

**Institut für Unfallchirurgische Forschung und
Biomechanik**

Leiter: Prof. Dr. Lutz Claes

**Biokompatibilität und Resorption eines neuen
Calciumphosphatzementes
im osteoporotischen Schafsmodell**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Ulm

Stipe Krajinovic

München

2003

Amtierender Dekan : **Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin**

1. Berichterstatter : **PD Dr. Anita Ignatius**

2. Berichterstatter : **Prof. Dr. Rolf Brenner**

Tag der Promotion : **21. Oktober 2004**

GLIEDERUNG

1. Einleitung

1.1.	Bedeutung von Knochenersatzmaterialien	6
1.2.	Einsatz von Knochenersatzmaterialien bei der Osteoporosebehandlung	9
1.3.	Übersicht über Knochenzemente	11
1.3.1.	Nicht resorbierbare Knochenzemente	11
1.3.2.	Resorbierbare Knochenzemente	12
1.4.	Ziel der Arbeit	17

2. Material und Methoden

2.1.	Implantatmaterial, Biocement D [®]	18
2.2.	Tiermodell: „osteoporotisches Schaf“	19
2.2.1.	Versuchs-Design	19
2.2.2.	Behandlung	20
2.2.2.1.	Ovarektomie	21
2.2.2.2.	Implantation des Zementes	22
2.3.	Probenaufbereitung	24
2.3.1.	Histologische Dünnschliffe	24
2.3.2.	Färbungen	26
2.3.3.	Mikroradiographie	28
2.4.	Auswertung	29
2.4.1.	Quantitative Analyse des Knochenanteils um den Zement	29
2.4.1.1.	Analyse des Knochenanteils	29
2.4.1.2.	Statistischer Test	31
2.4.2.	Qualitative Analyse der Gewebereaktion	32

3. Ergebnisse	
3.1. Quantitative Analyse des Knochenanteils	35
3.2. Qualitative Auswertung (histologisch)	40
3.2.1. Gruppe A – Kontrollgruppe	40
3.2.2. Gruppe B – Ovariectomie	44
3.2.3. Gruppe C – Ovariectomie und Steroidtherapie	47
4. Diskussion	
4.1. Wahl des Versuchsmodells und des Implantationsortes	53
4.2. Biokompatibilität und Resorption von Biocement D	56
4.3. Biokompatibilität und Resorption im Vergleich zu anderen injizierbaren Zementen	57
5. Zusammenfassung	63
6. Literaturverzeichnis	64
7. Danksagung	73

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α-TCP	alpha-Tricalciumphosphat: Hochtemperaturphase des Tricalciumphosphat
β-TCP	beta-Tricalciumphosphat: Niedrigtemperaturphase des Tricalciumphosphat
DCP	Dicalciumphosphat
CA	Karboniertes Apatit
DCPD	Dicalciumphosphatdihydrat
Ap	Apatit
ACP	Amorphes Calciumphosphat
HA	Hydroxylapatit
MCP	Monocalciumphosphat
MCPM	Monocalciumphosphatmonohydrat
CaCO₃	Calciumcarbonat
KGW	Körpergewicht

1. EINLEITUNG

1.1. Bedeutung von Knochenersatzmaterialien

Biomaterialien sind per definitionem "nicht-körpereigene Substanzen, die nach der Implantation in den menschlichen Organismus dort vorhandene strukturelle Elemente, ganze Gewebe und ihre (Teil-) Funktionen ersetzen" [Rueger, 1996]. Die Verwendung von Biomaterialien zur Behandlung von skelettalen Defekten führt zum Begriff der Knochenersatzmaterialien, deren Gebrauch und Entwicklung in den letzten 30 Jahren immer mehr an Bedeutung zugenommen haben.

In der klinischen Anwendung gilt die autogene Spongiosa immer noch als der "golden standard". Doch die Verfügbarkeit an autogener Spongiosa ist leider sehr begrenzt. Größere Knochendefekte, wie sie z.B. nach Tumor-Exstirpationen und komplizierten und ausgedehnten Splitterbrüchen im knöchernen Gewebe vorkommen, sind nicht durch die autogene Spongiosa-Technik zu überbrücken [Rueger, 1996; Claes et al., 1997]. Eine Alternative zur autogenen Transplantation ist die Verwendung von allogener Spender-Spongiosa, die von einer Knochenbank bezogen werden kann. Der Einsatz von allogener Spongiosa ist jedoch mit gewissen, nicht unerheblichen Risiken verbunden. Hierzu zählt die Gefahr der Übertragung von infektiösen Krankheitserregern, insbesondere HCV und HIV. Mögliche Nachteile der autogenen Spongiosa-Technik sind u.a. der Zweiteingriff und damit verbundene postoperative Schmerzen, die verlängerte Operationsdauer, Infektionen an der Entnahmestelle, die Kosten, der begrenzte Vorrat an autogener Spongiosa und die Gefahr von Verletzungen offener Knochenwachstumsfugen an den Entnahmestellen bei Kindern [Rueger, 1998; Stutzle et al., 1998].

Die Forschungsansätze der letzten Dekaden zeigten eine Tendenz in Richtung der Verwendung von denaturierten xenogenen Transplantaten, die von boviner Spongiosa bis hin zu korallischen Transplantaten reichen. Die meisten dieser Knochenersatzmaterialien wurden in keramische Implantate überführt. Die Porengröße der Keramik ist dabei für eine gute Durchbauung durch neuen Knochen entscheidend [Gunther et al., 1998]. Doch die Ergebnisse, die autogene Spongiosa erzielt, und vor

allein die Zeitspanne, in der eine gute Durchbauung des Implantats erzielt wird, werden weder von den alloenen noch von den xenogenen denaturierten Implantaten erreicht. Dies ist dadurch zu erklären, dass der größte Teil der Osteogenese von organischen Bestandteilen der Knochenmatrix ausgeht, die beim Denaturieren und weiterem Verarbeiten verloren gehen. Ohne den Schritt der Denaturierung gäbe es aber unakzeptable Reaktionen des Wirtsgewebes auf das fremde Implantat. So besteht weiterhin der Bedarf an synthetischen Knochenersatzmaterialien mit geeigneter Biokompatibilität und geeigneten Degradationseigenschaften. Besonderer Wert muss auf die mechanischen Eigenschaften gelegt werden. Diese Überlegung gewinnt vor allem dann an Bedeutung, wenn es sich bei dem zu reparierenden Gewebe um strukturschwachen (osteopenischen/-porotischen) Knochen handelt. Bisher war z.B. bei Wirbelkörperbrüchen die Verbundosteosynthese (s.u.) ein beliebtes Mittel, um diesem Problem zu begegnen.

Die Knochenersatzmaterialien können in vier Gruppen unterteilt werden (*Abb. 1*).

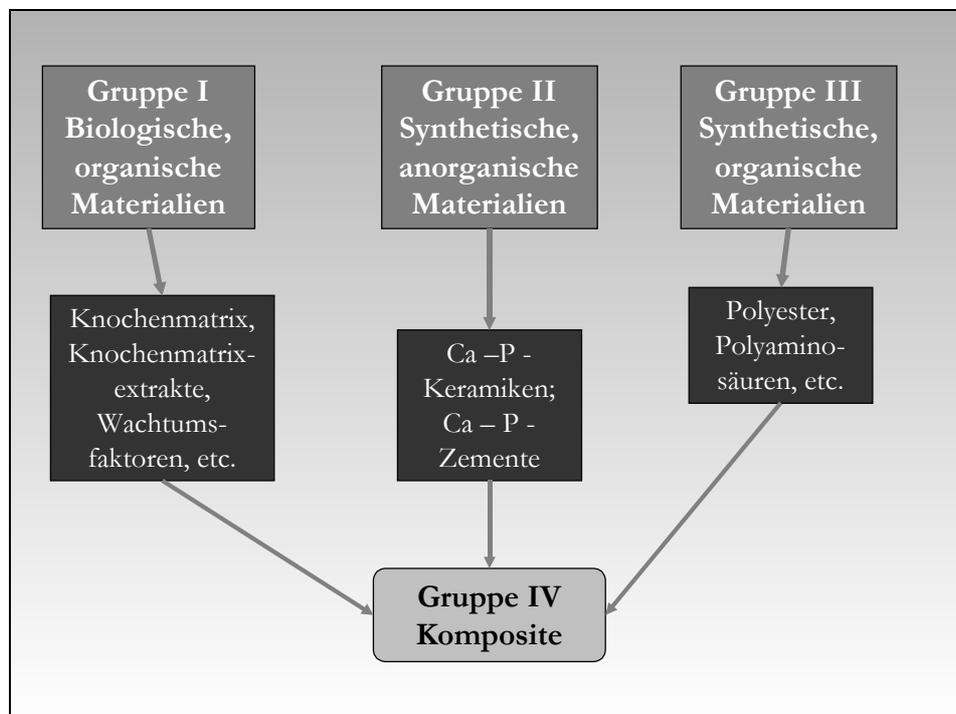


Abb. 1: Übersicht über Knochenersatzmaterialien. (Ca-P= Calciumphosphat, HA= Hydroxylapatit; [modifiziert nach Rueger, 1998a])

Zur Gruppe der biologisch, organischen Materialien gehören u.a. Knochenmatrices und -extrakte, Knochenwachstumsfaktoren (z.B. die BMPs; bone morphogenetic proteins) und eine Vielzahl anderer biologisch aktiver Substanzen, wie z.B. das TGF- β . In der Gruppe II befinden sich alle durch Hydrothermik und Sinterungsprozesse gewonnene Materialien (Hydroxylapatitkeramiken und -analoge: z.B. Interpore[®], Bio-Oss[®]), monophasische synthetische Materialien (z.B. Ceros[®] 80/82), mehrphasische Calciumphosphat-Keramiken und Biogläser und zuletzt calciumphosphathaltige Knochenzemente (z.B. Norian SRS[®], Biobon[®]). Die Gruppe III enthält u.a. verschiedene Polymere, wie z.B. Polyester oder Polyaminosäuren. Die Gruppe IV ist schwer zu unterteilen, da sie beliebige Kombinationen unterschiedlichster Materialien enthält [Rueger, 1998].

Die hohe Biokompatibilität und verbesserte Resorptionsfähigkeit von Calciumphosphatzementen im Vergleich zu z.B. HA-Keramiken zog in den letzten Jahrzehnten eine Reihe von Neuentwicklungen von verschiedenen Materialien nach sich, zumal sich für diese Gruppe von Biomaterialien ein breites Spektrum von Einsatzmöglichkeiten eröffnet. Der größte Vorteil ist hierbei die Möglichkeit, die Materialien als Zement (also in flüssiger Phase) zu applizieren und sie somit in der Verbundosteosynthese anstatt des PMMA zu verwenden. Die Einsatzgebiete reichen von der Knochendefektauffüllung in der Kieferchirurgie, über orthopädische (z.B. Auffüllung von Zysten) bis hin zu chirurgischen Anwendungen in der Unfallchirurgie (z.B. Versorgung von distalen Radiusfrakturen).

Ein resorbierbarer Knochenzement sollte hohen Ansprüchen der Gewebeverträglichkeit genügen und zugleich eine geeignete Resorbierbarkeit aufweisen. In zahlreichen Vorversuchen an menschlichen und tierischen Zellen wurde die hohe Biokompatibilität von Calciumphosphaten im Allgemeinen bestätigt [Driessens et al., 1998; Knabe et al., 2000; Ignatius, 2001; Langstaff et al., 2001].

1.2. Einsatz von Knochenersatzmaterialien bei der Osteoporosebehandlung

Eine von drei Frauen entwickelt in ihrem Leben Osteoporose, aus der u.U. Knochenbrüche entstehen können [Doren et Schneider, 1992]. Die schon weit entwickelten Hormontherapien haben jedoch keine hohe Akzeptanz und Compliance. Die Angst vor den Nebenwirkungen wie z.B. Gewichtszunahme und erhöhtes Risiko eines Brust- oder Endometrium-Carcinoms schrecken viele Frauen davon ab, sich dieser Therapie zu unterziehen [Doren et Schneider, 1992]. Dies hat jedoch weitreichende Folgen für die Gesundheit des Knochens, die sich erst nach jahrzehntelanger Latenzzeit bemerkbar machen können.

Der osteoporotische Knochen kann aufgrund der verminderten Knochendichte und sich daraus ergebenden mangelhaften biomechanischen Eigenschaften hohen Belastungen nicht standhalten, so dass Frakturen v.a. im Bereich der Wirbelsäule und des Schenkelhalses entstehen. Implantate zur Behandlung und Stabilisierung solcher Frakturen können im osteoporotischen Knochen schlecht verankert werden. Deshalb wurden verschiedene Behandlungsmethoden entwickelt.

So wird über den erfolgreichen klinischen Einsatz von konventioneller Osteosynthese in Kombination mit gemahlener allogener Spenderspongiosa bei osteoporotischen Patienten berichtet. In einer Studie wurden 30 Patienten nach diesem Verfahren behandelt, wovon sich bei 20 ein komplikationsloser Verlauf zeigte. Nach der Entfernung der Osteosyntheseimplantate konnte im allogenen Transplantat reifer Knochen und Knochenneubildung festgestellt werden. Bei insgesamt acht Patienten gab es jedoch Komplikationen (fehlgeschlagene Osteosynthese oder fortbestehende Dislokation der Bruchstücke oder Infektion) [Kuokkanen et al., 2001].

