

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

Vorgelegt über das  
Institut für molekulare Tierzucht und Haustiergenetik  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Eckhard Wolf

**Untersuchung von neuen makroporösen Polymerkompositen als  
Knochenersatz im Tiermodell**

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

von  
Christine Bausewein  
aus Erfurt

München 2009

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Universität München**

**Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun**  
**Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Wolf**  
**Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Nuss**

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

# Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis.....	5
2. Einleitung .....	7
2.1 Knochenersatzmaterialien.....	7
2.1.1 Definition und Einteilung von Knochenersatzmaterialien .....	7
2.1.2 Komposite.....	17
2.2 Tiermodelle in der Knochenforschung .....	19
2.2.1 Das Schaf als Modell in der Knochen-Forschung .....	20
2.2.2 Critical Size Defect .....	21
2.3 Ziel der Arbeit.....	22
3. Material und Methoden .....	24
3.1 Knochenersatzmaterialien.....	24
3.2 Tiermodell .....	25
3.3 Ablauf des Tierversuchs.....	26
3.3.1 Gruppeneinteilung und Implantationszeitraum .....	26
3.3.2 Implantationsmodell.....	27
3.3.3 Osteosyntheseimplantate .....	27
3.3.4 Operation .....	29
3.3.5 Monitoring post OP .....	33
3.4 Aufarbeitung der Tibien <i>post mortem</i> .....	36
3.4.1 Präparation .....	36
3.4.2 Röntgen .....	37
3.4.3 Biomechanik .....	37
3.4.4 Bestimmung der Mineraleichte und des Knochenvolumens im Defekt .....	39
3.4.5 Histologie.....	42

3.4.6 Statistische Auswertung .....	45
4. Ergebnisse .....	47
4.1 Klinischer Verlauf .....	47
4.1.1 Röntgen .....	47
4.1.2 Aktivitätsmessung.....	50
4.1.3 Bodenreaktionskräfte.....	51
4.2 Makroskopische Beobachtungen .....	52
4.3 Röntgen im Faxitron.....	53
4.4 Bestimmung der Mineraldichte und des Knochenvolumens im Defekt .....	54
4.5 Biomechanik.....	59
4.6 Histologie .....	61
4.6.1 Qualitative Gewebedifferenzierung .....	61
4.6.2 Quantitative Gewebedifferenzierung .....	65
4.6.3 Fluoreszenzhistologische Untersuchung.....	69
5. Diskussion .....	72
5.1 Eignung des Untersuchungsmodells.....	72
5.2 Eignung der Knochenersatzmaterialien .....	76
5.2.1 $\beta$ -Trikalziumphosphat ( $\beta$ -TCP) .....	76
5.2.2 Polycaprolacton/ $\beta$ -Trikalziumphosphat (PCL/TCP).....	80
5.2.3 Poly (L-DL-lactid)/ Kalziumphosphat-Glas (PLA/G5).....	86
5.5 Ausblick.....	91
6. Zusammenfassung .....	92
7. Summary .....	94
8. Literaturverzeichnis.....	96
9. Danksagung.....	102
10. Lebenslauf .....	104

## 1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BMP	Bone morphogenetic protein
Ca	Kalzium
ca.	circa
Cl	Chlor
CaP	Kalziumphosphat
ccm	Kubikzentimeter
CT	Computertomographie
DBM	demineralisierte Knochenmatrix
etc.	et cetera
EU	Europäische Union
Fa.	Firma
H	Wasserstoff
HA	Hydroxylapatit
KEM	Knochenersatzstoff
KG	Körpergewicht
Lig.	Ligamentum
Lnn.	Lymphonodi
M	Molar
M.	Musculus
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
Na	Natrium
O	Sauerstoff
P	Phosphor
PCL	Polycaprolacton
PGA	Polyglykolid
PLA	Polylactid
PMMA	Polymethylmethacrylat
pQCT	periphere quantitative Computertomographie
ROI	Region of interest
s.c.	subkutan

Si	Silicium
TCP	Tricalciumphosphat
Ti	Titan
Tr.	Tropfen
v.a.	vor allem
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel
§	Paragraph
<	kleiner als/ weniger als
>	größer als/ mehr als

## 2. Einleitung

### 2.1 Knochenersatzmaterialien

#### 2.1.1 Definition und Einteilung von Knochenersatzmaterialien

Bei der Behandlung von ossären Substanzverlusten in Folge von komplizierten Frakturen, Pseudarthrosen und in der Endoprothetik kommen häufig Knochenersatzmaterialien zum Einsatz. Sie finden auch zur Defektauffüllung und bei der chirurgischen Behandlung von Knochtumoren oder Knochenzysten Anwendung (Epple, 2007; Frauendorf, 2007; Rueger, 1998a).

Bei Knochenersatzmaterialien handelt es sich um so genannte Biomaterialien. Ziel des Einsatzes von solchen Knochenersatzmaterialien ist die Wiederherstellung der Kontinuität und der mechanischen Belastbarkeit von Knochen. Außerdem sollen durch die Knochenersatzmaterialien die Menge, Qualität und Geschwindigkeit der Knochenneubildung positiv beeinflusst und beschleunigt werden (Rueger, 1998a).

Um ihre Aufgabe *in vivo* optimal erfüllen zu können, müssen solche Knochenersatzmaterialien folgende Voraussetzungen erfüllen:

**Biokompatibilität:** Die Materialien dürfen keine chemischen (Freisetzung toxischer Stoffe), biologischen (immunologische Abwehr oder allergische Reaktionen) oder andere adverse Reaktionen im Empfängerorganismus hervorrufen (Epple, 2007; von Garrel und Gotzen, 1998).

**Osteoaktivität:** Unter Osteoaktivität bzw. biologischer Potenz versteht man die osteokonduktiven, osteoinduktiven und osteogenen Eigenschaften eines Implantats (Hallfeldt et al., 1994; Parikh, 2002; von Garrel, 1998). Mit *Osteokonduktion* wird der „Leitschieneneneffekt“ eines Knochenersatzmaterials beschrieben. Es handelt sich

dabei um eine Richtungsgebung für einwachsende Blutgefäße und neugebildeten Knochen durch eine definierte Struktur. *Osteoinduktion* bezeichnet die Bildung neuen Knochens durch aktives Rekrutieren von mesenchymalen Stammzellen aus dem umgebenden Gewebe des Empfängers. Diese differenzieren zu knochenbildenden Osteoblasten. Gesteuert wird dieser Prozess durch Wachstumsfaktoren wie z. B. den Bone Morphogenetic Proteins (BMP), die auch vom implantierten Material freigesetzt werden können, wenn das Material entsprechend dotiert ist. Bei Materialien mit *osteogenen Eigenschaften* handelt es sich um Implantate, die zelluläre Elemente beinhalten. Diese Zellen können zur Synthese von neuem Knochen am Implantationsort beitragen (Albrektsson und Johansson, 2001; Greenwald et al., 2001; Parikh, 2002).

*Mechanische Stabilität:* Das Material sollte außerdem entsprechend des im Defekt fehlenden Knochens ausreichende Festigkeit und mechanische Stabilität besitzen (Epple, 2007; Hutmacher, 2000; Uhr, 2007; von Garrel, 1998).

Zahlreiche Arbeiten belegen die Bedeutung des Implantatdesigns für eine Optimierung der Knochendefektheilung. So ist für die Osteokonduktion, die Resorbierbarkeit und die Vaskularisierbarkeit eine hohe Porosität und die Interkonnektion der Poren entscheidend (Mastrogiacomo et al., 2005; Parikh, 2002). Durch eine hohe Porosität im Material wird eine größere Oberfläche in Relation zum Implantatvolumen erreicht. Dies führt zu einer schnelleren Integration in das Implantatlager, da eine größere Angriffsfläche für eine schnellere Revaskularisation und damit auch für eine gesteigerte Wirkung osteoinduktiver Faktoren bereitgestellt wird (Übersicht in (Epple, 2007; Hallfeldt, 1994)). Die Angaben zu geeigneten Porengrößen variieren zwischen den Autoren. Meist werden aber Größen von 300 – 400 µm als optimal angegeben. Als minimale Porengröße, bei der es noch zu Bildung von mineralisiertem Knochen kommt, gelten 50 µm. Implantate mit kleineren

Poren bieten nicht genügend interstitiellen Raum für das Einwachsen von Gefäßen und es kommt zu einer sehr geringen Sauerstoffspannung. Dies begünstigt zunächst die Bildung von Knorpelgewebe und erst in einem zweiten Schritt kommt es zur Mineralisation und Knochenbildung (enchondralen Ossifikation). Bei größeren Poren kommt es zur direkten Ossifikation, ohne Knorpelbildung als Vorstufe. Dabei ist zu berücksichtigen, dass große Poren und eine hohe Gesamtporosität den Nachteil einer geringeren mechanischen Belastbarkeit des Implantats haben. (Karageorgiou und Kaplan, 2005; Kieswetter et al., 1996; Klenke et al., 2008)

Wichtig ist auch, dass die Biodegradation des Knochenersatzmaterials der Knochenneubildungsrate angepasst sein sollte. Des Weiteren sollte die Biodegradation in kontrollierter Geschwindigkeit ablaufen, bei der das Material in leicht metabolisierbare und exkretierbare Moleküle zersetzt werden kann (Epple, 2007; Hutmacher, 2000; Ishaug et al., 1997).

Einige weitere Voraussetzungen für ein optimales Knochenersatzmaterial sind die Sterilisierbarkeit, Lagerungsfähigkeit, die einfache Anwendung und möglichst geringe Kosten (Damien und Parsons, 1991; Epple, 2007).

Neben den aufgeführten Voraussetzungen, die ein optimales Knochenersatzmaterial erfüllen muss, ist auch das Implantatlager im Empfängerorganismus als erfolgsbestimmender Faktor relevant. Transplantat- bzw. Implantatlager können unterteilt werden in ersatzstarke Lager mit guter Vaskularisation, ersatzschwache Lager und ersatzunfähige Lager, deren Gewebe avital und vermindert durchblutet sind (Übersicht in (von Garrel, 1998)).

Eine optimale Einheilung eines Materials ist abhängig von der Defektgröße, mechanischer Ruhe, Vitalität und osteogener Kapazität des Implantatlagers (Hallfeldt, 1994). Dabei ist die osteogene Kapazität des Implantatlagers abhängig von der Lokalisation im Skelettsystem. Die Tibia beispielsweise gilt als ein eher

ersatzschwaches Lager. Das ist durch die geringe Weichteilabdeckung des Knochens und damit relativ geringe Blutversorgung bedingt. Knochendefekte mit guter Weichteilabdeckung heilen besser als solche mit geringer Weichteilabdeckung (Übersicht in (Hallfeldt, 1994)).

Basierend auf den erläuterten Ansprüchen an die Biomaterialien wurden verschiedene chirurgische Therapieverfahren entwickelt. Dabei gibt es drei klassische Möglichkeiten zur Therapie von Knochendefekten kritischer Größe (Definition siehe 1.2.2):

1. Knochentransport (Ilizarov-Technik)
2. Knochentransplantat (autogen, allogene, xenogen)
3. Implantate aus Biomaterialien

Bei der *Ilizarov-Technik* handelt es sich um Osteogenese durch Kallusdistraction. Diese Methode wird in erster Linie bei ausgedehnten Defektzonen im Röhrenknochen eingesetzt. Das Anlegen des hierbei nötigen Fixateur externe über mehrere Monate ist für den Patienten häufig problematisch und sehr zeitaufwändig. Zudem besteht ein hohes Infektionsrisiko (Knaepler et al., 1994).

Vorteile der *Knochentransplantate* sind deren osteokonduktive Eigenschaften. Die vom Transplantat mitgebrachten Wachstumsfaktoren sorgen für Osteoinduktion und eine schnelle Vaskularisation. Hinzu kommt beim autogenen Knochentransplantat der Gehalt an Zellen, von denen ein osteogenes Potential ausgehen kann (Übersicht in (Cancedda et al., 2007)). Autogener Knochen wird oft auch als „Goldstandard“ bezeichnet (Rueger, 1998a). Die Probleme, die solche Knochentransplantate mit sich bringen, sind trotz der Vorteile nicht zu unterschätzen. Bei autogenen Transplantaten ist das Material nur in geringen Mengen verfügbar und es ist immer ein operativer Zweiteingriff mit all seinen Nachteilen und Risiken nötig. So kann es zum Beispiel zu Morbidität an der Entnahmestelle kommen (Gerngroß et al., 1982). Bei allogenen

und auch xenogenen Knochentransplantaten besteht ein Risiko der Übertragung von Infektionen und immunologischer Abwehrreaktionen (Frauendorf, 2007; Knaepler, 1994) (Übersicht in (Cancedda, 2007; Damien, 1991)). Xenogene Transplantate sind zudem durch sterilisierende Maßnahmen derart behandelt, dass sie ihre osteogenen Eigenschaften verlieren (Rueger, 1996). Solche Knochentransplantate führen außerdem nicht immer mit 100 %iger Sicherheit zur erfolgreichen Heilung (Mastrogiacomo, 2005), weshalb zunehmend alternative Methoden zum Einsatz kommen.

*Biomaterialien* haben gegenüber den Knochentransplantaten den Vorteil, dass sie unbeschränkt verfügbar sind und meist gute osteokonduktive Eigenschaften haben (Cancedda, 2007). Auch besteht kein Risiko der Übertragung von Infektionen. Ein großer Nachteil dieser Materialien gegenüber dem autologen Knochen ist die fehlende Osteoinduktivität (Übersicht in (Cancedda, 2007)). Eine Lösung bietet die Integration von Wachstumsfaktoren oder von osteogenen Zellen (Mastrogiacomo, 2005). Biomaterialien können in synthetische und nicht-synthetische Materialien untergliedert werden (Tab. 1). Zu den synthetischen Materialien gehören Metalle, Keramiken und Glaskeramiken, Polymere sowie Komposite aus den diversen Materialien.

Des Weiteren gibt es biologisch funktionalisierte synthetische Materialien. Zu den nicht-synthetischen Materialien biologischen Ursprungs gehören osteoinduktive Materialien, wie z.B. demineralisierte Knochenmatrix (DBM) oder Komposite mit DBM-Anteilen (Übersicht in (Epple, 2007; Rueger, 1996; Rueger, 1998a)).

Tab. 1 Einteilung von Biomaterialien zum Einsatz als Knochenersatzmaterialien (KEM) (Epple, 2007; Frauendorf, 2007; Rueger, 1996)

Nicht-synthetische/ biologische KEM	z. B. mineralisierte/ demineralisierte Knochenmatrix, bovines Kollagen	
Synthetische KEM	Keramiken	Hydroxylapatit
		Trikalziumphosphat
		Biphasisches Kalziumphosphat (Hydroxylapatit + Trikalziumphosphat)
		Glaskeramiken
	Polymere	Nicht degradierbar (z.B. Polymethylmethacrylat)
		Degradierbar (Polyester, wie z. B. Polyglykoxide, Polylaktide, Polycaprolaktone)
Metalle	z. B. Titanium, Tantal, Nickel- Titaniumlegierungen, Magnesiumlegierungen	
Komposite	Kombinationen aus verschiedenen synthetischen und/ oder nicht-synthetischen Materialien	

Da in der vorliegenden Studie ein keramisches Material sowie zwei Polymerkompositmaterialien mit keramischen Anteilen zum Einsatz kamen, wird im Folgenden näher auf diese Materialgruppen eingegangen.

## *Keramiken*

Zu den keramischen Materialien, die als Knochenersatzstoff genutzt werden, gehören zum Beispiel Trikalziumphosphate (TCP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) und Hydroxylapatite (HA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). Außerdem gibt es noch Kombinationen aus Trikalziumphosphat und Hydroxylapatit (biphasisches Kalziumphosphat, BCP) (Übersicht in (Damien, 1991; Epple, 2007)). Bei den Trikalziumphosphaten unterscheidet man  $\alpha$ - und  $\beta$ -TCP, wobei das Letztere das biochemisch Stabilere ist.

Keramiken sind weder toxisch noch kanzerogen und lösen im Allgemeinen auch keine lokalen Entzündungsreaktionen aus (Übersicht in (Damien, 1991)). Sie sind durch ihre Ähnlichkeit zu Knochen biokompatibel (Epple, 2007). In ihren chemischen Eigenschaften sind sie dem Knochen sehr ähnlich. Außerdem sind sie oberflächenaktiv bzw. bioaktiv und haben gute osteokonduktive Eigenschaften. Dabei ist das Einwachsverhalten von Knochen in ein keramisches Implantat von der Makroporosität des Materials abhängig. Im Knochen implantiert gehen sie mit diesem eine gute Bindung ein, wodurch ein fester osteoimplantärer Verbund entsteht (Übersicht in (Damien, 1991; LeGeros et al., 1988)). Das kann dazu führen, dass Materialreste bei sehr guter Material-Knochen-Verbindung ohne die Möglichkeit eines weiteren Abbaus komplett im Knochen eingebaut werden (Übersicht in (Damien, 1991)). Dies hat zur Folge, dass die Gesamtstabilität des neugebildeten Knochens unter der des ursprünglichen, gesunden Knochens zurück bleibt, da Keramiken eine sehr hohe Brüchigkeit aufweisen (Boyan et al., 1997). Die mechanische Stabilität solcher Implantate ist in belasteten Implantatlagern unzureichend (Epple, 2007).

Die Degradation kann bei keramischen Implantaten auf physikalischem, chemischen und/oder zellulärem Weg erfolgen, wobei sie stets relativ langsam abläuft. TCP-

Implantate weisen hierbei meist einen schnelleren Abbau als HA-Keramiken auf. Die Degradationszeit von biphasischen Kalziumphosphaten liegt zwischen der von TCP und HA (LeGeros, 1988), (Übersicht in (Epple, 2007)).

Keramiken werden klinisch als Implantate zur Defektauffüllung eingesetzt (Wintermantel und Ha, 1996). Außerdem werden sie auch zur Beschichtung von metallischen Implantaten genutzt, um diesen osteokonduktive Eigenschaften zu verleihen (Übersicht in (Damien, 1991)). Beispiele für klinisch eingesetzte Keramiken sind *Ostim*<sup>®</sup> und *Osteograf/N*<sup>TM</sup> (beides HA-Keramiken). Bei den TCP-Keramiken wäre beispielhaft das  $\beta$ -TCP *Cerasorb*<sup>®</sup> zu nennen (Frauendorf, 2007).

Oft werden in der Gruppe der Keramiken auch die Biogläser aufgeführt (Arcos et al., 2009). Biogläser weisen Komponenten, wie SiO<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>O, CaO oder P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> auf. Sie zeigen eine schnelle und direkte Bindung an den Knochen. Nachteilig ist ebenfalls die niedrige Festigkeit (Rueger, 1998b; Wintermantel und Ha, 2002).

### *Polymere*

Polymere sind makromolekulare Verbindungen, die aus mehreren gleichen oder verschiedenen Monomeren aufgebaut sind. Diese kommen natürlich vor oder werden synthetisch hergestellt (Bendix und Liedke, 1998).

Polymere weisen eine höhere Elastizität, Plastizität, Viskoelastizität und Thermoverformbarkeit als Keramiken auf. Die Eigenschaften von Polymeren können zum Beispiel über die Kettenlänge, Kristallinität oder Mischung von zwei oder mehr Polymeren gesteuert werden. Wichtige Eigenschaften sind vor allem die mechanische Stabilität und die Biodegradierbarkeit des Materials (Bendix, 1998; Epple, 2007). Man unterscheidet degradierbare und nicht degradierbare Polymere. Zu den nicht degradierbaren Polymeren gehören zum Beispiel Polymethylmethacrylat (PMMA)-basierte Materialien und Polyethylen. Diese finden

häufig in der Endoprothetik Verwendung. Da sie vom Organismus nicht abgebaut werden, kommt es zu keinem Ersatz durch Knochen (Carson und Bostrom, 2007; Damien, 1991; Wintermantel, 1996).

Polyester-basierte Materialien zählen zu den degradierbaren Polymeren. Zu der Stoffgruppe der Polyester-basierten Polymere gehören zum Beispiel Polyglykolide (PGA), Polylaktide (PLA) und Polycaprolaktone (PCL) (Boyan, 1997; Epple, 2007). Bei den degradierbaren Polymeren unterscheidet man semikristalline (hohe Festigkeit) und amorphe (geringe Festigkeit) Polymere. Die Kristallinität entsteht, wenn sich durch sterische Molekülkettenanordnung geordnete Bereiche im Material ausbilden. Dies kann durch thermische Behandlung beeinflusst werden. Je kristalliner das Polymer ist, desto länger dauert die Degradation (Amecke et al., 1992; Bendix, 1998). So beträgt die Degradationsdauer bei dem amorphen Poly(DL-lactid) (PDLLA) 12 bis 16 Monate, während die Degradationszeit bei den semikristallinen Polymeren Polycaprolacton (PCL) und Poly(L-lactid) (PLLA) zwischen drei und fünf Jahren liegt (Übersicht in (Middleton und Tipton, 2000)). So konnten beispielsweise Bos und Rozema an Ratten und Ziegen zeigen, dass der Abbau von PLLA über drei Jahre dauerte (Bos et al., 1991; Rozema et al., 1990).

Die Biodegradation dieser Polyester-basierten Polymere verläuft in erster Linie durch hydrolytische Spaltung der Esterbindung. Aber auch zellulärer oder enzymatischer Abbau ist bei diesen Stoffen möglich (Bos, 1991; Boyan, 1997). Unter physiologischen Bedingungen im Körper entstehen bei dem hydrolytischen Abbau der Polymere  $H_2O$  und  $CO_2$ , die vor allem über Stoffwechselwege durch Niere und Lunge ausgeschieden werden (Athanasίου et al., 1998; Bendix, 1998). Die sauren Abbauprodukte der Polymere können zu lokalen Entzündungsreaktionen führen. So berichtete Bergsma 1993 und 1995 von adversen Gewebereaktionen und Entzündung in vivo. Diese wurde durch die rapide Freisetzung von Oligomeren und

Milchsäure bei der Degradation von PLA-Platten und –Schrauben verursacht (Bergsma et al., 1993; Bergsma et al., 1995). Ein weiterer Nachteil von Polymeren sind die mangelnden mechanischen Eigenschaften, die nicht an die des trabekulären Knochens heranreichen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die degradierbaren Polyester-basierten Polymere PLA und PCL als Kompositbestandteile verwendet. Dabei wurde zum einen PLA mit einem Bioglas und zum anderen PCL mit  $\beta$ -TCP kombiniert.

PCL wird aus  $\epsilon$ -Caprolacton durch Polymerisation synthetisiert. Der Kristallinitätsgrad sinkt mit steigendem Molekulargewicht. Die Degradation erfolgt in erster Linie auf hydrolytischem Wege. Dabei handelt es sich um eine vom Materialinneren ausgehende Degradation (bulk degradation). Die Degradationszeit beträgt 2-4 Jahre. Durch zum Beispiel Copolymerisation oder durch Zumischen von Lactiden und Glycoliden kann dabei die Degradationsrate erhöht werden (Übersicht in (Domb et al., 2002; Wintermantel, 2002)).

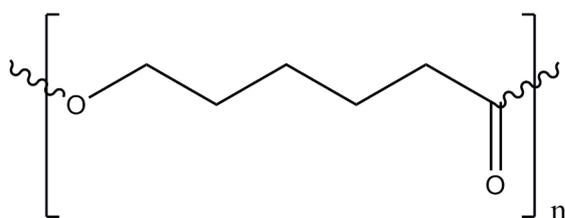


Abb. 1 Chemische Struktur für PCL

PLA ist ein aus Milchsäureeinheiten aufgebautes Polymer, das sowohl in hochkristalliner als auch in amorpher Form vorliegen kann (Bendix, 1998). Ein Beispiel für ein klinisch als Knochenersatzstoff eingesetztes Polymer ist das aus PGA und PLA bestehende *Fisiograft* (Frauendorf, 2007). Außerdem finden Polymere wie PLA und PGA im medizinischen Bereich sehr häufig als resorbierbare

Nahtmaterialien oder als resorbierbare Implantate zur Frakturfixierung Verwendung (Parikh, 2002).

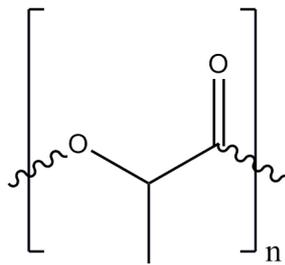


Abb. 2 Chemische Strukturformel für PLA

### 2.1.2 Komposite

Unter Kompositen versteht man Materialien, die aus einer Kombination von zwei oder mehr Einzelkomponenten aufgebaut sind. Häufig wird dabei z. B. ein keramisches Material mit Kollagen oder Polymeren kombiniert (Übersicht in (Damien, 1991)). Solche Komposite sollen die Eigenschaften des natürlichen Knochens imitieren, also gleichzeitig hart und elastisch sein (Übersicht in (Boyan, 1997; Eppele, 2007)). Ein oder mehr beigemischte zusätzliche Stoffe sollen dabei Defizite des ersten Stoffs ausgleichen (Rueger, 1998a). Die Charakteristika können durch verschiedene Mischungsverhältnisse der einzelnen Materialkomponenten untereinander beeinflusst werden (Boyan, 1997). Es wird zumeist versucht osteokonduktive Materialien wie Keramiken, mit Polymeren zu kombinieren (Damien, 1991). Einige Autoren konnten zeigen, dass bei solchen Kompositen Keramiken wie HA oder TCP dabei für gute Biokompatibilität, Biodegradierbarkeit und gute mechanische Eigenschaften sorgen. Polymere wie PLA oder PCL werden zugesetzt, um die entsprechende Elastizität zu erreichen und die Degradation besser steuern zu können (Lam et al., 2008; Shikinami und Okuno, 1999; Verheyen et al., 1992). Verheyen et al. zeigte, dass bei einer Kombination des Polymers PLLA und der Keramik HA der Polymeranteil für eine gesteigerte Resorption sorgte, während der

keramische Anteil die Knochenbindungsfähigkeit des Materials erhöhte (Verheyen, 1992). Shikinami und Okuno konnten bei Kompositen aus PLA und HA eine höhere mechanische Stabilität gegenüber den Einzelbestandteilen feststellen (Shikinami, 1999). Ignatius et al. stellten bei Polymerkompositen aus  $\alpha$ -TCP und PLA verbesserte mechanische Eigenschaften gegenüber dem reinen Polymer fest. Jedoch kam es hier im Rahmen der Degradation des Polymerabbaus zu Entzündungsreaktionen (Ignatius et al., 2001a). Causa et al. und Lam et al. fanden bei der Kombination von PCL mit HA bzw.  $\beta$ -TCP ebenfalls verbesserte mechanische Eigenschaften gegenüber dem reinen Polymer. Auch hatten die Komposite eine bessere Osteokonduktivität und wiesen eine schnellere Degradation auf (Causa et al., 2006; Lam, 2008). Rizzi et al. konnten eine verbesserte Biokompatibilität von Polymeren, die mit HA kombiniert wurden, feststellen. Sie besiedelten Komposite aus PLA/HA und PCL/HA mit humanen Osteoblasten. Es zeigte sich eine höhere Zellaktivität an den HA-exponierten Partikeln der Komposite gegenüber reinem PLA oder PCL. Die Zellaktivitätsantwort wurde durch die Exposition von HA dominiert (Rizzi et al., 2001).

Bei PLA- oder PLG-Schäumen ermöglichte eine Kombination mit Keramiken wie Trikalziumphosphat oder Hydroxylapatit ein variables Anpassen der Degradationsrate und eine Abpufferung der sauren Abbauprodukte der Polymerkomponenten (Übersicht in (Boyan, 1997; Hutmacher, 2000)).

Eine Fähigkeit von Polymeren als Kompositbestandteil ist die Möglichkeit, eine Carrier-Funktion für zugesetzte osteoinduktive Substanzen zu übernehmen (Übersicht in (Middleton, 2000)).

## 2.2 Tiermodelle in der Knochenforschung

Tierversuche sind in der muskuloskelettalen Forschung unerlässlich. Mittels tierexperimenteller Modelle können zum Beispiel invasive Knochenheilungsstudien in „kontrolliertem“ Labor-Umfeld durchgeführt werden. Prinzipiell ist es dabei möglich, Informationen von einer Säugerspezies auf andere zu übertragen und Tiermodelle als Modelle für humane Konditionen zu nutzen. Jedoch darf man Ergebnisse dieser Studien nicht bedenkenlos auf den Menschen übertragen. So gibt es beispielsweise einige human-spezifische Knochen- und Bindegewebserkrankungen, die beim Tier nicht vorkommen (Übersicht in (Auer et al., 2007)).

