Abbau des Materials beobachtet werden. Außer in entstandenen Rissen konnte kein Gewebe innerhalb des Materials festgestellt werden. Um das subkutan implantierte Material herum war direkt angrenzend eine dicke Bindegewebeskapsel zu beobachten (Abb. 23). Dieses Bindegewebe war von einigen Blutgefäßen durchzogen. Nach 4- und 12-wöchiger Implantation waren keine Entzündungsreaktionen feststellbar. Nach 20 Wochen Implantationszeit waren allerdings sporadisch Fremdkörperriesenzellen zu finden.



Abb. 22:

Subkutanes Implantat aus CaP-Referenz-Z nach 20-wöchiger Implantation.

Makroskopisch sind keine Entzündungsreaktionen und keine Verringerung des implantierten Materials sichtbar.

SI = subkutanes Implantat

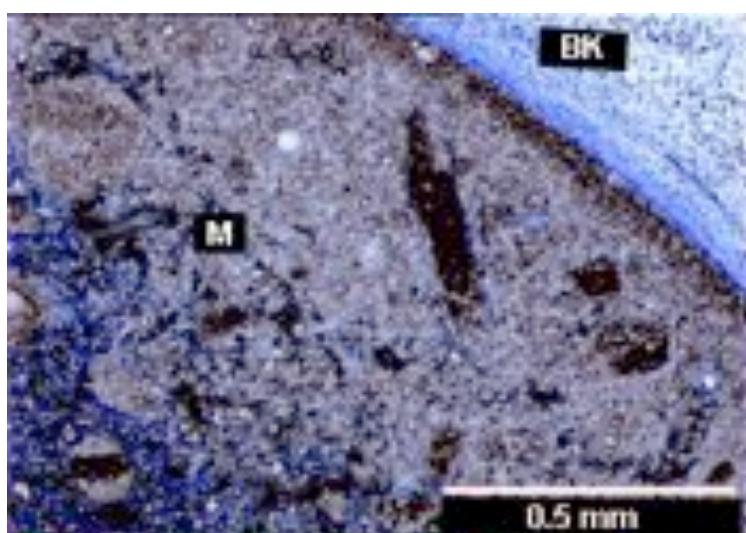


Abb. 23:

Histologischer Schnitt des subkutanen Implantats aus CaP-Referenz-Z nach 4-wöchiger Implantation.

Sichtbar ist ein glatter von Bindegewebe umgebener Implantatrand.

M = implantiertes Material

BK = Bindegewebeskapsel

Färbung nach Giemsa

### 4.3.2 CaP-Gelatine-Z

#### Makroskopische Untersuchung

Den Defekt in der Femurkondyle bedeckte ein flacher Kallus. Soweit dies makroskopisch zu beurteilen war, bestand der Kallus zum größten Teil aus Knochen. Der Zement war gut in den Knochen integriert. Makroskopisch sichtbare Anzeichen einer Entzündung konnten nicht gefunden werden. Bei keinem Kaninchen war ein Austritt des Zements aus dem Bohrkanal zu beobachten. Nach 12 und 20 Wochen Implantationszeit war im Knochen nur noch wenig implantiertes Material übrig (Abb. 24). Manchmal war es makroskopisch unmöglich, Reste des implantierten Materials auszumachen.



Abb. 24:

Knochenscheibe mit CaP-Gelatine-Z nach 20-wöchiger Implantation.

Makroskopisch ist kein implantiertes Material mehr sichtbar. Der Pfeil markiert den Defektbereich.

#### Histologische Auswertung

##### Qualitative Auswertung

Im Zentrum des Defekts war nach 4 Wochen eine reduzierte, aber variable Menge an CaP-Gelatine-Z zu erkennen. Der Rand des Implantats war unregelmäßig. Zu jedem Implantationszeitpunkt konnte ein zellulärer Materialabbau beobachtet werden. Der Zement wies einige Poren unterschiedlicher Größe auf. Allerdings waren nur randständige Poren mit Zellen (Fibroblasten, Osteoblasten) und Gewebe (Weichgewebe) gefüllt. In manchen randständigen Poren konnte sogar neu gebildeter Knochen gefunden werden. Der abgebauten Zement war durch

Weichgewebe (Knochenmark, Bindegewebe) und neu gebildeten Knochen trabekulärer Struktur ersetzt.

Nach 12- und 20-wöchiger Implantation war nur noch wenig Zement übrig. Dieser konnte als Schollen verschiedener Größe von neu gebildetem trabekulären Knochen umgeben im gesamten Bohrkanal verteilt gefunden werden (Abb. 25).

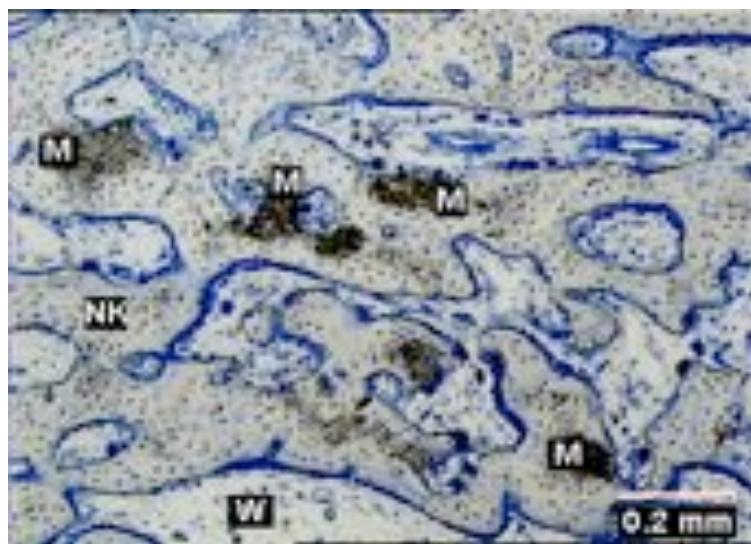


Abb. 25:

*Histologischer Schnitt des CaP-Gelatine-Z nach 12-wöchiger Implantation im trabekulären Knochen. Zu sehen ist die geringe Menge an Restmaterial eingebettet in neu gebildete Knochentrabekel und der enge Implantat-Knochen-Kontakt.*

M = implantiertes Material

NK = neu gebildeter Knochen

W = Weichgewebe  
(Knochenmark)

Färbung nach Paragon

Nach allen 3 Implantationsperioden war ein sehr enger Kontakt des Materials zum umliegenden Knochen erkennbar (Abb. 26). Es konnte keine oder nur eine sehr dünne Zwischenschicht aus Weichgewebe (v.a. Knochenmark) gefunden werden. Insbesondere nach 4 Wochen bildete der neu geformte Knochen direkt um das verbliebene Material eine schmale dichte Lamelle. Der neu gebildete Knochen weiter zum Defektrand hin war trabekulärer Knochen. Die dichte Knochenlamelle direkt um das Implantat war durch Remodeling nach 12 und 20 Wochen ebenfalls zu trabekulärem Knochen umgebaut worden (Abb. 25). Der Knochen in der Umgebung des Zements wies vitale Osteozyten, Osteoblasten, Osteoid und vor allem nach 12 Wochen auch Osteoklasten auf. Dies spricht für ein reges Knochenremodeling (Abb. 26).

Auf der Materialoberfläche und in den randständigen Poren war zu jedem Implantationszeitpunkt zellulärer Materialabbau vor allem durch Makrophagen zu sehen. Es konnte zu keinem Zeitpunkt eine entzündliche Reaktion weder im Defektbereich, noch in der Umgebung beobachtet werden.

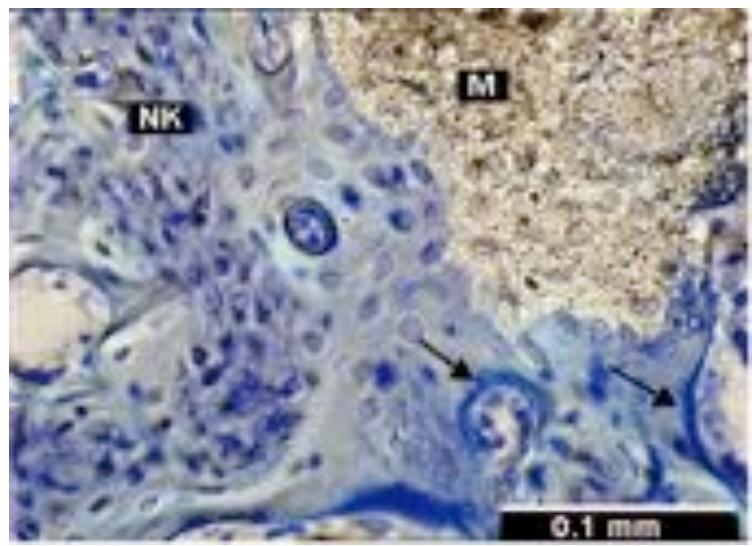


Abb. 26:

Histologischer Schnitt des CaP-Gelatine-Z nach 4-wöchiger Implantation im trabekulären Knochen. Zu sehen ist der enge Implantat-Knochen-Kontakt und die rege Osteoblastenaktivität in der unmittelbaren Umgebung des Zements.

M = implantiertes Material

NK = neu gebildeter Knochen

Pfeile = Osteoid mit aktiven Osteoblastensäumen

Färbung nach Paragon

## Quantitative Auswertung

War der Defekt mit CaP-Gelatine-Z gefüllt, so war nach 4 Wochen eine reduzierte, aber stark variierende Menge an Zement übrig (2-33 % des Defektbereichs). Nach 12 und 20 Wochen war der relative Anteil des Implantats im Defektbereich signifikant gesunken. Dabei betrug der Anteil bei 13 von 14 Kaninchen nur noch zwischen 0 und 8,5% (Abb. 27). Im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen der Femurkondyle nicht operierter Kaninchen konnte ein ähnlicher relativer Anteil an Knochen im Defektbereich festgestellt werden. Dieser veränderte sich zu den einzelnen Implantationszeitpunkten nicht signifikant (Abb. 27). Der relative Anteil an Weichgewebe im Defektbereich (Knochenmark, Bindegewebe) nahm während der Implantationsperiode zu. Es war nach 12 und 20 Wochen ein mit trabekulärem Knochen nicht operierter Kaninchen vergleichbarer relativer Anteil an Weichgewebe vorhanden (Abb. 27).

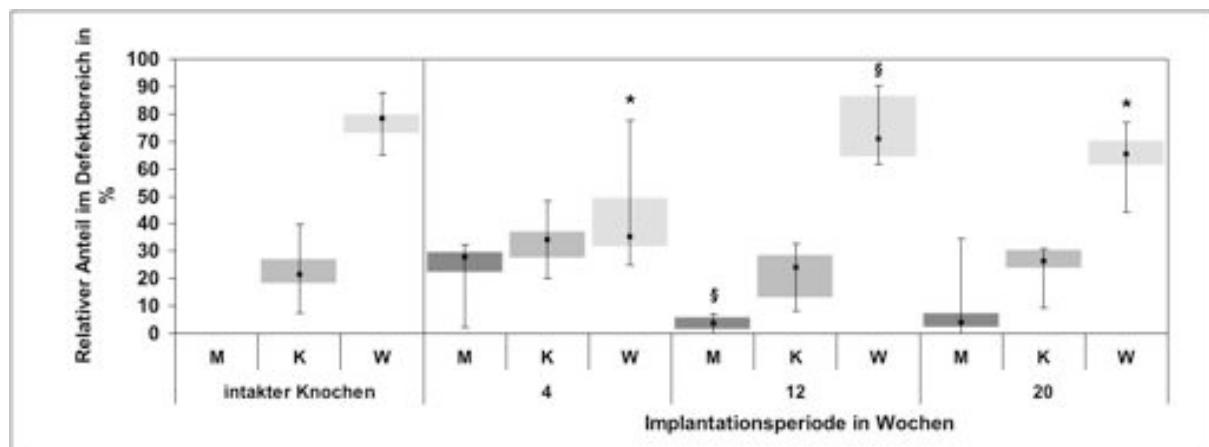


Abb. 27:

CaP-Gelatine-Z: Relativer Anteil (%) an Material (M), Knochen (K) und Weichgewebe (W) im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.

\*signifikanter Unterschied zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen ( $p < 0,05$ )

§ signifikanter Unterschied zu 4 Wochen Implantationszeit ( $p < 0,05$ )

In der defektnahen Umgebung war nach 4 Wochen signifikant mehr Knochen und weniger Weichgewebe als beim trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen zu finden (Abb. 28). Der relative Anteil an Knochen an dieser Lokalisation veränderte sich im Laufe der Implantation nicht signifikant.

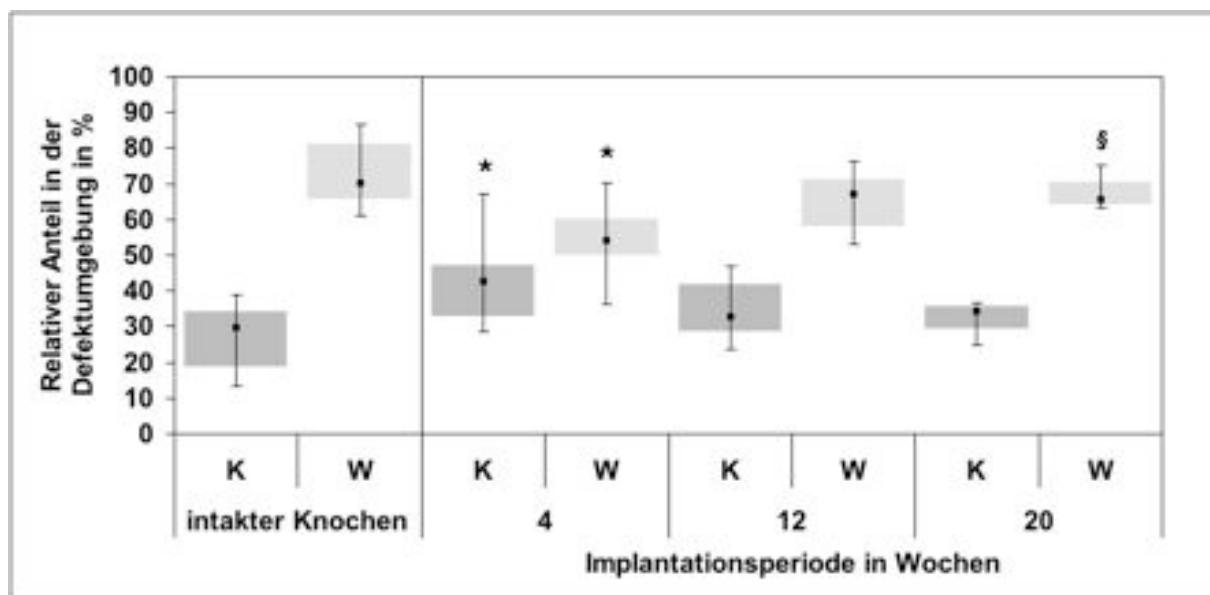


Abb. 28:

CaP-Gelatine-Z: Relativer Anteil (%) an Knochen (K) und Weichgewebe (W) in der Defektumgebung nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.

\* signifikanter Unterschied zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen  
( $p < 0,05$ )

§ signifikanter Unterschied zu 4 Wochen Implantationszeit ( $p < 0,05$ )

## Biomechanische Prüfung

Der Vergleich mit trabekulärem Knochen nicht operierter Kaninchen nach 4, 12 und 20 Wochen erbrachte weder im Defektbereich noch in dessen Umgebung einen signifikanten Unterschied der Steifigkeit (Abb. 29 und 30).

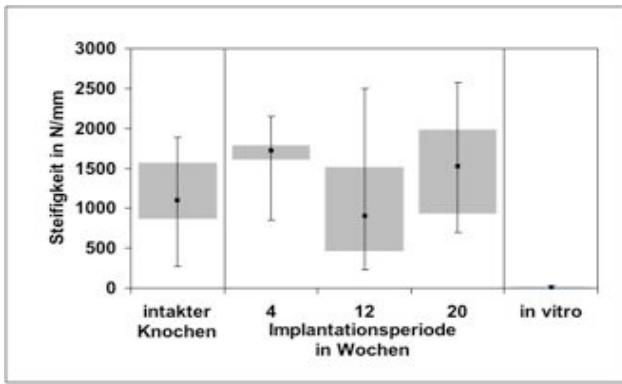


Abb. 29

CaP-Gelatine-Z: Steifigkeit (N/mm) im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.

Signifikante Unterschiede zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen ( $p < 0,05$ ) bestehen nicht.

Zusätzlich aufgetragen ist die Steifigkeit des in vitro ausgehärteten Zements. Hierfür wurden keine statistischen Berechnungen durchgeführt

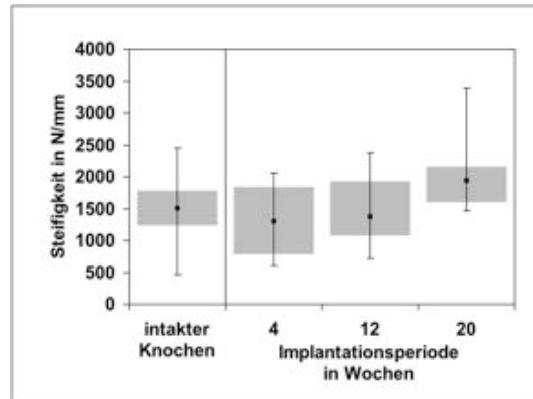


Abb. 30

CaP-Gelatine-Z: Steifigkeit (N/mm) in der Defektumgebung nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.

Signifikante Unterschiede zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen ( $p < 0,05$ ) bestehen nicht.

## pQCT-Auswertung

Im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen war die Dichte sowohl im Defektbereich als auch in der Umgebung nach 4, 12 und 20 Wochen signifikant erhöht (Abb. 31 und 32).

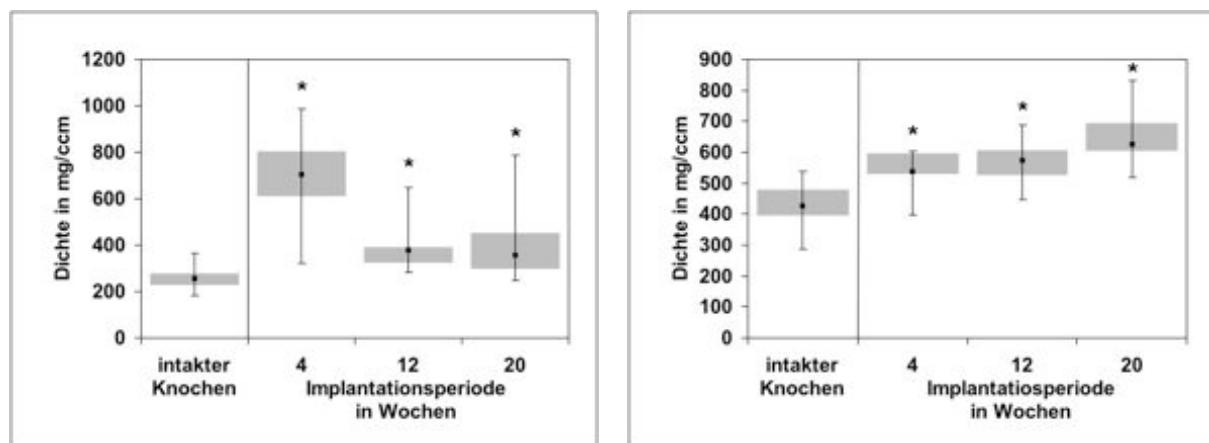


Abb. 31:

*CaP-Gelatine-Z: Dichte (mg/ccm) im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.*

\*signifikanter Unterschied zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen ( $p < 0,05$ )

Abb. 32:

*CaP-Gelatine-Z: Dichte (mg/ccm) in der Defektumgebung nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.*

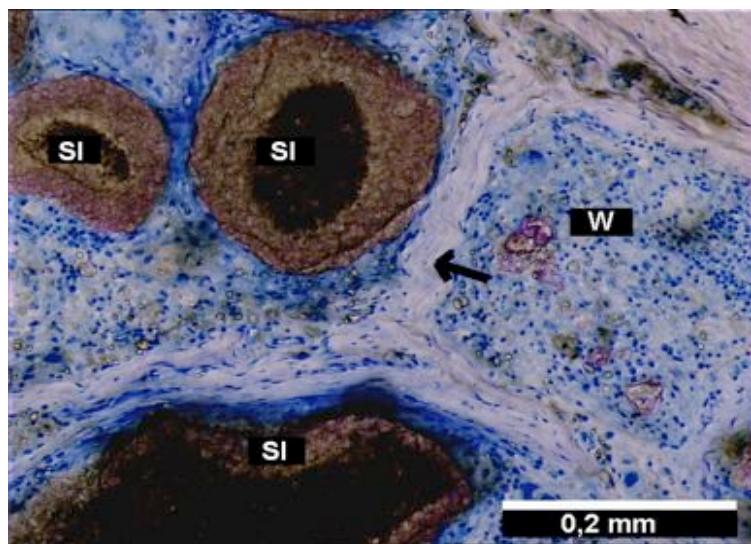
\*signifikanter Unterschied zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen ( $p < 0,05$ )

## Subkutanes Implantat (qualitative Auswertung)

Die Menge des subkutan implantierten CaP-Gelatine-Zements war sehr variabel, verringerte sich über die Implantationszeit aber kaum. Nach 4- und 12-wöchiger Implantationsdauer konnte im histologischen Schnitt ein geringer und nach 20-wöchiger Implantationsdauer ein starker zellulärer Abbau des Materials beobachtet werden. Im gesamten subkutanen Implantat waren Poren unterschiedlicher Größe zu finden. Diese Poren waren interkonnektierend und häufig mit blutgefäßführendem Bindegewebe gefüllt. (Abb. 34).

