

Aus dem
Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Angefertigt am
Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik
der Universität Ulm
(Univ.-Prof. Dr. Anita Ignatius)

Osseointegration kalthärtender Knochenzemente im Schafmodell

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

von
Britta Kanter, geb. Schulenberg
aus Siegen

München 2014

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Eckard Wolf

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Tag der Promotion: 12.Juli 2014

„Denke immer daran, dass es nur eine wichtige Zeit gibt: Heute. Hier. Jetzt.“

Leo Tolstoi

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	9
1.1	Einführung	9
1.2	Knochenersatzmaterialien auf Calciumphosphat-Basis	10
1.3	Calciumphosphat-Zemente	12
1.3.1	Grundsätzliches.....	12
1.3.2	Mechanische Eigenschaften.....	14
1.3.3	Porosität	15
1.3.4	Biokompatibilität	17
1.3.4.1	Osteokonduktivität und Osteoinduktivität.....	17
1.3.4.2	Degradationsverhalten	19
1.3.4.3	Einfluss der Degradationsprodukte und Matrix-Mineralisierung	22
1.4	Magnesiumphosphat-Zemente	23
2	ZIELSETZUNG	25
3	MATERIAL UND METHODEN	26
3.1	Zemente	26
3.1.1	Bruschit	26
3.1.2	Struvit	27
3.1.3	Hydroxylapatit.....	28
3.2	Tierversuch	29
3.2.1	Tiermodell.....	29
3.2.2	Implantationsmodell und Zeitplan	29
3.2.3	Operation.....	30
3.2.3.1	Operation Zugang.....	31
3.2.3.2	Operation Tibia-Defekt	32
3.2.3.3	Operation Femur-Defekt.....	34
3.2.3.4	Operation subkutane Implantate	35
3.2.4	Versorgung der Tiere post OP.....	36
3.3	Aufarbeitung der Proben	36
3.3.1	Präparation.....	36

3.3.2	Biomechanik: Indentationstest.....	39
3.3.3	Mikro-Computer-Tomographie	40
3.3.4	Histologie.....	41
3.3.4.1	Kunststoff-Schliffe.....	41
3.3.4.2	Entkalkte Paraffin-Schnitte	43
3.3.5	Phasenanalyse mittels Pulverdiffraktometrie	44
3.3.6	Quantitative Backscattered Electron Imaging (qBEi)	45
3.3.7	Energiedispersive Röntgendiffraktometrie	46
3.3.8	Statistische Auswertung	46
4	ERGEBNISSE	48
4.1	Klinischer Verlauf	48
4.2	Makroskopisch	49
4.3	Röntgen.....	53
4.4	Biomechanik	54
4.5	Mikro-Computer-Tomographie (μ-CT).....	57
4.5.1	Mineraldichte (MD)	57
4.5.2	Röntgendichtes Volumen/Gesamtvolumen (RV/GV)	62
4.6	Histologie	65
4.6.1	Kunststoff-Schliffe.....	65
4.6.1.1	Qualitative Histologie - Knochenimplantate	65
4.6.1.2	Qualitative Histologie - subkutane Implantate	73
4.6.1.3	Quantitative Histologie - Knochenimplantate	79
4.6.2	Paraffinschnitte: TRAP-Färbung.....	82
4.7	Phasenanalyse mittels Pulverdiffraktometrie (XRD)	85
4.8	Quantitative Backscattered Electron Imaging (qBEi).....	86
4.9	Energiedispersive Röntgendiffraktometrie	88
5	DISKUSSION	90
5.1	Eignung des Tier- und Implantationsmodells.....	91
5.1.1	Tiermodell.....	91
5.1.2	Defektgeometrie und Lokalisation	92
5.1.3	Anwendung der Zemente	95

5.2	Eignung der Untersuchungsmethoden	98
5.2.1	Mikro-Computer-Tomografie (μ -CT)	98
5.2.2	Quantitative Backscattered Electron Imaging (qBEI)	100
5.2.3	Biomechanik	101
5.3	Eignung der Materialien	103
5.3.1	Bruschit	103
5.3.2	Struvit	106
5.4	Stellungnahme zu den eingangs gestellten Hypothesen.....	109
5.5	Ausblick	110
6	ZUSAMMENFASSUNG	111
7	SUMMARY	113
8	ANHANG.....	115
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	117
10	DANKSAGUNG	127

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
<	kleiner als
>	größer als
≤	kleiner-gleich
Abb.	Abbildung
ANOVA	Analysis of variance
BCP	Biphasisches Calciumphosphat
BMD	Bone mineral density
BMDD	Bone mineral density distribution
BMP	Bone Morphogenic Proteine
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CDHA	Calciumdeficient Hydroxyapatite
cm	Zentimeter
d	Durchmesser
d. h.	das heißt
DCPD	Dicalciumphosphatdihydrat
FWHM	Full width at half maximum
h	Höhe
HA	Hydroxylapatit
i.m.	intramuskulär
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
kGy	Kilogray
kN	Kilonewton
kV	Kilovolt
l	Länge
l/min	Liter pro Minute
Lig.	Ligamentum
M.	Musculus
mg	Milligramm

mg HA/cm ³	Milligramm Hydroxylapatit pro Kubikzentimeter
ml	Milliliter
ml/kg KGW/h	Milliliter pro Kilogramm Körpergewicht pro Stunde
mm	Millimeter
mm/min	Millimeter pro Minute
mM	Millimol
MPa	Megapascal
N	Newton
Nr.	Nummer
p.o.	peroral
PLR	Powder-Liquid-Ratio
PMMA	Polymethylmethacrylat
s.c.	subkutan
TGF-β	Transforming Growth Factor - beta
TRAP	Tartrat-resistant acid phosphatase
Vergr.	Vergrößerung
wt%	Gewichtsprozent
z. B.	zum Beispiel
α-TCP	alpha-Tricalciumphosphat
β-TCP	beta-Tricalciumphosphat
θ	Theta
μm	Mikrometer

1 EINLEITUNG

1.1 Einführung

In Folge eines Traumas, bei Knochenzysten oder nach Tumorresektion entstehen oft größere Knochendefekte, welche nicht spontan heilen und die Funktion des Knochens beeinträchtigen. Diese Situation macht einen Knochenersatz erforderlich. Die verwendeten Materialien sollten nicht nur biokompatibel sein, sondern auch idealerweise die gleichen biologischen und mechanischen Eigenschaften wie das zu ersetzende Knochengewebe besitzen. Vorteilhaft ist, wenn das Implantat nach erfolgreicher Integration wieder vom Organismus resorbiert und durch körpereigenes Knochengewebe ersetzt werden kann und der Patient möglichst keine schmerzhaften Zweitoperationen benötigt (HEINEMANN et al., 2011).

Als Gold-Standard wird in der Literatur immer noch die autologe Transplantation beschrieben, da autologer Knochen die besten biologischen Eigenschaften aufweist. Neben der Osteokonduktivität (Leitschieneneffekt für einwachsenden Knochen und Gefäße), der Osteoinduktivität (Stimulation zur Knochenbildung durch Proteine wie zum Beispiel die Wachstumsfaktoren TGF- β 1-3, BMP) und der Bioresorbierbarkeit hat autologer Knochen als einziges verfügbares Knochenersatzmaterial osteogenes Potenzial, d. h. es sind Zellen, Wachstumsfaktoren (BMPs) und andere bioaktive Moleküle (z.B. Kollagen, Osteonectin, Osteopontin, Bone sialoproteine) im Implantat vorhanden, so dass eine *de novo* Knochenbildung erfolgen kann (LEGEROS, 2008; HEISS, 2013). Allerdings ist bei dieser Methode immer eine zweite Operation zur Knochenentnahme, z. B. am Beckenkamm erforderlich und die Menge an verfügbarem Knochen ist auf ca. 20 cm³ begrenzt (FELLAH et al., 2008). In Einzelfällen kann es manchmal dazu kommen, dass das Transplantat schneller vom Körper abgebaut wird als neues Knochengewebe produziert werden kann (EPPLER, 2007). Es ist auch möglich, homologe/allogene und heterologe/xenogene Transplantate in Form von Knochenstücken oder demineralisierter Knochenmatrix zu verwenden. Hier besteht nicht das Problem

der mangelnden Verfügbarkeit, sondern das Risiko der Übertragung von Infektionskrankheiten und einer möglichen Abstoßungsreaktion durch den Empfänger. Chemische und thermische Behandlungen sind nötig, um diese Risiken zu minimieren, allerdings werden dabei Zellen und Proteine abgetötet bzw. denaturiert, so dass die biologischen Eigenschaften des Materials (Osteoinduktivität) und die mechanische Stabilität beeinträchtigt werden (HEINEMANN et al., 2011).

Als Alternative zu den biologischen Implantaten werden vermehrt alloplastische, d. h. synthetisch hergestellte Materialien eingesetzt. Neben Polymeren, Metallen, Biogläsern, Glaskeramiken und Calciumsulfaten finden vor allem mineralische Werkstoffe auf Calciumphosphat-Basis Anwendung als Knochenersatzmaterial. Darüber hinaus können die verschiedenen Ersatzmaterialien miteinander kombiniert werden und als Komposit, d. h. als Verbundwerkstoffe aus mindestens zwei Werkstoffen, verwendet werden. Da die Eigenschaften der synthetischen Knochenersatzmaterialien bisher denen des natürlichen Knochengewebes unterlegen sind, werden diese ständig weiterentwickelt (DIMITRIOU et al., 2011; RENTSCH et al., 2012).

1.2 Knochenersatzmaterialien auf Calciumphosphat-Basis

Die mineralische Phase des Knochens besteht zu 60 bis 70 % aus Hydroxylapatit. Dieser kommt im Knochengewebe allerdings nicht in seiner Reinform ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) vor, sondern enthält immer auch weitere Ionen (CO_3^{2-} , F^- , Cl^- , $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, Na^+ , Mg^{2+} , K^+), so dass sich für Knochen-Apatit eine komplexe Strukturformel ergibt: $\text{Ca}_{10-a}\text{Mg}_b\text{Na}_c\text{K}_d(\text{PO}_4)_{6-e}(\text{CO}_3)_f(\text{OH})_{2-g}\text{Cl}_h\text{F}_i$ (BERGER & GILDENHAAR, 1995; LEGEROS, 2008; ISHIKAWA, 2010)

Knochenersatzmaterialien auf Calciumphosphat-Basis sind der mineralischen Phase des Knochens sehr ähnlich. Ihre Biokompatibilität, Osteokonduktivität und potentielle Biodegradierbarkeit ist allgemein bekannt. Eine osteoinduktive Eigenschaft wird ihnen nicht zugesprochen, es sei denn sie werden z.B. mit Wachstumsfaktoren beladen (SCHNURER et al., 2003; LEGEROS, 2008). Anwendung finden Calciumphosphate deshalb nicht nur als Volumenersatz für

Knochendefekte in der Orthopädie und Kieferchirurgie, sondern auch als Beschichtung auf metallischen Implantaten zur Verbesserung der Osseointegration. Calciumphosphat-Zemente können auch im Rahmen der Kypho- und Vertebroplastie zur Augmentation von frakturierten Wirbelkörpern oder Pedikelschrauben oder generell zur Verstärkung von osteoporotischem Knochengewebe eingesetzt werden (CLAES et al., 1997; GIANNOUDIS et al., 2005; LARSSON & HANNINK, 2011). Mechanisch weisen Calciumphosphate je nach Material und Porosität zwar eine gewisse Druckfestigkeit auf, ihr Nachteil ist allerdings ihre hohe Sprödigkeit, so dass sie hauptsächlich für nicht lasttragende Bereiche geeignet sind und eine zusätzliche stabilisierende Osteosynthese erforderlich ist (BOHNER, 2000), so wie z.B. bei der in Abb. 1 dargestellten Tibiaplateau-Fraktur.



Abb. 1: Tibiaplateau-Fraktur einer 75-jährigen, ansonsten gesunden Frau nach Autounfall; a: Röntgenbild, b: CT-Schnittbild, c: postoperatives Röntgenbild, Versorgung mit Plattenosteosynthese und Calciumphosphat-Zement (LARSSON & HANNINK, 2011)

Kommerziell erhältlich sind Knochenersatzmaterialien aus Calciumphosphaten als Keramiken in Form von gesinterten Blöcken und Granulaten oder als Zemente (siehe Abb. 2). Keramiken werden bei hohen Temperaturen hergestellt und sind dadurch sehr dicht. Durch spezielle Verfahren können aber bestimmte Porositäten erzeugt werden (HEINEMANN et al., 2011). Vorgefertigte Blöcke lassen sich allerdings nicht gut an komplexe Defekte anpassen, so dass kein enger Knochen-Implantat-Kontakt hergestellt werden

kann, was in Folge zu einer verschlechterten Heilung führen kann. Granulate passen sich besser als Blöcke an Knochendefekte an, haben aber den Nachteil, dass sie ins umliegende Gewebe migrieren können und nur eine geringe Festigkeit aufweisen (OOMS et al., 2002). Keramiken bestehen meistens aus Hydroxylapatit, β -Tricalciumphosphat oder einer Mischung aus beiden Komponenten (= biphasische Keramik) (DOROZHKIN & EPPLE, 2002). Zemente werden durch Vermischung einer oder zwei Pulverkomponenten mit einer flüssigen Phase hergestellt. Die entstehende Paste kann je nach Viskosität injiziert oder mit Hilfe eines Spatels eingebracht werden und härtet in situ aus (KOLK et al., 2012). Dadurch sind Zemente für komplexe Defekte im trabekulären Knochen und minimalinvasive Techniken geeignet (LOW et al., 2010).



Abb. 2: Kommerziell erhältliche Knochenersatzmaterialien auf Calciumphosphatbasis

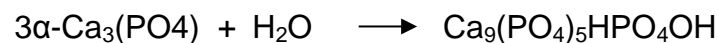
<http://www.synthes.com/sites/NA/Products/Biomaterials/BoneVoidFillersTrauma/Pages/TraumaBoneVoidFillers.aspx>, 20.12.2013

1.3 Calciumphosphat-Zemente

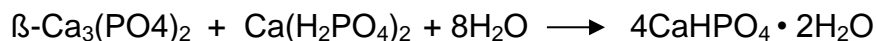
1.3.1 Grundsätzliches

Calciumphosphat-Zemente werden seit den 1980er Jahren intensiv als mögliches Knochenersatzmaterial untersucht. Die meist zitierten Wissenschaftler, die sich damit befassten, waren Brown & Chow, die 1986 das erste Patent für eine selbst härtende Calciumphosphat-Paste anmeldeten. Diese Paste war zunächst für das Reparieren von Läsionen in Zähnen gedacht, aber ihr möglicher Einsatz als Knochenersatzmaterial wurde bereits damals erwähnt (BROWN & CHOW, 1986).

Das Prinzip dieser Zemente beruht je nach Ausgangsmaterialien auf einem Lösungs-Präzipitations-Vorgang bzw. auf einer Säure-Basen-Reaktion. Im ersten Fall geht eine weniger stabile Pulverkomponente wie z.B. α -Tricalciumphosphat mit der flüssigen Phase in Lösung. Es entsteht eine übersättigte Lösung, aus der einzelne Kristalle einer stabileren, weniger löslichen Phase ausfallen. Auf diese Weise entstehen Hydroxylapatit-Zemente (siehe nachfolgende Gleichung):



Im zweiten Fall reagiert ein basisches Calciumphosphat mit einem sauren Calciumphosphat unter Flüssigkeitszugabe zu einer neutralen Verbindung. Zum Beispiel reagiert β -Tricalciumphosphat (basisch) mit Monocalciumphosphat-monohydrat (sauer) und es bildet sich Dicalciumphosphat-Dihydrat (Bruschit, neutral):



Die entstehenden Kristalle verzahnen sich dann untereinander, so dass der Zement nach dem Abbinden vollständig aushärtet (BOHNER, 2000; GINEBRA et al., 2010; ISHIKAWA, 2010; TAMIMI et al., 2012). Man spricht auch von kalthärtenden Calciumphosphaten im Gegensatz zu den bei hohen Temperaturen gesinterten Calciumphosphat-Keramiken (LINHART et al., 2004). Beim Aushärten von Acryl-Zementen (PMMA) können Temperaturen zwischen 70 und 90 °C entstehen, so dass es zu thermischen Nekrosen des Knochengewebes kommen kann. Beim Abbinden von Calciumphosphat-Zementen kommt es auch zu einer leichten Temperaturerhöhung. Diese bleibt jedoch unter der Grenze von 54 °C, bei der der Kollagenanteil des Knochens denaturiert (FERNÁNDEZ et al., 1995). Die Abbindezeit und die Viskosität lassen sich über das verwendete Pulver-Flüssigkeitsverhältnis und bestimmte Zusätze variieren. Dadurch werden allerdings auch immer die Eigenschaften des abgebundenen Zementes wie z.B. die Porosität, die mechanische Stabilität und das Degradationsverhalten beeinflusst (SCHNURER et al., 2003). Je

nachdem, welche Ausgangsmaterialien verwendet werden, entstehen verschiedene Abbindeprodukte:

- Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$)
- calciumdefizitärer Hydroxylapatit ($\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$)
- Dicalciumphosphat-Dihydrat (Bruscht, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Octacalciumphosphat ($\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- amorphes Calciumphosphat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$).

Die meisten als Medizinprodukt erhältlichen Zemente bilden als Abbindeprodukt Hydroxylapatit unterschiedlicher Stöchiometrie oder Bruscht (BOHNER et al., 2005; LOW et al., 2010).

1.3.2 Mechanische Eigenschaften

Knochengewebe ist aufgrund seiner Struktur und seiner Zusammensetzung sehr belastbar. Die Druckfestigkeit von humanem, trabekulären Knochen liegt im Bereich von 2 - 45 MPa, die von kortikalem Knochengewebe im Bereich von 90 - 230 MPa (LARSSON & HANNINK, 2011). Idealerweise sollte ein Ersatzmaterial die gleichen mechanischen Eigenschaften wie Knochengewebe besitzen (CLAES et al., 1997). Driessens et al. beschreiben Druckfestigkeiten von Calciumphosphat-Zementen zwischen 2,1 und 44 MPa und Zugfestigkeiten zwischen 0,5 und 4,5 MPa (DRIESSENS et al., 1994). Auch nach Low et al. ist die Druckfestigkeit der Zemente mit Werten bis zu 100 MPa meistens 5-10 x größer als die Zugfestigkeit, welche Werte bis zu 15 MPa erreicht (LOW et al., 2010). Die Druckfestigkeit der Calciumphosphat-Zemente hängt von den verwendeten Ausgangsmaterialien und dem Pulver-Flüssigkeitsverhältnis ab. Je mehr Flüssigkeit verwendet wird, desto poröser und weniger druckfest ist der Zement. Durch die Zugabe von Granulaten oder Fasern kann die mechanische Stabilität des Zementes erhöht werden (BOHNER et al., 2005). Bis jetzt gibt es allerdings kein resorbierbares Knochenersatzmaterial, das keine Einbußen in der mechanischen Stabilität aufweist, so dass Calciumphosphate nur in nicht-lasttragenden Bereichen Anwendung finden (DOROZHKIN, 2011).

1.3.3 Porosität

Trabekulärer Knochen weist interkonnektierende Poren zwischen 200 und 600 μm und eine Gesamtporosität zwischen 50 – 90 % auf (LEGEROS, 2008; FUENTES et al., 2010). Die Porosität von Biomaterialien soll den Durchfluss von Sauerstoff, Nährstoffen und Stoffwechsel-Metaboliten gewährleisten (AARVOLD et al., 2013).

Bei der Porengröße unterscheidet man zwischen Mikro- und Makroporen. Mikroporen sind Poren mit einer Größe $< 10 \mu\text{m}$ (LOW et al., 2010). Sie befinden sich bei kalt gehärteten Calciumphosphaten zwischen den einzelnen Kristallkörnern (BIGNON et al., 2003). Bei Keramiken, die bei hohen Temperaturen ($> 1200 \text{ }^\circ\text{C}$) gesintert werden, verschmelzen die Kristallkörner miteinander, so dass keine Mikroporen vorhanden sind (DOROZHKIN, 2011). Die Mikroporosität kann bei Zementen über das Pulver-Flüssigkeitsverhältnis eingestellt werden, d.h. je mehr Flüssigkeit verwendet wird, desto größer ist die Mikroporosität (MARTIN & BROWN, 1995). Durch die Mikroporen wird die Oberfläche stark vergrößert und die Flüssigkeit aus dem umgebenden Gewebe kann in den Zement eindringen und so die passive Löslichkeit fördern. Außerdem können an der rauen Oberfläche Proteine und Zellen gut haften (HANNINK & ARTS, 2011). Die Porosität von Zementen liegt nach Low et al. meistens zwischen 40 und 60 % mit Porengrößen von 0,1 bis 10 μm (LOW et al., 2010)

Unter Makroporen versteht man nach Heiss et al. Poren mit einer Größe von 150 bis 500 μm bzw. nach Low et al. und Cortez et al. eine mittlere Porengröße $> 100 \mu\text{m}$ (LOW et al., 2010; CORTEZ et al., 2011; HEISS, 2013). Interkonnektierende Makroporen sind notwendig, damit Zellen und Blutgefäße in ein Biomaterial einwandern können und gleichzeitig die Resorption beschleunigt werden kann (GINEBRA et al., 2010). Um Makroporen in einen Zement einzubringen, gibt es zwei Ansätze: zum einen können Porogene wie z.B. Mannitol, Saccharose oder Polylactid-Partikel zur Zementpaste dazugegeben werden. Dadurch, dass diese Porogene schneller als die Zementmatrix degradieren, werden Poren erzeugt; zum anderen können Schaumbilder, also gasbildende Substanzen wie z.B. Wasserstoffperoxid, Natriumbicarbonat oder auch Eiweiß-Schaum zur abbindenden Zementpaste

hinzugefügt werden, so dass eine makroporöse Struktur entsteht (GINEBRA et al., 2007). Tan et al. erzeugten einen makroporösen Bruschit-Zement durch die Zugabe von Alginat-Kügelchen und konnten *in vitro* zeigen, dass bei einer Porosität von > 50 % eine vollständige passive Degradation nach 220 Tagen stattfand, während eine Porosität zwischen 20 und 30 % nur zu einem Masseverlust von < 20 % führte (TAN et al., 2011). Kasuya et al. kombinierten in einer *in vivo* Studie einen Calciumphosphat-Zement mit unterschiedlichen Anteilen an Gelatine-Pulver. Je mehr Gelatine verwendet wurde, desto höher war die Makroporosität. Mit Zunahme der Makroporosität wurde das Biomaterial schneller resorbiert und mehr Knochengewebe gebildet (KASUYA et al., 2012). Auch Perez et al. beobachteten bei der Herstellung von Hydroxylapatit-Mikrokügelchen aus einem Calciumphosphat-Zement eine Zunahme der Porosität und verbesserte Anheftung von Osteoblasten, wenn sie das Calciumphosphat-Pulver mit Gelatine kombinierten (PEREZ et al., 2011). Mit Zunahme der Gesamtporosität verringert sich jedoch immer die mechanische Stabilität der Calciumphosphate, wobei die Mikroporosität dabei weniger Einfluss als die Makroporosität hat (BIGNON et al., 2003). Insgesamt verbessert eine poröse Oberfläche die mechanische Verzahnung zwischen Knochen und Implantat (KARAGEORGIU & KAPLAN, 2005). In Abb. 3 sind Makro- und Mikroporen innerhalb einer Calciumphosphat-Keramik dargestellt.

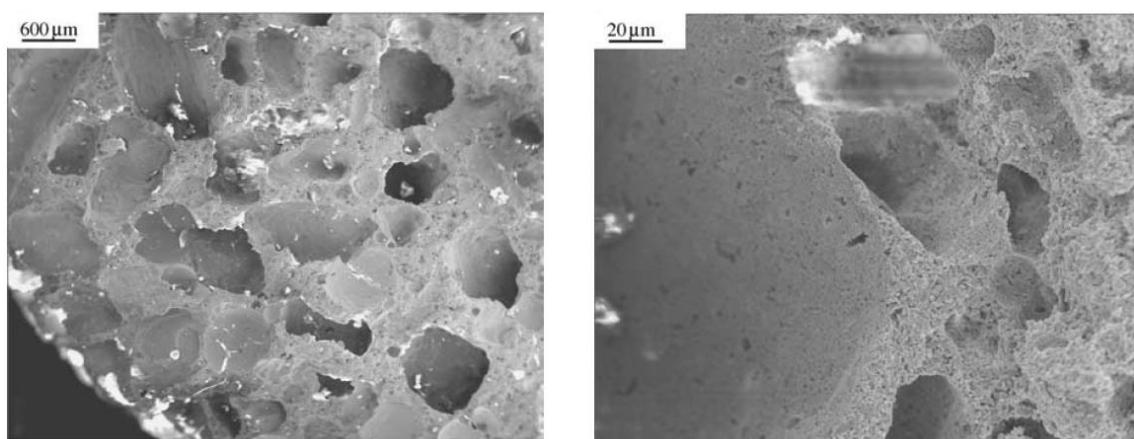


Abb. 3: Raster-Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Calciumphosphat-Keramik
A: Makroporosität, B: Mikroporosität (BIGNON et al., 2003)

1.3.4 Biokompatibilität

Unter Biokompatibilität versteht man, dass ein Implantat nicht nur keine lokalen oder systemischen Schäden im Organismus verursacht, sondern dass es auch seine gewünschte Funktion erfüllt. Außerdem sollten bei degradierbaren Materialien die Abbauprodukte ebenfalls biokompatibel sein (WINTERMANTEL & HA, 2002). Biomaterialien der dritten Generation sollen darüber hinaus dem Körper helfen, sich selbst zu heilen (SCHILLING et al., 2004).

Ein Material, das als Medizinprodukt im Körper eingesetzt wird, kann auf vier verschiedene Arten mit dem umliegenden Gewebe reagieren:

- a) Toxisch: es kommt zu einer Gewebenekrose
- b) Inert: es bildet sich eine Bindegewebskapsel um das Implantat
- c) Bioaktiv: Implantat und Gewebe gehen eine enge Bindung ein
- d) Degradierbar: das Implantat wird resorbiert und durch körpereigenes Gewebe ersetzt (RATNER et al., 1996).

Calciumphosphate kommen sowohl in fester als auch in gelöster Form fast überall im Körper vor (DOROZHKIN & EPPLE, 2002). Die gute Biokompatibilität der Calciumphosphate wird vor allem darin gesehen, dass sie sowohl in der chemischen Zusammensetzung als auch morphologisch biomimetische Eigenschaften aufweisen (LEGEROS, 2008; CHAI et al., 2012). Sie werden in der Regel gut in den Knochen integriert und sind somit als bioaktiv anzusehen. Im Gegensatz dazu bildet sich bei bioinerten Materialien wie PMMA oder metallischen Implantaten oft eine fibröse Bindegewebschicht um das Material. Dies kann zu einer Implantatlockerung und zum Versagen der mechanischen Stabilität führen und damit Revisionsoperationen erforderlich machen (DRIESSENS et al., 1994; LEGEROS, 2008).

1.3.4.1 Osteokonduktivität und Osteoinduktivität

Die Bioaktivität in Bezug auf Knochenimplantate wird auch als Osteokonduktivität bezeichnet. Das schnelle und enge An- bzw. Einwachsen von Knochengewebe in das Implantat führt zu einer hohen Implantatstabilität (YUAN et al., 2002).

Damit sich Zellen an ein Biomaterial anheften, proliferieren und differenzieren können, müssen sich zunächst Proteine (z. B. Integrine) an das Biomaterial anlagern (LEGEROS, 2008). Nach Implantation kommt das Biomaterial direkt in Kontakt mit Zellen, Biomolekülen, Wasser und darin gelösten Ionen. Dadurch kommt es zu einer geringgradigen Auflösung an der Oberfläche des Implantats. Die gelösten Ionen können entweder als biologischer Apatit an der Implantatoberfläche ausfallen oder es besteht ein Gleichgewicht zwischen dem biologischen Milieu und der modifizierten Oberfläche des Implantats, ohne dass sich Calciumphosphat an der Implantatoberfläche bilden. Im Anschluss binden Proteine an die Implantatoberfläche (DOROZHKIN, 2011). Neben der chemischen Zusammensetzung (Calcium-Phosphor-Verhältnis, Kristallinität und Partikelgröße) und der daraus resultierenden Löslichkeit ist auch die Makro- und Mikrostruktur innerhalb und an der Oberfläche des Implantats entscheidend für die Bioaktivität (Abb. 4).

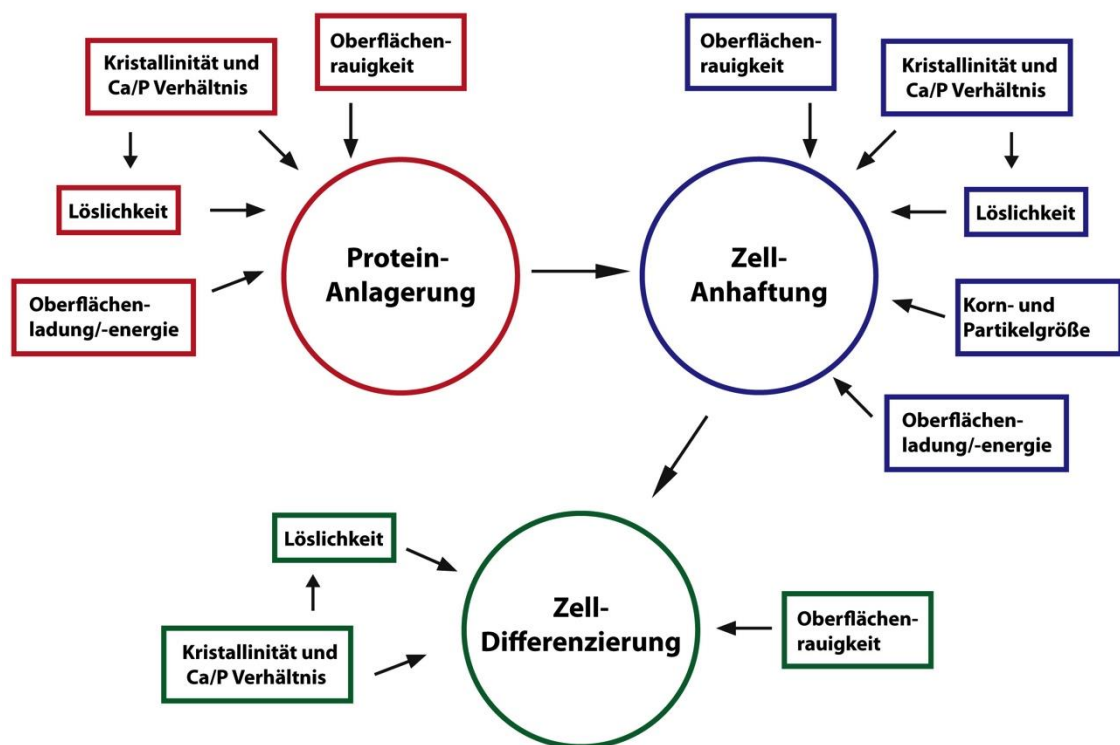


Abb. 4: Eigenschaften von Calciumphosphaten, die eine Rolle bei der biologischen Integration spielen nach Samavedi et al. (SAMAVEDI et al., 2013)

Eine gewisse Rauigkeit der Oberfläche, verbunden mit einer Mikroporosität, die die spezifische Oberfläche vergrößert und elektrische Ladungen sind für das

Anheften von Proteinen und Zellen von Vorteil (LEGEROS, 2008; SAMAVEDI et al., 2013).

Fast alle Calciumphosphate sind osteokonduktiv, aber nur manche besitzen auch osteoinduktive Eigenschaften, d.h. dass es auch in einem ektopen Implantatlager (subkutan oder intramuskulär) zu einer Knochenbildung kommt. LeGeros unterscheidet bei Calciumphosphaten zwischen einer technisierten und einer intrinsischen Osteoinduktivität. Dabei wird die technisierte Osteoinduktivität durch Zugabe von Osteoprogenitorzellen, Wachstumsfaktoren und bioaktiven Proteinen erreicht, während die intrinsische Osteoinduktivität auf den Materialeigenschaften des Calciumphosphates an sich beruht (LEGEROS, 2008). Neben der chemischen Zusammensetzung haben die Makro- und Mikroporosität einen Einfluss auf das osteoinduktive Potenzial eines Calciumphosphates. Darüber hinaus spielen auch das Tiermodell und der Implantationsort eine Rolle. Der Mechanismus, der dahintersteckt, ist allerdings noch unbekannt (CHAI et al., 2012). Um die Osteoinduktivität der in unserer Studie verwendeten Zemente zu untersuchen, wurde neben der orthotopen Implantation auch eine subkutane Implantation von Formkörpern durchgeführt.

1.3.4.2 Degradationsverhalten

Da Knochen als einziges Gewebe ohne Narbenbildung regenerieren kann und es bis jetzt noch kein Knochenersatzmaterial gibt, das die gleichen oder bessere biologische und mechanische Eigenschaften als Knochen besitzt (DIMITRIOU et al., 2011), ist es für die Funktionalität am besten, wenn das Knochenersatzmaterial nach und nach wieder durch Knochengewebe ersetzt wird. Idealerweise sollte der Abbauprozess genauso schnell verlaufen, wie neues Knochengewebe vom Organismus produziert werden kann (CLAES et al., 1997; CHOW, 2009).

Calciumphosphate können auf zwei Wege im Organismus resorbiert werden: zum einen können sie sich im umgebenden Milieu des Körpers rein thermodynamisch / chemisch lösen. Dies wird auch als passive Löslichkeit bezeichnet und kann nur dann stattfinden, wenn im umgebenden Gewebe ein Konzentrationsgefälle in Bezug auf Calcium- und Phosphationen besteht. Zum

anderen können sie aktiv, d. h. zellvermittelt abgebaut werden. In der frühen Phase geschieht dies durch Makrophagen und Fremdkörper-Riesenzellen, später kommen auch Osteoklasten hinzu. Makrophagen und Fremdkörper-Riesenzellen phagozytieren Zementpartikel, Osteoklasten können zusätzlich durch eine lokale Absenkung des pH-Wertes, wie es im Zuge des Knochenremodellings geschieht, auch synthetische Calciumphosphat-Verbindungen auflösen (GROSSARDT et al., 2010; HANNINK & ARTS, 2011). Dabei bilden die Osteoklasten unter Bildung eines Actin-Rings eine dichte sogenannte Sealing-Zone an der Oberfläche des Knochens bzw. des Biomaterials. Über die innerhalb dieser Sealing Zone liegende Ruffled Border werden durch Protonenpumpen H^+ -Ionen in den Resorptionsbereich gepumpt, so dass dort ein pH-Wert zwischen 4,5 und 5,0 erreicht wird (FRANCIS, 1999; VAANANEN, 2005). Detsch et al. kultivierten osteoklastär stimulierte murine Monozyten sowohl zweidimensional auf gesinterten Hydroxylapatit-Keramiken (DETSCH et al., 2008), als auch dreidimensional auf 3D-gedruckten Scaffolds aus HA, β -TCP und BCP (DETSCH et al., 2011). In beiden Fällen konnten Resorptionslakunen an den Oberflächen der Materialien beobachtet werden (siehe Abb. 5).

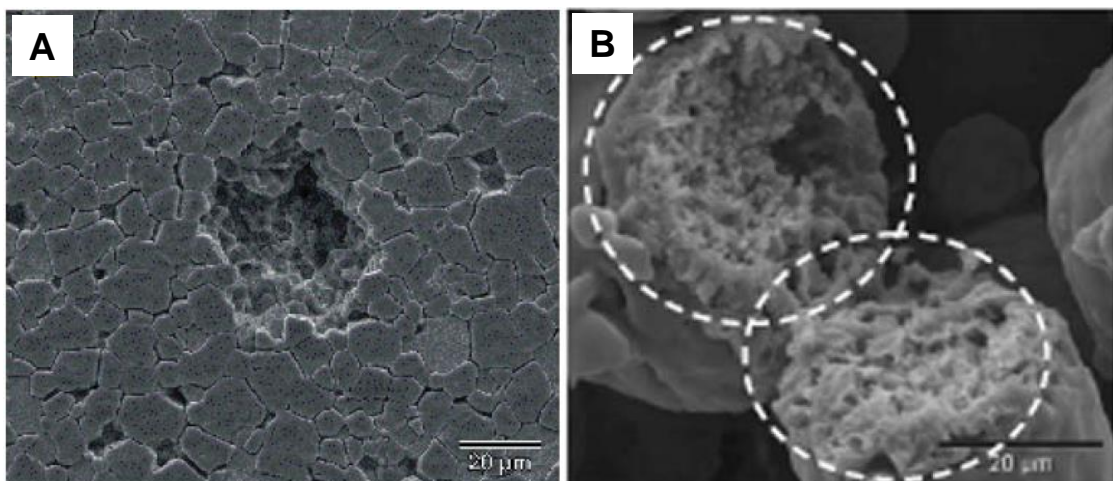


Abb. 5: Raster-Elektronenmikroskopische Aufnahme von Resorptionslakunen auf einer HA-Keramik (A) (DETSCH et al., 2008) und auf einem 3D-gedrucktem BCP-Scaffold (B) (DETSCH et al., 2011)

Schilling et al. betrachten Osteoklasten als wichtigste Zellen bei der aktiven Resorption von Biomaterialien. Sie konnten *in vitro* zeigen, dass auch

Calciumphosphat-Zemente durch humane Osteoklasten abgebaut werden können, wobei die Gewinnung der Osteoklasten durch Stimulierung von hämatopoetischen Stammzellen aus Buffy Coats erfolgte (SCHILLING et al., 2004). In Abb. 6 kann man deutlich erkennen, dass die Oberfläche des Calciumphosphat-Zementes nach 28 Tagen Kultivierung mit Zellbesiedlung (D) deutlich angegriffen ist, während sie ohne Zugabe von Zellen intakt blieb (C).

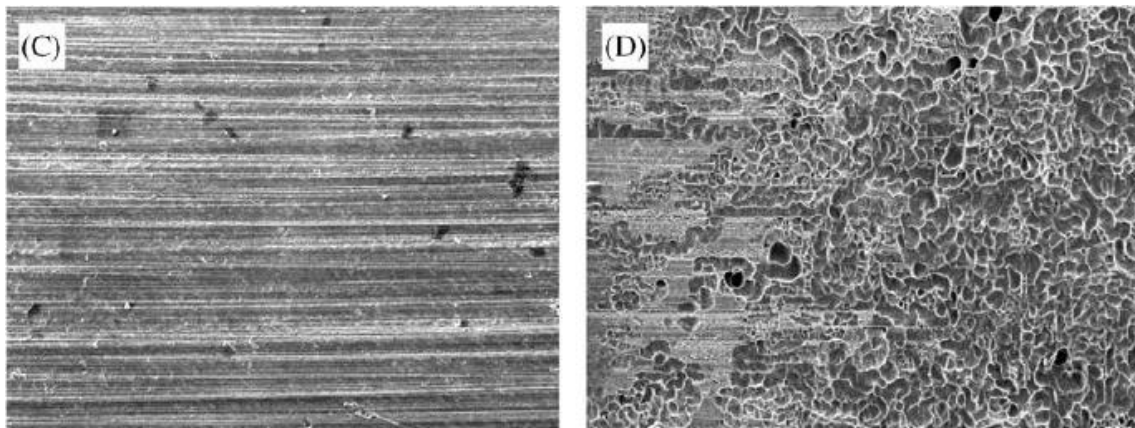


Abb. 6: Raster-Elektronenmikroskopische Aufnahme von Calciumphosphat-Zementen; (C) ohne Zellen, (D) mit humanen Osteoklasten, jeweils nach 28 Tagen Kultivierung, 100 x Vergr. (SCHILLING et al., 2004)

Die aktive Resorption geschieht nur langsam. Der Anteil an aktiver Resorption durch Osteoklasten beträgt z.B. für Hydroxylapatit nur 5 vol% pro Jahr (TAN et al., 2011).

Für die chemisch-physikalische Löslichkeit gilt, dass Hydroxylapatit unter physiologischen Bedingungen sehr stabil und kaum passiv löslich ist. Deshalb wird diese Calciumphosphatverbindung auch über längere Zeiträume kaum oder gar nicht resorbiert. Brushit weist gegenüber Hydroxylapatit eine wesentlich höhere passive Löslichkeit auf und ist deshalb besser biodegradierbar (APELT et al., 2004). Die Metastabilität von Brushit bei einem pH-Wert von 7,4 kann jedoch auch dazu führen, dass es zu einer Umwandlung zu Hydroxylapatit kommt, und so eine weitere Resorption verhindert wird (TAN et al., 2011; ALGE et al., 2012).

Das Degradationsverhalten hängt von der Zusammensetzung des Materials, der Partikelgröße, der Kristallinität und der Porosität ab. Ein weiterer Punkt, der das Degradationsverhalten bestimmt, ist das Implantationsmodell (Tiermodell,

Defekt- bzw. Implantatgröße, Lokalisation und die damit verbundene Vaskularisation und mechanische Belastung). Je größer die angreifbare Oberfläche des Implantates ist, desto schneller kann eine Resorption erfolgen. Eine hohe Porosität und eventuelle Risse, die durch eine mechanische Belastung entstehen können, vergrößern die Oberfläche des Zementes und führen zu einer schnelleren Degradation. (LEGEROS, 1993; CONSTANTZ et al., 1998; LU et al., 2002). Eine mechanische Belastung im Implantatbereich kann außerdem je nach Steifigkeit des Implantats zu unterschiedlich starken Mikrobewegungen zwischen Implantat und Knochengewebe führen und den Prozess des Knochenremodellings beeinflussen. Simon et al. konnten zeigen, dass sich an Bereichen, an denen höhere Kontaktkräfte zwischen Implantat und Knochen herrschten, sechs Monate nach Implantation dichtes Knochengewebe gebildet hatte, während sich in unbelasteten Bereichen desselben Implantates die Knochendichte verringerte (SIMON et al., 2003). Das entspricht dem Wolff'schen Gesetz, dass sich die Knochenstruktur im Rahmen eines kontinuierlichen Umbauprozesses an die Belastungen anpasst (WOLFF, 1892). Durch eine gesteigerte Remodelling-Aktivität könnte auch die Degradation des Implantates gesteigert werden.