Die am weitesten verbreitete Methode ist jedoch die Augmentation mittels sog. Verbundosteosynthese mit Polymethylmethacrylat(PMMA)-Zement. Das Aufspritzen frakturierter Wirbelkörper und sogar die prophylaktische Applikation von Zementen in Wirbelkörper ist möglich [Bai et al., 1999]. Dabei darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass PMMA gewisse Nachteile im Vergleich zu Calciumphosphatzementen hat.

Hierzu gehört v.a., dass PMMA unter großer Hitzeentwicklung aushärtet und dadurch das umliegende Gewebe schädigen kann, was u.U. fatale Folgen für den osteoporotischen Knochen haben kann. Bei Anwendungen an der Wirbelsäule besteht die Gefahr von Nervenschädigungen durch die Wärmeentwicklung. Ein weiterer Nachteil ist die fehlende Resorbierbarkeit des PMMA. Operationen sind damit meist irreversibel, da sich einmal eingebrachtes PMMA nur mit großen Substanzverlusten des Knochens wieder entfernen lässt. Revisionseingriffe werden dadurch schwieriger.

Calciumphosphatzemente stellen hier eine Alternative dar. Sie härten ohne Temperaturentwicklung aus und zeigen eine gute Biokompatibilität. Weiterhin können sie prinzipiell resorbiert werden. Als Nachteil der keramischen Materialien ist hier zu nennen, dass sie spröde sind und dadurch bestimmten mechanischen Belastungen schlecht standhalten können [Ignatius, 2001]. Trotzdem können gute Ergebnisse erzielt werden.

Beim direkten Vergleich eines Calciumphosphatzementes mit PMMA zeigten *Bai et al.* mit *in vitro* Versuchen eine Alternative zur gängigen Verwendung von PMMA-Zement in der prophylaktischen Augmentation osteoporotischer Wirbelkörper und nach Kompressionsfrakturen auf. Die Kontrollgruppe der unbehandelten osteoporotischen Wirbelkörper wies eine Kompressionsstabilität von 527 +/- 43 N auf. Die mit Calciumphosphatzement versorgten Wirbelkörper erreichten 1063 +/- 127 N und die mit PMMA beladenen blieben noch bei 1036 +/- 100 N bruchfest. Die Kompressionsstabilität der Wirbelkörper in den beiden Gruppen, die mit Calciumphosphatzement oder PMMA versorgt wurden, zeigten also ähnliche Werte und waren signifikant stabiler als die Kontrollgruppe ($\alpha < 0,05$). In einem zweiten Teil der Studie wurden komprimierte Wirbelkörper wieder aufgerichtet. Auch hier zeigten sich ähnliche Werte für beide Materialien: die anteriore Wirbelkörperhöhe nahm bei der Calciumphosphatgruppe um 58,5 +/- 4,6 % und bei der PMMA-Gruppe um 58,0 +/- 6,5 % zu [Bai et al., 1999]. Aufgrund der besseren Biokompatibilität wäre es überlegenswert, in dieser Indikation zu injizierbaren Calciumphosphatzementen zu greifen.

Aufgrund der o.g. mechanischen Nachteile von Calciumphosphaten ist das Ziel der Forschung die Verbesserung der mechanischen Eigenschaften der Calciumphosphatzemente [Shao et al., 2000], denn die Behandlung von Frakturen im osteoporotischen Knochen birgt eine Vielzahl von Problemen und Gefahren (s.o.), die bei der Behandlung von strukturgesunden Knochen nicht oder nur vermindert auftreten. Eine Behandlung von komplizierten Kompressionsfrakturen erfordert den Einsatz von injizierbaren Zementen, die leicht zu verarbeiten und zu applizieren sind. Eine Vielzahl solcher Materialien besteht bereits, deren Einsatz ist jedoch in klinischen Langzeitstudien noch nicht genug verifiziert [Claes et al., 1997].

1.3. Übersicht über Knochenzemente

1.3.1. Nicht resorbierbare Knochenzemente

Bei den nicht resorbierbaren Zementen ist in erster Linie der PMMA-Zement zu nennen. Dieser wird vornehmlich in Zusammenhang mit Hüft- und Knieendoprothesen eingesetzt. Weiterhin findet der PMMA-Zement auch in der Versorgung von pathologischen Frakturen zur Auffüllung von Knochendefekten bei Tumorbehandlungen Verwendung. Auch bei osteoporosebedingten Frakturen zur Augmentation von Implantaten im strukturschwachen Knochen wird PMMA eingesetzt [Claes et al., 1997].

Die Kombination von Osteosyntheseimplantaten und PMMA-Zement als sog. "Verbundosteosynthese" ist seit den 60er Jahren weit verbreitet und wird bei zahlreichen Indikationen verwendet [Claes et al., 1997; Harrington et al., 1976; Harrington, 1981; Harrington, 1975]. In der Endoprothetik mag dieser Zement seine Aufgabe erfüllen und das Gelenkimplantat im Knochen verankern. Aber die Nachteile des PMMA, v.a. die fehlende Resorption und die häufige bindegewebige Abgrenzung, schränken den Einsatz bei der Verbundosteosynthese ein. Das PMMA ist also als Knochenersatzmaterial im eigentlichen Sinne aufgrund der erwähnten Eigenschaften nicht geeignet. Das Problem

ist, wie bereits oben erwähnt, die fehlende Resorptionsfähigkeit, folglich bleiben Eingriffe bzw. Behandlungen mit PMMA irreversibel. Die bei der Aushärtung von PMMA entstehenden hohen Temperaturen (in der Literatur mit bis zu 70°C angegeben) können eventuell Schäden an Knochen und benachbarten neuronalen Strukturen verursachen [Bai et al., 2001], was v.a. bei der Wirbelsäulenchirurgie ein hohes Risiko darstellt.

Die Freisetzung von toxischen Monomeren aus dem PMMA im menschlichen Organismus kann nicht ausgeschlossen werden. Diese können möglicherweise die Zellen im Interface zwischen Knochen und PMMA schädigen [Ertel et al., 1994; Gough et Downes, 2001].

Alle genannten Nachteile des PMMA führen dazu, Calciumphosphatzemente auch für die o.g. Verbundosteosynthese zu erproben [Bai et al., 2001].

1.3.2. Resorbierbare Knochenzemente

Eine Alternative zum PMMA bei der Verbundosteosynthese stellen injizierbare Calciumphosphatzemente dar. Es wurde eine Vielzahl von Calciumphosphatzementen entwickelt, die sich in ihrer chemischen Zusammensetzung unterscheiden. Daraus ergeben sich unterschiedliche Eigenschaften bezüglich der Verarbeitungstechnik, der Aushärtungszeiten (s. z.B. *Tab. 1*) und der mechanischen Eigenschaften.

Eine Gemeinsamkeit aller Calciumphosphatzemente ist ihre Osteokonduktivität und ihre direkte Bindung zum Knochen. Dies ist, wie bereits oben erwähnt, ein großer Vorteil gegenüber dem PMMA-Zement [Hench, 1998]. Allerdings können Calciumphosphatzemente, wie auch das PMMA keinen Knochen induzieren. Die Fähigkeit zur Osteoinduktion besitzen nur Materialien, die auch biologische Faktoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren, enthalten.

Aus der Vielzahl von Calciumphosphatzementen erwächst die Notwendigkeit, diese zu klassifizieren und zu charakterisieren. Dies ist jedoch nur möglich, wenn einheitliche Qualitätskriterien beachtet werden [Driessens et al., 1998]. Danach werden u.a. folgende Kriterien bestimmt:

- Die „initial setting time t_i “ – Zeit, nach der die Anmodellierung des Zements abgeschlossen ist
- Die „final setting time t_f “ – Zeit, nach der es möglich ist, den Zement zu berühren, ohne ihn zu beschädigen
- Die „cohesion time t_c “ – Zeit, die nötig ist, dass die Zementpaste genug Widerstandskraft in frühem Kontakt zu Flüssigkeiten entwickelt [Fernandez et al., 1996]
- Die „compressive strength C“ – stellt die Druckfestigkeit des Zements in MPa dar [Driessens et al., 1998].

Driessens et al. verglichen mehrere Materialien miteinander bezüglich dieser Eigenschaften. Verglichen wurden die bekanntesten der auf dem Markt befindlichen Calciumphosphatzemente. Die Größen t_i und t_f wurden in diesem Vergleich jeweils bei Zimmer- (20°C) und bei Körpertemperatur (37°C) bestimmt (*Tab. 1*).

Tab. 1: Charakteristiken von Calciumphosphatzementen. (C = Druckfestigkeit, t_i = „initial setting time“, t_f = „final setting time“ [modifiziert nach Driessens et al., 1998])

Produkt	C [MPa]	$t_i(20^\circ\text{C})$ [min]	$t_i(37^\circ\text{C})$ [min]	$t_f(20^\circ\text{C})$ [min]	$t_f(37^\circ\text{C})$ [min]
Norian SRS [®]	33 (5)*	22 (1)	6,5 (0,5)	37 (1)	8,5 (0,5)
Cementek [®]	8 (2)	36 (1)	9,5 (0,5)	64 (2)	17 (1)
Biocement D	83 (4)	6,5 (0,5)	2,75(0,25)	11(1)	6,5 (0,5)

* STA in Klammern

Anhand des obigen Vergleiches (*Tab. 1*) kommen *Driessens et al.* zur Beurteilung, dass Norian SRS[®] für nicht lasttragende Applikationen verwendet werden kann. Cementek[®] zeigt Schwächen sowohl bei den biomechanischen Eigenschaften, als auch bei den benötigten Zeiten für Aushärtung und Anmodellierung (*Tab. 1*). Biocement D hingegen erwies sich in allen Kriterien den anderen Materialien überlegen [Driessens et al., 1998].

Zur weiteren Charakterisierung gehört die Kenntnis der genauen chemischen Zusammensetzung der verschiedenen Materialien (*Tab.2*). Calciumphosphatzemente bestehen fast immer aus einem Gemisch aus verschiedenen Calciumphosphatverbindungen. Wichtig ist hierbei auch das Mengenverhältnis zwischen Calcium und Phosphat und der pH-Wert, bei dem ein bestimmtes Calciumphosphat ausfällt.

Tab. 2: Eigenschaften von verschiedenen Calciumphosphaten, die bei Raumtemperatur (25°C) präzipitieren können, modifiziert nach [Dorozhkin et Eppele, 2002].

Ca:P ^{a)}	Name	Formel	pH ^{b)}
1,35–2,2	Amorphes Calciumphosphat ACP	---	c)
0,5	Monocalciumphosphatmonohydrat MCPM	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ *H ₂ O	0,0-2,0
1,0	Dicalciumphosphatdihydrat DCPD (brushite)	CaHPO ₄ *2H ₂ O	2,0-6,0
1,33	Octocalciumphosphat OCP	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ *5H ₂ O	5,5-7,0
1,5	Calcium-defizitäres Hydroxylapatit CDHA	Ca ₉ (HPO ₄)(PO ₄) ₅ (OH)	6,5-9,5
1,67	Hydroxylapatit HA	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	9,5-12,0

a) molares Verhältnis von Calcium und Phosphat. b) pH-Wert bei dem der Stoff stabil bleibt. c) immer metastabil

Das Präzipitat in den bekannten Calciumphosphatzementen besteht aus einer oder aus Kombinationen folgender Komponenten:

- Dicalciumphosphatdihydrat
- Hydroxylapatit
- Calcium-defizitäres Hydroxylapatit
- amorphes Calciumphosphat
- carboniertes Apatit [Driessens et al., 1998].

Wie aus *Tab. 2* ersichtlich bräuchte das MCPM einen sehr sauren pH-Wert um ausfallen zu können und ist somit ungeeignet für die Verwendung im menschlichen Organismus, da ein so saueres Milieu zytotoxische Wirkungen hätte. Das OCP hingegen braucht sehr

lange bis es ausfällt und ist deswegen als Bestandteil eines Calciumphosphatzementes unerwünscht [Driessens et al., 1998].

Über vielseitige Anwendungsgebiete der Calciumphosphatzemente wird in der neueren Literatur vermehrt berichtet. Über die Anwendung des Calciumphosphatzements Biobon® berichten *Shao et al.* in einer *in vitro*-Studie bei der Augmentation von Pedikel-Schrauben in humanen Lendenwirbelkörpern. Sowohl die „axialen Ausreißtests“ wie auch die Transversalbelastung bescheinigen dem Zement einen positiven Einfluss auf die Stabilität der Pedikel-Schrauben [Shao et al., 2000]. Die axialen Ausreißtests erfolgten bei den biomechanischen Versuchen durch Zug an der Pedikel-Schraube, wobei die aufgewendete Kraft entlang der Längsachse (0°) der Pedikel-Schrauben wirkte. Bei der Transversalbelastung hingegen wirkte die Kraft auf den Schraubenkopf in einem bestimmten Winkel zur Längsachse der Schraube (z.B. 90°).

Vanderschot et al. berichten in einer *in vivo*-Studie über den Vergleich zweier Knochenzemente (Cementek® und Biobon®, das unter dem Namen α -BSM entwickelt wurde) mit der autologen Knochenspende in einem kritischen Knochendefekt der Wirbelkörper bei Hausschweinen, in der es galt, eine Fusion des L4 zu erreichen. Sie kommen zur folgenden Beurteilung der unterschiedlichen Eignung der verwendeten Materialien: Cementek® > autologe Knochenspende > Biobon®. Die Ergebnisse waren insgesamt nur bei vier von acht Versuchstieren zufriedenstellend, bei den anderen gab es entweder eine verspätete Fusion oder gar keine [Vanderschot et al., 2002].