Für die Auswahl der am besten passenden Spezies müssen im Vorfeld für eine tierexperimentelle Studie einige Faktoren berücksichtigt werden. Idealerweise sollte die eingesetzte Spezies eine Beobachtung einer großen Anzahl an Individuen in einer möglichst kurzen Zeitperiode ermöglichen und eine stichhaltige Extrapolation von reproduzierbaren Daten und Ergebnissen liefern. Dabei spielen das Forschungsziel und die Fragestellung eine entscheidende Rolle. Die eingesetzten Tiere müssen die Gefangenschaft gut tolerieren und auch chirurgische Eingriffe möglichst komplikationslos überstehen. Außerdem sind die Infektions- und Krankheitsresistenz der Spezies und die interindividuelle Uniformität zu beachten. Die speziesspezifischen Knochencharakteristika, wie Mikrostruktur, Zusammensetzung, Modeling, Remodeling und biomechanische Eigenschaften sollten mit denen des Menschen vergleichbar sein. Außerdem muss die Lebensdauer der verwendeten Versuchstierspezies zur Studie passen (Pearce et al., 2007; Schimandle und Boden, 1994; Wissing et al., 1990).

Eine weitere wichtige Rolle für die Auswahl der Spezies spielen die Verfügbarkeit und die Anschaffungskosten, sowie der Haltungs- und Pflegeaufwand. Nicht zuletzt hat auch die gesellschaftliche Akzeptanz einer Spezies als Versuchstier eine großen

Einfluss auf die Entscheidung (Pearce, 2007; Schimandle, 1994; Wissing, 1990). Insgesamt gibt es keine Tierart die diese Kriterien vollständig erfüllt. Es handelt sich jeweils um eine bestmögliche Annäherung an die humane Situation (Hazzard et al., 1992; Pearce, 2007).

In den frühen Testphasen für Implantate werden kleine und kostengünstige Tierarten meist bevorzugt. Für chirurgische und orthopädische Fragestellungen sind jedoch Tiermodelle mit ähnlichen Knochendimensionen wie beim Menschen besser geeignet (Kleinschmidt und Hollinger, 1992; Martini et al., 2001).

Es ist wichtig für die Auswahl der am besten passenden Spezies und auch für die Interpretation der Ergebnisse einer solchen tierexperimentellen Studie, die Unterschiede der Tierarten untereinander und zum Menschen genau zu kennen (Auer, 2007). So ist die Geschwindigkeit der Knochenregeneration bei kleineren Versuchstierspezies, wie Mäusen, Ratten und Kaninchen wesentlich höher, als bei größeren Tieren, wie Hunden, Schweinen oder kleinen Wiederkäuern (Kleinschmidt, 1992).

### 2.2.1 Das Schaf als Modell in der Knochen-Forschung

Schafe sind als Versuchstierspezies weniger ethisch umstritten als zum Beispiel Hunde (Auer, 2007). Sie haben ein eher ruhiges Verhalten, was ein recht einfaches Handling ermöglicht (Martini, 2001). Des Weiteren besteht in der Knochenstruktur, den Dimensionen des Skeletts und den mechanischen Eigenschaften bei Schafen eine starke Annäherung an den Menschen (Gerhart et al., 1993; Martini, 2001; Wissing, 1990). Dies ermöglicht den Einsatz und die Testung humaner Implantate und Endoprothesen (Auer, 2007; Wissing, 1990). Außerdem sind das Knochen-Remodeling und die -Regeneration mit dem des Menschen vergleichbar (Petite et al.,

2000; Wissing, 1990). So tritt bei Schafen auch ein dem Menschen zeitlich ähnliches Knochen-Einwachsverhalten in poröse Implantate auf (Willie et al., 2004).

Auf histologischer Ebene ist bei Schafen in erster Linie eine primäre Knochenstruktur bzw. lamellärer Knochen zu finden. Beim Menschen hat sich im Vergleich dazu bis zur skelettalen Reife eine sekundäre Knochenstruktur mit Osteonen ausgebildet (Auer, 2007; Eitel et al., 1981; Newman et al., 1995). Im Gegensatz zum Menschen besitzen Schafe zunächst eine vorwiegend primäre Osteonenstruktur (Newman, 1995; Wissing, 1990). Mit zunehmenden Alter und während der Knochenheilung und des Remodellings werden dann aber auch beim Schaf sekundäre Osteone ausgebildet (Auer, 2007; Newman, 1995). Mit zunehmendem Alter sind mehr als die Hälfte des Knochenquerschnitts mit Haverschen Lamellensystemen und Sekundärosteonen ausgestattet (Wissing, 1990).

Die Knochen von Schafen weisen zwar eine höhere Knochendichte und -festigkeit als humane Knochen auf, die Mineralzusammensetzung des Knochens ist aber dennoch beim Schaf und Menschen ähnlich (Liebschner, 2004).

### 2.2.2 Critical Size Defect

In dieser Studie wurden Kompositmaterialien in einem Defekt kritischer Größe in der Schafttibia getestet.

Der sogenannte Critical Size Defect oder Defekt kritischer Größe wird definiert als die kleinste Größe einer intraosseären Verletzung im einzelnen Knochen, die nicht spontan verheilt (Hollinger und Kleinschmidt, 1990; Schmitz und Hollinger, 1986).

Der Reparaturversuch eines solchen Defekts kritischer Größe durch den Organismus selbst endet in der Formation von fibrösem Bindegewebe (Schmitz, 1986).

Die Größe, ab der ein Defekt als Defekt kritischer Größe bezeichnet wird, ist abhängig von der Rasse und Spezies, vom Alter des Individuums und von der Lokalisation des Defekts im Skelett (Gugala und Gogolewski, 1999; Schmitz, 1986). Außerdem spielt das Vorhandensein oder die Abwesenheit einer Osteosynthese und die Art der Fixierung eine Rolle (Übersicht in (Martini, 2001)). Des Weiteren sind die Intaktheit des Periosts, die Blutversorgung und die Relation zwischen Knochendefekt und Knochengröße von Bedeutung (Übersicht in (Martini, 2001; Schmitz, 1986)) (Gugala, 1999).

Beim Schaf gilt ein Defekt in der Diaphyse der Tibia als kritischer Defekt, wenn er das 1 bis 1,5-fache des Knochendurchmessers oder 10 % der Knochenlänge ausmacht. Das ergibt für die Schafstibia einen ca. 20 mm großen Defekt, der als nicht versorgter Defekt zu einer Pseudarthrose führt (Schmitz, 1986; Wippermann und Kniesch, 1994). Im Bereich des Metatarsus wird schon ein Defekt ab 6 mm Größe als kritischer Defekt bezeichnet und im spongiösen Knochen ein Defekt ab 10 mm Durchmesser (Petite, 2000) .

### **2.3 Ziel der Arbeit**

Auf der Suche nach dem idealen Knochenersatzmaterial haben Kompositmaterialien in der bisherigen Forschung das größte Potential gezeigt. Jedoch ist es bisher noch nicht gelungen, ein geeignetes Kompositmaterial zu entwickeln, das den Vorstellungen des idealen Knochenersatzmaterials entspricht.

In dieser Studie wurden zwei neue makroporöse Polymer-Komposite zur Behandlung großer Knochendefekte getestet und mit einem Trikalziumphosphat ohne Polymer verglichen. Die Materialien wurden in einen Defekt kritischer Größe in der Diaphyse der Schafstibia implantiert.

Im Rahmen der Arbeit sollte die Biokompatibilität der Materialien überprüft werden. Dabei wurde insbesondere auf adverse Reaktionen des Empfängerorganismus auf das Implantat geachtet. Des Weiteren sollten das Einwachsen neugebildeten Knochens in das Material und die daraus resultierenden mechanischen Eigenschaften (Steifigkeit) im Defektbereich untersucht werden. Außerdem wurden die Biodegradation und –resorbierbarkeit der Materialien über den Implantationszeitraum analysiert.

Anhand der Ergebnisse sollte versucht werden, Aussagen über die potentielle Eignung der getesteten Materialien als klinisch einsetzbare Knochenersatzwerkstoffe zu treffen.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Knochenersatzmaterialien

Bei den in dieser Studie getesteten Knochenersatzmaterialien handelte es sich um zwei verschiedene Polymer-Komposite.

Zum einen wurde ein Komposit aus Polycaprolacton mit 10 % (w/w)  $\beta$ -Tricalciumphosphat (PCL/TCP)<sup>1</sup> verwendet (Abb. 3a). Dieses hatte eine Gesamtporosität von 66,8 %. Die einzelnen Trabekel des Implantats wiesen eine Porosität von 30 % auf. Dabei lag die Porengröße bei 500  $\mu\text{m}$ . Hergestellt wurden die hohlzylindrischen Implantate durch Rapid Prototyping mit Laser-Schmelzverfahren aus Sintermaterial.

Zum anderen kam ein Komposit aus Polylactid mit einem löslichen Calciumphosphat-Glas (PLA/G5)<sup>2</sup> zum Einsatz (Abb. 3b). Die Gesamtporosität dieses Materials lag bei 90-95 %. Es bestand aus 50 % (w/w) Glas-Partikeln ( $\text{P}_2\text{O}_5\text{-CaO-Na}_2\text{O-TiO}_2$ ) und 50 % Poly (L-DL-lactid) im Mischungsverhältnis 95:5 % von L-lactid und DL-lactid. Die Porengröße lag bei 10-350  $\mu\text{m}$ . Die Herstellung erfolgte durch die Solvent-Casting Technik (Abgussverfahren) mit Salzpartikel-Auswaschung.

Als Referenzmaterial diente reines  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP)<sup>3</sup> (Abb. 3c) mit einer Gesamtporosität von 55–60 %. Die Mikroporen hatten eine Größe von 5  $\mu\text{m}$  und die Makroporen von bis zu 1 mm. Die Herstellung erfolgte durch Pressen von kommerziell erhältlichen  $\beta$ -TCP-Granula in die entsprechenden Formkörper.

---

<sup>1</sup> Polycaprolactone, Solvay CAPA 6506; NUIG, Galway, Irland

<sup>2</sup> UPC (Universitat Politècnica de Catalunya), Barcelona, Spanien

<sup>3</sup> Biovision, Jena

Alle drei Materialien lagen als hohlzylindrische Formkörper (Außendurchmesser 20 mm, Innendurchmesser 7,5 – 10 mm; Höhe 20 mm) vor. Die Poren aller Scaffolds waren nach Angaben der Hersteller interkonnektierend.

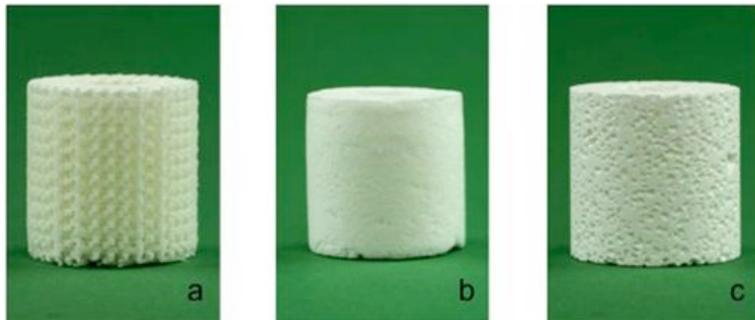


Abb. 3 Implantate in hohlzylindrischer Form

- a) PCL/CaP,
- b) PLA/G5,
- c)  $\beta$ -TCP

### 3.2 Tiermodell

Bei den Schafen, die für diese Studie eingesetzt wurden, handelte es sich um weibliche Bayerische Bergschafe. Sie waren mit einem Alter zwischen zwei und sechs Jahren alle skelettal ausgewachsen. Das durchschnittliche Gewicht der Tiere betrug 60 kg (41-83 kg).

Die Haltung der Schafe erfolgte während des gesamten Versuchs im Tierhaltungsbereich des Zentralen Tierforschungszentrums der Universität Ulm am Oberberghof. *Prae operationem* wurden die Tiere in Gruppen mit jeweils 5-8 Individuen auf Spaltenboden gehalten. *Post operationem* wurden die Schafe während des gesamten verbleibenden Versuchszeitraumes in Dreiergruppen gehalten. Hier hatten die Tiere als Untergrund eine rutschsichere Gummimatte mit eingestreuten Sägespänen und Stroh. Die Ernährung beinhaltete Wasser und Heu ad libitum, sowie Graspellets und pelletiertes Zucht/Haltungsfutter für kleine

Klauentiere<sup>4</sup>. Das Lichtmanagement erfolgte per Zeitschaltuhr mit einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden.

Die Schafe wurden durch das Tierforschungszentrum der Universität Ulm am Oberberghof mit 1 ml/5 kg Cydectin<sup>5</sup> *per os* entwurmt. Des Weiteren wurden die Schafe in den zwei Wochen vor dem chirurgischen Eingriff täglich für das notwendige Handling *post operationem* trainiert.

Die Durchführung des Versuchs erfolgte streng nach den Vorgaben des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 25. Mai 1998 (§§ 1, 2, 9 und 9a) und den Richtlinien der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations). Der Versuch wurde am 17.07.2007 vom Regierungspräsidium Tübingen unter der Reg.-Nummer 898 genehmigt.

### **3.3 Ablauf des Tierversuchs**

#### 3.3.1 Gruppeneinteilung und Implantationszeitraum

Die Implantationszeit bei allen Tieren in allen Versuchsgruppen betrug 14 Wochen.

Die Zuordnung der Schafe zu den einzelnen Versuchsgruppen erfolgte randomisiert nach Zufallsprinzip. Dabei wurden 24 Schafe in drei Gruppen mit jeweils acht Tieren eingeteilt. In der ersten Gruppe wurde das Polymerkomposit PCL/TCP und in der zweiten Gruppe das Polymerkomposit PLA/G5 implantiert. Die dritte Gruppe diente als Referenzgruppe, in der das keramische Material  $\beta$ -TCP zum Einsatz kam. Zusätzlich wurde noch ein weiteres Schaf operiert, dessen kritischer Defekt mit keinem Material versorgt wurde.

---

<sup>4</sup> Altromin 0133®, Altromin GmbH, Lage

<sup>5</sup> Cydectin®, Fort Dodge Veterinär GmbH, Würselen

### 3.3.2 Implantationsmodell

Im Rahmen dieser Studie wurde mittels Osteotomie an der rechten Tibia der Schafe ein diaphysärer Volldefekt von 20 mm gesetzt. In diesen wurde dann, je nach Gruppe, eines der unter Punkt 2.1 bzw. 2.3 beschriebenen hohlzylindrischen Implantate eingesetzt. Der Defekt wurde mit einer Osteosyntheseplatte aus Titan (siehe Punkt 2.3.3) überbrückt und stabilisiert.

### 3.3.3 Osteosyntheseimplantate

Bei dem in dieser Studie verwendeten System zur Stabilisierung der osteotomierten Tibia handelte es sich um winkelstabile Osteosyntheseplatten aus Voll-Titan<sup>6</sup>. Diese 6-Loch-Platten waren Spezialanfertigungen („SA-TIBIA SCHAF litos“) mit einer Länge von 140 mm, einer Breite von 16 mm und einer Höhe von 6 mm. Im lochfreien Mittelteil auf einer Länge von 41 mm war die Platte 18 mm breit. Dieser Teil überbrückte den Defekt.

Die drei proximalen Löcher waren leicht von der Plattenmittellinie versetzt. Dadurch konnten die Schrauben exakt durch die Mitte des Markraumes geschraubt werden. (Abb. 4). Die drei distalen Löcher lagen in der Mittellinie.

---

<sup>6</sup> Fa. Litos, Hamburg



*Abb. 4 Osteosyntheseplatte aus Voll-Titan.*

*p = proximal, d = distal*

Bei den beiden defektfernen Löchern war eine Winkelabweichung von  $15^\circ$  für die Schrauben vorgegeben (Abb. 5). Dadurch sollten die Spitzenspannungen in den Schrauben und im Knochen an diesen Stellen verringert und somit das Frakturrisiko minimiert werden.



*Abb. 5 Osteosyntheseplatte aus Titan mit Titanschrauben*

In die Löcher der Platte wurde mittels eines speziellen Gewindedrängers ein Gewinde geschnitten. Dieses diente dazu, mit den entsprechenden Schrauben und deren speziellem Kopfgewinde eine winkelstabile Verankerung zu erreichen. Die Schrauben bestanden ebenfalls aus Voll-Titan und hatten einen Kerndurchmesser von 3,5 mm und einen Außendurchmesser von 4,5 mm.

### 3.3.4 Operation

#### *OP-Vorbereitung*

Zur Vorbereitung auf den chirurgischen Eingriff mussten die Tiere unter erhaltener Flüssigkeitszufuhr 48 Stunden fasten. Hierdurch konnte das Risiko der Regurgitation während des Intubierens gemindert werden.

Am Operationstag wurden zunächst jeweils 0,04 mg/kg Atropin<sup>7</sup> und 1,2 mg/kg Xylacin<sup>8</sup> subkutan zur Narkose-Praemedikation injiziert. Nach einer Wartezeit von 15 Minuten wurde das Tier in den OP-Vorbereitungsraum verbracht, wo ihm auf dem Tisch in rechter Seitenlage die Außenseite des linken Ohres geschoren, gereinigt und mit Alkohol desinfiziert wurde. Anschließend wurde ein Verweilkatheter in die *Vena auricularis lateralis* (ersatzweise *Vena auricularis intermedia*) gelegt und mit Klebeband fixiert. Über diesen Verweilkatheter wurden zur Narkoseeinleitung je nach Wirkung (ca. 0,01 g/kg) Thiopental-Natrium<sup>9</sup> intravenös appliziert. Im Folgenden wurde das Schaf orotracheal intubiert und an ein Inhalationsnarkosegerät mit ca. 1-2 % Isofluran zur Narkoseerhaltung unter Spontanatmung angeschlossen.

Nach dem Scheren, Entfetten, Reinigen und Desinfizieren der kompletten rechten Hintergliedmaße erfolgte eine Umlagerung des Tieres in den OP-Raum auf den OP-Tisch in halb rechter Rückenlage. Die Gliedmaßen wurden ausgebunden und eine Pansenschlundsonde zur Verhinderung des Aufgasens des Pansens geschoben. Zusätzlich erhielt das Schaf während der gesamten Operationsdauer zur Kreislaufstabilisation als Dauerinfusion physiologische Kochsalzlösung<sup>10</sup>.

Im OP-Raum wurde die zu operierende rechte Hintergliedmaße noch ein weiteres Mal mit Alkohol und Sterilium desinfiziert, die Klauen in sterilen Handschuhen

---

<sup>7</sup> Atropinsulfat, Braun 0,5mg®, Braun Melsungen

<sup>8</sup> Rompun® 2%ig, Bayer

<sup>9</sup> Trapanal® 2,5g Byk Gulden

<sup>10</sup> Isotone Kochsalz-Lösung 0,9%, B.Braun, Melsungen

doppelt verpackt und dann das gesamte Schaf großflächig mit sterilen Tüchern unter Aussparung der zu operierenden Gliedmaße abgedeckt.

### *Zugang, Osteotomie und Osteosynthese*

Der Zugang erfolgte durch Inzision der Haut medial an der Tibia zwischen dem *Condylus medialis tibiae* und dem *Malleolus medialis*. Mit gleicher Schnittführung erfolgte die Durchtrennung der Unterhaut. Durch Inzision der *Fascia cruris* konnte dann die Tibia dargestellt werden.

Die Titanplatte<sup>11</sup> wurde mit Hilfe von Schränkeisen der Form der medialen Tibia angepasst. Dann wurde die Platte manuell am Knochen in Position gehalten, um die Bohrung der Schraubenlöcher vorzunehmen. Hierzu wurde eine Bohrlehre (für 3,5 mm Bohrer) verwendet. Unter zeitgleicher Kühlung durch Spülung mit isotoner Kochsalzlösung<sup>12</sup> wurden mit einem Bohrer (3,5 mm) durch diese Bohrlehre Löcher durch die mediale und die laterale Kortikalis gebohrt. In diese Löcher wurden dann mit einem Gewindeschneider (Außendurchmesser 4,5 mm) Gewinde geschnitten. Zusätzlich wurde vor dem Einsetzen der Schrauben mit einem Gewindedränger<sup>1</sup> ein Gewinde in alle Plattenlöcher gedrängt. Nach dem Ausmessen der Lochtiefe mit einem Längenmessgerät<sup>1</sup>, wurde die Titanplatte mit entsprechend langen Schrauben (Außendurchmesser 4,5 mm) am Knochen fixiert. Anschließend wurde die Platte wieder komplett vom Knochen entfernt.

Anhand der beiden defektnahen Löcher im Knochen wurde die Defektlokalisierung in der Mitte zwischen beiden Löchern mit einem sterilen Lineal ausgemessen und mit einem sterilen Stift gekennzeichnet. Über dem zu setzenden Defekt wurde dann das Periost vom Knochen gelöst und eine 20 mm breite Sägelehre mittels einer

---

<sup>11</sup> Fa. Litos, Hamburg

<sup>12</sup> Isotone Kochsalz-Lösung 0,9%, B.Braun, Melsungen

unikortikal sitzenden Kortokaliszugschraube (Außendurchmesser 4,5 mm) fixiert. Diese diente dazu, zwei exakt parallele Schnittflächen für die Osteotomie zu erhalten (Abb. 6).

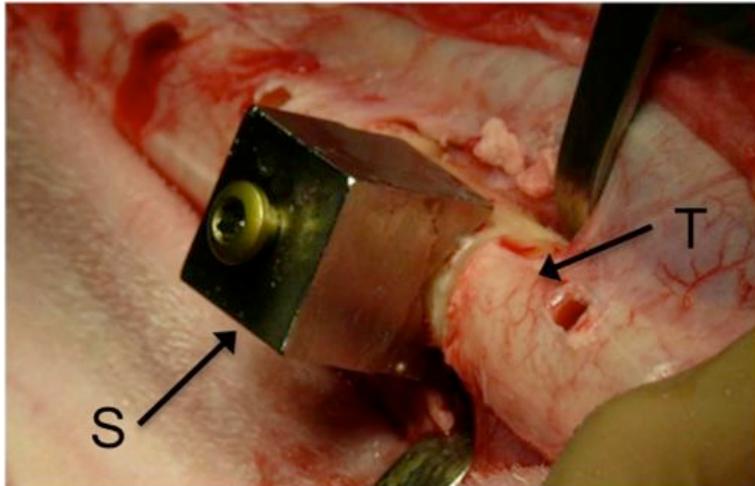


Abb. 6 Sägelehre über dem zukünftigen Defekt.

S = Sägelehre,  
T = Tibia

Mit Hilfe einer oszillierenden Säge<sup>13</sup> wurde unter zeitgleicher Kühlung durch Spülung mit isotoner Kochsalzlösung<sup>14</sup> ein 20 mm langes Knochenstück aus der Tibia ausgesägt.

Dabei entstand ein Größenverhältnis von 3:2 (60 % proximal, 40 % distal) zwischen dem proximalen und dem distalen Tibiafragment.

Anschließend wurde die Sägelehre wieder vom Knochen entfernt. Nach der Fixierung der Platte auf dem Knochen (Abb. 7) wurde von der kaudalen Seite ein zuvor mit Kochsalzlösung<sup>2</sup> getränktes, hohlzylindrisches Implantat in den Defekt eingesetzt.

---

<sup>13</sup> Fa. Synthes, Oberdorf, Schweiz

<sup>14</sup> Isotone Kochsalz-Lösung 0,9%, B.Braun, Melsungen

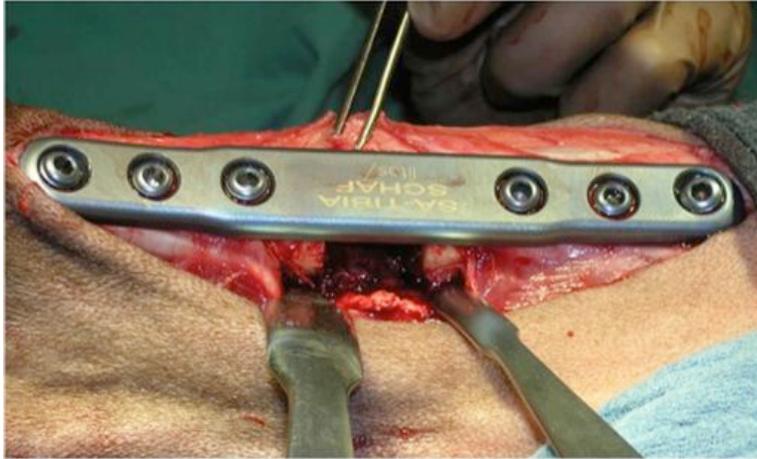


Abb. 7 Defekt (20 mm) in der Diaphyse der Schafstibia mit der Titanplatte

### *Wundverschluss, Verband*

Nach Abschluss der Osteotomie, der Osteosynthese und dem Einbringen des Implantats wurden die Faszie und Unterhaut durch Einzelknopfnähte mit einem resorbierbaren Faden<sup>15</sup> vernäht. Die Hautnaht erfolgte ebenfalls mittels Einzelknopfnähten, allerdings mit einem nicht-resorbierbaren Faden<sup>16</sup>.

Die mit NaCl<sup>17</sup> gereinigte Hautnaht wurde mit einem Pflaster<sup>18</sup> über die gesamte Länge abgedeckt. Danach wurde vom Metatarsus bis über das Knie der operierten Hintergliedmaße ein Baumwollstrumpf<sup>19</sup> gezogen und das gleiche Gebiet von distal nach proximal mit Wattebinden<sup>20</sup> umwickelt. Diese wurden anschließend mit Kreppbinde<sup>21</sup> fixiert.

Für die zusätzliche Stabilisierung und zur Minimierung des Frakturrisikos der operierten Gliedmaße wurde ein Fiberglas-Cast<sup>22</sup> angelegt. Dieser Cast wurde bereits *prae operationem* individuell für jedes operierte Schaf vorgefertigt und mit

---

<sup>15</sup> Vicryl® 2-0, Fa. Ethicon, Norderstedt

<sup>16</sup> Resolon® 3-0 Fa. Resorba, Nürnberg

<sup>17</sup> Isotone Kochsalz-Lösung 0,9%, B.Braun, Melsungen

<sup>18</sup> Leukomed®, Fa. BSN medical GmbH, Hamburg

<sup>19</sup> Stülpa, Fa. Hartmann, Heidenheim

<sup>20</sup> Rolta, Fa. Hartmann, Heidenheim

<sup>21</sup> Krepppapierbinden, Fa. Hartmann, Herbrechtingen

<sup>22</sup> ScotchCast, Fa. 3M Health Care, Neuss

Hilfe einer oszillierenden Säge<sup>23</sup> so in zwei Hälften gesägt, dass er *post operationem* mittels Leukoplast<sup>24</sup> wieder am Bein befestigt werden konnte. Um die Tiere an das Tragen des Casts zu gewöhnen, wurde dieser bereits drei Tage *prae operationem* angelegt.

### 3.3.5 Monitoring post OP

#### *Tierärztliche Versorgung*

Die Schafe wurden *postoperativ* täglich tierärztlich untersucht (Allgemeinbefinden, Temperatur). Zudem wurde täglich ein Verbandswechsel mit Wundtoilette durchgeführt. Ab der zweiten Woche wurden die Kontrollen zweimal wöchentlich und ab der vierten Woche einmal wöchentlich durchgeführt. Bei Bedarf, wie z.B. bei Druckstellen oder Wundheilungsstörungen der Haut, wurden bei einzelnen Tieren die Kontrollen auch häufiger vorgenommen. Am Tag 11 *post operationem* wurden den Schafen die Fäden gezogen.

Zur Infektionsprophylaxe und Schmerzbehandlung erhielten die Schafe subkutan im Anschluss an die Operation für drei Tage zweimal täglich 17,2 mg/kg Amoxicillin<sup>25</sup> und einmal täglich 4 mg/kg Carprofen<sup>26</sup>.

#### *Röntgen*

Unmittelbar nach der Operation wurden die Tiere in *craniocaudaler* Ebene geröntgt (Belichtung: 80 kV; 3,00 mAs, Abstand 100 cm). Dabei befanden sich die Schafe noch unter Vollnarkose. Desweiteren wurden im Abstand von zwei Wochen über den

---

<sup>23</sup> Fein MultiMaster FMM 250, Fa. C.&E. Fein GmbH, Stuttgart

<sup>24</sup> Leukoplast® hospital, Fa. BSN medical GmbH, Hamburg

<sup>25</sup> Amoxicillin 15%®, Fa. WDT, Garbsen

<sup>26</sup> Rimadyl® Injektionslösung, Fa. Pfizer, Karlsruhe

gesamten Implantationszeitraum Röntgenbilder am stehenden Tier zur Verlaufskontrolle angefertigt. Dies geschah ebenfalls in *craniocaudalem* Strahlengang (Belichtung: 80 kV; 3,00 mAs). Die jeweils letzte Aufnahme wurde dann post mortem am von Weichteil befreiten Knochen im Faxitron<sup>27</sup> (Belichtung: 60 kV, 1 Minute) in zwei Ebenen durchgeführt.

### *Fluorochromfarbstoffe*

Allen Schafen wurden im Abstand von vier Wochen fluorochrome Farbstoffe intravenös injiziert. Dies diente der Untersuchung der dynamischen Knochenneubildung.

Bei den verwendeten Farbstoffen handelte es sich um Calceingrün<sup>28</sup> (4. Woche *post operationem*, 10 mg/kg) und Tetracyclin<sup>29</sup> (8. Woche *post operationem*, 25 mg/kg). Das zu Beginn des Versuchs eingesetzte Tetracyclinhydrochlorid musste später im Laufe des Experiments gegen Oxytetracyclin<sup>30</sup> ausgetauscht werden, da es von Seiten der Firma nicht mehr verfügbar war.