1.3.4.3 Einfluss der Degradationsprodukte und Matrix-Mineralisierung

Sowohl beim Abbau von Knochengewebe als auch bei der Degradation von Calciumphosphat-Implantaten werden Calcium- und Phosphationen freigesetzt, so dass es zur einer lokalen Erhöhung der extrazellulären Ionenkonzentration über den physiologischen Bereich kommt. Zum einen können direkt wieder CDHA-Nanokristalle ausfallen, die sich dann mit organischen Bestandteilen aus der umgebenden Flüssigkeit verbinden (DOROZHKIN, 2011). Zum anderen verfügen Osteoblasten (und andere Zellen) über Calcium-sensitive Rezeptoren und werden von hohen Calciumkonzentrationen chemotaktisch angezogen (BREITWIESER, 2008). Außerdem wird die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten durch die extrazelluläre Calciumkonzentration beeinflusst. Dabei konnten Maeno et al. *in vitro* feststellen, dass Konzentrationen von 2 - 4 mM Ca^{2+} günstig für die Proliferation und Viabilität von Osteoblasten sind, während Konzentrationen von 6 - 8 mM Ca^{2+} die Differenzierung und Matrix-

Mineralisierung fördern. Konzentrationen $> 10 \text{ mM Ca}^{2+}$ dagegen sind für Osteoblasten toxisch (MAENO et al., 2005). Hohe extrazelluläre Calciumkonzentrationen führen außerdem zur Apoptose von Osteoklasten (LORGET et al., 2000). Neben Calciumionen werden beim Abbau von Knochengewebe bzw. von Implantaten auf Calciumphosphat-Basis auch Phosphationen freigesetzt. Anorganisches Phosphat PO_4^{3-} spielt beim Zellzyklus und der Proliferation sowie bei der Matrixmineralisation ebenfalls eine wichtige Rolle. Hohe extrazelluläre Phosphatkonzentrationen führen zum Zelltod von Osteoblasten (CHAI et al., 2012).

Um funktionelles Knochengewebe zu erhalten, muss eine Mineralisierung der Knochenmatrix stattfinden. Knochengewebe besteht aus einer organischen Matrix (hauptsächlich Kollagenfibrillen) und aus einer anorganischen Phase (hauptsächlich carbonisierter Hydroxylapatit (CHA). Calciumphosphat spielt bei der Matrix-Mineralisierung im Rahmen der Knochenbildung eine wichtige Rolle. Zur Matrix-Mineralisierung gibt es zwei Theorien: Bei der direkten Kristallkeimbildung von Calciumphosphaten an den Kollagenfibrillen lagern sich extrazellulär gebildete Mineral-Tröpfchen (Calciumphosphat-Cluster-Biopolymer-Komplexe) direkt an eine Kollagenfaser an und dringen in die Kollagenfibrille ein. Über eine amorphe Zwischenstufe werden dann gerichtete Hydroxylapatit-Kristalle gebildet. Bei der zweiten Theorie werden sogenannte Matrix-Vesikel von Osteoblasten und Chondrozyten gebildet. Die freigesetzten Vesikel bleiben zwischen den Kollagenfibrillen hängen und die in ihnen enthaltenen Calciumphosphatkristalle führen zur Mineralisation. In beiden Fällen können die beim Abbau von Knochengewebe bzw. von synthetischen Calciumphosphaten freigesetzten Ionen verwendet werden (ANDERSON et al., 2005; COLFEN, 2010; CHAI et al., 2012).

1.4 Magnesiumphosphat-Zemente

Magnesiumphosphate kommen biologisch als pathologische Kalzifizierungen z.B. in Nierensteinen vor (VORNDRAN et al., 2011). Als Medizinprodukt werden sie bisher noch nicht eingesetzt. Sie werden aber mit wachsendem Interesse in *in vitro*- und *in vivo*-Studien untersucht und es sind bereits mehrere Patente für Magnesiumphosphat-Zemente für den biomedizinischen Einsatz angemeldet

(LIU, 2006; BARRALET et al., 2013; GBURECK, 2013; GINEBRA & MESTRES, 2013). Dabei muss zwischen Calcium-Phosphaten, bei denen Magnesium als bioaktives Ion anstelle von Calcium ausgetauscht wird, und reinen Magnesiumphosphaten unterschieden werden. Klammert et al. untersuchten Calcium-Magnesiumphosphat-Zemente im System $Mg_xCa_{(3-x)}(PO_4)_2$, mit $0 < x < 3$, und propagierten Newberit ($Mg_{2,25}Ca_{0,75}PO_4)_2$) aufgrund seiner *in vitro*-Biokompatibilität und seiner gegenüber Brushit besseren mechanischen Eigenschaften als geeignetes Knochenersatzmaterial (KLAMMERT et al., 2010). Ewald et al. sehen Struvit (Ammonium-Magnesiumphosphat, $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$) als mögliches geeignetes Knochenersatzmaterial, da er neben einer guten Zytokompatibilität eine bessere Löslichkeit als Brushit aufweist und im Gegensatz zu Brushit bei einem physiologischen pH-Wert abbindet (EWALD et al., 2011).

Magnesiumphosphat-Zemente unterscheiden sich von Calciumphosphat-Zementen hinsichtlich ihrer Zusammensetzung. Für ihre Eigenschaften wie Porosität etc. gelten die gleichen Prinzipien wie für Calciumphosphat-Zemente. Brushit- und Struvit-Zemente wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* heterotop im Kaninchenmodell hinsichtlich ihrer Zyto- bzw. Biokompatibilität und ihres Degradationsverhaltens untersucht. Dabei waren alle untersuchten Zemente zyto- bzw. biokompatibel, allerdings zeigte Struvit die größte Reduktion des Implantatvolumens (KLAMMERT et al., 2009; GROSSARDT et al., 2010; KLAMMERT et al., 2010; KLAMMERT et al., 2011).

2 ZIELSETZUNG

Ziel der Studie war es, die Biokompatibilität, die Osseointegration und das Degradationsverhalten von einem Calcium- und einem Magnesium-Phosphat-Zement in Abhängigkeit ihrer Porosität *in vivo* zu untersuchen. Dazu wurden ein unbelasteter sowie ein teilbelasteter trabekulärer Knochendefekt im Schafmodell verwendet. Des Weiteren wurden Formkörper subkutan implantiert, um den Unterschied zwischen heterotoper und orthotoper Implantation zu untersuchen.

Es werden folgende Hypothesen aufgestellt:

- 1. Die untersuchten Bruschit- und Struvit-Zemente sind aufgrund ihres biologischen Verhaltens als resorbierbares Knochenersatzmaterial geeignet.*
- 2. Eine höhere Porosität (PLR 2,0) degradiert schneller als eine niedrigere Porosität (PLR 3,0).*
- 3. In einem teilbelasteten Defektmodell (Tibiaplateau) findet eine schnellere Degradation der Biomaterialien statt, als im einem unbelasteten Defektmodell (Femurkondyle).*

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zemente

Allgemein

Die Zemente wurden vom Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde der Universität Würzburg entwickelt und hergestellt, sowie mittels Quecksilberporosimetrie, Temperatur- und pH-Wert-Profilen charakterisiert (siehe Anhang, Abbildungen 78 bis 80). Alle Pulver- und Flüssigkeitskomponenten waren portionsweise in Glasflaschen abgefüllt. Die Pulver sowie die elektrischen Kaffeemühlen, die für die intraoperative Herstellung der Bruschit-Zemente nötig waren, wurden bei 25 kGy gammasterilisiert und die Flüssigkeiten bei 121°C für zwei Stunden autoklaviert. Abb. 7 zeigt die Utensilien für die intraoperative Herstellung der Bruschit-Zemente.

Von jeder Zementvariante wurden ebenfalls in Würzburg Formkörper zur subkutanen Implantation in Form von flachen Zylindern ($d = 10 \text{ mm}$, $h = 5 \text{ mm}$, Abb. 8) hergestellt. Dazu wurde die Zementpaste in Silikon-Gießformen eingebracht. Nach dem Aushärten wurden die Formkörper unter einer Sterilbank mit 70%igen Ethanol durchtränkt und anschließend getrocknet. Jeweils 5 Implantate einer Zementformulierung waren in einem sterilen 15 ml Röhrchen (BD Falcon™ Conical Tubes, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) verpackt.

3.1.1 Bruschit

Bruschit ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) oder Dicalciumphosphatdihydrat, DCPD, ist ein Calciumphosphat, das sich bei einem pH-Wert $< 4,2$ bildet (GINEBRA et al., 2010). Um Bruschit herzustellen gibt es verschiedene Rezepturen (TAMIMI et al., 2012). Für diese Studie wurden zunächst die zwei pulverförmigen Komponenten (10 g $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ und 7,554 g $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$) in einer elektrischen Kaffeemühle miteinander vermischt. Um zwei unterschiedliche Pulver-

Flüssigkeitsverhältnisse herzustellen, wurden für PLR 3,0 5,85 ml und für PLR 2,0 8,78 ml 0,5 molare Zitronensäure hinzugegeben. Die Zitronensäure diente nicht nur als flüssige Phase sondern auch als Abbindeverzögerer, da Brushit sonst zu schnell abgebunden hätte (BOHNER & GBURECK, 2008).

Der Zement wurde ca. eine Minute in einem sterilen Becherglas mit einem Spatel verrührt und anschließend in eine sterile 5 ml Spritze (Injekt[®]5ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) überführt. Die ersten Tropfen wurden verworfen, um die Viskosität zu überprüfen. Wenn die gewünschte Konsistenz erreicht war, konnte der Zement ohne aufgesetzte Kanüle in die Defekte injiziert werden.

Um die optimale Viskosität zu erreichen, musste bei PLR 2,0 ca. drei Minuten und bei PLR 3,0 ca. zwei Minuten gewartet werden. Nach weiteren zwei bis vier Minuten war der Zement ausgehärtet, so dass das Operationsgebiet abschließend mit physiologischer Natriumchlorid-Lösung gespült werden konnte.

Kontrolliert wurde das Abbindeverhalten auch bei dem im Becherglas verbliebenen Rest.



Abb. 7: Utensilien für die Zementherstellung (Brushit)



Abb. 8: Formkörper zur subkutanen Implantation

3.1.2 Struvit

Bei Struvit handelt es sich um ein Magnesiumphosphat ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Zur Herstellung wurden 10 g pulverförmiges $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ mit 3,33 ml bzw. 5,0 ml 3.5M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ Lösung für PLR 3,0 bzw. PLR 2,0 vermischt. Struvit bindet

sehr schnell ab, so dass PLR 3,0 auf einer Glasplatte angemischt und als Paste mit einem Spatel eingebracht wurde (Abb. 9), während PLR 2,0 in einem Becherglas angesetzt und zügig in eine 5ml Spritze überführt wurde, so dass dieser Zement injiziert werden konnte (Abb. 10).

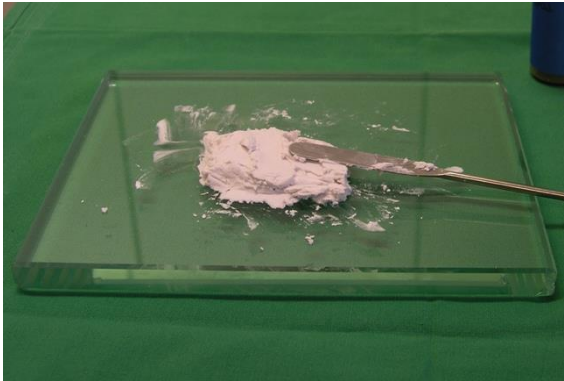


Abb. 9: Struvit PLR 3,0
pastöse Konsistenz



Abb. 10: Struvit-Zement PLR 2,0
injizierbar

3.1.3 Hydroxylapatit

Für diese Studie wurden 10 g pulverförmiges $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ und 3,03 ml 2.5 wt% Na_2HPO_4 Lösung verwendet, so dass als Abbindeprodukt ein calciumdefizitärer Hydroxylapatit ($\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_5\text{HPO}_4\text{OH}$) mit einer PLR von 3,3 entstand.

CDHA diente in dieser Studie als Referenz-Zement. Da bei den früheren Zeitpunkten keine Resorption zu erwarten war (APELT et al., 2004), erfolgte die Implantation hier nur über 10 Monate.

In Tabelle 1 sind die Reaktionsgleichungen der untersuchten Zemente zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 1: Reaktionsgleichungen der Zemente

$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	+ $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	+ $8\text{H}_2\text{O}$	\longrightarrow	$4\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Bruschit-Zement
$2\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$	+ $3(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	+ $36\text{H}_2\text{O}$	\longrightarrow	$6\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Struvit-Zement
$3\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$		+ H_2O	\longrightarrow	$\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_5\text{HPO}_4\text{OH}$	Hydroxylapatit-Zement

3.2 Tierversuch

Der Tierversuch wurde nach den Vorgaben des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 18.05.2006 und den internationalen Richtlinien der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Association) durchgeführt und am 13.09.2011 vom Regierungspräsidium Tübingen unter der Reg.-Nr. 1070 genehmigt.

3.2.1 Tiermodell

Für diese Studie wurden 49 ausgewachsene weibliche Merino-Schafe verwendet, welche aus einem Schäferbetrieb aus der näheren Umgebung stammten. Die Tiere waren zwischen 4 und 6 Jahre alt und hatten ein durchschnittliches Körpergewicht von 90 kg (70 - 110 kg).

Die Schafe wurden zwei Wochen vor Beginn des Experimentes angeliefert, um sie an das neue Umfeld zu gewöhnen. Des Weiteren wurden sie mit 8 mg/kg Levamisolhydrochlorid (Ripercol Drench 88,5 mg/ml, Lösung zum Eingeben für Rinder und Schafe, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) p.o. entwurmt. Die Haltung erfolgte in kleinen Gruppen in Stallungen des Tierforschungszentrums Oberberghof der Universität Ulm. Die Boxen waren mit Stroh eingestreut, Wasser und Heu standen ad libitum zur Verfügung. Zusätzlich bekamen die Schafe einmal täglich Graspellets und ein Standard-Diät-Futtermittel für kleine Wiederkäuer in der Versuchstierhaltung (Altromin Standarddiät für kleine Klauentiere, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland). Über eine Zeitschaltuhr wurde mit einer künstlichen Lichtquelle ein konstanter Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden simuliert.

3.2.2 Implantationsmodell und Zeitplan

Es wurden 7 Gruppen à 7 Schafen an beiden Hintergliedmaßen operiert. Als Implantationsmodell diente ein unbelasteter Bohrlochdefekt ($d = 10 \text{ mm}$, $l = 15 \text{ mm}$) in der medialen distalen Femurkondyle, sowie ein teilbelasteter keilförmiger Defekt ($l = 24 \text{ mm}$, $b = 14 \text{ mm}$, $h = 6 \text{ mm}$), welcher auf der medialen Seite der Tibia 3 mm unterhalb und parallel zum Tibiaplateau gesetzt

wurde (IGNATIUS et al., 1997; SIMON et al., 2003; IGNATIUS et al., 2005). Jedes Tier erhielt jeweils zwei Porositäten einer Zementformulierung, wobei pro Seite dieselbe Porosität für Femur und Tibia Verwendung fand. Die Implantationszeiträume waren 4, 7 und 10 Monate (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Einteilung der Versuchsgruppen

Material	Implantationszeitraum			Tierzahl
	4 Monate	7 Monate	10 Monate	
Struvit PLR 2,0 / 3,0	7	7	7	21
Bruschit PLR 2,0 / 3,0	7	7	7	21
Hydroxylapatit / Leerdefekt	-	-	7	7
				49

3.2.3 Operation

Präoperativ wurde den Tieren für 48 Stunden das Futter entzogen, um ein Regurgitieren während der OP zu vermeiden. Wasser stand über Selbsttränken ad libitum zur Verfügung.

Zur Prämedikation erhielten die Schafe 0,3 mg/kg KGW Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2 %, Injektionslösung für Tiere: Rinder, Pferde, Hunde, Katzen; Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) i.m., sowie als Analgesie 2 mg/kg KGW Carprofen (Rimadyl® 50 mg/kg, Pfizer Corporation Austria, Wien, Österreich) s.c. und 10 mg/kg KGW Amoxicillin-Trihydrat (Veyxyl-LA® 20 %, Vexy-Pharma GmbH, Schwarzenborn, Deutschland) s.c. als Infektionsprophylaxe.

Nachdem eine leichte Sedation eingetreten war, wurde ein Venenverweilkatheter (Vasofix® Braunüle 20 G, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in die Vena auricularis gelegt und über diesen bis zu 10 mg/kg KGW Thiopental-Natrium (Thiopental Inresa ® 0,5 g, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland) langsam nach Wirkung appliziert.

Direkt nach dem Ablegen wurden die Tiere intubiert und die Narkose mit 1 - 2 % Isofluran (Forene®, Abbott GmbH & Co KG, Ludwigshafen, Deutschland) und Sauerstoff (1,2 -1,4 l/min) aufrechterhalten. Die Narkosetiefe wurde regelmäßig überwacht und die Sauerstoffsättigung mittels eines Pulsoxymeters kontrolliert. Durch das Legen einer Pansensonde nach dem Intubieren sollte ein Aufgasen des Pansens verhindert werden. Um die Flüssigkeitsversorgung während der Operation zu gewährleisten, erhielten die Schafe über den venösen Zugang 10ml/kg KGW/h einer Elektrolyt-Infusionslösung (Jonosteril Infusionslösung, Fresenius Kabi Deutschland GmbH).

Für die Operation wurden die Tiere in Rückenlage auf einer Wärmedecke gelagert. Beide Hintergliedmaßen wurden geschoren, zweimal mit Jodseife (Jodosept®, Vétoquinol GmbH, Ravensburg, Deutschland) gewaschen, mit 70 %igen Ethanol entfettet und mit einem Hautantiseptikum (Frekaderm® Hautdesinfektion, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) desinfiziert. Anschließend folgte das Eindecken des Schafes mit sterilen Tüchern, so dass nur das Operationsfeld frei blieb. Die Operationen fanden unter sterilen Kautelen statt.

3.2.3.1 Operation Zugang

Die Operation erfolgte bilateral, wobei stets mit der rechten Seite begonnen wurde. Nach Inzision der Haut auf der medialen Seite des Kniegelenks wurde bis auf die *Fascia genus* präpariert. Diese wurde dann ca. 1 cm distal des Gelenkspaltes eröffnet um das *Lig. collaterale mediale* (Abb. 11) darzustellen. Ein Periost-Flap wurde auf der medialen Fläche der Tibia zwischen dem *Lig. collaterale mediale* und dem *Lig. patellae* über ca. 3 cm von distal nach proximal bis zum Gelenkspalt abpräpariert (Abb. 12).

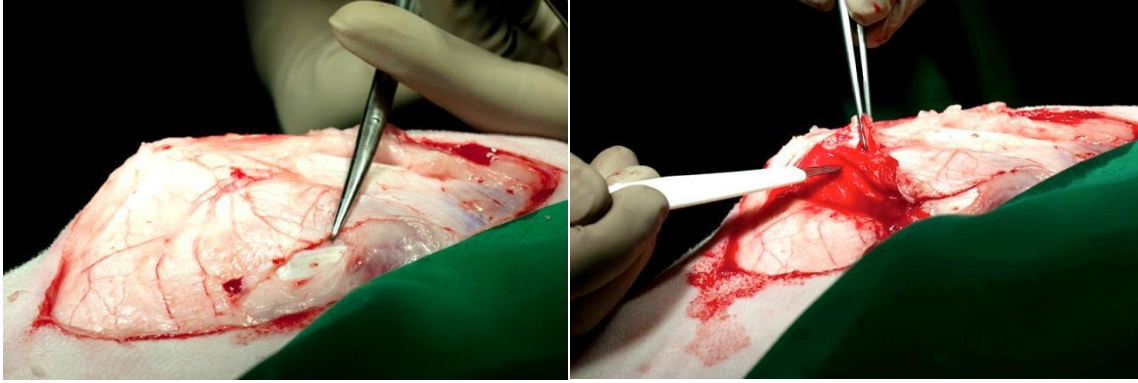


Abb. 11: Lig. collaterale mediale

Abb. 12: Präparation Periost-Flap

3.2.3.2 Operation Tibia-Defekt

Um eine spezielle Fräslehre (Eigenkonstruktion des Institutes für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Universitätsklinikum Ulm) zu positionieren, wurden zwei Kirschner Drähte (l = 15 cm, d = 0,15 cm, Aesculap, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) 3 mm unterhalb des Gelenkspaltes eingebracht. Der erste Draht wurde dorsal des *Lig. collaterale mediale*, der zweite weiter dorsal im Bereich der *Tuberositas tibiae* plziert (Abb. 13). An der Fräslehre wurde zunächst eine Positionshilfe befestigt, welche anhand der Kirschnerdrähte ausgerichtet werden konnte (Abb. 14).

Zur Befestigung der Fräslehre wurden unikortikale Bohrungen (d = 2,5 mm) in der Diaphyse der Tibia angelegt und Kortikalis-Schrauben (d = 2,7 mm, l = 16 mm, Synthes GmbH, Umkirch bei Freiburg, Deutschland) eingesetzt (Abb. 15). Zusätzlich wurde die Fräslehre mit drei Stellschrauben ausgerichtet. Nach dem Fixieren der Fräslehre konnten die Kirschner-Drähte und die Positionshilfe wieder entfernt werden.



Abb. 13: Setzen der Kirschner Drähte

Abb. 14: Ausrichten der Fräslehre mit Positionshilfe

Abb. 15: Befestigung der Fräslehre

Unter Kühlung mit physiologischer Natriumchlorid-Lösung (NaCl 0,9 % B.Braun Spüllösung, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurde in mehreren Schritten mit einer 6 mm breiten Fräse gearbeitet (Abb. 16), bis die gewünschte Größe erreicht worden war.

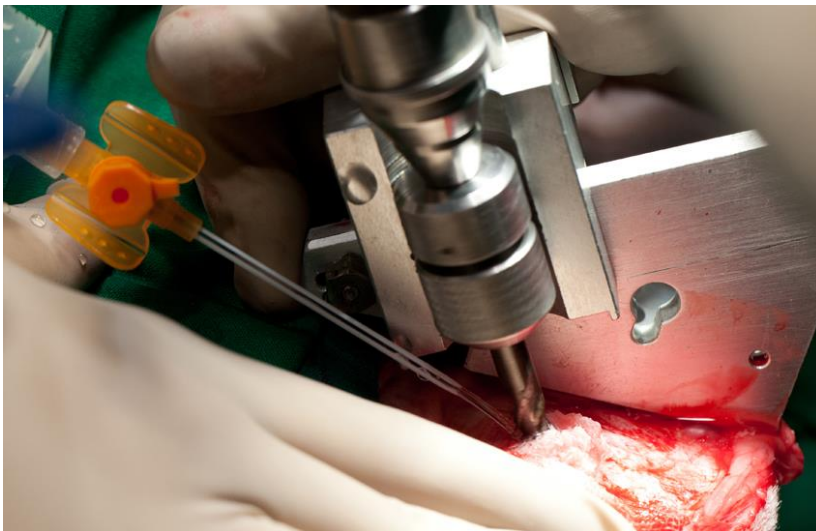


Abb. 16: Fräsen des keilförmigen Defektes unter Kühlung mit physiologischer Kochsalzlösung

Die Überprüfung der Defektgröße erfolgte mit Hilfe eines Probeimplantates (Abb. 17). Zwischen den einzelnen Fräsvorgängen wurde immer wieder das entstandene Knochenmehl entfernt und der Fräskopf gereinigt. Abschließend wurden die Knochenränder sauber präpariert, der Defekt mit physiologischer

Natriumchlorid-Lösung (NaCl 0,9 % B.Braun Spüllösung, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gespült und mit einer Kompresse austamponiert.

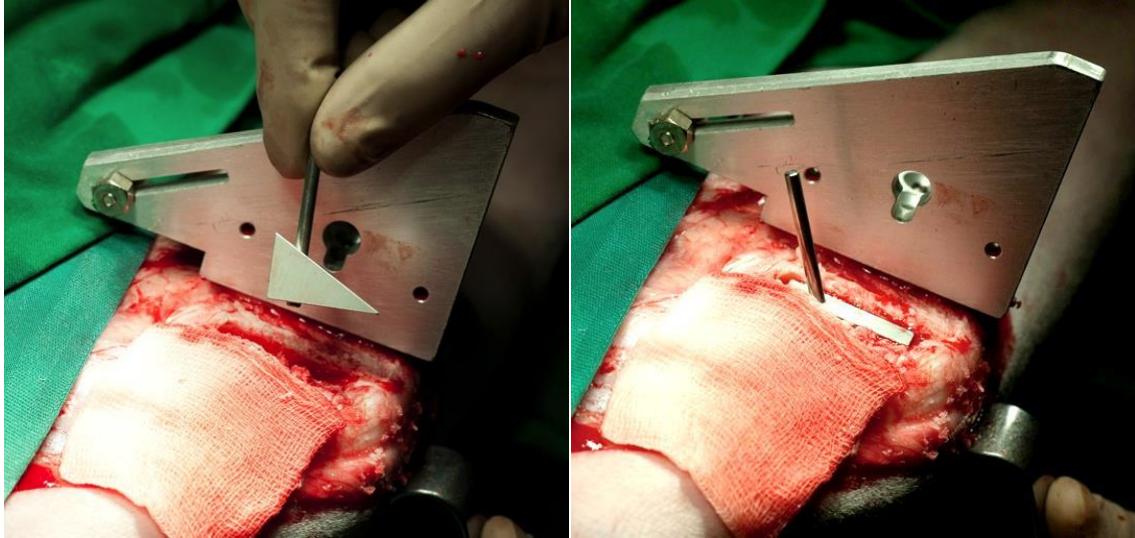


Abb. 17: Überprüfung der Defektgröße mit einem Probeimplantat

3.2.3.3 Operation Femur-Defekt

Für den Zugang zur medialen Femurkondyle wurde der Faszienchnitt in Richtung Patella ca. 2 cm erweitert und der *M. rectus femoris* retrahiert. Um eine bessere Führung für den 10 mm Bohrer zu haben, erfolgte zunächst eine Vorbohrung mit einem 2,5 mm Bohrer. Mit Hilfe eines Abstandhalters wurde gewährleistet, dass der 10 mm Bohrer nicht zu tief eindringen konnte und alle Defekte die gleichen Dimensionen aufwiesen (Abb. 18). Nachdem die Knochenspäne entfernt worden waren, wurde das Gewebe um das Bohrloch sauber präpariert, der Defekt gespült und mit einer sterilen Kompresse trocken gehalten.



Abb. 18: Setzen des Bohrlochdefektes **Abb. 19: Füllen des Dreieckdefektes mit Zement**
in der medialen Femurkondyle

Das Anmischen der Zemente erfolgte wie oben beschrieben. Zuerst wurde immer der keilförmige Defekt (Abb. 19) und anschließend das Bohrloch mit Zement gefüllt. Erst wenn der Zement ausgehärtet war, wurde das Operationsfeld mit physiologischer Natriumchlorid-Lösung (NaCl 0,9 % B.Braun Spüllösung, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gespült. Periost, Faszie und Unterhaut wurden mittels Einzelknopfheften mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl® 2-0, Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Neuss, Deutschland) adaptiert.

3.2.3.4 Operation subkutane Implantate

Vor Verschluss der Haut durch Einzelhefte mit einem nicht resorbierbaren Faden (Resolon® 3-0, Resorba Wundversorgung GmbH & Co. KG, Nürnberg, Deutschland) wurden distal und medial je eine subkutane Tasche stumpf präpariert und 3 bzw. 2 Implantate eingebracht. Der Abstand zur Hautinzision betrug dabei jeweils mindestens 5 cm.

Mit der linken Gliedmaße wurde ebenso verfahren wie mit der rechten, wobei die kontralaterale Seite jeweils den gleichen Zementtyp, aber mit der anderen Porosität, erhielt.

3.2.4 Versorgung der Tiere post OP

Im Stall wurden die Schafe, sobald der Schluckreflex einsetzte, extubiert und der Venenverweilkatheter wurde entfernt. Bis zum Erreichen des vollständigen Stehvermögens wurden die Tiere überwacht und in Einzelboxen gehalten. Bis zum Entfernen der Hauthefte am 14. Tag *post operationem* standen jeweils nur 2 Tiere in einer Box. Danach wurden die Schafe wieder in größeren Gruppen zusammengefasst.

An den ersten drei postoperativen Tagen erhielten die Schafe als Schmerzmedikation und Infektionsprophylaxe weiterhin einmal täglich 2mg/kg Carprofen s.c. (Rimadyl[®] 50mg/kg, Pfizer Corporation Austria, Wien, Österreich) und 10 mg/kg Amoxicillin-Trihydrat s.c. (Veyxyl-LA[®] 20 %, Vexy-Pharma GmbH, Schwarzenborn, Deutschland).

Die Kontrolle der Körperinnentemperatur, des Gangbildes und der Wunden erfolgte in der ersten Woche *post operationem* täglich und ab der zweiten Woche dreimal wöchentlich.

Nach Ende des jeweiligen Implantationszeitraumes wurden die Schafe durch geschultes Personal des Tierforschungszentrums mittels Bolzenschuss betäubt und durch Blutentzug getötet. Für die weiteren Untersuchungen wurden beide Hintergliedmaßen im Hüftgelenk abgetrennt.

3.3 Aufarbeitung der Proben

3.3.1 Präparation

Zunächst wurden im Unterhautgewebe die subkutanen Implantate frei präpariert und umgehend in 4 %iger Formaldehyd-Lösung fixiert. Jeweils zwei der subkutanen Implantate wurden im Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnmedizin der Universität Würzburg im Hinblick auf ihre chemische Zusammensetzung mittels Pulverdiffraktometrie untersucht. Die übrigen subkutanen Implantate dienten für die histologische Auswertung. Die Femora und Tibien wurden bis auf den Knochen präpariert und fotografiert. Die Kondylen wurden mit einer Diamant-Bandsäge (EXAKT 300, EXAKT Advanced

Technologies GmbH, Norderstedt, Deutschland) von der Diaphyse getrennt. Anschließend wurden proximo-distale Röntgenaufnahmen (Faxitron 43805N, Hewlett Packard, McMinnville, Oregon, USA) bei 40 kV und 5 Minuten Belichtungszeit erstellt.

Von beiden Knochenproben wurde der *Condylus lateralis* abgetrennt (Abb. 20, Abb. 21: Schritt 1) und verworfen. Es folgte eine zweite Röntgenaufnahme in medio-lateraler Projektion.

In einem nächsten Schritt wurde der *Condylus medialis* von Femur und Tibia jeweils medial mit einer rotierenden Schleifmaschine (EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt, Deutschland) angeschliffen (Abb. 20, 21: Schritt 2). Wenn der Zement gut sichtbar war, wurden die Proben fotografiert. Es erfolgte umgehend die Fixation der Tibien in Formaldehyd (4 %). Die Femora wurden in ca. 3 x 3 x 2 cm große Quader gesägt, wobei sich das Implantat zentral befand (Abb. 20: Schritte 3, 4). Von diesen Quadern wurde eine 5 mm dicke, planparallele Scheibe senkrecht zur Achse des Implantatzylinders abgesägt (Abb. 20: Schritt 5). Die Lagerung dieser Scheibe erfolgte bis zur biomechanischen Untersuchung in physiologischer Natriumchlorid-Lösung (NaCl 0,9% B.Braun Spüllösung, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland), während der übrige Teil in Formaldehyd (4 %) fixiert wurde.

Von der Rückseite der Implantate her, also von lateral, wurden sowohl bei den Tibia-, als auch bei den Femora-Proben 1 mm dünne Scheiben abgetragen, bis der Zement sichtbar wurde. Dann wurde eine 1 bis 2 mm dünne Scheibe für die Herstellung von Paraffin-Schnitten abgetrennt (Abb. 20: Schritt 6 bzw. Abb. 21: Schritte 4, 5) und separat in Formaldehyd (4 %) fixiert.

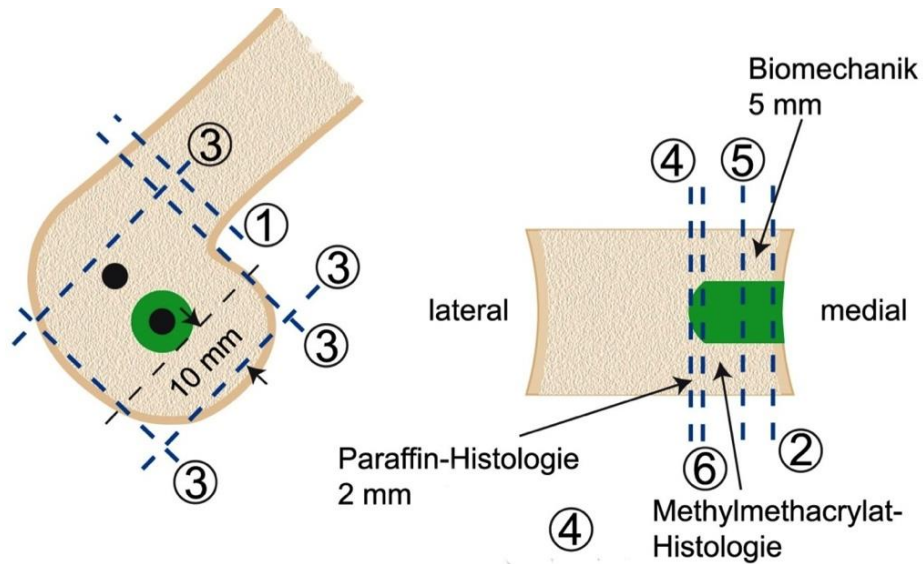


Abb. 20: Schema zur Aufarbeitung der Femur-Kondylen:

Die Zahlen beschreiben die Folge der einzelnen Sägeschritte. Das Implantat ist grün dargestellt, die Stellen für den biomechanischen Indentationstest im Zement und im trabekulären Knochengewebe sind als schwarze Punkte dargestellt.

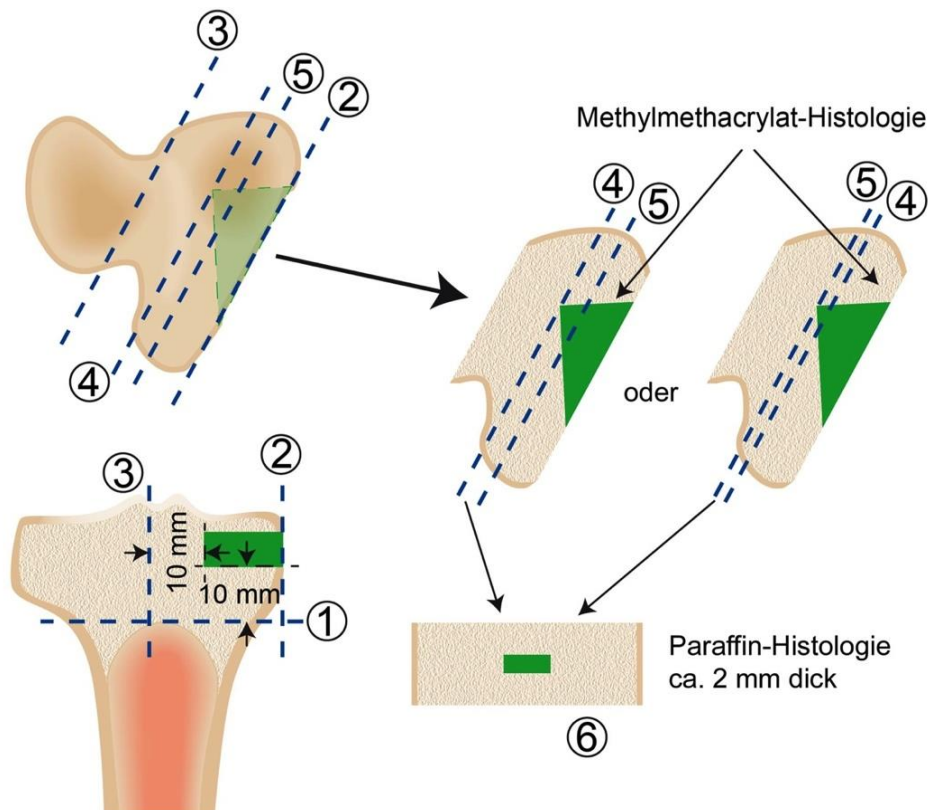


Abb. 21: Schema Aufarbeitung des Tibiaplateaus:

Die Zahlen beschreiben die Folge der einzelnen Sägeschritte. Das Implantat ist grün dargestellt.

3.3.2 Biomechanik: Indentationstest

Die Durchführung des Indentationstestes erfolgte mit einer Materialprüfmaschine (Z 10, Zwick GmbH & Co. KG). Dabei wurden ein Kraftaufnehmer vom Typ Z 12 (Zwick GmbH & Co.KG, Ulm, Deutschland) mit einem Messbereich von ≤ 10 kN und einer Messgenauigkeit von $\leq 0,25\%$ verwendet. Als Wegaufnehmer diente ein Messtaster MT 1201 (Dr. Johannes Heidenhain GmbH, Traunreut, Deutschland) mit einem Messbereich von 12mm und einer Genauigkeit von $\pm 1 \mu\text{m}$.

Unmittelbar nach der Präparation wurden die unfixierten, aber mit physiologischer Natriumchlorid-Lösung (NaCl 0,9% B.Braun Spüllösung, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) feucht gehaltenen Femur-Scheiben flach auf einer starren Druckplatte (Zwick GmbH & Co.KG, Ulm, Deutschland) so platziert, dass sich ein planer Druckstempel mit einem Durchmesser von 4 mm (Eigenkonstruktion des Institutes für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Universitätsklinikum Ulm) zentral über dem Implantat befand (Abb. 22). Mit einer Vorkraft von 2 N und einer Prüfgeschwindigkeit von 1 mm/min wurde der Indentationstest durchgeführt und mittels der dazugehörigen Software (testXpert[®] II Version 3.2, Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland) ein Kraft-Weg-Diagramm erstellt. Im linearen Bereich des Graphen konnte anhand der Steigung die Steifigkeit ermittelt werden (Abb. 23). Die ursprüngliche Höhe der Proben (L_0) ging dabei mit in die Berechnung ein:

$$\text{Steifigkeit} = \text{Steigung} / L_0 * 5 \text{ mm.}$$

Nach dem biomechanischen Test wurden die Proben in Formaldehyd (4 %) fixiert und für die Phasenanalyse an die Universität Würzburg geschickt.



Abb. 22: Versuchsaufbau
Biomechanik

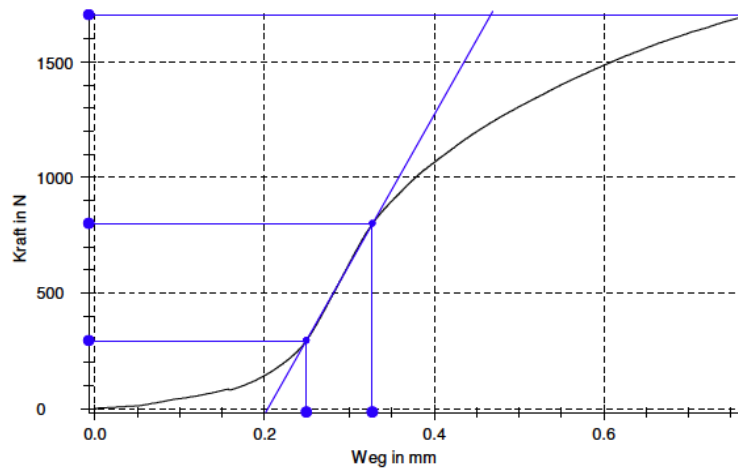


Abb. 23: Kraft-Weg-Diagramm mit eingezeichneter Steigung im linearen Bereich

3.3.3 Mikro-Computer-Tomographie

Die zugesägten und in Formaldehyd (4 %) fixierten Femurproben wurden in einem Mikro-Computer-Tomograph (Skyscan 1127, BRUKER-microCT, Kontich, Belgien) mit einer Auflösung von 30 μm gescannt und mit der dazugehörigen Software SkyscanTM CT-Analyser (BRUKER-microCT, Kontich, Belgien) ausgewertet. Bei jedem Scan wurden zwei Phantome mit bekannter Hydroxylapatitmenge (250 mg HA/cm³ und 750 mg HA/cm³), BRUKER-microCT, Kontich, Belgien) mitgeführt, um die Graustufen zu kalibrieren und die Mineraldichte (mineral density, MD) zu bestimmen. Für die Ermittlung der Mineraldichte wurde kein Grenzwert gesetzt. Die Auswertung erfolgte über einen 1 mm hohen Bereich des jeweiligen Präparates. Da der Zement und der trabekuläre Knochen eine ähnliche Röntgendichte besitzen, war es nicht möglich, den Zementanteil durch Setzen eines bestimmten Grenzwertes innerhalb der Graustufen zu bestimmen. Deshalb wurde als Basis ein kreisförmiges Volume of Interest (VOI) mit einem Durchmesser von 14 mm gewählt (Abb. 25), so dass das Implantat im Zentrum dieses Zylinders lag. Davon ausgehend wurden aufeinanderfolgende ringförmige VOIs mit einer Ringbreite von 1 mm (siehe Abb. 26) bis zu einem zentralen Zylinder mit einem

Durchmesser von 2 mm gesetzt. Der Bereich außerhalb des 14 mm Zylinders stellte den peripheren Knochen dar (Abb. 24).