Um das subkutan implantierte Material herum war eine dicke Bindegewebeskapsel gebildet worden, die mit Blutgefäßen durchzogen war. Manchmal waren am Rand des Implantats kleine durch straff organisiertes Bindegewebe abgekapselte Zementstücke sichtbar (Abb. 33).

Abb. 33:



Histologischer Schnitt des subkutanen CaP-Gelatine-Z Implantats nach 12-wöchiger Implantation.

Sichtbar sind Reste des implantierten Materials umgeben von Weichgewebe, das häufig als straff organisiertes Bindegewebe zwischen den Materialresten zu liegen kommt.

SI = subkutan implantiertes Material

W = Weichgewebe

Pfeil = straff organisiertes Bindegewebe

Färbung nach Giemsa

Nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationsdauer konnten sowohl in den Poren des subkutanen Implantats wie auch im umliegenden Bindegewebe eine auf leicht entzündliche Reaktionen hindeutende geringe Anzahl an Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen gefunden werden (Abb. 34).

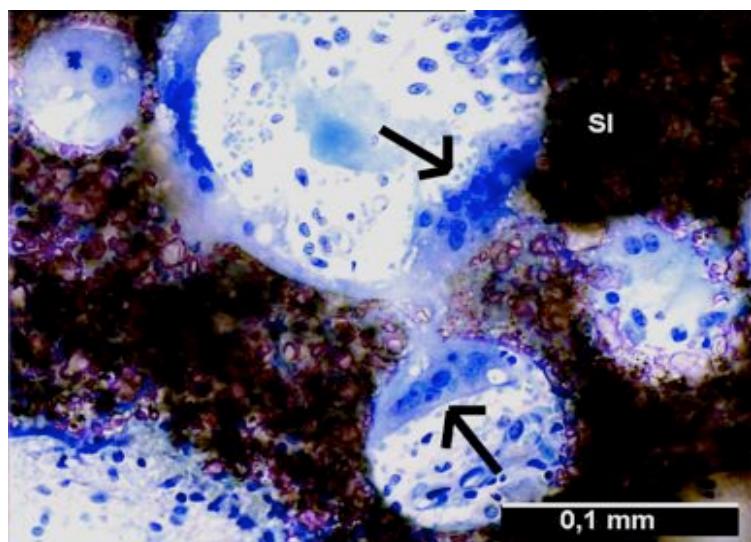


Abb. 34:

Histologischer Schnitt des subkutanen CaP-Gelatine-Z Implantats nach 20-wöchiger Implantation.

Sichtbar sind interkonnektierte Poren mit Fremdkörperriesenzellen.

SI = subkutan implantiertes Material

Pfeil = Fremdkörperriesenzelle

Färbung nach Giemsa

### 4.3.3 CaP-Gelatine-Soja-Z

#### Makroskopische Untersuchung

Den Defekt in der Femurkondyle bedeckte ein flacher Kallus. Soweit dies makroskopisch zu beurteilen war, bestand der Kallus zum größten Teil aus Knochen. Der Zement war gut in den Knochen integriert. Makroskopisch sichtbare Anzeichen einer Entzündung konnten nicht gefunden werden. Bei keinem Kaninchen war ein Austritt des Zements aus dem Bohrkanal in den Markraum hinein zu beobachten. Makroskopisch konnte häufig eine braungrüne oder gelbe Verfärbung des Implantationsgebiets beobachtet werden (Abb. 35).



Abb. 35:

Knochenscheibe mit CaP-Gelatine-Soja-Z nach 4 Wochen Implantation.

Makroskopisch ist nur noch eine geringe Restmenge an implantiertem Zement übrig. Der Pfeil markiert den Defektbereich.

#### Histologische Auswertung

##### Qualitative Auswertung

Im Zentrum des Defekts war nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit eine reduzierte, aber variable Menge an CaP-Gelatine-Z zu erkennen. Der verbleibende Zement wies viele Poren unterschiedlicher Größe auf. Allerdings konnten nur in randständigen Poren häufig neu gebildeter Knochen oder Weichgewebe (Bindegewebe, Knochenmark) gefunden werden (Abb. 36 und 37).

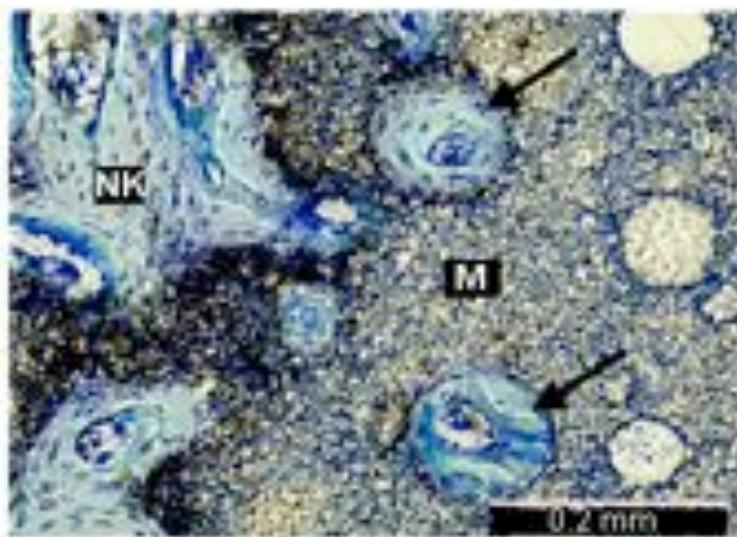


Abb. 36:

Histologischer Schnitt des CaP-Gelatine-Soja-Z nach 12-wöchiger Implantation im trabekulären Knochen. Zu sehen ist der enge Implantat-Knochen-Kontakt. Randständige Poren sind mit neu gebildetem Knochen gefüllt.

M = implantiertes Material

NK = neu gebildeter Knochen

Pfeil = neu gebildeter Knochen in randständigen Poren

Färbung nach Paragon

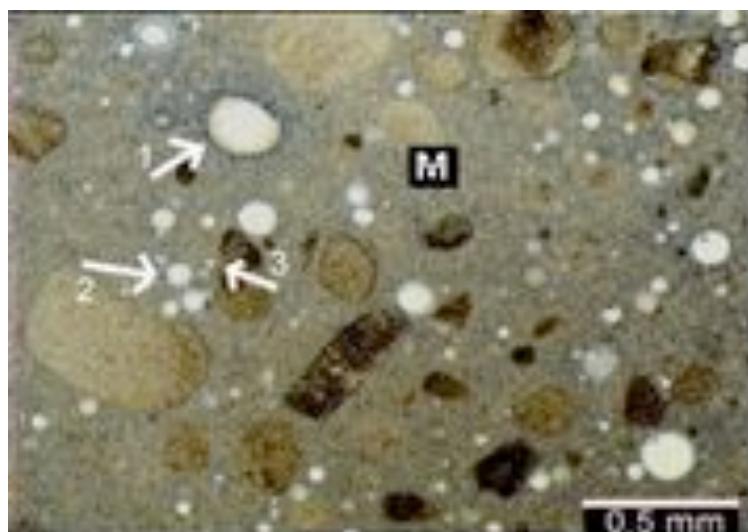


Abb. 37:

Histologischer Schnitt des CaP-Gelatine-Soja-Z nach 12-wöchiger Implantation im trabekulären Knochen. Zu sehen ist das Zentrum des implantierten Materials mit ungefüllten Poren unterschiedlicher Größe.

M = implantiertes Material

Pfeil 1-3 = ungefüllte Poren im Zentrum des Implantats

Färbung nach Paragon

Der Rand des Implantats war unregelmäßig. Der abgebaute Zement war durch Weichgewebe (Knochenmark, Bindegewebe) und neu gebildeten Knochen ersetzt. Der neu gebildete Knochen formte eine dichte Knochenlamelle um das verbleibende Material und hatte zu allen Implantationsperioden einen sehr engen Kontakt zum Zement (Abb. 36). Der Knochen in der Umgebung des Defekts wies vitale Osteozyten, Osteoblasten, Osteoid und vor allem nach 12 Wochen auch Osteoklasten auf. Dies spricht für ein reges Knochenremodeling.

An den Implantaträndern und in den randständigen Poren war zu jedem Implantationszeitpunkt zellulärer Materialabbau vor allem durch Makrophagen zu erkennen.

Zu allen Implantationszeitpunkten konnten sowohl in den Poren wie auch im umliegenden Bindegewebe eine auf leicht entzündliche Reaktionen hindeutende geringe Anzahl an Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen gefunden werden.

### Quantitative Auswertung

War CaP-Gelatine-Soja-Z implantiert, so war zu jedem Implantationszeitpunkt weniger als 80 % des Defekts mit Zement gefüllt (Abb. 38). Die verbleibende Menge an Zement variierte sehr stark. In der Menge des Restmaterials gab es zu den verschiedenen Implantationszeitpunkten keine signifikanten Unterschiede (Abb. 38). Der relative Anteil an Knochen im Defektbereich war zu allen Implantationszeitpunkten vergleichbar mit dem Anteil an Knochensubstanz von trabekulärem Knochen nicht operierter Kaninchen. Allerdings weist trabekulärer Knochen nicht operierter Kaninchen abhängig von der Materialrestmenge im implantattragenden Knochen signifikant mehr Weichgewebe im Defektbereich auf (Abb. 38).

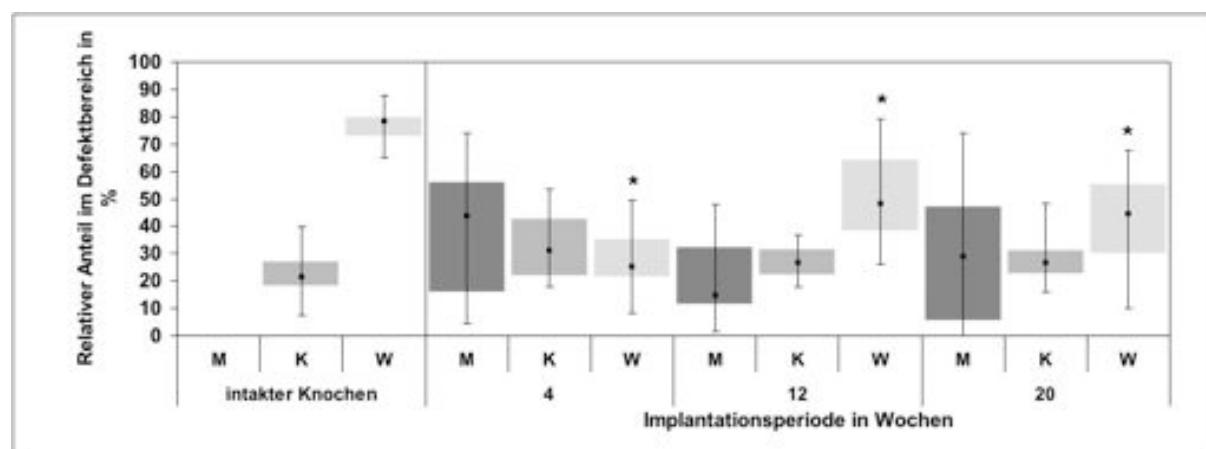


Abb. 38

*CaP-Gelatine-Soja-Z: Relativer Anteil (%) an Material (M), Knochen (K) und Weichgewebe (W) im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.*

\*signifikanter Unterschied zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen ( $p < 0,05$ )

In der Implantatumgebung konnte während der gesamten Implantationsdauer ein erhöhter relativer Anteil an Knochen, aber geringerer relativer Anteil an Weichgewebe (vor allem Knochenmark) im Vergleich zum trabekulären Knochen

nicht operierter Kaninchen gefunden werden. Nach 20-wöchiger Implantation betrugen die relativen Anteile an Knochen und Weichgewebe in diesem Bereich jeweils ungefähr 50 % (Abb. 39).

In der direkten Implantatumgebung erschien der Knochen im histologischen Schnitt sehr dicht. Der relative Anteil an Knochen war im Vergleich zum nicht operierten trabekulären Knochen erhöht und änderte sich über die Implantationszeit nicht signifikant. Der relative Anteil an Weichgewebe war hingegen im Vergleich zum nicht operierten trabekulären Knochen erniedrigt (Abb. 39).

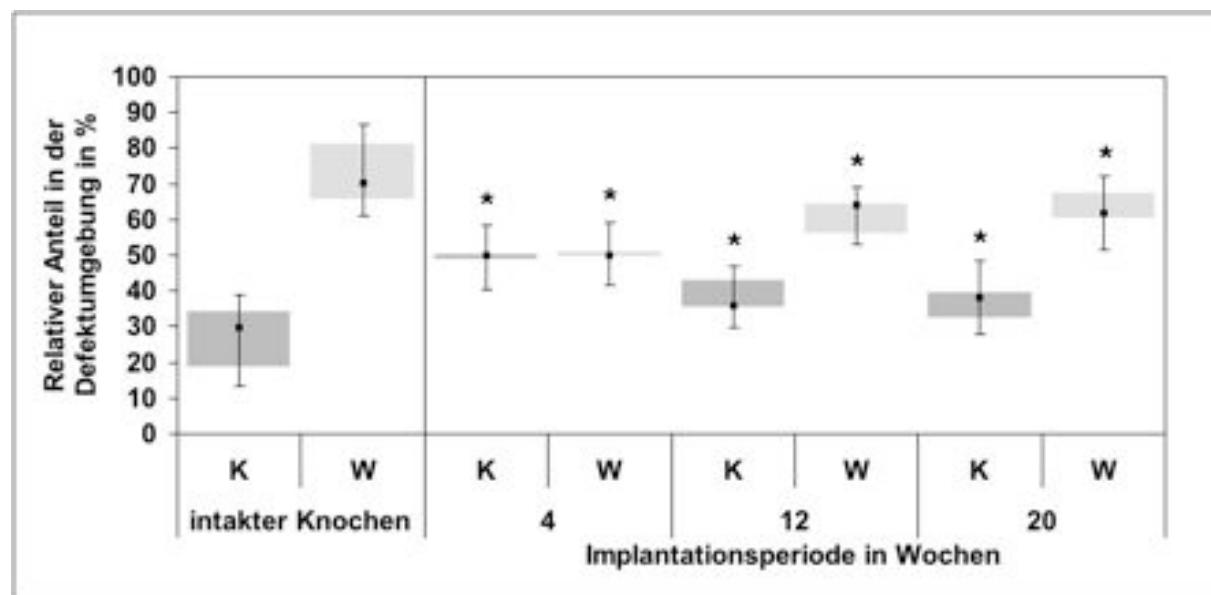


Abb. 39:

*CaP-Gelatine-Soja-Z: Relativer Anteil (%) an Knochen (K) und Weichgewebe (W) in der Defektumgebung nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.*

\* signifikanter Unterschied zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen ( $p < 0,05$ )

## Biomechanische Prüfung

Im Vergleich zum trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen war die Steifigkeit im Defektbereich nach 12 und 20 Wochen, in der Defektumgebung nach 4 und 20 Wochen signifikant erhöht (Abb. 40 und 41).

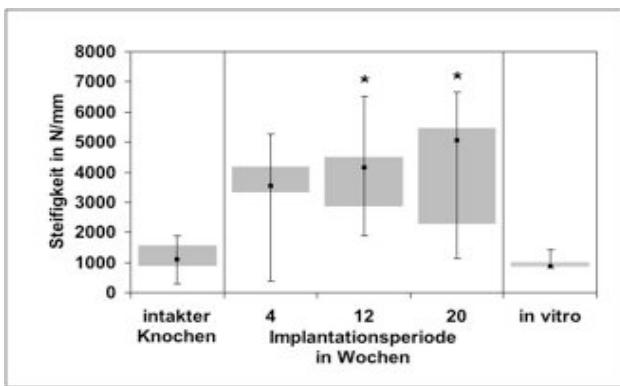


Abb. 40:

CaP-Gelatine-Soja-Z: Steifigkeit (N/mm) im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.

\*signifikanter Unterschied zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen ( $p < 0,05$ )

Zusätzlich aufgetragen ist die Steifigkeit des *in vitro* ausgehärteten Zements. Hierfür wurden keine statistischen Berechnungen durchgeführt

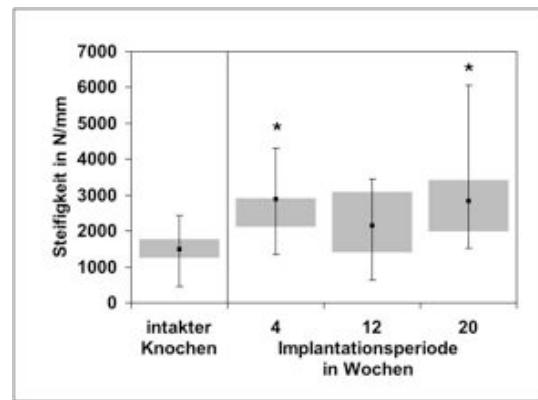


Abb. 41:

CaP-Gelatine-Soja-Z: Steifigkeit (N/mm) in der Defektumgebung nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.

\*signifikanter Unterschied zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen ( $p < 0,05$ )

## pQCT-Auswertung

Im Vergleich zum trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen war die Dichte im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen, in der Defektumgebung nach 4 und 12 Wochen signifikant erhöht (Abb. 42 und 43).

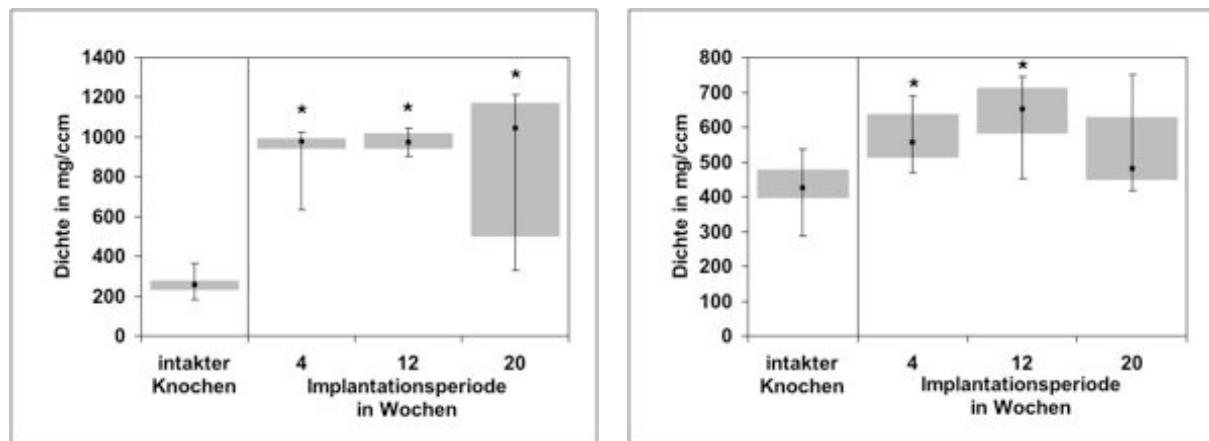


Abb. 42:

*CaP-Gelatine-Soja-Z: Dichte (mg/ccm) im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.*

\*signifikanter Unterschied zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen ( $p < 0,05$ )

Abb. 43:

*CaP-Gelatine-Soja-Z: Dichte (mg/ccm) in der Defektumgebung nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.*

\*signifikanter Unterschied zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen ( $p < 0,05$ )

## Subkutanes Implantat (qualitative Auswertung)

Die Menge des subkutan implantierten CaP-Gelatine-Soja-Z verringerte sich über die Implantationszeit kaum, variierte jedoch interindividuell etwas (Abb. 44). Nach allen Implantationszeitpunkten konnte im histologischen Schnitt ein geringer zellulärer Abbau des Materials beobachtet werden. Sowohl in den Poren wie auch in dessen Verbindungsstückchen war Weichgewebe wie Bindegewebe und Blutgefäße zu erkennen (Abb. 45). Um das subkutan implantierte Material herum war direkt angrenzend eine dicke Bindegewebeskapsel zu beobachten. Dieses Bindegewebe war von einigen Blutgefäßen durchzogen. Im Bindegewebe konnten nach allen Implantationszeitpunkten eine auf leicht entzündliche Reaktionen hindeutende geringe Anzahl an Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen gefunden werden.