Der am meisten eingesetzte Calciumphosphatzement ist jedoch der Norian SRS®, über dessen Anwendung zumeist in klinischen Studien berichtet wurde. *Cohen und Whitman* berichten über eine Studie mit 150 Patienten, die eine distale Radiusfraktur erlitten haben. Hier wurde der Zement in die frakturierte Metaphyse des Radius injiziert und die Mobilisierung des lädierten Armes erfolgte schon nach zwei, anstatt nach erst sechs Wochen bei der Kontrollgruppe, die nach der konventionellen Methode behandelt wurde. Es hatte den Anschein, dass die Patienten aus der Zementgruppe schon in den ersten Monaten der Studie eine größere Beweglichkeit und Funktionalität ihres Handgelenkes erreichten, als die, die konventionell behandelt wurden [Cohen et Whitman, 1997]. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen *Sanchez-Sotelo et al.*, die in einer prospektiven randomisierten Studie mit 110 Patienten mit distaler Radiusfraktur den

Calciumphosphatzement Norian SRS® und die konventionelle Behandlungsmethode gegenüberstellen. Sie stellen fest, dass die Behandlung mit Norian SRS® kürzere Immobilisierung, weniger Schmerzen, ein besseres radiologisches Ergebnis und eine geringere Redislokationsrate bietet und somit der konventionellen Methode überlegen ist [Sanchez-Sotelo et al., 2000]. In einer Einzelfalldarstellung berichten *Csizy et al.* über die Auffüllung einer großen Kalkaneuszyste nach erlittener pathologischer Fraktur mit injizierbarem Calciumphosphatzement von Norian®. Trotz der Lokalisation zeigte sich auch nach zwei Jahren, dass der Zement zwar nicht vollständig resorbiert war, er aber dennoch der hohen biomechanischen Belastung standhielt [Csizy et al., 2001]. Schon zuvor wurden den injizierbaren Calciumphosphatzementen von verschiedenen Autoren eine gute Biokompatibilität und hohe biomechanische Belastbarkeit bescheinigt [Constantz et al., 1995; Elder et al., 2000; Goodman et al., 1998; Yetkinler et al., 1999].

Der neueste und, den biomechanischen Eigenschaften zufolge, der vielversprechendste Calciumphosphatzement ist jedoch der Biocement D [Khairoun et al., 1997b; Khairoun et al., 1997a; Driessens et al., 1998]. Dank seinen, im Vergleich mit den Konkurrenzprodukten, verbesserten biomechanischen Eigenschaften und einer guten Biokompatibilität zeigt er eine vielversprechende Alternative auf.

1.4. Ziel der Arbeit

In den letzten Jahren wurden Calciumphosphatzemente entwickelt, die sehr gute Anwendungsmöglichkeiten in der Unfallchirurgie und Orthopädie als Knochenersatzmaterialien bieten. Sie weisen im Allgemeinen eine sehr gute Biokompatibilität auf und fördern durch Osteokonduktion den Knochenverbund. Einer der größten Vorteile der Calciumphosphatzemente ist die Möglichkeit, sie minimalinvasiv (perkutan) an die gewünschte Stelle zu applizieren. Bisher boten die Calciumphosphatzemente allerdings einen entscheidenden Nachteil. Sie wiesen keine ausreichende biomechanische Stabilität auf, sodass sie an mechanisch belasteten Lokalisationen nicht appliziert werden konnten. In neuerer Zeit wurde ein Calciumphosphatzement (Biocement D, Biomet Merck, Darmstadt) entwickelt, der verbesserte mechanische Eigenschaften im Vergleich zu seinen Vorgängern bieten soll.

Ziel der Arbeit war es, den Biocement D im Tiermodell auf seine Biokompatibilität zu untersuchen. Es soll festgestellt werden, ob der Zement nach einer Implantationszeit von sechs Monaten resorbierbar ist und ob er das gleiche Verhalten sowohl im gesunden wie auch im osteoporotischen Knochen zeigt. Die Untersuchungen wurden in einem osteoporotischen Tiermodell, dem ovariectomierten und glucocorticoidbehandelten Schaf, und an „normalen“ Schafen durchgeführt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Implantatmaterial, Biocement D

Bei dem untersuchten Material (*Abb. 2*) handelt es sich um den injizierbaren Biocement D von der Firma Merck Biomaterial, Darmstadt. Es ist ein Calciumphosphat-Zement mit einer L/P-ratio von 0,3 (*liquid to powder ratio: Verhältnis von flüssigen zu festen Bestandteilen*), einem Calcium-Anteil von 36,15% und einem Phosphat-Anteil von 18,47%. Seine biomechanischen Eigenschaften und grundlegende Gewebeverträglichkeit wurden in Vorversuchen von *Driessens et al.* getestet [Driessens et al., 1998]. Das Material befindet sich vor der Zubereitung in Pulverform und wird unmittelbar vor dem Applizieren mit 2%iger Na_2HPO_4 -Lösung vermischt. Das Na_2HPO_4 wird zur Beschleunigung der intraoperativen Aushärtung benötigt. In Pulverform enthält der Zement die Komponenten alpha-Tricalciumphosphat (α -TCP), Dicalciumphosphat (DCP), Calciumkarbonat (CaCO_3) und Apatit (AP); in ausgehärteter Form jedoch nur DCP, CaCO_3 und AP [Driessens et al., 1998].



Abb. 2: Biocement D-Pulver mit Pufferlösung

Biocement D besitzt bei 20°C an freier Luft eine Aushärtungszeit (t_F 20°C) von ca. 19 Minuten. Die Aushärtung bei Körpertemperatur (t_F 37°C) und in Ringerlösung erfolgt in ca. sieben Minuten, bei Raumtemperatur in 19 Minuten. Die Druckfestigkeit (C) ist mit ca. 83 MPa angegeben und wurde nach einem Tag Verweildauer in Ringer-Lösung bestimmt [Driessens et al., 1998].

2.2. Tiermodell: „osteoporotisches Schaf“

Der Zement wurde im Rahmen eines Tierversuches zur Generierung eines osteoporotischen Tiermodells eingesetzt. Die Genehmigung dieses Tierversuchs durch das Regierungspräsidium Baden-Württemberg erfolgte unter der Nummer 656 am 03.03.1999. Ziel dieser Arbeit war die Validierung eines Modells zur Generierung einer Osteoporose am Großtier.

2.2.1. Versuchs-Design

In die Studie wurden insgesamt 23 adulte weibliche Merinoschafe im Alter von vier bis sieben Jahren und einem durchschnittlichen Gewicht von 88,5 kg (72 kg – 108 kg) einbezogen und auf drei Gruppen aufgeteilt (*Abb. 3*). Es herrschten gleiche Haltungsbedingungen für alle Tiere, wobei die in Deutschland geltenden Bestimmungen für den Einsatz von Tieren in experimentellen Studien eingehalten wurden. Während der gesamten Versuchsdauer wurden die Tiere regelmäßig gesundheitlichen Kontrollen unterzogen.

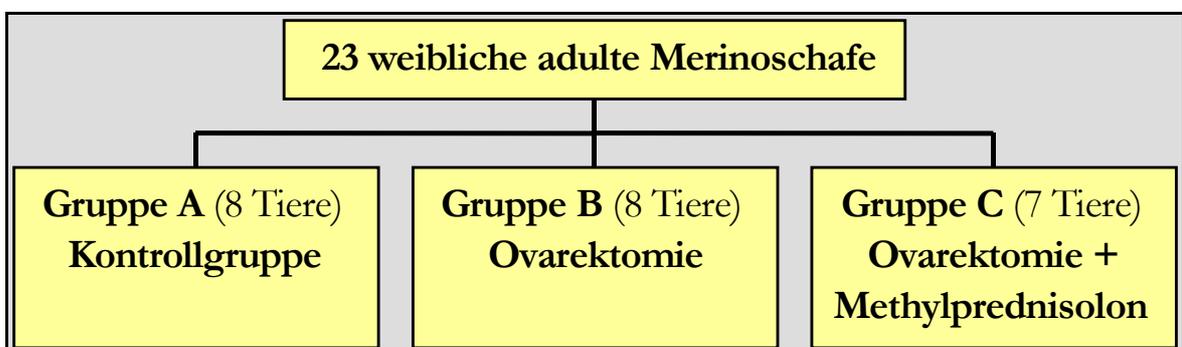


Abb. 3: Aufteilung der Versuchstiere auf die einzelnen Gruppen

2.2.2. Behandlung

In der Gruppe A (Kontrollgruppe) blieben die Tiere zunächst unbehandelt. Bei den Tieren der Gruppen B und C wurde eine Ovariectomie durchgeführt. Bei der Gruppe C wurde anschließend an die Ovariectomie eine Steroidbehandlung durchgeführt. Hierbei wurde den Tieren Methylprednisolon in die seitliche Brustwand subkutan gespritzt. Die Dosierung richtete sich nach dem Gewicht der Schafe und betrug 0,45 mg/kg Körpergewicht (KGW). Die Behandlung mit Methylprednisolon erstreckte sich auf eine Dauer von sechs Monaten, wobei die ersten fünf Monate die eigentliche Behandlung erfolgte und im letzten Monat die Steroide ausgeschlichen wurden [Schorlemmer, 2002; Schorlemmer et al., 2003].

Sechs Monate nach der Ovariectomie wurde bei allen drei Gruppen in der proximalen Tibia eine Knochenbiopsie entnommen, die im Rahmen der Dissertation von *Schorlemmer* mechanisch und computertomographisch untersucht wurde [Schorlemmer, 2002]. Die Biopsiestellen wurden mit Biocement D aufgefüllt, ebenso die am Beckenkamm geschaffenen Defekte. Die Implantationsdauer betrug sechs Monate (*Abb. 4*).

Es folgte die Tötung der Tiere und dann die Aufarbeitung der Knochenpräparate mit Herstellung der histologischen Präparate und Mikroradiographien.



Abb. 4: Zeitlicher Ablauf des Versuchs, Ovariectomie nur bei den Gruppen B und C

2.2.2.1. Ovariectomie

Nach entsprechender Prämedikation der Schafe mit Xylacin (Rompun[®] 2%, Bayer) und Atropinsulfat (Atropinsulfat 0,5 mg Braun Melsungen[®]) subkutan, wurden die Tiere für die Intubationsnarkose vorbereitet. Dazu wurde Thiopental-Natrium (Trapanal[®], Byk Gulden) in einer Dosis von ca. 10-20 mg/kg KGW verabreicht. Die Intubation erfolgte mit Tubus Gr. 9, die Inhalationsnarkose mit Halothan wurde zur Einleitung bei 4%, zur Aufrechterhaltung bei 1-1,2% gehalten. Nach gründlicher Vorbereitung der Operationsstelle in der linken Flanke erfolgte der Schnitt in der Mitte zwischen letzter Rippe und Tuber coxae, ca. eine Handbreite unter den Dornfortsätzen der Wirbelkörper. Als Leitstruktur wurde das Mesometrium (=Ligamentum latum uteri) dargestellt. Vor Absetzen der Ovarien wurden die Gefäße mit Doppelligaturen abgebunden. Etwaige Blutungen beim Präparieren wurden sofort mit dem Couter oder durch Ligaturen gestoppt. Zuletzt erfolgte der schichtweise Verschluss der Bauchhöhle. Das Peritoneum wurde durch fortlaufende Naht genäht, z.T. schon zusammen mit dem M. rectus abdominis, da dieser in vielen Fällen mit dem Peritoneum verwachsen war. Sowohl die Mm. obliquus internus et externus abdominis wie auch die Unterhaut und die Haut wurden durch Einzelknopfhefte verschlossen.

2.2.2.2. Implantation des Zementes

Die Vorbereitung zur OP und die Narkose entsprach der bei der Ovariectomie. Zur Biopsieentnahme und Implantation des Zementes wurden die Schafe in Linksseitenlage gelagert. Es wurden zwei Implantationsorte gewählt, nämlich das Tibiaplateau des rechten Hinterbeins und der rechte Beckenkamm (*Abb. 5*).

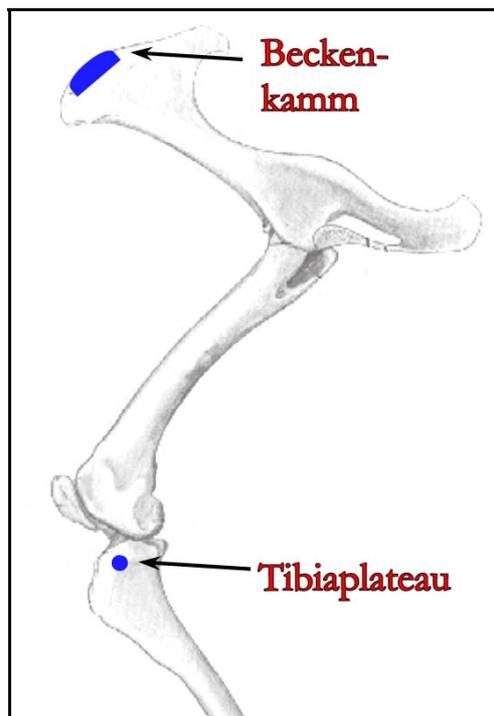


Abb. 5: Schematische Darstellung der Implantatlager am rechten Hinterbein des Schafes, Ansicht von medial

Zunächst erfolgt die Biopsie am rechten **Beckenkamm**. Dazu wurde der gewählte Bereich freipräpariert und das Periost in einem möglichst kleinem Bereich entfernt. Die Kortikalis wurde rechteckig auf 1 x 3 cm aufgemeißelt und aufgeklappt. Mit einem scharfen Löffel erfolgte die Entnahme von Beckenkamm-spongiosa und satte Füllung des Loches mit Biocement D (*Abb. 6*). Dann wurde die Kortikalis zugeklappt und anschließend das Periost dicht verschlossen und schichtweise die einzelnen Gewebeschichten vernäht.