Die injizierten Farbstoffe werden in den mineralisierenden neugebildeten Knochen eingebaut und sind im histologischen Schnitt unter Fluoreszenzbeleuchtung als grüne (Calceingrün) und gelbe (Tetrazyklin) Banden zu erkennen. Aus dem Abstand der beiden Farbbanden kann so die Knochenneubildungsrate für den Abstand zwischen den Injektionen, also zwischen der vierten und der achten Woche post OP ermittelt werden.

---

<sup>27</sup> Faxitron 43805N X-Raysystem Fa. Hewlett-Packard, USA

<sup>28</sup> Calcein-Grün, Fa. Synopharm

<sup>29</sup> Tetracyclinhydrochlorid, Firma Caelo, Caesar und Lorenz GmbH

<sup>30</sup> Ursocyclin 10%, Medistar Arzneimittelvertrieb GmbH, Holzwickede

### *Aktivitätsmessung, Bodenreaktionskräfte*

Zum Monitoring des Heilungsverlaufes der operierten Gliedmaße wurden bei einzelnen Schafen über den gesamten Implantationszeitraum von 14 Wochen in regelmäßigen Abständen Aktivitätsmessungen mit Schrittzählern und Messungen der Bodenreaktionskräfte mit einer Emed-Plattform<sup>31</sup> durchgeführt.

Am Metatarsus der operierten Gliedmaße wurden bei jeweils drei Tieren pro Materialgruppe Schrittzähler<sup>32</sup> zur Aktivitätsmessung befestigt (Abb. 8). Dies geschah über den gesamten Implantationszeitraum hindurch alle zwei Wochen für zwei Tage. Zusätzlich war bei den gleichen Tieren bereits *prae operationem* auch eine entsprechende Vergleichsmessung durchgeführt worden.



*Abb. 8 Schrittzähler am Metatarsus eines Schafes befestigt*

Zur Messung der Bodenreaktionskräfte wurden die einzelnen Schafe alle zwei Wochen über eine Emed-Plattform<sup>1</sup> geführt (Abb. 9). Dabei entstanden zu jedem Messzeitpunkt mindestens sechs Einzelmessungen für jede rechte Hintergliedmaße. Zusätzliche Messungen der Bodenreaktionskräfte wurden bereits *prae operationem*

---

<sup>31</sup> emed-M System, novel GmbH, München

<sup>32</sup> StepWatch™, Fa. Cyma, Mountlake Terrace, Washington

ohne Cast und auch mit Cast (nach einer mehrtägigen Gewöhnungszeit) durchgeführt. So konnte der Verlauf *post operationem* mit dem ursprünglichen, gesunden Zustand verglichen werden. Dazu wurden die maximalen Auftrittskräfte ausgewertet, auf das Körpergewicht normiert und in Prozent Körpergewicht angegeben.



Abb. 9 Schaf beim Gang über die Emed-Plattform

### *Tötung*

Nach einer Standzeit von 14 Wochen wurden die Schafe durch Betäubung mittels Bolzenschuss und unmittelbar folgendem Blutentzug getötet.

Dies geschah sachgemäß durch geschultes Personal des Tierforschungszentrums der Universität Ulm.

## **3.4 Aufarbeitung der Tibien *post mortem***

### 3.4.1 Präparation

Die im Hüftgelenk exartikulierte rechte Hintergliedmaße wurde unmittelbar nach der Tötung enthäutet. Das Weichgewebe wurde dann von den rechten Tibien mit den Titanplatten gelöst und die Tibien im Knie- und Sprunggelenk exartikuliert. Der

stellenweise über die Platte gewachsene Kallus wurde vorsichtig entfernt. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden fotografisch dokumentiert.

Nachdem die Folgeuntersuchungen (Biomechanik, periphere quantitative Computertomographie) abgeschlossen waren, wurden die Präparate in Formaldehyd (4%) verbracht, wo sie 2-4 Tage bis zur anschließenden histologischen Aufarbeitung verblieben.

### 3.4.2 Röntgen

Unmittelbar nach der Präparation wurden die operierten Tibien zunächst mit und dann ohne winkelstabile Platte im Faxitron<sup>33</sup> (Belichtung: 60 kV, 1 Minute; *lateromedialen* und *craniocaudalem* Strahlengang ) geröntgt.

### 3.4.3 Biomechanik

Die mechanische Belastbarkeit bzw. Biegesteifigkeit des Defektbereichs wurde mittels einer nicht-zerstörenden Vierpunkt-Biegeprüfung an einer Materialprüfmaschine<sup>34</sup> getestet.

Hierzu wurden zunächst die proximale und die distale Epiphyse mit einer Diamant-Bandsäge<sup>35</sup> abgetrennt. Anschließend erfolgte die Einbettung des proximalen und des distalen Endes der Diaphyse in einen kaltpolymerisierenden Kunststoff<sup>36</sup> in speziellen Aluminiumzylindern<sup>37</sup> (Durchmesser 40 mm, Höhe 50 mm) wobei das proximale Ende in einem mit Gradeinteilung versehenen Zylinder platziert wurde

---

<sup>33</sup> Faxitron 43805N X-Raysystem Fa. Hewlett-Packard, USA

<sup>34</sup> Mod. Z010, Fa. Zwick, Ulm

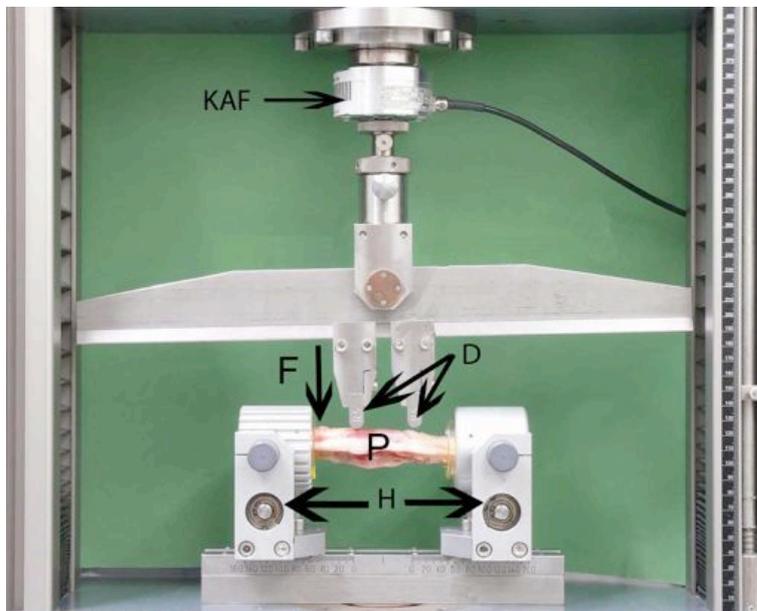
<sup>35</sup> Trennschleifsystem, Fa. Exakt, Norderstedt

<sup>36</sup> Technovit 3040, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim

<sup>37</sup> Eigenbau Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Ulm

(Abb. 10). Die mediale Knochenseite, also das ehemalige Plattenlager, kam in 0°-Stellung (oben) zu liegen. Das Austrocknen des Knochens und des Defektbereichs zwischen den beiden defektnahen Schraubenlöchern wurde während der gesamten Prozedur durch NaCl<sup>38</sup>-getränkte Tupfer verhindert.

Die Aufnahmezylinder mit der Tibiadiaphyse wurden in eine Prüfvorrichtung in der Materialprüfmaschine<sup>39</sup> eingespannt. Diese Vierpunkt-Biegevorrichtung bestand aus einer oberen Traverse mit zwei Druckstempeln<sup>40</sup> (Stützweite 40 mm), einer unteren Haltevorrichtung (Stützweite 60 mm) (Abb. 10), sowie einer Messdose<sup>41</sup> (500 N, Genauigkeit  $\leq 0,3\%$ ).



*Abb. 10 Knochenprobe (P) in der Materialprüfmaschine während der biomechanischen Messung.*

*F = auf Probe einwirkende Kraft durch die Druckstempel,  
P = Probe (Tibiadiaphyse, Defekt in der Mitte),  
D = Druckstempel, H = Haltevorrichtung,  
KAF = Kraftaufnehmer Typ KA*

Für die Messung wurde die Traverse über einen manuellen Schalter bis kurz über das Präparat gefahren. Der Defekt befand sich dann in der Mitte unter den beiden Druckstempeln. Um eine gleichmäßige Krafteinleitung beidseits des Defektes zu gewährleisten, war die Traverse flexibel gelagert. Nach Erreichen einer Vorkraft von 2,5 N wurde mit einer Prüfgeschwindigkeit von 6 mm/min dreimal bis 40 N belastet.

<sup>38</sup> Isotone Kochsalz-Lösung 0,9%, B.Braun, Melsungen

<sup>39</sup> Typ Z 10, Fa. Zwick, Ulm

<sup>40</sup> Eigenbau Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Ulm

<sup>41</sup> Typ KAF-TC, Fa. A.S.T./Zwick

Die maximale Auslenkung wurde auf 4 mm begrenzt, um sehr instabile Präparate nicht zu zerstören. Nach Ablauf der drei Zyklen wurde die Tibia um 30° gedreht. Dieser Ablauf wiederholte sich 12 mal (360°). Auf diese Weise konnte ein polares Biegesteifigkeitsdiagramm erzeugt werden, was der ungleichmäßigen Kallusbildung rund um die Defektzone Rechnung trug.

Zum Vergleich wurden auch die nicht operierten linken Tibien getestet. Dabei wurden außer der Prüfgeschwindigkeit (hier 2 mm/min) die selben Prüfparameter verwendet. Die Aufzeichnung der Messdaten erfolgte mit dem Steuerungs- und Datenerfassungsprogramm TestXPert<sup>42</sup>. Die ermittelten Werte wurden in einem Kraft-Weg-Diagramm aufgetragen, aus deren Steigung sich die Biegesteifigkeit der Proben im Defektbereich ergab.

#### 3.4.4 Bestimmung der Mineraleichte und des Knochenvolumens im Defekt

##### *Periphere quantitative Computertomographie*

Zur Bestimmung der Mineraleichte wurde der Defektbereich der frischen explantierten rechten Tibien mittels peripherer quantitativer Computertomographie gescannt. Dafür wurde die Tibiadiaphyse mit dem distalen Ende voran zentral in das pQCT<sup>43</sup> auf einer Acrylglasschiene, die als Probenhalter diente, fixiert. Zur Kalibrierung des Gerätes wurde vor jeder Messung eine Referenzmessung an einem Standardphantom<sup>44</sup> aus Hydroxylapatit durchgeführt.

Für den 60 mm langen Übersichtsscan („Scoutview“) wurde das proximale Ende des Defektes in der Tibiadiaphyse als Startpunkt gewählt. Es wurden dazu 30 Schnitte von je 1 mm Schichtdicke angefertigt. An Hand der farbcodierten Rasteraufnahme

---

<sup>42</sup> Zwick, Ulm

<sup>43</sup> XCT 960A, Fa. Stratec Medizintechnik, Pforzheim

<sup>44</sup> Phantom 0495, Nr. 91068

des zweidimensionalen Scoutviews konnten dann die Positionen der eigentlichen Querschnitte für die Messung manuell festgelegt werden.

Es wurden 5 hochauflösende CT-Schnitte mit einer Voxelgröße von 0,590 x 0,590 µm erzeugt. Der Abstand zwischen den Schnitten betrug 5 mm. Von diesen fünf Querschnitten befanden sich jeweils einer am proximalen und am distalen Defektrand, einer im proximalen und im distalen Drittel des Defektes und einer in der Defektmitte. In diesen wurden jeweils 4 zu messende ROIs (2,95 x 7,08 mm) festgelegt (lateral, medial, anterior und posterior) (Abb. 11). Die Mineraldichte (Dichte) wurde in mg Hydroxylapatit/ccm gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der zum Gerät gehörenden Software<sup>45</sup>. Zur Auswertung wurde ein Schwellenwert von 0 festgelegt. Durch den Schwellenwert wurde dem Rechner vorgegeben, ab welchem Schwächungskoeffizienten die erhaltenen Bildpunkte als Objekt zu werten waren.

In der Referenzgruppe ( $\beta$ -TCP) waren die Dichtewerte von Restmaterial und neugebildeten, mineralisierten Gewebe annähernd deckungsgleich. Somit war eine eindeutige Bestimmung der Mineraldichte von neugebildetem Gewebe im Defekt in dieser Gruppe nicht möglich. In den beiden Polymerkompositgruppen waren die Dichtewerte des Materials so niedrig, dass sie nicht messbar waren. Die Mineraldichte von neugebildetem Gewebe im Defekt in diesen Versuchsgruppen war also eindeutig möglich.

Mit sieben nicht operierten linken Tibiadiaphysen wurde in gleicher Weise wie mit den rechten operierten Tibien verfahren.

---

<sup>45</sup> Version 5.20

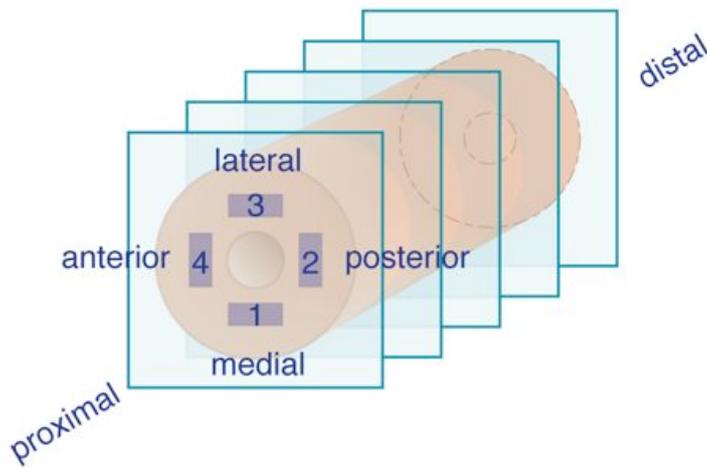


Abb. 11 Mess- und Auswertungsschema am pQ-CT  
1-4 = ROIs, die in jedem Schnitt zur Auswertung festgelegt wurden

### Mikro – Computertomographie

Um das mineralisierte Volumen im Defekt bestimmen zu können, wurde der Defektbereich mittels hochauflösender Computertomographie<sup>46</sup> gescannt. Es wurden 300 Schnitte im Abstand von 70 µm und einer räumlichen Auflösung von 100 x 100 x 70 µm (60 kV, 120 mA) gescannt. Die Bestimmung des mineralisierten Volumens im Defekt wurde mit Hilfe des Programmes VGStudioMax<sup>47</sup> vorgenommen. Hierzu wurden die zentralen 200 Schnitte verwendet. Durch Setzen von einheitlichen cut-off-Werten konnten nicht mineralisierte Gewebe und Implantatmaterial von der Auswertung ausgeschlossen werden. Lediglich in der Referenzgruppe (β-TCP) war eine Bestimmung des mineralisierten Volumens nicht möglich, da die Graustufen von neugebildeten Knochen und Restmaterial eine sehr hohe Übereinstimmung aufwiesen. Die dreidimensionale Darstellung des Defektbereichs wurde mit dem Programm OsiriX<sup>48</sup> durchgeführt.

<sup>46</sup> Fan Beam µ-Scope, Stratec, Pforzheim

<sup>47</sup> Version 1.0, Heidelberg

<sup>48</sup> Version 2.4, OsiriX Foundation, Genf, Schweiz

### 3.4.5 Histologie

#### *Herstellung der Dünnschliffpräparate*

Für die histologische Aufbereitung wurden die Proben zunächst aus dem Formaldehyd (4 %) entnommen und in Längsrichtung in lateromedialer Ebene mit einer Diamant-Bandsäge<sup>49</sup> halbiert (Abb. 12).

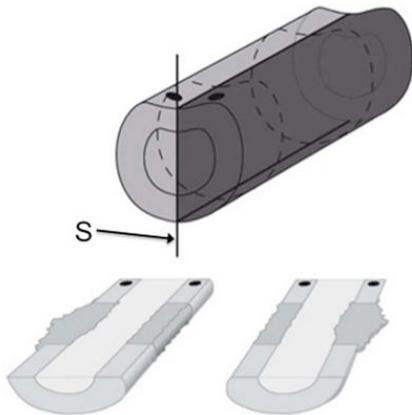


Abb. 12 Schnittebene zur Herstellung der histologischen Schnitte.

S = Schnittebene

Anschließend wurden sie erneut in Formaldehyd (4 %) gelagert (1-2 Tage) und dann unter fließendem Leitungswasser gewässert (2-4 Stunden).

Zum Entwässern wurden die Hälften dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe aus vergälltem Ethanol (40 – 70 – 80 – 90 – 3 x 100%) verbracht. Im Folgenden wurden die Proben in Xylol entfettet.

Zur Kunststoffinfiltration und Aushärtung kamen die Proben in ein Einbettmedium aus Methylmethacrylat<sup>50</sup>. Unter Zugabe eines Reaktionsbeschleunigers<sup>51</sup> und Sauerstoffausschluss härtete der Kunststoff aus. Die Dauer der Aushärtung betrug drei bis sechs Wochen, je nach der Größe der Proben. Zuletzt wurde ein Weichmacher<sup>52</sup> zugesetzt. Dieser diente der Vermeidung von zu großen

---

<sup>49</sup> Trennschleifsystem, Fa. Exakt, Norderstedt

<sup>50</sup> Fa. Röhm, Darmstadt bzw. Technovit 2700 VLC, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim)

<sup>51</sup> Benzoylperoxid, Fa. Merck, Darmstadt

<sup>52</sup> Nonylphenyl-Polyethylenglykol-Acetat, Fluka, CH-Buchs

Spannungsrissen in den Präparaten. Die Aushärtung erfolgte in luftdicht verschlossenen Gefäßen. Zur Ableitung der Polymerisationswärme standen die Präparate in kaltem Wasser.

Nach erfolgter Aushärtung wurde der polymerisierte Gewebeblock auf einen Objektträger geklebt und so weit abgeschliffen, bis die gewünschten Gewebeschichten an der Oberfläche lagen<sup>53</sup>. Auf die gegenüberliegende Oberfläche der Blöcke wurde ein zweiter Objektträger geklebt. Von diesem „Sandwich“ wurde dann eine ca. 500 µm dicke Schicht mit einer Diamant-Bandsäge gesägt<sup>54</sup>. Mit einem Mikroschleifsystem<sup>55</sup> wurden die Schnitte schrittweise auf die gewünschte Dicke von 60 - 100 µm heruntergeschliffen. Danach wurden die Schliffe mit feinsten Schleifpapieren poliert, bis sie vollständig plan waren und bei mikroskopischer Kontrolle ein klares Bild zeigten.

Die Färbung der Schliffe erfolgte nach Paragon mit einer verdünnten Stammlösung<sup>56</sup> bei 40°C über 20 Minuten. Bei dieser Färbemethode stellen sich Zellkerne, basophiles Zytoplasma, Osteoidsäume und Weichgewebe in verschiedenen Blautönen dar, während mineralisierte Knochenmatrix rosa bis violett ist.

#### *Qualitative und quantitative Auswertung*

Die histologischen Schnitte wurden qualitativ deskriptiv und quantitativ ausgewertet. Bei der quantitativen Auswertung durch die Punktezählmethode erfolgte die Auswertung der Präparate bei 50-facher Vergrößerung unter dem Axiophot-

---

<sup>53</sup> Mikroschleifsystem, Fa. Exakt

<sup>54</sup> Trennschleifsystem, Fa. Exakt, Norderstedt

<sup>55</sup> Mikroschleifsystem, Fa. Exakt

<sup>56</sup> hergestellt aus 30 % Ethanol, 0,73 g% Toluidinblau = und 0,27 g% basischem Fuchsin, Chroma, Münster

Photomikroskop<sup>57</sup>. Es wurden zwei Zählfelder angelegt, die jeweils den gesamten lateralen und medialen kortikalen Defektbereich umfassten (Abb. 13). Zum Auszählen der Punkte in diesen Bereichen wurde ein Rasterobjektiv mit 10 x 10 Zählpunkten (Punkteabstand 0,25 mm) verwendet. In jedem der beiden Zählfelder wurden 1000 – 1600 Zählpunkte ausgezählt. Unterschieden wurde dabei zwischen Material, Knochen, Weichgewebe und Knorpel. Die ausgezählten Punkte wurden dann in relative Flächenanteile in % des jeweiligen Bereiches umgerechnet und statistisch ausgewertet.

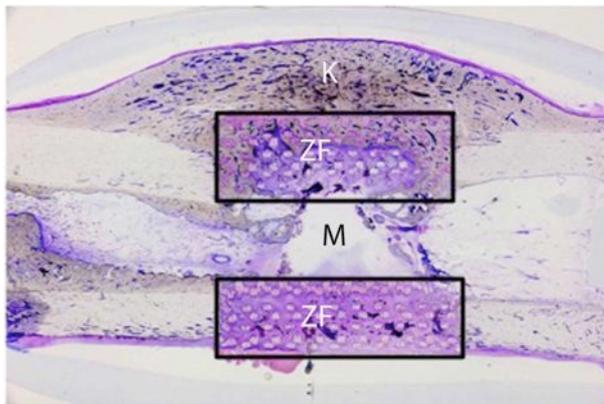


Abb. 13 Histologisches Präparat der Versuchsguppe mit dem Polymerkomposit PCL/TCP nach 14 wöchiger Implantation.

ZF = Zählfeld,  
K = Kallus,  
M = Markraum

Die qualitativ deskriptive Auswertung erfolgte unter 50- bis 200-facher Vergrößerung. Dabei wurde insbesondere auf Osteolysen und Knochenneubildung im Defekt- und Osteotomiekantenbereich und auf den Kontakt zwischen Material und neugebildetem Knochen geachtet. Außerdem wurden die Präparate auf entzündliche Reaktionen im Defekt, der unmittelbaren Defektumgebung und im Markraum (Makrophagen, Fremdkörperriesenzellen, Lymphozyten, vermehrte Osteoklastenaktivität, bindegewebige Abkapselung des Materials, Hyperämie in der Umgebung) untersucht. Zusätzlich wurden die Schnitte noch auf das Vorhandensein von externem Kallus hin ausgewertet. Aus den quantitativen und den qualitativ deskriptiven Auswertungsparametern, zusammen mit den makroskopischen und *in*

<sup>57</sup> Axiophot®, Fa. Zeiss, Oberkochen

vivo Beobachtungen konnten Rückschlüsse auf die Biokompatibilität des jeweiligen Materials gezogen werden.

### *Fluorochrome Auswertung*

Die fluoreszenzhistologische Auswertung erfolgte am Axiophot-Photomikroskop<sup>58</sup> unter Fluoreszenzlicht. Dabei kam ein Fluoreszenzfilter zur Anwendung, der beide Fluoreszenzfarbstoffe, Calceingrün und Tetracyclin, gemeinsam darstellen kann (Wellenlänge 450 – 490 nm).

Da die Fluoreszenzfarbstoffe zu unterschiedlichen Zeitpunkten injiziert wurden (4. und 8. Woche), war es möglich die Eindringtiefen des neugebildeten Knochen von den Osteotomieändern in den Defekt zu den beiden Zeitpunkten zu bestimmen. Die Messung erfolgte mit Hilfe des Rasterobjektives bei 50-facher Vergrößerung, wobei die Länge der einzelnen Kästchen im Raster 0,25 mm betrug und als Maßeinheit diente. Zusätzlich wurde noch eine Messung der Knocheneindringtiefe unter normaler lichtmikroskopischer Beleuchtung bei 50-facher Vergrößerung durchgeführt, um so auch für den Tötungszeitpunkt (14. Woche) entsprechende Werte zu erhalten.

### 3.4.6 Statistische Auswertung

Zur Berechnung der statistischen Signifikanzen wurde bei allen quantitativen Auswerteverfahren (Biomechanik, Dichtemessung, Gewebedifferenzierung, Knocheneindringtiefen) das Statistikprogramm JMP<sup>®59</sup> angewendet. Die Berechnung statistisch signifikanter Unterschiede erfolgte mit dem Wilcoxon-Test für ungepaarte

---

<sup>58</sup> Axiophot®, Fa. Zeiss, Oberkochen

<sup>59</sup> Version 5.0.1.2, SAS Institute, Cary, N.C., USA

Proben und nicht normalverteilte Stichproben, da für jedes Material unterschiedliche Schafe herangezogen wurden und wegen der geringen Tierzahl ( $n=24$ , 7–8 pro Gruppe) nicht von einer Normalverteilung der Werte ausgegangen werden konnte. Es wurden jeweils die Gruppen untereinander verglichen. Die Darstellung in den Diagrammen erfolgte in Boxplots mittels Angaben von Median, Maximum und Minimum sowie der 25 % und 75 % Quartile. Bei den Aktivitätsmessungen und Messungen der Bodenreaktionskräfte war keine statistische Auswertung möglich, da hier die Gruppenstärke zu gering war ( $n=3$  pro Gruppe). Hier erfolgte die graphische Darstellung in Mittelwerten und Standardabweichungen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Klinischer Verlauf

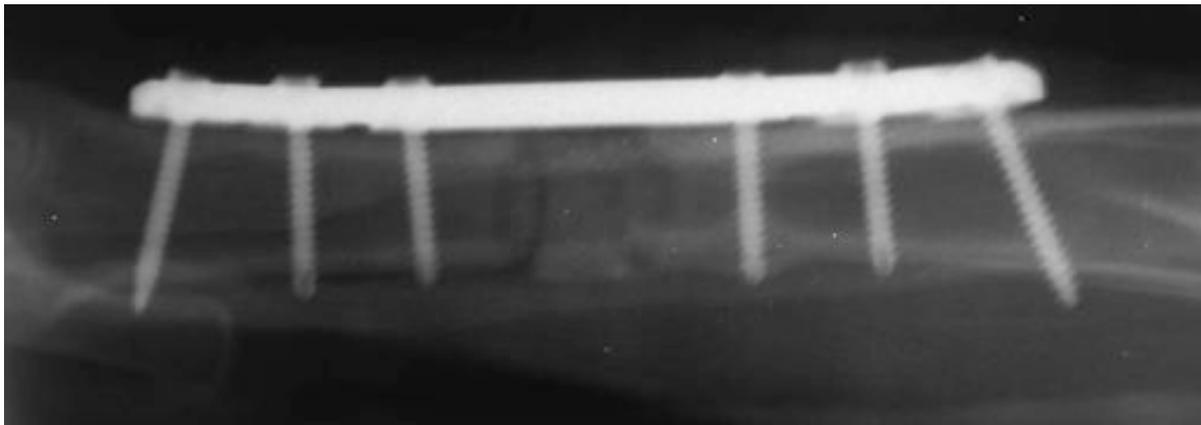
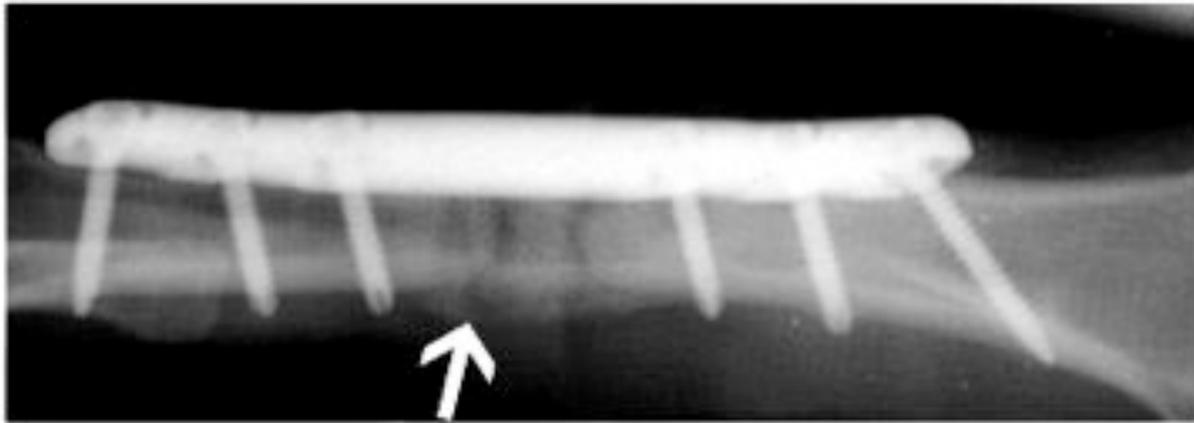
Bei allen Tieren verlief die Operation ohne Komplikationen. Die Operationszeit betrug im Durchschnitt 1 Stunde und 40 Minuten.

Ein Tier aus Gruppe 1 (PCL/TCP) musste einen Tag post operationem auf Grund einer Aspirationspneumonie euthanasiert werden. Die Euthanasie erfolgte durch Betäubung mit Bolzenschuss und anschließendem Entbluten.

Alle Tiere hatten in der postoperativen Phase und während der gesamten Standzeit ein ungestörtes Allgemeinverhalten. Die Schafe belasteten die rechte Hintergliedmaße mit dem Cast weder prae noch post operationem voll.