Abb. 44:

Subkutanes Implantat aus CaP-Gelatine-Soja-Z nach 12-wöchiger Implantation.

Auf der Abbildung sichtbar sind in Bindegewebe eingebettete neu gebildete Blutgefäße. Der unregelmäßige Implantatrand deutet auf den Abbau des Zements hin.

SI = subkutanes Implantat

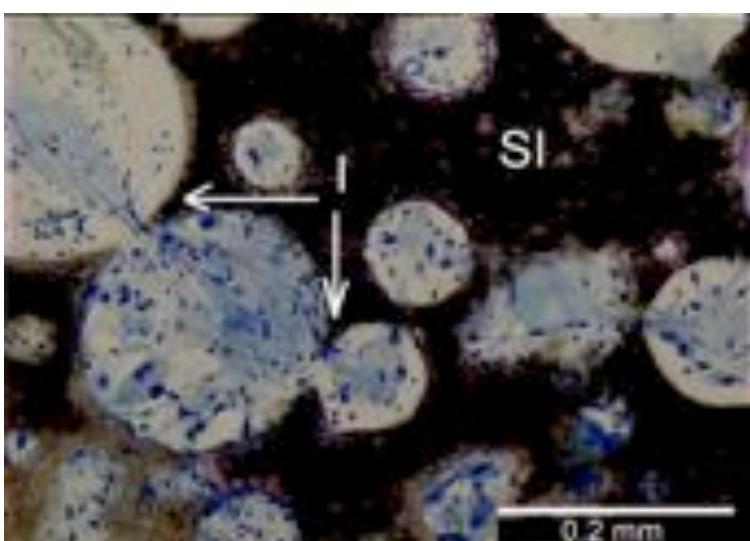


Abb. 45:

Histologischer Schnitt des subkutanen CaP-Gelatine-Soja-Z Implantats nach 20-wöchiger Implantation.

Sichtbar sind mit Bindegewebe und Blutgefäßen durchzogene Poren und deren Interkonnectionen.

SI = subkutan implantiertes Material

I und Pfeil = Interkonnectionen

Färbung nach Giemsa

#### 4.3.4 CaP-Alginat-Z

##### Makroskopische Auswertung

Den Defekt in der Femurkondyle bedeckte ein flacher Kallus. Soweit dies makroskopisch zu beurteilen war, bestand der Kallus zum größten Teil aus Knochen. Der Zement war gut in den Knochen integriert. Makroskopisch sichtbare Anzeichen einer Entzündung konnten nicht gefunden werden. Bei manchen Kaninchen war ein Austritt des Zements aus dem Bohrkanal in den Markraum hinein zu beobachten (Abb. 46). Da der Bohrkanal trotzdem nahezu vollständig gefüllt war, kann davon ausgegangen werden, dass der Austritt des Materials in den Markraum *intra operationem* stattgefunden hatte. Die Restmenge des Zements variierte von Kaninchen zu Kaninchen zu jedem untersuchten Implantationszeitpunkt stark.

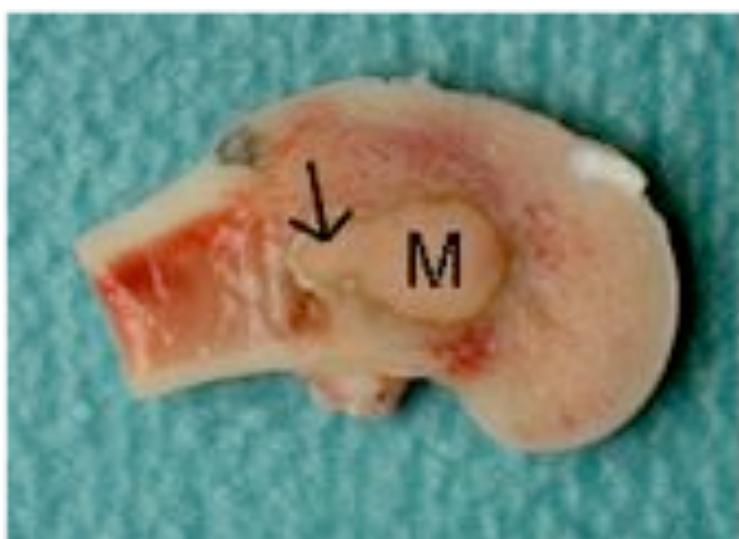


Abb. 46:

Knochenscheibe mit CaP-Alginat-Z nach 4-wöchiger Implantation.  
Makroskopisch sichtbar sind die große Menge an Material (M) und der Austritt des Materials in den Markraum (Pfeil).

##### Histologische Untersuchungen

###### Qualitative Auswertung

Im Zentrum des Defekts war auch nach 20 Wochen noch ein hoher, aber stark variierender Anteil an Material vorhanden. Der verbliebene Zement enthielt viele Poren unterschiedlicher Größe. Allerdings waren nur wenige randständige Poren mit Fibroblasten und wenig Weichgewebe (Bindegewebe) gefüllt. Die Poren im Zentrum des Defekts verblieben leer.

Der Rand des Implantats war unregelmäßig. Der abgebaute Zement war durch Weichgewebe (Knochenmark, Bindegewebe) und neu gebildeten Knochen ersetzt. Der Kontakt des Materials zum umliegenden Knochen war nicht überall sehr eng. Häufig war eine Schicht aus Weichgewebe (v.a. Bindegewebe) zwischen Zement und neu gebildetem Knochen vorhanden (Abb. 47).

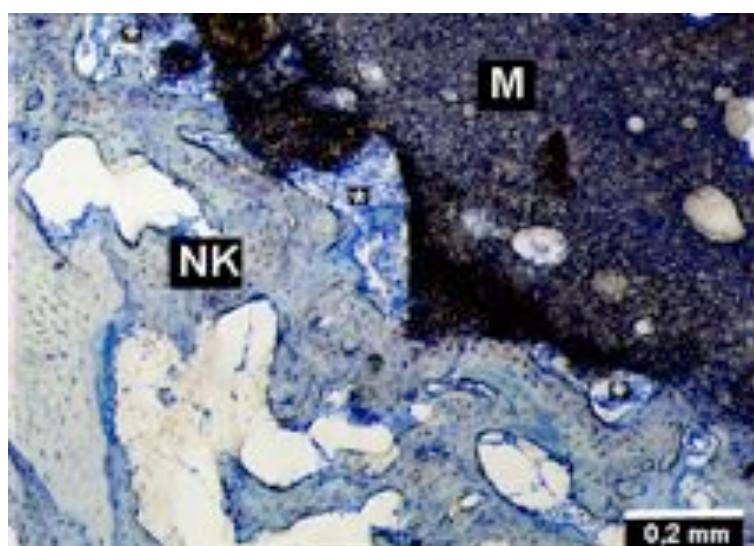


Abb. 47:

*Histologischer Schnitt des CaP-Alginat-Z nach 12-wöchiger Implantation im trabekulären Knochen. Zu sehen ist der häufig lockere Implantat-Knochen-Kontakt, welcher durch eine bindegewebige Zwischenschicht gekennzeichnet ist.*

*M = implantiertes Material*

*NK = neu gebildeter Knochen*

*\* = bindegewebige Zwischenschicht*

*Färbung nach Paragon*

Der neu gebildete Knochen in der Umgebung des Defekts wies vitale Osteozyten, Osteoblasten, Osteoid und vor allem nach 4 Wochen auch Osteoklasten auf. Dies spricht für ein reges Knochenremodeling.

Nach 4 Wochen konnten in der Nähe der Zementoberfläche auch einige chondroblastenähnliche Zellen gefunden werden (2 von 7 Kaninchen) (Abb. 48).

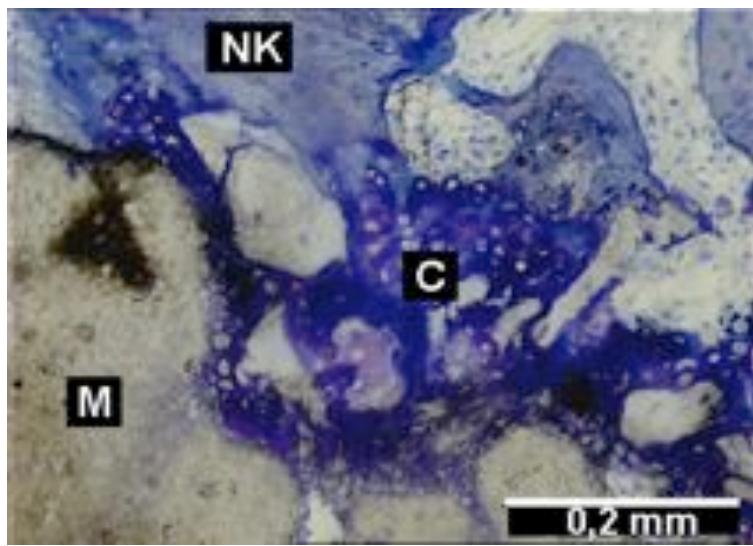


Abb. 48:

*Histologischer Schnitt des CaP-Alginat-Z nach 4-wöchiger Implantation im trabekulären Knochen. Zu sehen sind der unregelmäßige Implantatrand und chondroblastenähnliche Zellen in der Umgebung des Zements.*

*M = implantiertes Material*

*NK = neu gebildeter Knochen*

*C = chondroblastenähnliche Zellen*

*Färbung nach Paragon*

Obwohl die Resorptionsrate des CaP-Alginat-Z insgesamt niedrig war, konnte auf der Materialoberfläche ein zellulärer Abbau des Zements beobachtet werden. Hierbei waren vor allem Makrophagen beteiligt.

Zu allen Implantationszeitpunkten waren geringe Entzündungsreaktionen mit Beteiligung von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen zu finden.

### Quantitative Auswertung

War CaP-Alginat-Z implantiert, so war der Defekt mit einer stark variierenden Restmenge an Zement gefüllt (ca. 40-90 %) (Abb. 49). Der relative Anteil von CaP-Alginat-Z war nach 20 Wochen im Vergleich zur 4-wöchigen Implantation signifikant erniedrigt. Während der gesamten Implantationszeit veränderte sich der relative Anteil an Knochen in der Defektregion nicht. Nach 4- und 20-wöchiger Implantation lag der relative Anteil an Knochen im selben Bereich wie der des trabekulären Knochens nicht operierter Kaninchen. Der relative Anteil des Weichgewebes jedoch zeigte signifikante Unterschiede zu dem des intakten trabekulären Knochens nicht operierter Kaninchen (Abb. 49).

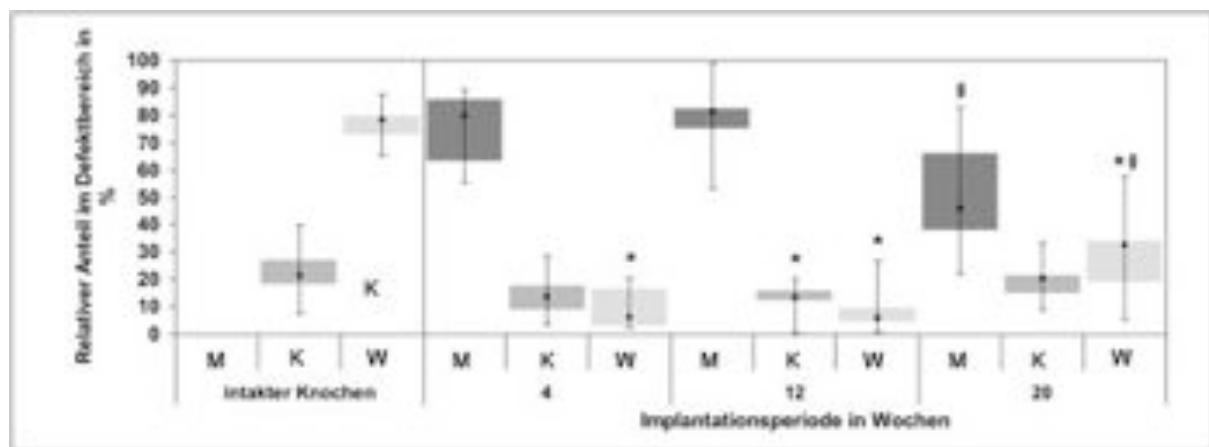


Abb. 49:

CaP-Alginat-Z: Relativer Anteil (%) an Material (M), Knochen (K) und Weichgewebe (W) im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.

\*signifikanter Unterschied zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen ( $p < 0,05$ )

§ signifikanter Unterschied zu 4 Wochen Implantationszeit ( $p < 0,05$ )

In der Implantatumgebung war im Vergleich zum nicht operierten trabekulären Knochen der relative Anteil an Knochen nach 4 und 12 Wochen größer und der des Weichgewebes nach allen Implantationszeitpunkten geringer. Der relative Anteil an Knochen veränderte sich während der gesamten Implantationsdauer nicht signifikant (Abb. 50).

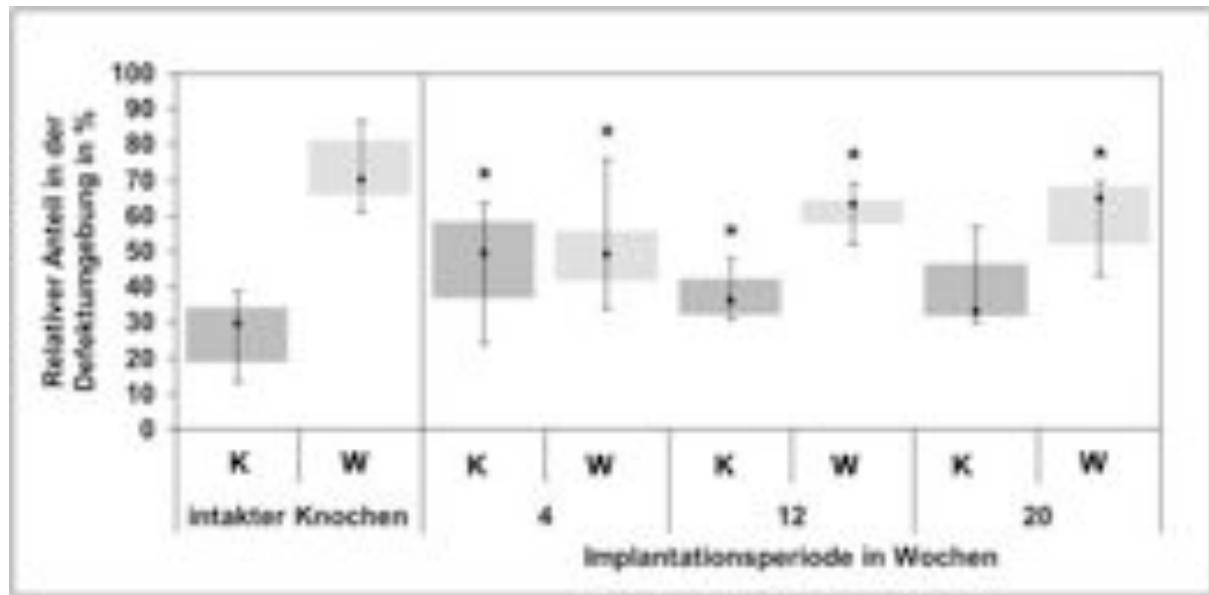


Abb. 50:

CaP-Alginat-Z: Relativer Anteil (%) an Knochen (K) und Weichgewebe (W) in der Defektumgebung nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.

\* signifikanter Unterschied zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen ( $p < 0,05$ )

## Biomechanische Prüfung

Im Vergleich zum trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen war die Steifigkeit im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen und in der Defektumgebung nach 20 Wochen signifikant erhöht (Abb. 51 und 52).

Im Defektbereich gab es einen signifikanten Anstieg der Steifigkeit nach 20 Wochen im Vergleich zur 4-wöchigen Implantation (Abb. 51).

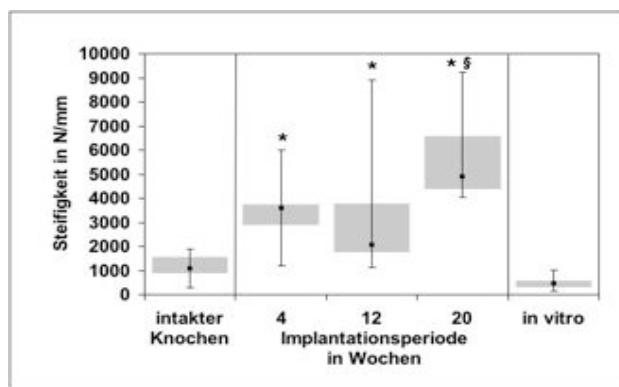


Abb. 51:

*CaP-Alginat-Z: Steifigkeit (N/mm) im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.*

*\*signifikanter Unterschied zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen*

*§ signifikanter Unterschied zu 4 Wochen Implantationszeit ( $p < 0,05$ )*

*Zusätzlich aufgetragen ist die Steifigkeit des in vitro ausgehärteten Zements. Hierfür wurden keine statistischen Berechnungen durchgeführt.*

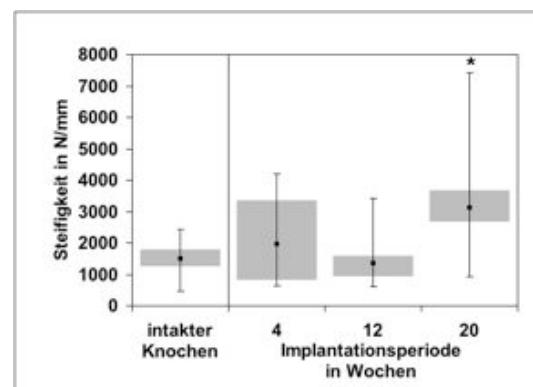


Abb. 52:

*CaP-Alginat-Z: Steifigkeit (N/mm) in der Defektumgebung nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.*

*\*signifikanter Unterschied zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen ( $p < 0,05$ )*

## pQCT-Auswertung

Im Vergleich zum trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen war die Dichte im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen, in der Defektumgebung nach 12 und 20 Wochen signifikant erhöht (Abb. 53 und 54).