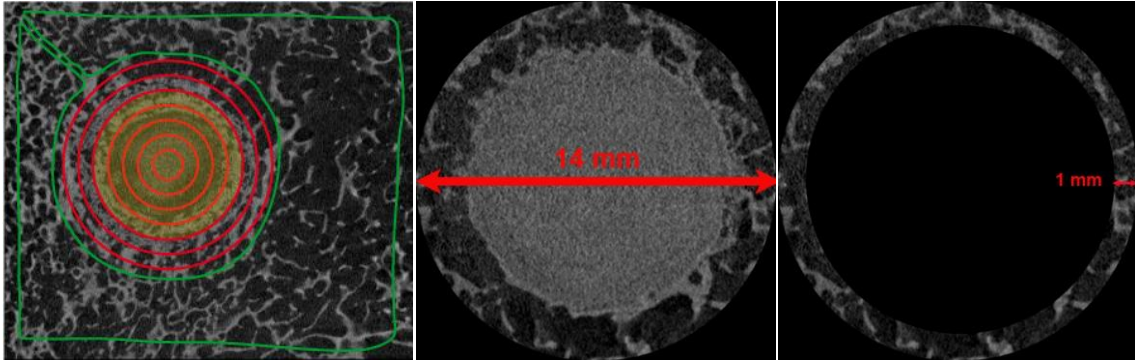


Abb. 24: VOIs μ -CT:
 grün = peripherer Knochen,
 rot = einzelne Ringgrenzen,
 gelb hinterlegt = Defektgröße
 (d = 10 mm)

Abb. 25: Basis-VOI,
 d = 14 mm

Abb. 26: VOI 12-14

Um den Knochenanteil des Gesamtvolumens (bone volume/total volume, BV/TV) zu bestimmen, wurde zunächst ein Grenzwert von 641,9 mg HA/cm³ festgelegt (MORGAN et al., 2009). Da BV/TV im Bereich des Zementes nicht die korrekte Bezeichnung gewesen wäre, wurde für diese Auswertung der Begriff „Röntgendichtes Volumen/Gesamtes Volumen“ (RV/GV) eingeführt.

Um die Struvit-Zemente noch deutlicher vom trabekulären Knochen zu separieren, wurde in diesen Gruppen der Grenzwert bei 355,8 mg HA/cm³ gesetzt. Dieser Wert entsprach der in dieser Studie ermittelten mittleren Mineraldichte des peripheren Knochens.

3.3.4 Histologie

3.3.4.1 Kunststoff-Schliffe

Anfertigung

Es wurden sowohl von den Knochenproben als auch von den subkutanen Implantaten Kunststoff-Schliffe nach der Säge-Schliff-Technik von Donath (DONATH & BREUNER, 1982) angefertigt. Zunächst erfolgte die Fixation der

Präparate für zwei bis fünf Tage in 4 %iger Formaldehyd-Lösung, bevor sie mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (40 - 100 %iges Ethanol) entwässert und mit 100 %igem Xylol entfettet wurden. Anschließend wurden die Proben über mindestens drei Wochen mit Kunstharz (Methylmethacrylat Monomer, MMC, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) infiltriert. Die Aushärtung erfolgte unter Zugabe von Benzoylperoxid (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) als Reaktionsbeschleuniger sowie Nonylphenyl-Polyethylenglykol-Acetat (Sigma-Aldrich Co. LLC, Saint Louis, Missouri, USA) als Weichmacher. Von den planparallel zwischen 2 Objektträgern aufgeklebten Gewebeblöcken wurden ca. 1 mm dünne Trennschnitte mit einer Diamant-Bandsäge (EXAKT 300, EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt, Deutschland) angefertigt. Von diesen konnten dann mit einem Mikroschleifsystem (EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt, Deutschland) Dünnschliffe mit einer Schliffdicke von 80 - 120 µm angefertigt werden.

Die polierten Dünnschliffe der Knochenpräparate wurden mit Toluidin-Blau und Fuchsin angefärbt (ROMEIS et al., 1989), so dass sich Zellkerne und basophiles Zytoplasma, sowie Osteoidsäume und Weichgewebe blau und mineralisierte Knochenmatrix je nach Mineralisierungsgrad zartrosa bis rotviolett darstellten.

Die Schliffe der subkutanen Implantate wurden mittels Giemsa (ROMEIS et al., 1989) angefärbt. Hier erschienen Zellen und Zellkerne unterschiedlich blau, Kollagen und Osteoid blassblau und mineralisierte Matrix rosa.

Auswertung

Die Beurteilung der histologischen Schliffe erfolgte zunächst qualitativ unter einem Lichtmikroskop (DFC420C, Leica GmbH, Wetzlar, Deutschland) bei verschiedenen Vergrößerungen. Dabei wurde besonders auf den Kontakt zwischen Implantat und Knochengewebe, immunologische Reaktionen und eventuell neu gebildetes Knochengewebe geachtet.

Bei den Knochenpräparaten wurden zusätzlich der verbliebene Zementanteil und die Menge an neu gebildetem Knochengewebe quantitativ bestimmt. Dazu wurden die Schliffe bei 12,5-facher Vergrößerung digitalisiert. Bei den Femur-

Proben wurde eine kreisförmige ROI mit einem Durchmesser von 10 mm gewählt, so dass der Rand dem ursprünglichen Defekt entsprach (Abb. 27). Bei den Tibia-Proben wurde eine quadratische ROI von 7 x 7 mm zentral im Bereich des Defektes gesetzt (Abb. 28), da die Breite des Defektes aufgrund dessen Geometrie von der Schnittebene abhing. Obwohl die ursprüngliche Defektgröße 6 mm betrug wurde eine Höhe von 7 mm gewählt, weil der Zement in den Schliffen diese Höhe aufwies. Mittels einer speziellen Software (Metamorph[®], Leica GmbH, Wetzlar, Deutschland) konnte manuell der Anteil von Zement und Knochengewebe bestimmt und in Verhältnis zur jeweiligen ROI gesetzt werden.

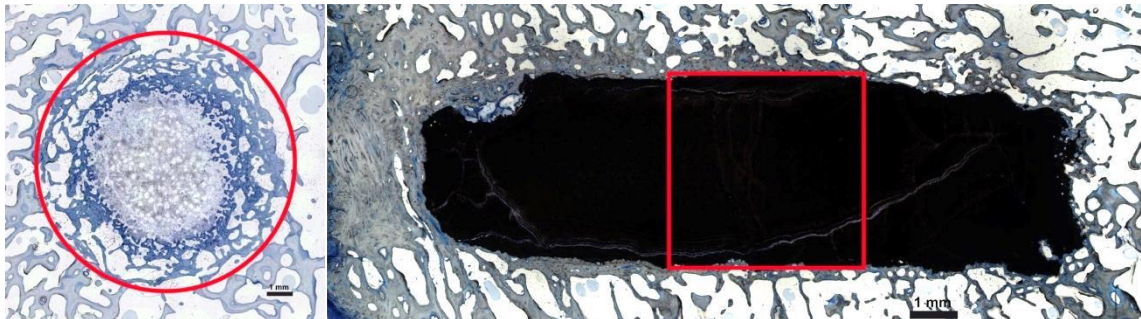


Abb. 27: ROI zur quantitativen histologischen Auswertung Femur **Abb. 28: ROI zur quantitativen histologischen Auswertung Tibia**

3.3.4.2 Entkalkte Paraffin-Schnitte

Anfertigung

Nach Fixierung in Formaldehyd (4 %) über zwei Tage wurden die für die Paraffin-Schnitte zugesägten Knochenscheiben mit 20 %iger Ethylendiamin-Tetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat-Lösung (EDTA, Fluka, Sigma-Aldrich Co. LLC, Saint Louis, Missouri, USA) bei pH 7,2 - 7,4 über ca. 4 Wochen entkalkt. Der Fortschritt der Entkalkung konnte mittels Röntgenaufnahmen überprüft werden (20 kV, 5 min, Faxitron 43805N, Hewlett Packard, McMinnville, Oregon, USA). Nach Entwässerung und Entfettung mittels aufsteigender Alkoholreihe (Vakuumeinbettungsautomat mtm, SLEE medical, Mainz, Deutschland) erfolgte die Einbettung der Präparate in Paraffin

(Paraffinausgießstation MPS/P2, SLEE medical, Mainz, Deutschland). Mit einem Rotationsmikrotom (Cut 6062, SLEE medical, Mainz, Deutschland) wurden 4 – 6 μm dünne Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Um Osteoklasten darzustellen, mussten diese Schnitte entparaffiniert und mit einer speziellen Färbelösung zur Darstellung der für Osteoklasten typischen tartrat-resistenten sauren Phosphatase angefärbt werden (Acid Phosphatase, Leukocyte (TRAP) Kit, Sigma Aldrich Co. LLC, Saint Louis, Missouri, USA). TRAP-positive Zellen erscheinen leuchtend rot.

Auswertung

Die Auswertung der entkalkten Paraffin-Schnitte im Hinblick auf das Vorkommen von Osteoklasten erfolgte qualitativ und semi-quantitativ unter einem Lichtmikroskop (DFC420C, Leica GmbH, Wetzlar, Deutschland) bei 200- bis 400-facher Vergrößerung. Da das Enzym TRAP auch bei Makrophagen vorkommt, wurde auch auf die Lokalisation (direkt am Knochen oder Zement) und die Morphologie (mindestens 2 Kerne) geachtet.

3.3.5 Phasenanalyse mittels Pulverdiffraktometrie

Die Pulverdiffraktometrie ist ein Verfahren zur Bestimmung der Phasenzusammensetzung eines komplexen Minerals. Es gibt für jedes Mineral ein charakteristisches Diffraktogramm, welches beim International Centre for Diffraction Data (ICDD (früher Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS)) als Powder Diffraction File (PDF) hinterlegt ist. Mit diesen wurden die gemessenen Diffraktogramme verglichen. Im Einzelnen kamen die Referenz-Muster für α -TCP (PDF Ref. 09-0348), β -TCP (PDF Ref. 09-0169), HA (PDF Ref. 09-0432), Bruschit (PDF Ref. 09-0077), Struvit (PDF Ref. 15-0762), Farringtonit (PDF Ref. 33-0876) und Newberyit (PDF Ref. 20-0153) zum Einsatz.

Von den ausgehärteten Zementen wurden im Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde der Universität Würzburg vor und nach Implantation Pulver-Röntgendiffraktogramme erstellt (Diffraktometer D 5005 Siemens AG, München, Deutschland). Die Daten wurden aus der K_{α} -Linie einer

Kupferanode zwischen $2\theta = 20 - 40^\circ$ in 0.02° -Schritten (1 Sekunde/Schritt) erhoben.

3.3.6 Quantitative Backscattered Electron Imaging (qBEi)

Mit der Methode des qBEi kann man die Knochenmineraldichte-Verteilung innerhalb der einzelnen Trabekel hochaufgelöst darstellen. Entwickelt und validiert hatte diese Methode Paul Roschger 1998, so dass die Einstellungen am Rasterelektronenmikroskop (Zeiss DSM 962, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) gemäß seinen Vorgaben verwendet wurden (ROSCHGER et al., 1998). Mit einem Rasterelektronenmikroskop können neben den Sekundärelektronen, die Informationen über die Topografie einer Probe geben, auch elastisch rückgestreute Elektronen detektiert werden. Diese erzeugen von einer Probe mit einer glatten Oberfläche ein Bild mit unterschiedlichen Graustufen. Je höher die Ordnungszahl Z eines Atoms ist, desto mehr Elektronen werden elastisch zurückgestreut und desto heller ist das entstehende Bild. Anhand von zwei Referenzstandards (Kohlenstoff: $Z = 6$; Aluminium: $Z = 13$, MAC Micro-Analysis Consultants Ltd., St. Ives, Cambridgeshire, England) wurden die Graustufen über das Einstellen von Helligkeit und Kontrast so kalibriert, dass man sie einer Ordnungszahl zuordnen konnte (Kohlenstoff: $GL = 25$, Aluminium: $GL = 225$). Diese Kalibrierung konnte mit anderen Referenzmaterialien mit bekannter Ordnungszahl (MAC Micro-Analysis Consultants Ltd., St. Ives, Cambridgeshire, England) überprüft werden. In einem zweiten Schritt wurde der Calciumgehalt ins Verhältnis zu den Graustufen gesetzt. Als Referenzmaterialien dienten Osteoid (Calciumgehalt $< 0,2$ wt%, selbst hergestellter demineralisierter Knochen) und reiner Hydroxylapatit (Calciumgehalt = 39,86 wt%, MAC Micro-Analysis Consultants Ltd., St. Ives, Cambridgeshire, England). Für die Auswertung der Bilder wurden mit der frei verfügbaren Software ImageJ Histogramme erstellt und die Werte in Bezug zur Knochenfläche gesetzt, so dass die Histogramme die Knochenmineraldichte-Verteilung (BoneMineralDensityDistribution, BMDD) darstellten. Zum besseren Vergleich der Gruppen wurden verschiedene Parameter nach Roschger berechnet: Der mittlere gewichtete Calciumgehalt (Ca_{Mean}), der Calciumgehalt an der Spitze der Kurve ($Ca_{MaxFreq}$) und die Breite

der Kurve auf Höhe des halben Maximums (FWHM) (ROSCHGER et al., 1998; ROSCHGER et al., 2008).

Für das qBEi wurden ca. 5,0 x 5,0 x 2,0 mm große planparallele Proben von den in Methacrylat-eingebetteten Tibia-Präparaten der 10-Monats-Gruppe hergestellt, wobei darauf geachtet wurde, dass jeweils in einer Ecke der Zement noch sichtbar war, so dass das Knochengewebe in unmittelbarer Nähe zum Zement untersucht werden konnte (ROI: 2,5 x 2,0 mm). Um die Proben leitfähig zu machen, mussten sie mit Kohlenstoff bedampft werden.

3.3.7 Energiedispersive Röntgendiffraktometrie

Die Energiedispersive Röntgenspektroskopie (Energy-dispersive X-ray spectroscopy, EDX) ist ein Verfahren zur Bestimmung der chemischen Zusammensetzung eines Materials. Dazu wurden im Rasterelektronenmikroskop (Zeiss DSM 962, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) die von der Probe emittierten Röntgenstrahlen gemessen. Dabei wies jedes Element eine charakteristische Röntgenstrahlung auf. Verwendet wurden die gleichen Proben wie für das qBEi, wobei nur eine Probe pro Gruppe untersucht wurde.

Neben quantitativen Punktanalysen innerhalb eines Trabekels wurden auch sogenannte Mappings von einem größeren Bereich (2,5 x 2,0 mm) angefertigt. Bei den Mappings konnten die untersuchten Elemente unterschiedlich farblich dargestellt werden (Calcium: gelb, Magnesium: grün, Natrium: rot und Phosphor: blau).

3.3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc.). Mit einem Shapiro-Wilk-Test wurden die Daten auf Normalverteilung getestet. Die Daten der μ -CT-Analyse waren normal verteilt und wurden mit einer Zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur für mehrfache Vergleiche untersucht. Die Daten der histologischen und biomechanischen Untersuchungen waren nicht normal verteilt. Deshalb wurde ein Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben verwendet, um Unterschiede

zwischen den Porositäten zu detektieren, sowie ein Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Korrektur für den Zeitverlauf innerhalb einer Zementformulierung. Die Darstellung erfolgte entsprechend als Mittelwert mit Standardabweichung bzw. als Boxplot mit Median, Interquartilen, Minimal-und Maximalwert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Klinischer Verlauf

Die Operationen verliefen ohne Komplikationen. Der Struvit-Zement mit PLR 3,0 musste zügig verarbeitet werden, da er sehr schnell aushärtete. Es war nicht immer möglich, den Defekt komplett trocken zu halten, so dass es gelegentlich zu Blutbeimischungen im Zement kam. Diese schienen den Zement kurzfristig wieder zu verflüssigen, beeinflussten makroskopisch die weitere Aushärtung jedoch nicht.

Bei den Bruschit-Zementen kam es während des Abbindevorgangs zu bräunlichen Verfärbungen des Gewebes am Rand des Implantats (Abb. 29).

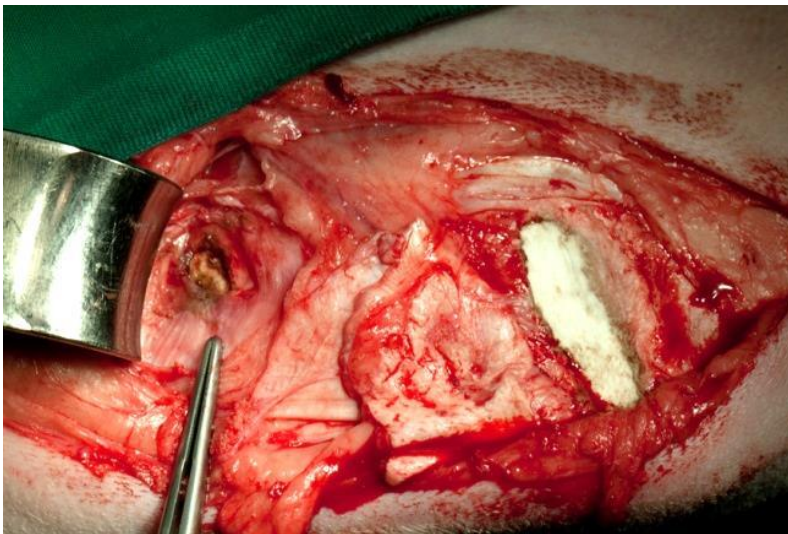


Abb. 29: Braune Verfärbungen des Gewebes

Postoperativ zeigten die Tiere ein ungestörtes Allgemeinbefinden und keine Anzeichen einer Entzündung oder Wundheilungsstörung. Das Gangbild war in den ersten Tagen etwas steif, normalisierte sich aber innerhalb weniger Tage.

4.2 Makroskopisch

Subkutane Implantate

Die subkutanen Implantate der Bruschit- und CDHA-Zemente waren zum Zeitpunkt der Tötung jeweils noch gut unter der Haut sichtbar (Abb. 30). Die subkutanen Struvit-Implantate wurden im Zeitverlauf deutlich kleiner und waren besonders im Fall der PLR 2,0-Implantate nach 10 Monaten kaum auffindbar. Alle subkutanen Implantate waren von einer dünnen Bindegewebschicht umgeben und lagen ansonsten reaktionslos im Unterhautgewebe (Abb. 31).



Abb. 30: CDHA; 10 Monate



Abb. 31: Struvit PLR 3,0; 7 Monate

Knochenimplantate

Die operierten Bereiche an den Knochen waren bei allen Tieren von einer dicken Bindegewebschicht überzogen. Nachdem diese entfernt worden war, waren die Bruschit- und CDHA-Zemente gut sichtbar (Abb. 32). Bei den Tibia-Implantaten in den Bruschit-Gruppen fielen nach dem Anschleifen quer verlaufende Risse im Zement auf (Abb. 34). Die CDHA-Zemente hingegen wiesen keine Risse auf (Abb. 36). Sowohl bei den Bruschit-, als auch bei den CDHA-Zementen waren zum Teil bräunliche Verfärbungen innerhalb des Zementes zu beobachten (Abb. 34 und Abb. 36). Bei den Bruschit-Zementen zeigten sich außerdem gräuliche Verfärbungen des angrenzenden Knochengewebes (Abb. 34).

Die Struvit-Zemente erschienen eingesunken (Abb. 33) und der entstandene Hohlraum war mit Bindegewebe aufgefüllt. Nach dem Anschleifen wurden die

Struvit-Zemente ebenfalls sichtbar. Schon nach 4 Monaten waren sie deutlich kleiner und nach 10 Monaten zum Teil kaum noch sichtbar. Zirkulär und in engem Kontakt zum verbliebenen Zement hatte sich neues Gewebe gebildet, welches makroskopisch wie Knochengewebe aussah (Abb. 35).

Die Leerdefekte wiesen einen sklerotischen Rand auf und waren ansonsten mit Fett- und Bindegewebe gefüllt.



Abb. 32: Bruschit PLR 3,0; 4 Monate, Zement gut sichtbar

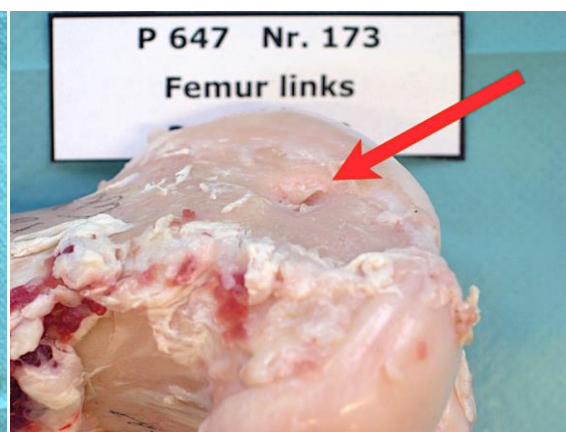


Abb. 33: Struvit PLR 3,0; 4 Monate, Zement stark eingesunken (roter Pfeil)

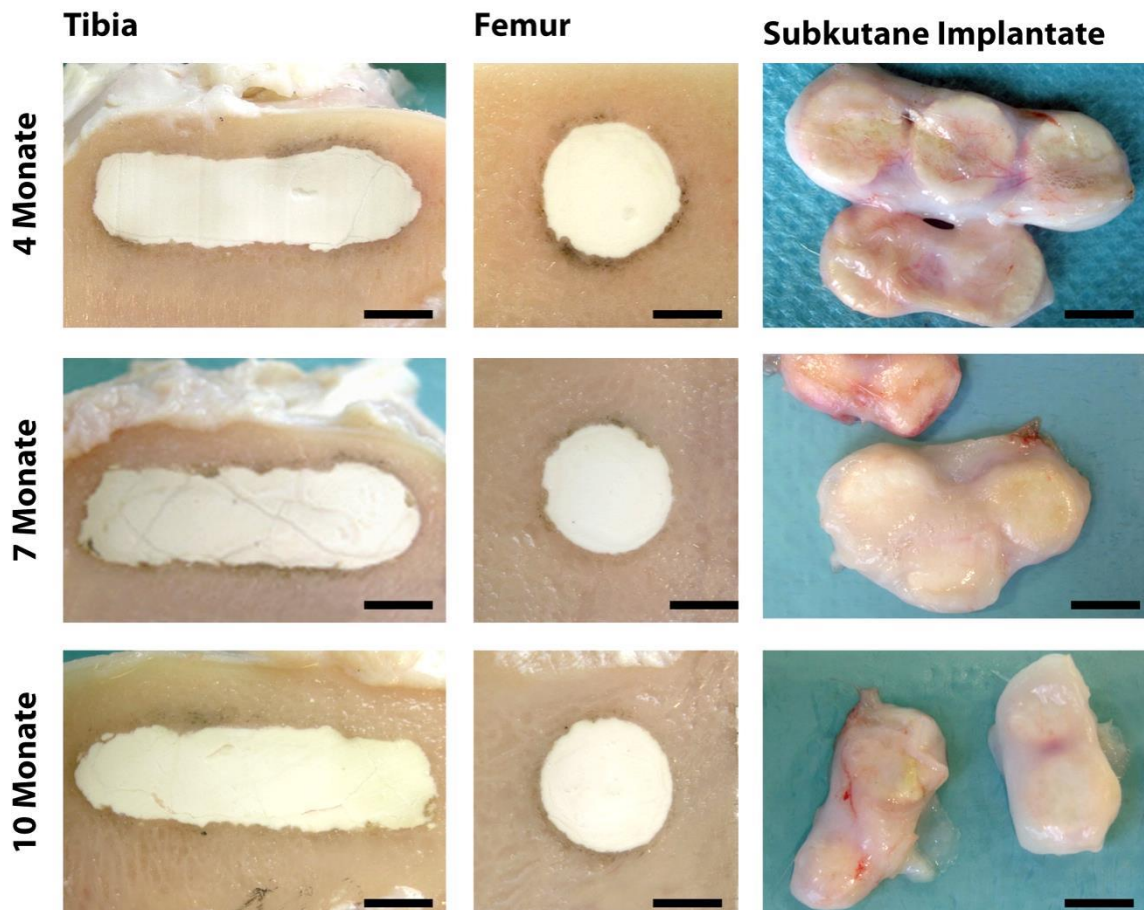


Abb. 34: Makroskopische Aufnahmen der präparierten Proben, Bruschi PLR 2,0;
Balken = 5 mm

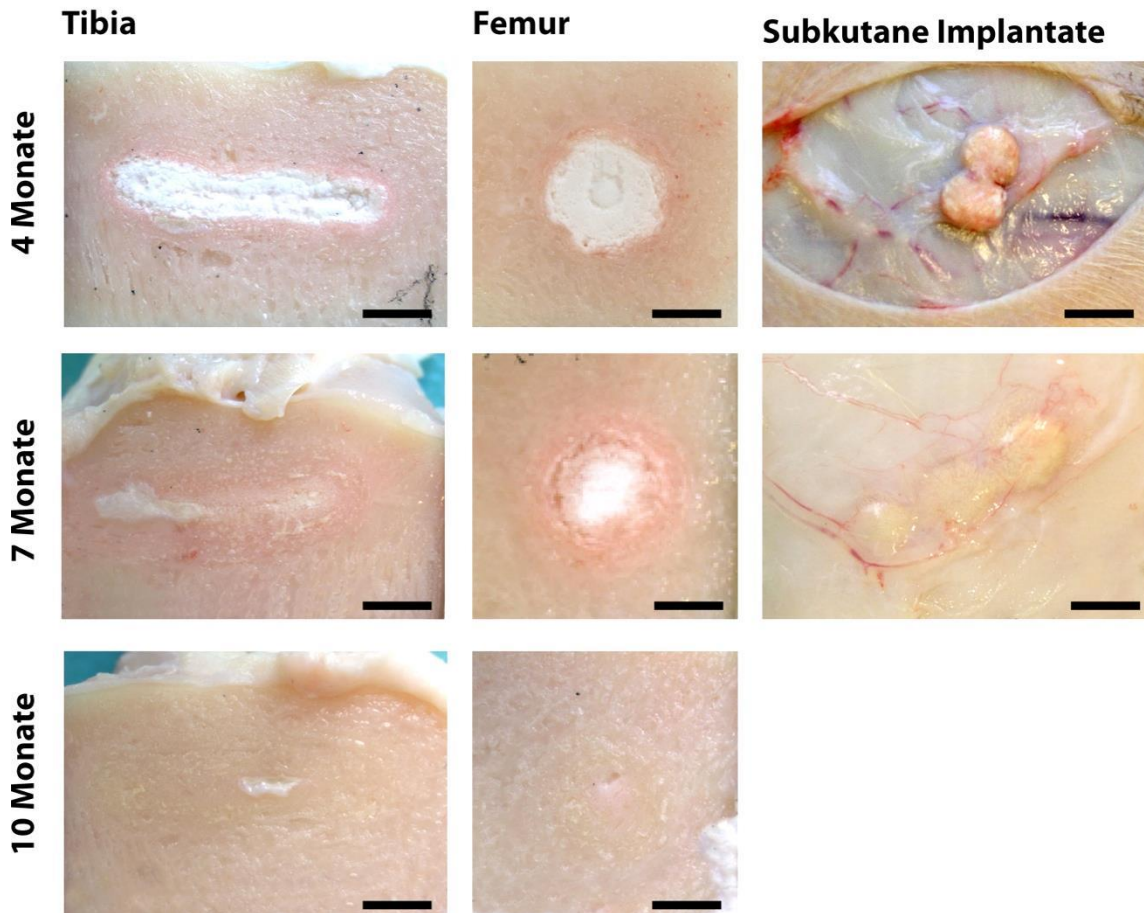


Abb. 35: Makroskopische Aufnahmen der präparierten Proben, Struvit PLR 2,0;
Balken = 5 mm

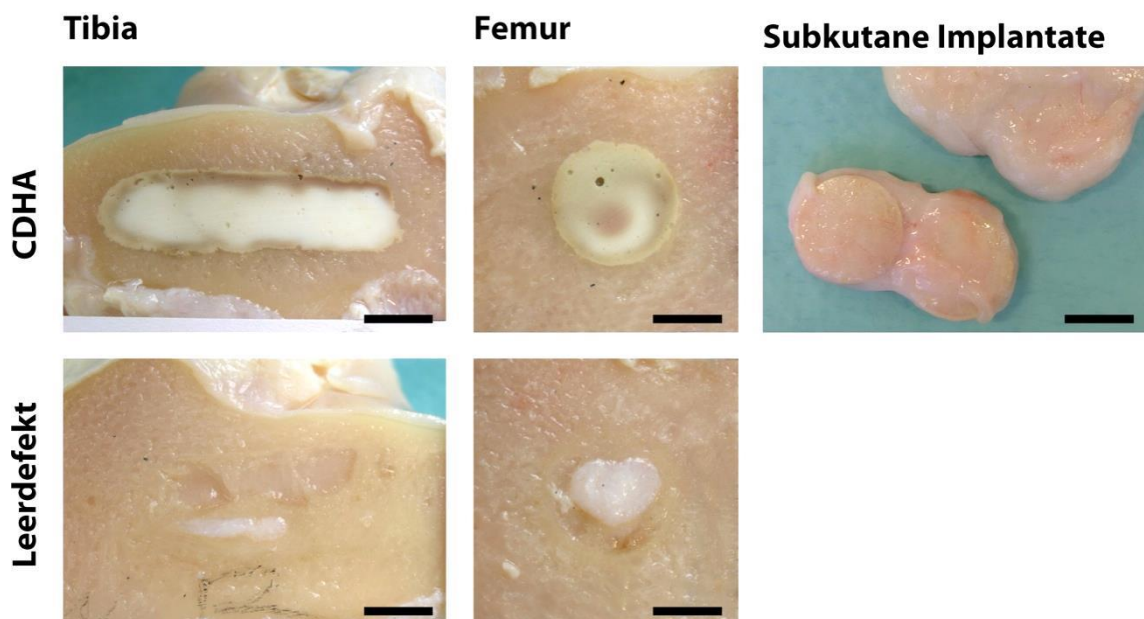


Abb. 36: Makroskopische Aufnahmen der präparierten Proben, Kontrollgruppen;
Balken = 5 mm

4.3 Röntgen

Die Zemente und der umliegende Knochen hatten eine ähnliche Röntgendichte. Die Bruschit- und CDHA-Zemente waren als kompakte röntgendichte Struktur gut zu erkennen. Es gab keine Abgrenzung zwischen Knochen und Zement in Form von Aufhellungen. In den Leerdefekten hatte sich kein röntgendichtes Gewebe gebildet. Die Struvit-Zemente erschienen diffus aufgehellt und waren von röntgendichtem Gewebe umgeben bzw. wurden durch dieses ersetzt (Abb. 37).

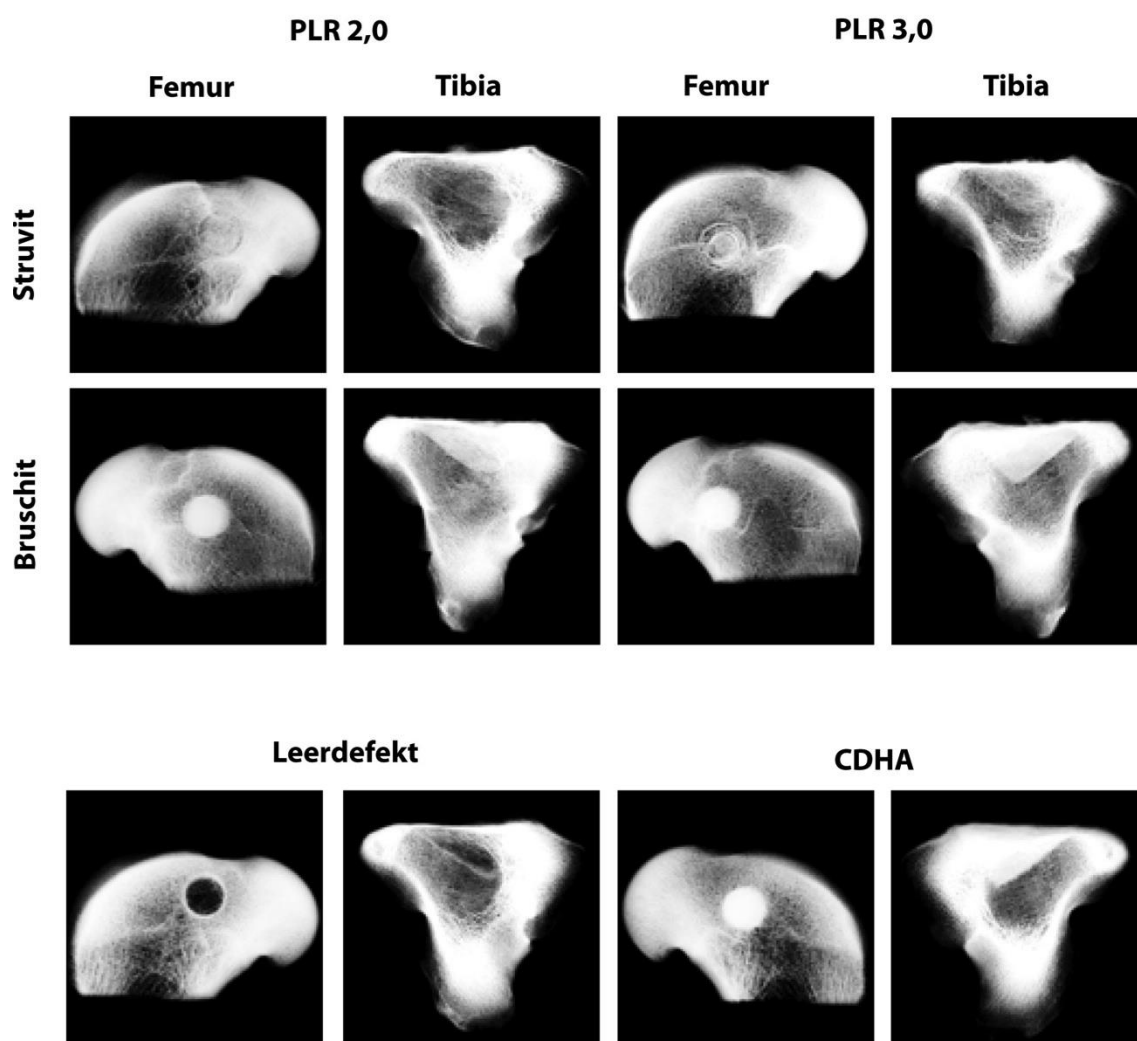


Abb. 37: Röntgenaufnahmen nach 10 Monaten Implantation,
Femurkondyle: medio-laterale Projektion, Tibiaplateau: proximo-distale Projektion

4.4 Biomechanik

Da keine Unterschiede bezüglich der Steifigkeit des unverletzten, normalen Knochens zwischen den einzelnen Gruppen festzustellen waren, wurden diese Werte gepoolt.

Die Struvit-Zemente (Abb. 38) zeigten mit einem Median von 22427 N/mm (PLR 2,0) bzw. 18130 N/mm (PLR 3,0) die höchste Steifigkeit *in vitro*. Nach 4 Monaten Implantation reduzierten sich die Steifigkeiten bei beiden Porositäten um 95%. Zu beachten ist, dass aufgrund der raschen Resorption der Struvit-Zemente ab 7 Monaten Implantationszeit bei diesen Gruppen nur noch von einem Zement-Knochen-Komposit gesprochen werden konnte. Nach 10 Monaten waren die Steifigkeiten der Struvit-Gruppen wieder um 3% angestiegen. Zwischen den Porositäten gab es keine signifikanten Unterschiede.

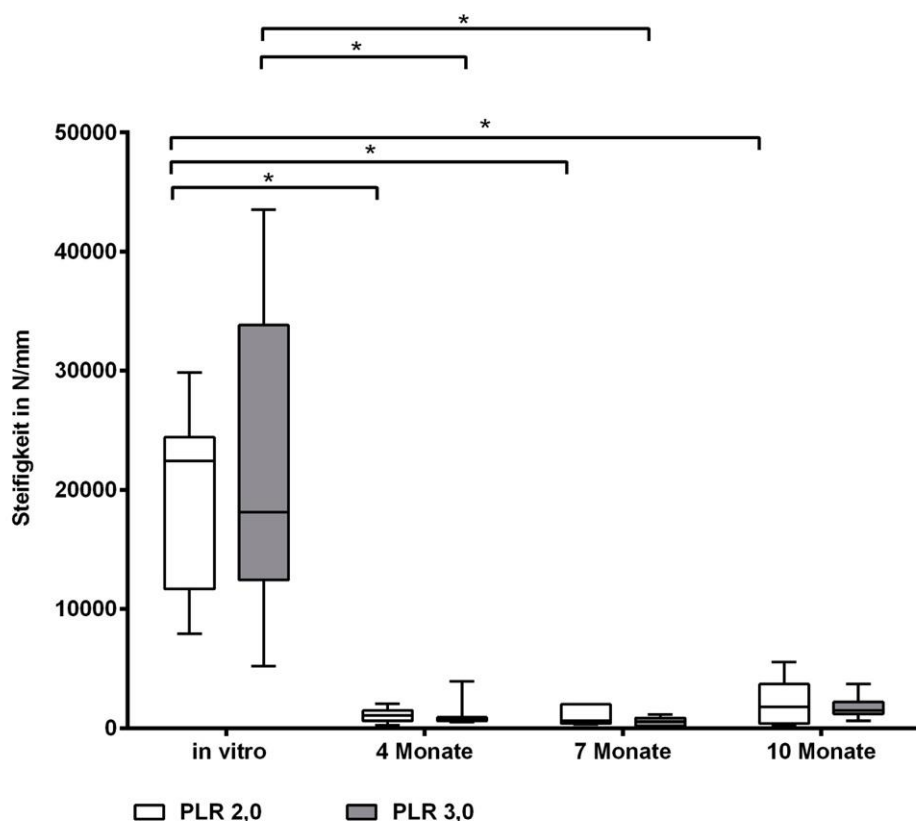


Abb. 38: Steifigkeit Struvit-Gruppen; * Kruskal-Wallis-Test, $p < 0,05$

Die Bruschit-Zemente (Abb. 39) der PLR 2,0 zeigten nach 4 Monaten Implantation eine gegenüber den *in-vitro*-Werten um 63 % reduzierte Steifigkeit. Im weiteren Zeitverlauf änderte sich die Steifigkeit nicht. Bei den Gruppen mit der PLR 3,0 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den *in-vitro*- und *in-vivo*-Werten festgestellt werden. Beim Vergleich der Porositäten zeigte die Gruppe mit der niedrigeren Porosität (PLR 3,0) nach 4 und 7 Monaten signifikant höhere Steifigkeiten als die Gruppen mit PLR 2,0. *In vitro* und nach 10 Monaten war dieser Unterschied nur tendenziell zu beobachten.

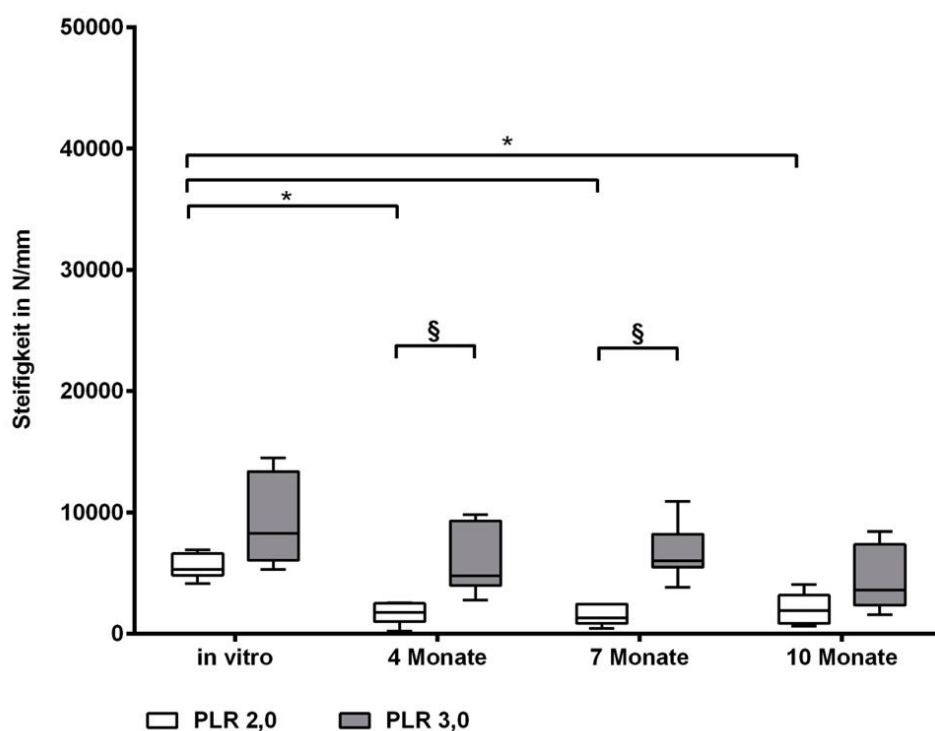


Abb. 39: Steifigkeit Bruschit-Gruppen; * Kruskal-Wallis-Test, $p < 0,05$; § Wilcoxon-Test, $p < 0,05$

Nach 10 Monaten Implantation wies CDHA mit 8774 N/mm die größte Steifigkeit auf. Die Struvit- und Bruschit-Zemente zeigten im Vergleich zum Knochengewebe keine Unterschiede in der Steifigkeit (Abb. 40).