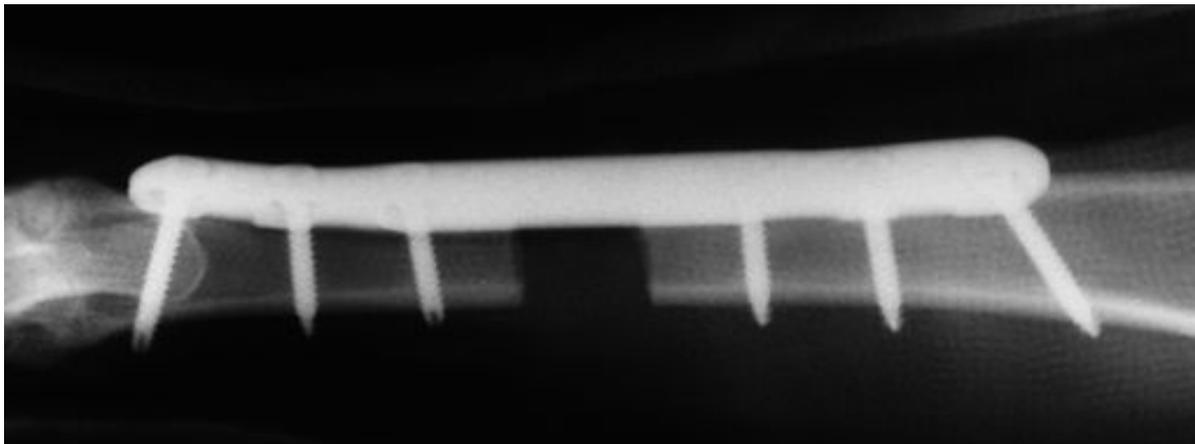
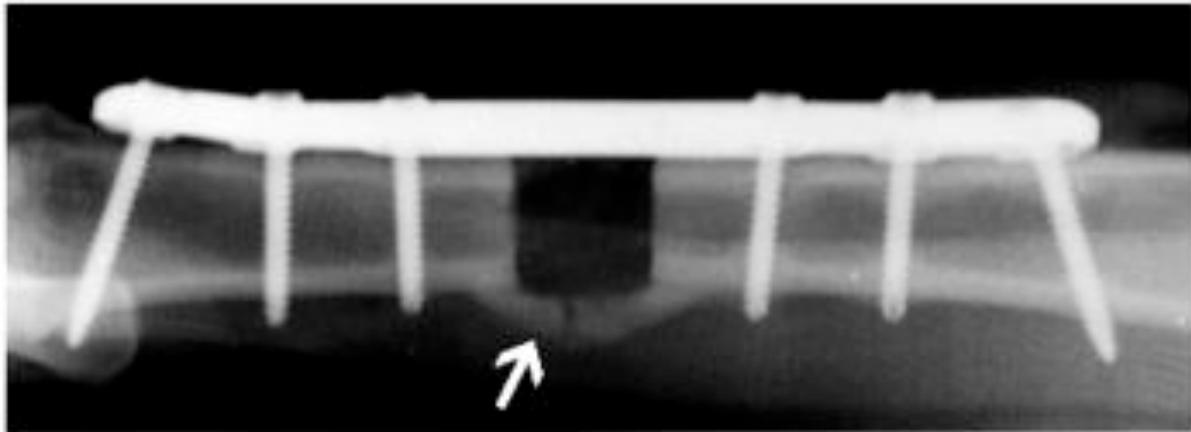
#### 4.1.1 Röntgen

Unmittelbar post operationem und während der gesamten Standzeit alle zwei Wochen wurden Röntgenbilder zur Verlaufskontrolle durchgeführt. Bei fünf von acht Tieren der Gruppe mit Referenzmaterial ( $\beta$ -TCP) war ab der sechsten Woche eine externe mineralisierte Kallusformation auf der plattenfernen Defektseite zu erkennen (Abb. 14). Da es sich in dieser Gruppe um ein röntgendichtes Implantat handelte, war anhand der Röntgenbilder nicht deutlich zu erkennen, ob es im Laufe des Versuchs zu Knochenneubildung innerhalb des Defekts oder des Markraums kam. Ab der zweiten Woche post operationem waren aber deutliche Fissuren im Knochenersatzstoff und zunehmende Auflösung der Implantatstruktur und -form zu erkennen.



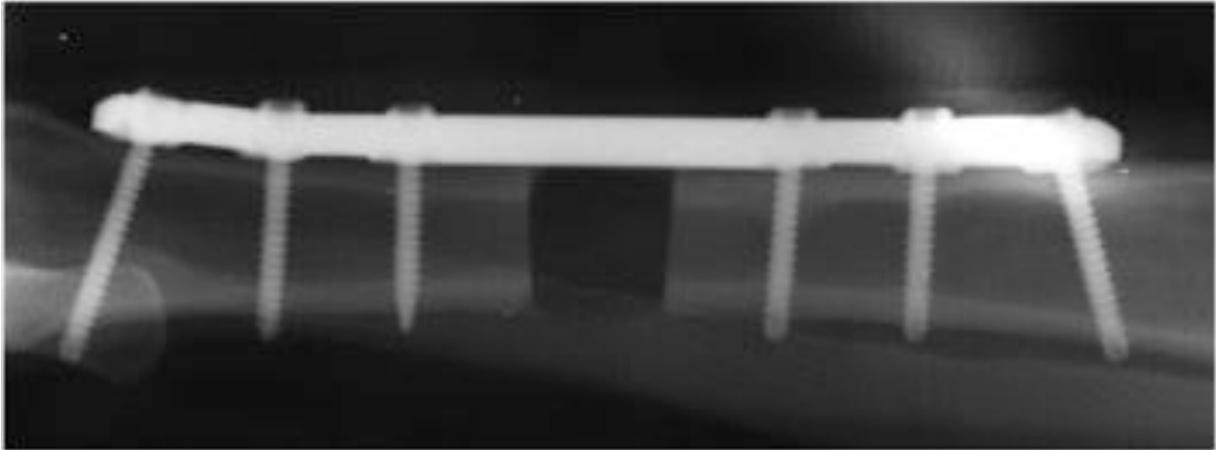
*Abb. 14 Röntgenbild einer Tibia mit  $\beta$ -TCP-Implantat im Defekt 6 Wochen post operationem. Beginnende externe plattenferne Kallusbildung (Pfeil) bzw. keine Kallusbildung (zweites Bild) erkennbar*

In Gruppe 1 (PCL/TCP) zeigte sich nur bei zwei von sieben Tieren eine solche Kallusformation ab der vierten Woche post operationem (Abb. 15). Im weiteren Verlauf konnte auch zunehmend von den Osteotomierändern aus zapfenförmig in den Defekt hineinragendes mineralisiertes Gewebe gefunden werden.



*Abb. 15 Röntgenbild einer Tibia mit PCL/TCP-Implantat 6 Wochen post operationem. Externe plattenferne Kallusbildung (Pfeil) bzw. keine Kallusbildung (zweites Bild) erkennbar*

Bei Gruppe 2 (PLA/G5) war bei keinem Schaf eine externe mineralisierte Kallusformation erkennbar (Abb. 16). Direkt unter der Osteosyntheseplatte war in dieser Versuchsgruppe ab der achten Woche bei fünf von acht Tieren mineralisiertes Gewebe zu finden.



*Abb. 16 Röntgenbild einer Tibia mit PLA/G5-Implantat in vivo 6 Wochen post operationem. Keine Kallusbildung erkennbar*

Ab der zweiten Woche post operationem war unabhängig vom implantierten Material bei 12 Schafen zu erkennen, dass sich einzelne Schrauben der Plattenosteosynthese aus Platte und Knochen geringgradig lockerten.

#### 4.1.2 Aktivitätsmessung

Bei den Aktivitätsmessungen mittels Schrittzählern zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Auch waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messungen im Zeitverlauf zu erkennen. Lediglich zwischen der achten und zwölften Woche kam es zu einem leichter Anstieg der Schritte pro 24 Stunden (Abb. 17). Unterschiede waren in erster Linie zwischen einzelnen Individuen zu finden. Insbesondere im Vergleich zu den Messungen prae operationem zeigten sich bei einzelnen Schafen ein starker Aktivitätsanstieg oder eine -abnahme. In dieser Zeit konnten bei diesen Tieren über mehrere Tage nach dem erstmaligen Anlegen des Casts entweder heftige Abschüttelversuche oder längeres Stehen auf der Stelle beobachtet werden.

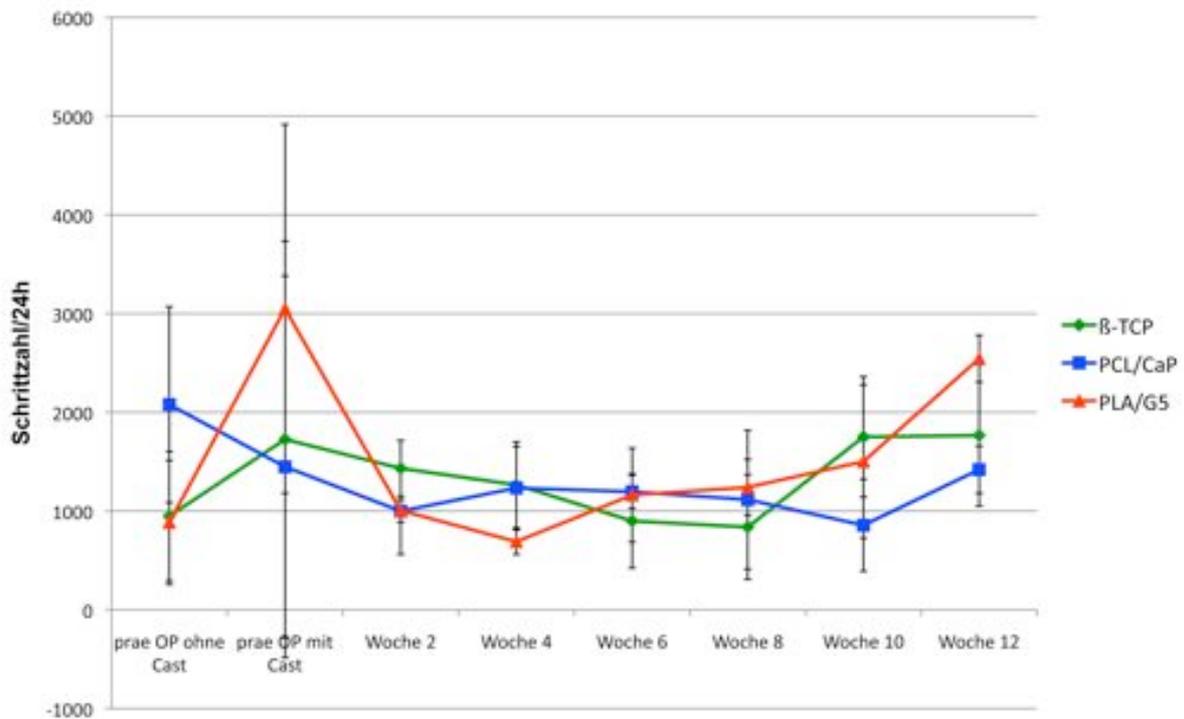


Abb. 17 Aktivitätsmessungen bei den Schafen in den drei Versuchsgruppen über den gesamten Versuchszeitraum in Schrittzahl/24Stunden

#### 4.1.3 Bodenreaktionskräfte

Bei der Messung der Bodenreaktionskräfte waren ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen festzustellen (Abb. 18). Pre-operationem konnten ohne Cast geringgradig höhere Werte gemessen werden als mit Cast. Post operationem kam es dann zu einem sehr geringen weiteren Abfall der Bodenreaktionskräfte. Bei einem einzelnen Schaf in Gruppe 2 (PLA/G5) war ab der achten Woche ein geringgradiger Anstieg der Werte zu beobachten. Insgesamt waren Veränderungen der Bodenreaktionskräfte unabhängig von der röntgenologisch beobachteten Kallusbildung bzw. Knochenheilung. Auch konnte man erkennen, dass interindividuelle Schwankungen der Werte mit dem Heilungsverlauf der castbedingten Druckstellen korrelierten.

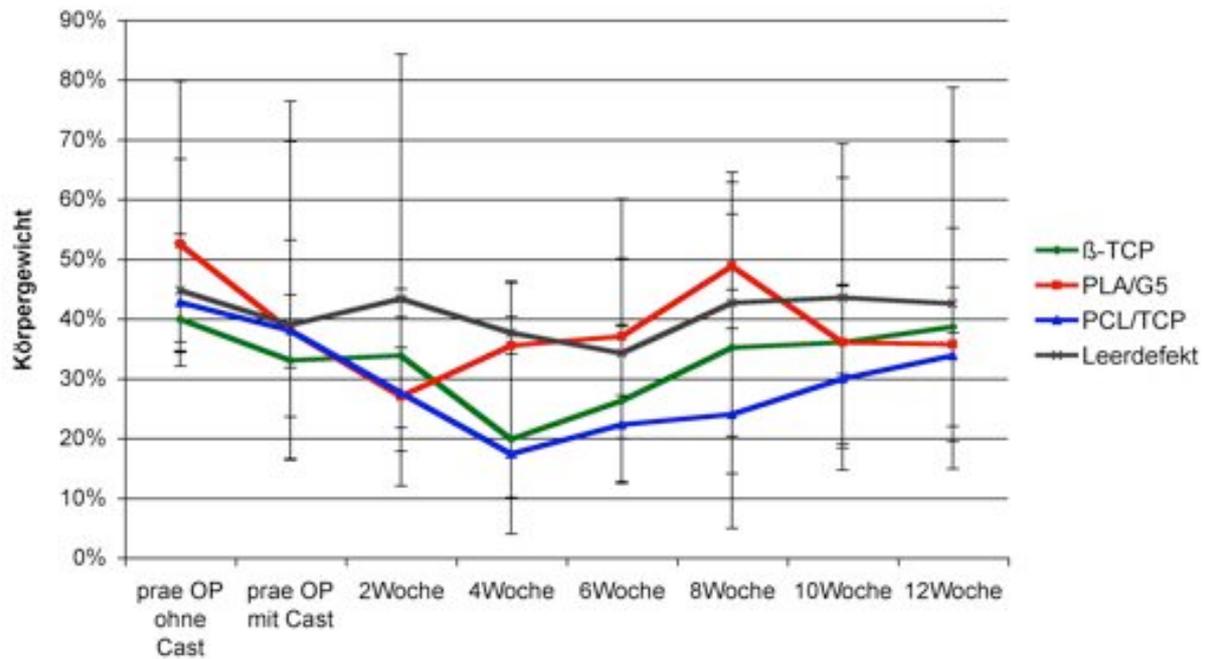


Abb. 18 Messung der Bodenreaktionskräfte über den gesamten Versuchszeitraum in % Körpergewicht

#### 4.2 Makroskopische Beobachtungen

Bei der Präparation der operierten Tibien waren bei keinem der Tiere makroskopische Anzeichen für Entzündungsprozesse zu finden. Über der Titanplatte hatte sich eine dünne Schicht aus Bindegewebe gebildet. Auch diese wies keine Anzeichen einer Entzündung oder Nekrose auf.

Über den proximalen zwei Dritteln der Platte zeigten vier Tiere aus Gruppe 1 (PCL/TCP) und jeweils ein Tier aus Gruppe 2 (PLA/G5) und der Referenzgruppe ( $\beta$ -TCP) knöcherne Kallusbildung, die die Osteosyntheseplatte dort überdeckte (Abb. 19). Diese Kallusformation wurde unter größter Vorsicht mit Hammer und Meißel entfernt. Daraufhin konnten die Schrauben, mit denen die Platte am Knochen fixiert war, herausgedreht werden. Nun konnte die Titanplatte vorsichtig vom Knochen abgelöst werden. Dies geschah bei allen Tibien problemlos und ohne Gewebe mitzureißen.



Abb. 19 Rechte Tibia mit Kallusformation über der proximalen Plattenhälfte

#### 4.3 Röntgen im Faxitron

Beim Röntgen der operierten Tibien mit und ohne Titanplatte mit dem Faxitron-Tischröntgengerät konnten die Ergebnisse der *in-vivo*-Verlaufsrontgenkontrollen bezüglich der Kallusformation im Defektbereich bestätigt werden. Auch hier war bei den Tibien mit dem implantierten Referenzmaterial ( $\beta$ -TCP) bei fünf von acht Tieren externe Kallusformation zu erkennen (Abb. 20c).

In Gruppe 1 (PCL/TCP) zeigte sich ebenfalls bei zwei von sieben Tieren eine solche Kallusformation (Abb. 20a).

Bei Gruppe 2 (PLA/G5) war bei fünf von acht Tieren mineralisiertes Gewebe direkt unter der Osteosyntheseplatte zu finden (Abb. 20b).

In einigen Defekten der Gruppen mit dem Referenzmaterial und dem Polymer-Komposit PCL/TCP war in den Faxitron-Aufnahmen zu erkennen, dass von den Osteotomieändern aus zapfenförmig mineralisiertes Gewebe in den Defekt eingewachsen war.

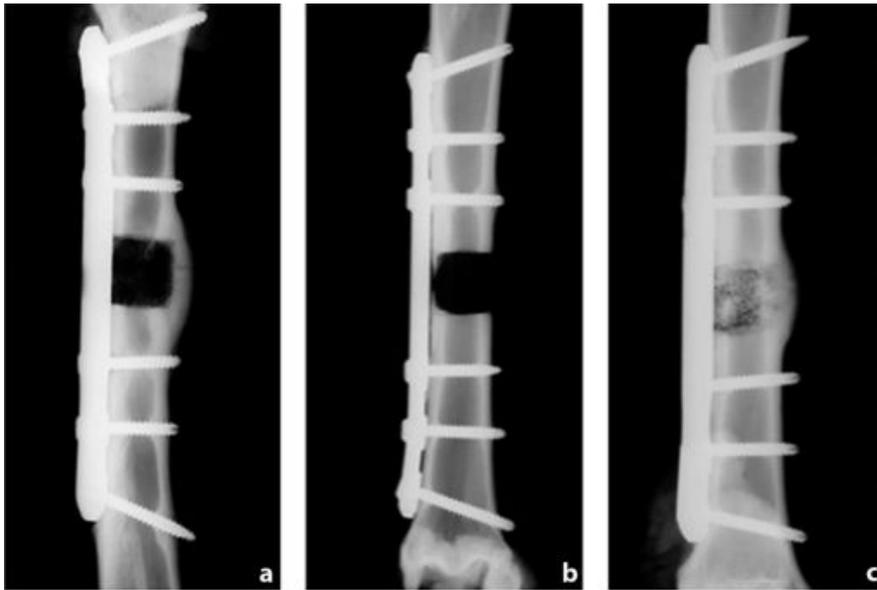


Abb. 20 Faxitron-Röntgenbilder post mortem, jeweils ein Beispiel aus jeder Versuchsgruppe. a) PCL/TCP im Defekt mit deutlicher plattenferner externer Kallusbildung; b) PLA/G5 im Defekt ohne Kallusbildung; c)  $\beta$ -TCP im Defekt (röntgendicht) mit deutlicher plattenferner externer Kallusbildung

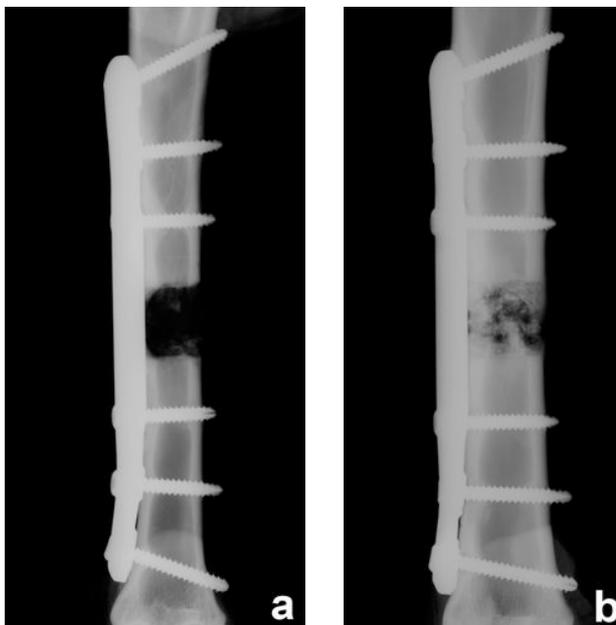


Abb. 21 Faxitron-Röntgenbilder post mortem a) PCL/TCP und b)  $\beta$ -TCP ohne erkennbare Kallusbildung

#### 4.4 Bestimmung der Mineraleichte und des Knochenvolumens im Defekt

Dargestellt werden im Folgenden die Ergebnisse der Mineraleichtemessungen im kortikalen Bereich des Defekts (Abb. 22).

Für die linken nicht operierten Tibien konnte eine durchschnittliche Dichte von 1411 ( $\pm 53$ ) mg/ccm im gesamten Defektbereich gemessen werden.

Beim Referenzmaterial ( $\beta$ -TCP) war die gemessene Mineraleichte im Defekt nicht eindeutig bestimmbar, da die Dichtewerte von im Defekt verbliebenem Restmaterial

denen von mineralisiertem, neugebildetem Knochen entsprachen. Somit war eine Unterscheidung von  $\beta$ -TCP-Resten und im Defekt neugebildetem Knochen nicht möglich. Die Mineraldichte im Defekt war bei den beiden zu testenden Polymerkompositen wesentlich geringer als beim intakten Knochen. So betrug die durchschnittliche Mineraldichte der Gruppe mit den PLA/G5-Implantaten etwa ein Drittel und die der Gruppe mit den PCL/TCP-Implantaten ungefähr ein Viertel der Dichte der intakten Knochen. Die Mineraldichte des nicht mit Implantat versorgten Defektes war 1,5 bis 2,5-fach höher als die der beiden getesteten Materialien (PCL/TCP und PLA/G5).

Der Vergleich innerhalb der einzelnen Gruppen zeigte keinen Unterschied zwischen der Mineraldichte in den proximalen und den distalen kortikalen Bereichen des Defektes (Abb. 23a-d).

Auch zeigten sich keine Unterschiede zwischen dem medialen und dem lateralen Defektbereich innerhalb der Gruppe 1 (PCL/TCP). In Gruppe 2 (PLA/G5) war dagegen die Mineraldichte im medialen Defektbereich sechs mal höher als im lateralen Defektbereich (Abb. 24a-c).

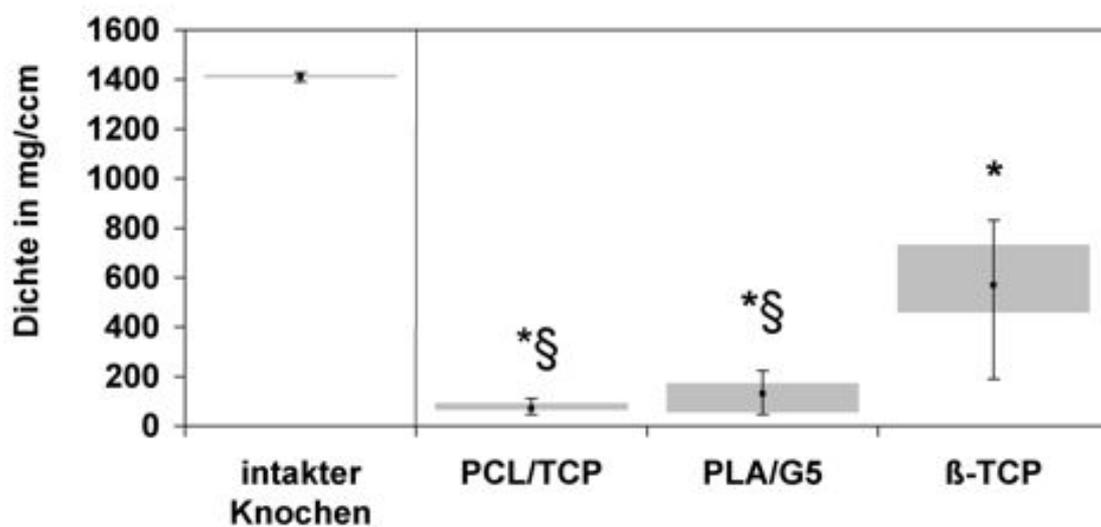
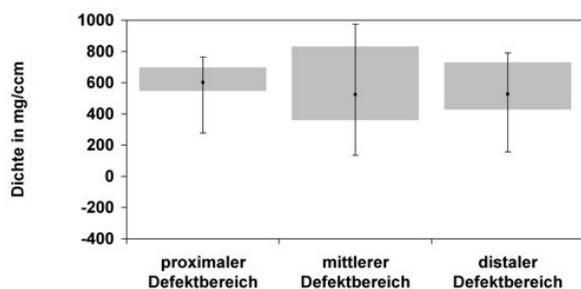


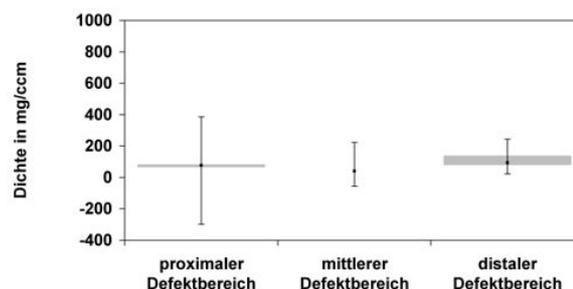
Abb. 22 Mineraldichte in mg/ccm, die drei Versuchsgruppen im Vergleich mit intakten Tibien

\* signifikanter Unterschied zum intakten Knochen ( $p < 0,05$ )

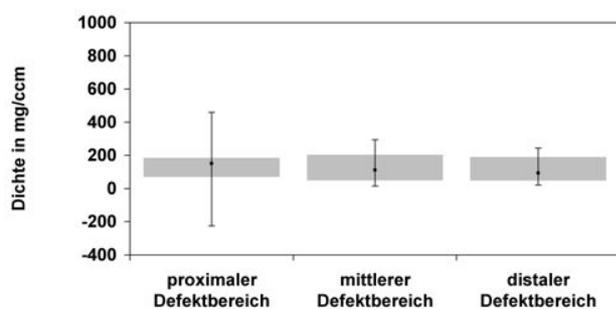
§ signifikanter Unterschied zum Referenzmaterial ( $\beta$ -TCP) ( $p < 0,05$ )



a

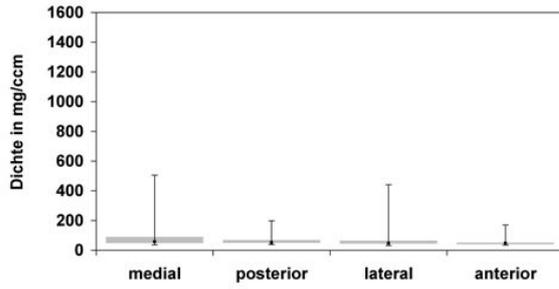


b

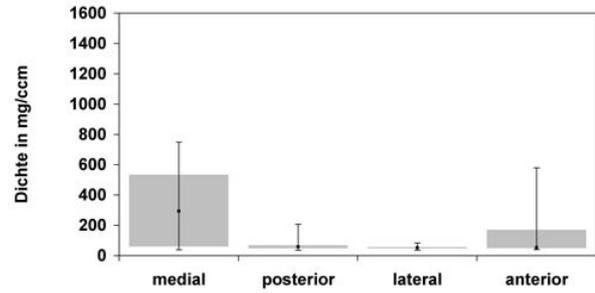


c

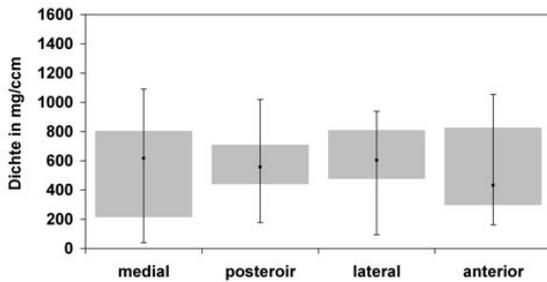
Abb. 23 Mineraldichte in mg/ccm in den Defekten der einzelnen Versuchsgruppen im proximalen, mittleren und distalen Defektbereich; a)  $\beta$ -TCP, b) PCL/TCP, c) PLA/G5



a



b



c

Abb. 24 Mineraldichte in mg/ccm in den Defekten der einzelnen Versuchsgruppen im medialen, lateralen, posterioren und anterioren Defektbereich; a) PCL/TCP, b) PLA/G5, c)  $\beta$ -TCP

Bei der Bestimmung des Volumens des im Defekt neugebildeten Knochens ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Polymerkompositgruppen (PCL/TCP und PLA/G5) (Abb. 25). Das Knochenvolumen des Defektes ohne Implantat lag zwischen dem der beiden getesteten Materialien.