Abb. 6: Operationssitus nach erfolgter Implantation des Knochenzements im Beckenkamm

Zur Biopsieentnahme an der **medialen** Seite der **Tibia** musste das Tier in Rückenlage umgelagert werden. Der Hautschnitt erfolgte direkt unterhalb des Kniegelenkes auf einer Länge von ca. 4-6 cm. Das Periost wurde hier medial an der Epiphyse über einer Länge von ca. 2 cm mit einem Raspatorium vom Knochen gelöst. An der so freipräparierten Bohrstelle wurde zunächst die Kortikalis vorgebohrt (Querschnitt 9 mm, Tiefe 1mm). Mit einem Hohlbohrer wurde nun bis in eine Tiefe von 15 mm gebohrt und anschließend mit einem Extraktionswerkzeug die Knochenprobe entnommen (*Abb. 7*). Der so geschaffene Defekt wurde mit Biocement D gefüllt (*Abb. 8*). Auch hier erfolgte der schichtweise Verschluss der einzelnen Gewebeschichten.

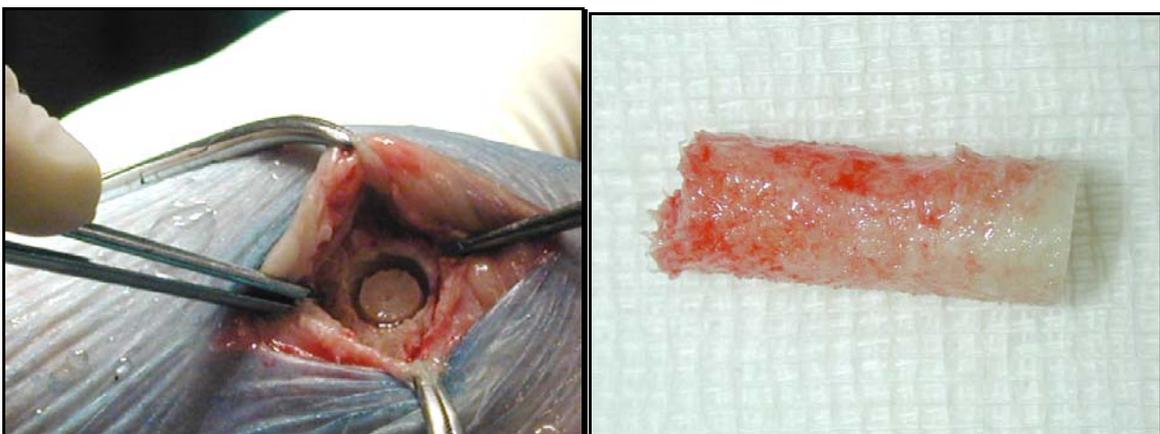


Abb. 7: Mit einem Hohlbohrer vorgebohrte Biopsiestelle (linkes Bild) mit dazugehörigem Biopsat (rechtes Bild)

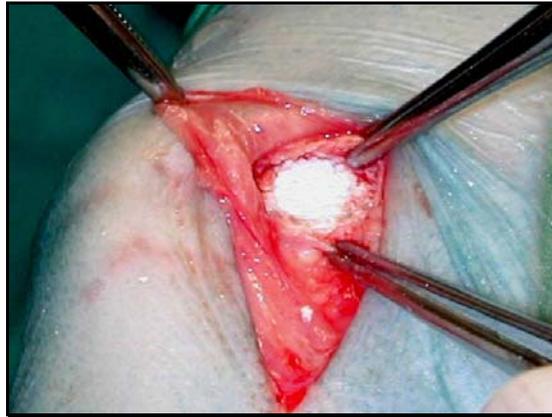


Abb. 8: Operationssitus nach erfolgter Implantation des Knochenzements im Tibiaplateau

2.3. Probenaufbereitung

2.3.1. Histologische Dünnschliffe

Die betreffenden Knochenfragmente wurden aus Tibia und Beckenkamm im unfixiertem Zustand noch am Tag der Tötung der Tiere an der Säge (Hersteller: Exakt/Kulzer) herausgeschnitten. Für dieses Projekt galt das unten dargestellte Schnitt-Schema (*Abb. 9*). Um Gewebe- und Zellstrukturen zu erhalten, wurde der Knochen, solange er unfixiert war, mit einer physiologischen (0,9%) NaCl-Lösung feucht gehalten.

Die Fixation der Proben erfolgt durch eine mit $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \bullet \text{H}_2\text{O}$ (Natrium-Dihydrogen-Phosphat) und Na_2HPO_4 (Di-Natrium-Hydrogen-Phosphat) abgepufferte 4 %ige Formalinlösung. Der pH-Wert wurde hierbei auf 7,0 – 7,4 eingestellt. Die Zeitdauer der Fixation betrug, in Anbetracht der Größe der Präparate, mindestens 48 Stunden. Nach ausreichender Spülung erfolgte im nächsten Schritt die Entwässerung der Präparate. Diese wurde mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (40% - 98%iges Ethanol) und 100%igem Xylol unter Agitation durchgeführt.

Anschließend wurden die Präparate mit Methylmethacrylat (MMC)-Monomer (Polyscience) infiltriert. Bei diesem Material handelt es sich um einen Kunststoff, der mit Hydrochinon stabilisiert ist und mit Hilfe des Reaktionsbeschleunigers Benzoylperoxid

(Merck) unter Sauerstoffausschluss aushärtet. Ein zugesetzter Weichmacher (Nonylphenyl-Polyethylenglykol-Acetat, Fluka) verhindert, dass zu große Spannungsrisse in den Präparaten entstehen. Der gesamte Vorgang der Infiltration und Aushärtung dauerte ca. 8 Wochen, da es sich hierbei um recht große Gewebeblöcke handelte.

Durch planparalleles Aufblocken mit der Vakuumklebepresse wurden die Voraussetzungen für das präzise Sägen und anschließendes Schleifen und Polieren der einzelnen **Dünnschliffe** geschaffen. Zum Sägen wurde der Gewebeblock nach der sog. Sandwich-Methode vorbereitet. Die Dünnschliffe erreichten nach Durchlaufen aller Bearbeitungsschritte eine Dicke von ca. 90-120 μm . Die Tibiapräparate wurden so geschnitten, dass die entstandene Schnittfläche einen Querschnitt der Zementfläche bot (*Abb. 9*). Die Beckenkammpräparate wurden ungefähr in der Mitte des Defektes durchtrennt. Dann wurden in craniale und caudale Richtung jeweils mehrere Schnitte hergestellt (*Abb. 9*).

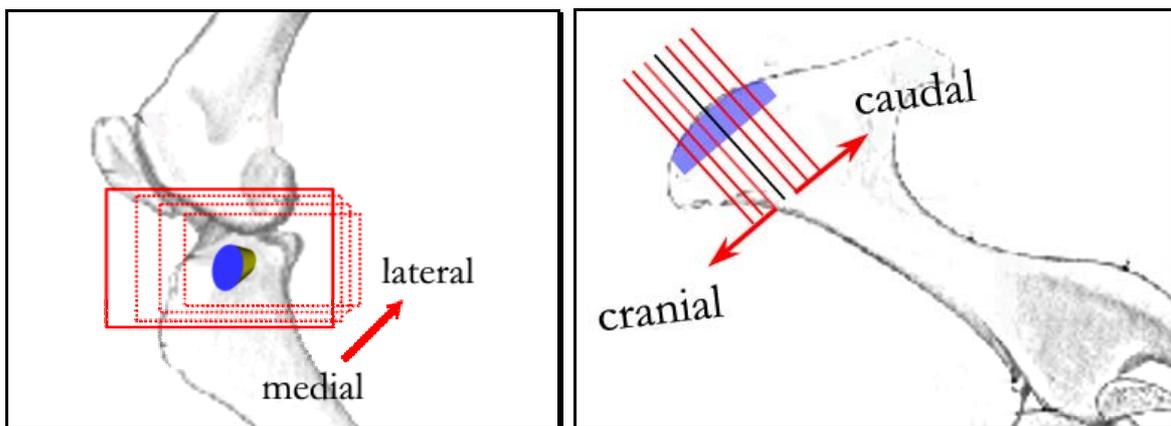


Abb. 9: Schnittschema für Tibiaplateau (linkes Bild) und Beckenkamm (rechtes Bild),
■ = Implantat, → = Schnittführung

2.3.2. Färbungen

Zur Darstellung von zellulären Strukturen wurden Oberflächenfärbungen der Dünnschliffe von Beckenkamm und Tibiaplateau angefertigt.

Giemsa – Färbung

Die meisten Präparate wurden mit Giemsa gefärbt, um Knochenumbauprozesse deutlich darstellen zu können. Außerdem liefert Giemsa sehr guten Farbkontrast zwischen weichem und hartem Bindegewebe, was letztlich wichtig ist, wenn die Neubildung von Osteoid bzw. neuem Knochen erfasst und das Interface zwischen Knochen und Biocement beurteilt werden soll.

Die Dünnschliffe wurden für eine Minute in 0,25 %iger Ameisensäure (Merck, Art. Nr. 1.00264) angeätzt und mit Leitungswasser und Aqua dest. abgespült. Dann wurden sie für 30 Minuten bei 40 °C in die Giemsa-Lösung (Giemsa-Stammlösung: Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung, Merck, Art. Nr. 1.09204) gestellt. Daraufhin wurde nur kurz in 0,1 %iger Essigsäure (Roth, Art. Nr. 3738.1) differenziert und wieder mit Leitungswasser und Aqua dest. gespült. Nun wurde mit 70 % vergälltem Ethanol (Hausapotheke, Fassware) kurz differenziert und anschließend wieder mit Leitungswasser und Aqua dest. gespült. Nach einer mikroskopischen Kontrolle des Ergebnisses wurde das Präparat in Kunstharz (VLC 7200, Methacrylatzubereitung, PSI, Grünwald, Art. Nr. 5100) eingebettet.

Färbeergebnis:

- Zellkerne: dunkelblau
- Osteoid: blassblau
- Mineralisierte Matrix: rosa
- Knorpelmatrix: rot-violett

Paragon – Färbung

Es wurden Dünnschliffe angefärbt und als Vergleich zur Giemsa-Färbung verwendet, mit der die eigentliche histologische Auswertung geschah. Auch hier wurde das Dünnschliffpräparat zunächst mit 0,25 % Ameisensäure (Merck, Art. Nr. 1.00264) eine Minute lang angeätzt, mit Leitungswasser gespült und dann eine Minute in Aqua dest. gestellt. Anschließend wurden die Präparate für 20 Minuten in die auf +40 °C vorgewärmte Färbelösung (Toluidinblau O, Art. Nr. 1B481 und bas. Fuchsin, Art. Nr. 1A308, Fa. Chroma) eingetaucht, unter Leitungswasser kurz abgespült und in 70 % Ethanol (vergällt, Hausapotheke) differenziert. Es wurde dann 2 x 2 Minuten in Aqua dest. gespült, getrocknet, und wiederum nach einer mikroskopischen Kontrolle in Kunstharz (VLC 7200, PSI, Grünwald) eingebettet.

Färbeergebnis:

Bei einem pH = 10 ergeben sich folgende Färbungen der einzelnen Strukturen:

- Osteoid, Weichgewebe: blau
- Mineralisierte Matrix (je nach Mineralisierungsgrad): zartrosa - rotviolett
- Zellstrukturen: blau

2.3.3. Mikroradiographie

Von den Dünnschliffpräparaten des Tibiaplateaus wurden Mikroradiographien angefertigt. Dazu wurde je ein Präparat von jedem Versuchstier aus den drei Gruppen verwendet (hier jeweils die Präparate der 2. Schnittebene; die Schnittebenen „wandern“ von medial nach lateral) (*Abb. 9*).

Voraussetzung für gute Mikroradiographien ist ein Röntgengerät (FAXITRON-X-Ray-Systems, Hewlett-Packard, USA), das eine genügend weiche Strahlung produzieren kann. Um Dünnschliffe mit ca. 100 μm Dicke als scharfe Kontaktaufnahmen abzubilden, wurde feinkörniges Filmmaterial auf Glasobjektträgern verwendet (high resolution plates Typ IA, 5 x 4 inch, 060 thickness ultra, Imtec Products Inc., USA). Die Spannung wurde hierbei auf wenige kV (*Tab. 3*), die Stromstärke auf 3 mA eingestellt. Das Abbildungsverhältnis betrug 1:1.

Die Variation der Spannung ändert je nach Dicke des Präparates den Röntgenkontrast bei konstanter Belichtungszeit von $t = 15$ min (*Tab. 3*).

Tab. 3: Einstellungen am Faxitron, bei $t=15$ min

Dicke des Dünnschliffes [μm]	Spannung [kV]
80	20
100	25
150	27

2.4. Auswertung

2.4.1. Quantitative Analyse des Knochenanteils um den Zement

Bei der quantitativen Auswertung mit Hilfe der Mikroradiographien galt es den **Knochenanteil** um das Implantat herum zu quantifizieren und mit dem **Knochenanteil** einer Vergleichsfläche von gleicher Größe im selben Präparat in Bezug zu setzen.