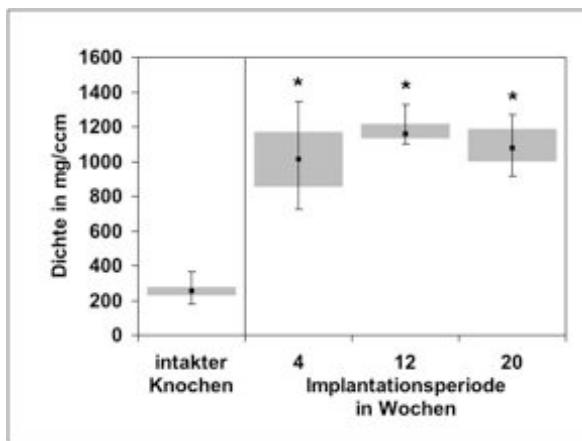


Abb. 53:

*CaP-Alginat-Z: Dichte (mg/ccm) im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.*

\*signifikanter Unterschied zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen ( $p < 0,05$ )

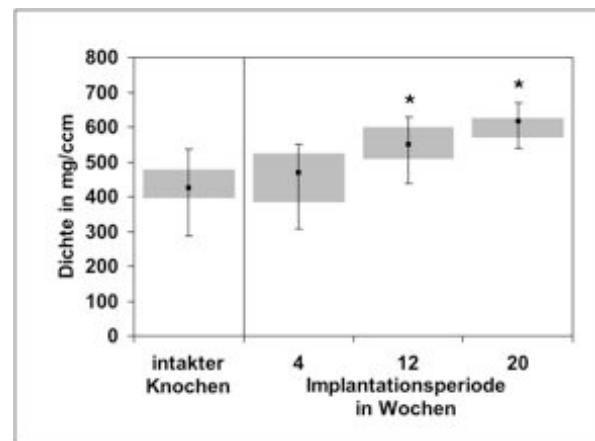


Abb. 54:

*CaP-Alginat-Z: Dichte (mg/ccm) in der Defektumgebung nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.*

\*signifikanter Unterschied zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen ( $p < 0,05$ )

## Subkutanes Implantat (qualitative Auswertung)

Die Menge des subkutan implantierten CaP-Alginat-Z verringerte sich über die Implantationszeit kaum (Abb. 55), variierte jedoch interindividuell etwas. Im histologischen Schnitt konnte man erkennen, dass sich nur in den sehr randständigen Poren und deren wenigen Verbindungsstücken Zellen (Fibroblasten, Fremdkörperriesenzellen) und Weichgewebe (Bindegewebe) befanden. Die Poren im Implantatinneren verblieben leer. Das Implantat war in der Regel mit einer mäßig dicken Bindegewebeschicht bedeckt. Dieses Bindegewebe war von einigen Blutgefäßen durchzogen. Im Bindegewebe konnten nach allen Implantationszeitpunkten eine auf leicht entzündliche Reaktionen hindeutende geringe Anzahl an Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen gefunden werden (Abb. 56).



Abb. 55:

*Subkutanes Implantat aus CaP-Alginat-Z nach 4-wöchiger Implantation.*

*Auf der Abbildung sichtbar ist die um das Implantat gebildete Bindegewebeskapsel.*

*SI = subkutanes Implantat*

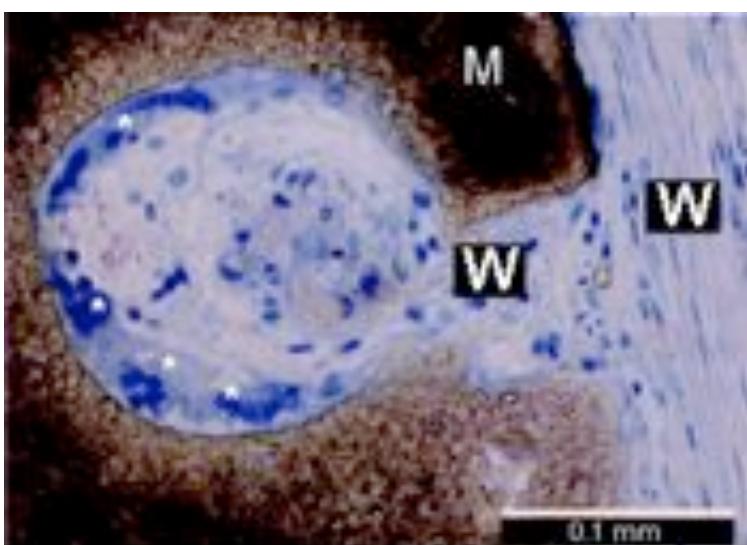


Abb. 56:

*Histologischer Schnitt des subkutanen CaP-Alginat-Z Implantats nach 4-wöchiger Implantation.*

*Sichtbar ist eine mit Weichgewebe (Bindegewebe) und Fremdkörperriesenzellen gefüllte randständige Pore.*

*M = subkutan implantiertes Material*

*W = Weichgewebe*

*Färbung nach Giemsa*

### **4.3.5 Vergleich der Kompositmaterialien mit dem Referenz-Zement**

#### **Makroskopische Auswertung**

Die makroskopischen Beobachtungen haben unabhängig vom implantierten Material ein gutes Einwachsen der Zemente in den Knochen gezeigt. Dabei traten makroskopisch keinerlei Anzeichen einer Entzündungsreaktion auf.

Wenn CaP-Referenz-Z oder CaP-Alginat-Z implantiert waren, so konnte ein Austritt der Zemente in den Markraum beobachtet werden (Abb. 13 und 46). Waren CaP-Gelatine-Z oder CaP-Gelatine-Soja-Z implantiert, so wurde dieses Phänomen nicht beobachtet.

Nach 20 Wochen war das meiste des implantierten Referenzmaterials noch vorhanden. Wenn CaP-Alginat-Z implantiert war, konnte makroskopisch eine ähnliche, aber interindividuell stark schwankende Menge an implantiertem Restzement nach derselben Zeit beobachtet werden. Ein deutlicher Unterschied hingegen war sichtbar, wenn CaP-Gelatine-Z oder CaP-Gelatine-Soja-Z implantiert waren. Im Vergleich zum Referenzmaterial war nach 20 Wochen eine deutlich geringere Menge an implantiertem Material übrig.

#### **Histologische Untersuchungen**

Es konnte beobachtet werden, dass alle Zemente durch Zellen (v.a. Makrophagen) abgebaut wurden. Diese konnten vornehmlich am Implantatrand angetroffen werden, was einen überwiegenden Abbau des Zements vom Defektrand zum Defektzentrum hin vermuten lässt.

Für einen Abbau der Zemente und Ersatz durch neu gebildeten Knochen vom Implantatrand her spricht auch die in der Fluoreszenzhistologie gefundene Lokalisation und Abfolge der Farbketten im neu gebildeten Knochen. Die durch Calceingrün erzeugten grünen Ketten wurden im äußeren Bereich des Defekts gefunden. Die durch Oxytetracyklin erzeugten gelben Farbketten konnten eher zementnah weiter innen im Defektbereich nachgewiesen werden. Im Implantatzentrum selbst konnten keinerlei Fluoreszenzfärbbanden gefunden werden. Im Vergleich zum Referenzmaterial degradierten CaP-Gelatine-Z und CaP-Gelatine-Soja-Z wesentlich schneller. Der Abbau des CaP-Alginat-Z erfolgte zwar ebenfalls

schneller als der des CaP-Referenz-Z, aber langsamer als der bei den beiden anderen Kompositen (Abb. 57).

Im Referenzmaterial konnten lediglich ein paar wenige kleine Poren ohne Zell- oder Gewebeinfiltration gefunden werden. Die Komposite besaßen im Gegensatz dazu eine hohe Porosität mit Poren unterschiedlicher Größe. Die Poren im Implantatinneren waren ebenfalls ohne Zell- und Gewebeinfiltration. Die randständigen Poren im CaP-Alginat-Z jedoch waren mit Zellen (Fibroblasten, Makrophagen) und Weichgewebe (Bindegewebe) gefüllt. In den randständigen Poren des CaP-Gelatine-Z und des CaP-Gelatine-Soja-Z konnte teilweise sogar zusätzlich neu gebildeter Knochen beobachtet werden.

Ein enger Kontakt zwischen dem implantierten Material und dem umgebenden Knochen konnte nach allen drei Implantationszeitpunkten beobachtet werden, wenn CaP-Referenz-Z, CaP-Gelatine-Z oder CaP-Gelatine-Soja-Z implantiert war. Im Gegensatz hierzu konnte nach der Implantation von CaP-Alginat-Z an vielen Stellen der Materialoberfläche eine größere Menge Bindegewebe zwischen dem Zement und dem umgebenden Knochen gefunden werden.

Unabhängig vom implantierten Material jedoch konnte um den Zement herum neu gebildeter Knochen gefunden werden. Dieser wies vitale Osteozyten, Osteoblasten und Osteoid auf, was für eine rege metabolische Aktivität des neu gebildeten Knochens spricht. Es konnten bei keinem der implantierten Zemente ausgeprägte entzündliche Reaktionen festgestellt werden. Es konnten lediglich wenige Entzündungszellen (Makrophagen, Fremdkörperriesenzellen) ausfindig gemacht werden.

Im Defektbereich selbst konnte bei allen Kompositen im Vergleich zum Referenzmaterial eine größere Menge an neu gebildetem Knochen gefunden werden. Eine Ausnahme hiervon machen lediglich CaP-Alginat-Z und CaP-Gelatine-Z nach 12-wöchiger Implantation (Abb. 58).

Nach 20 Wochen Implantationsdauer konnte im Defektbereich bei allen Kompositmaterialien im Vergleich zum Referenzmaterial ein wesentlich höherer Anteil an Weichgewebe festgestellt werden (Abb. 59).

In der Defektumgebung war der einzige histologisch zu beobachtende Unterschied der Komposite zum Referenzmaterial ein signifikanter Anstieg des Weichgewebes nach 20 Wochen, wenn CaP-Gelatine-Soja-Z implantiert war.

## Biomechanische Prüfung

Im Vergleich zum Referenzmaterial wies der Defekt, wenn CaP-Gelatine-Z implantiert war, nach allen 3 Implantationszeitpunkten eine signifikant niedrigere Steifigkeit auf. Die anderen zwei Komposite unterschieden sich in der Steifigkeit im Defektbereich nicht signifikant vom Referenzmaterial (Abb. 60).

In der Defektumgebung gab es zwischen den Zementen keinerlei signifikanten Unterschiede in der Steifigkeit.

## pQCT-Auswertung

Zu jedem Implantationszeitpunkt zeigten die Kompositmaterialien im Defektbereich eine geringere Dichte als das Referenzmaterial (Abb. 61).

In der Defektumgebung zeigte nur CaP-Alginat-Z zu jedem Implantationszeitpunkt eine niedrigere Dichte als CaP-Referenz-Z. Die anderen beiden Komposite zeigten in der Dichte der Defektumgebung keine signifikanten Unterschiede zum Referenzmaterial.

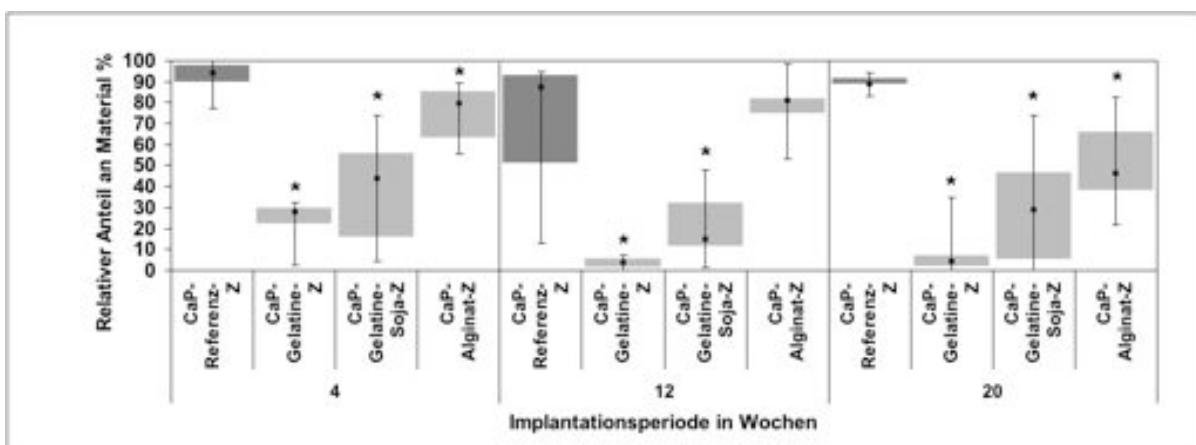


Abb. 57

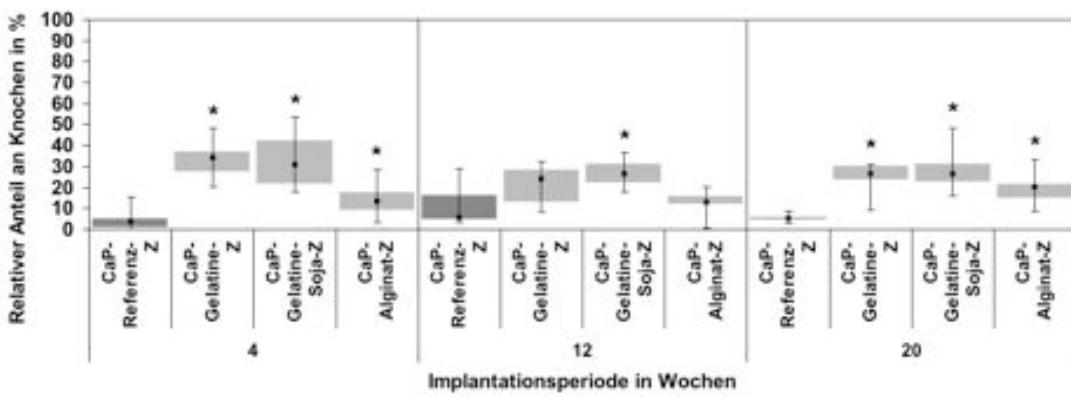


Abb. 58

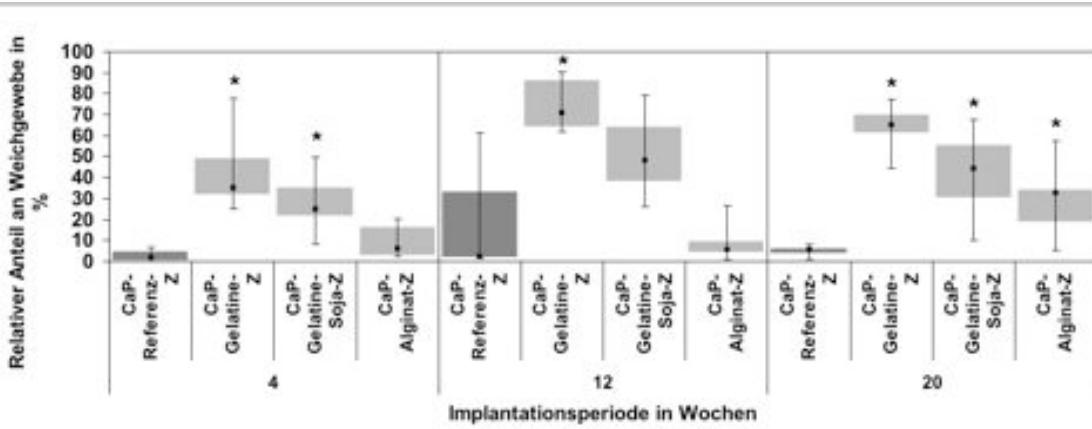


Abb. 59

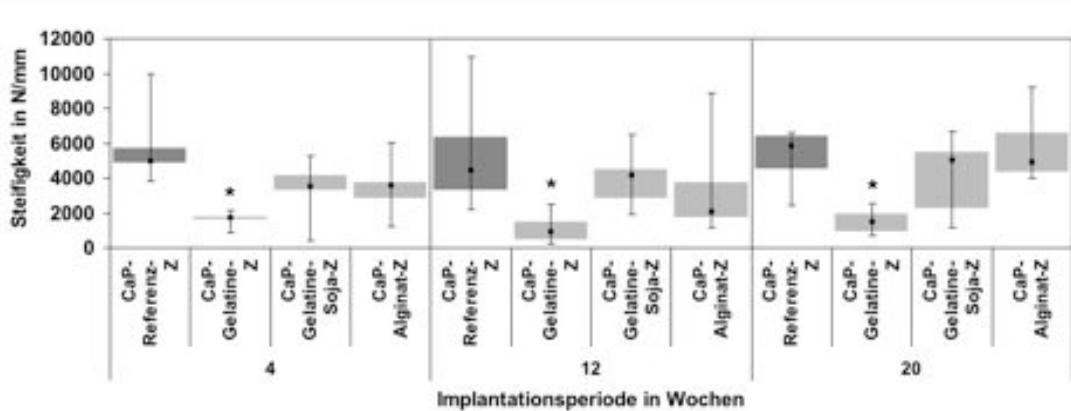


Abb. 60

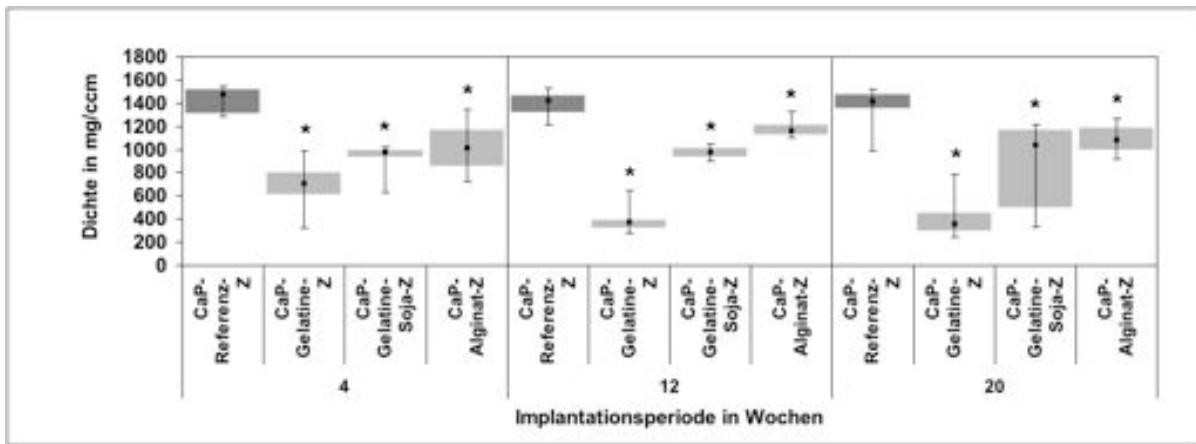


Abb. 61

Vergleich der Kompositmaterialien (CaP-Gelatine-Z, CaP-Gelatine-Soja-Z, CaP-Alginat-Z) mit dem Referenzmaterial (CaP-Referenz-Z) nach einer Implantationsperiode von 4, 12 und 20 Wochen im trabekulären Knochen der Femurkondyle.

Abb. 57: Relativer Anteil (%) an Material im Defektbereich.

Abb. 58: Relativer Anteil (%) an neu gebildetem Knochen im Defektbereich.

Abb. 59: Relativer Anteil (%) an Weichgewebe im Defektbereich.

Abb. 60: Steifigkeit (N/mm) im Defektbereich.

Abb. 61: Dichte (mg/ccm) im Defektbereich.

\*signifikanter Unterschied zum Referenzmaterial

## **5 Diskussion**

### **5.1 Modell**

Um Knochenersatzmaterialien zu testen, die zur Anwendung am oder im Menschen kommen sollen, sollte ein Tiermodell gewählt werden, das einen dem Menschen ähnlichen Knochen aufweist (Wang et al. 1998). Wang et al. konnten zeigen, dass der Kaninchenknochen wie auch der Knochen des Pavians eine dem menschlichen Knochen ähnliche Mineraldichte aufweisen. Allerdings postulierten sie für das Kaninchen eine rein primäre Knochenstruktur, die sich von der sekundären Osteonenstruktur des menschlichen Knochens unterscheidet. Dies wurde von Hörner et al. teilweise widerlegt (Hörner et al. 1997). Er fand heraus, dass die Grundstruktur des Kaninchenknochens zwar aus primären Osteonen besteht, sich aber in der äußersten Kompakta bereits in jungen Kaninchen eine sekundäre Osteonenstruktur entwickelt. Im Laufe der Altersentwicklung der Kaninchen nimmt der Umfang der sekundären Osteone und der Schaltlamellen zu. Dadurch wird der Knochen des Kaninchens mit zunehmendem Alter dem des Menschen immer ähnlicher. Was jedoch die direkte Übertragung der im Kaninchen erhobenen Ergebnisse auf den Menschen besonders schwierig macht, ist die vergleichsweise hohe Remodelingrate des Kaninchenknochens. Handelt es sich allerdings wie bei der vorliegenden Studie um einen ersten Screening-Versuch bezüglich der Biokompatibilität und Resorptionseigenschaft neu entwickelter Knochenersatzstoffe, so ist das Kaninchen trotzdem sehr gut geeignet, um die verschiedenen Knochenersatzstoffe zu vergleichen. Abgesehen von der kurzen Versuchszeit, die durch die hohe Regenerations- und Remodelingrate zustande kommt, ist das Kaninchen einfach im Handling und sparsam im Platzbedarf. So können durch den Kaninchenversuch erste richtungsweisende Ergebnisse erzielt werden. Knochenersatzstoffe, die sich in Screening-Studien als viel versprechend darstellen, müssen jedoch vor der Anwendung weiter untersucht werden. Hierfür sollten Versuchstiere herangezogen werden, die in der jeweils gewünschten Zielgröße (mechanische Belastbarkeit, Abbauzeit und Ersatz durch Knochen etc.) dem Menschen ähnlicher sind, wie zum Beispiel das Schaf (Pearce et al. 2007).