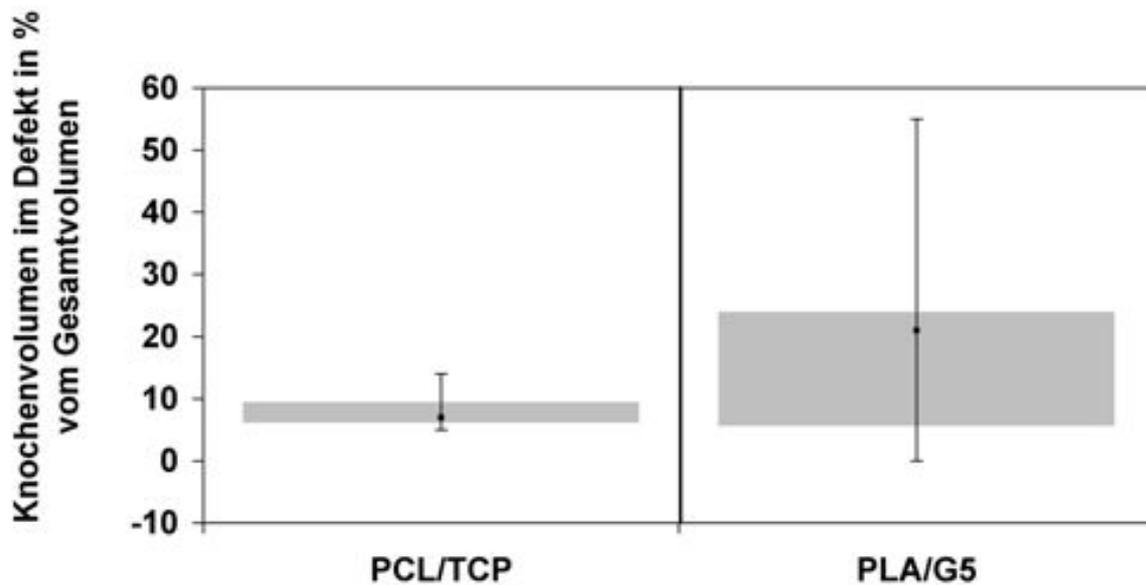


Abb. 25 Knochenvolumen im Defekt in % vom gemessenen Gesamtvolumen

Für die Referenzgruppe ( $\beta$ -TCP) war eine Bestimmung des Knochenvolumens im Defekt nicht möglich, da der neugebildete Knochen und das verbleibende Material eine sehr hohe Übereinstimmung der Graustufen aufwiesen. Somit waren der Knochen und das keramische Material nicht eindeutig unterscheidbar. In Abb. 26 wird jeweils ein Beispiel einer dreidimensionalen Rekonstruktion der Mikro-CT-Datensätze aus jeder Gruppe gezeigt.

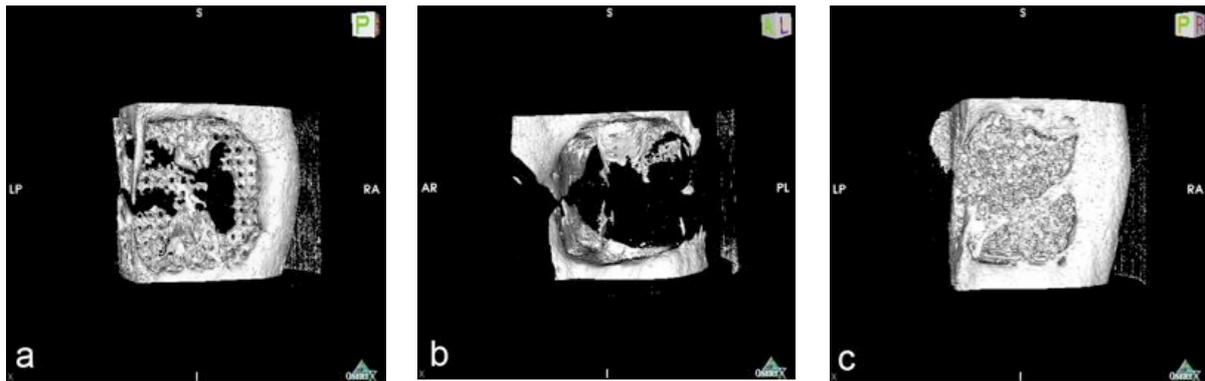


Abb. 26 Mikro-CT-Darstellung (dreidimensionale Rekonstruktion) von jeweils einem Defekt aus jeder Gruppe. a) PCL/TCP, b) PLA/G5, c)  $\beta$ -TCP; Ansicht: posterior, linke Seite ist medial (plattenseitig), rechte Seite ist lateral

#### 4.5 Biomechanik

Durch die Prüfung der Biegesteifigkeit der Tibien konnte Aufschluss über die mechanischen Eigenschaften des Gewebes im Defektbereich gewonnen werden.

Einige der osteotomierten Tibien wiesen eine hohe Instabilität im Defektbereich auf, so dass es nicht möglich war, diese der Vierpunktbiegeprüfung zu unterziehen. Es konnten in der Referenzgruppe ( $\beta$ -TCP) sechs von acht Tibien getestet werden, in Gruppe 1 (PCL/TCP) und 2 (PLA/G5) waren es jeweils zwei von sieben bzw. acht Tibien. Bei den nicht messbaren Defekten wurde eine Biegesteifigkeit von 0 Nm<sup>2</sup> angenommen.

Es konnte eine signifikant höhere Steifigkeit in der Gruppe mit dem Referenzmaterial ( $\beta$ -TCP) gegenüber den beiden zu testenden Polymerkompositen gemessen werden. Während die Referenzgruppe 3,6 % der Biegesteifigkeit der linken, intakten Tibien erreichte, kam die Gruppe mit PCL/TCP nur auf 0,6 % und die Gruppe mit PLA/G5 auf 0,4 % der Biegesteifigkeit der linken Tibien (Abb. 27).

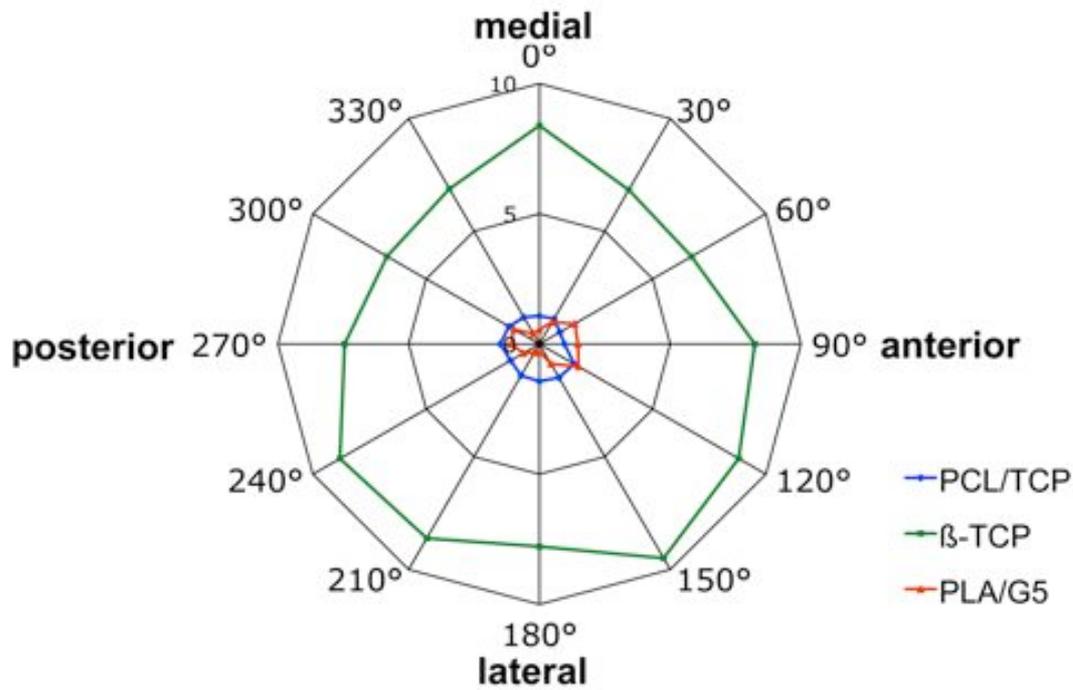


Abb. 27 Steifigkeit des Defektes in den Tibien der drei Versuchsgruppen im Vergleich in  $Nm^2$   
 Es bestehen signifikante Unterschiede zwischen PCL/TCP ( $n=7$ ) und  $\beta$ -TCP ( $n=8$ ), sowie zwischen PLA/G5 ( $n=8$ ) und  $\beta$ -TCP ( $p < 0,05$ )

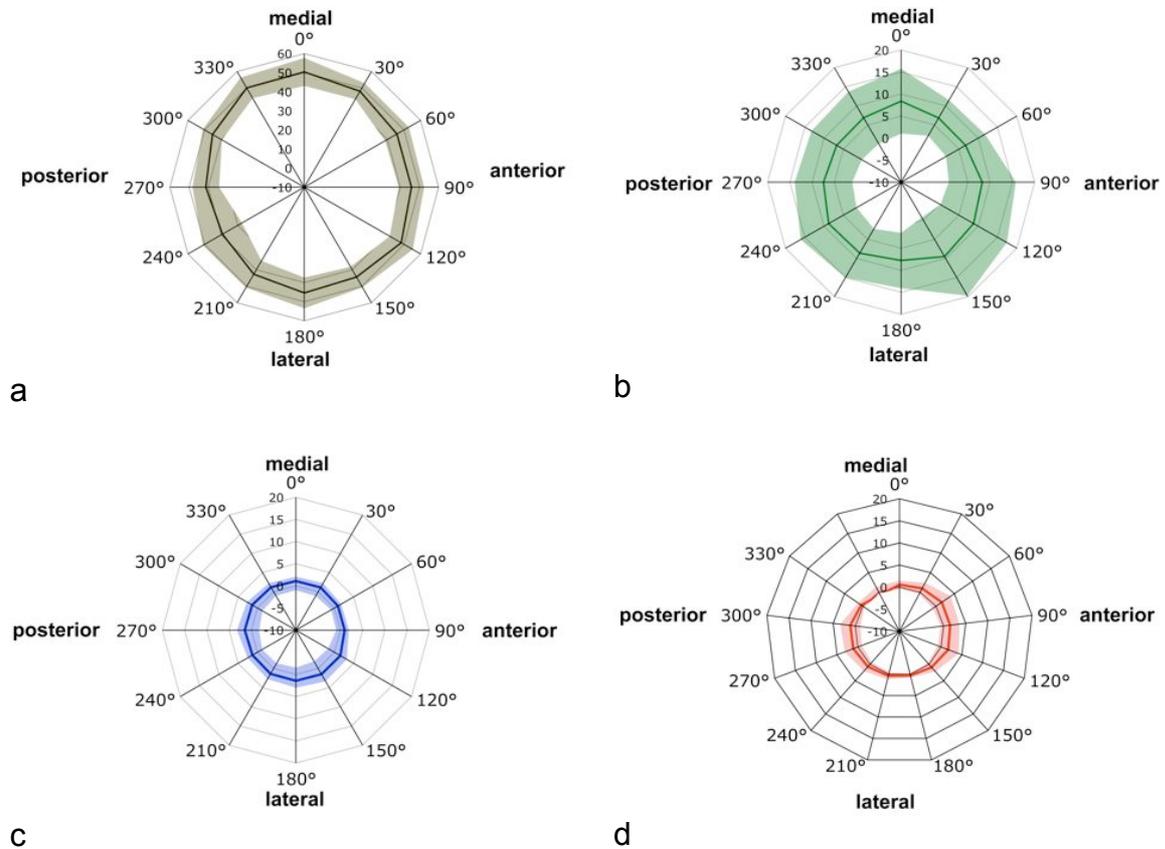


Abb. 28 Steifigkeit der Defekte in den einzelnen Versuchsgruppen in  $Nm^2$  mit Standardabweichung; a) intakter Knochen, b)  $\beta$ -TCP ( $n=8$ ), c) PCL/TCP ( $n=7$ ), d) PLA/G5 ( $n=8$ )

Es bestehen signifikante Unterschiede aller drei Materialien zum intakten Knochen ( $p < 0,05$ )

## 4.6 Histologie

### 4.6.1 Qualitative Gewebedifferenzierung

Bei der qualitativen Auswertung der histologischen Schnitte fiel am deutlichsten eine massive externe Kallusbildung auf der plattenfernen Defektseite auf. Dieser Kallus war bei sechs Tieren in Gruppe 1 (PCL/TCP) und bei sieben Tieren der Referenzgruppe ( $\beta$ -TCP) zu finden (Abb. 30 und Abb. 31). Bei den meisten Schafen mit einem solchen Kallus waren die proximale und distale Kallusspange jedoch von einem schmalen Knorpelband unterbrochen.

Kein Defekt in der Polymerkompositgruppe mit dem PLA/G5 wies einen solchen externen Kallus auf. Bei fünf Tibien mit diesem Material war eine Kallusbildung im Defekt direkt unter der Osteosyntheseplatte zu finden. Auch hier war zwischen der proximalen und der distalen Knochenspange meist ein schmales Knorpelband zu finden (Abb. 29).

Die Knochenmenge im gesamten Defekt und an den Defekträndern war beim Referenzmaterial ( $\beta$ -TCP) am höchsten. Lediglich auf der medialen Defektseite war in Gruppe 2 (PLA/G5) geringgradig mehr Knochen zu finden als in der Referenzgruppe. Der Knochen im Defekt war in jedem Fall als ungerichtet zu beschreiben (Abb. 32).

Bei allen Schafen konnten geringe Osteoklastenaktivitäten an den kortikalen Osteotomie­rändern gefunden werden (Abb. 33). Im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen waren bei der Referenzgruppe ( $\beta$ -TCP) jedoch tendenziell geringgradig mehr Osteoklastenaktivitäten als bei den beiden Polymerkompositen zu finden.

Bei der Untersuchung des Knochen-Material-Kontakts fiel auf, dass dieser beim  $\beta$ -TCP deutlich enger war als bei den beiden Polymerkompositen. In Gruppe 3 ( $\beta$ -TCP) war an den meisten Stellen ein direkter Kontakt zwischen Knochen und  $\beta$ -TCP vorhanden (Abb. 34). Einzelne Materialpartikel waren hier vollständig von neugebildetem Knochen umgeben. Bei Gruppe 2 (PLA/G5) dagegen war kaum ein direkter Kontakt zwischen Material und Knochen zu beobachten. Das Material war zumeist von Bindegewebsschichten mit Fremdkörperriesenzellen eingekapselt (Abb. 35). Beim PCL/TCP war teilweise ein direkter Material-Knochen-Kontakt zu erkennen. Häufig war aber auch hier das Polymerkomposit von Fremdkörperriesenzellen und Bindegewebe umschlossen (Abb. 36).

Entzündungszellen konnten hochgradig in den Implantaten aus PLA/G5 nachgewiesen werden (Abb. 35 und Abb. 37). Hier waren vor allem Fremdkörperriesenzellen zu finden. In den Implantaten aus PCL/TCP war eine mittelgradige Entzündungsreaktion mit Fremdkörperriesenzellen und vereinzelt Lymphozyten zu finden (Abb. 38). Die geringsten Anzeichen einer entzündlichen Reaktion mit Fremdkörperriesenzellen und vereinzelt Lymphozyten wiesen die Implantate aus  $\beta$ -TCP auf (Abb. 39).

In allen drei Gruppen beschränkte sich die Entzündungsreaktion auf das Material und seine unmittelbar angrenzende Umgebung.

Bei allen Gruppen waren im kortikalen Defektbereich Kapillaren und kleinere Blutgefäße in unterschiedlicher Dichte und Stärke im Bindegewebe zu finden (Abb. 40 und Abb. 41).

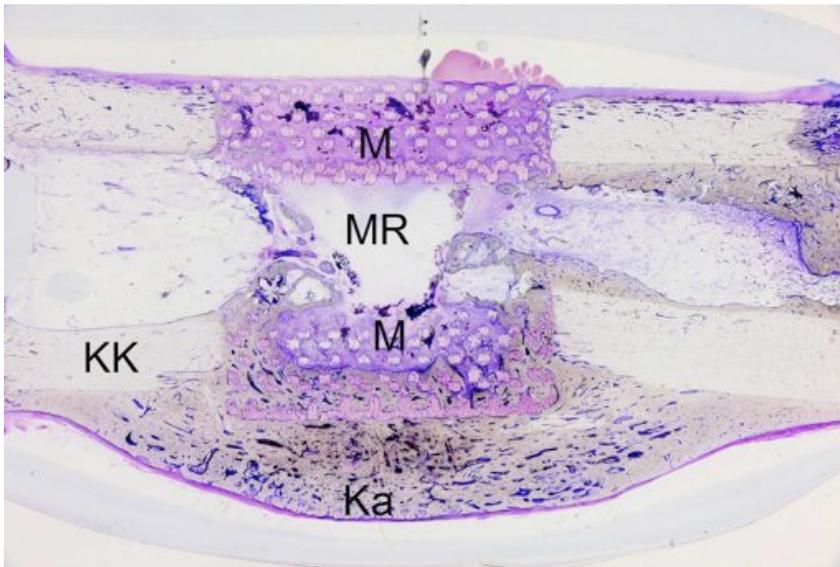


Abb. 29 Histologischer Schnitt durch eine Tibia mit PLA/G5-Implantat; Markraum (MR), Material (M) und kortikaler Knochen (KK)

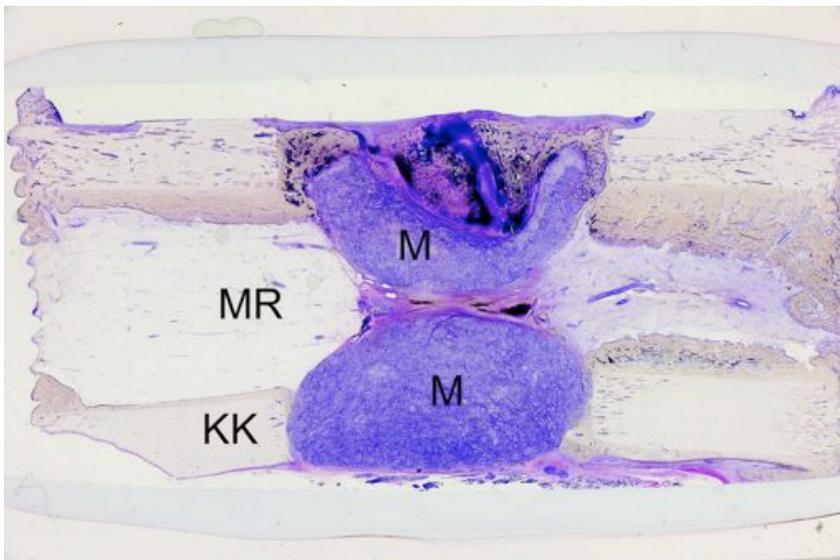


Abb. 30 Histologischer Schnitt durch eine Tibia mit PCL/TCP-Implantat; Markraum (MR), Material (M), kortikaler Knochen (KK) und Kallus (Ka) auf der plattenfernen lateralen Defektseite

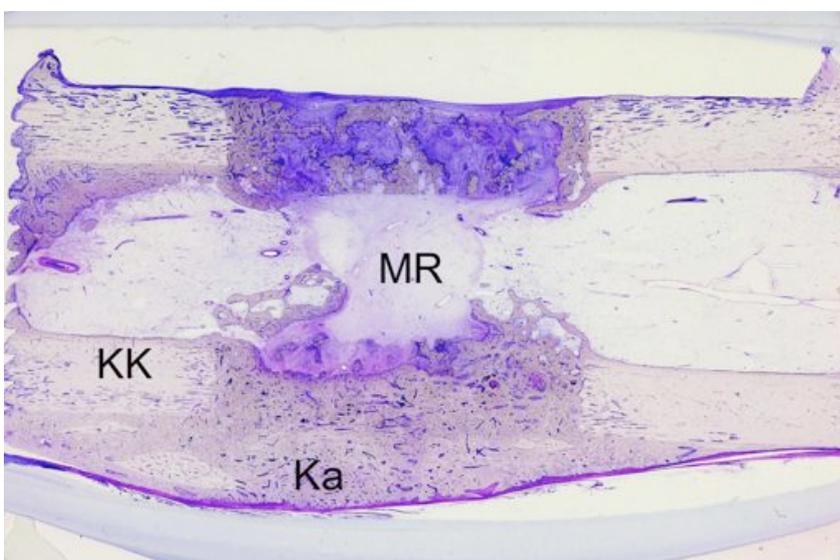


Abb. 31 Histologischer Schnitt durch eine Tibia mit  $\beta$ -TCP-Implantat; Markraum (MR), kortikaler Knochen (KK) und plattenfernen lateralen Kallus (Ka)

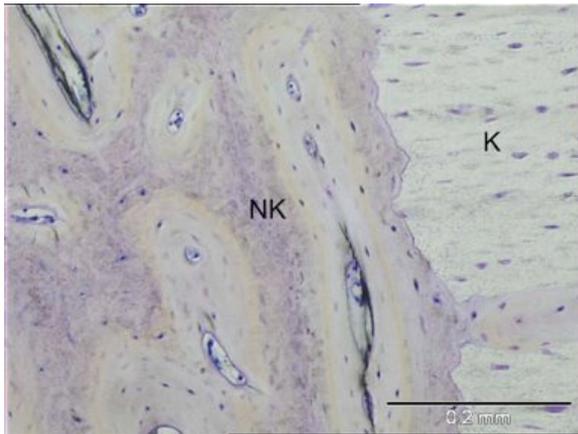


Abb. 32 Neugebildeter Knochen (NK) und alter Knochen (K) an der Osteotomie-kante. Material  $\beta$ -TCP; 100-fache Vergrößerung

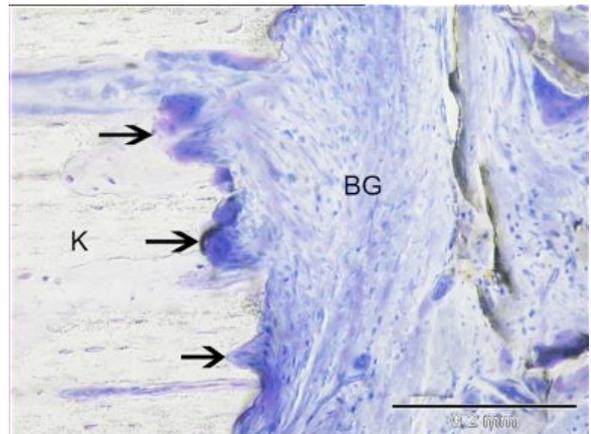


Abb. 33 Osteoklasten am Defektrand (Pfeile), angrenzend im Defekt Bindegewebe (BG). Material PLA/G5; 100-fache Vergrößerung

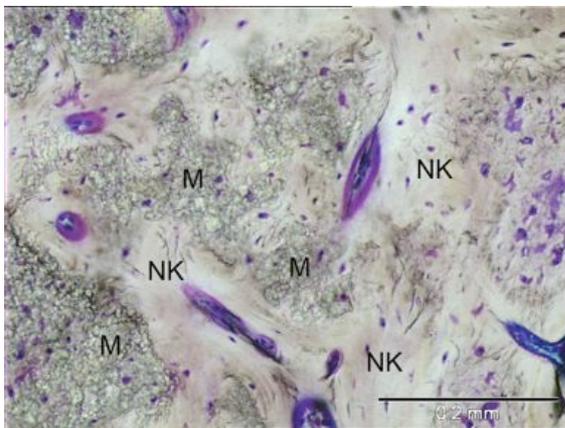


Abb. 34 Direkter Kontakt zwischen neugebildetem Knochen (NK) und dem Material (M)  $\beta$ -TCP. 100-fache Vergrößerung

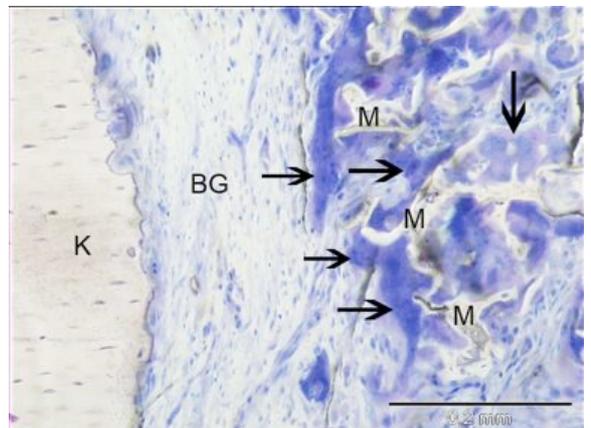


Abb. 35 Bindegewebsschicht zwischen Material (M) PLA/G5 und Knochen (K). Fremdkörperriesenzellen (Pfeile) am Material (M). 100-fache Vergrößerung

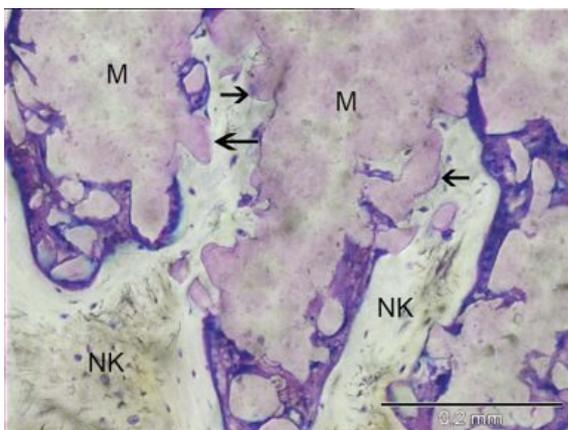


Abb. 36 Stellenweise direkter Kontakt (Pfeile) zwischen Material (M) PCL/TCP und neugebildetem Knochen (NK). 100-fache Vergrößerung

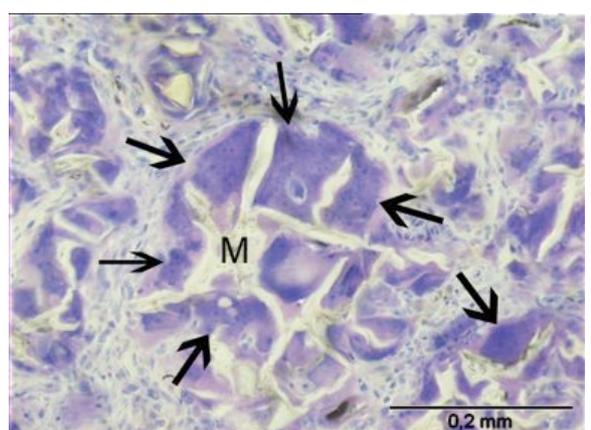


Abb. 37 Fremdkörperriesenzellen (Pfeile) im Material (M) PLA/G5. 100-fache Vergrößerung

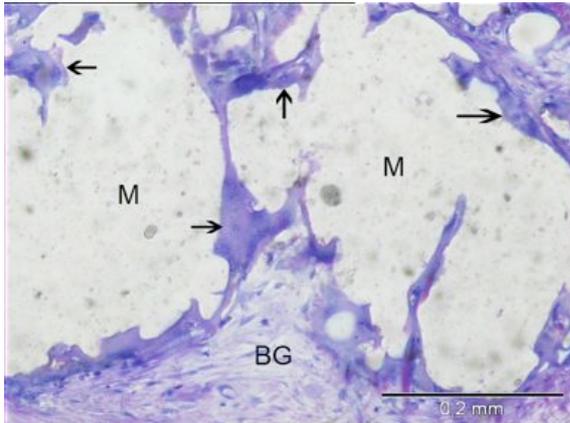


Abb. 38 Material (M) PCL/TCP umgeben von Fremdkörperriesenzellen (Pfeile) und Bindegewebe (BG). 100-fache Vergrößerung

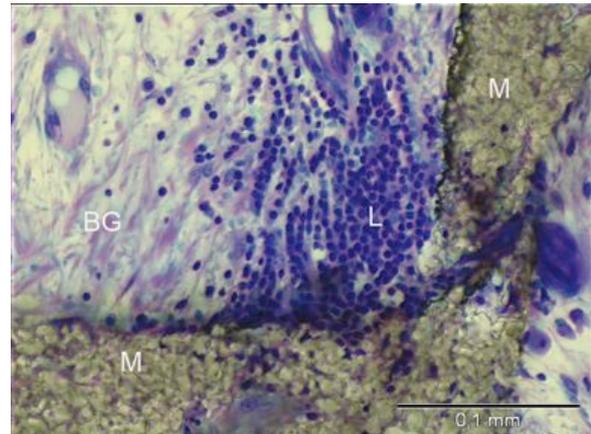


Abb. 39 Material (M)  $\beta$ -TCP umgeben von Bindegewebe (BG) und Lymphozyten (L). 200-fache Vergrößerung

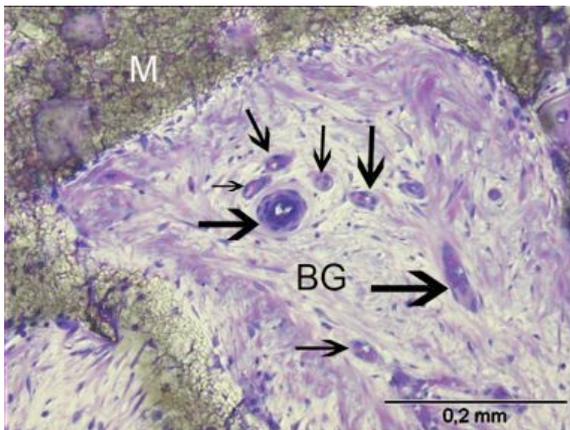


Abb. 40 Kapillare Blutgefäße (Pfeile) im Bindegewebe (BG) im Defekt mit Materialresten (M) von  $\beta$ -TCP. 100-fache Vergrößerung

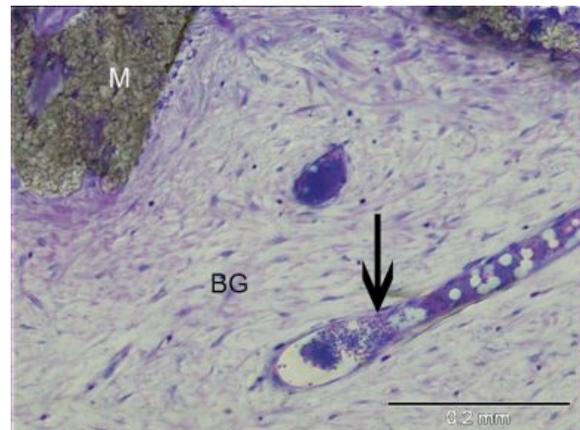


Abb. 41 Blutgefäß (Pfeil) im Bindegewebe (BG) im Defekt mit Materialrest (M) von  $\beta$ -TCP. 100-fache Vergrößerung

#### 4.6.2 Quantitative Gewebedifferenzierung

##### Material PCL/TCP

Bei der quantitativen histologischen Auswertung der Präparate (siehe Kapitel 2.4.5) zeigten sich innerhalb der Polymerkompositgruppe 1 (PCL/TCP) keine signifikanten Unterschiede zwischen den medialen und den lateralen Cortices. Es waren kaum knorpelige Anteile zu finden. Weichgewebe war im Defekt am häufigsten vertreten

und machte fünf mal mehr Flächenanteile aus als Knochen und 1,5 mal mehr als Restmaterial (Abb. 42).