2.4.1.1. Analyse des Knochenanteils

Die Mikroradiographien wurden an einem Durchleuchtungstisch (White screen, Normlicht) mit einer digitalen schwarz/weiß Kamera (CCD Kamera, KAM 02, Kontron, München) aufgenommen und in einen mit entsprechender Bildverarbeitungssoftware ausgestatteten PC Rechner eingespeist (PC NT-Rechner mit 128 MB RAM, Dual-mode anzeigefähiger Grafikkarte, 17“ Monitor hochauflösend, Syncmaster 700s plus Samsung, 19“ Monitor hochauflösend, Ecomo 21M98 ELSA. Dazu war eine digitale Schnittstelle (Camera Interface, DCI Digital) zwischen Kamera und Rechner notwendig. Bei der Aufnahme war zu beachten, dass die Mikroradiographien nicht die gleiche Helligkeit erreichten, so dass mit der Kamera-Blende und evtl. später am Rechner Kontrast und Schärfe nachgestellt werden mussten, um optimale Voraussetzungen für die weitere Bearbeitung zu erreichen.

Zu Beginn der Berechnungen wurde die Software bei jedem Präparat neu kalibriert. Dies geschah mittels eines Millimetermaßes (hier durchsichtiges Lineal), das bei der Aufnahme der Mikroradiographie darüber gelegt und mit aufgenommen wurde.

Die Software (Analysis, Soft Imaging System SIS) war darauf ausgelegt, in einem vom Benutzer festgelegten Bereich (= **ROI** = region of interest = *hier: ringförmige Fläche um das Implantat herum*) den Anteil der Fläche zu berechnen, die aus Knochen besteht, also den relativen **Knochenanteil** (*Abb. 10*). Dabei konnte die Größe der ROIs relativ zur **Implantatfläche** (=Flow ratio) bestimmt werden und mit einem weiteren – bzgl. seiner Lokalisation, frei wählbaren – aber **kreisförmigen** Bereich im gleichen Präparat

verglichen werden. Die kreisförmige Vergleichsfläche hatte dabei die gleiche Fläche wie die ROI. Die kreisförmige Vergleichsfläche wurde in unmittelbarer Nähe der ROI platziert. Eine „Flow ratio“ = 1,2 bedeutet, dass die **ROI** und die **Implantatfläche** zusammen 120% der Implantatfläche entsprechen. Zur Evaluierung der Auswertungsmethodik wurde die Flow ratio wie folgt für jede einzelne Microradiographie gewählt: 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,7; 1,8; 2,0.

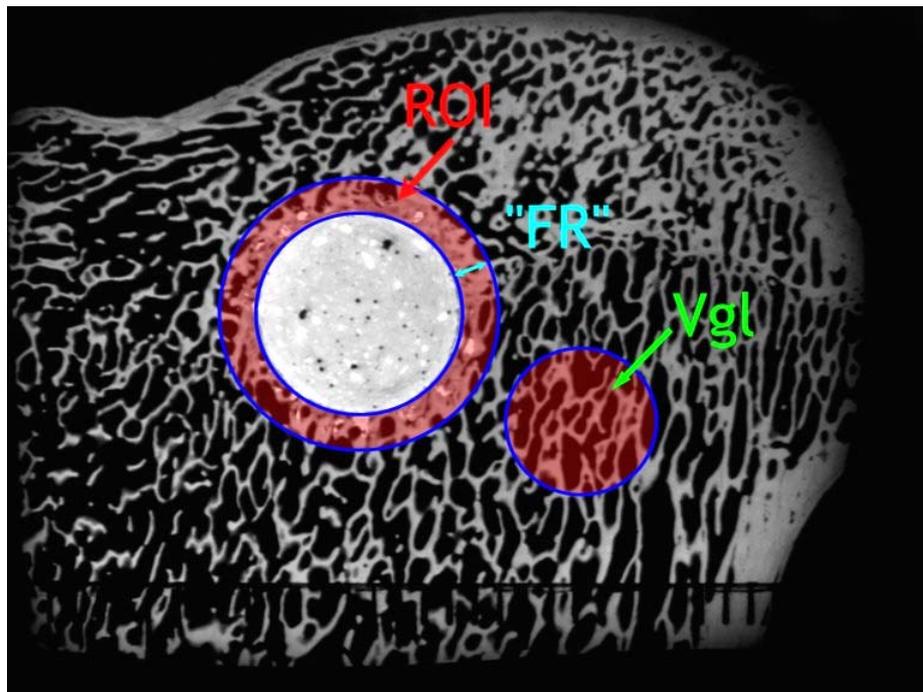


Abb. 10: Schema der Auswertung, ROI = Region of interest, „FR“ = flow ratio; Vgl = Vergleichsfläche

Da Auswerte- und Kontrollfläche sich im gleichen Präparat befinden, entspricht dieses Vorgehen einem „intraindividuellen“ Vergleich zwischen dem Knochen in unmittelbarer Umgebung zum Implantat und einem etwas weiter entfernten Knochenareal. Es wurde darauf geachtet, dass sich die Vergleichsfläche nur in der Spongiosa befand. Das Implantat befand sich in der ausgewerteten Schnitthöhe auch in fast allen Fällen in der Spongiosa und wies im Querschnitt keinen Kontakt zur Kortikalis auf. Bei den Präparaten Nr. 891, 895, 879 und 885 befand sich das Implantat in unmittelbarer Nähe zur Kortikalis. Das Präparat von Tier 867 aus der Kontrollgruppe (A) wurde von der Auswertung ausgeschlossen, da sich in der ausgewerteten Schnitthöhe das Implantat

noch deutlich im subchondralen Knochen befand, somit fehlplatziert war und es keine Möglichkeit bot, die Knochendichte um den Zement zu bestimmen. Somit blieben auch in der Kontrollgruppe Präparate von acht Tieren zur Auswertung.

Als Ergebnis wurde die *Fläche des berechneten Knochens in μm^2* (also die Flächendichte des Knochens) ausgegeben und in Microsoft[®]-Excel[®]-Tabellen übernommen.

2.4.1.2. Statistischer Test

Hierzu wurden die gewonnenen Daten aus den Excel-Tabellen in die Computersoftware JMP (Version 3.2, SAS Institute Inc., Cary NC, U.S.A.) übertragen. Um zu testen, ob ein osteoinduktiver Effekt des Implantats vorliegt, wurden die Knochendichtewerte der Vergleichsflächen (*Vgl*) mit denen der ROIs verglichen. Dazu wurde für jede FR ein Student's t-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt.

2.4.2. Qualitative Analyse der Gewebereaktion

Die qualitative Analyse der histologischen Präparate wurde an der zweiten Schnittebene der Tibiapräparate und an der zweiten Schnittebene der Beckenkammpräparate in cranialer Richtung deskriptiv durchgeführt. Dies geschah am Axiophot-Mikroskop (Zeiss, Jena; *Abb. 11*).



Abb. 11: Axiophot-Mikroskop

Bei den **Tibiapräparaten** wurde nach folgenden Kriterien ausgewertet:

1. Wieviel Osteoid befindet sich in unmittelbarer Umgebung des Zementes?
 - a. vollständig von Osteoid umrandet
 - b. viel
 - c. wenig
 - d. nicht vorhanden

-
-
2. Ist Weichgewebe vorhanden?
 - a. nein
 - b. ja:
 - i. viel
 - ii. wenig
 - iii. gar nicht

 3. Falls ja, welche Art von Weichgewebe ist vorhanden?
 - a. lockeres Bindegewebe
 - b. straff organisiertes Bindegewebe
 - c. Knorpelgewebe
 - d. Kollagenstränge
 - e. wabiges Bindegewebe
 - i. vielzellig
 - ii. wenigzellig

 4. In welchem Maße sind die Implantate von Knochen umschlossen?
 - a. vollständig
 - b. fast vollständig
 - c. teilweise

 5. In welchem Maße wächst der Knochen in den Zement ein?
 - a. vollständig
 - b. fast vollständig
 - c. teilweise
 - d. wenig
 - e. gar nicht

-
-
6. Wie stellt sich die Vitalität des Knochens dar?
- a. Osteozyten angefärbt
 - b. schwach angefärbt
 - c. nicht angefärbt
 - d. leere Lakunen
 - e. Knochenzuwachs
 - f. Knochenabbau → osteoklastäre Aktivität
7. Welche Entzündungsmerkmale sind vorhanden?
- a. keine
 - b. Makrophagen
 - c. Fremdkörperriesenzellen
 - i. mit oder
 - ii. ohne Einschlüssen
 - d. Plasmazellen
 - e. Granulozyten
8. Wie stellen sich die Implantatränder dar?
- a. scharf begrenzt
 - i. ja
 - ii. nein
 - b. Zementpartikel vorhanden
 - i. ja
 - 1. wenige
 - 2. viele
 - ii. keine

Bei der Beschreibung der **Beckenkammpräparate** wurde lediglich darauf eingegangen, in wiefern sich die Gewebereaktion auf den Zement von der Gewebereaktion in den Tibiapräparaten unterscheidet.

3. E R G E B N I S S E

3.1. Quantitative Analyse des Knochenanteils

Bei der Bestimmung des absoluten Knochenanteils, wie unter 2.4.1.1. beschrieben, wurden verschiedene Flächengrößen (Flow ratios, *FR*) um das Implantat herum ausgewertet. *Abb. 12, 14 und 16* geben einen Überblick über die Ergebnisse der Auswertung bei allen verwendeten *FRs* als Mittelwerte (*MW*) der Knochenfläche der einzelnen Gruppen mit Standardabweichungen (*STA*). Auf der Abszisse ist die *FR* und auf der Ordinate der Knochenanteil, der sich im Auswertungsbereich befand, aufgetragen. Es sind jeweils die Wertepaare aus *ROI* und *Vgl* dargestellt (*Abb. 12, 14, 16*). Wie zu erwarten war, nahm mit zunehmender Größe der Auswertungsbereiche (*FR*) auch die Knochenfläche in den Auswertebereichen zu. Ein signifikanter Unterschied der mittleren Knochendichte konnte an den mit (*) gekennzeichneten Daten festgestellt werden. Dabei wurden die behandelten Gruppen B und C jeweils mit der Kontrollgruppe A verglichen. Bei **prozentualer Darstellung** des Knochenflächenanteils in Bezug auf die Gesamtauswertefläche ergab sich bei der *ROI* mit zunehmender Größe der Auswertebereiche (*FR*) eine **Abnahme des gemessenen Knochenflächenanteils** an der Gesamtauswertefläche, während der Anteil in der Vergleichsfläche (*Vgl*) in etwa gleich blieb (*Abb. 13, 15, 17*).

Bei **klein gewählten *FRs*** stellt sich prozentual gesehen **viel Knochen** in der *ROI* dar, bei **groß gewähltem Auswertebereich** hingegen ein weitaus **geringerer** Prozentsatz. Dies bedeutet, dass der Knochen um den Zement besonders in unmittelbarer Nähe zum Zement am dichtesten war. Dieses Ergebnis deutet auf eine osteokonduktive Eigenschaft des Zements hin. In allen Präparaten war die Knochenfläche der *ROI* in jedem Fall signifikant höher als in der *Vgl*, wobei festzustellen war, dass die Differenz aus *ROI* und *Vgl* mit zunehmender Größe des Auswertebereichs abnahm (*Abb. 18*).

Bei direktem Vergleich der Gruppen wurde deutlich, dass **unterschiedliche Knochendichten** vorliegen. So war die höchste Knochendichte in der unbehandelten Kontrollgruppe A vorhanden. Die Gruppen B (Ovarektomie) und C (Ovarektomie +

Steroide) hatten eine geringere Knochendichte, wobei C die schlechteste Knochenstruktur aufwies.

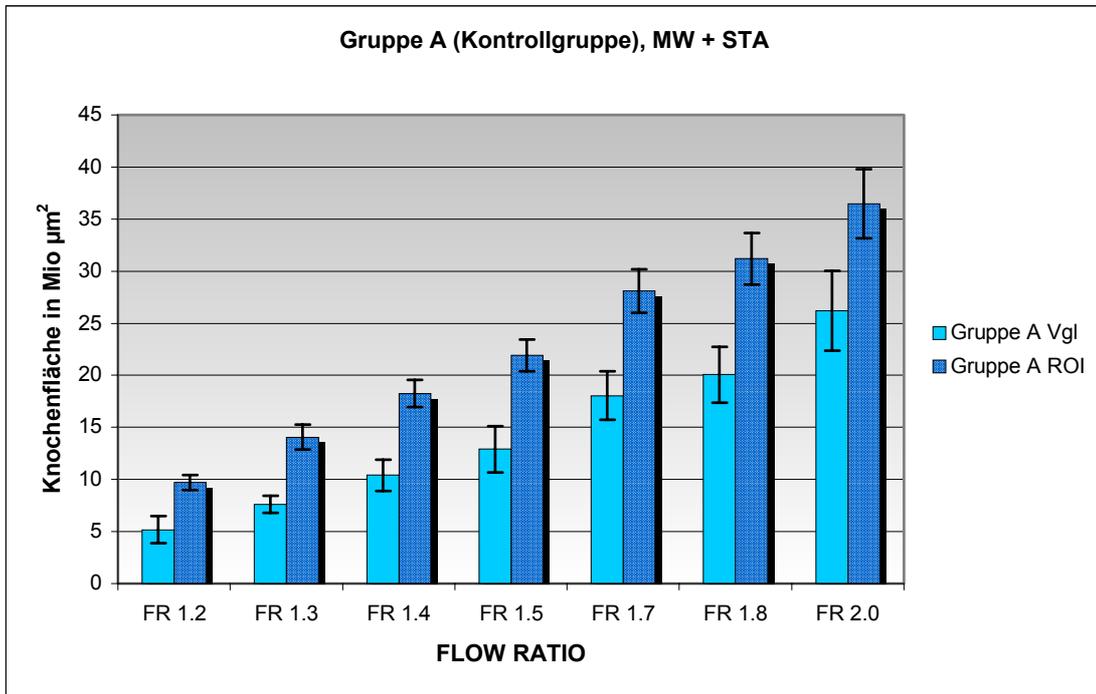


Abb. 12: Gruppe A: Darstellung der arithmetischen Mittelwerte mit *STA* über alle ausgewerteten Flow ratios