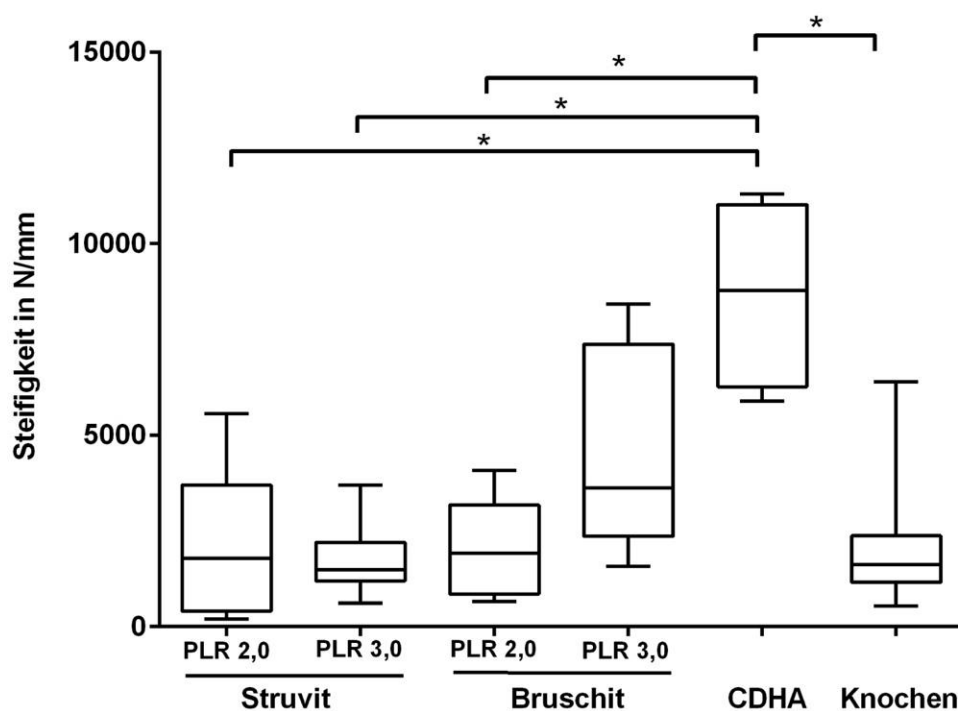


Abb. 40: Steifigkeit nach 10 Monaten; * Kruskal-Wallis-Test, $p < 0,05$

4.5 Mikro-Computer-Tomographie (μ -CT)

Wie schon bereits erwähnt, konnte mittels der μ -CT-Untersuchungen nicht eindeutig zwischen Knochengewebe und Zement unterschieden werden. Um aber die Ergebnisse besser veranschaulichen zu können, wurde zum Teil schon an dieser Stelle eine Interpretation der Daten durchgeführt. Dabei wurden die Mineraldichte und das Röntgendichte Volumen/Gesamtvolumen immer gemeinsam und im Zusammenhang mit der Textur betrachtet. Die Trennung zwischen Knochen und Zement erfolgte anhand der Lokalisation. In Abb. 41 ist jeweils ein repräsentatives μ -CT-Schnittbild der 10-Monats-Gruppen dargestellt.

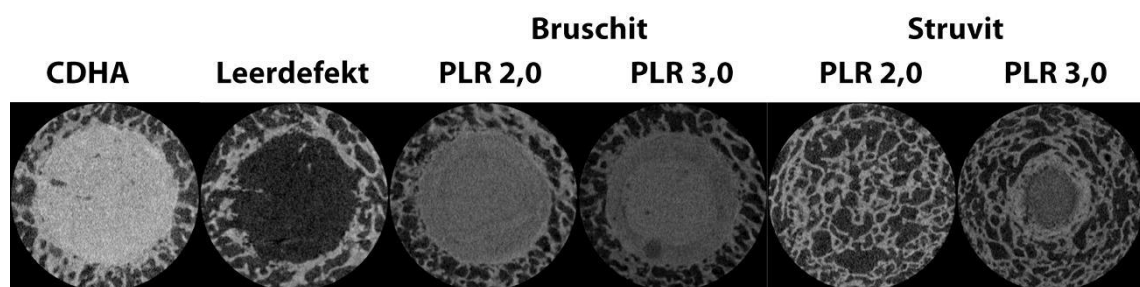


Abb. 41: μ -CT-Schnittbilder der Basis-VOI (d = 14 mm) nach 10 Monaten

4.5.1 Mineraldichte (MD)

Die Mineraldichte des peripheren Knochens unterschied sich zwischen den einzelnen Gruppen nicht. Der gepoolte Mittelwert lag bei $355,8 \text{ mg HA/cm}^3$. Für die einzelnen Gruppen ist der Wert des peripheren Knochens der jeweiligen Gruppe dargestellt.

Kontrollgruppen

Die CDHA-Gruppe zeigte in allen VOIs (Volume of Interest) innerhalb des Defektes (VOI 2 bis VOI 8-10) mit rund 1200 mg HA/cm^3 eine konstante MD, die im Vergleich zu den weiter außen liegenden VOIs deutlich höher war. Das deutet darauf hin, dass sich im gesamten Defektbereich Zement befand. Das VOI 10-12 wies darüber hinaus eine höhere MD als das VOI 12-14 und der periphere Knochen auf (Abb. 42 A).

Die Leerdefekte wiesen innerhalb des Defektes bis zum VOI 6-8 eine sehr niedrige MD $< 100 \text{ mg HA/cm}^3$ auf. Das VOI 8-10 unterschied sich nicht von dem VOI 12-14 und dem peripheren Knochen. Das VOI 10-12 lag mit einer MD von knapp 600 mg HA/cm^3 deutlich über allen anderen VOIs. Diese Werte sprechen dafür, dass der Leerdefekt bis einschließlich zum VOI 6-8 tatsächlich leer war und dass Knochen bis in das VOI 8-10 hineingewachsen war (Abb. 42 B).

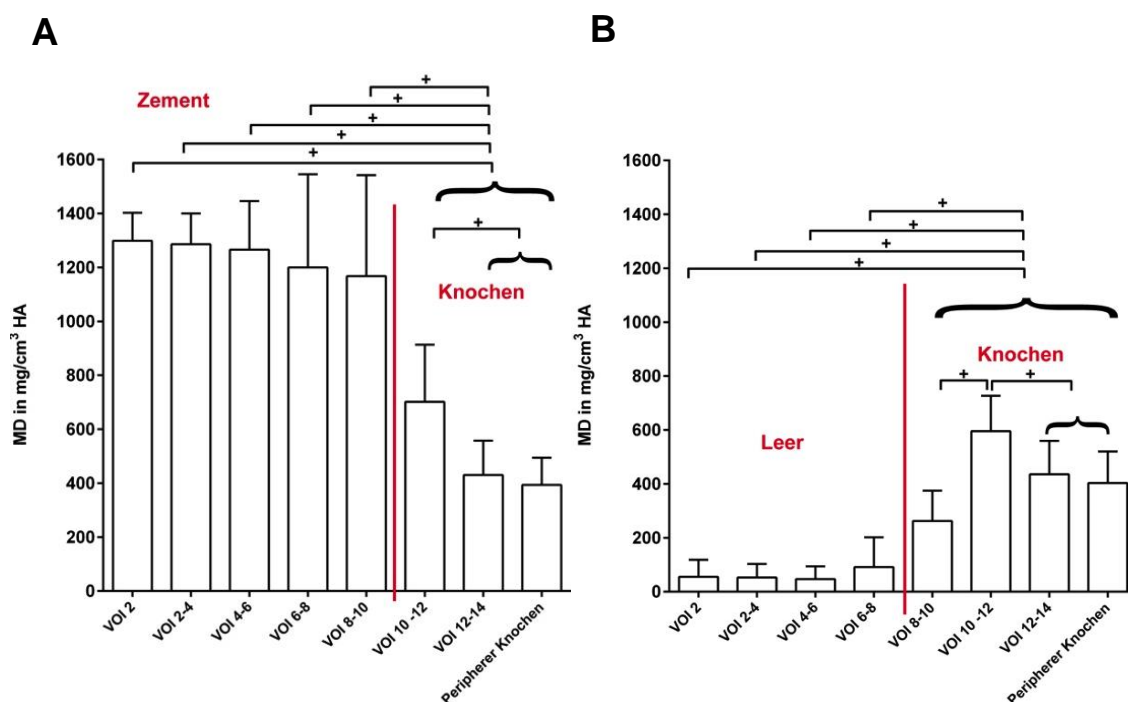


Abb. 42: MD Kontrollgruppen nach 10 Monaten; A: CDHA, B: Leerdefekt; + ANOVA, $p < 0,05$

Bruschit-Gruppen

Der MD-Verlauf innerhalb der Bruschit-Gruppen unterschied sich weder zwischen den Porositäten, noch im Zeitverlauf. Deshalb sind in Abb. 43 exemplarisch die Werte für Bruschit PLR 2,0 nach 10 Monaten dargestellt. Die im Defekt liegenden Bereiche (VOI 2 bis VOI 8-10) wiesen jeweils eine gleichbleibende und signifikant höhere MD auf als die außerhalb des Defektes liegenden Bereiche. Das VOI 10-12 hatte eine erhöhte MD gegenüber dem VOI 12-14 und dem peripheren Knochen. Dieser Verlauf der MD deutet darauf hin, dass sich im Defektbereich ausschließlich Zement befand.

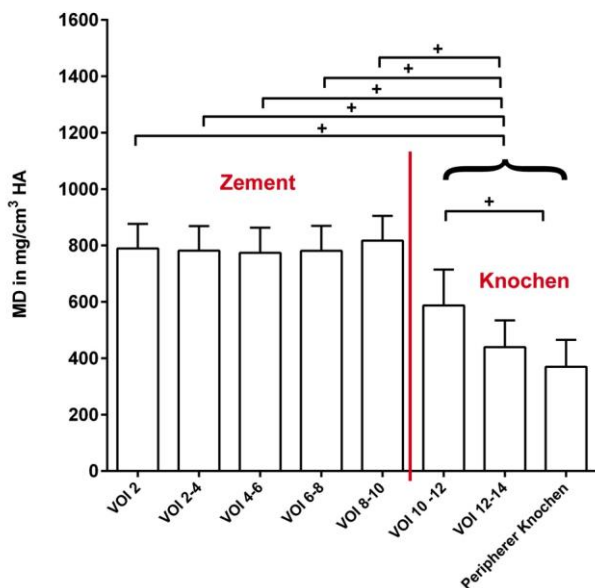


Abb. 43: MD Bruschit, PLR 2,0 nach 10 Monaten; + ANOVA, $p < 0,05$

Vergleicht man die MD der einzelnen VOIs innerhalb der Zemente (VOI 2 bis VOI 8-10) im Zeitverlauf, fällt auf, dass bei PLR 2,0 die MD mit zunehmender Implantationszeit abnahm (Abb. 44 A). Dieser Effekt war bei PLR 3,0 nicht so deutlich, aber in Tendenz erkennbar (Abb. 44 B).

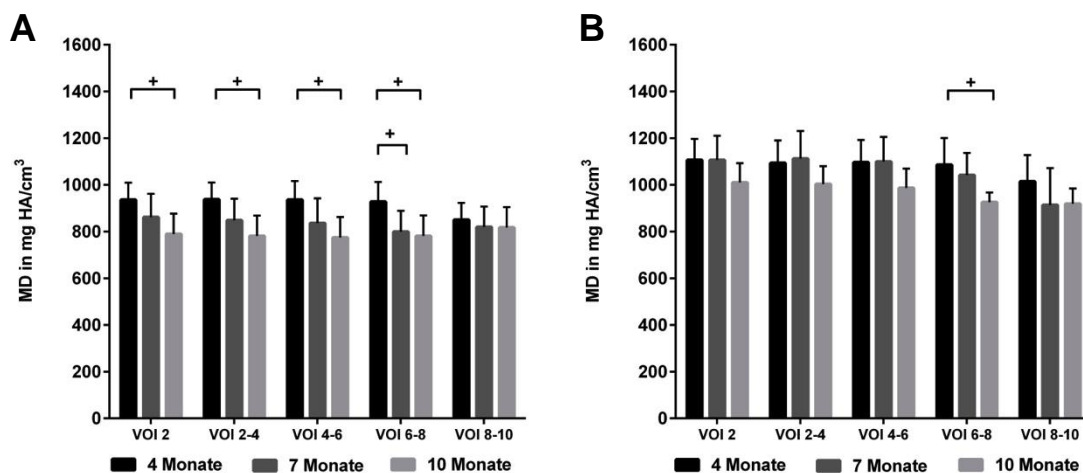


Abb. 44: Zeitverlauf MD Bruschit-Zemente im Defektbereich;
A: PLR 2,0; B: PLR 3,0; + ANOVA, $p < 0,05$

Des Weiteren wies Bruschit PLR 3,0 zu allen untersuchten Zeitpunkten eine höhere MD auf als Bruschit PLR 2,0 (Abb. 45).

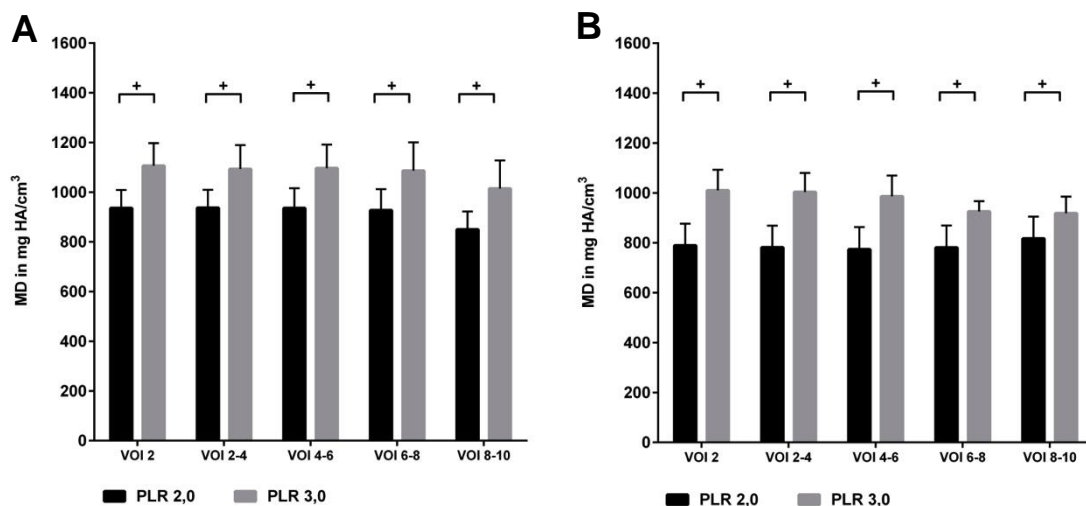


Abb. 45: MD Bruschit-Zemente, Vergleich der Porositäten nach 4 (A) und 10 (B) Monaten; + ANOVA, $p < 0,05$

Struvit-Gruppen

Bei den Struvit-Gruppen war aufgrund der relativ ähnlichen Röntgendichte und der fortschreitenden Resorption eine Trennung zwischen Zement und Knochen anhand der MD-Werte kaum möglich (Abb. 46 A, B und Abb. 47 B). Lediglich bei der 4-Monats-Gruppe der PLR 3,0 kann vermutet werden, dass der Zement wahrscheinlich bis zum VOI 6-8 reichte und das VOI 8-10 eine Resorptionszone darstellte (Abb. 47 A).

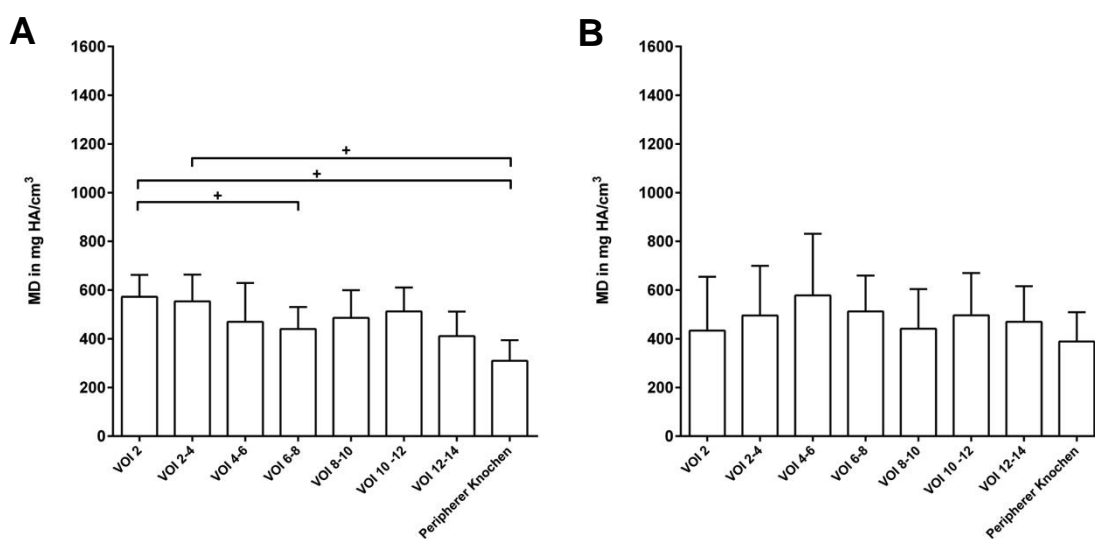


Abb. 46: MD Struvit PLR 2,0 nach 4 (A) und 10 (B) Monate; + ANOVA, $p < 0,05$

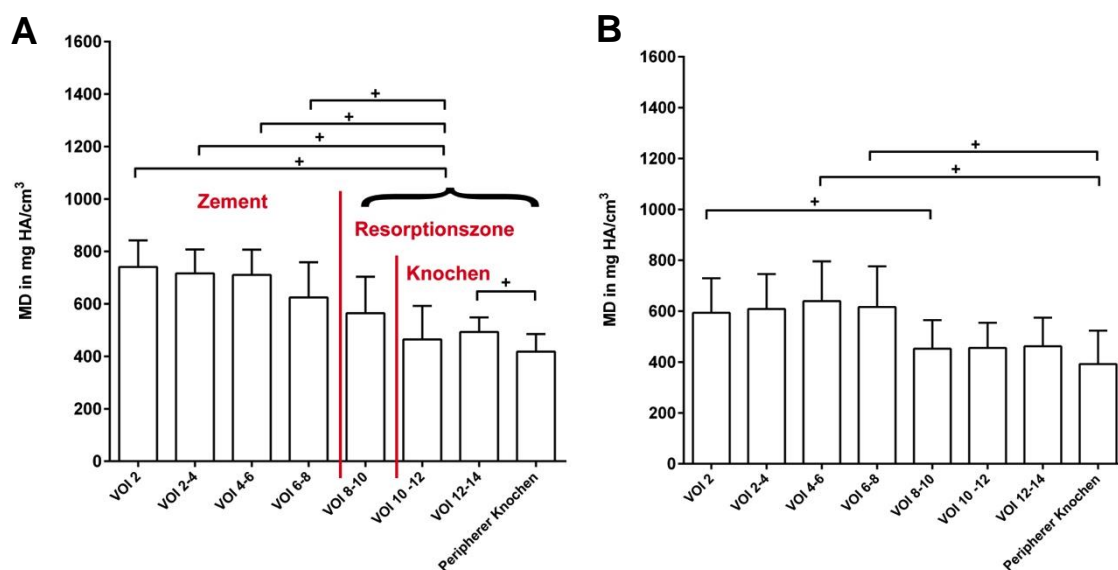


Abb. 47: MD Struvit PLR 3,0 nach 4 (A) und 10 (B) Monaten; + ANOVA, $p < 0,05$

Um sicher die Struvit-Zemente bezüglich ihrer MD vergleichen zu können, wurde der Zementkern (VOI 2) nach 4 Monaten Implantation verglichen. Dabei wies die Gruppe mit der höheren Porosität (PLR 2,0) mit $572,6 \text{ mg HA/cm}^3$ eine signifikant niedrigere MD auf als die mit der niedrigeren Porosität mit $741,2 \text{ mg HA/cm}^3$ (Abb. 48).

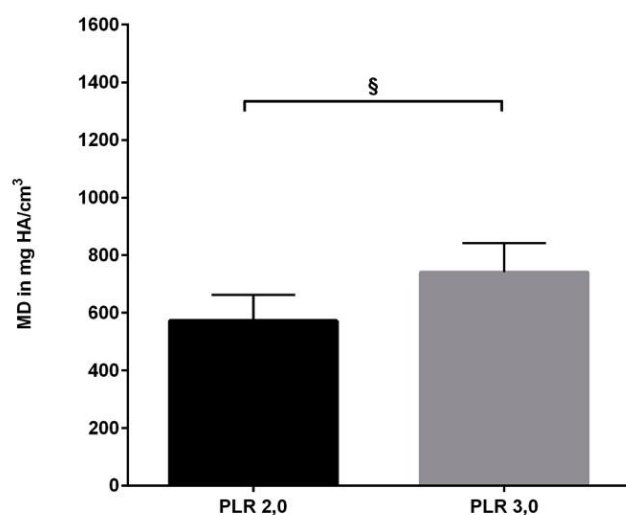


Abb. 48: MD Struvit Zemente, Vergleich der Porositäten in der VOI 2 nach 4 Monaten; § Wilcoxon-Test, $p < 0,05$

4.5.2 Röntgendichtes Volumen/Gesamtvolumen (RV/GV)

Das RV/GV des peripheren Knochens bei einem Grenzwert von 641,9 mg HA/cm³ unterschied sich nicht zwischen den Gruppen. Der gepoolte Mittelwert lag bei 27,2 %.

Kontrollgruppen

Bei der CDHA-Gruppe war das RV/GV innerhalb des Defektes nahezu 100 %, während die inneren VOIs (VOI 2 bis VOI 6-8) des Leerdefektes ein RV/GV von 0 % aufwiesen. Diese Ergebnisse bestätigen die Aussagen der BMD-Messungen. Der Defekt war im Fall der CDHA-Gruppe vollständig mit Zement gefüllt. Bei der Leerdefekt-Gruppe war nur vom Rand her Knochengewebe eingewachsen. Das VOI 10-12 zeigte mit 55 % (CDHA) bzw. 50 % (Leerdefekt) bei beiden Gruppen ein höheres RV/GV als das VOI 12-14 und der periphere Knochen (ca. 30 %, Abb. 49).

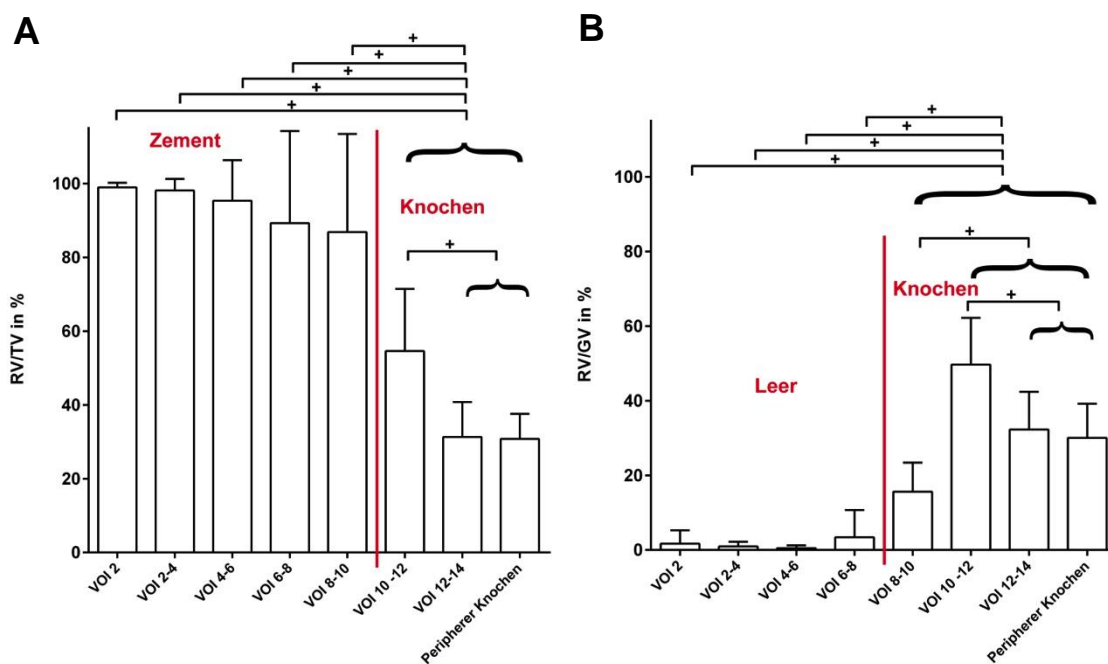


Abb. 49: RV/GV Kontrollgruppen nach 10 Monaten; A: CDHA, B: Leerdefekt; + ANOVA, $p < 0,05$

Bruschit

Bei den Bruschit-Gruppen wurden ähnliche Werte wie bei der CDHA-Gruppe ermittelt. Unabhängig von der Porosität und dem Zeitpunkt lag das RV/GV im Defektbereich bei nahezu 100 % und stellte auch hier den nicht resorbierten Zement dar. Das VOI 10-12 zeigte mit Werten deutlich über 40 % ebenfalls ein im Vergleich zum VOI 12-14 und dem peripheren Knochen erhöhtes RV/GV (Abb. 50).

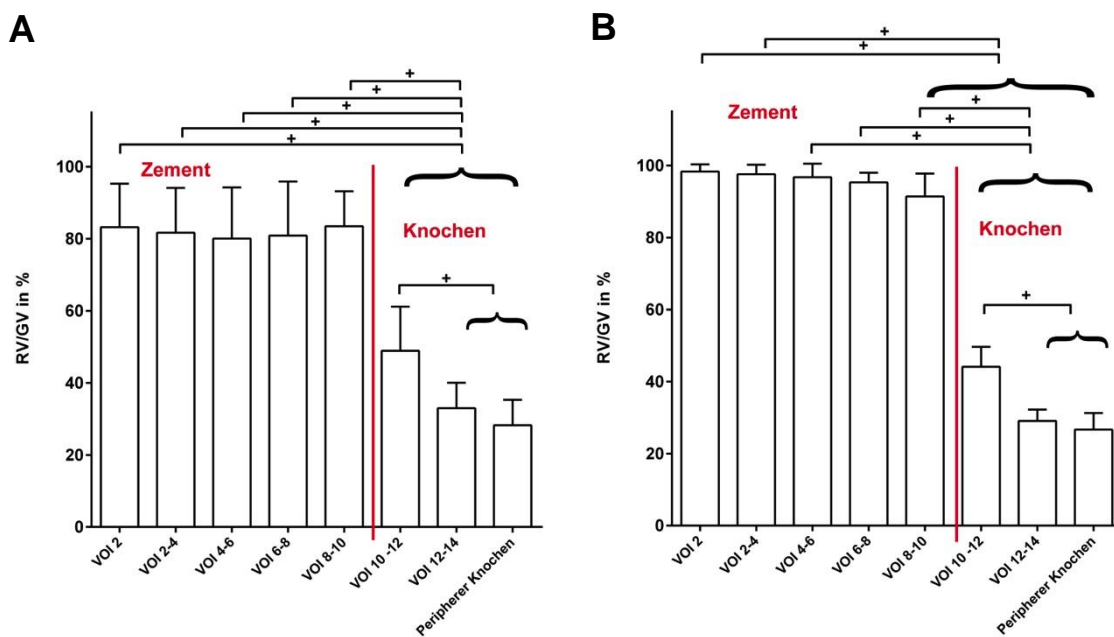


Abb. 50: RV/GV Bruschit nach 10 Monaten; A: PLR 2,0, B: PLR 3,0; + ANOVA, $p < 0,05$

Struvit

Bei der 4-Monats-Struvit-PLR 2,0-Gruppe nahm das RV/GV kontinuierlich von innen (87 %) nach außen (34 %) ab. Werte über 80 % wurden als Zement und Werte < 80 % als Resorptionszone angesprochen. Ab dem VOI 10-12 wurde der umgebende Knochen dargestellt (Abb. 51 A). Nach 7 und 10 Monaten waren die Werte in allen VOIs annähernd gleich (um 50 %, Abb. 51 B). Die Struvit-PLR-3,0-Gruppen zeigten bei allen drei Implantationszeiträumen abfallende Werte für die einzelnen VOIs von innen (deutlich über 80%) nach außen (um 40 %). Entsprechend der oben gewählten Werte konnten auch hier die verschiedenen Bereiche markiert werden. Die Resorptionszone dehnte sich

im Zeitverlauf vom VOI 8-10 (nach 4 Monaten) nach innen bis zum VOI 4-6 (nach 7 und 10 Monaten) aus (Abb. 52).

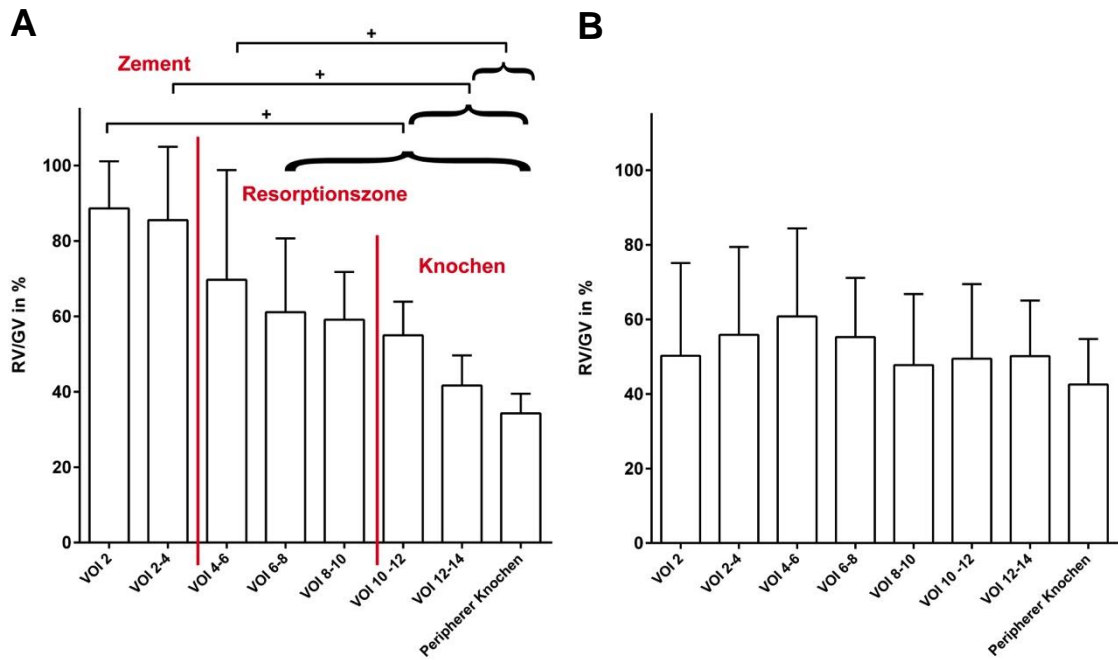


Abb. 51: RV/GV Struvit PLR 2,0 nach 4 (A) und 10 (B) Monaten; + ANOVA, $p < 0,05$

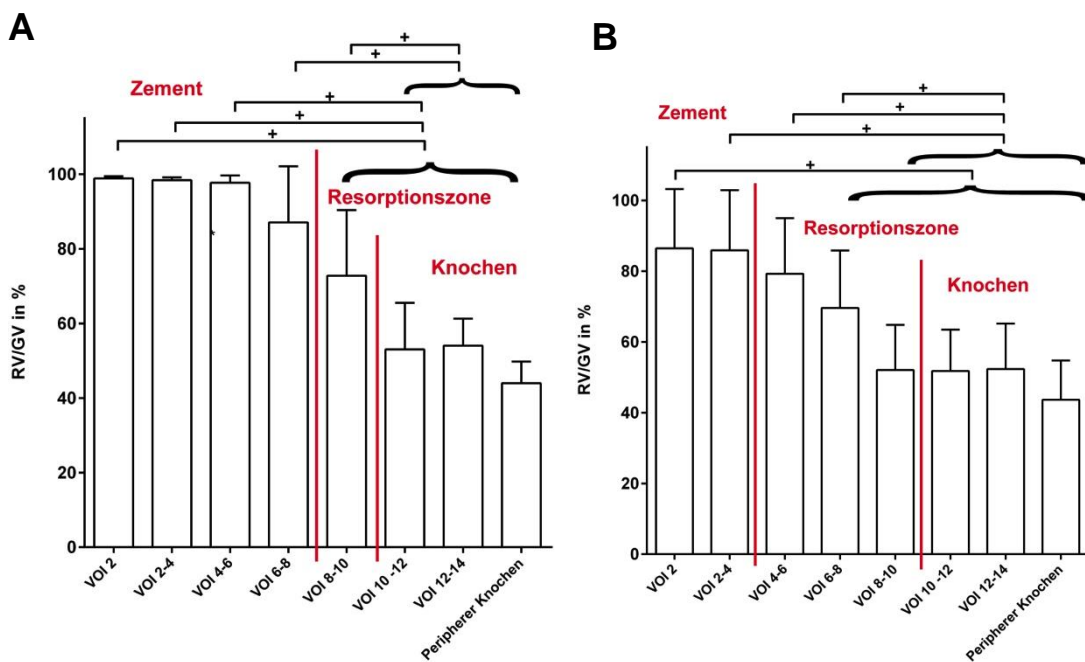


Abb. 52: RV/GV Struvit PLR 3,0 nach 4 (A) und 10 (B) Monaten; + ANOVA, $p < 0,05$

4.6 Histologie

4.6.1 Kunststoff-Schliffe

4.6.1.1 Qualitative Histologie - Knochenimplantate

Kontrollgruppe

Um die CDHA-Zemente (Abb. 53) hatte sich sowohl bei den Femur- als auch bei den Tibia-Implantaten nach 10 Monaten neues Knochengewebe dicht ohne erkennbaren Zwischenraum angelagert. Der Kontakt zwischen Zement und trabekulärem Knochen war zu 100% ausgeprägt und Osteoidsäume mit Osteoblasten konnten regelmäßig dargestellt werden. Die Zemente erschienen homogen mit regelmäßig vorkommenden Luftblasen. Befanden sich diese größeren Poren in Randnähe, waren sie zum Teil mit Knochengewebe gefüllt. Der Rand der Zemente war nicht immer scharf begrenzt, teilweise konnten fokale wolkig aufgeraute Resorptionsbereiche mit Osteoklasten beobachtet werden. Gelegentlich auftretende kleinere Zementfragmente waren dicht von Knochengewebe umgeben.

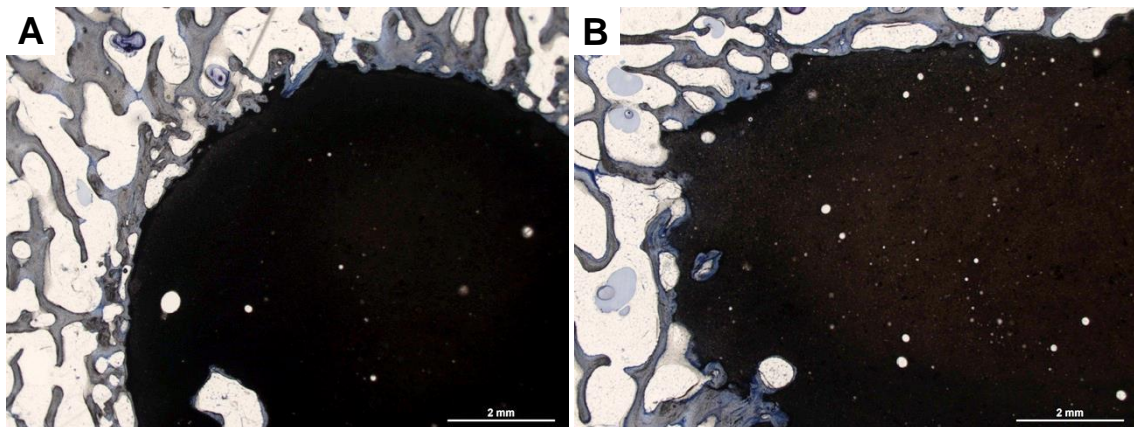


Abb. 53: CDHA nach 10 Monaten; Femur (A) und Tibia (B), 12,5x Vergr., Toluidinblau-Fuchsin

Die Leerdefekte (Abb. 54) zeigten ca. auf 2-3 mm vom Defektrand her einsprossendes trabekuläres Knochengewebe. Der übrige Defektbereich war im Fall der Femur-Defekte mit Fettzellen und mit einzelnen radiär verlaufenden

Bindegewebsfasern gefüllt. Die Tibia-Defekte waren vorwiegend mit kollagenem Bindegewebe gefüllt.

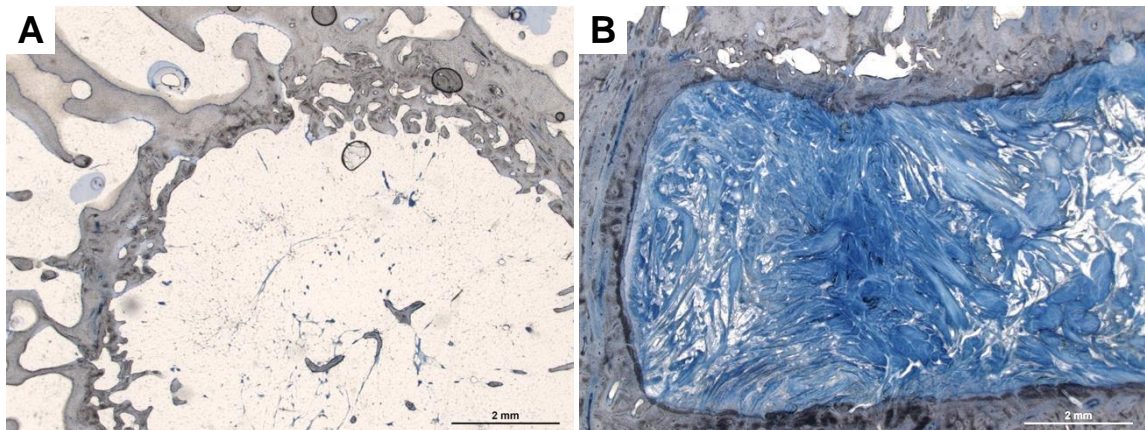


Abb. 54: Leerdefekt nach 10 Monaten; Femur (A) und Tibia (B), 12,5x Vergr., Toluidinblau-Fuchsin

Bruschi

In beiden Gruppen hatte sich sowohl bei den Femur-Implantaten als auch bei den Tibia-Implantaten zu allen Implantationszeiträumen trabekuläres Knochengewebe ohne erkennbaren Zwischenraum dicht am Zement und zu 100% angelagert. Nach 4 Monaten war manchmal nur eine Zellschicht und nach 7 Monaten nur dünne Knochenlamelle sichtbar. Im weiteren Zeitverlauf wurde die Knochenlamelle breiter und es waren vermehrt Osteoblasten und Osteoidsäume sichtbar. Es schien, als ob sich das Knochengewebe von den Trabekeln ausgehend am Zement entlang ausgebreitet hatte. Besonders cranial und caudal der Tibia-Implantate erschien die angrenzende Knochenstruktur sehr dicht. Der Zement wies jeweils eine dunklere äußere und eine hellere innere Zone auf, war aber ansonsten in der Struktur homogen und weitgehend ohne Luftblasen. Im Gegensatz zu den Femur-Implantaten zeigten die Tibia-Implantate deutliche quer und zirkulär verlaufende Risse (Abb. 55 B und Abb. 56 B, D). An den Rändern erschien der Zement zum Teil etwas unregelmäßig und rau und es kamen Resorptionszonen mit Osteoklasten in zum Teil deutlichen Bohrkanälen vor (Abb. 56 C). Einzelne Zementfragmente waren in das angrenzende Knochengewebe eingelagert. Die Fettzellen des Knochenmarkes waren in Zementnähe häufig bräunlich verfärbt und in ihrer Struktur verändert. Sie erschienen nicht rund, sondern unregelmäßig deformiert

(Abb. 56 C). Da sich im Zeitverlauf kaum etwas änderte, sind in Abb. 55 nur die histologischen Bilder nach 10 Monaten dargestellt, sowie in Abb. 56 das Interface zwischen Zement und Knochen.