Als Implantationsmodell wird in der Literatur häufig ein Bohrlochdefekt verwendet. Ein beim Kaninchen oft verwendeter Bohrlochdefekt in der distalen Femurkondyle besitzt 6 mm im Durchmesser und etwa 10 mm in der Tiefe. Dieser wird im Allgemeinen als Defekt kritischer Größe angesehen. Als Defekt kritischer Größe wird ein Defekt bezeichnet, der im untersuchten Zeitraum nicht spontan zur Heilung kommt. LeGuehennec et al. konnten allerdings zeigen, dass an dieser Lokalisation auch ein Defekt von nur 4 mm im Durchmesser binnen eines Jahres nicht von alleine heilt und somit ebenfalls schon als Defekt kritischer Größe anzusehen ist (Le Guehennec et al. 2005). Der in unserer Studie verwendete Defekt hatte einen Durchmesser von 5 mm und eine Tiefe von 10 mm. Bei einer Standzeit von maximal 20 Wochen kann er somit ebenfalls als Defekt kritischer Größe eingestuft werden. Die Richtigkeit dieser Annahme bestätigten auch zwei Leerdefekte unserer Studie, die nach 20 Wochen nicht geheilt waren.

## **5.2 Referenzmaterial aus Hydroxylapatit (CaP-Referenz-Z)**

Kalziumphosphat-Keramiken (CaP-Keramiken) haben sich auf Grund ihrer allgemein anerkannten guten Biokompatibilität in vielen klinischen Anwendungen durchgesetzt (Fraendorf und Sünnig 2007). Zu den Kalziumphosphat-Keramiken gehören auch die Hydroxylapatite, insbesondere das kalziumdefiziente Hydroxylapatit, das in dieser Studie den Hauptbestandteil der Zemente ausmachte. Das verwendete Referenzmaterial war ein fast reines kalziumdefizientes Hydroxylapatit. Lediglich ein sehr geringer Anteil an  $\alpha$ -Trikalziumphosphat aus der pulverförmigen Ausgangskomponente konnte im ausgehärteten Zement nachgewiesen werden (unveröffentlichte Ergebnisse Prof. Planell, Universitat Politecnica de Catalunya, Spanien). Die sehr gute Biokompatibilität konnte übereinstimmend mit der Literatur auch in der vorliegenden Studie bestätigt werden (Cheung und Haak 1989; Gregoire et al. 1990; Hench und Wilson 1993).

In unserer Studie konnte eine im Vergleich zum trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen signifikante Erhöhung der Mineraldichte im Defektbereich zu allen Implantationszeitpunkten nachgewiesen werden. Die Mineraldichte wurde in mg Hydroxylapatit/ccm gemessen. Auf Grund dessen, dass der Defekt zu allen Implantationszeitpunkten eine große Menge an dichtem aus Hydroxylapatit

bestehendem Referenzmaterial aufwies, ist dieses Ergebnis nur folgerichtig. Die Knochenmatrix selbst besteht zwar etwa zu 70 % auch aus Hydroxylapatit, war aber vor allem beim trabekulären Knochen der nicht operierten Kaninchen mit vielen Hohlräumen durchzogen, weshalb die Mineraldichte im intakten spongiösen Knochen deutlich niedriger war als im Zement.

Der im Defekt verbliebene Rest des Referenz-Zements war in dieser Studie umgeben von einer dichten Knochenlamelle, die sehr engen Kontakt zum Zement hatte. Es gab nur sehr wenige kleine Stellen, an denen das Implantat durch eine bindegewebige Schicht vom umgebenden Knochen getrennt war. Diese Beobachtungen decken sich mit denen anderer Forschergruppen (Daculsi et al. 1990; Kasten et al. 2008; Tracy und Doremus 1984). Eine osteokonduktive Eigenschaft konnte dem Referenz-Zement somit nachgewiesen werden. Osteoinduktive Eigenschaften nach ektoper subkutaner Implantation allerdings wurden wie in der Studie von Drobeck et al. nicht gefunden. Drobeck et al. implantierten Hydroxylapatit in Granula- und Tablettenform subkutan in Ratten und Beagel und fanden ebenfalls keine Knochenneubildung um das Implantat (Drobeck et al. 1984).

Vor allem dichte Hydroxylapatite werden auf Grund ihrer äußerst langsamen Resorption als langzeitstabile Biomaterialien angesehen (Epple und Bäuerlein 2007). Eine langsame Degradation konnte auch von uns in der vorliegenden Studie gezeigt werden. Trotz der hohen Stoffwechsel- und Remodelingrate des Kaninchens war nach 20-wöchiger Implantation der größte Teil des implantierten Referenz-Zements noch vorhanden. Allerdings konnte zu jedem Implantationszeitpunkt ein geringer zellulärer Abbau des kalziumdefizienten Hydroxylapatits festgestellt werden. Auch in anderen Studien wurde gezeigt, dass Hydroxylapatit grundsätzlich zellulär abgebaut werden kann. Daculsi et al. verglichen zum Beispiel den Abbau von synthetisch hergestelltem und biologisch gewonnenem Hydroxylapatit in der Ratte, im Kaninchen und in einer klinischen Humanstudie. Das synthetisch hergestellte Hydroxylapatit wurde hierbei sowohl zellulär wie auch über chemische Lösungsprozesse degradiert (Daculsi et al. 1989).

CaP-Keramiken besitzen abhängig von ihrer Porosität eine dem trabekulären Knochen ähnliche Druckfestigkeit (Jarcho 1981). Dichte CaP-Keramiken können Druckfestigkeiten erreichen, die sogar im Bereich des kortikalen Knochens liegen. In

unserer Studie konnten wir beobachten, dass die Steifigkeit des *in vitro* ausgehärteten CaP-Referenz-Z geringfügig höher war als die des trabekulären Kaninchenknochens. Die Steifigkeit des implantierten Zements war zu allen Implantationszeitpunkten deutlich höher als die des trabekulären nicht operierten Kaninchenknochens und die des *in vitro* ausgehärteten Zements. Der wenig abgebaute Zement wurde zu allen drei Implantationszeitpunkten von einer sehr dichten Knochenlamelle umgeben. Diese dicht gepackte, stark mit dem Implantat verzahnte Knochenlamelle könnte der Grund für die erhöhte Steifigkeit sein.

Die CaP-Keramiken sind allerdings zu spröde, um einen mechanisch belasteten Defekt ohne weitere Stabilisierung befriedigend zu überbrücken. Die grundsätzlichen Ziele bei der Weiterentwicklung von CaP-Keramiken als Knochenersatzstoff sollten also eine verbesserte Resorption und verbesserte mechanische Eigenschaften sein (Damien und Parsons 1991; Hamadouche und Sedel 2000).

Die vorliegende Studie wurde im Rahmen des EU-Projekts *SmartCaP* angefertigt. Ziel des Projekts war es, funktionalisierte CaP-Keramiken zu entwickeln, die in angemessener Zeit resorbiert und durch autogenen Knochen ersetzt werden können. Um ein minimalinvasives chirurgisches Vorgehen zu ermöglichen, sollten sie injizierbar sein und erst *in vivo* aushärten. Hierfür wurden auf Basis des Referenzmaterials drei Kalziumphosphat-Komposite (CaP-Komposite) entwickelt. Diese Komposite bestanden überwiegend aus kalziumdefizientem Hydroxylapatit, in das Polymere eingearbeitet wurden. Die Aufgabe dieser Polymere war es, ein interkonnektierendes Poresystem im Zement herzustellen, das den Abbau der Materialien und das Einwachsen von Blutgefäßen erleichtern sollte. Des Weiteren sollte der Zement durch sie funktionalisiert werden, um einen stimulativen Effekt auf die Knochenneubildung auszuüben.

### **5.3 Komposit aus kalziumdefizientem Hydroxylapatit und Gelatine (CaP-Gelatine-Z)**

Eines der verwendeten Polymere war bovine Gelatine. Sie ist die denaturierte Form von Kollagen, dem natürlichen organischen Bestandteil von Knochen (Babel 1996). Kollagen besteht vor allem aus Polypeptidketten. Gelatine besitzt oberflächenaktive

Eigenschaften und wird daher auch zur Stabilisierung von Schäumen verwendet. In der vorliegenden Studie wurde diese Eigenschaft genutzt, um Poren im Kalziumphosphat-Zement zu erzeugen und während der Injektion und Aushärtung des Zements zu stabilisieren. Anhand der histologischen Bilder konnte nachgewiesen werden, dass die Gelatine diese Aufgabe nicht nur *in vitro*, sondern auch bei der *In-vivo*-Anwendung hervorragend erfüllte. Mit einer durchschnittlichen Porengröße von 180 µm besaß der in dieser Studie verwendete CaP-Gelatine-Z die besten Voraussetzungen für das Einsprossen von Gefäßen in das Implantat. Klenke et al. konnten 2007 im Rattenversuch nachweisen, dass in einer porösen CaP-Keramik eine Porengröße von 140 µm und größer optimal für die Einsprossung von Gefäßen und damit für das Einwachsen von neuem Knochen ist. Sie testeten Porengrößen 40-280 µm (Klenke et al. 2008). Klawitter und Hulbert implantierten poröse Keramiken in den Femurschaft von Hunden. Die fünf untersuchten Keramiken hatte Poren unterschiedlicher Größe (< 45-200 µm). Nach 22-wöchiger Implantation stellten sie ebenfalls das beste Knocheneinwachsverhalten bei einer Porengröße von 150-200 µm fest (Klawitter und Hulbert 1971). Der in der vorliegenden Studie *in vitro* präformierte und anschließend subkutan implantierte CaP-Gelatine-Z wies eine deutliche Interkonnektion der Poren auf. Dies führte zu einem Einsprossen von Bindegewebe und Blutgefäßen bis in das Implantatinnere. Diese Interkonnektion konnte beim *in vivo* ausgehärteten Zement in der Femurkondyle im histologischen Schnitt nicht durchgehend nachgewiesen werden. Ein Hinweis auf eine unzureichende Interkonnektion der Poren des im Knochen implantierten CaP-Gelatine-Z war die nicht bis ins Implantatzentrum reichende Infiltration mit Zellen oder Geweben. Es waren lediglich die randständigen Poren mit Bindegewebe und neu gebildetem Knochen gefüllt. Ein Grund für die geringere Interkonnektion der Poren des *in vivo* ausgehärteten Zements könnte der schon bei der Injektion in den Knochen auf den Zement wirkende höhere Druck sein. Dieser kam durch das in den Defekt austretende Blut zustande. Auch direkt nach der Injektion bis zur vollständigen Aushärtung waren die Poren und Interkonnektionen der Kompression durch den Blutdruck aus dem Defektgrund auf der einen Seite und der den Defekt bedeckenden Muskelschicht auf der anderen Seite ausgeliefert. Dies könnte einen negativen Einfluss auf die Stabilität der Interkonnektionen bis zur Aushärtung des Zements gehabt haben.

Ähnliche Komposite aus Keramik und Kollagen bzw. Gelatine wurden bereits in anderen Studien untersucht. Ein von Rodrigues et al. in der Zellkultur getestetes makroporöses Kollagen-Hydroxylapatit-Komposit (bovines Kollagen) führte zu einer guten Adhäsion und Ausbreitung humaner Osteoblasten (Rodrigues et al. 2003). Auch auf einem Gelatine-Hydroxylapatit-Schwamm zeigten Osteoblasten ein gutes Wachstum und penetrierten sogar in die Poren des Schwamms. Eine Besiedelung des reinen Gelatine-Schwamms ohne Beimengung des Hydroxylapatits erbrachte in dieser Studie eine geringere Zellzahl und eine niedrigere Zellproliferation (Rohanizadeh et al. 2008). Plank et al. konnten in einer Tierversuchsstudie zeigen, dass sowohl von Gelatine alleine wie auch von Kollagen nach 6- und 12-wöchiger Implantation im Knochen weder ein positiver, noch ein negativer Effekt auf die Bildung von neuem Knochen ausgeht. Sie implantierten Gelatine, Kollagen und eine Mischung aus beidem in die Tibia von Schafen (Plank et al. 1978). Die Kombination aus Gelatine und CaP, insbesondere Hydroxylapatit, scheint allerdings eine nicht nur in der Zellkultur viel versprechende Wachstums- und Differenzierungsgrundlage für osteoblastäre Zellen zu sein. Rueger et al. konnten in einer Tierversuchsstudie zeigen, dass bei einem porösen Gelatine-Hydroxylapatit-Implantat schneller ein intensives Knochenwachstum mit massivem Einwachsen des Knochens in die Poren stattfindet als bei einem porösen Gelatine- $\beta$ -TriKalziumphosphat-Implantat. Die Implantate dieser Studie waren *ex vivo* ausgehärtete Formkörper, die in Bohrlochdefekte der Femurdiaphyse von Ratten implantiert wurden (Rueger et al. 1985).

Auch in unserer Studie konnten wir eine gute Akzeptanz des CaP-Gelatine-Z durch das umgebende Knochengewebe, so wie ein schnelles Einwachsen des Knochens in die randständigen Poren des Implantats feststellen. Direkte osteoblastäre Besiedelung des CaP-Gelatine-Z mit reger Osteoidbildung bestätigten die Beobachtungen von Plank und Rodrigues. Im Gegensatz zu Asahina et al. konnten wir kaum Weichgewebe zwischen dem Implantat und dem umgebenden Knochen finden. In der Studie von Asahina et al. wurde für 3 Monate ein präformiertes Gelatine-Hydroxylapatit-Komposit als Granulat oder Block in die Mandibel von Affen implantiert (Asahina et al. 1997).

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Steifigkeit des *in vitro* ausgehärteten Zements geringer war als die des gesunden trabekulären Knochens

der Femurkondyle des Kaninchens. Nach 4-wöchiger Implantationszeit gab es jedoch keinen signifikanten Unterschied mehr in der Steifigkeit des Implantat-Knochen-Verbunds im Defektbereich im Vergleich zum trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass zu diesem Zeitpunkt über 70 % des Zements schon durch neuen trabekulären Knochen ersetzt worden war, wie bei der histologischen Auswertung deutlich zu erkennen war. Der verbleibende Restzement allerdings reichte aus, um dem Defektbereich eine im Vergleich zum trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen höhere Mineraldichte zu verleihen. Sowohl in der makroskopischen wie auch in der histologischen Auswertung konnte beim CaP-Gelatine-Z im Vergleich zum CaP-Referenz-Z ein deutlich schnellerer Materialabbau und -ersatz durch Knochen beobachtet werden. Dies ist vor allem auf die Porosität des CaP-Gelatine-Z zurückzuführen. Die Porosität führte zu einer vergrößerten Materialoberfläche und dadurch zu einer größeren Angriffsfläche für die abbauenden zellulären und azellulären Prozesse. Zudem war durch die Porosität des Kompositmaterials auch effektiv weniger Material im Defekt vorhanden, das abgebaut werden musste.

Die erhöhte Steifigkeit und Mineraldichte des CaP-Referenz-Z im Vergleich zum CaP-Gelatine-Z war durch die Porosität, den relativen Anteil an Restmaterial und den Ersatz des abgebauten Materials durch dichten (CaP-Referenz-Z) oder trabekulären (CaP-Gelatine-Z) Knochen zu erklären. Die Mineraldichte des CaP-Gelatine-Z war geringer als die des CaP-Referenz-Z, da zu jedem Zeitpunkt durch die Porosität und den vermehrten Abbau des Komposit weniger Material vorhanden war. Je dichter gepackt der neu gebildete Knochen im Defektbereich war, desto höher war die Steifigkeit.

Aus den erhobenen Ergebnissen lässt sich schließen, dass das in dieser Studie gestestete injizierbare Kalziumphosphat-Gelatine-Komposit eine Erfolg versprechende Weiterentwicklung des Referenzmaterials ist, das in weiterführenden *In-vivo*-Studien getestet werden sollte. Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, auf Basis von Kalziumphosphat und Gelatine einen porösen Zement zu entwickeln, der *in vivo* unter Beibehaltung seiner Poren aushärtet. Die Aufrechterhaltung der Interkonnektion der Poren bei der *In-vivo*-Aushärtung konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Das Material erwies sich als biokompatibel, bioaktiv, osteokonduktiv, osseointegrativ und resorbierbar. Die Resorptionszeit war

im Vergleich zum Referenzmaterial deutlich geringer und der zeitgleiche Ersatz des Materials durch eigenen Knochen war bei allen Kaninchen gegeben. Osteoinduktive und osteogene Eigenschaften konnten bei dem CaP-Gelatine-Z nicht nachgewiesen werden. Der Zement war einfach in der Handhabung und Verarbeitung und ist unserer Meinung nach für ein minimalinvasives chirurgisches Vorgehen geeignet, wenngleich bei belasteten Defekten auf Grund der biomechanischen Eigenschaften des Zements eine zusätzliche Stabilisierung des Defekts notwendig sein wird.

#### ***5.4 Komposit aus kalziumdefizientem Hydroxylapatit, Gelatine und Sojaextrakt (CaP-Gelatine-Soja-Z)***

Menschen aus asiatischen Ländern leiden weniger häufig unter Osteoporose. Dieser Effekt wird der regelmäßigen Aufnahme sojareicher Nahrung zugeschrieben (Murkies et al. 1998). Soja ist ein natürliches Produkt aus je ca. 40 % Proteinen und Kohlenhydraten, 18 % Öl und ca. 2 % Mineralien (Grieshop und Fahey 2001). Der positive Effekt von Soja wird vor allem den Isoflavonen zugeschrieben. Den größten Anteil in Soja bilden Genistein und Daidzein. Diese Isoflavone, auch Phytoöstrogene genannt, haben nachweislich einen Effekt auf eukaryotische Zellen (Middleton et al. 2000). Sie sind, wie der Begriff Phytoöstrogene schon besagt, Pflanzeninhaltstoffe mit östrogenähnlicher Struktur und Wirkung. Zu den Phytoöstrogenen gehören neben den Isoflavonen auch die Stoffklassen der Ligane und der Coumestane. In der Sojabohne sind diese allerdings nicht enthalten (Hwang et al. 2006).

Östrogen ist wichtig bei der Geschlechtsentwicklung von Mädchen, bei der Steuerung des Menstruationszyklus und der Aufrechterhaltung von Schwangerschaften (Gruber et al. 2002). Darüber hinaus hat es auch Einfluss auf den Knochenstoffwechsel. Es bewirkt das Schließen der Epiphysenfugen und beendet somit das Längenwachstum der langen Röhrenknochen zum Ende der Pubertät. Frauen nach der Menopause haben in der Regel eine stark reduzierte Östrogenkonzentration im Serum. Die Osteoporose, die sie häufig entwickeln, wird neben einer reduzierten Bewegung zu einem großen Teil diesem Östrogenmangel zugeschrieben. Eine Östrogentherapie kann in diesen Fällen den Knochenverlust und das Frakturrisiko reduzieren. Dabei wirkt Östrogen vor allem antiresorptiv durch

die Hemmung von Osteoklasten. Die Wirkung des Östrogens auf Osteoblasten ist noch nicht eindeutig geklärt (Oursler et al. 1993). Eine vermehrte Osteoblastenproliferation und dadurch gesteigerte Knochenneubildung wird als eher unwahrscheinlich betrachtet. Vielmehr wird vermutet, dass die durch Östrogen stimulierten Osteoblasten einen hemmenden Einfluss auf die Osteoklastendifferenzierung und -aktivität haben.