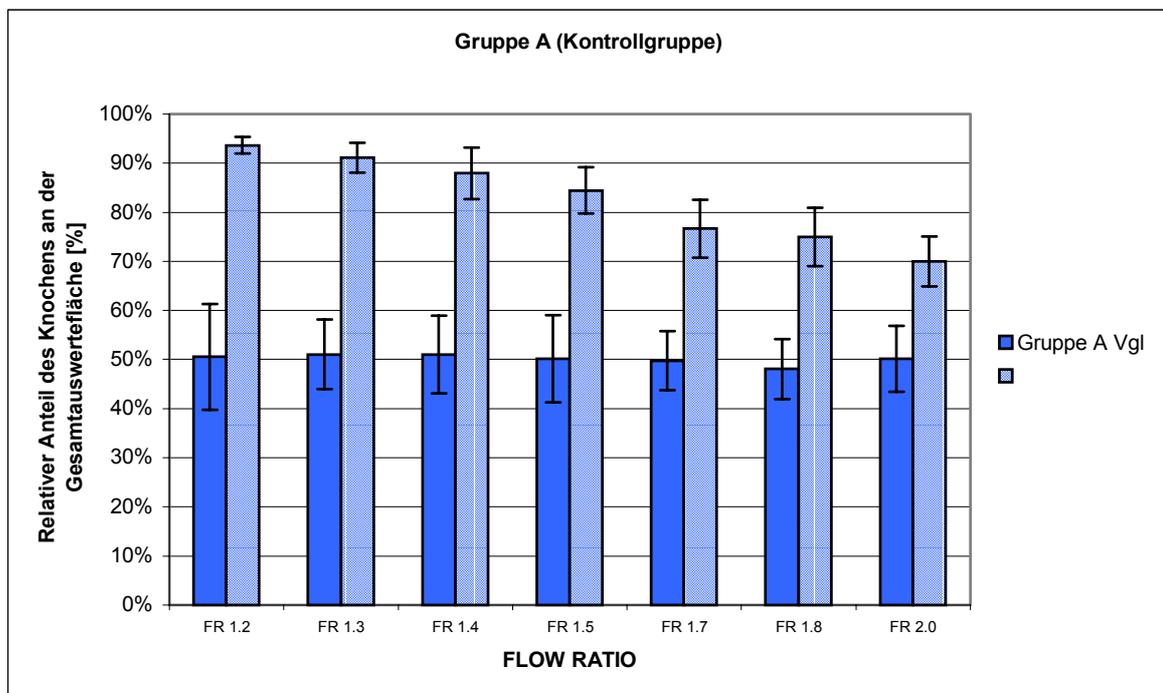


Abb. 13: Gruppe B: Anteil der Knochenfläche an der Gesamtauswertefläche in der ROI um das Implantat und in der Vergleichsfläche (*Vgl*).

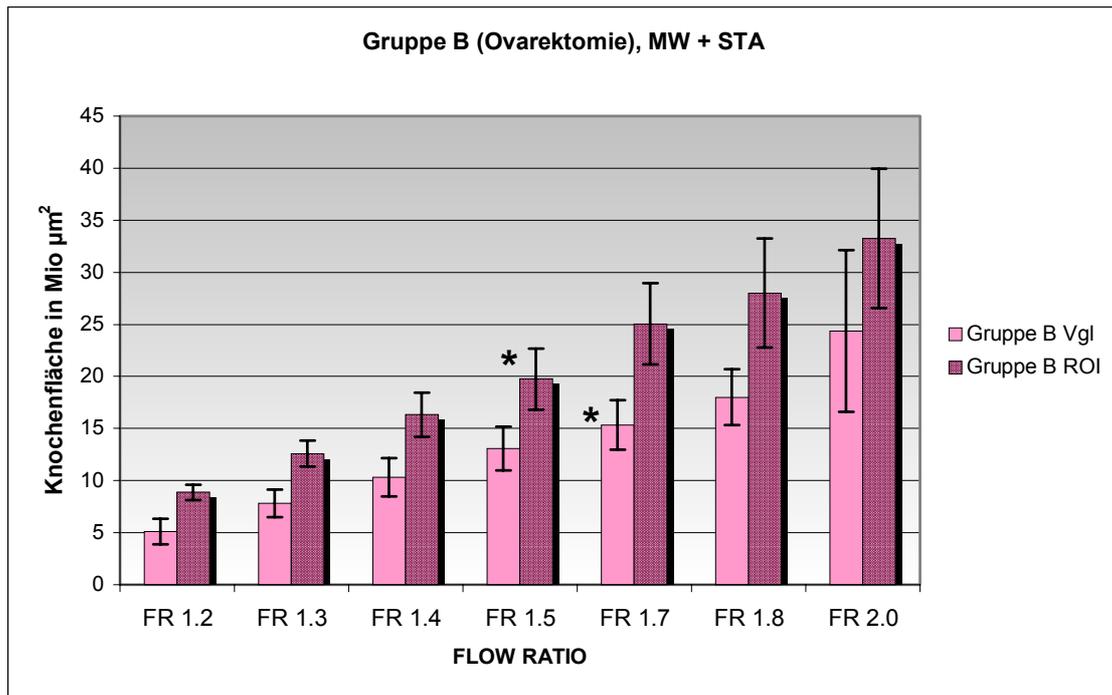


Abb. 14: Gruppe B: Darstellung der arithmetischen Mittelwerte mit *STA* über alle ausgewerteten Flow ratios
 (*= Unterschied zur Kontrollgruppe A, $p < 0,05$)

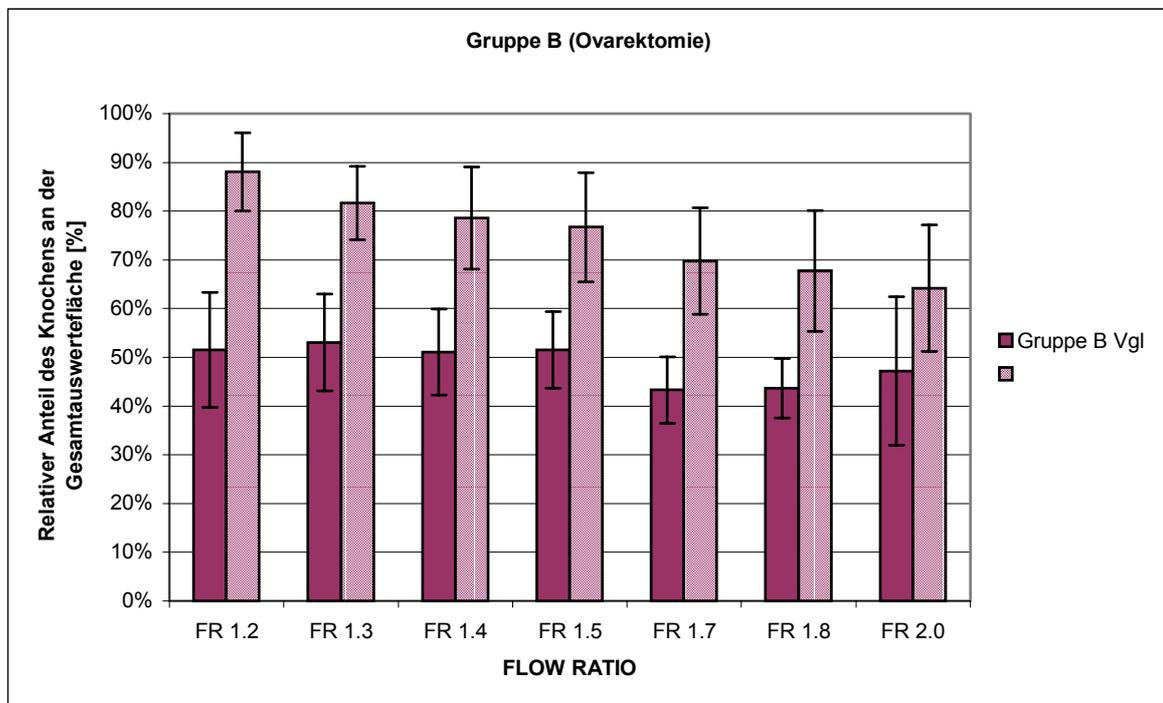


Abb. 15: Gruppe B: Anteil der Knochenfläche an der Gesamtauswertefläche in der ROI um das Implantat und in der Vergleichsfläche (*Vgl*).

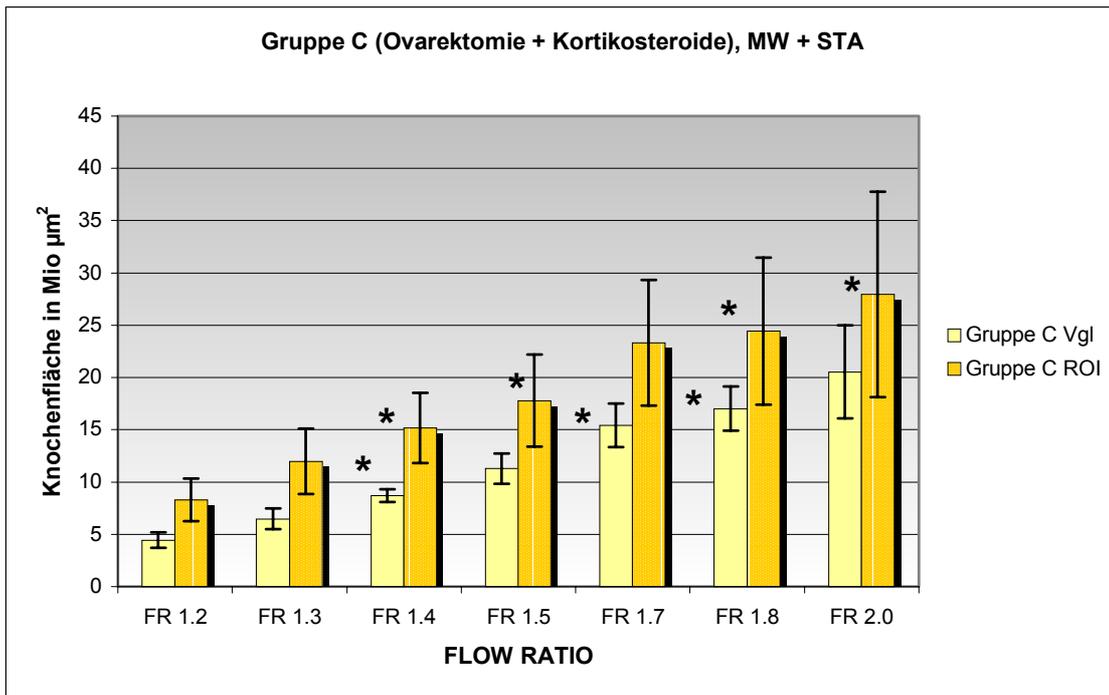


Abb. 16: Gruppe C: Darstellung der arithmetischen Mittelwerte mit *STA* über alle ausgewerteten Flow ratios (*= Unterschied zur Kontrollgruppe A, $p < 0,05$)

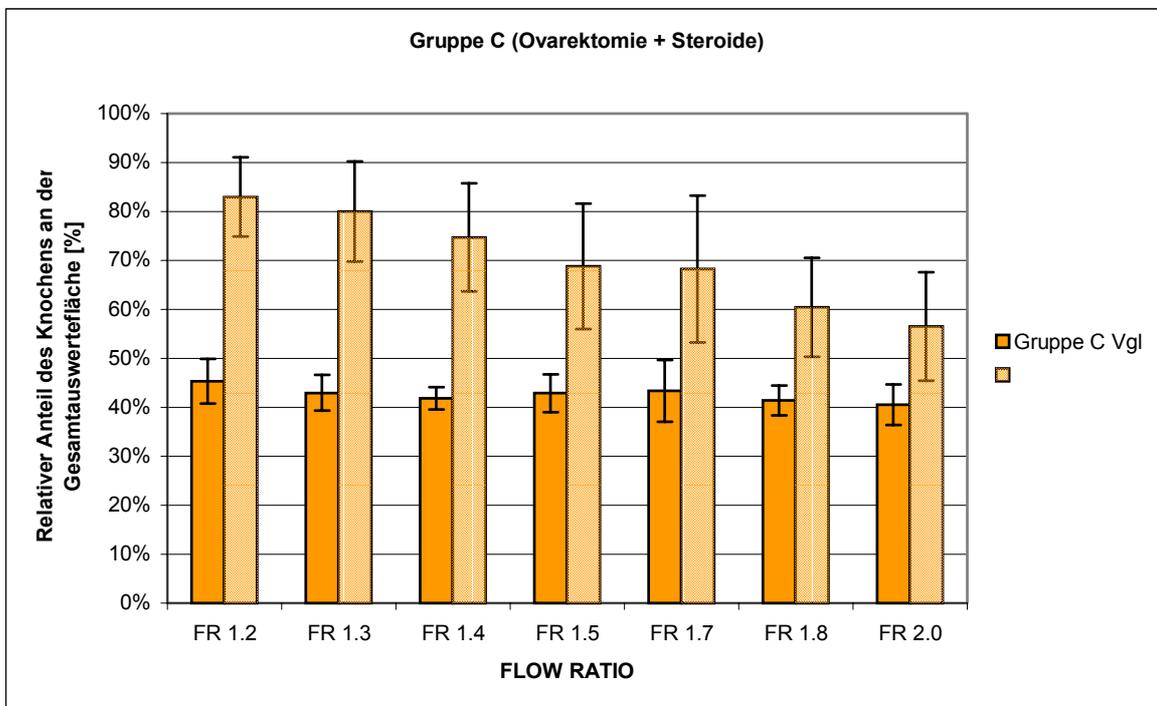


Abb. 17: Gruppe C: Anteil der Knochenfläche an der Gesamtauswertefläche in der ROI um das Implantat und in der Vergleichsfläche (*Vgl*).