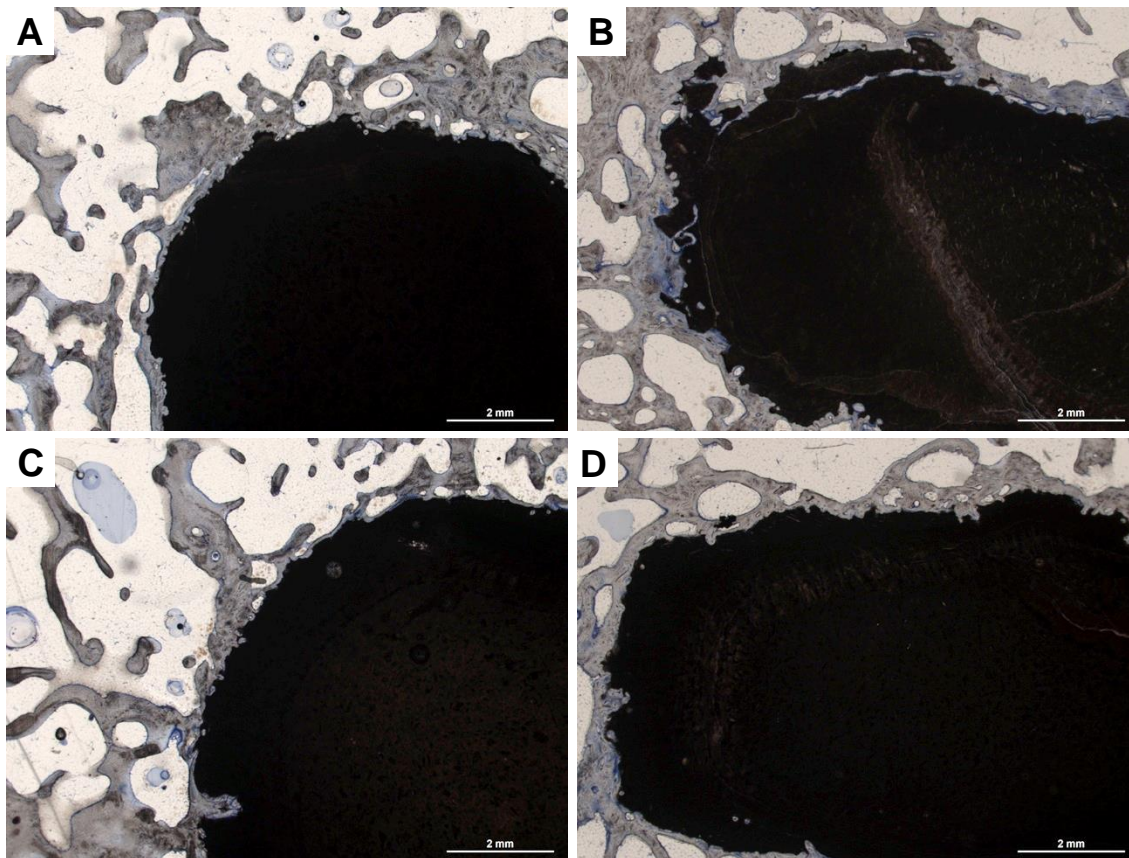


Abb. 55: Brushit PLR 2,0 (A, B) und 3,0 (C, D) nach 10 Monaten; Femur (A, C) und Tibia (B, D), 12,5x Vergr., Toluidinblau-Fuchsin

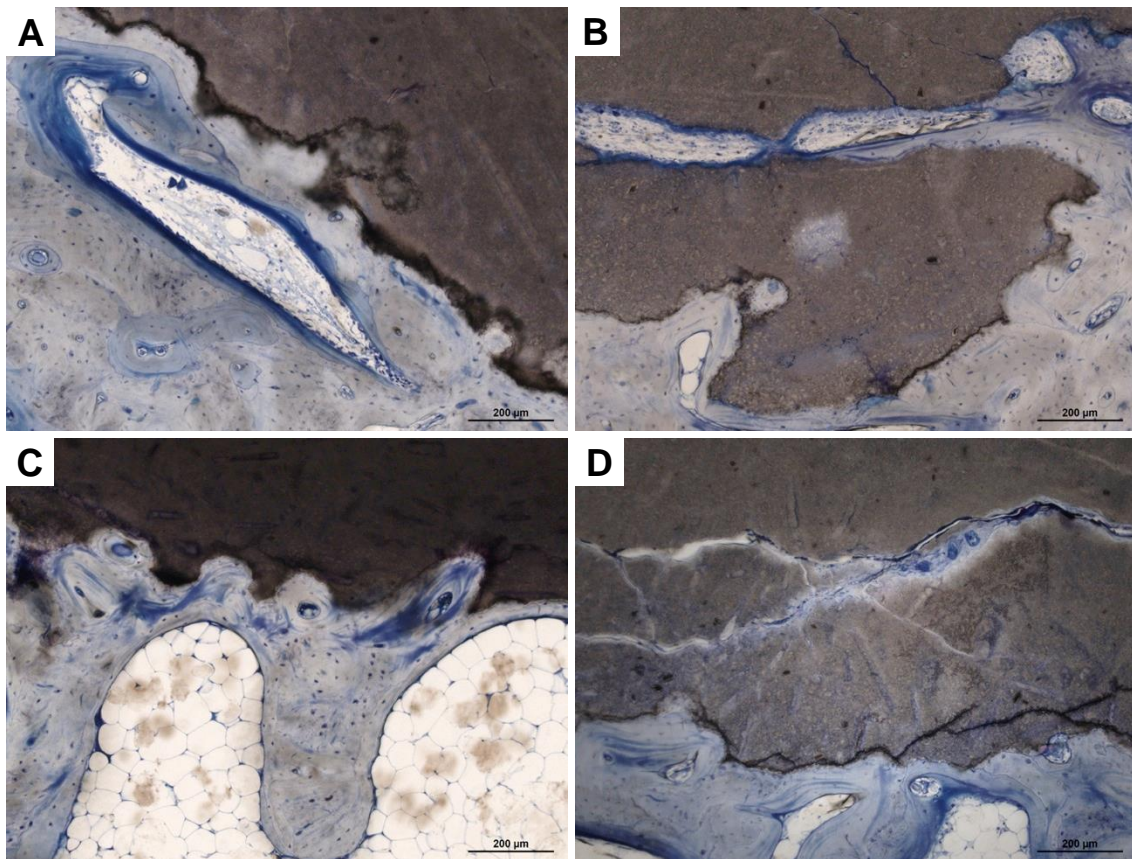


Abb. 56: Interface Bruschit-Zemente-Knochen Femur (A, C) und Tibia (B, D), 100x Vergr., Toluidinblau-Fuchsin

Struvit

Die Struvit-Zemente zeigten eine deutliche Reduktion in ihrer Größe (Abb. 57 bis 59). Zeitgleich bildete sich zentripetal neues trabekuläres Knochengewebe. Zentral war jeweils ein in seiner Struktur aufgelockert erscheinender Zementkern sichtbar. Im übrigen Defektbereich waren sowohl im neu gebildeten Knochengewebe als auch im Knochenmark größere Zementfragmente und kleinere Zementpartikel vorhanden. Die Größe der Zementfragmente und -partikel nahm von innen nach außen hin sowie im Zeitverlauf ab. Das Knochengewebe schien die Zementpartikel zum Teil als Startpunkt für die Knochenneubildung zu verwenden und integrierte den Zement gut in die Knochenmatrix (Abb. 59, Abb. 61 **). Das Knochenmark zwischen den einzelnen Trabekeln wies zahlreiche von Zellen umgebene bzw. aufgenommene Zementpartikel auf (Abb. 61 *). Die Zellen zeigten eine Makrophagen-ähnliche Morphologie, eine spezielle immunhistologische

Färbung zur eindeutigen Identifizierung von Makrophagen wurde nicht durchgeführt. Die Anzahl dieser Partikel nahm ebenfalls nach außen hin und mit zunehmender Implantationsdauer ab. Die neu gebildeten Trabekel reichten teilweise direkt bis an den Zementkern heran, oder es war ein zellreicher Bereich dazwischen (siehe Abb. 60), welcher hauptsächlich aus Fibroblasten, Lymphozyten, Makrophagen und einzelnen Fremdkörper-Riesenzellen bestand. Im Zeitverlauf wanderte diese, auch Blutgefäße aufweisende, „Resorptions-schicht“ nach innen und wurde durch trabekuläres Knochengewebe ersetzt. Osteoklasten kamen sowohl an den Zementfragmenten und im Knochengewebe vor. Insgesamt schien das Gewebe sehr aktiv zu sein. Zahlreiche Osteoblasten und viel Osteoid (Abb. 61, roter Pfeil) konnten zu jedem Zeitpunkt dargestellt werden. Struvit PLR 2,0 schien schneller zu degradieren als Struvit PLR 3,0.

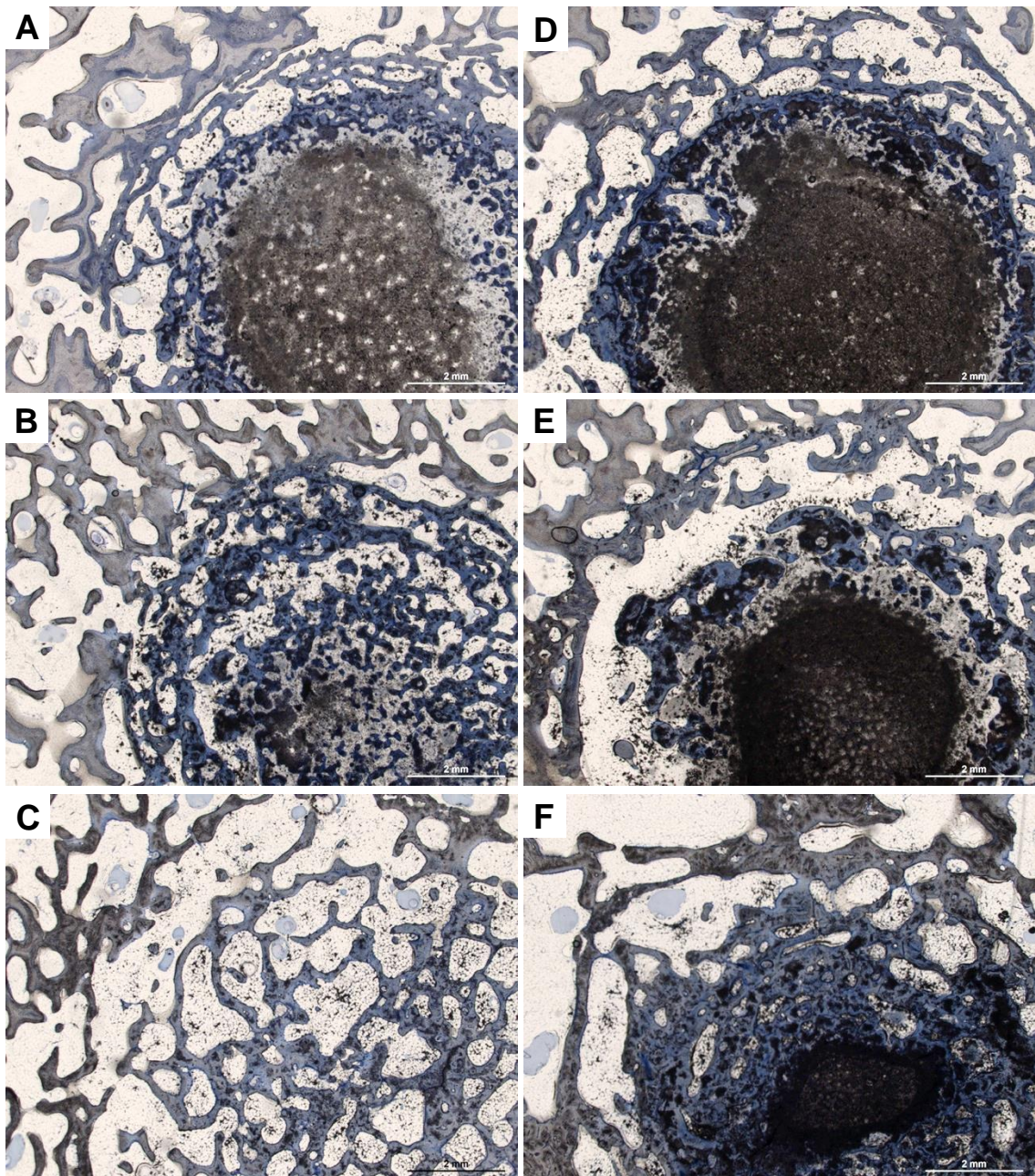


Abb. 57: Struvit PLR 2,0 (A, B, C) und 3,0 (D, E, F), Femur nach 4 (A,C) ,7 (B, D) und 10 (E, F) Monaten; 12,5x Vergr., Toluidinblau-Fuchsin

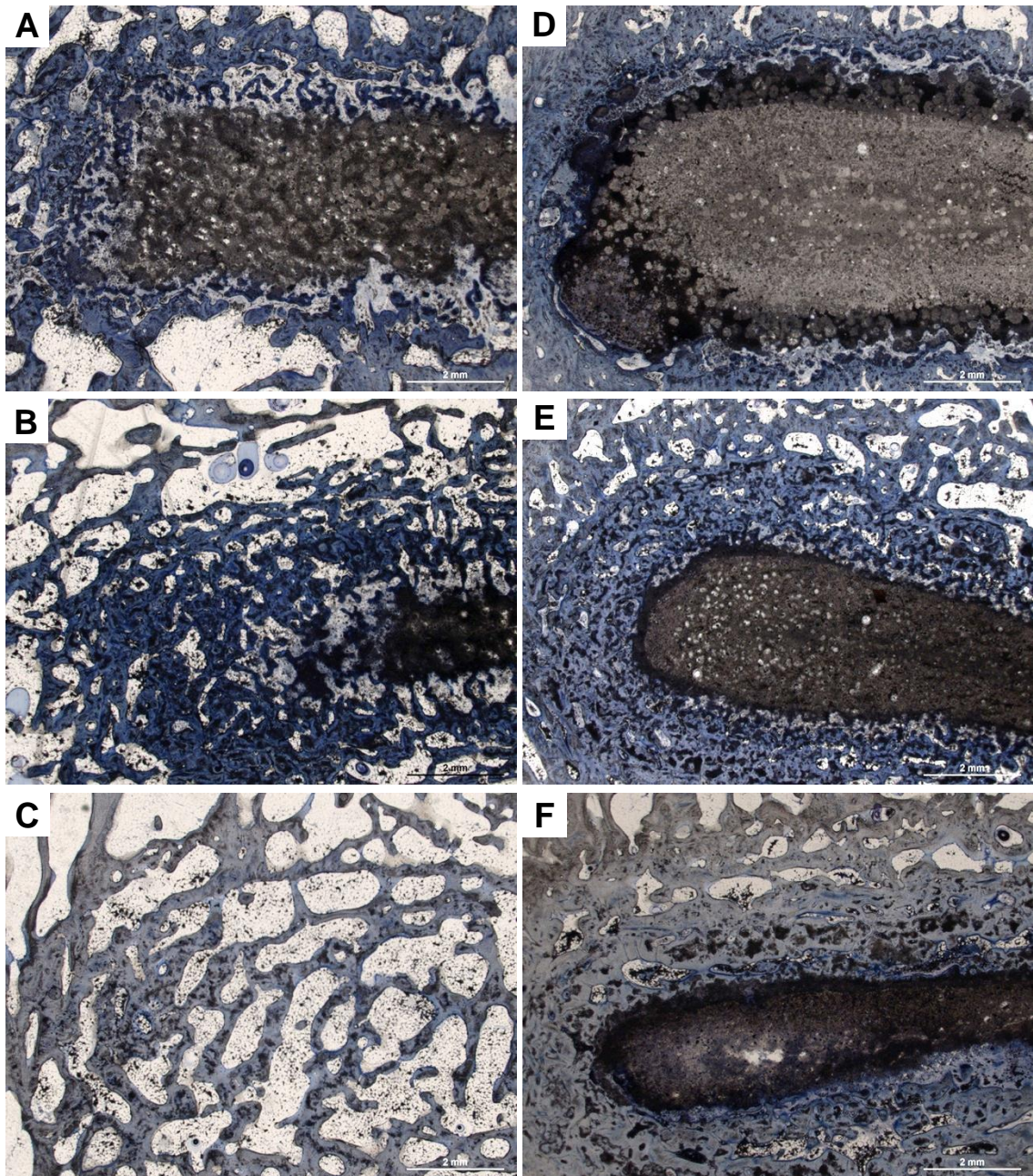


Abb. 58: Struvit PLR 2,0 (A, B, C) und 3,0 (D, E, F), Tibia nach 4 (A, D), 7 (B, E) und 10 (C, F) Monaten; 12,5x Vergr., Toluidinblau-Fuchsin

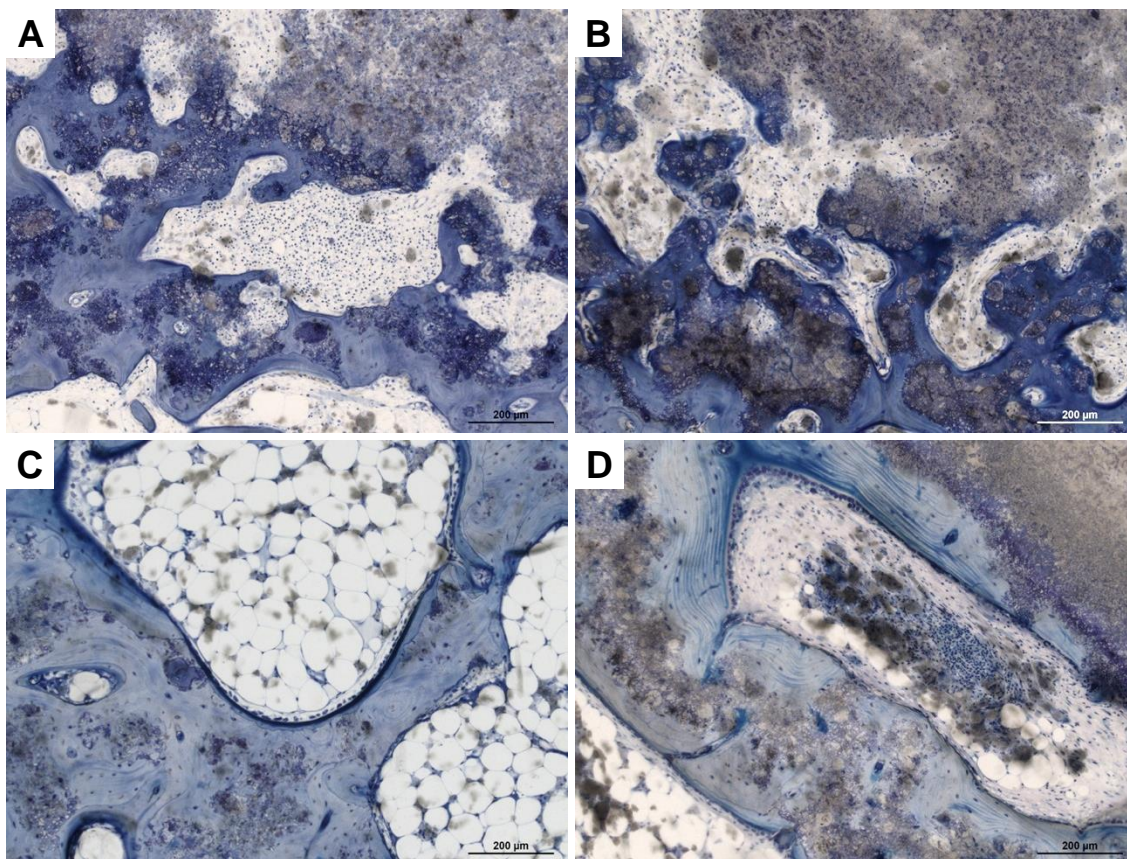


Abb. 59: Interface Struvit-Zemente-Knochen PLR 2,0 (A, C) und PLR 3,0 (B, D) Femur nach 4 (A, B) und 10 Monaten (C, D); 100x Vergr., Toluidinblau-Fuchsin

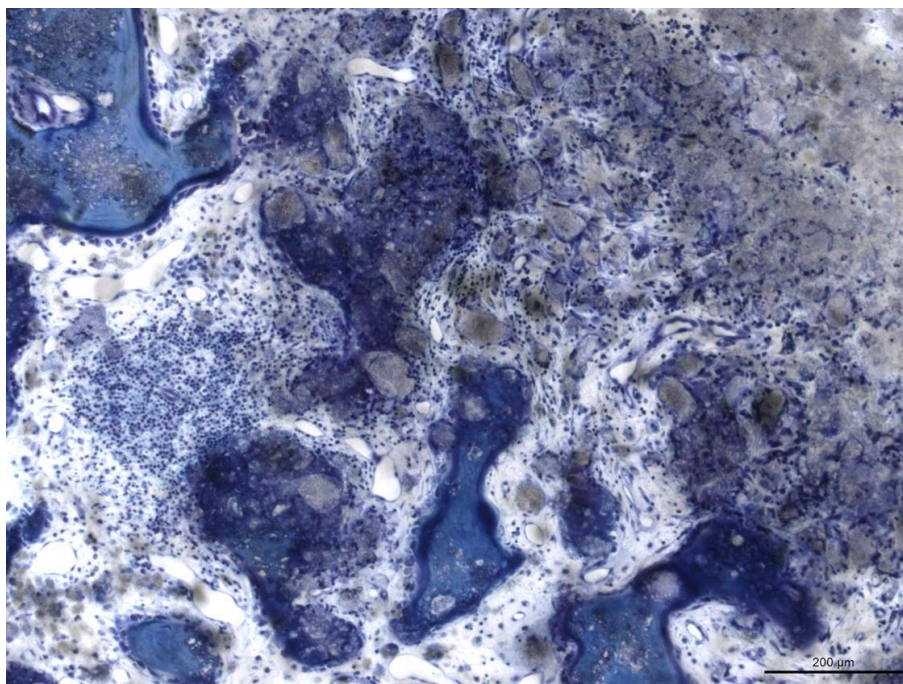


Abb. 60: Interface Struvit-Zement-Knochen: zellreiche Zone mit Blutgefäßen, Lymphozyten und Fibroblasten. 100x Vergr., Toluidinblau-Fuchsin

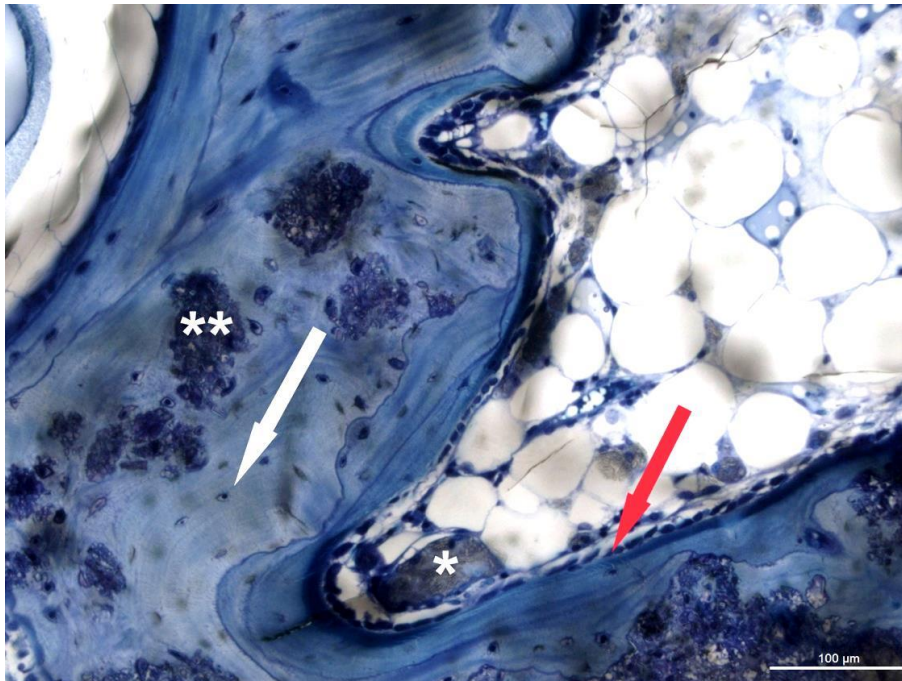


Abb. 61: Neu gebildeter Knochen, Struvit, 200x Vergr., Toluidinblau-Fuchsin: intrazelluläre Zementpartikel im Markraum (*), in Trabekel eingelagerte Zementreste (), Osteoblasten mit Osteoidsaum (roter Pfeil), Osteozyten (weißer Pfeil)**

4.6.1.2 Qualitative Histologie - subkutane Implantate

Insgesamt schien bei den subkutanen Implantaten die Menge an detektiertem Knochengewebe von der Oberflächenbeschaffenheit der Zemente abzuhängen. Erschien die Oberfläche anresorbiert bzw. rau und waren große Poren vorhanden (Abb. 62 B), war mehr Knochengewebe zu sehen als an glatten Bereichen der Implantate (Abb. 62 A).

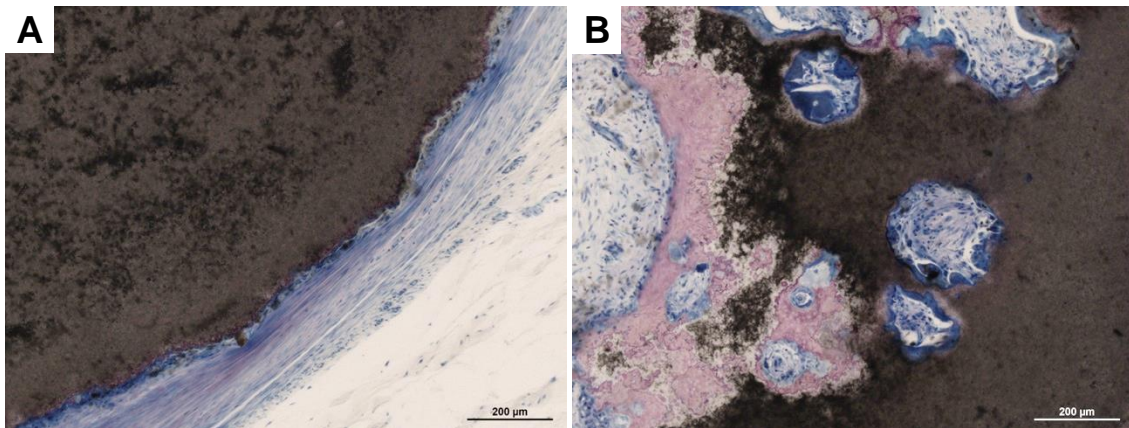


Abb. 62: Subkutanes Implantat, Bruschi PLR 2,0, 4 Monate; 100x Vergr., Giemsa, A: Randbereich, B: Oberfläche angeschnitten

Kontrollgruppe

Die subkutanen Implantate der CDHA-Gruppe waren von einer dünnen Schicht aus parallelfaserigem Bindegewebe bedeckt (Abb. 63). Die Ränder der Formkörper erschienen ausgefranst, aber nicht fragmentiert. Es konnten nur wenig Knochengewebe und einzelne Fremdkörper-Riesenzellen detektiert werden.

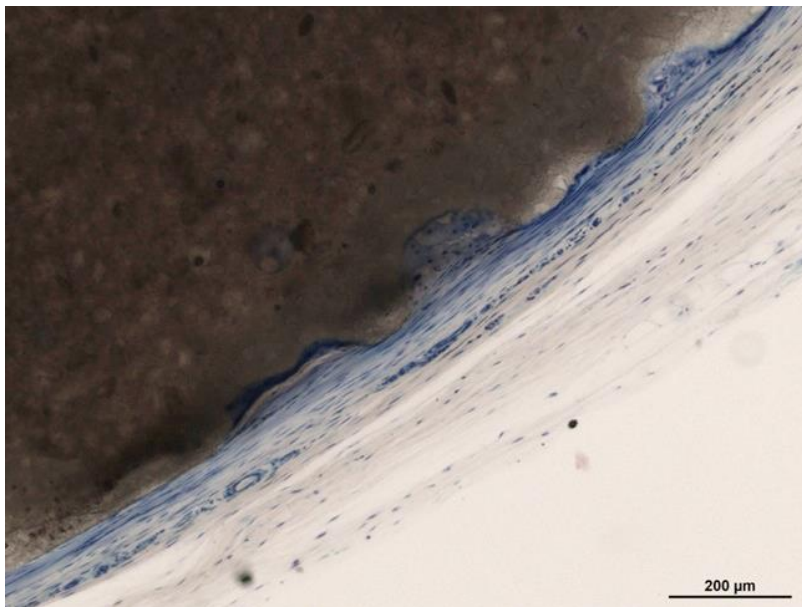


Abb. 63: Subkutanes Implantat, CDHA, 100x Vergr., Giemsa

Bruschit

Nach 4 Monaten waren beide Zementvarianten von parallelfaserigem Bindegewebe umgeben (Abb. 64 A). Knochengewebe hatte sich vor allem zwischen den Implantaten oder in gelegentlich vorkommenden Luftblasen gebildet (Abb. 64 D-F). Im weiteren Zeitverlauf erschien der Rand der Implantate ausgefranst und einige Fragmente waren reaktionslos im Bindegewebe eingebettet. Mehrkernige Riesenzellen waren nur vereinzelt sichtbar. Der Knochenanteil nahm mit zunehmender Implantationsdauer zu. Zwischen den Porositäten gab es keine Unterschiede.

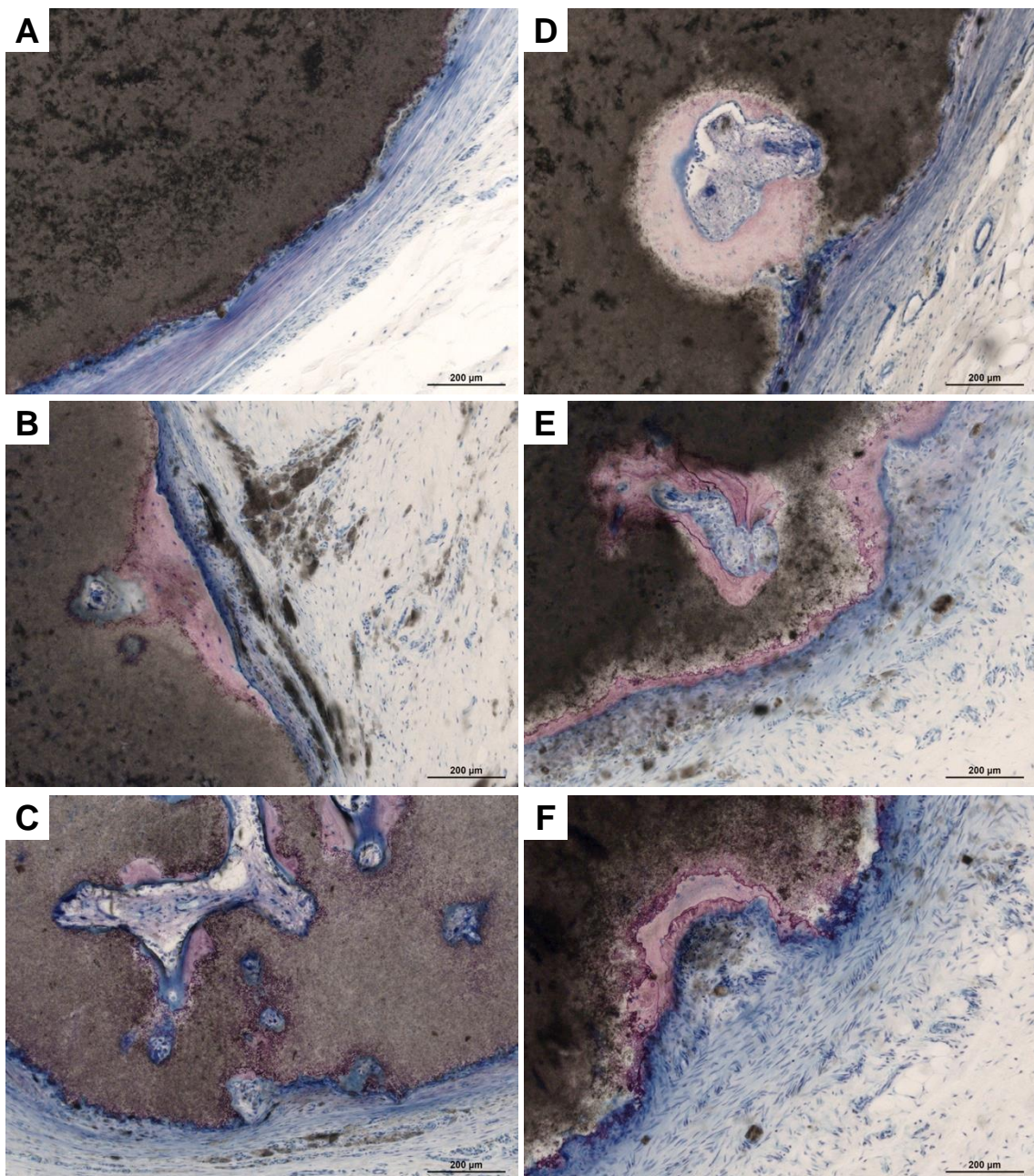


Abb. 64: Subkutane Implantate Bruschi PLR 2,0 (A, B, C) und PLR 3,0 (D, E, F) nach 4 (A, D), 7 (B, E) und 10 (C, F) Monaten; 100x Vergr., Giemsa

Struvit

Die subkutanen Struvit-Implantate mit der höheren Porosität (PLR 2,0) zeigten zu keinem Zeitpunkt eine Knochenbildung. Sie schienen sich schneller aufzulösen als die subkutanen Struvit-Implantate mit der niedrigeren Porosität (PLR 3,0). Die Degradation schien generell in zwei Phasen stattzufinden: Nach

4 Monaten waren größere rosa gefärbte Zementfragmente und kleinere braune Zementpartikel sichtbar (Abb. 65 A, D). An den Fragmenten konnten mehrkernige Riesenzellen detektiert werden, während die braunen Partikel oft von Lymphozyten und Makrophagen umgeben waren. Insgesamt waren die Implantate von zellreichem Bindegewebe (Fibroblasten, Lymphozyten) umgeben. Nach 7 Monaten waren von den Struvit PLR 2,0-Implantaten fast nur noch braune Zementpartikel vorhanden (Abb. 65 B). Diese waren in zellreichem Bindegewebe eingelagert, wobei die Zelldichte sowohl gegenüber der 4-Monats-Gruppe als auch gegenüber der niedrigeren Porosität geringer war. Bei den Struvit PLR 3,0-Implantaten waren neben den braunen Zementpartikeln noch rosa Zementfragmente vorhanden (Abb. 65 E). Zwischen diesen Fragmenten hatten sich kleine Inseln von Knochengewebe gebildet. Vereinzelt mehrkernige Riesenzellen waren hauptsächlich bei PLR 3,0 sichtbar. Nach 10 Monaten waren bei der PLR 2,0-Gruppe nur noch wenige braune Zementpartikel, welche in einem zellarmen Bindegewebe eingebettet waren, sichtbar (Abb. 65 C). Bei der PLR 3,0-Gruppe waren z. T. noch größere rosa Zementfragmente sowie etwas Knochengewebe vorhanden (Abb. 65 F). Zellreiches Bindegewebe mit eingelagerten braunen Zementpartikeln schloss sich nach außen hin an.

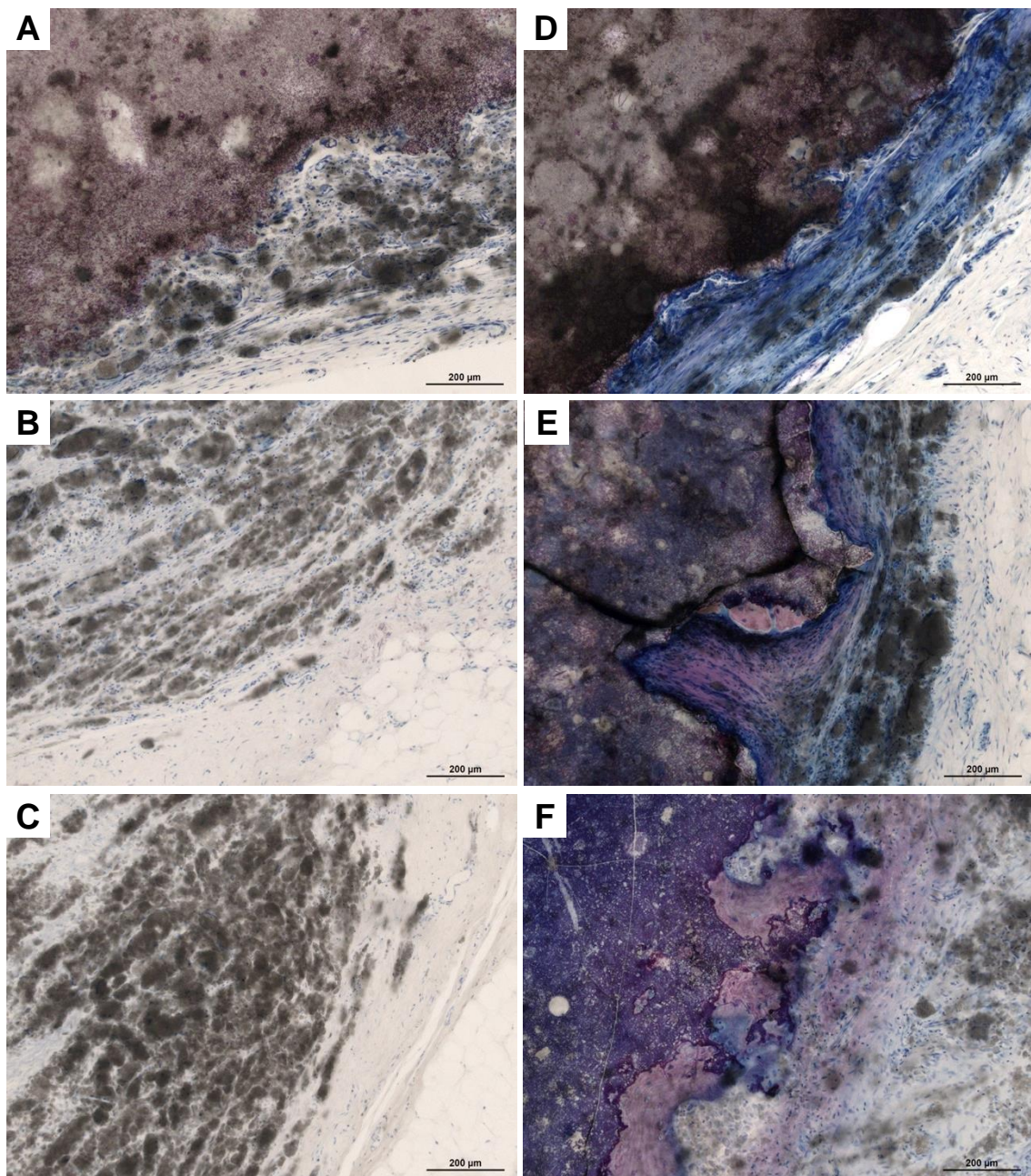


Abb. 65: Subkutane Implantate Struvit PLR 2,0 (A, B, C) und PLR 3,0 (D, E, F) nach 4 (A, D), 7 (B, E) und 10 (C, F) Monaten; 100x Vergr., Giemsa

4.6.1.3 Quantitative Histologie - Knochenimplantate

Bruschit

Der Anteil an verbliebenem Zement lag bei allen Gruppen, unabhängig von der Porosität, der Implantationsdauer und dem Implantationsort bei nahezu 100 % (Abb. 66 A, B). Der Anteil an neu gebildetem Knochen war dementsprechend gering (Abb. 66 C, D).

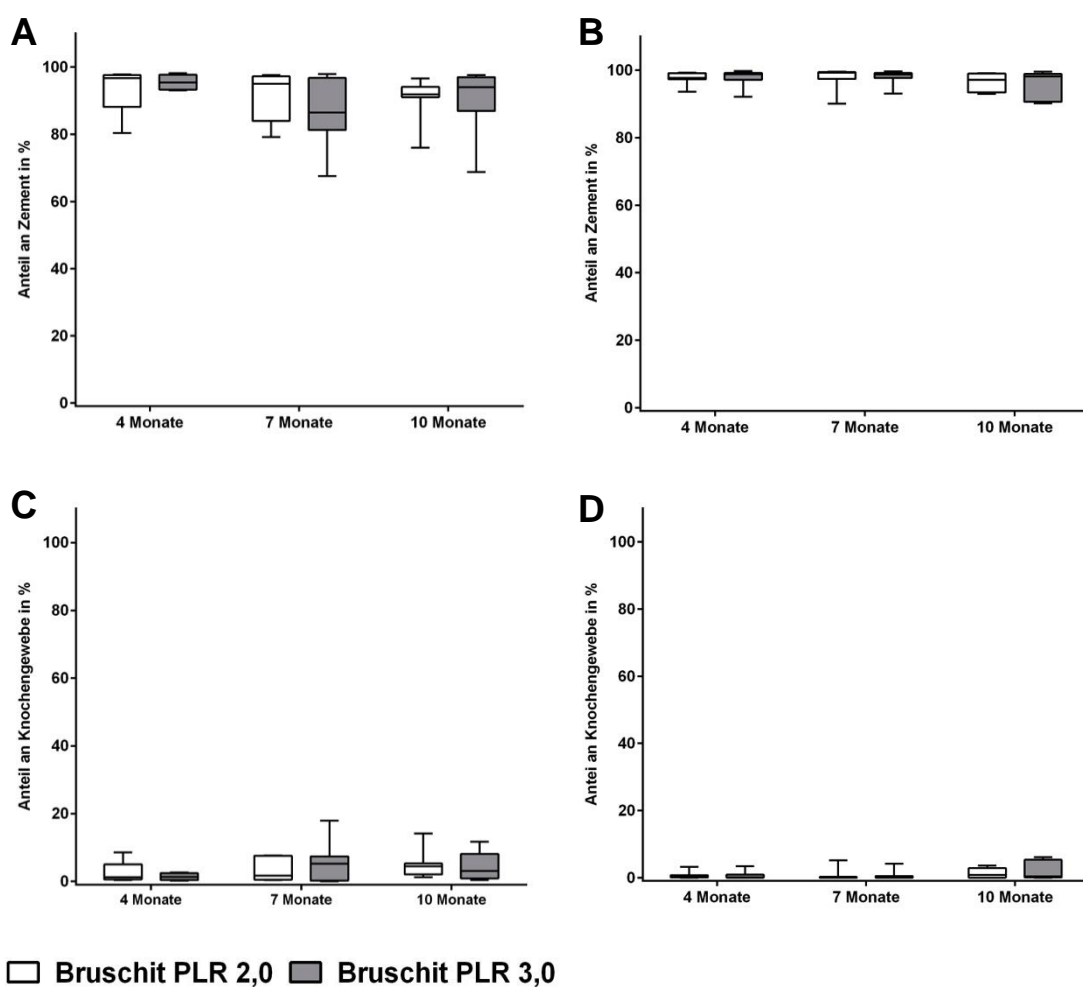


Abb. 66: Quantitative Histologie Bruschi-Gruppen Femur (A, C) und Tibia (B, D)

Struvit

Nach 4 Monaten Implantation war bei der PLR 2,0-Gruppe ein Zementanteil von 33,2 % im Femurdefekt bzw. 65,8% im Tibiadefekt vorhanden. Nach 10 Monaten hatte sich der Zementanteil bei beiden Implantationsorten auf fast 0 % weiter reduziert (Abb. 67 A, B, weiße Boxplots). Gleichzeitig nahm der Anteil an neu gebildetem Knochen kontinuierlich zu. Im Femurdefekt stieg der Knochenanteil von 19,3 % nach 4 Monaten auf 42,1 % nach 10 Monaten und im Tibiadefekt von 11,5 % auf 45,3 % (Abb. 67 C, D, weiße Boxplots).