Die in Soja am häufigsten vorkommenden Isoflavone Genistein und Daidzein entfalten ihre Wirkung durch Bindung an die beiden bekannten Hauptrezeptoren des Östrogens ( $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ ) (Hwang et al. 2006). Die Häufigkeit und Verteilung dieser Rezeptoren ist gewebe- und zellspezifisch. Auch die nach Indigestion entstehenden Abbauprodukte besitzen noch östrogenähnliche Wirkung. Die Affinität zu einem dieser Rezeptoren und die Effektivität nach Bindung sind abhängig vom jeweiligen Liganden, dessen Konzentration und der rezeptortragenden Zielzelle. Durch Indigestion sojareicher Nahrung können im Serum Isoflavonkonzentrationen von bis zu  $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M auftreten. Genistein hemmte zum Beispiel die Bildung von Osteoklasten aus Mäusemonozyten in der Zellkultur ab einer Konzentration von  $10^{-8}$  M, Daidzein hemmte sie bei den von Hwang et al. untersuchten Konzentrationen ( $10^{-4}$ - $10^{-12}$  M) dagegen nicht. Hwang et al. konnten durch Zellkulturen nachweisen, dass abhängig von der vorhandenen Östrogenkonzentration im Kulturmedium die Isoflavone und ihre Abbauprodukte sowohl eine östrogene wie auch anitöstrogene Wirkung haben können. Bei Anwesenheit von Östrogenkonzentrationen im Bereich von postmenopausalen Frauen entfalteten sie einen östrogenen Effekt, bei Östrogenkonzentrationen von prämenopausalen Frauen entwickelten sie eher antiöstrogene Effekte. Zu den östrogenen Effekten von Genistein und Daidzein zählen die Hemmung der Aktivität von Immunzellen wie die der Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen (Middleton et al. 2000; Santin et al. 2007). Santin et al. beschreiben eine Erhöhung der Kollagensynthese von Osteoblasten durch die in Soja enthaltene Isoflavone bei gleichzeitiger beschleunigter Mineralisation der aufgebauten Matrix. Eine weitere östrogene Eigenschaft der Isoflavone besteht in der Hemmung der Osteoklastenaktivität *in vitro*, was, so vermuten Santin et al. *in vivo* eine Hemmung der Knochenresorption zur Folge haben könnte (Santin et al. 2007). Ob dieser *in vitro* nachgewiesene osteostimulative Effekt der Isoflavone auch *in vivo* vorhanden ist, sollte in dieser Studie geklärt werden. Hierfür wurde ein poröses

injizierbares Hydroxylapatit-Komposit aus Hydroxylapatit, Gelatine und Sojabohnenextrakt verwendet.

Die bei diesem Zement verwendete Gelatine war wie beim CaP-Gelatine-Z beschrieben ebenfalls bovinen Ursprungs und diente als Schaumbildner der Erzeugung und Aufrechterhaltung der Poren und deren Interkonnektionen. Der in der vorliegenden Studie *in vitro* ausgehärtete und anschließend subkutan implantierte CaP-Gelatine-Soja-Z wies wie auch der CaP-Gelatine-Z eine deutliche Interkonnektion der Poren auf. Dies führte zu einem Einsprossen von Bindegewebe und Blutgefäßen bis in das Implantatinnere. Diese Interkonnektion konnte beim *in vivo* ausgehärteten Zement im histologischen Schnitt wie beim implantierten CaP-Gelatine-Z nicht durchgehend nachgewiesen werden. Es waren nur die randständigen Poren mit Bindegewebe und neu gebildetem Knochen gefüllt. Der Grund für die geringere Interkonnektion der Poren des *in vivo* ausgehärteten Zements war hier ebenfalls im Blut- und Gewebedruck zu suchen, dem der Zement während der Implantation und bis zur vollständigen Aushärtung ausgeliefert war.

Im histologischen Schnitt der Femurkondyle konnte beobachtet werden, dass der abgebaute CaP-Gelatine-Soja-Z anders als der CaP-Gelatine-Z, aber ähnlich wie beim CaP-Referenz-Z, durch eine dichte Knochenlamelle ersetzt wurde. Der abgebaute CaP-Gelatine-Z wurde wie oben schon beschrieben durch neuen trabekulären Knochen ersetzt.

Der *in vitro* ausgehärtete CaP-Gelatine-Soja-Z wies eine ähnliche Steifigkeit wie der trabekuläre Knochen nicht operierter Kaninchen auf. Trotzdem konnte beim in die Femurkondyle implantierten CaP-Gelatine-Soja-Z eine im Vergleich zum trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen und im Vergleich zum CaP-Gelatine-Z erhöhte und im Vergleich zum CaP-Referenz-Z ähnliche Steifigkeit des Defektbereichs beobachtet werden. Hierfür ausschlaggebend war die ähnlich wie beim CaP-Referenz-Z gebildete dicht gepackte mit dem CaP-Gelatine-Soja-Z stark verzahnte Knochenlamelle.

Die Mineraldichte im Defektbereich, gemessen in mg Hydroxylapatit/ccm, korrelierte auch bei diesem Kompositmaterial mit dem in der histologischen Untersuchung gefundenen relativen Anteil an Restmaterial. Die Mineraldichte war, wie auch der relative Anteil des Restmaterials im Defektbereich, im Vergleich zum CaP-Gelatine-Soja-Z beim CaP-Referenz-Z erhöht und sowohl beim CaP-Gelatine-Z wie auch beim

trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen erniedrigt. Zusätzlichen Einfluss auf die höhere Mineraldichte des CaP-Referenz-Z im Vergleich zum CaP-Gelatine-Soja-Z hatte auch die Porosität des Kompositmaterials. Der Mineraldichteunterschied zwischen CaP-Gelatine-Soja-Z und CaP-Gelatine-Z wurde durch die unterschiedlich dichte Knochenneubildung im Defektbereich verstärkt.

Die höhere Abbaugeschwindigkeit des CaP-Gelatine-Soja-Z im Vergleich zum Referenzmaterial kann wie beim CaP-Gelatine-Z durch die Porosität erklärt werden. Durch die Poren war im Defekt mengenmäßig effektiv weniger implantiertes Material vorhanden, das abgebaut werden musste. Hinzu kam eine durch die Poren vergrößerte Oberfläche, die den Abbau des Zements auf Grund der größeren Angriffsfläche beschleunigte. Trotz der beschriebenen hemmenden Wirkung der Isoflavone *in vitro* auf Osteoklasten und Makrophagen (Middleton et al. 2000; Santin et al. 2007) konnte in der vorliegenden Studie *in vivo* ein zellulärer Abbau des Materials zu allen Implantationszeitpunkten beobachtet werden.

Aus den erhobenen Ergebnissen lässt sich schließen, dass das in dieser Studie gestestete injizierbare Komposit aus Kalziumphosphat, Gelatine und Sojaextrakt eine erfolgsversprechende Weiterentwicklung des Referenzmaterials ist, das in weiterführenden *In-vivo*-Studien getestet werden sollte. Im Vergleich zum CaP-Gelatine-Z konnte unserer Meinung nach allerdings durch den Zusatz des Sojaextrakts und damit der Isoflavone im Kaninchen keine nennenswerte Verbesserung erzielt werden. Die Zugabe des Sojaextrakts hatte keinen Einfluss auf die Stabilität oder die Interkonnektion der Poren. Das Material erwies sich ebenfalls als biokompatibel, bioaktiv, osteokonduktiv, osseointegrativ und resorbierbar. Der zeitgleiche Ersatz des Materials durch eigenen Knochen war bei allen Kaninchen gegeben. Die Resorptionszeit war im Vergleich zum Referenzmaterial deutlich geringer, im Vergleich zum CaP-Gelatine-Z erbrachte der Zusatz der Isoflavone keine weitere Beschleunigung der Resorption. Osteoinduktive und osteogene Eigenschaften konnten dem CaP-Gelatine-Soja-Z nicht nachgewiesen werden. Der Zement war einfach in der Handhabung und Verarbeitung und ist unserer Meinung nach für ein minimalinvasives chirurgisches Vorgehen geeignet, wenngleich bei belasteten Defekten auf Grund der biomechanischen Eigenschaften des Zements eine zusätzliche Stabilisierung des Defekts notwendig sein wird.

## **5.5 Komposit aus kalziumdefizientem Hydroxylapatit und Alginat (CaP-Alginat-Z)**

In der vorliegenden Studie wurde auch ein poröses Komposit aus Hydroxylapatit und Natriumalginat implantiert. Als Alginate werden allgemein die Salze der Alginäure bezeichnet. Die Alginäure wird von Braunalgen und von einigen Bakterien gebildet. Das in dieser Studie verwendete Natriumalginat stammte aus Algen und wurde synthetisch sulfoniert. Die Alginate verleihen der Alge als interzelluläre Gelmatrix *in vivo* sowohl Flexibilität als auch Festigkeit. Alginat ist ein Polysaccharid, das aus einem Gemisch der beiden Uronsäuren  $\alpha$ -L-Glucuronsäure und  $\beta$ -D-Mannuronsäure gebildet wird. Diese sind als lineare Kette 1,4-glycosidisch verbunden. Die Alginäure ist, wie auch ihre Natrium-, Kalium-, Ammonium- und Kalziumsalze, in der EU als Lebensmittelzusatzstoff (E 400-405) zugelassen. Die Salze sind wasserlöslich und dienen der Lebensmittelindustrie vor allem als Emulgator, Gelier-, Überzugs- oder Verdickungsmittel. Bei oraler Aufnahme werden sie vom Körper nicht resorbiert. Alginat wird auch in der medizinischen Versorgung von Wunden, als Medikament gegen Sodbrennen und in Biomaterialien zur Verkapselung menschlichen Zellgewebes eingesetzt. Um Alginat als besiedeltes Biomaterial im Bereich des Tissue Engineering zu verwenden, werden in der Zellkultur Zellen in Alginatbeads zur Proliferation und Differenzierung gebracht. Anschließend werden die besiedelten Beads in verschiedene Gewebe implantiert (Knorpel, Leber, Pankreas, Nerven, Epithel etc.). Die implantierten Zellen sollen zur Regeneration des geschädigten Empfängergewebes beitragen. Das Alginat dient in diesem Fall als Zellträger.

Alginat galiert durch Zugabe von Kalzium und kann durch Komplexierung des Kalziums (z.B. durch EDTA) wieder verflüssigt werden, so dass Zellen eingebracht und wieder entnommen werden können (Masuda et al. 2003). Das macht Alginat zu einer beliebten Matrix in der Zellkultur. Etliche *In-vitro-Arbeiten* zeigten, dass Alginat für osteoblastäre Zellen ein geeigneter Träger ist. Abbah et al. besiedelten Natriumalginat mit mesenchymalen Stammzellen von Kaninchen. Sie konnten eine gute Proliferation und osteogene Differenzierung dieser Zellen nachweisen. In einer weiteren Studie besiedelten sie Alginatbeads. Die Beads boten den Zellen eine dreidimensionale Matrix. Die Differenzierung zu osteogenen Zellen wurde hierdurch beschleunigt. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass mit Stammzellen besiedelte

Alginatbeads als biodegradierbarer injizierbarer Knochenersatz geeignet sind (Abbah et al. 2006; Abbah et al. 2008).

Die Zugabe von Kalziumphosphaten scheint die osteostimulativen Eigenschaften des Alginat zu verbessern. Lawson et al. beobachteten, dass eine Zugabe von Kalziumphosphat zu Alginat eine deutlich bessere Anheftung und Proliferation von humanen Knochenmarkszellen bewirkte (Lawson et al. 2004). Luginbuehl et al. kultivierten zwei verschiedene osteoblastäre Zelllinien auf einem TriKalziumphosphat-Alginat-Gel mit und ohne Zugabe des *Insulin-like Growth Factor* (ILG). Sie fanden heraus, dass beide Gele keine toxischen Effekte auf die Zellen hatten, allerdings proliferierten die Zellen auf dem Gel mit ILG besser. Bei einer der beiden Zelllinien konnte durch vermehrte Zugabe von Trikalziumphosphat eine erhöhte osteoblastäre Aktivität erreicht werden (Luginbuehl et al. 2005). Tampieri et al. konnten ebenfalls nachweisen, dass osteoblastenähnliche Zellen (MG63) besser auf einem Hydroxylapatit-Alginat-Gel wachsen, je mehr Kalziumphosphat zugegeben wurde. Sie führten diese Beobachtung auf die geringere Viskosität zurück, die das Komposit bei zunehmendem Kalziumphosphatgehalt aufwies (Tampieri et al. 2005). Auch poröse Komposite aus Hydroxylapatit und Alginat bieten, so Turco et al., osteoblastären Zellen eine gute Wachstums- und Proliferationsgrundlage (Turco et al. 2009). Bernardt et al. besiedelten ebenfalls ein poröses Komposit aus Hydroxylapatit und Alginat. Allerdings war bei ihnen zusätzlich Gelatine in das Komposit eingearbeitet. Sie konnten auf diesem Komposit eine osteogene Differenzierung von humanen Knochenmarkszellen nachweisen (Bernhardt et al. 2009).

*In vivo* wurde Alginat bisher wenig untersucht. Perrot et al. implantierten Alginatbeads ohne und mit mesenchymalen Stammzellen in Ratten. Hierfür verwendeten sie ein extraossäres Modell mit periostealem Flap. Bei den implantierten Alginatbeads ohne Zellbesiedelung konnte nach 10 Wochen nur eine Kalzifizierung des Randbereichs des Alginatbeads festgestellt werden. Waren hingegen die Beads mit Stammzellen besiedelt, so konnte ein ausgedehnter Mineralisationsprozess mit Ausbildung von reifem lamellären Knochen beobachtet werden (Perrot et al. 2007).

Eine weitere *In-vivo-Studie* mit Alginat wurde in einem osteoporotischen Tiermodell durchgeführt (Wang et al. 2006). Hierfür wurden mesenchymale Stammzellen von

ovarektomierten Kaninchen entnommen, kultiviert, in Kalziumalginat-Gel verbracht und in das Femur desselben Kaninchens implantiert. In dieser Studie konnte nach 4- und 8-wöchiger Implantation im Defekt Wachstum trabekulären Knochens nachgewiesen werden. Chang et al. implantierten ein mit osteogen induzierten mesenchymalen Stammzellen besiedeltes Alginat-Gel ektop subkutan in Ratten. Sie konnten eine Differenzierung und Proliferation der Stammzellen und sogar die Bildung von Geflecktknochen über enchondrale Ossifikation beobachten (Chang et al. 2009).

Das Alginat wurde in der vorliegenden Studie ohne Zellbesiedelung getestet und sollte im verwendeten Zement einwachsenden osteoblastären Zellen als Wachstums- und Proliferationsgrundlage dienen.

Zur Erzeugung und Stabilisierung der Poren und deren Interkonnectionen diente in diesem Zement Tween® 80. Tween® 80 ist ein Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonooleat. Es ist ein nichtionisches Tensid und wird bei einigen Nahrungsmitteln als Emulgator und Stabilisator eingesetzt. Es ist als Lebensmittelzusatzstoff E 433 zugelassen. Weitere Verwendung findet es in Kosmetika, Arzneimitteln, Futtermitteln und in der pharmazeutischen Industrie bei der Virusaktivierung von Blutprodukten. Es existieren bislang keine veröffentlichten Berichte über die Reaktion von Knochenzellen auf Tween® 80. Allerdings konnten keine toxischen Eigenschaften des in dieser Studie eingesetzten CaP-Alginat-Z nach Besiedelung mit humanen Osteoblasten gefunden werden (Unveröffentlichte Ergebnisse Prof. Santin, University of Brighton).

Die Implantation von Tween® 80 in den Knochen wurde unserer Kenntnis nach nur in einer Studie untersucht. Hierbei wurden verschiedene poröse Membranen in den Schädelknochen von Ratten implantiert. Unter anderem wurde eine Kompositmembran aus Polycaprolacton und Tween® 80 getestet. Die Autoren konnten bei dieser Membran osteokonduktive Eigenschaften feststellen (Cho et al. 2008).

In der vorliegenden Studie konnte nach subkutaner Implantation vom CaP-Alginat-Z weder im Implantat noch um das Implantat herum eine Knochenbildung gefunden werden. Das Material erwies sich also als nicht osteoinduktiv. Es ist davon auszugehen, dass die Geflecktknochenbildung im subkutan implantierten Alginat-Gel von Chang et al. auf die ebenfalls implantierten osteogen induzierten

mesenchymalen Stammzellen zurückzuführen war und nicht auf osteoinduktive Eigenschaften des Zements.

In der vorliegenden Studie konnten Poren sowohl beim subkutanen Implantat wie auch im Knochenimplantat im gesamten Zementbereich gefunden werden. Ein Einwandern von Zellen und Einwachsen von Geweben war in beiden Fällen allerdings nur in den randständigen Poren zu beobachten. Dies ist ein Hinweis auf eine unzureichende Interkonnektion der Poren im implantierten Zement.

Im Vergleich zu den anderen getesteten Kompositen war die Resorptionsrate des im Knochen implantierten CaP-Alginat-Z deutlich geringer, jedoch war vor allem nach 20 Wochen weniger Restmaterial im Defektbereich übrig als beim Referenz-Zement. Die Poren des CaP-Alginat-Z stellten für die Abbauprozesse eine im Vergleich zum Referenzmaterial vergrößerte Angriffsfläche dar und waren somit auch bei diesem Kompositzement der Grund für einen schnelleren Abbau. Zu jedem Implantationszeitpunkt konnte in der histologischen Auswertung ein zellulärer Materialabbau hauptsächlich durch Makrophagen beobachtet werden.

Die Steifigkeit des *in vitro* ausgehärteten CaP-Alginat-Z war geringer als die des *in vitro* ausgehärteten CaP-Referenz-Z und die des trabekulären Knochens nicht operierter Kaninchen. *In vivo* allerdings war die Steifigkeit des Material-Knochen-Verbunds im Defektbereich des CaP-Alginat-Z ähnlich der des CaP-Referenz-Z und höher als die des trabekulären Knochens nicht operierter Kaninchen. Der abgebauten CaP-Alginat-Z wurde ähnlich wie das Referenzmaterial durch eine sehr dicht gepackte Knochenlamelle ersetzt. Daraus lässt sich schließen, dass auch bei diesem Komposit die Steifigkeit hauptsächlich durch die Eigenschaften des im Defekt neu gebildeten Knochens bestimmt wurde.

Die Mineraldichte im Defektbereich des CaP-Alginat-Z (gemessen in mg Hydroxylapatit/ccm) war niedriger als die des CaP-Referenz-Z, aber höher als die des trabekulären Knochens nicht operierter Kaninchen. Sie ist vor allem abhängig von der verbliebenen Zementrestmenge (hauptsächlich Hydroxylapatit) und von der Dichte und Struktur des im Defektbereich vorhandenen Knochens. Der CaP-Alginat-Z wurde im Vergleich zum CaP-Referenz-Z schneller abgebaut und wies eine starke Porosität auf. Somit war beim CaP-Alginat-Z zu jedem untersuchten Zeitpunkt weniger Zement und somit weniger Hydroxylapatit vorhanden. Der CaP-Alginat-Z machte auch nach 20-wöchiger Implantation noch etwa 40 % Flächenanteil des

Defektbereichs aus. Der abgebaute Zement wurde durch sehr kompakten Knochen ersetzt. Folglich war im Vergleich zum trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen zu jedem untersuchten Zeitpunkt mehr Hydroxylapatit vorhanden und somit die gemessene Mineraldichte höher.

Der CaP-Alginat-Z hatte keinen engen Implantat-Knochen-Kontakt. Häufig war eine Schicht aus Bindegewebe zwischen dem implantierten Zement und dem neu gebildeten Knochen zu finden. Zusätzlich konnten vor allem in der direkten Umgebung des im Knochen implantierten Zements entzündliche Reaktionen unter Beteiligung von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen gefunden werden.

Die entzündlichen Reaktionen und die daraus resultierende Schicht aus Bindegewebe könnten auf eine Stimulierung der Immunzellen durch Alginat hindeuten. Borges et al. beobachteten einen aktivierenden Effekt, den Alginat in der Zellkultur auf Immunzellen aus der Milz von Mäusen hatte (Borges et al. 2007).

Aus den erhobenen Ergebnissen lässt sich schließen, dass das in dieser Studie getestete injizierbare Komposit aus Kalziumphosphat, Tween 80® und Alginat was das Resorptionsverhalten angeht lediglich eine geringe Verbesserung des Referenzmaterials darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist auf Basis von Kalziumphosphat, Tween und Alginat einen porösen Zement zu entwickeln, der *in vivo* unter Beibehaltung seiner Poren aushärtet. Die Aufrechterhaltung der Interkonnektion der Poren bei der *In-vivo-Aushärtung* konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Das Material erwies sich im Kaninchen nur als bedingt biokompatibel. Der Zement ist bioaktiv, osteokonduktiv und resorbierbar. Der zeitgleiche Ersatz des Materials durch eigenen Knochen war bei allen Kaninchen gegeben. Die Osseointegration ist gering. Osteoinduktive und osteogene Eigenschaften konnten dem CaP-Algiant-Z nicht nachgewiesen werden. Der Zement war einfach in der Handhabung, allerdings war die Verarbeitung auf Grund der geringeren Viskosität im Vergleich zu den andern Kompositen etwas erschwert. Unserer Meinung nach ist es erforderlich den Zement zu verbessern, bevor er in weiterführenden *In-vivo-Studien* getestet wird.