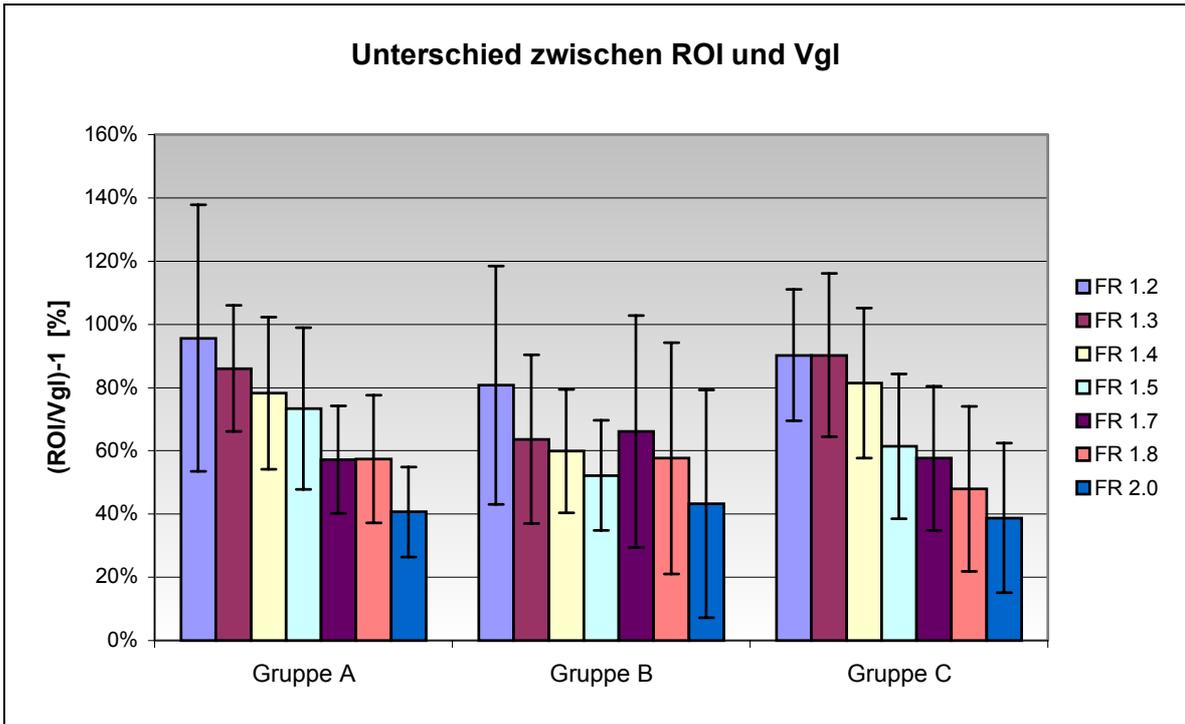


Abb. 18: Prozentuale Darstellung, um wie viel Prozentpunkte die Knochenfläche der ROI höher ist als die der *Vgl*. Gegliedert nach Gruppen und FR. (Gruppe A: Kontrollgruppe, Gruppe B: Ovariectomie, Gruppe C: Ovariectomie + Steroide); In jedem Fall war die Knochenfläche der ROI signifikant höher als die der *Vgl*.

3.2. Qualitative Auswertung (histologisch)

Anhand der unter 2.4.2. festgelegten Kriterien wurden zu jedem Tier jeweils ein Tibia- und ein Beckenkammpräparat ausgewertet.

3.2.1. Gruppe A

Bei allen Präparaten der Kontrollgruppe (Gruppe A) war festzustellen, dass die Implantate vollständig von Knochengewebe (Lamellen- bzw. Faserknochen) umgeben waren (*Abb. 19*). In unmittelbarer Umgebung befand sich sehr wenig Osteoid. Neu gebildeter Knochen war schwer auszumachen, da er bereits sehr gut mineralisiert war und sich somit dem älteren Knochengewebe sehr ähnlich angefärbt hatte.

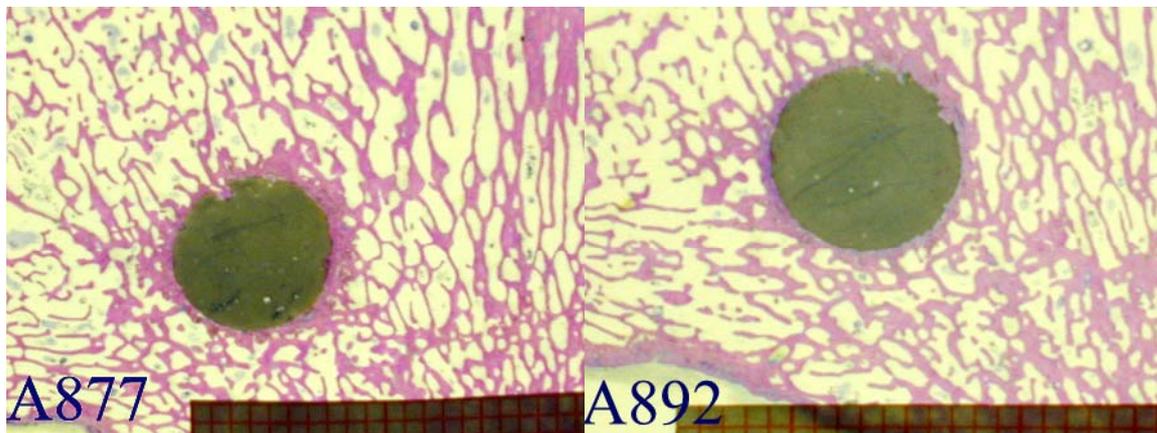


Abb. 19: Beispielhaft für die Gruppe A: vollständig umwachsene Implantate
Quadrat entspricht 1x1 mm

Die Knochen-Zement-Grenze war bei zwei von acht Präparaten sehr scharf begrenzt. Bei vier Präparaten lagen einzelne Zementpartikel in unmittelbarer Umgebung zum Implantat. Bei einem Präparat (A890) waren viele vereinzelt Partikel vorhanden. Diese waren jedoch immer komplett von Knochengewebe umschlossen. Im gesamten Präparat A890 war außerdem deutlich viel neuer Knochen vorhanden, der an die bestehenden Lamellen angebaut wurde. Bei Präparat A882 (*Abb. 20*) zeigt sich in etwa der Mitte des Implantats eine im Durchmesser ca. 2 mm messende Luftblase, die nicht von knöchernem Gewebe ausgekleidet wurde.

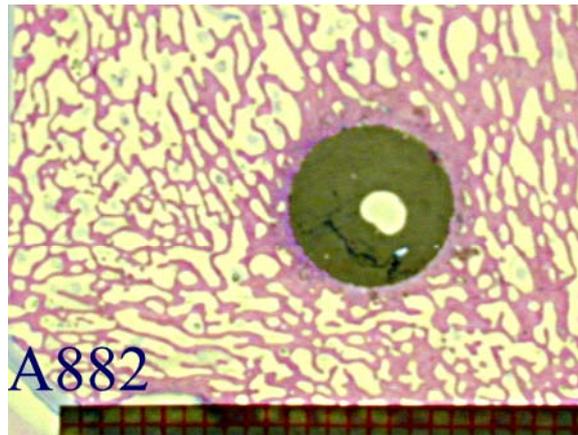


Abb. 20: Beim Einbringen des Zements in den Knochen entstandene Luftblase
 Luftblase
 Quadrat entspricht 1x1 mm

Es war in keinem Präparat weiches Bindegewebe vorhanden. Ein Vorwachsen des Knochens in die Implantate war so gut wie nicht vorhanden (Abb. 21, 22). Der Knochen stellte sich vital dar, die Osteozyten waren gut angefärbt. In den Paragonfärbungen konnten bei hoher Vergrößerung angefärbte Canaliculi dargestellt werden (Abb. 23). Es waren nebeneinander Knochenauf- und Abbauprozesse festzustellen, wobei der Knochenaufbau überwog. Resorptionslakunen waren nur selten sichtbar, zumal sich auch die meisten in entfernteren Bereichen und nicht in unmittelbarer Nähe zum Implantat befanden (Abb. 22, 24).

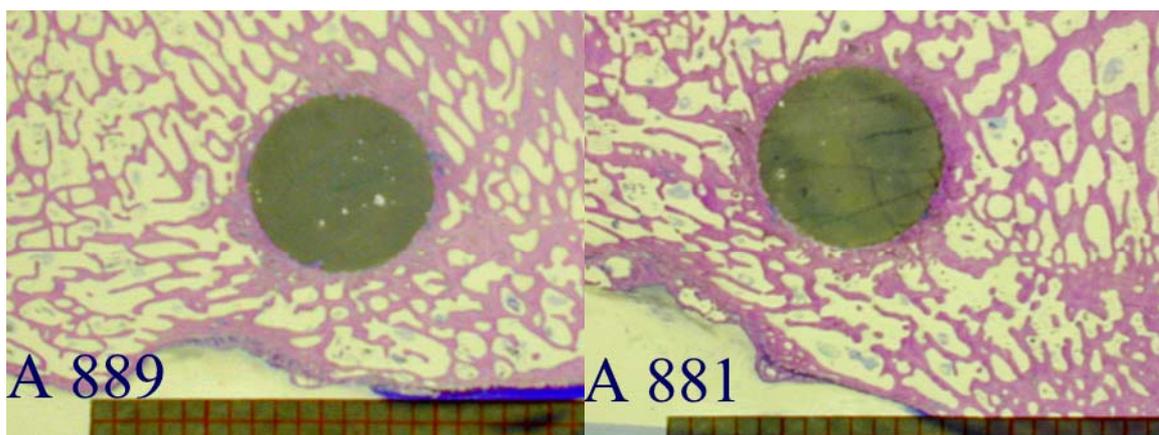


Abb. 21: Beispielhaft für die Gruppe A: in der Übersichtsaufnahme ist kein Einwachsen des Knochens sichtbar.
 Quadrat entspricht 1x1 mm

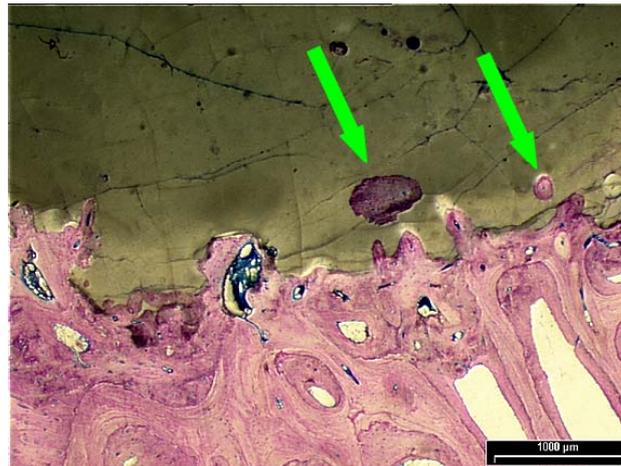


Abb. 22: A886: Direkte Anlagerung von Knochen an die Zementoberfläche mit geringem Einwachsen des Knochens in den Zement (Pfeile) und geringer Degradation des Zements. Originalvergrößerung 1,25x, Balken entspricht 1000 µm

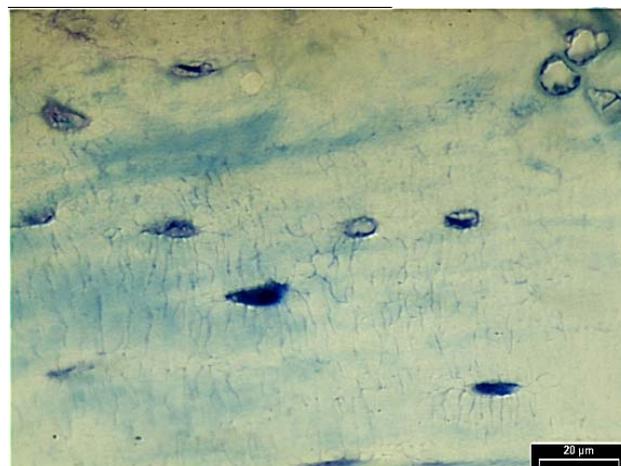


Abb. 23: A877: Paragon-Färbung mit Darstellung der Vitalität des Knochens: gut angefärbte Zellen mit deutlich sichtbaren Zellkernen und interkonnektierenden Canaliculi. Originalvergrößerung 40x, Balken entspricht 20 µm

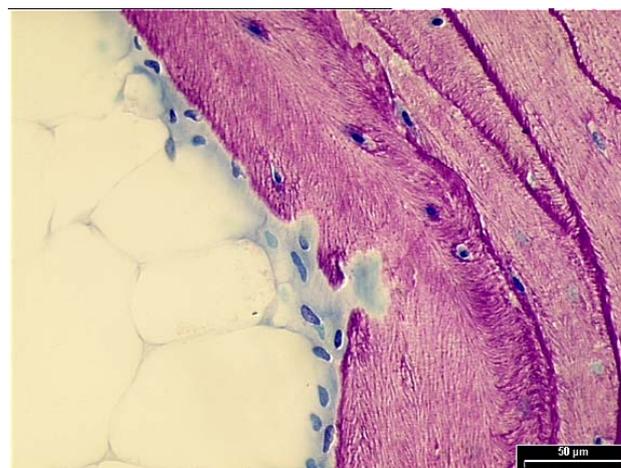


Abb. 24: A886: Resorptionslakunen in einem etwas entfernten Bereich mit angrenzendem Fettgewebe des Knochenmarks (deutlich sichtbare Schichten der Knochenlamelle). Originalvergrößerung 20x, Balken entspricht 50 µm

Es waren in keinem der Präparate Zeichen einer Entzündung oder Fremdkörperreaktion auszumachen. Es waren keine Gebiete mit fibröser Umbauung des Implantats zu sehen (beispielhaft: *Abb. 25, 26*).