Bei der PLR 3,0-Gruppe reduzierte sich der Zementanteil im Femurdefekt von 47,5 % (4 Monate) auf 12,1 % (10 Monate) und im Tibiadefekt von 72 % (4 Monate) auf 6,3 % (10 Monate). Der Anteil an Knochengewebe nahm bei beiden Implantationsorten im Zeitverlauf zu (Abb. 67 A, B, graue Boxplots). Im Femurdefekt konnten nach 4 Monaten 25,5 % und nach 10 Monaten 42,3 % Knochenanteil detektiert werden, im Tibiadefekt waren es 11,5 % (4 Monate) bzw. 47,9 % (10 Monate, Abb. 67 C, D, graue Boxplots).

Beim Vergleich der Porositäten konnten in Bezug auf den Anteil an neu gebildetem Knochen keine Unterschiede festgestellt werden. Dies traf für alle Implantationszeitpunkte und beide Implantationsorte zu. Der Anteil an Zement war bei den Tibiadefekten nach 7 und 10 Monaten bei den PLR 3,0-Gruppen höher als bei den entsprechenden PLR 2,0-Gruppen (Abb. 67 B).

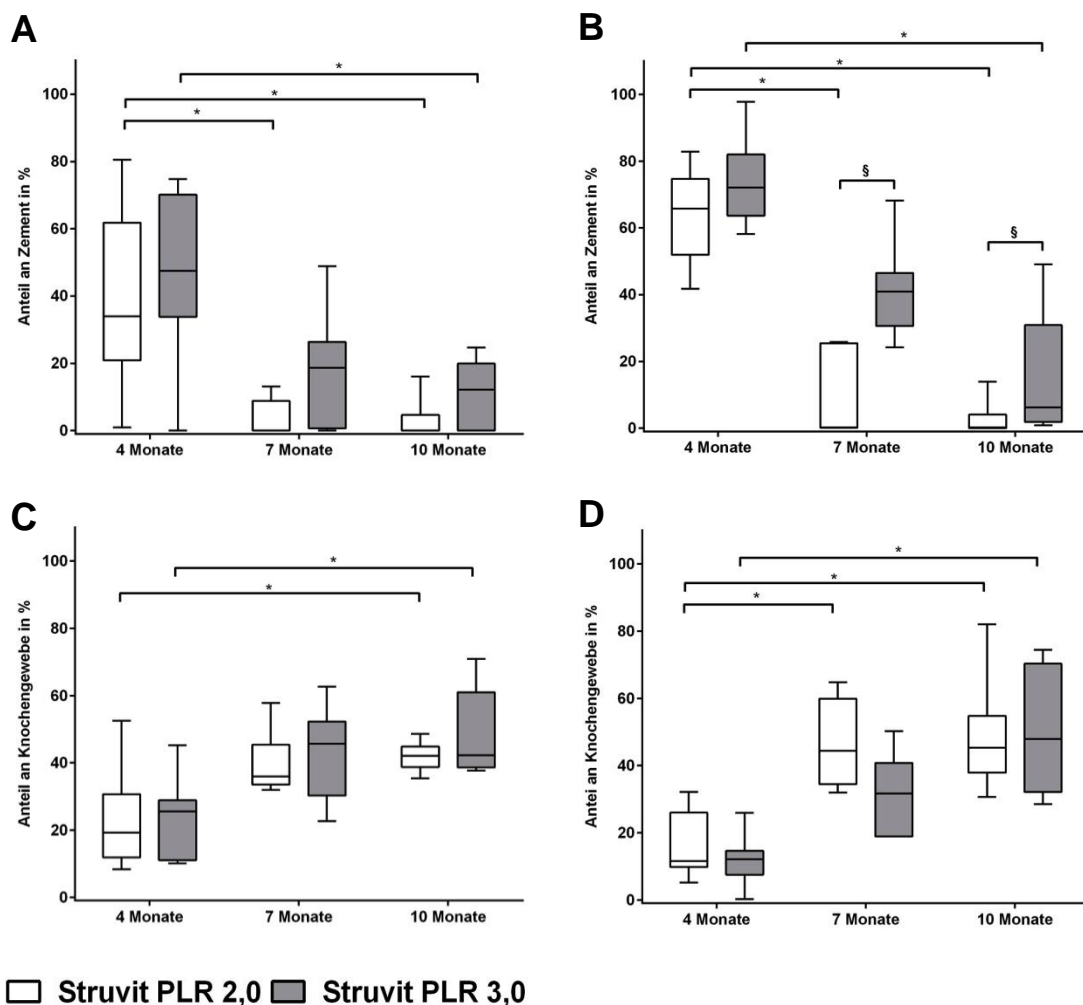


Abb. 67: Quantitative Histologie Struvit-Gruppen Femur (A, C) und Tibia (B, D);

* Kruskal-Wallis-Test, $p < 0,05$; § Wilcoxon-Test, $p < 0,05$

Vergleich der Materialien nach 10 Monaten

Der CDHA-Zement war ähnlich wie die Bruschit-Zemente nach 10 Monaten noch fast zu 100 % vorhanden. Dementsprechend hatte sich auch kaum Knochengewebe im Defekt gebildet. Die Leerdefekte zeigten unabhängig vom Implantationsort signifikant mehr Knochenbildung als die Bruschit- und CDHA-Gruppen. Die Struvit-Gruppen zeigten jedoch deutlich bei beiden Implantationslagern die meiste Knochenneubildung und den geringsten Zementanteil.

4.6.2 Paraffinschnitte: TRAP-Färbung

Bei den Leerdefekten konnten mittels der TRAP-Färbung in beiden Implantationsorten keine Osteoklasten nachgewiesen werden.

In der CDHA-Gruppe konnten für die Femur-Implantate mehrkernige TRAP-positive Zellen sicher nachgewiesen werden (Abb. 68 und Tabelle 3), während dies bei den Tibia-Implantaten nicht gelang.

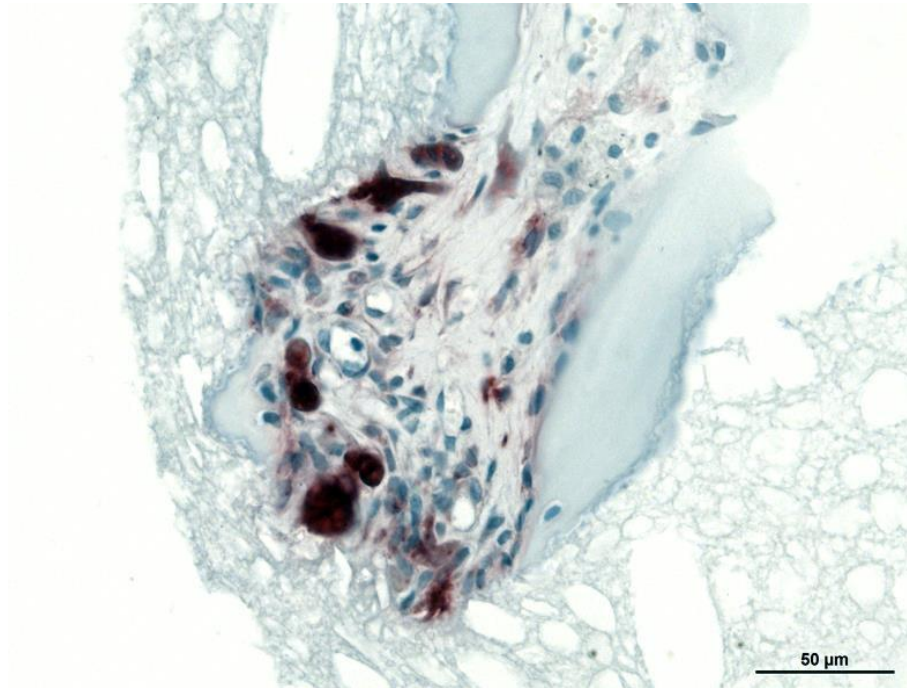


Abb. 68: CDHA, 10 Monate; 400x Vergr., TRAP-Färbung

Die Bruschi-Gruppen (Abb. 69 und Tabelle 3) wiesen insgesamt deutlich weniger TRAP-positive mehrkernige Zellen auf als die Struvit-Gruppen. Teilweise waren nur vereinzelte Zellen dicht am Zement sichtbar. Generell fiel auf, dass bei Bruschi PLR 3,0 keine oder deutlich weniger Osteoklasten als bei PLR 2,0 detektiert werden konnten.

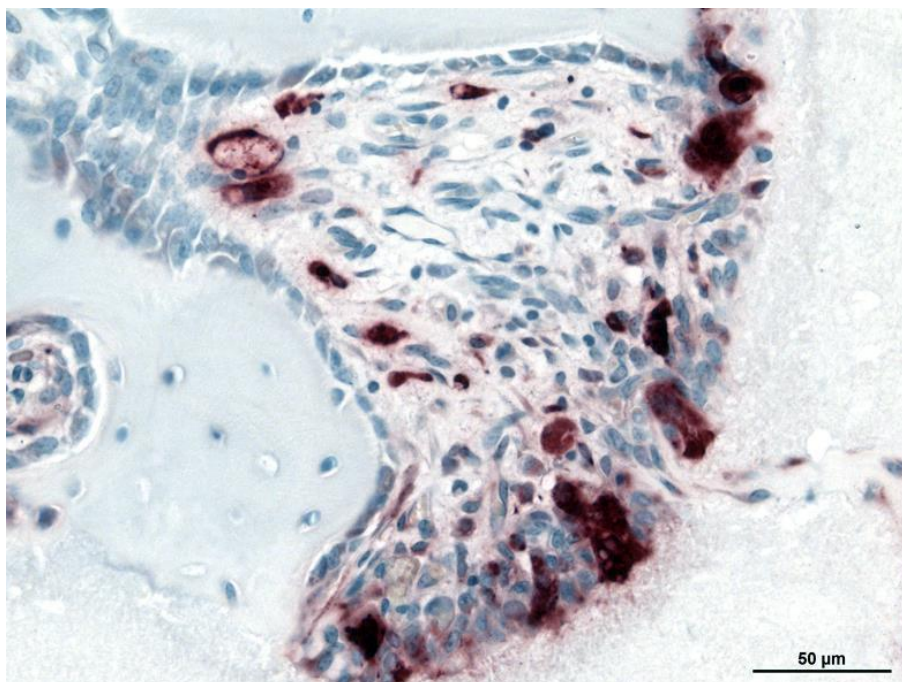


Abb. 69: Bruschit, 10 Monate; 400x Vergr., TRAP-Färbung

TRAP-positive mehrkernige Zellen konnten vor allem bei den Struvit-Gruppen nachgewiesen werden (Abb. 70 und Tabelle 3). Die Zellen waren entweder direkt am Zement lokalisiert oder im neu gebildeten Knochengewebe. Dabei fiel auf, dass bei den Tibia-Implantaten zu allen Zeitpunkten tendenziell weniger Osteoklasten sichtbar waren als bei den Femur-Implantaten. Nach 7 Monaten konnten bei beiden Implantationsorten und beiden Porositäten die meisten Zellen detektiert werden. Nach 10 Monaten zeigten die Struvit PLR 2,0-Gruppen deutlich weniger Osteoklasten als die PLR 3,0-Gruppen.

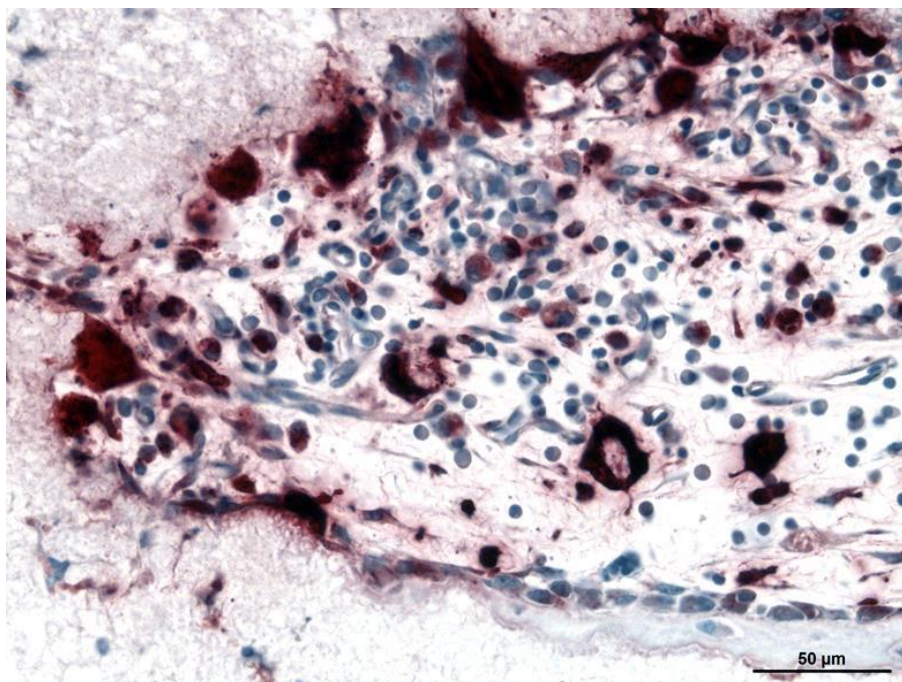


Abb. 70: Struvit, 10 Monate; 400x Vergr., TRAP-Färbung

Tabelle 3: Semi-quantitative Auswertung zum Vorkommen von TRAP-positiven mehrkernigen Zellen (- keine, (+) vereinzelte, + wenige, ++ viele, +++ sehr viele TRAP-positive Zellen)

	Struvit				Bruschit				CDHA		Leerdefekt	
	2,0		3,0		2,0		3,0					
	Femur	Tibia	Femur	Tibia	Femur	Tibia	Femur	Tibia	Femur	Tibia	Femur	Tibia
4 Monate	++	+	++	+	+	+	+	(+)				
7 Monate	+++	+	++	+	-	(+)	-	-				
10 Monate	+	-	++	-	+	+	(+)	(+)	+	-	-	-

4.7 Phasenanalyse mittels Pulverdiffraktometrie (XRD)

Bei den Bruschit-Zementen kam es bei PLR 2,0 nach Implantation zu einer Phasenumwandlung zu Octacalciumphosphat (o). Die Peaks von Bruschit (b) wurden im Zeitverlauf kleiner und verschwanden, während die Peaks von Octacalciumphosphat nach 10 Monaten deutlich sichtbar wurden (Abb. 71). Bei Bruschit PLR 3,0 konnte dies nicht beobachtet werden.

Bei den Struvit-Zementen (Abb. 72) war nach 4 Monaten kein Struvit-Anteil (s) mehr zu detektieren sondern nur noch Farringtonit (f). Ab 7 Monaten Implantation konnten Anteile von Hydroxylapatit (HA) nachgewiesen werden.

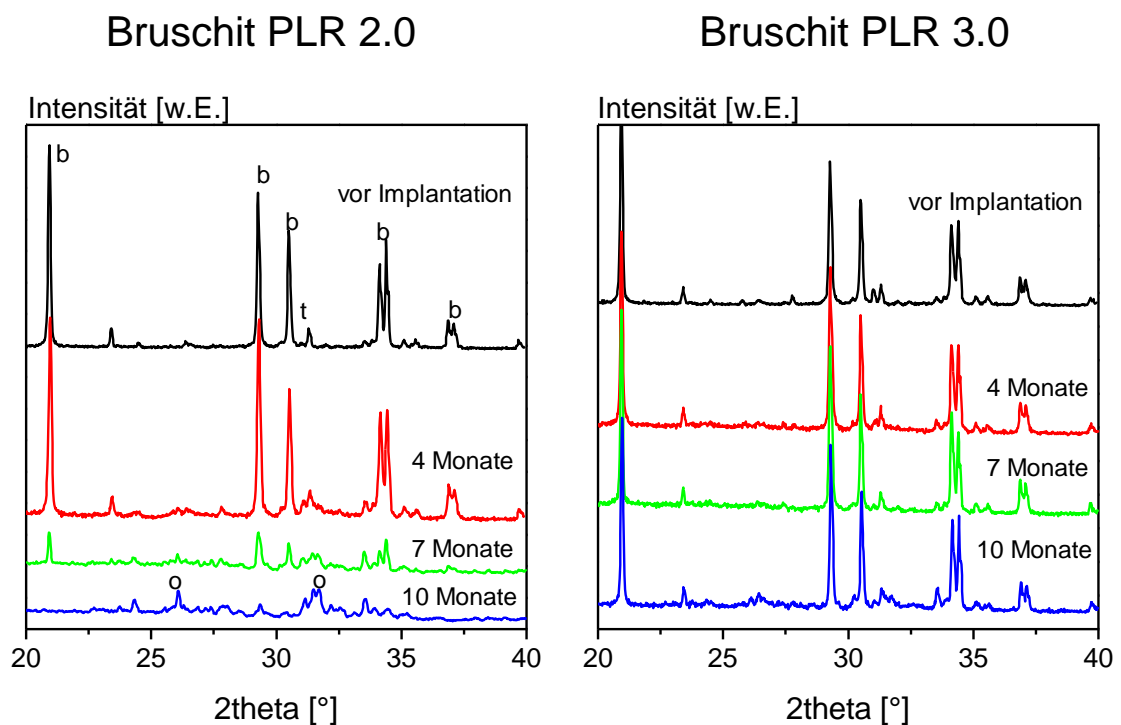


Abb. 71: XRD- Phasenanalyse der Zemente vor und nach Implantation

b = Bruschit, t = β -TCP, o = Octacalciumphosphat

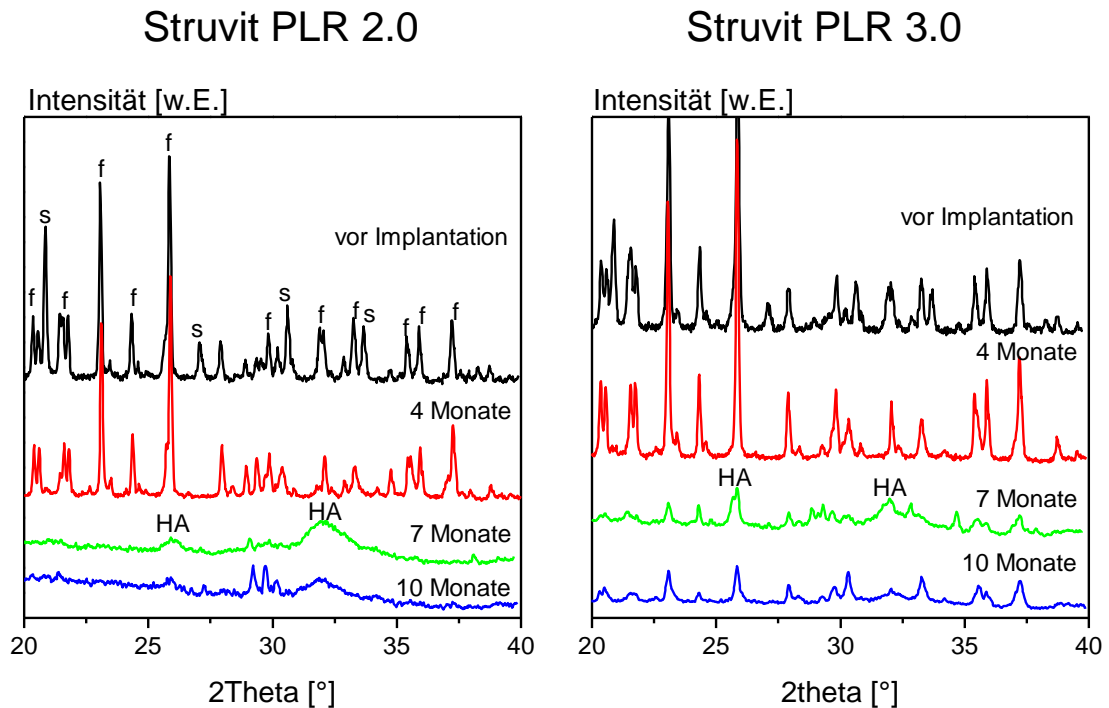


Abb. 72: Abb. 1: XRD- Phasenanalyse der Zemente vor und nach Implantation
s = Struvit, f = Farringtonit, HA = Hydroxylapatit

4.8 Quantitative Backscattered Electron Imaging (qBEi)

Auf den qBEi-Bildern stellte sich stärker mineralisiertes Gewebe, wie zum Beispiel im Inneren der Trabekel, heller dar als weniger stark mineralisiertes Gewebe, wie zum Beispiel die äußeren Bereiche der Trabekel. Aufgrund der hohen Auflösung konnte die Verteilung der Mineralisierung der einzelnen Trabekel in BMDD-Histogrammen dargestellt werden. Die einzelnen Histogramme zeigten in allen Gruppen einen ähnlichen Verlauf. Als Beispiel ist in Abb. 73 ein typisches qBEi-Bild (A) mit dazugehörigem BMDD-Histogramm (B) dargestellt.

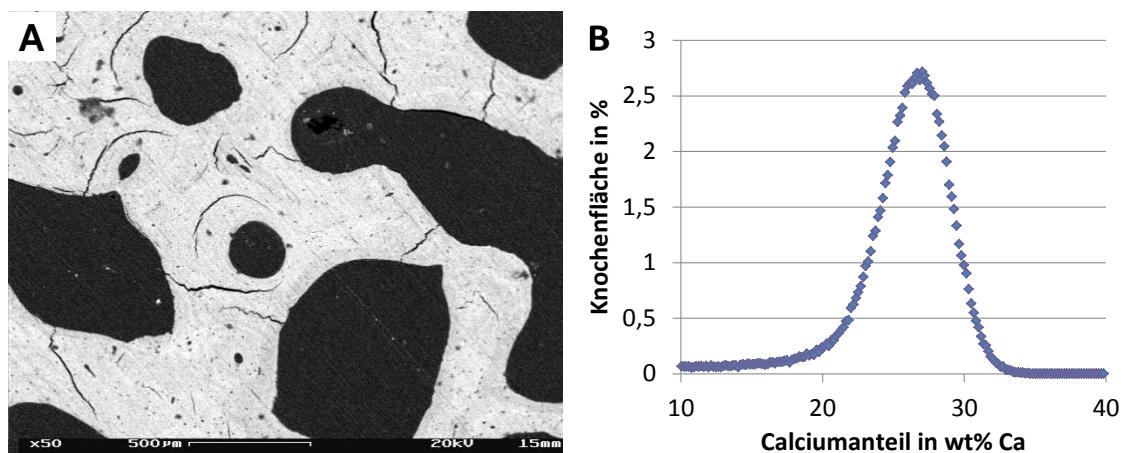


Abb. 73: qBEi-Bild (A) und BMDD-Histogramm (B) für Struvit PLR 2,0 (Tier Nr. 101)

Die ermittelten Werte für Ca_{Mean} , $MaxFreq$, Ca_{MaxFreq} und $FWHM$ unterschieden sich zwischen den einzelnen Gruppen nicht. Im Mittel lag der gewichtete Calciumgehalt Ca_{Mean} bei $25,4 \pm 1,3$ wt% Ca. Der am häufigsten vorkommende Calciumgehalt Ca_{MaxFreq} war $26,4 \pm 0,3$ wt% Ca. Der Wert für $FWHM$ lag bei $6,1 \pm 1,3$ Δ wt% Ca. (Tabelle 4). Exemplarisch ist in Abb. 74 ein BMDD Histogramm der gesamten Struvit PLR 2,0-Gruppe dargestellt.

Tabelle 4: BMDD-Werte

	Struvit		Bruschit		CDHA	Leerdefekt
	2,0	3,0	2,0	3,0		
Ca_{Mean} [wt% Ca]	$25,3 \pm 1,0$	$24,7 \pm 1,4$	$25,5 \pm 0,7$	$25,7 \pm 1,9$	$26,0 \pm 1,4$	$25,2 \pm 1,1$
Ca_{MaxFreq} [wt% Ca]	$26,3 \pm 0,9$	$25,8 \pm 1,5$	$26,6 \pm 0,6$	$26,7 \pm 2,1$	$26,9 \pm 1,5$	$26,3 \pm 1,5$
$FWHM$ [Δ wt% Ca]	$5,8 \pm 0,6$	$6,4 \pm 0,7$	$6,3 \pm 0,6$	$6,1 \pm 0,7$	$5,9 \pm 0,7$	$6,2 \pm 0,8$

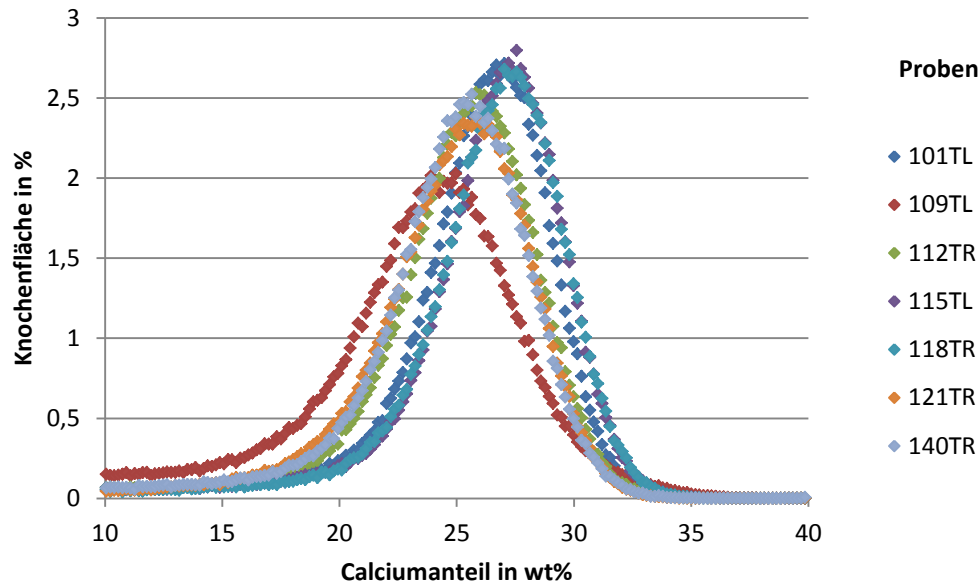


Abb. 74: BMDD-Histogramme Struvit PLR 2,0

4.9 Energiedispersive Röntgendiffraktometrie

Zum Vergleich sind in Abb. 75 die EDX-Spektren des Knochengewebes von Struvit PLR 2,0 und dem Leerdefekt dargestellt. Der Peak für Magnesium ist bei Struvit PLR 2,0 höher als beim Leerdefekt. Die quantitativen Punktanalysen innerhalb eines Trabekels ergaben, dass der Magnesium-Anteil des neu gebildeten Knochens in der Nähe der Struvit- Zemente gegenüber den anderen Zementen und dem Leerdefekt deutlich erhöht war (Tabelle 5).

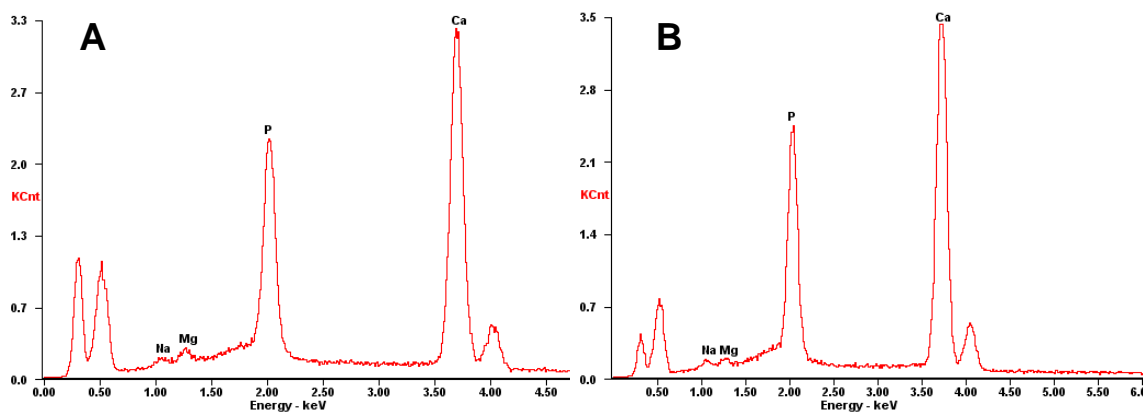


Abb. 75: EDX- Spektren des Knochengewebes, A: Struvit PLR 2,0, B: Leerdefekt

Tabelle 5: Magnesium-Anteil im Trabekel

	Struvit		Bruschit		CDHA	Leerdefekt
	2,0	3,0	2,0	3,0		
Mg [wt %]	1,64	1,42	0,72	0,66	0,65	0,99

Die Mappings zeigten, dass sich Magnesium hauptsächlich im Markraum befand (Abb. 76 C).

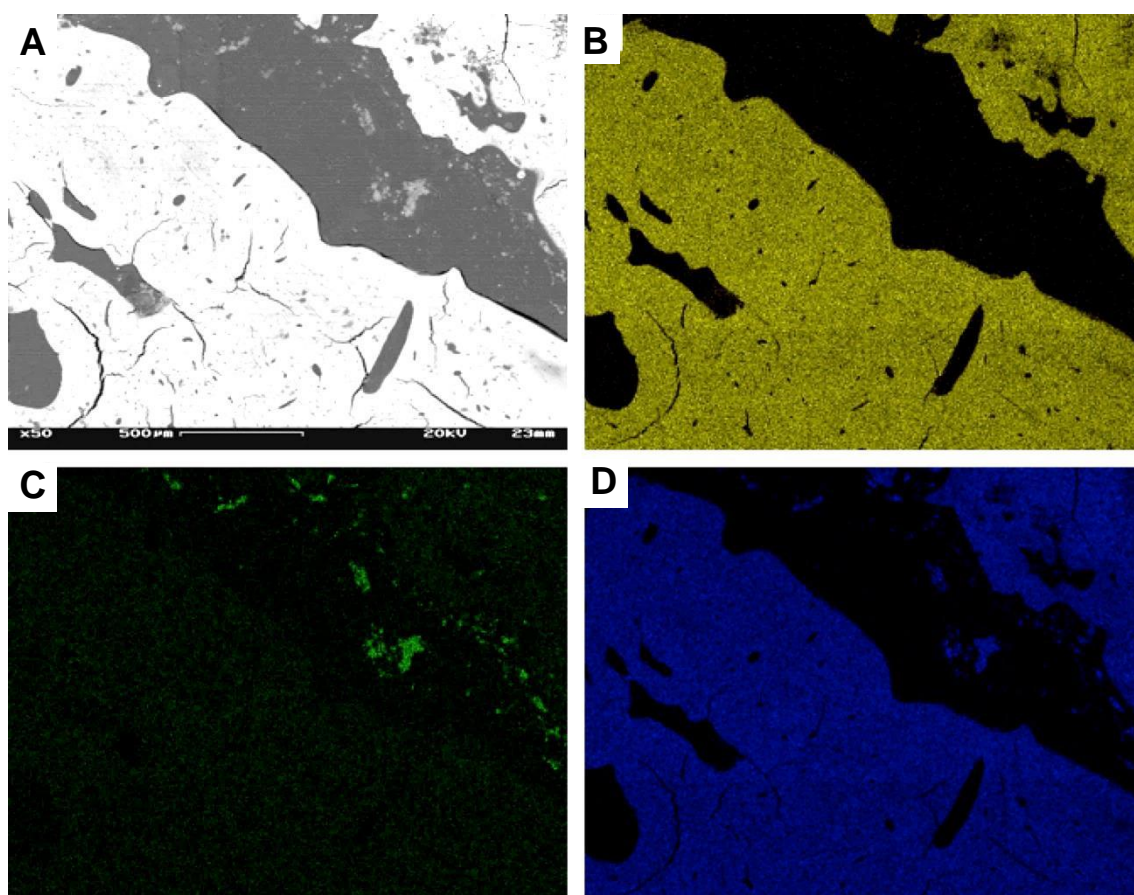


Abb. 76: BSE-Bild (A) und EDX-Mappings des neu gebildeten Knochens in der Nähe von einem Struvit PLR 2,0-Zement für Calcium (B), Magnesium (C) und Phosphor (D)

5 DISKUSSION

Alle in der vorliegenden Studie untersuchten Zementvarianten zeigten eine gute Biokompatibilität und Osseointegration. Nach 10 Monaten Implantation wurde der Kontroll-CDHA-Zement nicht resorbiert und der Leerdefekt nicht mit Knochengewebe durchbaut. Die Bruschi-Zemente zeigten nach 10 Monaten nur eine marginale Auflösung. Bei der Variante mit der höheren Porosität (PLR 2,0) kam es zu einer Phasenumwandlung zu Octacalciumphosphat und die Steifigkeit reduzierte sich über den Implantationszeitraum um ca. 50 %. Bei PLR 3,0 konnte keine Phasenumwandlung beobachtet werden und die Steifigkeit veränderte sich kaum. Die Struvit-Zemente hatten sich in Abhängigkeit von der Porosität nach 10 Monaten fast vollständig aufgelöst und wurden durch trabekulären Knochen ersetzt. Dabei wurden Zementpartikel sowohl in den neu gebildeten Knochen eingelagert als auch im Markraum intrazellulär von Makrophagen aufgenommen. Nach 4 Monaten war mittels XRD kein Struvit-Anteil mehr zu detektieren sondern nur noch Farringtonit. Ab 7 Monaten Implantation konnten Anteile von Hydroxylapatit nachgewiesen werden. Die Steifigkeit der Struvit-Zemente reduzierte sich nach Implantation um fast 90%, stieg aber im Zeitverlauf wieder etwas an. Mehrkernige TRAP-positive Zellen konnten bei allen Zementen zu fast jedem Zeitpunkt nachgewiesen werden, was zeigt, dass die Zemente nicht nur durch chemisch-physikalische Prozesse, sondern auch durch eine zelluläre Aktivität degradiert wurden.

Um die eingangs gestellten Hypothesen zu beantworten, werden die Ergebnisse der vorliegenden Studie in Bezug auf verschiedene Aspekte diskutiert. Abschließend erfolgt eine Stellungnahme zu den Hypothesen.

5.1 Eignung des Tier- und Implantationsmodells

5.1.1 Tiermodell

Um die Biokompatibilität von Knochenimplantaten *in vivo* zu untersuchen, müssen geeignete Tiermodelle genutzt werden. *In vitro*-Versuche liefern nur Informationen über die Zytokompatibilität und nicht über die Biokompatibilität eines Materials (PEARCE et al., 2007).

Mäuse und Ratten sind von den Dimensionen her zu klein, um degradierbare Knochenersatzmaterialien zu untersuchen (POTES et al., 2009). Kaninchen werden zum Teil für solche Studien verwendet, aber auch hier sind nur kleine Defekte möglich (meistens Bohrlöcher mit z.B. $d = 5$ mm und $l = 10$ mm, was einem Volumen von 0,2 ml entspricht (OHURA et al., 1996)), die eigentlich nicht mit den Defektgrößen beim Mensch vergleichbar sind. Zum Vergleich: Knochenzysten bei Kindern wurden mit 15 - 20 ml Calciumphosphat-Zement aufgefüllt (SLONGO & JOERIS, 2006). In der vorliegenden Studie wurden ca. 1,0 ml (Tibiadefekt) bzw. ca. 1,2 ml (Femurdefekt) Zement eingebracht. Das ist immer noch deutlich weniger als beim Mensch, aber ein fünf- bzw. sechsmal größeres Volumen als beim Kaninchen.

Das Schaf wird für Untersuchungen zur Frakturheilung oder zur Integration von Knochenersatzmaterialien oft verwendet. Es weist nicht nur in Bezug auf Gewicht und Größe ähnliche Dimensionen wie der Mensch auf, sondern es besitzt auch eine dem Menschen ähnliche Makrostruktur des Knochens. Auch wenn die Mikrostruktur des ovinen Knochens (primäre und bei älteren Tieren auch sekundäre Osteone) von der des Menschen (sekundäre Osteone) abweicht, ist es als orthopädisches Modell geeignet, da es ein mit dem Menschen vergleichbares Knochenremodelling besitzt. Darüber hinaus sind Schafe relativ kostengünstig, einfach im Umgang und ethisch als Versuchstiere besser akzeptiert als z.B. Hunde, die ebenfalls eine dem Menschen ähnliche Knochenstruktur aufweisen (PEARCE et al., 2007; POTES et al., 2009; ELLINGHAUS et al., 2011). Da sich die Knochenstruktur während des Wachstums ändert (NAFEI et al., 2000), wurden für diese Studie adulte Schafe verwendet.

Die Implantationszeiträume von 4, 7 und 10 Monaten wurden gewählt, um den Degradationsverlauf untersuchen zu können. Im Fall von den Struvit-Zementen konnte dadurch eine kontinuierlich fortschreitende Degradation der Zemente und eine zunehmende Knochenneubildung beobachtet werden.

5.1.2 Defektgeometrie und Lokalisation

Als Implantationsorte wurden ein nicht belasteter Bohrlochdefekt in der medialen Femurkondyle, sowie ein teilbelasteter keilförmiger Defekt in der proximalen Tibia gewählt. Bohrlochdefekte sind übliche Modelle, um resorbierbare Knochenersatzmaterialien zu untersuchen (MUNTING et al., 1993; OHURA et al., 1996; FRAYSSINET et al., 1998; IKENAGA et al., 1998; FLAUTRE et al., 1999; LU et al., 1999; FLAUTRE et al., 2002; DEL REAL et al., 2003; APELT et al., 2004; THEISS et al., 2005; VON RECHENBERG et al., 2013). Der teilbelastete keilförmige Defekt in der proximalen Tibia ist gut charakterisiert (IGNATIUS et al., 1997; SIMON et al., 2003; IGNATIUS et al., 2005; HARMS et al., 2012) und ist im Hinblick auf die mechanische Stabilität der Zemente *in vivo* aussagekräftig. In der vorgestellten Studie zeigten die Bruschit-Implantate im Tibia-Defekt deutliche Risse in Richtung der Belastung sowie in einem 90° Winkel dazu, während die CDHA-Implantate keine Risse aufwiesen. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des biomechanischen Indentationstestes, bei dem nach 10 Monaten der CDHA-Zement eine höhere Steifigkeit aufwies als beide Bruschit-Zemente. Bei den Struvit-Zementen konnten keine Risse detektiert werden, da diese sehr schnell degradierten. Einen Einfluss auf die Degradation und die Knochenneubildung schien der Implantationsort nicht zu haben, auch wenn der direkte Vergleich der Implantationsorte anhand der quantitativen histologischen Auswertung aufgrund der unterschiedlichen Defektgeometrie nur eingeschränkt möglich war. Subjektiv erschien das Knochengewebe im Tibiadeфекt zum Teil etwas dichter.

Die Defektgröße und der Implantationsort sind neben dem Tiermodell wichtige Kriterien bei der Untersuchung von degradierbaren Knochenersatzstoffen. In dieser Studie wurden zwei Defekte kritischer Größe betrachtet. Durch das Mitführen einer Kontrollgruppe mit Leerdefekten konnte bestätigt werden, dass

die Leerdefekte auch nach 10 Monaten nicht spontan geheilt waren. Ist der Defekt zu klein gewählt, wäre ein Knochenersatz nicht unbedingt notwendig, da die Regenerationsfähigkeit des Knochens ausreichen würde, um den Defekt zu füllen.

Dass das Volumen des Implantats und das Tiermodell eine wesentliche Rolle beim Degradationsverhalten spielen, konnten auch Flautre et al. (FLAUTRE et al., 1999) nachweisen, in deren Studie das gleiche Material im Schafmodell (Bohrloch: $d = 10 \text{ mm}$, $l = 20 \text{ mm}$) dreimal langsamer degradierte als im Kaninchenmodell (Bohrloch: $d = 4,7 \text{ mm}$, $l = 10 \text{ mm}$). Die Ursache hierfür wurde sowohl in der unterschiedlichen Defektgröße als auch im unterschiedlichen Tiermodell gesehen.