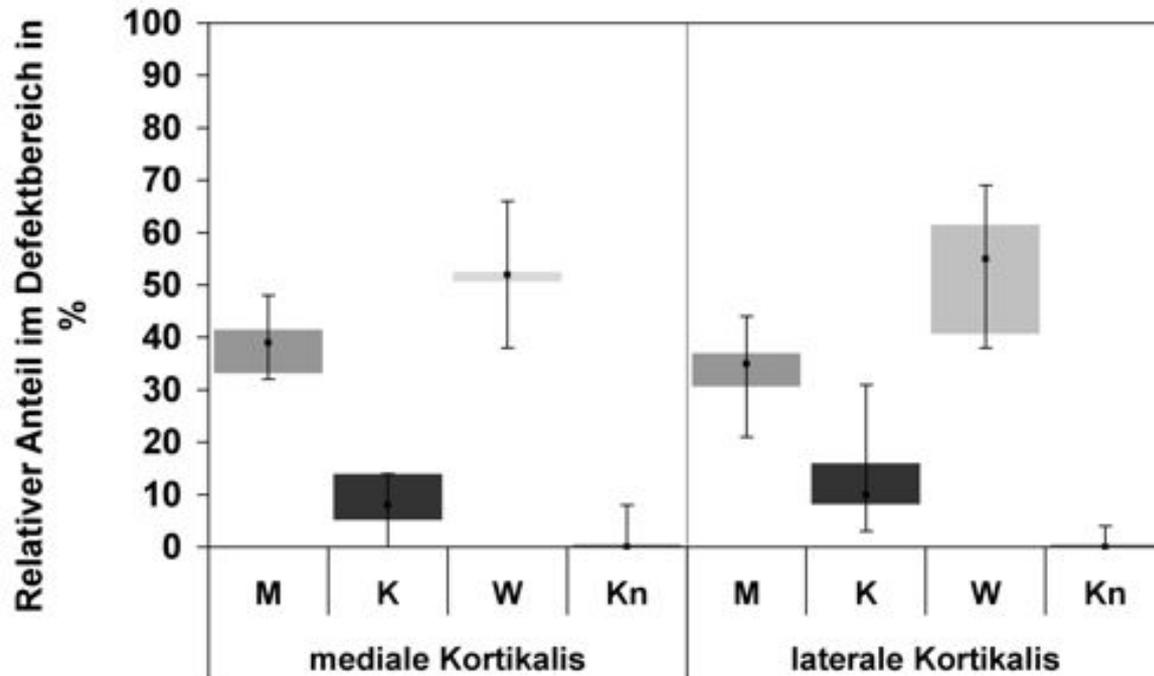


Abb. 42 Relativer Anteil an Material (M), Knochen (K), Weichgewebe (W) und Knorpel (Kn) im medialen und lateralen Defektbereich bei Gruppe 1 (PCL/TCP) in %

#### Material PLA/G5

In der Polymerkompositgruppe mit PLA/G5 waren deutliche Unterschiede zwischen der medialen und der lateralen Kortikalis zu finden (Abb. 43). So war im medialen kortikalen Defektbereich 8,5 mal mehr Knochen vorhanden als im lateralen kortikalen Defektbereich. Dagegen war auf der lateralen Seite der Weichgewebeanteil am höchsten (ca. doppelt so hoch wie auf medialer Seite). Auch der Materialanteil war auf der lateralen Seite höher. Auf der medialen Defektseite war das Material aber aus dem kortikalen Defektbereich und somit auch aus dem Zählbereich in den Markraum verschoben (Abb. 29).

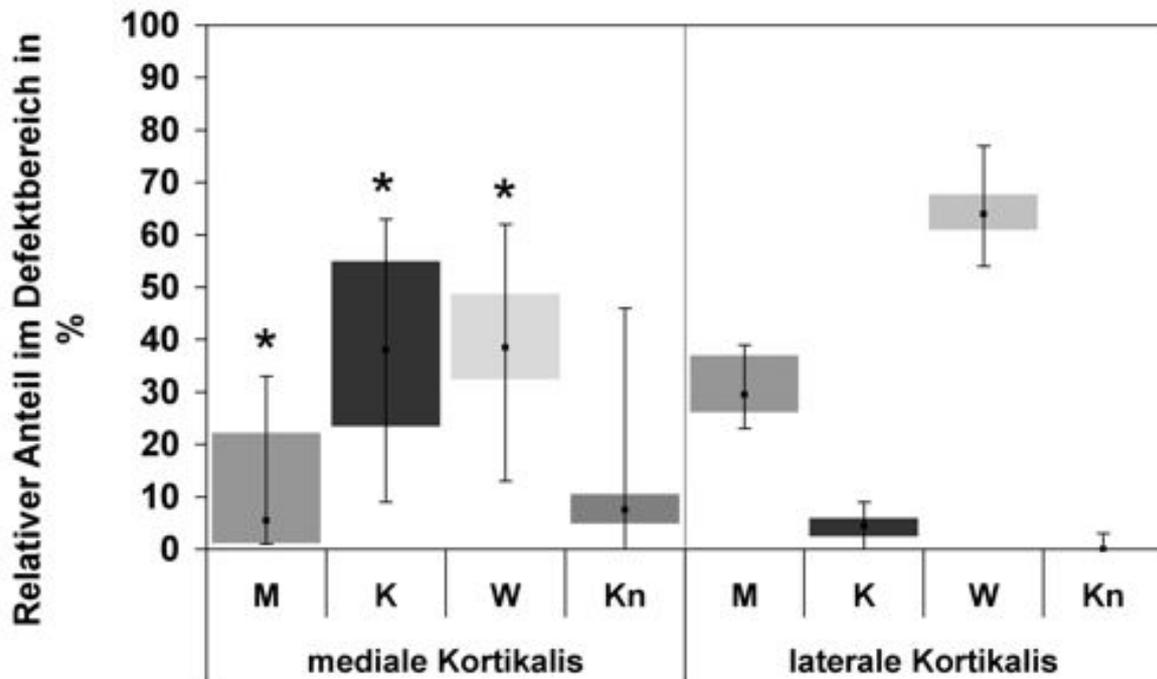


Abb. 43 Relativer Anteil an Material (M), Knochen (K), Weichgewebe (W) und Knorpel (Kn) im medialen und lateralen Defektbereich bei Gruppe 2 (PLA/G5) in %

\* signifikanter Unterschied zur lateralen Kortikalis ( $p < 0,05$ )

#### Referenzmaterial $\beta$ -TCP

In der Referenzgruppe ( $\beta$ -TCP) waren ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen der medialen und der lateralen Defektseite zu finden (Abb. 44). Hier war der Anteil an neugebildetem Knochen im lateralen kortikalen Defektbereich fast dreimal so hoch wie im medialen kortikalen Defektbereich. Weichgewebe dagegen war auf der medialen Defektseite am häufigsten vertreten (ca. doppelt so viel wie auf lateralen Seite). Bezüglich des verbleibenden Restmaterials waren keine Unterschiede zwischen der medialen und der lateralen Seite zu finden.

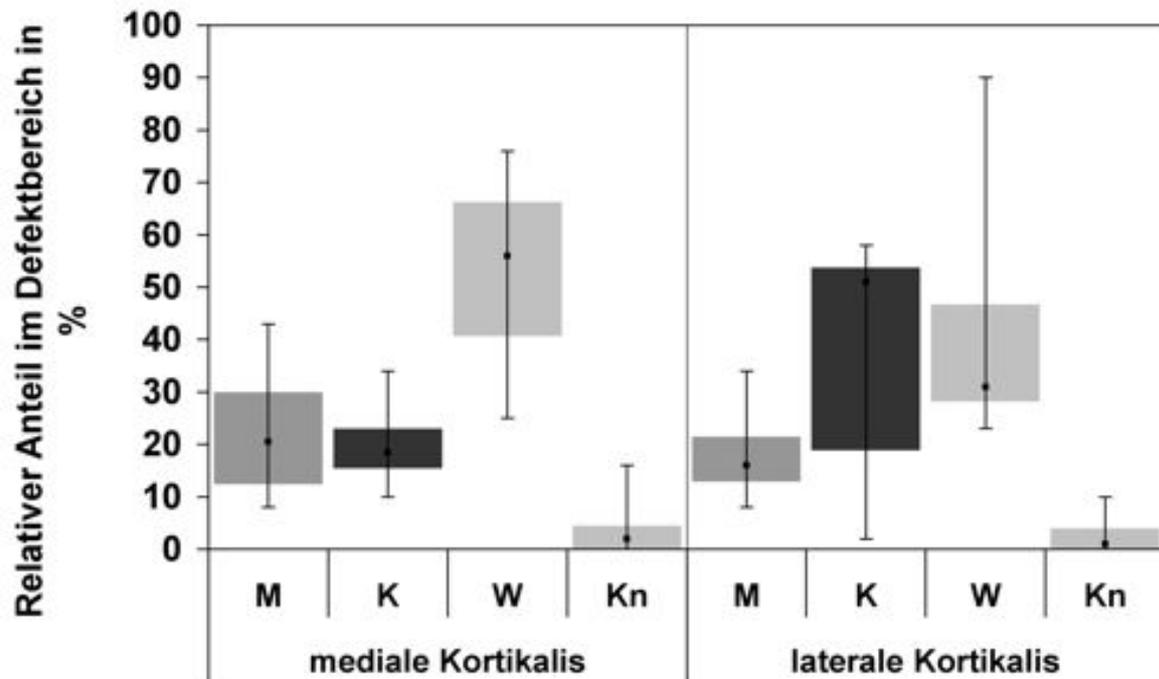


Abb. 44 Relativer Anteil an Material (M), Knochen (K), Weichgewebe (W) und Knorpel (Kn) im medialen und lateralen Defektbereich bei Gruppe 3 ( $\beta$ -TCP) in %

#### Die Versuchsgruppen im Vergleich

Bei der quantitativen histologischen Auswertung der Präparate variierten die relativen Mengen von Material, Knochen, Weichgewebe und Knorpel im Defekt zwischen den Versuchsgruppen. So war in der Referenzgruppe ( $\beta$ -TCP) dreimal so viel neugebildeten Knochen zu finden wie in Gruppe 1 (PCL/TCP). Die relative Menge an neugebildeten Knochen in Gruppe 2 (PLA/G5) lag zwischen den beiden vorgenannten Gruppen (Abb. 45). Beim relativen Anteil an Weichgewebe und Knorpel im Defekt zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Der relative Anteil von Material im Defekt lag in Gruppe 1 (PCL/TCP) doppelt so hoch wie bei den anderen beiden Materialgruppen. Auch im Vergleich des verbleibenden Materials im Defekt mit entsprechenden nicht

implantierten Materialien war der Materialabbau in der Referenzgruppe am größten (Abb. 45). In Gruppe 1 (PCL/TCP) war der Materialabbau sechs mal geringer als in der Referenzgruppe und vier mal geringer als in der Kompositgruppe mit PLA/G5.

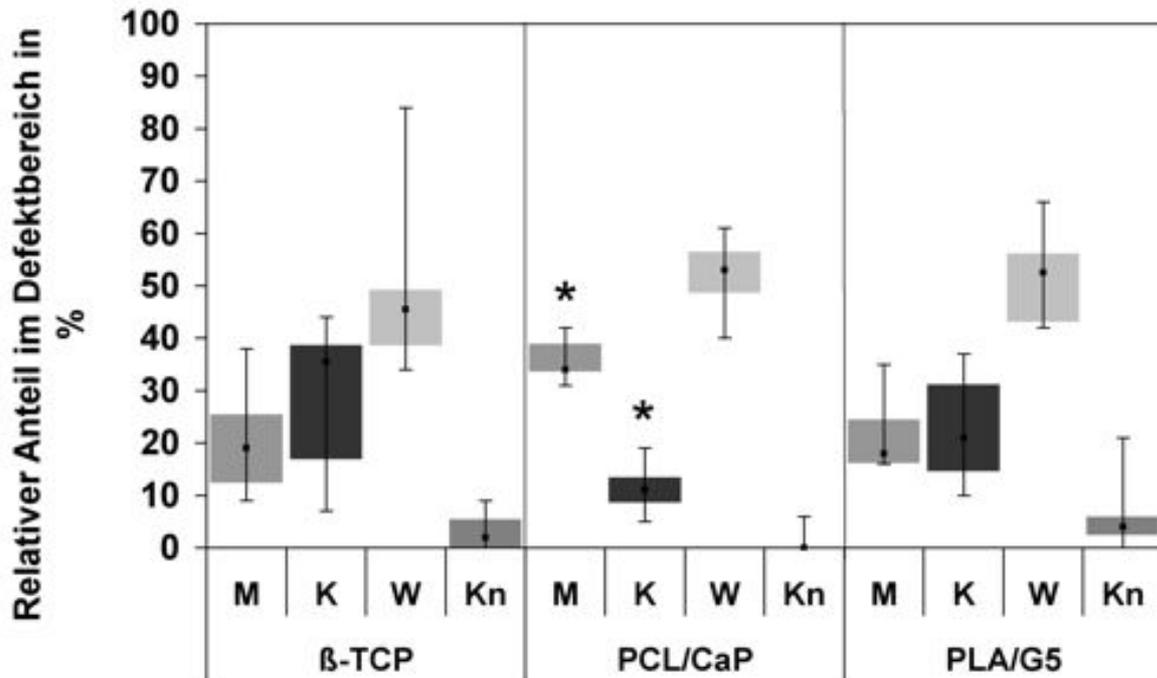


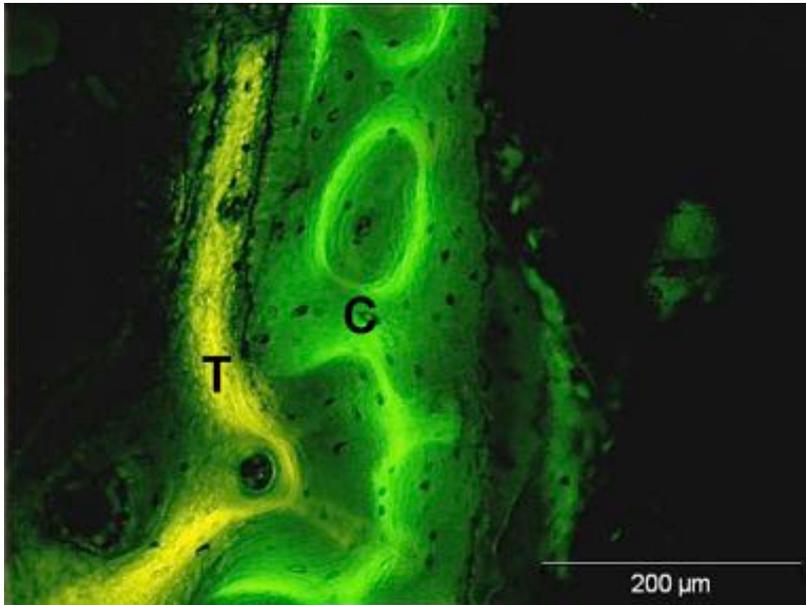
Abb. 45 Relativer Anteil an Material (M), Knochen (K), Weichgewebe (W) und Knorpel (Kn) im Materialgruppenvergleich in %

\* signifikanter Unterschied zum Referenzmaterial ( $\beta$ -TCP) ( $p < 0,05$ )

#### 4.6.3 Fluoreszenzhistologische Untersuchung

Bei der fluoreszenzhistologischen Untersuchung war auffällig, dass bei allen Versuchsgruppen kaum grün fluoreszierender Knochen (durch Calceingrün gefärbt, vierte Woche) im Defekt zu finden war. Bei Tieren mit externem plattenfernen Kallus (siehe 3.6.1) war etwas mehr calceingrüngefärbter Knochen nachweisbar. Tetracyclin (gelb fluoreszierender Knochen, achte Woche) kam in größeren Mengen im lateralen kortikalen Defektbereich bei der Referenzgruppe ( $\beta$ -TCP) und im

medialen kortikalen Defektbereich in Gruppe 2 (PLA/G5) vor. In Gruppe 1 (PCL/TCP) waren nur geringe Mengen gelb fluoreszierenden Knochens zu finden (Abb. 46).



*Abb. 46  
Fluoreszenzhistologische  
Färbung eines Defektes mit  
PCL/TCP-Implantat. 4 Wochen  
post operationem gebildeter  
Knochen ist durch Calceingrün  
(C) gefärbt. 8 Wochen post  
operationem gebildeter  
Knochen ist durch Tetracyclin  
gefärbt (T); 100fache  
Vergrößerung*

Bei der fluoreszenzhistologischen Untersuchung war außerdem eine Zuordnung der Knochenneubildung im zeitlichen Verlauf möglich (Abb. 47a-d). Es war erkennbar, dass in allen Gruppen die Eindringtiefe neugebildeten Knochens in den Defekt nach vier Wochen sehr gering war. Auf der lateralen Defektseite wies die Referenzgruppe ( $\beta$ -TCP) die größten Eindringtiefen in den Defekt auf. Hier war nach acht Wochen der neugebildete Knochen um das 5 bis 7-fache tiefer eingedrungen als nach vier Wochen und nach 14 Wochen dann um das 3 bis 4-fache der achten Woche. Die Knocheneindringtiefen bei den Polymerkompositgruppen lagen auf der lateralen Defektseite signifikant niedriger im Vergleich zur Referenzgruppe. So war die Knocheneindringtiefe in Gruppe 2 (PLA/G5) in der 14. Woche 7 bis 11-fach niedriger als in der Referenzgruppe und in Gruppe 1 (PCL/TCP) 3-fach niedriger (Abb. 47a,b). Auf der medialen Defektseite wies die Kompositgruppe mit PLA/G5 die größten Eindringtiefen in den Defekt auf (Abb. 47c,d). Hier war nach acht Wochen Knochen

um das 4 bis 5-fache tiefer in den medialen Defekt eingedrungen als nach vier Wochen, nach 14 Wochen dann um das 2 bis 3-fache der achten Woche. Die Knocheneindringtiefen bei der Polymerkompositgruppe mit PCL/TCP und der Referenzgruppe ( $\beta$ -TCP) lagen auf der medialen Defektseite niedriger im Vergleich zur Gruppe 2 (PLA/G5). So war die Knocheneindringtiefe in Gruppe 1 (PCL/TCP) in der 14. Woche 2 bis 3-fach niedriger als in Gruppe 2 (PLA/G5) und 1,5-fach niedriger als in der Referenzgruppe ( $\beta$ -TCP).

Es gab in allen Gruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen den proximalen und den distalen Osteotomiekanten innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppen.

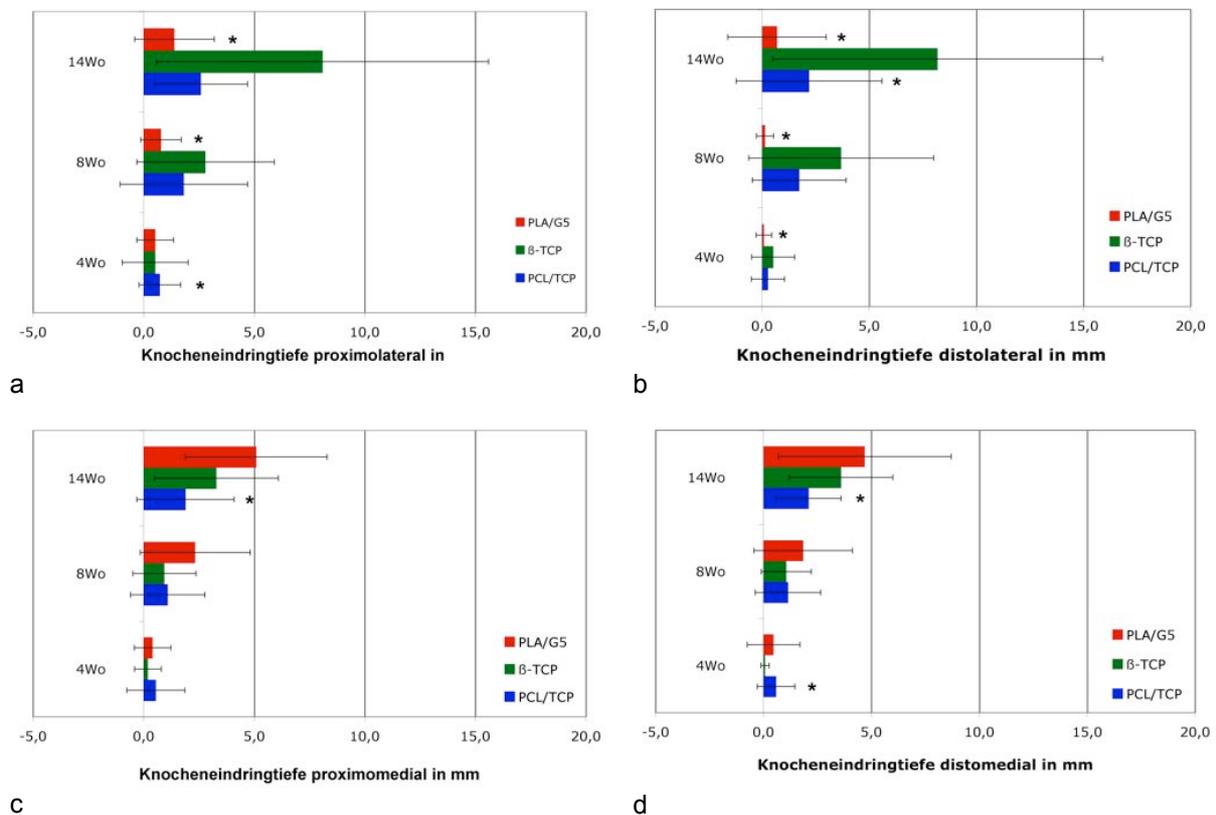


Abb. 47 Knocheneindringtiefen in den Defekt gemessen von den Osteotomiekanten nach 4, 8, und 14 Wochen. a) proximolaterale Osteotomiekante, b) distolaterale Osteotomiekante, c) proximomediale Osteotomiekante, d) distomediale Osteotomiekante

\* signifikanter Unterschied zum Referenzmaterial ( $\beta$ -TCP) ( $p < 0,05$ )

## 5. Diskussion

### 5.1 Eignung des Untersuchungsmodells

Zur Testung von Knochenersatzmaterialien *in vivo* werden häufig Schafe herangezogen. Ovine Knochen haben zwar eine höhere Knochendichte und -festigkeit als humane Knochen (Liebschner, 2004), in ihrer Knochenstruktur, ihren Skelett-Dimensionen und mechanischen Knocheneigenschaften ähneln sie jedoch dem Menschen (Gerhart, 1993; Martini, 2001; Wissing, 1990). Bei Schafen ist vor allem eine primäre Knochenstruktur bzw. lamellärer Knochen zu finden, während der Mensch bis zum Abschluss der skelettalen Reife eine sekundäre Knochenstruktur mit Osteonen ausgebildet hat (Auer, 2007; Eitel, 1981; Newman, 1995). Während der Knochenheilung und dem anschließenden Remodelling kommt es auch beim Schaf zur Ausbildung von sekundären Osteonen (Auer, 2007; Newman, 1995).

Im Hinblick auf Größe, Form, Festigkeit, biomechanische Belastung, Struktur, Vaskularisierung und Regeneration der Knochen ist das Schaf den Kaninchen, Hunden und Primaten bei der Testung von Implantaten überlegen (Wissing, 1990).

Wegen der überwiegenden Vorteile gegenüber anderen Versuchstierspezies ist das Schaf als Versuchstier für die Zielsetzung dieser Arbeit am besten geeignet und wurde auch bereits in zahlreichen anderen Studien mit ähnlicher Fragestellung verwendet. So testeten zum Beispiel Sarkar et al. autogenes plättchenreiches Plasma (PRP) in einem Kollagen-Trägermaterial in einem diaphysären Defekt kritischer Größe in der Tibia von Schafen. Eine Fixierung erfolgte mittels Platte und Marknagel (Sarkar et al., 2006). Gugala et al. und Wippermann et al. verwendeten ebenfalls Schafe, um in einem kritischen Defekt in der Tibia Polymer-Membranen

bzw. Hydroxylapatitkeramiken kombiniert mit autogenem Knochenmark zu testen (Gugala, 1999; Wippermann, 1994).

In der vorliegenden Studie wurden verschiedene Knochenersatzmaterialien in einem Defekt kritischer Größe in der Schafstibia getestet. Ein Defekt kritischer Größe ist definiert als die kleinste Größe einer Knochenverletzung, die nicht spontan verheilt (Hollinger, 1990; Schmitz, 1986). In der Diaphyse der Schafstibia gilt ein Defekt von ca. 20 mm als kritisch, wie eine Studie von Wippermann et al. belegt. Hier kam es in solchen Defekten ohne Implantation eines Knochenersatzmaterials nicht zur Ausheilung, sondern zur Bildung einer Pseudarthrose (Wippermann, 1994). Viateau et al. zeigten, dass schon bei Defektgrößen von 13 und 25 mm Größe keine Heilung erfolgte. Diese Studie wurde jedoch an Metatarsusdefekten im Schaf durchgeführt (Viateau et al., 2004).

Um die Ergebnisse aus der Literatur zu überprüfen und sicherzustellen, dass auch bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Schafrasse (Bergschaf) ein Defekt von 20 mm nicht spontan heilt, wurde exemplarisch ein Schaf mit einem unbehandelten Defekt von 20 mm Größe untersucht. Auch hier kam es zu keiner knöchernen Überbrückung des Defektes während des gesamten Versuchszeitraums. Dies belegt, dass der in dieser Studie verwendete Defekt als ein Defekt kritischer Größe einzustufen ist. Auch ist für die Zielsetzung dieser Studie der verwendete diaphysäre Volldefekt am Röhrenknochen besser geeignet als ein Bohrlochdefekt. Im diaphysären Volldefekt kommt es im Gegensatz zum Bohrlochdefekt zu mechanischer Belastung und damit zur Stimulation bedarfsangepasster Knochenneubildung (Wippermann, 1994). Ein solcher Defekt stellt also eine gute Annäherung an die klinische Situation dar.

Zur Fixierung von Defekten kritischer Größe in der Diaphyse von Schafstibien gibt es verschiedene Möglichkeiten. Gugala et al. verwendeten zur Abstützung eines 40 mm

großen Defekts einen bilateralen Fixateur externe. Um eine volle Belastung der operierten Gliedmaße und ein Versagen der Osteosynthese zu verhindern, wurden die Tiere in Schlingen gehängt (Gugala, 1999). Kon et al. verwendeten ebenfalls einen Fixateur externe, um einen 35 mm großen Defekt zu fixieren (Kon et al., 2000). Regauer et al. setzten einen rotationsstabilen Marknagel ein, um einen 50 mm großen Defekt zu stabilisieren. An den operierten Gliedmaßen führten sie zusätzlich eine Tenotomie des Ligamentum patellae durch, um eine volle Belastung der Tibia zu verhindern und damit die Gefahr von Frakturen zu minimieren oder ein Verbiegen des Marknagels zu vermeiden (Regauer et al., 2005). Sarkar et al. verwendeten ebenfalls einen Marknagel zur Abstützung eines 25 mm großen Defektes. Zur weiteren Stabilisierung wurde die osteotomierte Tibia hier zusätzlich noch mit einer Stahlplatte fixiert (Sarkar, 2006).