## 6 Zusammenfassung

Ziel der Studie war es, neuartige injizierbare poröse Knochenersatzmaterialien *in vivo* zu untersuchen. Die in dem EU-Projekt „SmartCaP“ entwickelten Zemente eröffnen durch ihre poröse Struktur erstmals die Möglichkeit, poröse Knochenersatzmaterialien und minimalinvasives chirurgisches Vorgehen miteinander zu kombinieren. Der Hauptbestandteil der untersuchten Zemente war kalziumdefizientes Hydroxylapatit. In den Zement eingebrachte Polymere sollten nach der *In-vivo-Aushärtung* sowohl die Porosität und die Interkonnektion der Poren gewährleisten als auch dem Zement osteoinduktive Eigenschaften verleihen. Es wurden drei verschiedene Kompositmaterialien untersucht. Dem ersten Komposit wurde als Polymer Gelatine zugesetzt, dem zweiten Gelatine und Sojaextrakt und dem dritten Alginat. Als Referenzmaterial diente dichtes kalziumdefizientes Hydroxylapatit ohne Polymerbeimengung.

Zur Untersuchung der Materialien diente ein Bohrlochdefekt kritischer Größe (Durchmesser 5 mm, Tiefe 10 mm) in der distalen Femurkondyle von Kaninchen. In diesem härtete der Zement nach Injektion aus. Um die osteoinduktiven Eigenschaften der Materialien zu prüfen, wurden die Materialien zusätzlich als präformierte Formkörper (Zylinder; Durchmesser 5 mm, Höhe 3 mm) ektop subkutan implantiert.

Es wurden für jedes zu untersuchende Material drei Implantationszeitpunkte gewählt (4, 12, 20 Wochen). Je Implantationszeitpunkt und Materialvariante wurde eine Tierzahl von 6-7 Kaninchen verwendet.

Histologische Untersuchungen gaben Aufschluss über die Biokompatibilität, die Osteoinduktion, die Osteokonduktion, die Osseointegration und das Resorptionsverhalten der Zemente. Die biomechanischen Eigenschaften wurden durch Messung der Steifigkeit des Implantat-Knochen-Verbunds (gemessen in N/mm) evaluiert. Aufschluss über die Dichte im Defektbereich und dessen Umgebung (gemessen in mg Hydroxylapatit/ccm) gab eine Mineraldichtemessung unter Verwendung der peripheren quantitativen Computertomographie.

Die Ergebnisse dieser Studie belegen, dass die untersuchten Kompositmaterialien ein Applizieren porösen Zements *intra operationem* und dessen Aushärtung *intracorporal* unter Erhaltung der Poren ermöglichen. Die Interkonnektion der Poren, die bei der *In-vitro-Aushärtung* zu beobachten war, konnte *in vivo* nicht nachgewiesen werden. Alle getesteten Materialien wiesen biomechanische Eigenschaften auf, die den Einsatz in mechanisch belasteten Defekten ohne zusätzliche Stabilisierung des Defekts nicht möglich machen. Keines der untersuchten Materialien hatte osteoinduktive Eigenschaften.

Die Komposite mit Gelatine und mit Gelatine und Sojaextrakt zeigten eine gute Biokompatibilität. Ihre Resorptionsrate war deutlich höher als die des Referenzmaterials. Bei diesen beiden Kompositen konnte eine gute Osteokonduktion und Osseointegration beobachtet werden. Der Zusatz des Sojaextrakts zum Komposit mit Gelatine erbrachte keine Vorteile verglichen mit dem Gelatine-Komposit ohne Sojaextrakt. Das Komposit mit Alginat zeigte im Gegensatz zu den beiden anderen Kompositen nur eine geringere Verbesserung der Resorptionsrate im Vergleich zum Referenzmaterial. Die Materialvariante mit Alginat besaß auch im Vergleich zum Referenzmaterial und zu den beiden anderen Kompositen eine geringere Biokompatibilität und Osseointegration. Die Mineraldichte des Defektbereichs korrelierte bei allen Materialien mit der verbliebenen Restmenge an Zement. Die Mineraldichte in der Umgebung des Defekts wies keinen Unterschied zwischen den Materialien auf.

Zusammenfassend erwies sich das Komposit mit Gelatine als biokompatibel und wurde in einer der Heilung angepassten Zeit resorbiert. Die Einführung von Poren in injzierbare Zemente stellt auf Grund der verbesserten Osseointegration eine deutliche Verbesserung gegenüber herkömmlichen Zementen dar.

## 7 Summary

The aim of this study was to test newly developed injectable porous bone cements in an experimental animal model. The cements were developed during a project called "SmartCaP", supported by the European Union.

The tested cements were composite materials with a main component of Kalzium-deficient hydroxylapatite. To achieve porosity, interconnectivity of the pores and osteoinductivity, the polymers were combined with the hydroxylapatite (HA). Three composite cements were investigated: one a mixture of HA and gelatin, a second of HA and gelatin plus soy bean extract and the last of HA and alginate. As the reference cement, the non-porous HA was used without any polymer.

The cements were tested in a critical-sized bony defect (diameter 5 mm, depth 10 mm) in the distal femoral condyle of rabbits. Additional preset discs of all the materials (diameter 5 mm, height 3 mm) were implanted subcutaneously to test the osteoinductivity of the cements. Implantation periods were 4, 12 and 20 weeks using 6-7 animals for each time-point per group.

To analyze biocompatibility, osteoinductivity, osteoconductivity, osseointegration and degradation of the materials, histological examinations were carried out. To evaluate biomechanical properties of the cements, measurements of the stiffness of the material-bone compound (in N/mm) by indentation tests were undertaken. Additionally, the mineral density (in mg HA/cm<sup>3</sup>) of the defect region itself and the surrounding region was analyzed by peripheral quantitative computer tomography.

The results clearly demonstrated the preservation of the pores, but not of the interconnectivity during injection and setting of the materials *in vivo*. All tested materials had biomechanical properties that did not allow their use in mechanically loaded defects without additional stabilization. None of the materials displayed osteoinductivity.

The composites with gelatin and gelatin plus soybean extract were significantly biocompatible. Their degradation rate was clearly higher compared to that of the reference material. Both these composite cements showed a good osteoconductivity and osseointegration. There was no advantage in adding soybean extract to the composite with gelatin.

The degradation rate of the composite with alginate was higher compared to that of the reference cement. However, it was not degraded as fast as both the composites with gelatin. Additionally, the biocompatibility and osseointegration of the composite cement with alginate was adverse compared to the other composites and the reference material.

The mineral density of all materials depended on the amount of material remaining at each time-point in the defect region. Comparing the materials there was no difference in mineral density of the region surrounding the defect.

In summary, we have shown that a composite with gelatin is biocompatible and would be reabsorbed during a relevant healing time. The introduction of pores into injectable cement would through improved osseointegration clearly lead to an improvement compared to conventional cements.

## 8 Literaturverzeichnis

Abbah SA, Lu WW, Chan D, Cheung KM, Liu WG, Zhao F, Li ZY, Leong JC, Luk KD  
*In vitro evaluation of alginate encapsulated adipose-tissue stromal cells for use as injectable bone graft substitute.*

Biochem Biophys Res Commun 2006; 347(1): 185-191.

Abbah SA, Lu WW, Chan D, Cheung KM, Liu WG, Zhao F, Li ZY, Leong JC, Luk KD.  
*Osteogenic behavior of alginate encapsulated bone marrow stromal cells: an in vitro study.*  
J Mater Sci Mater Med 2008; 19(5): 2113-2119.

Albrektsson T., Johansson C  
*Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration.*  
Eur Spine J 2001; 10 Suppl 2: 96-101.

Alexander H.  
Composites.  
In: Ratner BD, Hoffmann AS, Schoen FJ, Lemons JE (eds.). *Biomaterials science*. San Diego: Academic Press; 1996: 94-105.

Asahina I, Watanabe M, Sakurai N, Mori M, Enomoto S.  
*Repair of bone defect in primate mandible using a bone morphogenetic protein (BMP)-hydroxyapatite-collagen composite.*  
J Med Dent Sci 1997; 44(3): 63-70.

Athanasiou KA, Zhu C, Lanctot DR, Agrawal CM, Wang X.  
*Fundamentals of biomechanics in tissue engineering of bone.*  
Tissue Eng 2000; 6(4): 361-381.

Babel W.  
*Gelatine – ein vielseitiges Biopolymer.*  
Chemie in unserer Zeit 1996; 30(2): 86-95.

Bernhardt A, Despang F, Lode A, Demmler A, Hanke T, Gelinsky M.  
*Proliferation and osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on alginate-gelatine-hydroxyapatite scaffolds with anisotropic pore structure.*  
J Tissue Eng Regen Med 2009; 3(1): 54-62.

Bohr H, Ravn HO, Werner H.  
*The osteogenic effect of bone transplants in rabbits.*  
J Bone Joint Surg Br 1968; 50(4): 866-873.

Borges O, Borchard G, de Sousa A, Junginger HE, Cordeiro-da-Silva A.  
*Induction of lymphocytes activated marker CD69 following exposure to chitosan and alginate biopolymers.*  
Int J Pharm 2007; 337(1-2): 254-264.

*Böstman O, Pihlajamäki H.*  
*Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review.*  
*Biomaterials 2000; 21: 2615-2621.*

*Boyan BD, Lohmann CH, Romero J, Schwartz Z.*  
*Bone and cartilage tissue engineering.*  
*Clin Plast Surg 1999; 26(4): 629-645, ix.*

*Burchardt H, Busbee GA 3rd, Enneking WF.*  
*Repair of experimental autologous grafts of cortical bone.*  
*J Bone Joint Surg Am 1975; 57(6): 814-819.*

*Caplan AI.*  
*Bone development and repair.*  
*Bioessays 1987; 6(4): 171-175.*

*Chamay A, Tschantz P.*  
*Mechanical influences in bone remodeling. Experimental research on Wolff's law.*  
*J Biomech 1972; 5(2): 173-180.*

*Chang SC, Tai CL, Chung HY, Lin TM, Jeng LB.*  
*Bone marrow mesenchymal stem cells form ectopic woven bone in vivo through endochondral bone formation.*  
*Artif Organs 2009; 33(4): 301-308.*

*Chapekar MS.*  
*Tissue engineering: challenges and opportunities.*  
*J Biomed Mater Res 2000; 53(6): 617-620.*

*Chen D, Zhao M, Mundy GR.*  
*Bone morphogenetic proteins.*  
*Growth Factors 2004; 22(4): 233-241.*

*Cheung HS, Haak MH.*  
*Growth of osteoblasts on porous calcium phosphate ceramic: an in vitro model for biocompatibility study.*  
*Biomaterials 1989; 10(1): 63-67.*

*Cho WJ, Kim JH, Oh SH, Nam HH, Kim JM, Lee JH.*  
*Hydrophilized polycaprolactone nanofiber mesh-embedded poly(glycolic-co-lactic acid) membrane for effective guided bone regeneration.*  
*J Biomed Mater Res A 2009; 91(2): 400-407.*

*Chow L.*  
*Calcium-Phosphat-Zemente: Eigenschaften und Verwendung.*  
*Biomaterialien 2001; 2(1): 11-18.*

Claes L, Hoellen I, Ignatius A.  
[Resorbable bone cements].  
Orthopade 1997; 26(5): 459-462.

Claes L, Maurer-Klein N, Henke T, Gerngross H, Melnyk M, Augat P.  
Moderate soft tissue trauma delays new bone formation only in the early phase of fracture healing.  
J Orthop Res 2006; 24(6): 1178-1185.

Cohen MM Jr.  
The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates.  
Am J Med Genet A 2006; 140(23): 2646-2706.

Crane GM, Ishaug SL, Mikos AG.  
Bone tissue engineering.  
Nat Med 1995; 1(12): 1322-1324.

Daculsi G, LeGeros RZ, Heughebaert M, Barbieux I.  
Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics.  
Calcif Tissue Int 1990; 46(1): 20-27.

Daculsi G, LeGeros RZ, Mitre D.  
Crystal dissolution of biological and ceramic apatites.  
Calcif Tissue Int 1989; 45(2): 95-103.

Damien CJ, Parsons JR.  
Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications.  
J Appl Biomater 1991; 2(3): 187-208.

del Valle S, Mino N, Munoz F, González A, Planell JA, Ginebra MP.  
In vivo evaluation of an injectable Macroporous Calcium Phosphate Cement.  
J Mater Sci Mater Med 2007; 18(2): 353-361.

Ditz W, Börner M.  
Klinische Erfahrungen einer neuen Generation von Knochenersatzmaterialien in der Extremitätenchirurgie unter besonderer Berücksichtigung der Praktikabilität, Stabilität sowie Remodellierung.  
Trauma und Berufskrankheit 2001; (3): 270-277.

Drobeck HP, Rothstein SS, Gumaer KI, Sherer AD, Slighter RG.  
Histologic observation of soft tissue responses to implanted, multifaceted particles and discs of hydroxylapatite.  
J Oral Maxillofac Surg 1984; 42(3): 143-149.

Epple M, Bäuerlein E.  
Handbook of Biomineralization - Medical and Clinical Aspects.  
Wiley Vch; 2007: 81-95.

*Fraendorf T, Sünnig W.  
Knochenersatz in der zahnärztlichen Chirurgie – Standortbestimmung.  
Implantologie Journal 2007; 4: 6-12.*

*Gallagher JC.  
The pathogenesis of osteoporosis.  
Bone Miner 1990; 9(3): 215-227.*

*Geneser F.  
Histologie.  
Deutscher Ärzte Verlag; 1996: 216ff.*

*Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN.  
Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications.  
J Bone Joint Surg Am 2001; 83-A Suppl 2 Pt 2: 98-103.*

*Grégoire M, Orly I, Menanteau J.  
The influence of calcium phosphate biomaterials on human bone cell activities. An in vitro approach.  
J Biomed Mater Res 1990; 24(2): 165-177.*

*Grieshop CM, Fahey GC Jr.  
Comparison of quality characteristics of soybeans from Brazil, China, and the United States.  
J Agric Food Chem 2001; 49(5): 2669-2673.*

*Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC.  
Production and actions of estrogens.  
N Engl J Med 2002; 346(5): 340-352.*

*Gutwald R, Pistner H, Reuther J, Mühlung J.  
Biodegradation and tissue-reaction in a long-term implantation study of poly(L-lactide)(Leerz. entfernen).  
J Mater Sci Mater Med 1994; (5): 485-490.*

*Hamadouche M, Sedel L.  
Ceramics in orthopaedics.  
J Bone Joint Surg Br 2000; 82(8): 1095-1099.*

*Hardouin P, Anselme K, Flautre B, Bianchi F, Bascoulenguet G, Bouxin B.  
Tissue engineering and skeletal diseases.  
Joint Bone Spine 2000; 67(5): 419-424.*

*Heiple KG, Kendrick RE, Herndon CH, Chase SW.  
A critical evaluation of processed calf bone.  
J Bone Joint Surg Am 1967; 49(6): 1119-1127.*

*Hench LL, Wilson J.  
Surface-active biomaterials.  
Science 1984; 226(4675): 630-636.*

Hench LL, Wilson J.  
*An Introduction to Bioceramics.*  
World Scientific Pub Co; 1933

Hill PA.  
*Bone remodeling.*  
Br J Orthod 1998; 25(2): 101-107.

Hillier ML, Bell LS.  
*Differentiating human bone from animal bone: a review of histological methods.*  
J Forensic Sci 2007; 52(2): 249-263.

Hofbauer LC, Kühne CA, Viereck V.  
*The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases.*  
J Musculoskelet Neuronal Interact 2004; 4(3): 268-275.

Hollinger JO, Brekke J, Gruskin E, Lee D.  
*Role of bone substitutes.*  
Clin Orthop Relat Res 1996; (324): 55-65.

Hollinger JO, Kleinschmidt JC.  
*The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials.*  
J Craniofac Surg 1990; 1(1): 60-68.

Holmes RE.  
*Bone regeneration within a coralline hydroxyapatite implant.*  
Plast Reconstr Surg 1979; 63(5): 626-633.

Hörner K, Loeffler K, Holtzmann M.  
*[Comparison of the histologic structure of the compact bone of the long hollow bones of mouse, hamster, rat, guinea pig, rabbit, cat, and dog during development].*  
Anat Histol Embryol 1997; 26(4): 289-295.

Hwang CS, Kwak HS, Lim HJ, Lee SH, Kang YS, Choe TB, Hur HG, Han KO.  
*Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: they can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration.*  
J Steroid Biochem Mol Biol 2006; 101(4-5): 246-253.

Jarcho M.  
*Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics.*  
Clin Orthop Relat Res 1981; (157): 259-278.

Kasten P, Vogel J, Geiger F, Niemeyer P, Lugrinbühl R, Szalay K.  
*The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects.*  
Biomaterials 2008; 29(29): 3983-3992.

*Kaufmann EA, Ducheyne P, Shapiro IM.*  
*Effect of varying physical properties of porous, surface modified bioactive glass 45S5 on osteoblast proliferation and maturation.*  
*J Biomed Mater Res 2000; 52(4): 783-796.*

*Klawitter JJ, Hulbert S.F*  
*Application of porous ceramics for the attachment of load bearing internal orthopedic applications.*  
*J Biomed Mater Res 1971; 2: 161-299.*

*Klenke FM, Liu Y, Yuan H, Hunziker EB, Siebenrock KA, Hofstetter W.*  
*Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo.*  
*J Biomed Mater Res A 2008; 85(3): 777-786.*

*Kobayashi T, Kronenberg H.*  
*Minireview: transcriptional regulation in development of bone.*  
*Endocrinology 2005; 146(3): 1012-1017.*

*König HE, Liebich HG.*  
*Anatomie der Haussäugetiere.*  
*Schattauer; 1999*

*Langer R, Vacanti JP.*  
*Tissue engineering.*  
*Science 1993; 260(5110): 920-926.*

*Lawson MA, Barralet JE, Wang L, Shelton RM, Triffitt JT.*  
*Adhesion and growth of bone marrow stromal cells on modified alginate hydrogels.*  
*Tissue Eng 2004; 10(9-10): 1480-1491.*

*LeGeros RZ.*  
*Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates.*  
*Clin Orthop Relat Res 2002; (395): 81-98.*

*Le Guehennec L, Goyenvalle E, Aguado E, Houchmand-Cuny M, Enkel B, Pilet P, Daculsi G, Layrolle P.* Small-animal models for testing macroporous ceramic bone substitutes.  
*J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2005; 72(1): 69-78.*

*LeHuec JC, Schaeverbeke T, Clement D, Faber J, Le Rebeller A.*  
*Influence of porosity on the mechanical resistance of hydroxylapatite ceramics under compressive stress.*  
*Biomaterials 1995; 16: 113-118.*

*Lu JX, Flautre B, Anselme K, Hardouin P, Gallur A, Descamps M, Thierry B.*  
*Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo.*  
*J Mater Sci Mater Med 1999; 10(2): 111-120.*

*Luginbuehl V, Wenk E, Koch A, Gander B, Merkle HP, Meinel L.*  
*Insulin-like growth factor I-releasing alginate-tricalciumphosphate composites for bone regeneration.*  
*Pharm Res 2005; 22(6): 940-950.*

*McKibbin B.*  
*The biology of fracture healing in long bones.*  
*J Bone Joint Surg Br 1978; 60-B(2): 150-162.*

*Mainil-Varlet P, Gogolewski S.*  
*Long-term soft tissue reaction to various polylactides and their in vivo degradation.*  
*J Mater Sci Mater Med 1996; 7: 713-721.*

*Martini L, Fini M, Giavaresi G, Giardino R.*  
*Sheep model in orthopedic research: a literature review.*  
*Comp Med 2001; 51(4): 292-299.*

*Masuda K, Sah RL, Hejna MJ, Thonar EJ.*  
*A novel two-step method for the formation of tissue-engineered cartilage by mature bovine chondrocytes: the alginate-recovered-chondrocyte (ARC) method.*  
*J Orthop Res 2003; 21(1): 139-148.*

*Masuda T, Yliheikkilä PK, Felton DA, Cooper LF.*  
*Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part I. In vivo studies.*  
*Int J Oral Maxillofac Implants 1998; 13(1): 17-29.*

*Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TS.*  
*The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer.*  
*Pharmacol Rev 2000; 52(4): 673-751.*

*Mittelmeier H, Mittelmeier W, Gleitz M.*  
*[Pyrost, a spongy, mineral bone substitute. Experimental bases and 13-year clinical experience in over 1000 cases].*  
*Orthopade 1998, 27(2): 126-135.*

*Murkies AL, Wilcox G, Davix SR.*  
*Clinical review 92: Phytoestrogens.*  
*J Clin Endocrinol Metab 1998, 83(2): 297-303.*

*Oonishi H, Kushitani S, Yasukawa E, Iwaki H, Hench LL, Wilson J, Tsuji E, Sugihara T.*  
*Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute.*  
*Clin Orthop Relat Res 1997; (334): 316-325.*

*Osborn JF.*  
*Biological behavior of the hydroxyapatite ceramic coating on the femur shaft of a titanium endoprosthesis--initial histologic evaluation of a human explant].*  
*Biomed Tech (Berl) 1987; 32(7-8): 177-183.*

Otsuki B, Takemoto M, Fujibayashi S, Neo M, Kokubo T, Nakamura T.  
*Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: three-dimensional micro-CT based structural analyses of porous bioactive titanium implants.*  
*Biomaterials* 2006; 27(35): 5892-9500.