Während die Bruschi- und CDHA-Zemente nach Präparation des Weichgewebes noch deutlich von außen sichtbar waren, waren die Struvit-Zemente eingesunken. Das deutet darauf hin, dass die Degradation in dem Bereich, der mit dem umgebenden Weichgewebe Kontakt hatte, zu schnell von statten ging. Ursache dafür ist wahrscheinlich der höhere Flüssigkeitsaustausch im Weichgewebe. In Konsequenz muss gesagt werden, dass die Struvit-Zemente nur für geschlossene Defekte, bei denen der kortikale Knochen weitestgehend intakt ist oder rekonstruiert werden kann, geeignet sind. Überprüft werden könnte dies mit einem gedeckelten Defektmodell (Abb. 77), bei dem ein Boneflap der Kortikalis durchgeführt wird, wie es zum Beispiel in den Studien von Hannink et al. und Ohura et al. angewandt wurde (OHURA et al., 1996; HANNINK et al., 2008).

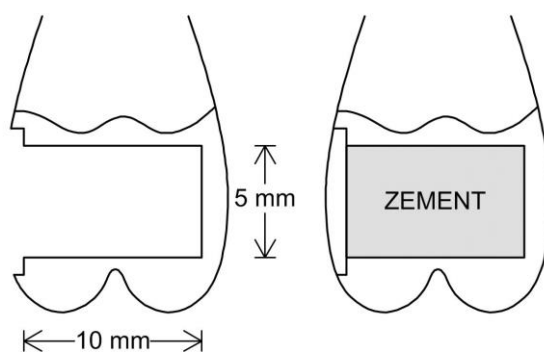


Abb. 77: Schematische Zeichnung eines gedeckelten Bohrlochdefektes nach Ohura et al. (OHURA et al., 1996)

Der höhere Flüssigkeitsaustausch im Weichgewebe ist wahrscheinlich auch dafür verantwortlich, dass die subkutanen Brushit-Implantate im Gegensatz zu den im Knochen implantierten Brushit-Zementen im Zeitverlauf an Volumen verloren. Aber auch die Tatsache, dass vorgefertigte Zylinder für die subkutane Implantation genutzt wurden, könnte zu dem unterschiedlichen Degradationsverhalten geführt haben. Die CDHA-Implantate degradierten weder im orthotopen noch im heterotopen Implantationsort. Dies bestätigt die bisherigen Erkenntnisse, dass Hydroxylapatit (HA) generell eine schlechtere Degradierbarkeit als Brushit aufweist (APELT et al., 2004; LEGEROS, 2008; TAMIMI et al., 2012). Die Struvit-Zemente verhielten sich in beiden Implantatlagern ähnlich.

Die zum Teil beobachtete Bildung von Knochengewebe an den subkutanen Implantaten spricht dafür, dass die untersuchten Zemente eine gewisse Osteoinduktivität besitzen. Theoretisch haben Calciumphosphate diese Eigenschaft nicht, da sie weder Zellen noch osteogene Faktoren enthalten, die Voraussetzung für eine de novo Knochenformation sind (LEGEROS, 2008). Es wurde aber gezeigt, dass verschiedene Calciumphosphate aufgrund ihrer chemischen Zusammensetzung, Geometrie, Porosität und Rauigkeit trotzdem osteoinduktiv sein können (YUAN et al., 2002; FELLAH et al., 2008). Der Mechanismus, der dahinter steckt, ist noch unbekannt (SAMAVEDI et al., 2013). Neben den chemischen und physikalischen Eigenschaften der Zemente spielen auch der Implantationsort und das Tiermodell eine Rolle. So konnten z.B. Yuan et al. zeigen, dass eine biphasische Calciumphosphat-Keramik (BCP) im Gegensatz zu einer HA-Keramik osteoinduktive Eigenschaften besaß, wenn diese intramuskulär in Ziegen implantiert wurden. Dabei war die Makroporosität der verwendeten Materialien ähnlich, so dass sie neben der unterschiedlichen chemischen Zusammensetzung die im Gegensatz zur BCP-Keramik fehlende Mikroporosität bei der HA-Keramik für die fehlende Osteoinduktivität verantwortlich machten (YUAN et al., 2002). Akiyama et al. implantierten poröse CDHA-Blöcke intramuskulär bei Hunden und bei Ratten. Nach 6 Wochen zeigte sich bei der Ratte keine Knochenbildung und kaum eine Degradation des implantierten Materials, während beim Hund schon nach 4 Wochen Knochengewebe und eine deutliche Reduktion des Implantats beobachtet

werden konnte. Sie sahen TRAP-positive mehrkernige Zellen, die sie beim Hund, jedoch nicht bei der Ratte detektieren konnten, als Ursache für die beobachtete unterschiedliche Osteoinduktivität des Materials (AKIYAMA et al., 2011). In einer Studie von Habibovic et al. kam es nach subkutaner Implantation verschiedener Calciumphosphate bei keinem der Implantate zu einer Knochenformation, während nach intramuskulärer Implantation regelmäßig Knochengewebe detektiert werden konnte. Die Ursache hierfür sahen sie in der besseren Durchblutung der Muskulatur im Vergleich zum subkutanen Gewebe (HABIBOVIC et al., 2006). Die in unserer Studie untersuchten subkutanen Implantate wurden immer an der gleichen Stelle implantiert und verursachten keine entzündlichen Reaktionen. Unterschiede in der Durchblutung in diesem Bereich sind daher auszuschließen. Allerdings könnte die relative Nähe zum Operationsgebiet dazu geführt haben, dass im Bereich der subkutanen Implantate vermehrt osteogene Faktoren im Blut zirkulierten. Diese können an der rauen Oberfläche der Implantate anheften und so zu einer Knochenformation führen (LEGEROS, 2008). Auch wir konnten beobachten, dass große Poren und eine raue Oberfläche zu mehr Knochenformation führten als eine relativ glatte Oberfläche. Bei den subkutanen Struvit-Implantaten mit der höheren Porosität (PLR 2,0) zeigte sich allerdings keine Knochenbildung, weil sich diese Implantate vermutlich zu schnell auflösten und dadurch keinen Ansatzpunkt für Zellen oder Proteine darstellten.

5.1.3 Anwendung der Zemente

Es ist wichtig, eine Zementformulierung, die später in der klinischen Anwendung als Paste verwendet werden soll, auch als Paste im Tiermodell zu untersuchen. In der vorliegenden Studie wurden die Zemente intraoperativ angemischt und als Paste eingebracht. Dabei erwies sich das Injizieren der Zemente als komfortabler als das Einbringen mit einem Spatel. In einer Studie von Flautre et al. wurden vorgehärtete Zementzylinder mit intraoperativ angemischter Zementpaste verglichen. Dabei wurden, wie auch in einer Untersuchung von Munting et al., keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt (MUNTING et al., 1993; FLAUTRE et al., 1999). Im Gegensatz dazu

beobachteten Frayssinet et al. eine gesteigerte Fremdkörperreaktion und eine schnellere Degradation, wenn ein Bruschit-Zement als Paste und nicht als vorgehärteter Formkörper in einem Kondylen-Bohrlochdefekt beim Kaninchen eingesetzt wurde. Der Grund hierfür wurde in der Modifikation der extrazellulären Ionenkonzentration durch ein unvollständiges Abbinden des Zementes bzw. durch die schnelle Degradation des als Paste eingebrachten Zementes gesehen. Durch die Verschiebung der Ionenkonzentration wurde wahrscheinlich das Verhalten der Zellen beeinflusst. Viele freigesetzte Partikel und ein saurer pH-Wert beim Abbinden könnten eine entzündliche Reaktion ausgelöst haben (FRAYSSINET et al., 2000).

Das intraoperative Anmischen hat den Nachteil, dass jeder Operateur unterschiedlich arbeitet und dadurch die Eigenschaften des abgebundenen Zementes beeinflussen kann (GINEBRA et al., 2010). Spezielle Mischapparaturen (VON RECHENBERG et al., 2013) oder gebrauchsfertige Zementpasten (HEINEMANN et al., 2013) können dieses Problem umgehen. Da in unserer Studie für die Operationen und das Anmischen der Zemente nur eine Person verantwortlich war, konnten Abweichungen beim Anmischen zwar nicht ausgeschlossen, aber minimiert werden.

Die Injizierbarkeit der Zemente hat den Vorteil, dass sich das Implantat gut an die Defektform anpasst. Eine zu niedrige Viskosität kann jedoch dazu führen, dass der Zement in das umgebende Gewebe oder sogar in den Blutkreislauf gelangt. Dadurch kann es zu Gewebsschädigungen und pulmonalen Embolien kommen, die zum Tod des Patienten führen können (BERNARDS, 2004; KREBS et al., 2007; MCARTHUR et al., 2009). Dieses Auslaufen des Zementes zwischen die Trabekel wurde auch in der Arbeit von Hannink et al. beobachtet (HANNINK et al., 2008) und kam in geringem Maße auch bei den hier verwendeten Zementen vor. Da die ROI für die quantitative histologische Auswertung bei den Femurdefekten entsprechend der Defektgröße gewählt wurde, könnte es sein, dass die Degradation der Zemente eventuell etwas größer war als die gemessenen Werte. Im Tibia-Defekt fiel das Auslaufen des Zementes zwischen die Trabekel besonders auf, weil die Knochenstruktur in diesem Bereich wahrscheinlich weniger dicht war als in der Femurkondyle. In der histologischen Auswertung wurde deshalb eine ROI (7 mm x 7 mm)

gewählt, die etwas größer als der ursprüngliche Defekt ($h = 6 \text{ mm}$) war. Bei der μ -CT-Auswertung fiel auf, dass das VOI 10-12 bei allen Gruppen ein gegenüber dem peripheren Knochen erhöhtes RV/TV aufwies. Dies kann auf die Osteokonduktivität der Materialien zurückzuführen sein, aber auch darauf, dass sich in diesem Bereich Zement zwischen den Trabekeln befand. Allerdings hatte auch der Leerdefekt eine sklerotische VOI 10-12, so dass schon das Trauma des Bohrens alleine zu einer vermehrten Knochenbildung in diesem Bereich führte. Auch Albrektsson & Johansson gehen davon aus, dass allein eine Verletzung des Knochengewebes nach einer Fraktur oder Einsetzen eines Implantats schon einen osteoinduktiven Effekt hat, es also zu einer Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Knochenvorläuferzellen und damit zu einer Bildung von neuem Knochengewebe kommt (ALBREKTSSON & JOHANSSON, 2001).

Die beobachteten bräunlichen Verfärbungen der Zemente selbst sind wahrscheinlich auf die Beimischung von Blut zurückzuführen, da der Defekt beim Einbringen des Zementes trotz Tamponade oft nicht ganz trocken war. Der Kontakt mit Blut und anderen Flüssigkeiten kann dazu führen, dass der Zement nicht wie gewünscht aushärtet oder zu schnell wieder zerfällt (WANG et al., 2007; KONISHI et al., 2013). Im Kontakt zu Weichgewebe können die zahlreichen kleinen Zementpartikel zu einer Inflammation führen, da sie die Freisetzung von Entzündungsmediatoren induzieren. Wenn aufgrund der Partikelgröße und -form die Phagozytosekapazität der nach einer Implantation aktivierten Monozyten und Makrophagen überschritten wird, kommt es zu einer schweren entzündlichen Reaktion (MIYAMOTO et al., 1999; LANGE et al., 2011).

Das Pulver-Flüssigkeitsverhältnis wird durch Kontamination mit Blut kleiner, so dass die Porosität erhöht und die mechanische Stabilität niedriger wird (MUSHA et al., 2010). Durch die erhöhte Porosität und eventuell die Bestandteile des Blutes kann jedoch die Degradation des Zementes und die Knochenneubildung verbessert werden (MUSHA et al., 2010). Um den Einfluss von äußeren Flüssigkeiten zu minimieren, wurden sogenannte schnell abbindende anti-wash-out-Zemente entwickelt (WANG et al., 2007; LOW et al., 2010; KONISHI et al., 2013). Da in der vorliegenden Studie die Kontamination mit Blut gering

war und die verwendeten Zementformulierungen innerhalb von wenigen Minuten aushärteten, wurden die Zementeigenschaften wahrscheinlich kaum beeinflusst. Von Rechenberg et al. beobachteten auch keinen Einfluss der Blutkontamination auf das Ergebnis ihrer Studie. Der Zement schien sogar die Blutung zu stillen (VON RECHENBERG et al., 2013).

Dass das Einstellen der Mikroporosität über das Pulver-Flüssigkeits-Verhältnis gelungen war, konnte durch die Bestimmung der Mineraleichte mittels μ -CT nachgewiesen werden. Die höhere Porosität hatte sowohl bei den Bruschi- als auch bei den Struvit-Zementen jeweils eine niedrigere Mineraleichte als die Zemente mit der niedrigeren Porosität. Der Einfluss der Mikroporosität auf das biologische Verhalten konnte durch die bilaterale Implantation beider Porositäten im selben Tier untersucht werden. Auch wenn die Ergebnisse der quantitativen histologischen Auswertung nur im Tibiadeфекt der Struvit-Gruppen bezüglich des verbliebenen Zementanteiles signifikante Unterschiede zwischen den Porositäten zeigten, fiel beim direkten intraindividuellen Vergleich auf, dass der Struvit-Zement mit der höheren Porosität (PLR 2,0) schneller degradierte als der mit der niedrigeren Porosität (PLR 3,0). Auch bei den Bruschi-Zementen hatte die Porosität einen Einfluss auf das Verhalten *in vivo*. Nur bei der höheren Porosität (PLR 2,0) kam es zu einer Phasenumwandlung zu Octacalciumphosphat. Der Mechanismus der Phasenumwandlung wird in dieser Arbeit im Kapitel Eignung der Materialien – Bruschi detailliert beschrieben.

5.2 Eignung der Untersuchungsmethoden

Neben den standardmäßigen makroskopischen und histologischen Untersuchungen wurden weitere Methoden gewählt, um den Einfluss der Materialien auf das Knochengewebe zu evaluieren.

5.2.1 Mikro-Computer-Tomografie (μ -CT)

Generell ist die μ -CT-Untersuchung gut geeignet, um röntgendichte Strukturen dreidimensional darzustellen und bestimmte Parameter zu ermitteln. Leider war es aufgrund der ähnlichen Röntgendichte der Zemente im Vergleich zum

Knochengewebe nicht möglich, das Biomaterial direkt vom Knochengewebe zu segmentieren. Auch anderen Arbeitsgruppen ist dies im Zusammenhang mit Calciumphosphat-Implantaten nicht gelungen (CHOPRA et al., 2009; HUBER et al., 2009; KASUYA et al., 2012). In der vorliegenden Studie konnte der Zementanteil jedoch sicher anhand der histologischen Schliffe bestimmt werden, wenn auch nur im zweidimensionalen Raum.

Um Veränderungen der Mineraldichte (MD) und des Röntgendichten Volumens/Gesamtvolumen (RV/GV) in Abhängigkeit von der Lokalisation im Defekt bzw. in der Umgebung des Defektes zu detektieren, wurden für die μ -CT-Auswertung ringförmigen VOIs gewählt. Dass die Bruschi- und der CDHA-Zement noch fast vollständig im Defekt vorhanden waren, wurde durch die histologische Auswertung bestätigt. Auch die Resorptionszone, die bei den Struvit-Implantaten im Defektbereich beobachtet wurde, konnte in den histologischen Schliffen nachgewiesen und weiter bezüglich Zement- und Knochenanteil quantifiziert werden. Eine wichtige Aussage konnte außerdem die Bestimmung des RV/GV im VOI 10-12 liefern. Ein im Vergleich zum peripheren Knochen erhöhtes RV/GV im VOI 10-12, also eine vermehrte Knochenbildung in diesem Bereich gibt einen Hinweis auf die osteokonduktiven Eigenschaften der Zemente. Wie bereits diskutiert kann aber auch ein Auslaufen des Zementes zwischen die Trabekel zu diesem Effekt geführt haben, oder schon das Trauma des Bohrens die Bildung eines sklerotischen Rings um den Defekt verursacht haben.

Die Mineraldichte konnte im μ -CT anhand zweier mitgeführter Phantome mit bekannter Dichte ermittelt werden. Hierfür wurde kein Grenzwert bezüglich der Graustufen gesetzt, um mineralisiertes Gewebe von nicht-mineralisiertem Gewebe zu unterscheiden. Somit wurde das gesamte Gewebe der Probe berücksichtigt. Die Knochenminerale dichte hängt von der Lokalisation im Skelett ab (ZUPAN et al., 2013). In einer Studie von Bindl et al. wurden bei metaphysär in der Femurkondyle osteotomierten, aber sonst gesunden Schafen Werte von $404 \pm 66 \text{ mg HA/cm}^3$ (distaler Bereich) bzw. $360 \pm 35 \text{ mg HA/cm}^3$ (proximaler Bereich) mittels peripherer quantitativer Computertomografie (pqCT) ermittelt. Die von uns ermittelten Werte für die Minerale dichte des peripheren Knochens lag bei $355,8 \pm 106,3 \text{ mg HA/cm}^3$ und entsprach somit diesen Werten. Beim

Vergleich der MD der Zemente fiel auf, dass die höhere Porosität (PLR 2,0) sowohl bei den Struvit-, als auch bei den Bruscht-Zementen eine niedrigere Mineraldichte aufwies. Somit konnte auch mittels μ -CT bestätigt werden, dass zwei unterschiedliche dichte bzw. poröse Zemente hergestellt wurden.

Mittels μ -CT kann auch die Porosität einer Probe bestimmt werden. Da die Porengröße der untersuchten Zemente sich aber hauptsächlich im Submikrometerbereich ($< 1 \mu\text{m}$, siehe Anhang Abb. 78) und damit unterhalb der gewählten Auflösung des μ -CT von $30 \mu\text{m}$ befand, konnte in diesem Fall die Porosität der Zemente mittels μ -CT nicht analysiert werden. Eine höhere Auflösung beim Scannen war aufgrund der Probengröße nicht möglich, und selbst mit der maximalen Auflösung des Gerätes von $4 \mu\text{m}$ hätten die Poren in der Zementmatrix nicht aussagekräftig dargestellt werden können. Die Bestimmung der Porosität der Zemente wurde deshalb im Zuge der Materialcharakterisierung in der Universität Würzburg mittels Quecksilberporosimetrie durchgeführt (siehe Anhang Abb. 78).

5.2.2 Quantitative Backscattered Electron Imaging (qBEi)

Um einen möglichen Einfluss der Degradationsprodukte der Zemente auf die Mineralisation der Knochen trabekel zu untersuchen, wurde das qBEi angewandt. Bei Mineralisationsstörungen wie Osteoporose oder Osteomalazie weicht die Verteilung des Mineralgehaltes innerhalb der Trabekel deutlich von der gesunder Knochen ab (ROSCHGER et al., 1998; ROSCHGER et al., 2008; BUSSE et al., 2009). Der in der vorliegenden Arbeit beim Schaf gemessene mittlere Calciumanteil ($25,4 \pm 1,3 \text{ wt\% Ca}$) war im Vergleich zu den von Roschger et al. beim Menschen ermittelten Referenzwerten ($22,20 \pm 0,45 \text{ wt\% Ca}$) erhöht (ROSCHGER et al., 2008). Das kann dadurch begründet werden, dass das Schaf eine höhere Knochenmineraldichte als der Mensch besitzt (OHEIM et al., 2013).

Die Trabekel in unmittelbarer Nähe zu den jeweiligen Zementen waren in allen Gruppen ähnlich mineralisiert. Dies spricht dafür, dass die Zemente und ihre Degradationsprodukte keinen Einfluss auf die Mineralisation des Knochens hatten. Der Leerdefekt könnte dabei als Kontrollgruppe angesehen werden.

Somit wurden die Ergebnisse der μ -CT-Analysen auch auf Trabekel-Ebene bestätigt. Die hier ermittelten Werte von Ca_{MEAN} lagen mit $25,4 \pm 1,3$ wt% Ca zwar etwas über den Werten der Kontrollgruppe in einer erst kürzlich vorgestellten Studie von Brennan et al. ($24,67 \pm 1,20$ wt% Ca), aber die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Schafe waren älter als die in der Studie von Brennan et al. und die Mineralisation der Trabekel nimmt beim Schaf mit dem Alter zu (BRENNAN et al., 2014).

In der quantitativen EDX-Punktanalyse wurde ein erhöhter Magnesium-Gehalt in dem Trabekel der Struvit-Gruppe gegenüber den anderen Gruppen ermittelt. Der Grund dafür ist wahrscheinlich, dass Magnesium, welches bei der Degradation der Struvit-Zemente freigesetzt wurde, mit in das Knochengewebe integriert wurde. In den histologischen Schliffen konnte gesehen werden, dass ganze Zementpartikel in das Knochengewebe eingelagert wurden. Außerdem können auch einzelne freigesetzte Magnesiumionen im Rahmen der Matrix-Mineralisierung in das Knochengewebe gelangen. Da aber nur jeweils eine Probe untersucht wurde, kann man nur von einer Tendenz sprechen und weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Daten zu bestätigen. Im Allgemeinen wird die mineralische Zusammensetzung des Knochens mittels einer Asche-Untersuchung bestimmt. Die Werte aus der Literatur betragen dabei 0,65 % (ESPINOZA et al., 1982), bis 0,78 % (CHICCO et al., 1973). Die in dieser Studie ermittelten Werte lagen etwas darüber, allerdings wurden in der Studie von Chicco et al. Lämmer bzw. in der Studie von Espinoza et al. bolivianische Schafe untersucht.

Bei den EDX-Mappings konnte gezeigt werden, dass sich Magnesium vor allem im Knochenmark im Interface zwischen Zementrest und neu gebildetem Knochen angereichert hatte. In den histologischen Schliffen konnte dies bestätigt werden und man konnte erkennen, dass die Zementpartikel intrazellulär aufgenommen waren.

5.2.3 Biomechanik

Die Steifigkeit der in dieser Studie untersuchten Struvit-Zemente reduzierte sich nach Implantation stark gegenüber den *in vitro* ermittelten Werten. Die Ursache

hierfür kann in dem zweistufigen Auflösungsprozess während der Degradation gesehen werden, welcher mittels der Phasenanalyse (XRD) der Zemente aufgedeckt wurde. Die Struvit-Zemente bestanden zunächst aus einem Struvit- und einem Farringtonit-Anteil. Nach 4 Monaten konnte im XRD allerdings kein Struvit, sondern nur noch Farringtonit nachgewiesen werden, d.h. in einem ersten Schritt löste sich die Binderphase Struvit aus der Zementmatrix, weil Struvit unter physiologischen Bedingungen eine höhere Löslichkeit als Farringtonit aufweist. Dadurch waren nur noch locker verbundene Farringtonit-Partikel übrig, welche kaum mechanisch stabil waren und sich auch weiter auflösten. Im Zeitverlauf stieg die Steifigkeit wieder etwas an und erreichte das Niveau von normalem, unverletztem Knochengewebe. Dies ist darin zu begründen, dass neues Knochengewebe in die sich auflösende Zementmatrix eingewachsen war bzw. diese ersetzte. Das Auftreten von Hydroxylapatit im XRD und die histologischen Schliffe bestätigten diese Vermutung. Signifikante Unterschiede in der Steifigkeit bezüglich der Porosität der Struvit-Zemente wurden nicht gefunden. Das bedeutet, die unterschiedlichen Pulver-Füssigkeits-Verhältnisse hatten keinen Einfluss auf die mechanische Stabilität. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass bei der Verwendung von mehr Flüssigkeit (PLR 2,0) ein höherer Anteil von Struvit-Kristallen im Zement entsteht, da in der Flüssigkeit ein Reaktionspartner (Ammoniumphosphat) enthalten ist. Je mehr Struvit-Kristalle miteinander verzahnt sind, desto höher ist die mechanische Stabilität.

Bei den Bruschi-Zementen mit der höheren Porosität (PLR 2,0) kam es im Gegensatz zu den Bruschi-Zementen mit der niedrigeren Porosität (PLR 3,0) nach Implantation zu einer Reduktion der Steifigkeit. Die mittels μ -CT ermittelte Reduktion der Mineraldichte der Zemente im Zeitverlauf konnte ebenfalls nur bei der höheren Porosität beobachtet werden und steht somit im Einklang mit den biomechanischen Ergebnissen, da weniger dichte Materialien auch weniger mechanisch stabil sind.

Die meisten Studien zur biomechanischen Stabilität werden *in vitro* oder nach heterotoper Implantation durchgeführt. Dabei wird ein Prüfkörper bestimmter Geometrie in einem statischen Kompressionstest mit einer bestimmten Kraft pro Zeiteinheit belastet. Der Prüfkörper kann sich frei ausdehnen, bis er zerbricht. In

der vorliegenden Arbeit war der Zement von Knochengewebe umgeben, d.h. er konnte sich nicht frei ausdehnen. Deshalb wurde hier sowohl *in vitro* als auch nach orthotoper Implantation ein Indentationstest verwendet, mit dem eine Aussage über die Steifigkeit der Materialien getroffen werden kann. Dadurch ist es allerdings nicht möglich, die hier ermittelten Werte bezüglich der mechanischen Stabilität direkt mit den Werten aus anderen Studien zu vergleichen. Magnesiumphosphat-Zemente weisen jedoch auch in anderen Studien initial eine hohe mechanische Stabilität auf (WU et al., 2008; MESTRES & GINEBRA, 2011), welche aber aufgrund von Degradationsvorgängen nach subkutaner bzw. intramuskulärer Implantation deutlich sinkt. Ein wie oben beschriebener zweiphasiger Degradationsprozess wurde hier allerdings nicht erwähnt (DRIESSENS et al., 1995; KLAMMERT et al., 2011).

5.3 Eignung der Materialien

5.3.1 Bruschit

Alle untersuchten Materialien zeigten eine gute Biokompatibilität. Die Bruschit- und CDHA-Zemente wurden gut in das umgebende Knochengewebe integriert, zeigten aber keine deutliche Reduktion im Volumen. Bei den CDHA-Zementen war dies zu erwarten, während die Bruschit-Zemente aufgrund ihrer höheren passiven Löslichkeit im physiologischen Milieu in anderen Studien eine gute Biodegradierbarkeit zeigten (MUNTING et al., 1993; FRAYSSINET et al., 1998; LU et al., 1999; FLAUTRE et al., 2002; APELT et al., 2004). Eine Erklärung für die mangelnde Resorption könnte eine Phasenumwandlung von Bruschit zu Hydroxylapatit (HA) sein, die schon von einigen Autoren beobachtet wurde (DRIESSENS et al., 1994; BOHNER et al., 2003; ALGE et al., 2012). Dass es bei Bruschit zu Phasenumwandlungen kommen kann, liegt daran, dass Bruschit unter physiologischen Bedingungen instabil ist, d.h. in Lösung geht (DOROZHKIN, 2011). Dabei führt eine höhere Porosität aufgrund der vergrößerten Oberfläche zu einer besseren Durchdringung des Materials mit extrazellulärer Flüssigkeit und somit zu einer höheren chemischen Löslichkeit.

Durch einen fehlenden oder zu langsamen Flüssigkeitsaustausch im Gewebe entsteht eine in Bezug auf Calcium und Phosphat übersättigte Lösung, aus der dann stabilere, weniger lösliche Calciumphosphate als Brushit (in der Regel HA) ausfallen (BOHNER et al., 2003; GROVER et al., 2003; ALGE et al., 2012). Dass in unserer Studie bei dem Brushit-Zement mit der höheren Porosität (PLR 2,0) mittels Phasenanalyse eine Umwandlung zu Octacalciumphosphat (OCP) und nicht HA statt fand, ist verwunderlich. OCP ist zwar stabiler, also schlechter löslich als Brushit aber im Vergleich zu HA instabiler und prinzipiell biodegradierbar (BOHNER, 2000; LEGEROS, 2008; LOW et al., 2010). Eine Erklärung hierfür könnte im Calcium-Phosphor-Verhältnis der Materialien gesehen werden. Octacalciumphosphat liegt mit einem Calcium-Phosphor-Verhältnis von 1,33 dichter an dem Calcium-Phosphor-Verhältnis von Brushit (1,00) als an dem von Hydroxylapatit (1,5 - 1,67). Die für die Präzipitation von Octacalciumphosphat notwendigen Calciumionen stammen wahrscheinlich aus der extrazellulären Flüssigkeit, die in den porösen Zement eindringen konnte. Durch eine Erhöhung des Pulver-Flüssigkeitsverhältnisses (PLR 3,0) wurde die Porosität um ca. 30% erniedrigt, dadurch wurde die Durchdringung mit extrazellulärer Flüssigkeit reduziert und eine Phasenumwandlung konnte verhindert werden. Allerdings wurden beide Zemente unabhängig von ihrer Porosität und gegebenenfalls einer damit verbundenen Phasenumwandlung in unserer Studie nicht resorbiert.

Eine weitere Ursache hierfür könnte die chemische Zusammensetzung der Zemente sein, da jede Veränderung in der Zementkomposition die Zementeigenschaften beeinflussen kann (LU et al., 2002; TAMIMI et al., 2012). Die in der hier vorgestellten Studie untersuchten Brushit-Zemente wurden aus zwei Calciumphosphatpulvern (β -Tricalciumphosphat (β -TCP) und wasserfreiem Monocalciumphosphat (MCPA)) und einer Zitronensäurelösung hergestellt. Der Durchmesser der β -TCP-Partikel war dabei $< 125 \mu\text{m}$. In den oben zitierten *in vivo*-Studien, die eine gute Resorption von Brushit-Zementen beobachteten, wurden für die Herstellung der Brushit-Zemente allerdings immer β -TCP-Partikel mit einem Durchmesser von ca. $500 \mu\text{m}$ verwendet. Deshalb könnte die Größe der β -TCP-Partikel einen Einfluss auf das Degradationsverhalten haben. Allerdings konnten von Rechenberg et al.

kürzlich zeigen, dass es hinsichtlich des Resorptionsverhaltens keine Unterschiede zwischen einem Bruschit-Zement (andere Rezeptur als die hier verwendeten Bruschit-Zemente) mit und ohne β -TCP-Granulat gab (VON RECHENBERG et al., 2013). Da von Rechenberg et al. eine andere Flüssigkeitskomponente zur Herstellung der Bruschit-Zemente nutzten (Natrium-Hyaluronat), kann die Ursache für die von uns beobachtete mangelnde Resorbierbarkeit auch in der Verwendung der Zitronensäure gesehen werden.

Im teilbelasteten Defekt in der Tibia fielen bei beiden Bruschit-Zementen Risse in der Zementmatrix auf. Diese verliefen in Belastungsrichtung sowie in einem 90° Winkel dazu. In den unbelasteten Femur-Defekten zeigten die Zemente keine Risse. In Konsequenz muss gesagt werden, dass die mechanische Stabilität der Bruschit-Zemente nicht für einen lasttragenden Bereich ausreichte. Risse können zwar zu einer schnelleren Degradation des Zementes führen, da die Oberfläche vergrößert wird und dadurch Flüssigkeiten und Zellen eine größere Angriffsfläche haben, aber Risse können auch die mechanische Stabilität des Implantates bzw. des Implantat-Knochenverbundes weiter reduzieren.

Bei den Bruschit-Zementen fiel eine grau-bräunliche Verfärbung des angrenzenden Gewebes auf. Solche Verfärbungen wurden auch von anderen Gruppen beobachtet, dort aber nicht weiter diskutiert, da diese Verfärbungen keinen Effekt auf den Verlauf der Heilung zu haben schienen (APELT et al., 2004; VON RECHENBERG et al., 2013). Zellen reagieren sehr empfindlich auf Veränderungen im umgebenden Milieu. Da es beim Abbinden von Bruschit-Zementen im Gegensatz zu Hydroxylapatit- und dem untersuchten Magnesiumphosphat-Zement zu einer Senkung des pH-Wertes kommt (DRIESSENS et al., 1994; PINA et al., 2010; EWALD et al., 2011) und sowohl bei den Struvit-Zementen als auch bei dem CDHA-Zement keine Verfärbungen des angrenzenden Gewebes beobachtet wurden, ist dies wahrscheinlich die Ursache für die Veränderungen im Gewebe. Histologisch wurde in unserer Studie in der näheren Umgebung der Bruschit-Zemente eine veränderte Morphologie der Fettzellen des Knochenmarks detektiert. Die Zellen erschienen nicht prall und rund, sondern eingefallen. Die Absenkung des pH-Wertes konnte

auch im Rahmen der Materialcharakterisierung bei den verwendeten Zementen nachgewiesen werden (siehe Anhang Abb. 79). Dass die Verfärbungen und die deformierten Fettzellen des Knochenmarkes nach 10 Monaten immer noch sichtbar waren, deutet auf eine langanhaltende Schädigung hin. Da jedoch die Osseointegration des Zementes trotzdem in allen Fällen gut war, scheint diese Nebenwirkung keinen großen Einfluss zu haben. Eine weitere Ursache für die Verfärbungen könnte die Temperaturerhöhung beim Abbindeprozess sein. Da aber die verwendeten Struvit- und Bruschi-Zemente ähnliche Temperaturverläufe zeigten (siehe Anhang Abb. 80) und bei den Struvit-Zementen keine Verfärbungen des Gewebes zu beobachten waren, ist dies eher unwahrscheinlich.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die in dieser Arbeit untersuchten Bruschi-Zemente biokompatibel, osteokonduktiv und sogar in gewissem Maß osteoinduktiv sind, da auch bei den subkutanen Implantaten, also ektop eine Knochenbildung beobachtet wurde. Allerdings entsprechen sie aufgrund ihrer mangelnden Resorbierbarkeit und der nicht ausreichenden mechanischen Stabilität nicht den Anforderungen eines idealen Knochenersatzmaterials.

5.3.2 Struvit

Die Struvit-Zemente fungierten in der vorgestellten Arbeit als eine Art Platzhalter und gleichzeitig auch als Startpunkt für die Bildung von neuem Knochengewebe. Das freigesetzte Magnesium schien die Knochenformation zu fördern. Magnesium ist das zweithäufigste Kation im Körper und an der Aktivität von sehr vielen Enzymen beteiligt. Es ist bekannt, dass Magnesium eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel spielt. Magnesium-Mangel kann zu Osteoporose führen (RUDE et al., 2009). In Abhängigkeit von der Konzentration hat es einen positiven Effekt auf die Aktivität und Proliferation von Osteoblasten (CAI et al., 2010). So beobachteten Ewald et al. *in vitro* ein stärkeres Zellwachstum sowie eine vermehrte Aktivität von humanen Osteoblasten auf Struvit-Zementen im Vergleich zu Bruschi- und CDHA-Zementen (EWALD et al., 2011). *In vivo* wurde eine verbesserte Knochen-Implantat-Verbindung bei Titan-Implantaten beobachtet, wenn diese mit Magnesium-substituierten HA

anstatt mit reinem HA beschichtet waren (REVELL et al., 2004). Der Grund für die bessere Interaktion zwischen Zellen und Material könnte eine Hochregulation der Integrin-Expression in Osteoblasten sein (ZREIQAT et al., 2002).

Wird Magnesium in Calciumphosphaten eingeführt, führt dies außerdem zu einer erhöhten Löslichkeit und damit verbundenen besseren Biodegradibilität (DOROZHKIN, 2011). Magnesiumhaltige Degradationsprodukte wurden in dieser Studie vor allem im Markraum extra- und intrazellulär sowohl mittels EDX als auch histologisch nachgewiesen. Dass diese Akkumulation negative Effekte haben könnte, ist nicht auszuschließen. Da aber die Partikelanzahl im Zeitverlauf weniger wurde und keine pathologischen Veränderungen im Knochengewebe auftraten, ist davon auszugehen, dass mögliche negative Effekte vernachlässigbar sind. Yu et al. konnten außerdem keine Kanzerogenität oder Mutagenität von Magnesiumphosphat-Zement-Extrakten nachweisen (YU et al., 2010).

Struvit hat bei physiologischen pH-Werten eine relativ hohe Löslichkeit (EWALD et al., 2011), deshalb ist davon auszugehen, dass die Resorption bei den hier untersuchten Magnesiumphosphat-Zementen hauptsächlich passiv erfolgte. Aufgrund der Phasenanalyse kann gesagt werden, dass dieser Vorgang in zwei Stufen stattfand: Zunächst lösten sich die Struvit-Kristalle auf und danach der Farringtonit-Anteil. Der Grund dafür ist, dass Farringtonit schlechter löslich ist als Struvit (KLAMMERT et al., 2011). Der HA-Anteil, der bei der Phasenanalyse nach 7 Monaten auftrat, stammte wahrscheinlich von dem neu gebildeten Knochengewebe. Das neu gebildete Knochengewebe und der verbliebene Zement bildeten eine Art Komposit. Das spiegelt sich auch in den Ergebnissen des Indentationstestes wider. Der anfängliche hohe Verlust der Steifigkeit wurde mit dem Einwachsen von Knochengewebe wieder auf das Niveau des Kontrollknochengewebes angehoben.

In vitro konnte gezeigt werden, dass die Resorption von Bruschi- und Struvit-Zementen sowohl passiv als auch aktiv erfolgen kann, wohingegen CDHA hauptsächlich aktiv abgebaut wird. Dabei ist die passive Löslichkeit von Bruschi zwar größer als die von CDHA, aber deutlich geringer als die von

Struvit (GROSSARDT et al., 2010). In der vorliegenden Studie konnte auch *in vivo* eine aktive Resorption der Zemente durch Osteoklasten nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden bei den Struvit-Gruppen im Knochenmark kleine Zementpartikel von Makrophagen und Fremdkörper-Riesenzellen phagozytiert, so wie es auch von Lu et al. beschrieben wurde (LU et al., 2002).

Die zellreiche „Resorptionschicht“ könnte auch als Entzündungsgeschehen angesehen werden. Kleine Zementpartikel und eine daraus resultierende Inflammation müssen sich aber nicht unbedingt nachteilig auf die Heilung auswirken, sondern können auch einen positiven Effekt auf die Knochenbildung haben (MALARD et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit wanderte die zellreiche Schicht im Zeitverlauf von außen nach innen. Gleichzeitig nahm die Zelldichte ab und neues Knochengewebe wurde gebildet. Deshalb kann man den Prozess in der Summe als positiv und den Zement somit als biokompatibel und biodegradierbar bewerten. Die Resorptionsgeschwindigkeit entsprach dabei der Geschwindigkeit der Knochenneubildung. Ein Kontakt mit Weichgewebe sollte jedoch vermieden werden, da sich der Zement sonst zu schnell auflöst.

Die subkutanen Implantate mit der höheren Porosität (PLR 2,0) lösten sich schnell auf und boten keinen Ansatzpunkt für eine Knochenbildung. Bei den subkutanen Implantaten mit der niedrigeren Porosität (PLR 3,0) konnte Knochengewebe detektiert werden, was für eine Osteoinduktivität des Materials spricht.

Im Vergleich zwischen belastetem und unbelastetem Defektmodell ergaben sich keine eindeutigen Unterschiede hinsichtlich der Degradation der Struvit-Zemente. Subjektiv wurde im Tibiadefekt (belastet) ein dichteres Knochengewebe gebildet als im Femurdefekt (unbelastet). Dies entspricht dem Wolff'schen Gesetz der Transformation der Knochen, wonach sich ein Knochengewebe in seiner Struktur der Belastung anpasst (WOLFF, 1892)

5.4 Stellungnahme zu den eingangs gestellten Hypothesen

1. Hypothese:

Die untersuchten Bruschit- und Struvit-Zemente sind aufgrund ihres biologischen Verhaltens als resorbierbares Knochenersatzmaterial geeignet.

Beide Zemente sind biokompatibel, aber die Bruschit-Zemente sind aufgrund ihrer unzureichenden mechanischen Stabilität und der mangelnden Degradation nicht als resorbierbares Knochenersatzmaterial geeignet. Die Struvit-Zemente sind als resorbierbares Knochenersatzmaterial geeignet, jedoch erfolgt die Resorption im Kontakt mit Weichgewebe sehr schnell.

2. Hypothese:

Eine höhere Porosität (PLR 2,0) degradiert schneller als eine niedrigere Porosität (PLR 3,0).

Für den Fall der Struvit-Zemente trifft diese Aussage zu. Bei den Bruschit-Zementen hatte die Porosität zwar einen Einfluss auf die chemische Zusammensetzung (Phasenumwandlung nur bei der höheren Porosität), sie hatte jedoch keinen Einfluss auf das Degradationsvolumen, da die bessere passive Löslichkeit einer höheren Porosität durch die Phasenumwandlung zu einem schlechter löslichen Calciumphosphat kompensiert wurde.

3. Hypothese:

In einem teilbelasteten Defektmodell (Tibiaplateau) findet eine schnellere Degradation der Biomaterialien statt als im einem unbelasteten Defektmodell (Femurkondyle).

Diese Hypothese kann nicht bestätigt werden. Es konnte zwar gezeigt werden, dass eine mechanische Belastung einen Einfluss auf die Zemente hatte (Rissbildung Bruschit-Zemente nur unter Belastung), aber auf die Degradation hatte das Defektmodell keinen Einfluss. Bei den Struvit-Zementen kam es im belasteten Defekt zur Bildung einer dichteren Knochenstruktur, d.h. die mechanische Belastung hatte einen Einfluss auf das Knochenremodelling in der Umgebung der Implantate.