Bei solchen Fixateur-externe-Osteosynthesen und bei unaufgebohrter Marknagelung handelt es sich um relativ flexible Osteosynthesen. Dabei besteht aufgrund der mechanischen Instabilität immer das Risiko der Entstehung von hypertrophen Pseudarthrosen (Sarkar, 2006). Außerdem sind bei diesen Systemen die Schraubenbohrungen sehr weit proximal und distal am Röhrenknochen. Dort sind die Markräume weiter und die Kortikalis wird dünner, was dazu führt, dass der Knochen weniger belastbar ist. In der vorliegenden Studie wurde deshalb eine winkelstabile Plattenosteosynthese mit Titanplatten und Titanschrauben verwendet. Bei Plattenosteosynthesen sitzen die Schraubenbohrungen in der Diaphyse, wo die Kortikalis dicker ist und damit auch mehr Belastungswiderstand bietet. Zudem besteht durch die geringere freie Schraubenlänge bei der Plattenosteosynthese eine wesentlich höhere Stabilität als beim Fixateur externe, da die Stabilität mit zunehmenden Abstand zwischen Knochenoberfläche und Stabilisationselement exponentiell abnimmt (Sarkar, 2006).

Die meisten der oben aufgeführten Studien beschreiben zusätzliche Maßnahmen, wie das Aufhängen der Tiere in Schlingen, Tenotomien oder Kombination mehrerer Osteosynthesysteme zur Verhinderung von Frakturen des Knochens oder des Versagens des Fixationsmaterials. Dies zeigt, dass eine einfache Fixierung mit nur einem Osteosynthesystem allein meist nicht ausreichend ist, um eine genügend große Stabilität der osteotomierten Tibien zu garantieren. So wurde auch in dieser Studie als zusätzliche unterstützende Maßnahme jedem Schaf ein Fiberglas-Cast während des gesamten Versuchszeitraums an die operierte Gliedmaße angelegt. Eine solche Fragmentschienung über dem Weichteilmantel führt bei Muskelkontraktion zu einem erhöhten Weichteildruck. Dies wiederum verringert die Fragmentbewegung unter Belastung (Sarkar, 2006).

Da bei allen Schafen dieses Versuchs nur sehr geringe Knochenresorption an den Defekträndern und keine Osteolysen an den Schraubenein- und austrittslöchern in der Kortikalis auftraten, kann auf eine gute Stabilität der Osteosynthese und ausreichende Bewegungsruhe im Defekt geschlossen werden.

Während des gesamten Implantationszeitraums von 14 Wochen wurde *intra vitam* alle zwei Wochen ein Heilungsmonitoring mittels Aktivitätsmessungen und Messungen der Bodenreaktionskräfte parallel zu Röntgenverlaufskontrollen durchgeführt. Um Vergleichswerte zu erhalten wurden zusätzlich *prae operationem* jeweils die gleichen Messungen ohne und mit Cast durchgeführt. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen waren nicht zu erkennen. Auch konnte kein Zusammenhang der Höhe der Aktivität und der Belastung der operierten Gliedmaße in Abhängigkeit von den einzelnen Materialgruppen festgestellt werden. Der *prae operationem* beobachtete starke Aktivitätsanstieg nach Anlegen des Casts ist auf einzelne Tiere zurückzuführen, die auf das Anlegen des Casts zunächst über die gesamte *prae operative* Gewöhnungszeit hinweg mit Abwehr-

bzw. Schüttelbewegungen der rechten Hintergliedmaße reagierten. Post operationem akzeptierten jedoch auch diese Tiere den Cast ebenso problemlos, wie alle anderen Schafe dieser Studie. In anderen Studien konnte zwar über die Messung der Bodenreaktionskräfte erfolgreich ein Monitoring des Knochenheilungsverlaufs durchgeführt werden, jedoch wurden hier keine zusätzlichen äußeren Fixierungsmaßnahme, wie das Anbringen eines Casts, durchgeführt (Duda et al., 1998; Seebeck et al., 2005).

## **5.2 Eignung der Knochenersatzmaterialien**

In dieser Arbeit wurden Kompositmaterialien aus Polymeren (PCL und PLA) mit einem keramischen Anteil ( $\beta$ -TCP bzw. Bioglas G5) getestet. Derartige Materialkombinationen können eindeutige Vorteile gegenüber den Einzelkomponenten haben und zeigen auf der Suche nach einem möglichst idealen Knochenersatzmaterial ein vielversprechendes Potential. Es können zum Beispiel die mechanischen Eigenschaften und die Biokompatibilität verbessert werden (Causa, 2006; Lam, 2008; Lowry et al., 1997; Shikunami, 1999). Im Folgenden werden die Ergebnisse der biomechanischen, histologischen und röntgenologischen Untersuchungen an den Tibiadefekten mit den implantierten Materialien diskutiert.

### **5.2.1 $\beta$ -Trikalziumphosphat ( $\beta$ -TCP)**

Poröse hohlzylindrische Formkörper aus phasenreinem  $\beta$ -TCP wurden in dieser Studie als Referenzmaterial eingesetzt. Dieses Material findet bereits klinisch als Knochenersatzwerkstoff zur Defektauffüllung Verwendung (Übersicht in (Damien, 1991; Frauendorf, 2007)). Vorteile von Trikalziumphosphaten sind ihre gute Biokompatibilität und ihre guten osteoinduktiven Eigenschaften. Sie gehen eine sehr enge Bindung mit dem Knochen ein und bilden einen festen osteoimplantären Verbund. Dieses keramische Material degradiert eher langsam. Dadurch kann es

vorkommen, dass Materialreste komplett in Knochen eingebaut werden, ohne weiter abgebaut zu werden (Übersicht in (Damien, 1991; Epple, 2007)). Da Trikalziumphosphate sehr brüchig sind, ist die Gesamtstabilität des Material-Knochen-Verbundes geringer als die des ursprünglichen, gesunden Knochens (Boyan et al., 1996). Auf Grund ihrer Brüchigkeit sind Keramiken daher nicht für belastete Implantatlager geeignet (Epple, 2007).

Die in der Literatur aufgeführten Vor- und Nachteile von TCP konnten in dieser Arbeit für das eingesetzte  $\beta$ -TCP bestätigt werden.

In der Versuchsgruppe mit dem implantierten Referenzmaterial ( $\beta$ -TCP) war bei der histologischen Untersuchung keine Entzündungsreaktion zu finden. Nur gelegentlich traten vereinzelte Fremdkörperriesenzellen auf. Das eingesetzte Material wies also eine gute Biokompatibilität auf. Auch waren Knochen und Material kaum durch Bindegewebe voneinander getrennt, wie es bei den beiden Polymerkompositgruppen der Fall war. Wiltfang et al. und Lu et al. implantierten in ihren Studien  $\beta$ -TCP in Kaninchenknochen. Beide konnten ebenfalls keine Entzündungsreaktion bzw. kaum Makrophagen um das Restmaterial beobachten (Lu et al., 1998; Wiltfang et al., 2002). In einer Arbeit von Bodde et al. konnte dies auch bestätigt werden. Hier wurden  $\beta$ -TCP-Implantate im Schafsfemur getestet und es ergab sich eine gute Biokompatibilität mit geringer zellulärer Reaktion auf das Material (Bodde et al., 2007).

In den histologischen Präparaten war erkennbar, dass es bei den  $\beta$ -TCP-Implantaten im Gegensatz zu den beiden Polymerkompositmaterialien zum Einwachsen von neugebildetem Knochen in das Implantat kam. Es war vergleichsweise viel Knochen bei gleichzeitig sehr gutem Material-Knochen-Kontakt eingewachsen. An den meisten Stellen war eine gute Osseointegration des Materials erfolgt. Das Referenzmaterial wies somit wesentlich bessere osteokonduktive und

osseointegrative Eigenschaften auf, als die getesteten Polymerkompositmaterialien. Einen guten Material-Knochen-Kontakt bei  $\beta$ -TCP-Implantaten in Kaninchenknochen konnten Lu et al. ebenfalls feststellen.  $\beta$ -TCP wies hier eine bessere Knochenregeneration als HA auf (Lu, 1998). Santos et al. stellten *in vitro* zwar für  $\beta$ -TCP einen initial negativen Effekt der Oberflächenchemie auf die Zelladhäsion fest, anschließend kam es jedoch zu einem positiven Effekt auf die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten (dos Santos et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit ergab die biomechanische Auswertung Biegesteifigkeiten für die mit  $\beta$ -TCP-Implantaten aufgefüllten Defekte, die immer noch weit unter denen von intakten, gesunden Knochen lagen. Dies ist darin zu begründen, dass die kortikalen Defektareale nicht zu 100 % mit neugebildetem Knochen ausgefüllt waren. Durch die Brüchigkeit des verbleibenden Materials wurde die Gesamtstabilität unter die Stabilität von intaktem Knochen herabgesetzt. Die Brüchigkeit des Materials war in den Verlaufsrontgenbildern gut zu erkennen. In den implantierten Formkörpern traten schon zwei Wochen *post operationem* deutliche Risse auf. Das Material zerfiel in kleinere Fragmente. In den Röntgenbildern *post mortem* war außerdem bei fünf von acht Tibien eine externe Kallusbildung auf der lateralen, plattenfernen Defektseite zu finden. Diese Beobachtung spiegelt sich ebenfalls in den Ergebnissen der biomechanischen Vier-Punkt-Biege-Prüfung wieder. Es konnten in erster Linie nur die Tiere gemessen werden, die auch in den röntgenologischen Kontrollen eine mineralisierte Kallusformation aufwiesen. In der Gruppe mit  $\beta$ -TCP-Implantaten waren sechs von acht Tieren biomechanisch testbar. Bei zwei Tieren dieser Gruppe war keine ausreichende Stabilität vorhanden, so dass keine Biegeprüfung durchgeführt werden konnte. Eine solche externe Kallusbildung auf der lateralen plattenfernen Defektseite beschrieben auch Gugala et al.. Hier war ein Defekt kritischer Größe in der Schafstibia gesetzt worden. Als Begründung für das

vorliegende Verteilungsmuster von neugebildeten Knochen führten Gugala et al. die bessere Weichteilabdeckung und damit auch bessere Vaskularisation auf der lateralen Defektseite an. Medial war der Defekt lediglich von Haut abgedeckt (Gugala, 1999).

Mit Hilfe der fluoreszenzhistologischen Untersuchung konnten die Knocheneindringtiefen von den Osteotomiekannten ausgehend in den Defekt hinein zu verschiedenen Zeitpunkten im Implantationszeitraum ermittelt werden. Auch hier konnte das oben bereits diskutierte Verteilungsmuster von neugebildetem Knochen im Defekt bestätigt werden. Der Fluoreszenzfarbstoff Calceingrün wurde den Schafen in der vierten Woche *post operationem* und Tetracyclin in der achten Woche *post operationem* injiziert. Es war jedoch kaum calceingrüngefärbter Knochen im Defekt zu finden. Gelber durch Tetracyclin gefärbter Knochen war dagegen in größeren Mengen in der Referenzgruppe ( $\beta$ -TCP) erkennbar. Deshalb kann man darauf schließen, dass eine Knochenneubildung im Defektbereich bei allen Gruppen erst nach der vierten Woche erfolgte. Dies bestätigte sich auch in den Röntgenverlaufskontrollen. Hier war ab der sechsten bis zur achten Woche in einigen Defekten eine deutliche Zubildung von mineralisierten Geweben erkennbar. Auch bei der Messung der Knocheneindringtiefen in den Defekt war das meiste Wachstum zwischen der achten und der 14. Woche zu sehen. Dabei war der Knochen lateral am weitesten in den Defekt bzw. das Referenzmaterial ( $\beta$ -TCP) eingedrungen, was wie oben beschrieben wahrscheinlich mit der besseren Weichteilabdeckung auf der lateralen Defektseite zusammenhängt.

Obwohl Keramiken in der Literatur als eher relativ langsam degradierende Materialien beschrieben werden (Übersicht in (Epple, 2007)), zeigte sich bei den  $\beta$ -TCP-Implantaten dieses Versuchs ein wesentlich stärkerer Materialabbau über den Versuchszeitraum hinweg als bei den beiden getesteten

Polymerkompositmaterialien. Dies ist damit zu begründen, dass es sich zum Beispiel beim PCL um ein semikristallines Polymer handelte, das ebenfalls sehr lange Degradationszeiten hat, die anscheinend die des reinen  $\beta$ -TCP noch übersteigen. Auch in der Studie von Wiltfang et al. waren bei  $\beta$ -TCP-Implantaten in spongiösen Tibiaknochen bei Kaninchen relativ kurze Degradationszeiten feststellbar. Bereits nach 6 Wochen waren 60 % des Materials degradiert. Nach 68 Wochen waren 90 - 95 % des  $\beta$ -TCP aufgelöst und zu Knochen transformiert (Wiltfang, 2002). Lu et al. und Bodde et al. stellten in ihren Studien an Kaninchen- bzw. an Schafsknochen ebenfalls eine gute Biodegradation für  $\beta$ -TCP-Implantate im Vergleich zu HA- bzw. HA/ $\beta$ -TCP-Implantaten fest (Bodde, 2007; Lu, 1998).

Da  $\beta$ -TCP klinisch oft als keramisches Knochenersatzmaterial eingesetzt wird und es, wie dieser Versuch bestätigen konnte, eine gute Osseointegration bzw. Osteokonduktion und Biokompatibilität aufwies, war das Material als Referenzmaterial für diese Studie gut geeignet. Die starke Brüchigkeit und die daraus resultierende mechanische Instabilität stellen jedoch einen nicht zu unterschätzenden Nachteil des Materials dar. Dadurch ist dieses Material nicht optimal für das Auffüllen von belasteten Defekten geeignet.

### 5.2.2 Polycaprolacton/ $\beta$ -Trikalziumphosphat (PCL/TCP)

Polymere wie Polycaprolactone weisen eine wesentlich höhere Elastizität als Keramiken auf, was eine geringe Steifigkeit und niedrigere mechanische Belastbarkeit zur Folge hat (Bendix, 1998; Epple, 2007). Da natürlicher Knochen gleichzeitig hart und elastisch ist, stellen Mischungen aus Polymeren und Keramiken eine gute Kombinationsmöglichkeit dar. Die Keramik erhöht die Steifigkeit des Polymers und das Polymer setzt die Brüchigkeit der Keramik herab. Dies soll bei einem geeigneten Mischungsverhältnis der Kompositbestandteile zu optimalen

mechanischen Eigenschaften führen, die den natürlichen Knochen imitieren (Boyan, 1997; Epple, 2007). In *in vitro* Versuchen zeigten Causa et al., dass die schlechten mechanischen Eigenschaften des Polymers PCL durch den Zusatz der Keramik HA wesentlich verbessert werden konnten (Causa, 2006). Auch Lam et al. konnten bei Kompositen aus PCL und  $\beta$ -TCP gesteigerte mechanische Eigenschaften durch die Inkorporation der Keramik feststellen (Lam, 2008). Defizite beider Materialgruppen können also durch Kombination gegenseitig ausgeglichen werden.

Die Degradationszeit von Polymeren hängt laut Literatur von ihrem Kristallinitätsgrad ab. Bei Polycaprolacton handelt es sich um ein semikristallines Material, das Degradationszeiten von ca. zwei Jahren aufweist (Übersicht in (Middleton, 2000)). Durch die Kombination des Polymers mit Trikalziumphosphat kann die Degradationszeit günstig beeinflusst werden (Lam, 2008). Die PCL/TCP-Implantate in der vorliegenden Studie wiesen bei der quantitativen histologischen Auswertung eine geringere Degradation über den Implantationszeitraum auf als das Referenzmaterial ( $\beta$ -TCP). Dies ist mit den in der Literatur beschriebenen langen Degradationszeiten für PCL zu begründen (Bos, 1991; Rozema, 1990). Durch die Kombination mit keramischen Materialien soll die Degradation verbessert werden (Verheyen, 1992). So verlief in einem *in vivo*-Versuch von Lam et al. die Degradation von reinen PCL-Implantaten langsamer als bei Kompositen aus PCL und  $\beta$ -TCP (Lam, 2008). Möglicherweise war das Mischungsverhältnis des Polymeranteils und des  $\beta$ -TCP-Anteils in den Kompositen in der vorliegenden Studie nicht optimal. Die Degradation erfolgt laut Literatur bei dem Polymer PCL in erster Linie durch hydrolytische Spaltung (Domb, 2002). Erst zu späteren Zeitpunkten tritt auch ein Abbau auf zellulärem Wege über Phagozytose auf (Boyan, 1997). In der vorliegenden Arbeit waren bei der qualitativen histologischen Auswertung bereits nach 14 Wochen hauptsächlich phagozytierende Fremdkörperriesenzellen und

Makrophagen in den Polymerkompositen zu finden. Diese Zellen sind wahrscheinlich schon zu einem früheren Zeitpunkt mit der Entzündungsreaktion eingewandert. Diese kann durch hydrolytische Spaltung der Polymeranteile und der daraus resultierenden Freisetzung der sauren Abbauprodukte entstehen.

Die sauren Abbauprodukte können zu lokalen Entzündungsreaktionen führen (Bendix, 1998). Durch die Kombination mit einer Keramik wie Trikalziumphosphat kann jedoch das entstehende saure Milieu abgepuffert werden, wodurch das gesamte Material eine gute Biokompatibilität erhält (Boyan, 1997; Hutmacher, 2000). In der vorliegenden Studie war der Keramikanteil ( $\beta$ -TCP) beim PCL/TCP nicht in der Lage die sauren Polymerabbauprodukte ausreichend abzupuffern, um eine solche lokale Abwehrreaktion zu vermeiden. Lam et al. implantierten in sechs New Zealand White Kaninchen Materialien aus reinem PCL und Komposite aus PCL und  $\beta$ -TCP subkutan, intramuskulär und in einen kritischen Defekt im Kalvarienmodell. Die Implantate zeigten in allen drei Implantatlagern eine gute Biokompatibilität. Auch nach zweijähriger Implantationszeit war keine Entzündungsreaktion im Kalvarienmodell festzustellen (Lam, 2008). Lowry et al. implantierten in Kaninchenhumeri intramedulläre Pins aus PCL und Bioglas. Auch hier war nur eine minimale Entzündungsreaktion feststellbar (Lowry, 1997).

Die Angaben aus der Literatur zur Biokompatibilität von PCL-Keramik-Kompositen konnten im vorliegenden Versuch für die eingesetzten PCL/TCP-Implantate nicht belegt werden (Übersicht in (Boyan, 1997; Hutmacher, 2000; Lam, 2008)). Ein Grund hierfür kann zum Beispiel ein abweichendes Versuchsdesign sein. So verwendeten Lam et al Kaninchen, deren Knochenregeneration wesentlich schneller abläuft als bei Schafen. Auch handelte es sich um nicht belastete Defekte und möglicherweise war das Mischungsverhältnis zwischen dem Polymer und der Keramik, die Porosität und die chemischen Eigenschaften der Komposite abweichend von denen, die in der

vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden. Das kann besonders Einfluss auf die Biokompatibilität haben (Lam, 2008). Die Entzündungszellen waren allerdings nur in unmittelbarem Kontakt zum Material zu finden waren, nicht jedoch außerhalb des Implantats oder in der Defektumgebung. Die in den PCL/TCP-Implantaten vorhandenen Entzündungszellen waren in Bindegewebe eingebettet. Es kam aber nicht zu einer Abkapselung des Materials gegenüber der Umgebung. Stellenweise war ein direkter Knochen-Material-Kontakt zu finden. Die Inflammation verhinderte die vollständige Osseointegration, also das Einwachsen von neuem Knochen in die Poren des Materials. Außerdem wurde durch die Entzündungsreaktion die Osteoklastenaktivität gesteigert und somit der Aufbau neuen Knochens in diesen Bereichen vermindert (Arnett und Dempster, 1986; Lorenzo et al., 2008). Die mittelgradigen Entzündungsanzeichen in den Defekten mit dem Polymerkompositmaterial PCL/TCP in dieser Studie lassen auf eine mangelnde Biokompatibilität dieser Materialien schließen.

Durch den Zusatz einer Keramik zum Polymer kann die Bioaktivität der Oberfläche erhöht werden und das gesamte Material erhält gute osteokonduktive Eigenschaften, die eine Osseointegration begünstigen (Causa, 2006). Eine Osseointegration bei dem in der vorliegenden Studie eingesetzten Polymerkompositmaterial war jedoch kaum gegeben. Dies kann damit zusammenhängen, dass es bei Kompositen aus Polymeren und keramischen Material eine Rolle spielt, in welchem Ausmaß die Keramik an der Implantatoberfläche freiliegt und für Zellen erreichbar ist. Da Keramiken sehr gute osteokonduktive Eigenschaften haben, fördert ein hoher Anteil von keramischem Material an der Oberfläche die Adhäsion von Zellen. Causa et al. konnten *in vitro* bei einem Komposit aus PCL und HA eine höhere Osteokonduktivität gegenüber dem reinen Polymer feststellen (Causa, 2006). Verheyen et al. zeigten, dass bei einer Kombination eines Polymers mit der Keramik HA, der keramische

Anteil die Knochenbindungsfähigkeit des Materials erhöhte (Verheyen, 1992). Außerdem konnten Zerbo et al. in einer Studie feststellen, dass durch TCP-Partikel die Migration von Osteoprogenitorzellen in Poren des Materials gefördert wird (Zerbo et al., 2005). Bei einem zu geringen Anteil freiliegenden keramischen Materials haben die Zellen kaum Möglichkeit sich an das Material anzuheften und den Leitschieneneffekt zum Einwachsen in das Implantat zu nutzen. Das Einwachsen von Knochengewebe wird also verzögert. Bei dem in dieser Studie eingesetzten Komposit aus dem Polymer PCL und der Keramik  $\beta$ -TCP war möglicherweise ein zu geringer Anteil an  $\beta$ -TCP an der Implantatoberfläche exponiert, was zu einer verminderten Knochenbindungsfähigkeit des Materials führte. Die Osteokonduktivität des Implantates war somit zu gering. Dies bestätigte sich in den Ergebnissen der quantitativen Histologie. Hier waren in der PCL/TCP-Gruppe signifikant geringere Mengen an neugebildeten Knochen im Defekt bzw. im Material zu finden als in der Referenzgruppe ( $\beta$ -TCP). Die Messung der Knocheneindringtiefen von den Osteotomiekannten ausgehend in den Defekt hinein zu verschiedenen Zeitpunkten mittels fluoreszenzhistologischer Untersuchung konnte die quantitativ histologischen Beobachtungen über die Menge an neugebildeten Knochen im Defekt bestätigen. Wie auch in der Referenzgruppe ( $\beta$ -TCP) war in den PCL/TCP-Implantaten kaum calceingrüngefärbter Knochen (Injektion 4 Wochen *post operationem*) im Defekt vorhanden. Im medialen kortikalen Defektbereich war in der PCL/TCP-Gruppe in geringen Mengen durch Tetracyclin gefärbter Knochen (Injektion nach 8 Wochen *post operationem*) zu finden. Somit kann man darauf schließen, dass eine Knochenneubildung bei den PCL/TCP-Implantaten, wie auch bei den  $\beta$ -TCP-Implantaten im Defektbereich hauptsächlich zwischen der achten und 14. Woche erfolgte. Insgesamt war der neugebildete Knochen am weitesten in die  $\beta$ -TCP-Implantate und nur wenig in die Polymerkompositimplantate eingedrungen. Das lässt

ebenfalls auf die geringere Osteokonduktivität der eingesetzten Komposite schließen. Dies bestätigten auch die Röntgenverlaufskontrollen. Hier war ab der sechsten bis zur achten Woche *post operationem* in zwei von sieben Defekten eine deutliche Zubildung von mineralisierten Geweben erkennbar. Bei den restlichen Tieren in der PCL/TCP-Gruppe war jedoch im Verlauf des Versuchs keine Neubildung von mineralisierten Gewebe im Defektbereich zu finden. Lediglich bei zwei von sieben Tieren war eine Kallusbildung erkennbar. Diese war nur auf der lateralen plattenfernen Seite des Defektes zu finden. Wie auch beim Referenzmaterial ( $\beta$ -TCP) lässt sich das mit der besseren Weichteilabdeckung und Vaskularisation auf der lateralen Seite erklären. Deutlich erkennbar war hier, dass das neugebildete mineralisierte Gewebe um das implantierte Polymerkomposit herum, jedoch nicht in das Implantat hinein gewachsen war. Dies lässt ebenfalls auf schlechte osteokonduktive und osseointegrative Eigenschaften des Materials schließen.

Bei der Messung der Mineraldichte und des mineralisierten Volumens im Defekt mittels Computertomographie war kein Vergleich der PCL/TCP-Gruppe mit der Referenzgruppe ( $\beta$ -TCP) möglich, da das Referenzmaterial ( $\beta$ -TCP) und neugebildeter Knochen im Defekt die gleichen Dichtewerte bzw. Graustufen aufwiesen. Es konnte hier lediglich ein Vergleich zwischen der Polymerkompositgruppe (PCL/TCP), sowie der im Versuch zusätzlich operierten Tibia ohne eingesetztes Implantat erfolgen. Hier ergaben sich ähnliche Werte für den implantatfreien Defekt und die Defekte mit PCL/TCP-Implantaten, woraus sich schlussfolgern lässt, dass das implantierte Material keine Verbesserung der Defektüberbrückung in einem Defekt kritischer Größe am Röhrenknochen gegenüber implantatfreien Defekten bewirkte. Die Beobachtungen zur Kallusbildung, die Menge an mineralisierten Gewebe und die Mineraldichte des Gewebes im Defekt mittels

Röntgen und CT spiegeln sich in den Ergebnissen der biomechanischen Vier-Punkt-Biege-Prüfung wieder. Es zeigten sich an den operierten Tibien signifikante Unterschiede zwischen der Polymerkompositgruppe (PCL/TCP) und der Referenzgruppe ( $\beta$ -TCP). Es konnten nur die Tiere gemessen werden, die auch im Röntgenbild eine mineralisierte Kallusformation aufwiesen. In der PCL/TCP-Gruppe waren daher nur zwei von sieben Tibien testbar. Die gemessenen Werte der Steifigkeit im Defekt lagen in der Referenzgruppe wesentlich höher als in der Polymerkompositgruppe. Diese Ergebnisse bestätigen auch die histologischen Beobachtungen.

### 5.2.3 Poly (L-DL-lactid)/ Kalziumphosphat-Glas (PLA/G5)

Ebenso wie die oben beschriebenen Polycaprolactone zeigen auch Poly (L-DL-lactide) eine höhere Elastizität und geringere Steifigkeit als Keramiken (Bendix, 1998; Epple, 2007). Auch hier können durch die Kombination von Keramiken mit Polylactiden die mechanischen Eigenschaften wesentlich verbessert werden (Boyan, 1996; Epple, 2007). Sowohl Ignatius et al. als auch Shikinami und Okuno konnten bei Kompositen aus PLA und  $\alpha$ -TCP bzw. HA eine höhere mechanische Stabilität gegenüber den Einzelbestandteilen feststellen (Ignatius, 2001a; Shikinami, 1999). Die mechanische Stabilität wird allerdings ebenfalls von den Porengrößen und der Gesamtporosität des Materials beeinflusst. Für die PLA/G5-Implantate der vorliegenden Studie sind Porengrößen von 10 – 350  $\mu\text{m}$  bei einer Gesamtporosität von 90 – 95 % angegeben. Eine höhere Gesamtporosität hat eine geringere mechanische Belastbarkeit des Implantats zur Folge (Ignatius et al., 2001c; Lu et al., 1999).

Die Degradationszeit von Polymeren wie PLA kann durch die Kombination mit keramischem Material günstig beeinflusst werden. Bei reinen PLA-Implantaten

dauert der Abbau sehr lange. Claes et al. beschrieb in einer *in vitro* Studie eine vollständige Degradation von Pins aus Poly(L, DL-lactid) nach 24 Monaten (Claes et al., 1996). Auch Rozema konnte 1990 feststellen, dass der Abbau von implantierten PLLA-Proben im knöchernen Orbitalboden bei Ziegen sehr lange (ca. 3,5 Jahre) dauerte (Rozema, 1990). Ebenso wie bei den vorn beschriebenen Polycaprolactonen erfolgt die Degradation von Polylactiden in erster Linie durch hydrolytische Spaltung und zu späteren Zeitpunkten auch auf zellulärem Wege (Boyan, 1997; Domb, 2002). Shikinami und Okuno konnten bei Kompositen aus PLA und HA zeigen, dass diese Komposite hauptsächlich einer Degradation auf hydrolytischem Wege und in geringerem Maße der Phagozytose unterlagen. Die Degradation war von der Implantatgröße und -dicke, sowie vom Implantatlager abhängig (Shikinami, 1999). Bos et al. zeigten bei subkutaner Implantation von PLA-Proben in Ratten, dass diese initial durch autokatalytische Hydrolyse degradieren. Später erfolgte die Beseitigung von verbleibendem Material durch phagozytäre Aktivität von Makrophagen (Bos, 1991). Wie auch bei den PCL/TCP-Implantaten waren in der vorliegenden Arbeit innerhalb der ersten 14 Wochen nach der Implantation phagozytierende Zellen in den Implantaten zu finden. Wahrscheinlich waren hier zu Beginn saure Abbauprodukte durch hydrolytische Spaltung des Materials freigesetzt worden, die in kurzer Zeit zu der zu beobachtenden starken zellulären Entzündungsreaktion mit Fremdkörperriesenzellen und Makrophagen führten.