Oursler MJ, Landers JP, Riggs BL, Spelsberg TC.  
*Oestrogen effects on osteoblasts and osteoclasts.*  
*Ann Med* 1993; 25(4): 361-371.

Paul W, Sharma CP.  
*Effect of calcium, zinc and magnesium on the attachment and spreading of osteoblast like cells onto ceramic matrices.*  
*J Mater Sci Mater Med* 2007; 18(5): 699-703.

Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG.  
*Animal models for implant biomaterial research in bone: a review.*  
*Eur Cell Mater* 2007; 13: 1-10.

Perrot P, Heymann D, Charrier C, Couillaud S, Rédini F, Duteille F.  
*Extraosseous bone formation obtained by association of mesenchymal stem cells with a periosteal flap in the rat.*  
*Ann Plast Surg* 2007; 59(2): 201-206.

Plank E, Burri C, Hutzschchenreuter P.  
[*Osteogenetic potential of gelatin and collagen in poorly regenerating bone layers (animal experiments)*].  
*Chir Forum Exp Klin Forsch* 1978; 247-249.

Probst A, Spiegel HU.  
*Cellular mechanisms of bone repair.*  
*J Invest Surg* 1997; 10(3): 77-86.

Puleo DA, Bizios R.  
*Formation of focal contacts by osteoblasts cultured on orthopedic biomaterials.*  
*J Biomed Mater Res* 1992; 26(3): 291-301.

Quesada N, Mutlu GM.  
*Images in cardiovascular medicine. Pulmonary embolization of acrylic cement during vertebroplasty.*  
*Circulation* 2006; 113: e295-e296.

Roach P, Eglin D, Rohde K, Perry CC.  
*Modern biomaterials: a review-bulk properties and implications of surface modifications.*  
*J Mater Sci Mater Med* 2007; 18(7): 1263-1277.

Rodrigues CV, Serricella P, Linhares AB, Guedes RM, Borojevic R, Rossi MA, Duarte ME, Farina M.  
*Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering.*  
Biomaterials 2003; 24(27): 4987-4797.

Rohanizadeh R, Swain MC, Mason RS.  
*Gelatin sponges (Gelfoam) as a scaffold for osteoblasts.*  
J Mater Sci Mater Med 2008; 19(3): 1173-1782.

Rueger JM.  
*Synthetische resorbierbare Materialien: Eine Alternative zum Transplantat?*  
Unfallchirurg 1998; 265: 261-269.

Rueger JM, Siebert, HR, Dohr-Fritz M, Schmidt H, Pannike A.  
*Time sequence of osteoinduction and osteostimulation elicited by biologic bone replacement materials.*  
Life Support Syst 1985; 3 Suppl 1: 471-475.

Ruth EB.  
*Bone studies. II. An experimental study of the Haversian-type vascular channels.*  
Am J Anat 1953; 93(3): 429-455.

Santavirta S, Konttinen YT, Saito T, Grönblad M, Partio E, Kemppinen P, Rokkanen P., S.,  
*Immune response to polyglycolic acid implants.*  
J Bone Joint Surg Br 1990; 72(4): 597-600.

Santin M, Morris C, Standen G, Nicolais L, Ambrosio L.  
*A new class of bioactive and biodegradable soybean-based bone fillers.*  
Biomacromolecules 2007; 8(9): 2706-2011.

Schieker M, Heiss C, Mutschler W.  
*Knochenersatzmaterialien.*  
Unfallchirurg 2008; 111: 613-620.

Schmitz JP, Hollinger JO.  
*The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions.*  
Clin Orthop Relat Res 1986; (205): 299-308.

Schnürer SM, Gopp U, Kühn KD, Breusch SJ.  
*Knochenersatzwerkstoffe.*  
Orthopäde 2003; 32(1): 2-10.

Tampieri A, Sandri M, Landi E, Celotti G, Roveri N, Mattioli-Belmonte M, Virgili L, Gabbanelli F, Biagini G.  
*HA/alginate hybrid composites prepared through bio-inspired nucleation.*  
Acta Biomater 2005; 1(3): 343-351.

*Thompson Z, Miclau T, Hu D, Helms JA.  
A model for intramembranous ossification during fracture healing."*  
J Orthop Res 20(5): 1091-1098.

*Tracy BM, Doremus RH.  
Direct electron microscopy studies of the bone-hydroxyapatite interface.*  
J Biomed Mater Res 1984; 18(7): 719-726.

*Tsuruga E, Takita H, Itho H, Wakisaka Y, Kuboki Y.  
Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis.*  
J Biochem 1997; 121(2): 317-324.

*Turco G, Marisch E, Bellomo F, Semeraro S, Donati I, Brun F, Grandolfo M, Accardo A, Paoletti S.  
Alginate/Hydroxyapatite biocomposite for bone ingrowth: a trabecular structure with high And isotropic connectivity.*  
Biomacromolecules 2009; 10(6): 1575-1583.

*Uhr G.  
Ziele und Wege des Tissue Engineering in der Knochen- und Geweberegeneration.*  
Implantologie Journal 2007; 4: 26-28.

*Van Heest A, Swiontkowski M.  
Bone-graft substitutes.*  
Lancet 1999; 353 Suppl 1: SI28-29.

*Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, Werb Z.  
MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes.*  
Cell 1998; 93(3): 411-422.

*Walenkamp GHIM, Murray DW.  
Bone Cements and Cementing Technique.*  
Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 2001

*Wang Z, Goh J, Das De S, Ge Z, Ouyang H, Chong JS, Low SL, Lee EH.  
Efficacy of bone marrow-derived stem cells in strengthening osteoporotic bone in a rabbit model.*  
Tissue Eng 2006; 12(7): 1753-1761.

*Wang X, Mabrey JD, Agrawal CM.  
An interspecies comparison of bone fracture properties.*  
Biomed Mater Eng 1998; 8(1): 1-9.

*Willmann G.  
Beschichtung von Implantaten mit Hydroxyapatit: Die Option auf eine stoffschlüssige Verbindung zwischen Knochen und Metall.*  
Materialwissenschaft und Werkstofftechnik 1999; 30: 317-325.

*Wintermantel E, Suk-Woo H.  
Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren."  
Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 2002: 101ff.*

*Wippermann BW, Schratt HE, Steeg S, Tscherne H.  
[Complications of spongiosa harvesting of the ilial crest. A retrospective analysis of 1,191 cases]."  
Chirurg 1997; 68(12): 1286-1291.*

*Zarb G, Albrektsson T. (1991).  
Osseointegration: A requiem for the periodontal ligament?  
Int J Periodontics Restorative Dent 1991; 11(2): 88-91.*

## **9 Abbildungsverzeichnis**

Abb.		Seite
1	Linke Femurkondyle eines NZW mit Bohrlochdefekt (Durchmesser 5 mm, Tiefe 10 mm); Sicht von lateral	31
2	Zur Operation vorbereitetes Kaninchen (noch nicht mit sterilen Tüchern abgedeckt)	33
3	Die Bohrstelle ist frei präpariert und der Mittelpunkt des geplanten Defekts markiert.	34
4	Erweiterung des Defekts auf 5 mm Durchmesser und 8 mm Tiefe mit Hilfe eines mit Anschlagring versehenen kanülierten 5 mm-Bohrers	35
5	Einfüllen des Zements in den Defekt mit Hilfe einer 2 ml Spritze.	36
6	Einbringen des vorgeformten subkutanen Implantats.	37
7	Schnittebene zur Anfertigung einer Knochenscheibe für den biomechanischen Test. Die schwarzen Markierungen sind die verschiedenen Messpunkte im Implantatbereich (grüner Rand) und in der Umgebung (ohne Umrandung)	42
8	Beispiel für ein nach Paragon gefärbtes histologisches Präparat der Probe aus der rechten Femurkondyle (CaP-Referenz-Z, 20 Wochen Standzeit post operationem)	43
9	3 mm dicke Knochenprobe (P) während der biomechanischen Messung in der Materialprüf-maschine	45
10	Schematische Darstellung der Druckpunkte für die Messung der Steifigkeit des Implantat-Knochen-Verbunds. (Ansicht von medial).	45
11	CaP-Z in Teflonplatte ausgehärtet in PBS bei 37 °C.	46

Abb.		Seite
12	Histologisches Präparat der Materialvariante CaP-Gelatine-Soja-Z nach 20-wöchiger Implantation. Die eingezeichneten Kreise zeigen die jeweils ausgewerteten Bereiche.	48
13	Knochenscheibe mit CaP-Referenz-Z nach 4-wöchiger Implantation. Makroskopisch sichtbar sind die große Menge an Material (M) und der Austritt des Materials in den Markraum (Pfeil).	51
14	Histologischer Schnitt des CaP-Referenz-Z nach 12-wöchiger Implantation im Knochen. Zu sehen ist der enge Material-Knochen-Kontakt.	52
15	Histologischer Schnitt des CaP-Referenz-Z nach 4-wöchiger Implantation im Knochen. Der zelluläre Abbau ist gekennzeichnet durch Zellen mit inkorporierten Materialpartikeln (Pfeile).	52
16	CaP-Referenz-Z: Relativer Anteil (%) an Material (M), Knochen (K) und Weichgewebe (W) im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.	53
17	CaP-Referenz-Z: Relativer Anteil (%) an Knochen (K) und Weichgewebe (W) in der Defektumgebung nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.	54
18	CaP-Referenz-Z: Steifigkeit (N/mm) im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.	55
19	CaP-Referenz-Z: Steifigkeit (N/mm) in der Defektumgebung nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.	55
20	CaP-Referenz-Z: Dichte (mg/ccm) im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.	56

Abb,		Seite
21	CaP-Referenz-Z: Dichte (mg/ccm) in der Defektumgebung nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.	56
22	Subkutanes Implantat aus CaP-Referenz-Z nach 20-wöchiger Implantation. Makroskopisch sind keine Entzündungsreaktionen und keine Verringerung des implantierten Materials sichtbar.	57
23	Histologischer Schnitt des subkutanen CaP-Referenz-Z Implantats nach 4-wöchiger Implantation. Sichtbar ist ein glatter von Bindegewebe umgebener Implantatrand.	57
24	Knochenscheibe mit CaP-Gelatine-Z nach 20-wöchiger Implantation. Makroskopisch ist kein implantiertes Material mehr sichtbar. Der Pfeil markiert den Defektbereich.	58
25	Histologischer Schnitt des CaP-Gelatine-Z nach 12-wöchiger Implantation im trabekulären Knochen. Zu sehen ist die geringe Menge an Restmaterial eingebettet in neu gebildete Knochentrabekel und der enge Implantat-Knochen-Kontakt.	59
26	Histologischer Schnitt des CaP-Gelatine-Z nach 4-wöchiger Implantation im trabekulären Knochen. Zu sehen ist der enge Implantat-Knochen-Kontakt und die rege Osteoblastenaktivität in der unmittelbaren Umgebung des Zements.	60
27	CaP-Gelatine-Z: Relativer Anteil (%) an Material (M), Knochen (K) und Weichgewebe (W) im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.	61
28	CaP-Gelatine-Z: Relativer Anteil (%) an Knochen (K) und Weichgewebe (W) in der Defektumgebung nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.	62

Abb.		Seite
29	CaP-Gelatine-Z: Steifigkeit (N/mm) im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.	63
30	CaP-Gelatine-Z: Steifigkeit (N/mm) in der Defektumgebung nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.	63
31	CaP-Gelatine-Z: Dichte (mg/ccm) im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.	64
32	CaP-Gelatine-Z: Dichte (mg/ccm) in der Defektumgebung nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.	64
33	Histologischer Schnitt des subkutanen CaP-Gelatine-Z Implantats nach 12-wöchiger Implantation. Sichtbar sind Reste des implantierten Materials umgeben von Weichgewebe, das häufig als straff organisiertes Bindegewebe zwischen den Materialresten zu liegen kommt.	65
34	Histologischer Schnitt des subkutanen CaP-Gelatine-Z Implantats nach 20-wöchiger Implantation. Sichtbar sind interkonnektierte Poren mit Fremdkörperriesenzellen.	65
35	Knochenscheibe mit CaP-Gelatine-Soja-Z nach 4 Wochen Implantation. Makroskopisch ist nur noch eine geringe Restmenge an implantiertem Zement übrig. Der Pfeil markiert den Defektbereich.	66
36	Histologischer Schnitt des CaP-Gelatine-Soja-Z nach 12-wöchiger Implantation im trabekulären Knochen. Zu sehen ist der enge Implantat-Knochen-Kontakt. Randständige Poren sind mit neu gebildetem Knochen gefüllt.	67

Abb.		Seite
37	Histologischer Schnitt des CaP-Gelatine-Soja-Z nach 12-wöchiger Implantation im trabekulären Knochen. Zu sehen ist das Zentrum des implantierten Materials mit ungefüllten Poren unterschiedlicher Größe.	67
38	CaP-Gelatine-Soja-Z: Relativer Anteil (%) an Material (M), Knochen (K) und Weichgewebe (W) im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.	68
39	CaP-Gelatine-Soja-Z: Relativer Anteil (%) an Knochen (K) und Weichgewebe (W) in der Defektumgebung nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.	69
40	CaP-Gelatine-Soja-Z: Steifigkeit (N/mm) im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.	70
41	CaP-Gelatine-Soja-Z: Steifigkeit (N/mm) in der Defektumgebung nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.	70
42	CaP-Gelatine-Soja-Z: Dichte (mg/ccm) im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.	71
43	CaP-Gelatine-Soja-Z: Dichte (mg/ccm) in der Defektumgebung nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.	71
44	Subkutanes Implantat aus CaP-Gelatine-Soja-Z nach 12-wöchiger Implantation. Auf der Abbildung sichtbar sind in Bindegewebe eingebettete neu gebildete Blutgefäße. Der unregelmäßige Implantatrand deutet auf den Abbau des Zements hin.	72

Abb.		Seite
45	Histologischer Schnitt des subkutanen CaP-Gelatine-Soja-Z Implantats nach 20-wöchiger Implantation. Sichtbar sind mit Bindegewebe und Blutgefäßen durchzogene Poren und deren Interkonnektionen.	72
46	Knochenscheibe mit CaP-Alginat-Z nach 4-wöchiger Implantation. Makroskopisch sichtbar sind die große Menge an Material (M) und der Austritt des Materials in den Markraum (Pfeil).	73
47	Histologischer Schnitt des CaP-Alginat-Z nach 12-wöchiger Implantation im trabekulären Knochen. Zu sehen ist der häufig lockere Implantat-Knochen-Kontakt, welcher durch eine bindegewebige Zwischenschicht gekennzeichnet ist.	74
48	Histologischer Schnitt des CaP-Alginat-Z nach 4-wöchiger Implantation im trabekulären Knochen. Zu sehen sind der unregelmäßige Implantatrand und die chondroblastenähnlichen Zellen in der Umgebung des Zements.	75
49	CaP-Alginat-Z: Relativer Anteil (%) an Material (M), Knochen (K) und Weichgewebe (W) im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.	76
50	CaP-Alginat-Z: Relativer Anteil (%) an Knochen (K) und Weichgewebe (W) in der Defektumgebung nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.	77
51	CaP-Alginat-Z: Steifigkeit (N/mm) im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.	78
52	CaP-Alginat-Z: Steifigkeit (N/mm) in der Defektumgebung nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.	78

Abb.		Seite
53	CaP-Alginat-Z: Dichte (mg/ccm) im Defektbereich nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.	79
54	CaP-Alginat-Z: Dichte (mg/ccm) in der Defektumgebung nach 4, 12 und 20 Wochen Implantationszeit im Vergleich zum intakten trabekulären Knochen nicht operierter Kaninchen.	79
55	Subkutanes Implantat aus CaP-Alginat-Z nach 4-wöchiger Implantation. Auf der Abbildung sichtbar ist die um das Implantat gebildete Bindegewebeskapsel.	80
56	Histologischer Schnitt des subkutanen CaP-Alginat-Z Implantats nach 4-wöchiger Implantation. Sichtbar ist eine mit Weichgewebe (Bindegewebe) und Fremdkörperriesenzellen gefüllte randständige Pore.	80
57-61	Vergleich der Kompositmaterialien (CaP-Gelatine-Z, CaP-Gelatine-Soja-Z, CaP-Alginat-Z) mit dem Referenzmaterial (CaP-Referenz-Z) nach einer Implantationsperiode von 4, 12 und 20 Wochen im trabekulären Knochen der Femurkondyle  Abb. 57: Relativer Anteil (%) an Material im Defektbereich.  Abb. 58: Relativer Anteil (%) an neu gebildetem Knochen im Defektbereich.  Abb. 59: Relativer Anteil (%) an Weichgewebe im Defektbereich.  Abb. 60: Steifigkeit (N/mm) im Defektbereich.  Abb. 61: Dichte (mg/ccm) im Defektbereich	83ff.

## **10 Tabellenverzeichnis**

Tab.		Seite
1	Verteilung der Versuchstiere in Abhängigkeit des implantierten Materials und der Implantationsperiode	31
2	Injection von Fluorochromfarbstoffen post operationem in Abhängigkeit von der Implantationsperiode	39

## **11 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Anita Ignatius und Herrn Prof. Dr. Lutz Claes für die Möglichkeit der Promotion am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik und für ihre große Unterstützung in allen privaten und arbeitsbezogenen Anliegen bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Ulrike Matis für die Übernahme meiner Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Antje Steinfatt für die tatkräftige Unterstützung während der Operationen.

Frau Christine Bausewein gilt mein besonderer Dank für die Mit Hilfe bei der gesamten Versuchsdurchführung, wie auch ihre unermüdliche Geduld bei Fachgesprächen und Diskussionen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Uschi Maile danke ich für die OP-Vorbereitung, die OP-Assistenz und die Anfertigung der histologischen Dünnschliffpräparate. In ihr habe ich während meiner Zeit am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik nicht nur eine zuverlässige Kollegin gefunden, die mir durch ihre unkomplizierte und offene Art eine große Hilfe während der gesamten Versuchsdurchführung war, sondern eine gute Freundin, die auch bei privaten Angelegenheiten stets ein offenes Ohr hatte.

Frau Martina Reusch möchte ich danken für die Mit Hilfe bei der Durchführung der Tierversuche. Frau Marion Tomo danke ich für die Unterstützung bei der OP-Vorbereitung und beim Anfertigen der histologischen Dünnschliffpräparate. Herrn Herbert Schmitt danke ich für die Hilfe bei der Lösung aller technischen Fragestellungen und fotografischer Probleme. Frau Patrizia Horny danke ich für die Hilfe bei der biomechanischen Testung und Auswertung.

Den Tierärzten des Tierforschungszentrums Oberberghof in Ulm, allen voran Frau Dr. Barbara Kuhnt möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit und alle guten Ratschläge danken.

Mein besonderer Dank gilt Wilhelm und Mareen, die sich liebevoll und zuverlässig um das Wohlbefinden der Kaninchen gekümmert haben.

Allen Mitarbeitern des Instituts möchte ich danken für die nette kollegiale Zeit in ihrer Mitte.

Meinem Mann Ralph danke ich für seine Aufmunterungen und sein Verständnis für die vielen Wochenenden, die ich im Tierforschungszentrum verbracht habe.