5.5 Ausblick

Um die Biodegradierbarkeit und die mechanische Stabilität zu verbessern, müssten die Bruschit-Zemente weiter modifiziert und erneut untersucht werden. Die Struvit-Zemente sollten noch einmal in einem geschlossenen Defektmodell eingesetzt werden, um den Einfluss des Flüssigkeitsaustauschs mit dem Weichgewebe zu minimieren. Des Weiteren wäre interessant, ob der Magnesiumphosphat-Zement auch im osteoporotischen Knochen einen positiven Einfluss hätte. Da das Schaf ein verbreitetes Modell für die Osteoporose-Forschung ist (TURNER et al., 2001; OHEIM et al., 2013), könnte das verwendete Tier-Modell auch auf diesem Gebiet zum Einsatz kommen. In Bezug auf die Röntgengichte der Materialien wäre es unter Umständen sinnvoll, ein Kontrastmittel wie z. B. Bariumsulfat in den Zement zu integrieren. Bariumsulfat scheint die Zementeigenschaften kaum zu verändern (KOBAYASHI et al., 2007). Dadurch wäre eine bessere und eventuell auch intraoperative Kontrolle des Zementvolumens möglich.

Degradierbare Biomaterialien können auch zur lokalen Applikation von Wirkstoffen genutzt werden. Gerade Zemente würden sich aufgrund ihrer Eigenschaften dazu eignen, Medikamente, wie z. B. Antibiotika oder NSAIDs, oder andere aktive Substanzen, wie z. B. Wachstumsfaktoren, zu integrieren (GINEBRA et al., 2012). Die meisten Studien auf diesem Gebiet beschäftigen sich mit Calciumphosphat-Zementen (wie z. B. (BLOM et al., 2001; LE NIHOUANEN et al., 2008; HESARAKI & NEMATI, 2009; VERRON et al., 2010)). Deshalb wären sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Studien mit Wirkstoff-beladenen Struvit-Zementen eine interessante Fragestellung für die Zukunft.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Da es bisher noch kein Knochenersatzmaterial gibt, das den komplexen Eigenschaften des Knochengewebes entspricht, wird intensiv an der Entwicklung neuer Materialien geforscht. In der vorgestellten Studie wurden ein Calciumphosphat- und ein Magnesiumphosphat-Zement (Bruschit bzw. Struvit) in einem unbelasteten und einem teilbelasteten Knochendefekt kritischer Größe im Schafmodell untersucht. Von jeder Zementformulierung kamen zwei unterschiedliche Pulver-Flüssigkeits-Verhältnisse (2,0 und 3,0), welche zu unterschiedlichen Porositäten der abgebundenen Zemente führten, zum Einsatz. Die Implantationszeiträume betragen 4, 7 und 10 Monate. Als Kontrolle diente bei der 10-Monats-Gruppe ein CDHA-Zement ($\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_5\text{HPO}_4\text{OH}$) bzw. ein Leerdefekt.

Alle Zementformulierungen erwiesen sich als biokompatibel und osteokonduktiv. Bei den Struvit-Zementen ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) konnte nach 10 Monaten Implantation eine fast komplette Degradation beobachtet werden. Diese fand sowohl passiv durch chemisch-physikalische Lösungsvorgänge als auch aktiv, d.h. zellvermittelt, statt. Gleichzeitig bildete sich neues trabekuläres Knochengewebe, so dass gesagt werden kann, dass die Resorptionsgeschwindigkeit der Geschwindigkeit der Knochenformation entsprach. Die mechanische Stabilität nahm zwar gegenüber den *in vitro* ermittelten Werten nach Implantation stark ab, wurde aber im Zeitverlauf durch das Einwachsen von neuem Knochengewebe wieder auf ein physiologisches Niveau angehoben. Signifikante Unterschiede zwischen den Porositäten gab es nur zum Teil hinsichtlich des verbliebenen Zementvolumens. Aufgrund der besseren Verarbeitbarkeit als injizierbare Paste, wäre ein Pulver-Flüssigkeits-Verhältnis von 2,0 eventuell besser für den klinischen Einsatz geeignet als ein Pulver-Flüssigkeits-Verhältnis von 3,0. In Kontakt mit Weichgewebe lösten sich die Struvit-Zemente schneller auf als neues Knochengewebe einwachsen konnte. Durch weitere Modifikationen bei der Zementzusammensetzung könnte dies verhindert werden. Durch die Kombination mit einem im Verhältnis zu

Struvit stabileren Calciumphosphat (z.B. β -Tricalciumphosphat) könnte ein biphasischer Zement entwickelt werden, bei dem sich die einzelnen Komponenten unterschiedlich schnell auflösen.

Die Brushit-Zemente ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) und der CDHA-Zement zeigten selbst nach zehn Monaten Implantation kaum Degradation. Bei dem CDHA-Zement war dies zu erwarten, bei den Brushit-Zementen jedoch nicht. Die Ursache hierfür kann bei der höheren Porosität (PLR 2,0) in der Phasenumwandlung von Brushit zu Octacalciumphosphat bzw. generell in der Zementkomposition gesehen werden. Da die Brushit-Zemente im teilbelasteten Defekt Risse aufwiesen, war ihre mechanische Stabilität *in vivo* für lasttragende Bereiche nicht ausreichend. Deshalb wäre es nötig, die Brushit-Zemente weiter zu modifizieren, bevor sie erneut im Tiermodell untersucht werden können. Um die Stabilität zu verbessern, könnten Keramik- oder Polymerfasern in den Zement eingebracht werden. Für die Verbesserung der Degradation sollte eine andere Flüssigkeitskomponente, z. B. Natriumhyaluronat oder Pyrophosphat, wie sie in anderen Studien verwendet wurden, in Betracht gezogen werden.

Zusätzlich zu den orthotopen Implantaten wurden jeweils auch subkutan Formkörper eingebracht. Diese zeigten, dass die untersuchten Zemente auch eine gewisse Osseinduktivität besaßen. Im Fall der Brushit-Zemente verhielten sich die subkutanen Implantate allerdings anders als die im Knochen implantierten Zemente. Im Gegensatz zu den orthotopen Implantaten zeigten die Formkörper im subkutanen Gewebe eingesetzt eine deutliche Größenreduktion. Die Ursache dafür kann im unterschiedlichen Gewebemilieu oder in der unterschiedlichen Implantatform (orthotop: Paste / heterotop: Block) gesehen werden. Um eine möglichst genaue Aussage über das biologische Verhalten eines Materials treffen zu können, ist es daher notwendig, die Materialien immer in der Form und im entsprechenden Zielgewebe zu untersuchen, wie sie später verwendet werden sollen, d.h. ein Zement als resorbierbares Knochenersatzmaterial sollte immer als Paste im Knochenlager untersucht werden. Auch eine Untersuchung in einem belasteten Implantationsmodell ist sinnvoll, da eine mechanische Belastung einen Einfluss auf das Verhalten der Zemente und das Knochenremodelling hat.

7 SUMMARY

Osseointegration of cold-setting bone-cements in an ovine model

The perfect bone substitute material which matches the properties of bone has still not been found. Therefore, intensive research is on-going. In the present study a calciumphosphate- and a magnesiumphosphate-cement (brushite and struvite respectively) were investigated. The cements were implanted in sheep using a partially loaded and an unloaded critical size bone defect. Each formulation was tested in two different powder-to-liquid-ratios (PLR 2.0 and 3.0), resulting in different porosities of the hardened cements. The implantation periods were 4, 7 and 10 months. For the 10 months' group there were two controls: a CDHA cement ($\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_5\text{HPO}_4\text{OH}$) and an unfilled defect.

Every investigated cement formulation proved to be biocompatible and osteoconductive. After ten months of implantation in live sheep, the struvite cements ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) showed a nearly complete degradation which was closely followed by new trabecular bone formation. The degradation observed was both passive to chemical dissolution and active to cellular activity. The mechanical properties of the struvite-cements decreased extensively, up to 90 %, after implantation. However, over the ten months of this study, the stiffness level caused by the infilling bone reached normal physiological ranges. There were no significant differences between the porosities except in the area of residual cement in some cases. Nevertheless, for clinical use, a PLR of 2.0 would be preferable to a PLR of 3.0 because an injectable cement provides better handling. When the struvite cement is in contact with soft tissue, it dissolves too quickly for proper bone ingrowth. Therefore, further modifications to the cement formulation are required. For example, a biphasic cement could be developed in which the individual components dissolve at different rates. This could be achieved through the combination of struvite and a more stable calcium phosphate (eg, β -tricalcium phosphate).

The brushite cements ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), as well as the CDHA cement, showed barely any resorption even after ten months of implantation. For the CDHA cement this was expected, but not for the brushite cements. These findings could be due to changes in the phase composition which occurred in the brushite cements with a PLR of 2.0, rather than due to the cement formulation itself. The partially-loaded defect model revealed that the brushite cements were not suitable for load-bearing applications because cracks formed in the cement. Hence, it is recommended that the cement formulations be modified before they are investigated again. To enhance the stability, ceramic or polymer fibers might prove successful when incorporated into the cement. To improve degradation behavior, another liquid component such as sodiumhyaluronat or pyrophosphate, as used in other studies, should be considered.

In addition to the bone implants, moulds of each cement formulation were implanted subcutaneously. Bone formation at these implants exhibited certain osteoinductive properties of the cements. By the time of implantation, the subcutaneous brushite implants had reduced in volume in contrast to the bone implants. The cause may be found in the different tissue milieu or in the different implant type (orthotopic: paste / heterotopic: block). When researching the specific biological behaviours of a biomaterial, it is necessary to examine the materials using them with the same type and corresponding target tissue as it will be used in clinical use. In such cases, cements used as resorbable bone substitute materials should always be investigated as a paste and in a suitable bone defect. Also, a study in a loaded implant model is useful, since a mechanical load has an influence on the behavior of the cements and the bone remodelling.

8 ANHANG

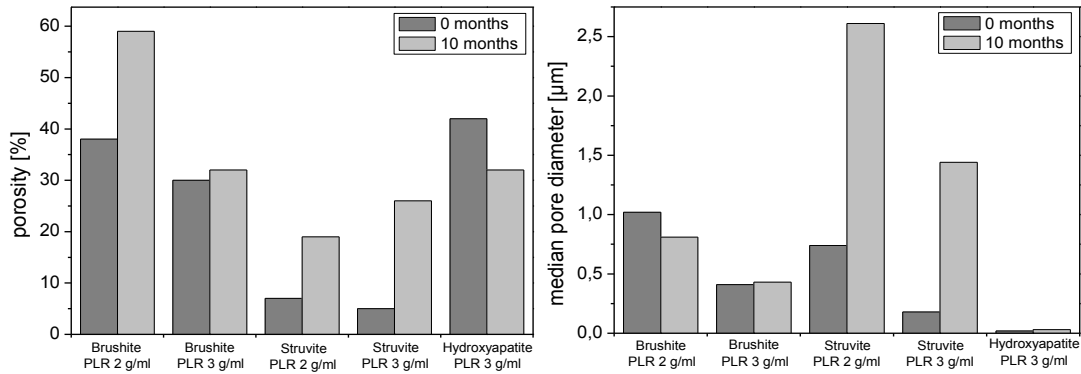


Abb. 78: Porosität und mittlere Porengröße der Zemente vor und nach 10 Monaten Implantation, entnommen aus Kanter et al. (KANTER et al., eingereicht 2013)

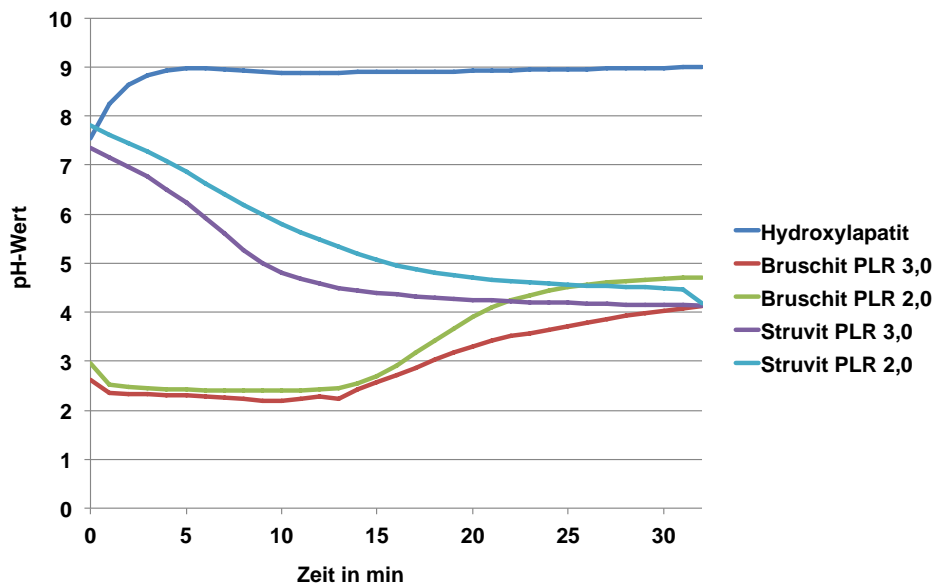


Abb. 79: pH-Wert-Verläufe der Zemente während des Abbindens

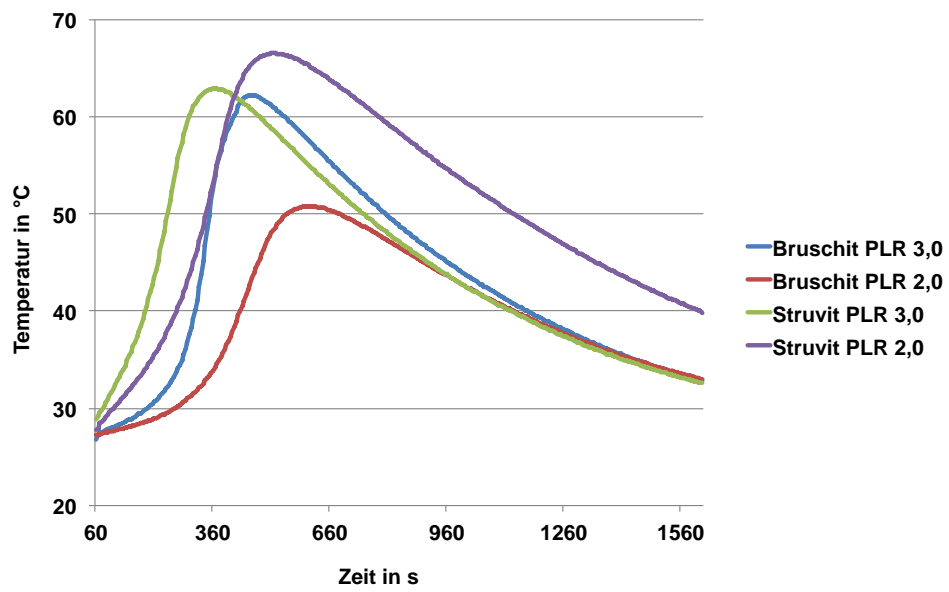


Abb. 80: Temperaturverläufe der Zemente während des Abbindens

9 LITERATURVERZEICHNIS

- Aarvold A, Smith JO, Tayton ER, Lanham SA, Chaudhuri JB, Turner IG, Oreffo RO. The effect of porosity of a biphasic ceramic scaffold on human skeletal stem cell growth and differentiation in vivo. *J Biomed Mater Res A* 2013; 101: 3431-7.
- Akiyama N, Takemoto M, Fujibayashi S, Neo M, Hirano M, Nakamura T. Difference between dogs and rats with regard to osteoclast-like cells in calcium-deficient hydroxyapatite-induced osteoinduction. *J Biomed Mater Res A* 2011; 96: 402-12.
- Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 2001; 10 Suppl 2: S96-101.
- Alge DL, Goebel WS, Chu TM. In vitro degradation and cytocompatibility of dicalcium phosphate dihydrate cements prepared using the monocalcium phosphate monohydrate/hydroxyapatite system reveals rapid conversion to HA as a key mechanism. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2012; 100: 595-602.
- Anderson HC, Garimella R, Tague SE. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Front Biosci* 2005; 10: 822-37.
- Apelt D, Theiss F, El-Warrak AO, Zlinszky K, Bettschart-Wolfisberger R, Bohner M, Matter S, Auer JA, von Rechenberg B. In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. *Biomaterials* 2004; 25: 1439-51.
- Barralet JE, TAMIMI MFA, FLYNN AP (2013) Magnesium phosphate biomaterials. Google Patents
- Berger G, Gildenhaar R. Resorbierbarer Knochenersatz auf der Basis von Calciumphosphaten. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* 1995; 26: 379-85.
- Bernards C, Chapman, J, Mirza, S. Lethality of embolized Norian Bone Cement varies with the time between mixing and embolization. 50th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 2004; Paper No: 0254
- Bignon A, Chouteau J, Chevalier J, Fantozzi G, Carret JP, Chavassieux P, Boivin G, Melin M, Hartmann D. Effect of micro- and macroporosity of bone substitutes on their mechanical properties and cellular response. *J Mater Sci Mater Med* 2003; 14: 1089-97.
- Blom EJ, Klein-Nulend J, Yin L, van Waas MA, Burger EH. Transforming growth factor-beta1 incorporated in calcium phosphate cement stimulates osteotransductivity in rat calvarial bone defects. *Clin Oral Implants Res* 2001; 12: 609-16.
- Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury* 2000; 31 Suppl 4: 37-47.

- Bohner M, Theiss F, Apelt D, Hirsiger W, Houriet R, Rizzoli G, Gnos E, Frei C, Auer JA, von Rechenberg B. Compositional changes of a dicalcium phosphate dihydrate cement after implantation in sheep. *Biomaterials* 2003; 24: 3463-74.
- Bohner M, Gbureck U, Barralet JE. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: a critical assessment. *Biomaterials* 2005; 26: 6423-9.
- Bohner M, Gbureck U. Thermal reactions of brushite cements. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008; 84: 375-85.
- Breitwieser GE. Extracellular calcium as an integrator of tissue function. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 1467-80.
- Brennan MA, Gleeson JP, O'Brien FJ, McNamara LM. Effects of ageing, prolonged estrogen deficiency and zoledronate on bone tissue mineral distribution. *J Mech Behav Biomed Mater* 2014; 29: 161-70.
- Brown W, Chow L. Combinations of sparingly soluble calcium phosphates in slurries and paste as mineralizers and cements. US Patent No. 4612053 1986;
- Busse B, Hahn M, Soltau M, Zustin J, Puschel K, Duda GN, Amling M. Increased calcium content and inhomogeneity of mineralization render bone toughness in osteoporosis: mineralization, morphology and biomechanics of human single trabeculae. *Bone* 2009; 45: 1034-43.
- Cai YL, Zhang JJ, Zhang S, Venkatraman SS, Zeng XT, Du HJ, Mondal D. Osteoblastic cell response on fluoridated hydroxyapatite coatings: the effect of magnesium incorporation. *Biomedical Materials* 2010; 5
- Chai YC, Carlier A, Bolander J, Roberts SJ, Geris L, Schrooten J, Van Oosterwyck H, Luyten FP. Current views on calcium phosphate osteogenicity and the translation into effective bone regeneration strategies. *Acta Biomater* 2012; 8: 3876-87.
- Chicco C, Ammerman C, Feaster J, Dunavant P. Nutritional Interrelationships of Dietary Calcium, Phosphorus and Magnesium in Sheep. *Journal of Animal Science* 1973; 36: 986-93.
- Chopra PM, Johnson M, Nagy TR, Lemons JE. Micro-computed tomographic analysis of bone healing subsequent to graft placement. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009; 88: 611-8.
- Chow LC. Next generation calcium phosphate-based biomaterials. *Dent Mater J* 2009; 28: 1-10.
- Claes L, Hoellen I, Ignatius A. Resorbierbare Knochenzemente [Resorbable bone cements]. *Orthopade* 1997; 26: 459-62.
- Colfen H. Biomineralization: A crystal-clear view. *Nat Mater* 2010; 9: 960-1.
- Constantz BR, Barr BM, Ison IC, Fulmer MT, Baker J, McKinney LA, Goodman SB, Gunasekaran S, Delaney DC, Ross J, Poser RD. Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate

- cements in different rabbit osseous sites. *Journal of Biomedical Materials Research* 1998; 43: 451-61.
- Cortez PP, Atayde LM, Silva MA, Armada-da-Silva P, Fernandes MH, Afonso A, Lopes MA, Mauricio AC, Santos JD. Characterization and preliminary in vivo evaluation of a novel modified hydroxyapatite produced by extrusion and spheronization techniques. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2011; 99: 170-9.
- del Real RP, Ooms E, Wolke JGC, Vallet-Regí M, Jansen JA. In vivo bone response to porous calcium phosphate cement. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2003; 65A: 30-6.
- Detsch R, Mayr H, Seitz D, Ziegler G. Is Hydroxyapatite Ceramic Included in the Bone Remodelling Process? An in vitro Study of Resorption and Formation Process. *Key Engineering Materials* 2008; 361-363: 1123- 6.
- Detsch R, Schaefer S, Deisinger U, Ziegler G, Seitz H, Leukers B. In vitro: osteoclastic activity studies on surfaces of 3D printed calcium phosphate scaffolds. *J Biomater Appl* 2011; 26: 359-80.
- Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med* 2011; 9: 66.
- Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 1982; 11: 318-26.
- Dorozhkin SV, Epple M. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed Engl* 2002; 41: 3130-46.
- Dorozhkin SV. Medical Application of Calcium Orthophosphates Bioceramics. *BIO* 2011; 1: 1-51.
- Driessens FCM, Boltong MG, Bermúdez O, Planell JA, Ginebra MP, Fernández E. Effective formulations for the preparation of calcium phosphate bone cements. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1994; 5: 164-70.
- Driessens FCM, Boltong MG, Zapatero MI, Verbeeck RMH, Bonfield W, Bermúdez O, Fernández E, Ginebra MP, Planell JA. In vivo behaviour of three calcium phosphate cements and a magnesium phosphate cement. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1995; 6: 272-8.
- Ellinghaus A, Schmidt-Bleek K, Duda GN, Schell H. Der physiologische Ablauf der Frakturheilung. Eine histologische Betrachtung
. *Osteologie* 2011; 20: 1019-291.
- Epple M, B auerlein, E. *Handbook of Biomineralization*. 2007: 81-3.
- Espinoza J, McDowell L, Rodriguez J, Loosli J, Conrad J, Martin F. Mineral Status of Llamas and Sheep in the Bolivian Altiplano. *The Journal of Nutrition* 1982;
- Ewald A, Helmschrott K, Knebl G, Mehrban N, Grover LM, Gbureck U. Effect of cold-setting calcium- and magnesium phosphate matrices on protein

- expression in osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2011; 96: 326-32.
- Fellah BH, Gauthier O, Weiss P, Chappard D, Layrolle P. Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. *Biomaterials* 2008; 29: 1177-88.
- Fernández E, Ginebra MP, Bermúdez O, Boltong MG, Driessens FCM, Planell JA. Dimensional and thermal behaviour of calcium phosphate cements during setting compared to PMMA bone cements. *Journal of Materials Science Letters* 1995; 14: 4-5.
- Flautre B, Delecourt C, Blary MC, Van Landuyt P, Lemaitre J, Hardouin P. Volume effect on biological properties of a calcium phosphate hydraulic cement: experimental study in sheep. *Bone* 1999; 25: 35S-9S.
- Flautre B, Maynou C, Lemaitre J, Van Landuyt P, Hardouin P. Bone colonization of beta-TCP granules incorporated in brushite cements. *J Biomed Mater Res* 2002; 63: 413-7.
- Francis MD. Physical Chemistry of Osteoclast Resorption of Bone. Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements 1999; 144: 317-20.
- Frayssinet P, Gineste L, Conte P, Fages J, Rouquet N. Short-term implantation effects of a DCPD-based calcium phosphate cement. *Biomaterials* 1998; 19: 971-7.
- Frayssinet P, Roudier M, Lerch A, Ceolin JL, Depres E, Rouquet N. Tissue reaction against a self-setting calcium phosphate cement set in bone or outside the organism. *J Mater Sci Mater Med* 2000; 11: 811-5.
- Fuentes E, Saenz de Viteri V, Igartua A, Martinetti R, Dolcini L, Barandika G. Structural characterization and mechanical performance of calcium phosphate scaffolds and natural bones: a comparative study. *J Appl Biomater Biomech* 2010; 8: 159-65.
- Gbureck U. Preparation for Magnesium Ammonium Phosphate Cement. US Patent No. 8540815 B2 2013;
- Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury* 2005; 36 Suppl 3: S20-7.
- Ginebra MMP, MESTRES BEÀG (2013) Inorganic cement for biomedical uses, preparation method thereof and use of same. Google Patents
- Ginebra MP, Delgado JA, Harr I, Almirall A, Del Valle S, Planell JA. Factors affecting the structure and properties of an injectable self-setting calcium phosphate foam. *J Biomed Mater Res A* 2007; 80: 351-61.
- Ginebra MP, Espanol M, Montufar EB, Perez RA, Mestres G. New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine. *Acta Biomater* 2010; 6: 2863-73.
- Ginebra MP, Canal C, Espanol M, Pastorino D, Montufar EB. Calcium phosphate cements as drug delivery materials. *Adv Drug Deliv Rev* 2012; 64: 1090-110.

- Grossardt C, Ewald A, Grover LM, Barralet JE, Gbureck U. Passive and active in vitro resorption of calcium and magnesium phosphate cements by osteoclastic cells. *Tissue Eng Part A* 2010; 16: 3687-95.
- Grover LM, Knowles JC, Fleming GJ, Barralet JE. In vitro ageing of brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials* 2003; 24: 4133-41.
- Habibovic P, Sees TM, van den Doel MA, van Blitterswijk CA, de Groot K. Osteoinduction by biomaterials--physicochemical and structural influences. *J Biomed Mater Res A* 2006; 77: 747-62.
- Hannink G, Wolke JG, Schreurs BW, Buma P. In vivo behavior of a novel injectable calcium phosphate cement compared with two other commercially available calcium phosphate cements. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008; 85: 478-88.
- Hannink G, Arts JJ. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: what is optimal for bone regeneration? *Injury* 2011; 42 Suppl 2: S22-5.
- Harms C, Helms K, Taschner T, Stratos I, Ignatius A, Gerber T, Lenz S, Rammelt S, Vollmar B, Mittlmeier T. Osteogenic capacity of nanocrystalline bone cement in a weight-bearing defect at the ovine tibial metaphysis. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 2883-9.
- Heinemann S, Gelinsky M, Worch H, Hanke T. [Resorbable bone substitution materials: An overview of commercially available materials and new approaches in the field of composites]. *Orthopade* 2011; 40: 761-73.
- Heinemann S, Rossler S, Lemm M, Ruhnnow M, Nies B. Properties of injectable ready-to-use calcium phosphate cement based on water-immiscible liquid. *Acta Biomater* 2013; 9: 6199-207.
- Heiss C, Maier G. S., Gelinsky M., Hose D., Schnettler R. Klinische Verwendung osteologischer Biomaterialien. *Osteologie* 2013; 22: 173-8.
- Hesaraki S, Nemati R. Cephalexin-loaded injectable macroporous calcium phosphate bone cement. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009; 89: 342-52.
- Huber FX, McArthur N, Heimann L, Dingeldein E, Cavey H, Palazzi X, Clermont G, Boutrand JP. Evaluation of a novel nanocrystalline hydroxyapatite paste Ostim in comparison to Alpha-BSM - more bone ingrowth inside the implanted material with Ostim compared to Alpha BSM. *BMC Musculoskelet Disord* 2009; 10: 164.
- Ignatius A, Unterricker K, Wenger K, Richter M, Claes L, Lohse P, Hirst H. A new composite made of polyurethane and glass ceramic in a loaded implant model: A biomechanical and histological analysis. *J Mater Sci-Mater M* 1997; 8: 753-6.
- Ignatius A, Peraus M, Schorlemmer S, Augat P, Burger W, Leyen S, Claes L. Osseointegration of alumina with a bioactive coating under load-bearing and unloaded conditions. *Biomaterials* 2005; 26: 2325-32.
- Ikenaga M, Hardouin P, Lemaitre J, Andrianjatovo H, Flautre B. Biomechanical characterization of a biodegradable calcium phosphate hydraulic cement:

- a comparison with porous biphasic calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res* 1998; 40: 139-44.
- Ishikawa K. Bone Substitute Fabrication Based on Dissolution-Precipitation Reactions
. *Materials* 2010; 3: 1123-55.
- Kanter B, Geffers M, Ignatius A, Gbureck U. Changes of material properties during in vivo degradation of calcium and magnesium phosphate cements eingereicht 2013;
- Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005; 26: 5474-91.
- Kasuya A, Sobajima S, Kinoshita M. In vivo degradation and new bone formation of calcium phosphate cement-gelatin powder composite related to macroporosity after in situ gelatin degradation. *J Orthop Res* 2012; 30: 1103-11.
- Klammert U, Reuther T, Jahn C, Kraski B, Kubler AC, Gbureck U. Cytocompatibility of brushite and monetite cell culture scaffolds made by three-dimensional powder printing. *Acta Biomater* 2009; 5: 727-34.
- Klammert U, Reuther T, Blank M, Reske I, Barralet JE, Grover LM, Kubler AC, Gbureck U. Phase composition, mechanical performance and in vitro biocompatibility of hydraulic setting calcium magnesium phosphate cement. *Acta Biomater* 2010; 6: 1529-35.
- Klammert U, Ignatius A, Wolfram U, Reuther T, Gbureck U. In vivo degradation of low temperature calcium and magnesium phosphate ceramics in a heterotopic model. *Acta Biomater* 2011; 7: 3469-75.
- Kobayashi N, Ong K, Villarraga M, Schwardt J, Wenz R, Togawa D, Fujishiro T, Turner AS, Seim HB, 3rd, Bauer TW. Histological and mechanical evaluation of self-setting calcium phosphate cements in a sheep vertebral bone void model. *J Biomed Mater Res A* 2007; 81: 838-46.
- Kolk A, Handschel J, Drescher W, Rothamel D, Kloss F, Blessmann M, Heiland M, Wolff KD, Smeets R. Current trends and future perspectives of bone substitute materials - from space holders to innovative biomaterials. *J Craniomaxillofac Surg* 2012; 40: 706-18.
- Konishi T, Takahashi S, Zhuang Z, Nagata K, Mizumoto M, Honda M, Takeuchi Y, Matsunari H, Nagashima H, Aizawa M. Biodegradable beta-tricalcium phosphate cement with anti-washout property based on chelate-setting mechanism of inositol phosphate. *J Mater Sci Mater Med* 2013; 24: 1383-94.
- Krebs J, Aebli N, Goss BG, Sugiyama S, Bardyn T, Boecken I, Leamy PJ, Ferguson SJ. Cardiovascular changes after pulmonary embolism from injecting calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007; 82: 526-32.
- Lange T, Schilling AF, Peters F, Mujas J, Wicklein D, Amling M. Size dependent induction of proinflammatory cytokines and cytotoxicity of particulate beta-tricalciumphosphate in vitro. *Biomaterials* 2011; 32: 4067-75.

- Larsson S, Hannink G. Injectable bone-graft substitutes: current products, their characteristics and indications, and new developments. *Injury* 2011; 42 Suppl 2: S30-4.
- Le Nihouannen D, Hacking SA, Gbureck U, Komarova SV, Barralet JE. The use of RANKL-coated brushite cement to stimulate bone remodelling. *Biomaterials* 2008; 29: 3253-9.
- LeGeros RZ. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. *Clin Mater* 1993; 14: 65-88.
- LeGeros RZ. Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials. *Chemical Reviews* 2008; 108: 4742-53.
- Linhart W, Briem D, Peters A, Lehmann W, Windolf J, Rueger JM. Resorbierbare Kalziumphosphatzemente. *Trauma und Berufskrankheit* 2004; 6: 277-84.
- Liu C. Inorganic Bone Adhesion Agent and its Use in Human Hard Tissue Repair. US Patent No. 7094286 B2 2006;
- Lorget F, Kamel S, Mentaverri R, Wattel A, Naassila M, Maamer M, Brazier M. High extracellular calcium concentrations directly stimulate osteoclast apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 268: 899-903.
- Low KL, Tan SH, Zein SH, Roether JA, Mourino V, Boccaccini AR. Calcium phosphate-based composites as injectable bone substitute materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010; 94: 273-86.
- Lu J, Descamps M, Dejou J, Koubi G, Hardouin P, Lemaitre J, Proust JP. The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone. *J Biomed Mater Res* 2002; 63: 408-12.
- Lu JX, About I, Stephan G, Van Landuyt P, Dejou J, Fioocchi M, Lemaitre J, Proust JP. Histological and biomechanical studies of two bone colonizable cements in rabbits. *Bone* 1999; 25: 41S-5S.
- Maeno S, Niki Y, Matsumoto H, Morioka H, Yatabe T, Funayama A, Toyama Y, Taguchi T, Tanaka J. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. *Biomaterials* 2005; 26: 4847-55.
- Malard O, Bouler JM, Guicheux J, Heymann D, Pilet P, Coquard C, Daculsi G. Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption, and inflammatory reactions: preliminary in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res* 1999; 46: 103-11.
- Martin RI, Brown PW. Mechanical properties of hydroxyapatite formed at physiological temperature. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1995; 6: 138-43.
- McArthur N, Kasperk C, Baier M, Tanner M, Gritzbach B, Schoierer O, Rothfischer W, Krohmer G, Hillmeier J, Kock HJ, Meeder PJ, Huber FX. 1150 kyphoplasties over 7 years: indications, techniques, and intraoperative complications. *Orthopedics* 2009; 32: 90.

- Mestres G, Ginebra MP. Novel magnesium phosphate cements with high early strength and antibacterial properties. *Acta Biomater* 2011; 7: 1853-61.
- Miyamoto Y, Ishikawa K, Takechi M, Toh T, Yuasa T, Nagayama M, Suzuki K. Histological and compositional evaluations of three types of calcium phosphate cements when implanted in subcutaneous tissue immediately after mixing. *J Biomed Mater Res* 1999; 48: 36-42.
- Morgan EF, Mason ZD, Chien KB, Pfeiffer AJ, Barnes GL, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Micro-computed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. *Bone* 2009; 44: 335-44.
- Munting E, Mirtchi AA, Lemaitre J. Bone repair of defects filled with a phosphocalcic hydraulic cement: an in vivo study. 1993;
- Musha Y, Umeda T, Yoshizawa S, Shigemitsu T, Mizutani K, Itatani K. Effects of blood on bone cement made of calcium phosphate: problems and advantages. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010; 92: 95-101.
- Nafei A, Kabel J, Odgaard A, Linde F, Hvid I. Properties of growing trabecular ovine bone. Part II: architectural and mechanical properties. *J Bone Joint Surg Br* 2000; 82: 921-7.
- Oheim R, Beil FT, Kohne T, Wehner T, Barvencik F, Ignatius A, Amling M, Clarke IJ, Pogoda P. Sheep Model for Osteoporosis: Sustainability and Biomechanical Relevance of Low Turnover Osteoporosis Induced by Hypothalamic-Pituitary Disconnection. *J Orthop Res* 2013; 31: 1067-74.
- Ohura K, Bohnert M, Hardouin P, Lemaître J, Pasquier G, Flautre B. Resorption of, and bone formation from, new β -tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements: An in vivo study. 1996;
- Ooms EM, Wolke JG, van der Waerden JP, Jansen JA. Trabecular bone response to injectable calcium phosphate (Ca-P) cement. *J Biomed Mater Res* 2002; 61: 9-18.
- Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 2007; 13: 1-10.
- Perez RA, Del Valle S, Altankov G, Ginebra MP. Porous hydroxyapatite and gelatin/hydroxyapatite microspheres obtained by calcium phosphate cement emulsion. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2011; 97: 156-66.
- Pina S, Torres PM, Ferreira JM. Injectability of brushite-forming Mg-substituted and Sr-substituted alpha-TCP bone cements. *J Mater Sci Mater Med* 2010; 21: 431-8.
- Potes JC, Reis J, Capela e Silva F, Relvas C, Cabrita AS, Simões JA. The Sheep as an Animal Model in Orthopaedic Research. *Experimental Pathology and Health Sciences* 2009;
- Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE (1996) *Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine*. Academic Press, San Diego. 484

- Rentsch C, Rentsch B, Scharnweber D, Zwipp H, Rammelt S. [Bone substitute. Transplants and replacement materials--an update]. *Unfallchirurg* 2012; 115: 938-49.
- Revell PA, Damien E, Zhang XS, Evans P, Howlett CR. The effect of magnesium ions on bone bonding to hydroxyapatite coating on titanium alloy implants. In: *Bioceramics*, Vol 16. Barbosa MA, Monteiro FJ, Correia R, Leon B, eds.: 2004: 447-50.
- Romeis B, Denk H, Künzle H, Plenck H, Rüschoff J, Sellner W (1989) *Mikroskopische Technik*, 17. Auflage edn. Urban & Schwarzenberg, München; Wien; Baltimore. 697
- Roschger P, Fratzl P, Eschberger J, Klaushofer K. Validation of quantitative backscattered electron imaging for the measurement of mineral density distribution in human bone biopsies. *Bone* 1998; 23: 319-26.
- Roschger P, Paschalis EP, Fratzl P, Klaushofer K. Bone mineralization density distribution in health and disease. *Bone* 2008; 42: 456-66.
- Rude RK, Singer FR, Gruber HE. Skeletal and hormonal effects of magnesium deficiency. *J Am Coll Nutr* 2009; 28: 131-41.
- Samavedi S, Whittington AR, Goldstein AS. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomater* 2013; 9: 8037-45.
- Schilling AF, Linhart W, Filke S, Gebauer M, Schinke T, Rueger JM, Amling M. Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts. *Biomaterials* 2004; 25: 3963-72.
- Schnurer SM, Gopp U, Kuhn KD, Breusch SJ. [Bone substitutes]. *Orthopade* 2003; 32: 2-10.
- Simon U, Augat P, Ignatius A, Claes L. Influence of the stiffness of bone defect implants on the mechanical conditions at the interface-a finite element analysis with contact. *J Biomech* 2003; 36: 1079-86.
- Slongo T, Joeris A. ChronOSTMInject in Children with Bone Cysts Resistant to Conventional Treatment. *European Cells and Materials* Vol. 11. Suppl. 1, 2006 (page 3) 2006; 11
- Tamimi F, Sheikh Z, Barralet J. Dicalcium phosphate cements: brushite and monetite. *Acta Biomater* 2012; 8: 474-87.
- Tan YN, Patel S, Gbureck U, Grover LM. Controlling degradation in calcium phosphate cements. *Advances in Applied Ceramics* 2011; 110: 457-63.
- Theiss F, Apelt D, Brand B, Kutter A, Zlinszky K, Böhner M, Matter S, Frei C, Auer JA, von Rechenberg B. Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials* 2005; 26: 4383-94.
- Turner RT, Maran A, Lotinun S, Hefferan T, Evans GL, Zhang M, Sibonga JD. Animal models for osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord* 2001; 2: 117-27.
- Vaananen K. Mechanism of osteoclast mediated bone resorption--rationale for the design of new therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57: 959-71.

- Verron E, Gauthier O, Janvier P, Pilet P, Lesoeur J, Bujoli B, Guicheux J, Bouler JM. In vivo bone augmentation in an osteoporotic environment using bisphosphonate-loaded calcium deficient apatite. *Biomaterials* 2010; 31: 7776-84.
- von Rechenberg B, Genot OR, Nuss K, Galuppo L, Fulmer M, Jacobson E, Kronen P, Zlinszky K, Auer JA. Evaluation of four biodegradable, injectable bone cements in an experimental drill hole model in sheep. *Eur J Pharm Biopharm* 2013; 85: 130-8.
- Vorndran E, Ewald A, Muller FA, Zorn K, Kufner A, Gbureck U. Formation and properties of magnesium-ammonium-phosphate hexahydrate biocements in the Ca-Mg-PO₄ system. *J Mater Sci Mater Med* 2011; 22: 429-36.
- Wang X, Chen L, Xiang H, Ye J. Influence of anti-washout agents on the rheological properties and injectability of a calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007; 81: 410-8.
- Wolff J (1892) *The Law of Bone Remodelling (Das Gesetz der Transformation der Knochen)*. Springer-Verlag, Berlin
- Wu F, Wei J, Guo H, Chen F, Hong H, Liu C. Self-setting bioactive calcium-magnesium phosphate cement with high strength and degradability for bone regeneration. *Acta Biomater* 2008; 4: 1873-84.
- Yu Y, Wang J, Liu C, Zhang B, Chen H, Guo H, Zhong G, Qu W, Jiang S, Huang H. Evaluation of inherent toxicology and biocompatibility of magnesium phosphate bone cement. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010; 76: 496-504.
- Yuan H, van den Doel M, Li S, van Blitterswijk CA, de Groot K, de Bruijn JD. A comparison of the osteoinductive potential of two calcium phosphate ceramics implanted intramuscularly in goats. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2002; 13: 1271-5.
- Zreiqat H, Howlett CR, Zannettino A, Evans P, Schulze-Tanzil G, Knabe C, Shakibaei M. Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants. *J Biomed Mater Res* 2002; 62: 175-84.
- Zupan J, van't Hof RJ, Vindisar F, Haring G, Trebse R, Komadina R, Marc J. Osteoarthritic versus osteoporotic bone and intra-skeletal variations in normal bone: evaluation with microCT and bone histomorphometry. *J Orthop Res* 2013; 31: 1059-66.

10 DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei Frau Prof. Anita Ignatius für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Dissertation am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik bedanken.

Herrn Prof. Eckhard Wolf danke ich für die Übernahme meiner Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

Bei Herrn Prof. Uwe Gbureck bedanke ich mich für die Zusammenarbeit mit der Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde des Universitätsklinikums Würzburg.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Institutes für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, sowie des Tierforschungszentrums Oberberghof, die mir im OP, im Schafstall, im Histolabor und auch sonst hilfreich zur Seite gestanden haben.

Bei meiner Familie möchte ich mich ganz herzlich für die Unterstützung in allen Lebenslagen bedanken.