Das saure Entzündungsmilieu, sowie eine histologisch deutlich erkennbare bindegewebige Abkapselung der Implantate führten in der vorliegenden Studie zu einer Verhinderung eines direkten Knochen-Material-Kontakts. Es kam nicht zu einer Osseointegration, obwohl in der Literatur eine Verbesserung der Osteokonduktion und Osseointegration durch die Kombination von Polymeren mit Keramiken beschrieben wird (Verheyen, 1992).

Die lokale Entzündungsreaktion durch saure Abbauprodukte kann auch bei dem Polymer Polylactid durch Beimischung eines keramischen Materials vermindert bzw. verhindert werden, wodurch die Biokompatibilität des Materials gesteigert wird (Athanasίου, 1998; Bendix, 1998; Boyan, 1997; Ignatius et al., 2001b). Dennoch kam es in einigen Studien im Zusammenhang mit Kompositen aus PLA und einem keramischen Anteil zu lokalen Entzündungsreaktionen. Bergsma et al. berichteten von adversen Gewebereaktionen und plötzlicher Entzündung *in vivo*. Diese wurde durch die rapide Freisetzung von Oligomeren und Karboxylsäure bei der Degradation von PLA-Platten und -Schrauben verursacht (Bergsma, 1993; Bergsma, 1995). Ignatius et al. implantierten in die Tibien von Schafen Polymerkompositmaterialien aus  $\alpha$ -TCP und PLA mit interkonnektierendem Porensystem. Nach einem Zeitraum von 24 Monaten war auch hier eine starke Entzündungsreaktion festzustellen. Dies stand im Zusammenhang mit der Degradation und den dabei entstehenden Kristallen und sauren Abbauprodukten des Polymeranteils (PLA) (Ignatius, 2001a). In den Defekten mit PLA/G5-Implantaten im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten Entzündungszellen (Fremdkörperriesenzellen und Makrophagen) als Zeichen einer hochgradigen Abstoßungs- und Entzündungsreaktion nachgewiesen werden. Diese Entzündungszellen waren ebenso wie beim PCL/TCP nur in unmittelbarem Kontakt zum Material zu finden. Zusätzlich waren die PLA/G5-Implantate durch eine deutliche Bindegewebsschicht vom angrenzenden Knochen abgekapselt, was auf ein chronisches Entzündungsgeschehen hindeutet. Der höhere Anteil an Fremdkörperriesenzellen in den PLA/G5-Implantaten gegenüber den PCL/TCP-Implantaten ist möglicherweise auf die höhere Gesamtporosität des PLA/G5 zurückzuführen. Dadurch bot dieses Material zu Beginn des Implantationszeitraums eine größere relative Oberfläche, die der hydrolytischen Spaltung zugänglich war und es konnten in kürzerer Zeit mehr saure Abbauprodukte freigesetzt werden. Das

wiederum führte zu einer stärkeren Entzündungsreaktion mit vermehrtem Einwandern von Fremdkörperriesenzellen und Makrophagen. Die hochgradigen Entzündungsanzeichen in den PLA/G5-Implantaten lassen ebenso wie bei den PCL/TCP-Implantaten auf eine mangelnde Biokompatibilität dieses Materials schließen.

In der vorliegenden Studie ergaben sich bei der quantitativen histologischen Auswertung medial direkt unter der Osteosyntheseplatte relativ hohe prozentuale Anteile von eingewachsenem Knochen in der Gruppe mit den PLA/G5-Implantaten. Dieses Phänomen war auch in den *post mortalen* Röntgenbildern gut erkennbar und trat nur in der PLA/G5-Gruppe auf. Möglicherweise ist das mit der vergleichsweise geringen Steifigkeit und hohen Elastizität des Materials im Vergleich zu den PCL/TCP- und den  $\beta$ -TCP-Implantaten zu begründen. Die PLA/G5-Implantate ließen sich leichter aus dem Defektbereich unter der Platte durch vom Defektrand einwachsendes Gewebe in den Markraum verdrängen. Die Titanplatte wirkte hier, im Gegensatz zum eigentlichen Implantat als Leitschiene. Im Gegensatz zu den beiden anderen Versuchgruppen war bei keiner einzigen der acht Tibien mit PLA/G5-Implantaten eine externe, plattenferne Kallusbildung zu erkennen. Auch zeigte sich in der PLA/G5-Gruppe im lateralen Kortikalisbereich innerhalb des Defektes keinerlei Einwachsen von mineralisiertem Gewebe. Dies wurde möglicherweise ebenso durch die starke zelluläre Entzündungsreaktion mit deutlicher bindegewebiger Abkapselung des Implantates verhindert. Durch die Bindegewebsschicht, die im Rahmen der Entzündungsreaktion die Implantate umgab, wurde das Einwachsen anderer Zellen und somit auch von Knochen in das Material verhindert. Das PLA/G5-Implantat war nicht in der Lage seine osteokonduktive Aufgabe zu erfüllen. Eine Bestätigung dafür fand sich auch in der Tibia, bei der der Defekt ohne Implantatauffüllung belassen wurde. Hier war ein ähnliches Wachstumsmuster mineralisierten Gewebes zu

beobachten: Bildung von mineralisiertem Gewebe unmittelbar unter der Osteosyntheseplatte und kaum mineralisiertes Gewebe im restlichen Defektbereich. Hier war kein Implantat als Leitschiene für das Einwachsen des Knochens vorhanden und der Defekt war als Defekt kritischer Größe zu groß, als dass Knochen von allein den Defekt überbrücken könnte.

Bei der fluoreszenzhistologischen Untersuchung der Knocheneindringtiefen in den Defekt konnte das oben bereits diskutierte Verteilungsmuster von neugebildeten Knochen im Defekt bestätigt werden. Auch in der PLA/G5-Gruppe erfolgte eine Knochenneubildung im Defektbereich ebenso wie in der PCL/TCP-Gruppe erst nach der vierten Woche. In den Röntgenverlaufskontrollen war ab der sechsten bis achten Woche in einigen Defekten unter der Osteosyntheseplatte eine Zubildung von mineralisiertem Gewebe erkennbar. Insgesamt war der neugebildete Knochen am weitesten in die  $\beta$ -TCP-Implantate und nur wenig in die Polymerkompositimplantate eingedrungen. Was wiederum auf eine mangelnde Osteokonduktivität der eingesetzten Komposite schließen lässt.

Die Messung der Mineraldichte und des mineralisierten Volumens mittel CT in den Defekten mit PLA/G5-Implantaten ergab ähnliche Werte, wie für die im Versuch zusätzlich operierte Tibia ohne Implantat. Dies führte zu dem Schluß, dass auch hier ebenso wie bei den PCL/TCP-Implantaten durch den Komposit-Einsatz keine Verbesserung der Defektüberbrückung gegenüber implantatfreien Defekten bewirkt werden konnte.

Bei der biomechanischen Vier-Punkt-Biegeprüfung in der PLA/G5-Gruppe waren nur zwei von acht Tibien testbar. Auch bei diesem Polymerkompositmaterial zeigten sich signifikante Unterschiede zu dem Referenzmaterial ( $\beta$ -TCP). Auch hier waren die gemessenen Werte der Steifigkeit im Defekt wesentlich geringer als bei den Referenz-Implantaten ( $\beta$ -TCP). Diese Ergebnisse werden durch die Beobachtungen

in der Histologie, bei den Röntgenkontrollen und sowohl bei der Messung der Mineraldichte, als auch des mineralisierten Volumens im Defekt bestätigt. Durch die oben beschriebene Entzündungsreaktion mit bindegewebiger Abkapselung und die schlechten osteokonduktiven Eigenschaften der PLAG5-Implantate wurde eine Knochenneubildung in den Defekten vermindert, was wiederum zu einer signifikant geringeren biomechanischen Steifigkeit gegenüber dem Referenzmaterial ( $\beta$ -TCP) führte. Ignatius et al. zeigten bei Polymerkompositmaterialien aus  $\alpha$ -TCP und PLA in Schafstibien ebenfalls, dass sich biomechanische Eigenschaften während der Defektheilung im Zusammenhang mit einer Entzündungsreaktion verschlechtern (Ignatius, 2001a).

## **5.5 Ausblick**

Da beide Komposit-Materialien gegenüber dem klinisch eingesetzten Referenzmaterial  $\beta$ -TCP keine Vorteile aufwiesen, sind sie in der vorliegenden Form nicht für den klinischen Einsatz geeignet. Veränderungen im Mischungsverhältnis der Kompositbestandteile, der chemischen Eigenschaften der Polymeranteile, der Oberflächeneigenschaften und der Porengrößen bzw. Porositäten der Implantate könnten zu einer Optimierung bezüglich der Biokompatibilität, Osseointegration, Biodegradation und biomechanischen Eigenschaften führen.

## 6. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Studie war es, zwei neue makroporöse Polymerkomposite als Knochenersatzstoffe *in vivo* zu untersuchen. Dabei handelte es sich zum einen um Implantate aus dem Polymer Polycaprolakton in Kombination mit der Keramik  $\beta$ -TCP und zum anderen um Implantate aus dem Polymer Polylactid in Kombination mit einem Bioglasanteil. Bei beiden Polymerkompositmaterialien sollte die Kombination mit dem keramischen Anteil für optimale biomechanische Eigenschaften, Biokompatibilität, Osteokonduktivität und Degradation sorgen. Als Referenzmaterial wurden in einer dritten Versuchsgruppe Formkörper aus  $\beta$ -TCP implantiert.

Die Materialien lagen in hohlzylindrischer Form (Außendurchmesser 20 mm, Innendurchmesser 7,5 – 10 mm; Höhe 20 mm) vor und wurden in 20 mm große diaphysäre Defekte in Schafstibien implantiert. Eine Fixierung der osteotomierten Tibien erfolgte mittels winkelstabiler Plattenosteosynthese und eines zusätzlichen externen Casts über den gesamten Implantationszeitraum von 14 Wochen. Je Materialgruppe wurde eine Tierzahl von 7 - 8 Schafen verwendet.

Mit Hilfe histologischer Untersuchungen konnten Aussagen zur Biokompatibilität, Osteokonduktivität, Osseointegration und zur Degradation der Materialien getroffen werden. Die biomechanische Untersuchung (Vier-Punkt-Biegung) gab Aufschluss über die Steifigkeit (in  $\text{Nm}^2$ ) des neugebildeten Gewebes bzw. des osteoimplantären Verbunds im Defekt. Die Mineraldichte (in mg HA/ccm) und das Volumen mineralisierten Gewebes im Defekt wurden mittels peripherer quantitativer und  $\mu$ -Computertomographie evaluiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass beide Polymerkompositmaterialien keine Vorteile gegenüber dem eingesetzten Referenzmaterial aufwiesen. Keines der

beiden Implantate förderte die Knochenregeneration in einem Defekt kritischer Größe mit niedriger regenerativer Kapazität. Beide Materialien degradierten langsamer und zeigten eine geringere biomechanische Festigkeit im Defektbereich am Ende des Implantationszeitraumes als es bei der  $\beta$ -TCP-Gruppe der Fall war. Keines der untersuchten Materialien wies biomechanische Eigenschaften auf, die einen Einsatz in mechanisch belasteten Defekten ohne zusätzliche Stabilisierung ermöglichten. Auch waren bei den Komposit-Implantaten im Vergleich mit der Referenzgruppe wesentlich höhere lokale Entzündungsanzeichen zu finden. Keines der beiden implantierten Komposite war somit dem Referenzmaterial ( $\beta$ -TCP) bezüglich der Biokompatibilität, Osseointegration, Biodegradation und mechanischen Eigenschaften im Defektbereich überlegen.

Ohne Veränderungen bezüglich der chemischen Eigenschaften, der Oberflächeneigenschaften, der Porengrößen und Porositäten ist ein klinischer Einsatz der in dieser Arbeit untersuchten Polymerkompositmaterialien nicht möglich.

## 7. Summary

The aim of this study was to investigate the *in vivo* behavior of two different polymer composite implants. One of the materials consisted of polycaprolactone (PCL) combined with  $\beta$ -tri-calcium phosphate ( $\beta$ -TCP), and the other of poly (95/5DL) - lactid (PLA) combined with a bio-glas (G5). In both composites the combination of the polymer with a ceramic proportion was intended to improve the biomechanical properties, biocompatibility, osteoconductivity and degradation of the implants. Pure  $\beta$ -TCP implants were used as reference material.

The implants had a hollow cylindrical shape (outer diameter 20 mm, inner diameter 5 -7 mm, height 20 mm). These were implanted in a 20 mm mid-diaphyseal critical size defect in the right tibia of sheep. Fixation of the osteotomized tibiae was performed by a titanium locking plate. Post surgery an additional fiberglass cast was applied for the whole implantation period of 14 weeks. Each experimental group consisted of 7 – 8 sheep.

Histological evaluation was performed to assess the biocompatibility, osteoconductivity, osseointegration and degradation of the composites. To analyze the biomechanical properties, the bending stiffness (in  $\text{Nm}^2$ ) of newly formed bone and the implant-bone interconnection in the defect were tested. Mineral density (in  $\text{mg HA/cm}^3$ ) and the volume of newly formed bone in the defect were evaluated by peripheral quantitative computer tomography and  $\mu$ -Computertomography respectively.

The results of this study demonstrated that neither of the two composites tested (PCL/TCP and PLA/G5) promoted bone regeneration in critical size defects with a low regenerative capacity. PCL/TCP and PLA/G5 both led to less biomechanical

strength compared to the reference material ( $\beta$ -TCP). Both composites degraded slower and induced less new bone formation and greater inflammatory reaction than  $\beta$ -TCP. The two tested composite materials were not superior in comparison to the reference material ( $\beta$ -TCP), rather appeared to result in poorer healing.

A clinical application of the evaluated composite materials without any alterations in their chemical and surface properties, and the porosity is not recommended.

## 8. Literaturverzeichnis

- Albrektsson, T. und C. Johansson (2001). "Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration" Eur Spine J 10 Suppl 2(S96-101).
- Amecke, B., D. Bendix et al. (1992). "Resorbable polyesters: composition, properties, applications" Clin Mater 10(1-2): 47-50.
- Arcos, D., I. Izquierdo-Barba et al. (2009). "Promising trends of bioceramics in the biomaterials field" J Mater Sci Mater Med 20(2): 447-455.
- Arnett, T. R. und D. W. Dempster (1986). "Effect of pH on bone resorption by rat osteoclasts in vitro" Endocrinology 119(1): 119-124.
- Athanasίου, K. A., C. M. Agrawal et al. (1998). "Orthopaedic applications for PLA-PGA biodegradable polymers" Arthroscopy 14(7): 726-737.
- Auer, J. A., A. Goodship et al. (2007). "Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use" BMC Musculoskelet Disord 8(72).
- Bendix, D. und H. Liedke (1998). "Resorbierbare Polymere: Zusammensetzung, Eigenschaften und Anwendungen" Heft zu "Der Unfallchirurg" 265(3-10).
- Bergsma, E. J., F. R. Rozema et al. (1993). "Foreign body reactions to resorbable poly(L-lactide) bone plates and screws used for the fixation of unstable zygomatic fractures" J Oral Maxillofac Surg 51(6): 666-670.
- Bergsma, J. E., W. C. de Bruijn et al. (1995). "Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws" Biomaterials 16(1): 25-31.
- Bodde, E. W., J. G. Wolke et al. (2007). "Bone regeneration of porous beta-tricalcium phosphate (Conduit TCP) and of biphasic calcium phosphate ceramic (Biosel) in trabecular defects in sheep" J Biomed Mater Res A 82(3): 711-722.
- Bos, R. R., F. R. Rozema et al. (1991). "Degradation of and tissue reaction to biodegradable poly(L-lactide) for use as internal fixation of fractures: a study in rats" Biomaterials 12(1): 32-36.
- Boyan, B. D., T. W. Hummert et al. (1996). "Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response" Biomaterials 17(2): 137-146.
- Boyan, B. D., E. Nasatzky et al. (1997). "Bone graft substitutes" Current Opinion in Orthopedics
- Cancedda, R., P. Giannoni et al. (2007). "A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice" Biomaterials 28(29): 4240-4250.
- Carson, J. S. und M. P. Bostrom (2007). "Synthetic bone scaffolds and fracture repair" Injury 38 Suppl 1(S33-37).

- Causa, F., P. A. Netti et al. (2006). "Poly-epsilon-caprolactone/hydroxyapatite composites for bone regeneration: in vitro characterization and human osteoblast response" J Biomed Mater Res A 76(1): 151-162.
- Claes, L. E., A. A. Ignatius et al. (1996). "New bioresorbable pin for the reduction of small bony fragments: design, mechanical properties and in vitro degradation" Biomaterials 17(16): 1621-1626.
- Damien, C. J. und J. R. Parsons (1991). "Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications" J Appl Biomater 2(3): 187-208.
- Domb, A., N. Kumar et al. (2002). "Biodegradable Polymers as Drug Carrier Systems", in: *Polymeric Biomaterials* (Dumitriu, S. ed), pp 91 - 121, Marcel Dekker, Inc., New York.
- dos Santos, E. A., M. Farina et al. (2009). "Chemical and topographical influence of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate surfaces on human osteoblastic cell behavior" J Biomed Mater Res A 89(2): 510-520.
- Duda, G. N., K. Eckert-Hubner et al. (1998). "Analysis of inter-fragmentary movement as a function of musculoskeletal loading conditions in sheep" J Biomech 31(3): 201-210.
- Eitel, F., H. Seiler et al. (1981). "[Morphological examination of animal-experiment results: comparison with regeneration of the human bone-structure. II. Research results (author's transl)]" Unfallheilkunde 84(6): 255-264.
- Epple, M. (2007). "Biomimetic Bone Substitution Materials", in: *Handbook of Biomaterialization - Medical and Clinical Aspects* (Epple, M. B., Edmund ed), pp 81-95.
- Frauendorf, T. Z. S., Wolfgang Prof.Dr.med. (2007). "Knochenersatz in der zahnärztlichen Chirurgie" Implantologie Journal 4(
- Gerhart, T. N., C. A. Kirker-Head et al. (1993). "Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein" Clin Orthop Relat Res 293: 317-326.
- Gerngroß, H., C. Burri et al. (1982). "[Complications at removal sites of autologous cancellous bone transplants]" Aktuelle Traumatol 12(3): 146-152.
- Greenwald, A. S., S. D. Boden et al. (2001). "Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications" J Bone Joint Surg Am 83-A Suppl 2 Pt 2(98-103).
- Gugala, Z. und S. Gogolewski (1999). "Regeneration of segmental diaphyseal defects in sheep tibiae using resorbable polymeric membranes: a preliminary study" J Orthop Trauma 13(3): 187-195.
- Hallfeldt, K. K., H. Stutzle et al. (1994). "[Bridging long tibial shaft defects by partially demineralized bone matrix]" Unfallchirurg 97(10): 518-524.
- Hazzard, D. G., R. T. Bronson et al. (1992). "Selection of an appropriate animal model to study aging processes with special emphasis on the use of rat strains" J Gerontol 47(3): B63-64.

- Hollinger, J. O. und J. C. Kleinschmidt (1990). "The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials" J Craniofac Surg 1(1): 60-68.
- Hutmacher, D. W. (2000). "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage" Biomaterials 21(24): 2529-2543.
- Ignatius, A. A., O. Betz et al. (2001a). "In vivo investigations on composites made of resorbable ceramics and poly(lactide) used as bone graft substitutes" J Biomed Mater Res 58(6): 701-709.
- Ignatius, A. A., C. Schmidt et al. (2001b). "In vitro biocompatibility of resorbable experimental glass ceramics for bone substitutes" J Biomed Mater Res 55(3): 285-294.
- Ignatius, A. A., S. Wolf et al. (2001c). "Composites made of rapidly resorbable ceramics and poly(lactide) show adequate mechanical properties for use as bone substitute materials" J Biomed Mater Res 57(1): 126-131.
- Ishaug, S. L., G. M. Crane et al. (1997). "Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds" J Biomed Mater Res 36(1): 17-28.
- Karageorgiou, V. und D. Kaplan (2005). "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis" Biomaterials 26(27): 5474-5491.
- Kieswetter, K., Z. Schwartz et al. (1996). "The role of implant surface characteristics in the healing of bone" Crit Rev Oral Biol Med 7(4): 329-345.
- Kleinschmidt, J. C. und J. O. Hollinger (1992). "Animal Models in bone research", in: *Bone grafts and bone substitutes* (Habal, M. B. and A. Hari Reddi eds), pp 133 - 146, W. B. Saunders Co, Philadelphia.
- Klenke, F. M., Y. Liu et al. (2008). "Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo" J Biomed Mater Res A 85(3): 777-786.
- Knaepler, H., T. von Garrel et al. (1994). "Die allogene Knochentransplantation - eine aktuelle Standortbestimmung" Deutsches Ärzteblatt 15(
- Kon, E., A. Muraglia et al. (2000). "Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones" J Biomed Mater Res 49(3): 328-337.
- Lam, C. X., D. W. Hutmacher et al. (2008). "Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months in vitro and in vivo" J Biomed Mater Res A
- LeGeros, R. Z., J. R. Parsons et al. (1988). "Significance of the porosity and physical chemistry of calcium phosphate ceramics. Biodegradation-bioresorption" Ann N Y Acad Sci 523(268-271).
- Liebschner, M. A. (2004). "Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone" Biomaterials 25(9): 1697-1714.
- Lorenzo, J., M. Horowitz et al. (2008). "Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system" Endocr Rev 29(4): 403-440.

- Lowry, K. J., K. R. Hamson et al. (1997). "Polycaprolactone/glass bioabsorbable implant in a rabbit humerus fracture model" J Biomed Mater Res 36(4): 536-541.
- Lu, J. X., B. Flautre et al. (1999). "Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo" J Mater Sci Mater Med 10(2): 111-120.
- Lu, J. X., A. Gallur et al. (1998). "Comparative study of tissue reactions to calcium phosphate ceramics among cancellous, cortical, and medullar bone sites in rabbits" J Biomed Mater Res 42(3): 357-367.
- Martini, L., M. Fini et al. (2001). "Sheep model in orthopedic research: a literature review" Comp Med 51(4): 292-299.
- Mastrogiacomo, M., A. Muraglia et al. (2005). "Tissue engineering of bone: search for a better scaffold" Orthod Craniofac Res 8(4): 277-284.
- Middleton, J. C. und A. J. Tipton (2000). "Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices" Biomaterials 21(23): 2335-2346.
- Newman, E., A. S. Turner et al. (1995). "The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models" Bone 16(4 Suppl): 277S-284S.
- Parikh, S. N. (2002). "Bone graft substitutes: past, present, future" J Postgrad Med 48(2): 142-148.
- Pearce, A. I., R. G. Richards et al. (2007). "Animal models for implant biomaterial research in bone: a review" Eur Cell Mater 13(1-10).
- Petite, H., V. Viateau et al. (2000). "Tissue-engineered bone regeneration" Nat Biotechnol 18(9): 959-963.
- Regauer, M., I. Jurgens et al. (2005). "[New-bone formation by osteogenic protein-1 and autogenic bone marrow in a critical tibial defect model in sheep]" Zentralbl Chir 130(4): 338-345.
- Rizzi, S. C., D. J. Heath et al. (2001). "Biodegradable polymer/hydroxyapatite composites: surface analysis and initial attachment of human osteoblasts" J Biomed Mater Res 55(4): 475-486.
- Rozema, F. R., R. R. Bos et al. (1990). "Poly(L-lactide) implants in repair of defects of the orbital floor: an animal study" J Oral Maxillofac Surg 48(12): 1305-1309; discussion 1310.
- Rueger, J. M. (1996). "[Bone substitutes. State of the art and: what lies ahead?]" Unfallchirurg 99(3): 228-236.
- Rueger, J. M. (1998a). "[Bone substitution materials. Current status and prospects]" Orthopade 27(2): 72-79.
- Rueger, J. M. (1998b). "Synthetische resorbierbare Materialien: Eine Alternative zum Transplantat?" Hefte zu "Der Unfallchirurg" 265(261-269).

- Sarkar, M. R., P. Augat et al. (2006). "Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold" Biomaterials 27(9): 1817-1823.
- Schimandle, J. H. und S. D. Boden (1994). "Spine update. The use of animal models to study spinal fusion" Spine 19(17): 1998-2006.
- Schmitz, J. P. und J. O. Hollinger (1986). "The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions" Clin Orthop Relat Res205): 299-308.
- Seebeck, P., M. S. Thompson et al. (2005). "Gait evaluation: a tool to monitor bone healing?" Clin Biomech (Bristol, Avon) 20(9): 883-891.
- Shikinami, Y. und M. Okuno (1999). "Bioresorbable devices made of forged composites of hydroxyapatite (HA) particles and poly-L-lactide (PLLA): Part I. Basic characteristics" Biomaterials 20(9): 859-877.
- Uhr, G. P.-D. D. D. (2007). "Ziele und Wege des Tissue Engineering in der Knochen- und Geweberegeneration" Implantologie Journal 4(
- Verheyen, C. C. P. M., d. W. J. R. et al. (1992). "Evaluation of hydroxylapatite/poly(L-lactide) composites: Mechanical behaviour" Journal of Biomedical Materials Research 26(1277-1296).
- Viateau, V., G. Guillemin et al. (2004). "A technique for creating critical-size defects in the metatarsus of sheep for use in investigation of healing of long-bone defects" Am J Vet Res 65(12): 1653-1657.
- von Garrel, T. und L. Gotzen (1998). "[Allogenic bone transplantation and bone banking]" Unfallchirurg 101(9): 713-727.
- Willie, B. M., R. D. Bloebaum et al. (2004). "Determining relevance of a weight-bearing ovine model for bone ingrowth assessment" J Biomed Mater Res A 69(3): 567-576.
- Wiltfang, J., H. A. Merten et al. (2002). "Degradation characteristics of alpha and beta tri-calcium-phosphate (TCP) in minipigs" J Biomed Mater Res 63(2): 115-121.
- Wintermantel, E. und S.-W. Ha (1996). "Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen. Implantate für Medizin und Umwelt" Springer -Verlag: Heidelberg.
- Wintermantel, E. und S.-W. Ha (2002). "Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren".
- Wippermann, B. und A. Kniesch (1994). "Zum Einfluss der Präparation und der Applikation von basischen Fibroblastenfaktor (bFGF) auf die Einheilung einer Hydroxylapatitkeramik (HA) in einem Tibiasegmentdefekt beim Schaf" Osteoporosis International 2(136 - 146).
- Wissing, H., K. M. Stürmer et al. (1990). "Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspecies für experimentelle Untersuchungen am Knochen" Hefte Unfallheilkunde 212(479 - 488).

Zerbo, I. R., A. L. Bronckers et al. (2005). "Localisation of osteogenic and osteoclastic cells in porous beta-tricalcium phosphate particles used for human maxillary sinus floor elevation" *Biomaterials* 26(12): 1445-1451.

## 9. 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 ihre große Unterstützung in allen privaten und arbeitsbezogenen Anliegen bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Eckhard Wolf für die Übernahme meiner Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen engsten Mitarbeitern im Versuch: Elfriede, Filou, Klaus, 45, 32117, 147, 38, 74, 1420065, 32159, 64, 95583, 43, 02331, 22, 95581, die Weiße, die Schwarze, 02361, 02369, Neunundfünfzig, 02357, 2111, 02358, Schoki, 02362, 02356, 02360, 02283. Ohne deren freundliche Art, enorme Lernfähigkeit und Kooperativität wäre die Arbeit nicht zustande gekommen. Besondere Dankbarkeit gilt dabei auch der Nulleins, die mir in allen Schafserziehungsfragen immer hilfreich und geduldig zur Seite stand.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Melanie Göckelmann. Ihre endlose Geduld und unermüdliche Unterstützung in der Versuchsdurchführung, wie auch in allen fachlichen Fragen und Problemen in vielen Gesprächen halfen wesentlich bei der Entstehung dieser Dissertation.

Frau Uschi Maile danke ich für die große Hilfe bei der OP-Vorbereitung, die OP-Assistenz und die Anfertigung der histologischen Dünnschliffpräparate. Auch für ihre Geduld und ihren vielen Zuspruch in allen schwierigen Situationen danke ich ihr sehr.

Frau Matrina Reusch danke ich für die Mithilfe im Tierversuch. Frau Marion Tomo danke ich für die Anfertigung der histologischen Dünnschliffpräparate. Frau Patricia

Horny danke ich für die Hilfe bei der biomechanischen Prüfung und Auswertung.  
Herrn Herbert Schmitt danke ich für seine ständige Hilfe bei fotografischen und technischen Problemen.

Mein Dank gilt auch den Tierärzten des Tierforschungszentrums Oberberghof in Ulm, vor allem Frau Dr. Barbara Kuhnt danke ich für die angenehme Zusammenarbeit und die vielen guten Ratschläge.

Bei Wilhelm und Rico bedanke ich mich besonders für die liebevolle und zuverlässige Versorgung der Schafe.

Allen Mitarbeitern des Instituts möchte ich für die nette und kollegiale Zeit in Ihrer Mitte danken, allen voran Stefan und Ronny, die mir mit viel Geduld und Ratschlägen durch die Höhen und Tiefen des Zusammenschreibens halfen.

Tom danke ich für die vielen Mensabesuche.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich für ihr großes Verständnis für die Seltenheit meiner Besuche und das immer offene Ohr am Telefon.