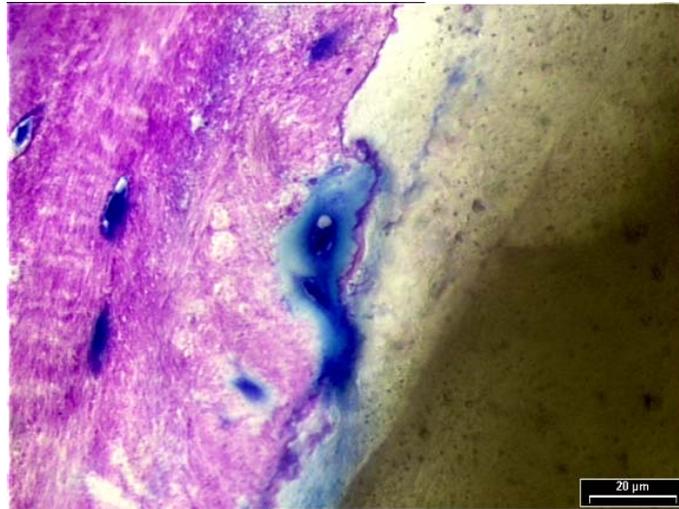


Abb. 25: A877: Sich in Osteoid einmauernde Zelle(n), scharfe Knochen-Zement-Grenze. Der Knochen scheint aufgrund seiner noch faserigen Struktur noch nicht vollständig mineralisiert zu sein. *Originalvergrößerung 40x, Balken entspricht 20 µm*

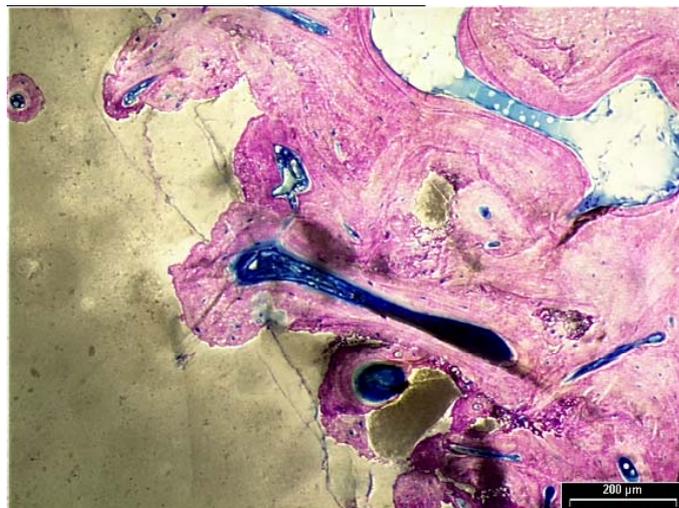


Abb. 26: A886: In den Zement vorwachsende knöcherne Strukturen mit „abgebröckelten“ und ummauerten Zementpartikeln, keine Fremdkörperreaktionen zu sehen *Originalvergrößerung 5x, Balken entspricht 200 µm*

Bezüglich der Beckenkammpräparate ist zu sagen, dass es in der Kontrollgruppe keinen Unterschied in der Gewebereaktion zu den Tibiapräparaten gab. Es wurden keine Fremdkörperreaktionen beobachtet, der Zement wurde nicht fibrös umbaut. Zelluläre Resorptionslakunen waren nur vereinzelt sichtbar.

3.2.2. Gruppe B (Ovarektomie)

In der Gruppe B waren alle Implantate ebenfalls vollständig von knöchernem Gewebe umschlossen. Allerdings war schon makroskopisch eine geringere Menge an Knochen im Vergleich zur Gruppe A erkennbar. Es war auch hier wenig Osteoid vorhanden. Der neu gebildete Knochen war schwer auszumachen, da sich fast kein Unterschied zum älteren Knochen erkennen ließ. In allen Präparaten war die Knochen-Zement-Grenze scharf begrenzt (*beispielhaft Abb. 27*), wobei es bei sechs Präparaten wenige, bei zwei Präparaten viele Zementpartikel gab. In drei Präparaten (B 883, B 891, B 895) befand sich das Implantat in direktem Kontakt zur Kortikalis. Im Implantat von B 868 war eine große Luftblase in der Mitte des Präparates sichtbar. Bei Präparat B 871 war im benachbarten Gebiet zum Implantat viel Osteoid vorhanden, nicht jedoch um das Implantat selbst. Das Osteoid war den Knochenbälkchen angelagert. Auch hier waren im Implantat mehrere kleine Luftblasen vorhanden.

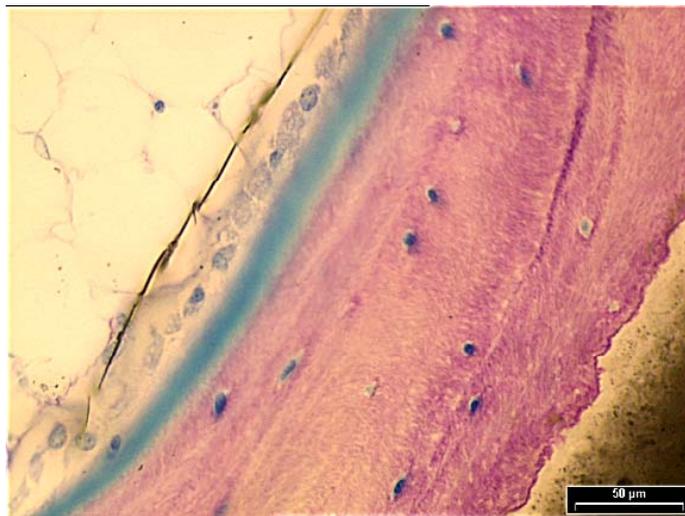


Abb. 27: B878: Scharfe Knochen-Zement-Grenze (rechts), noch unvollständig mineralisierter Knochen (mitte), Osteoidsaum (blau) mit angrenzendem Markraum (Fettvakuolen) *Originalvergrößerung 20x, Balken entspricht 50 µm*

Auch in den Präparaten der Gruppe B war kein Weichgewebe vorhanden. In fünf Präparaten schien der Knochen gar nicht, in den anderen drei sehr wenig in das Implantat vorzuwachsen (*Abb. 28*). Die Vitalität des Knochens schien hier sehr gut zu sein, die Osteozyten waren stark angefärbt (*Abb. 29*). Auch hier waren Knochenauf- und

Knochenabbauprozesse nebeneinander sichtbar, wobei osteoklastäre Resorptionslakunen am Implantat nur vereinzelt feststellbar waren (*Abb. 30*). In der Gruppe B konnten keine Entzündungsmerkmale ausgemacht werden.



Abb. 28: B895: Vereinzelt in den Zement vorwachsende Strukturen (Pfeile), die an ihrem Rand bereits gut mineralisiert sind. *Originalvergrößerung 2,5x, Balken entspricht 500 µm*

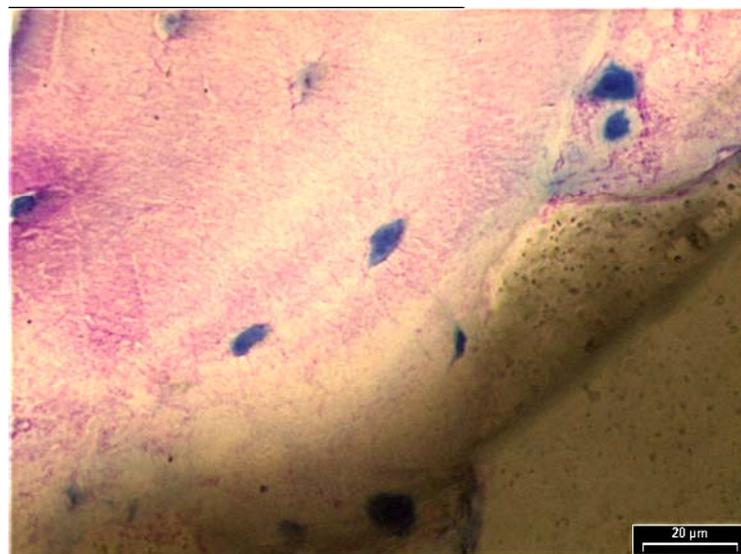


Abb. 29: B878: Gut angefärbte Osteozyten mit deutlich sichtbaren Zellkernen. Der Knochen ist bereits gut mineralisiert. *Originalvergrößerung 40x, Balken entspricht 20 µm*

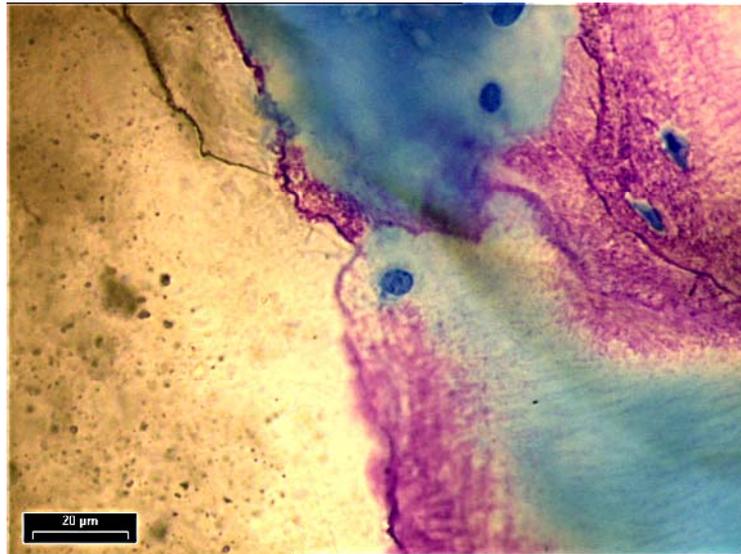


Abb. 30: B883: Osteoklastäre Zelle am Interface mit angedeuteter Resorptionslakune, daneben unvollständig mineralisierter Knochen. *Originalvergrößerung 40x, Balken entspricht 20 µm*

Auch in Gruppe B waren keine Anzeichen einer evtl. Fremdkörperreaktion oder Entzündung sichtbar. Vereinzelt waren vor allem bei den im Beckenkamm platzierten Implantaten zelluläre Abbaumechanismen zu beobachten (*Abb. 31*). Ein Unterschied zu den Tibiaimplantaten konnte nicht ausgemacht werden.

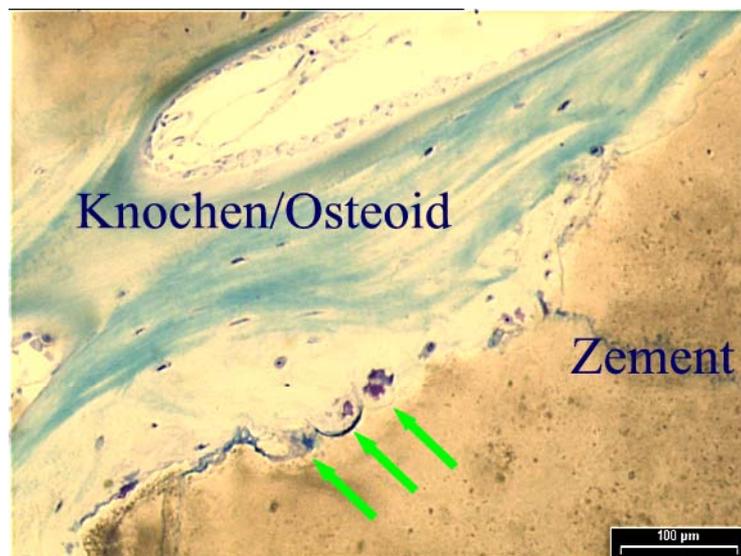


Abb. 31: B883: Paragon-Färbung am Präparat des Beckenkamms. Sichtbar sind zelluläre „Abbaulakunen“ am Zementrand. *Originalvergrößerung 10x, Balken entspricht 100 µm*

3.2.3. Gruppe C (Ovarektomie + Steroidtherapie)

Bei sechs der acht Präparate war das Implantat vollständig von Knochen umgeben. Bei zwei der Präparate (*Abb. 32*) war nur an wenigen Stellen kein knöchernes Gewebe im Anschluss an das Implantat zu sehen, sonst waren diese auch größtenteils von Knochen umgeben. Alle Präparate wiesen nur eine sehr geringe Menge an Osteoid auf (z.B bei Präparat C 884, *Abb. 33*).



Abb. 32: C894: Freie Stelle des Zements, an die kein Knochen angewachsen ist (Pfeil); Zement mit deutlich sichtbaren Luftblasen. Originalvergrößerung 1,25x, Balken entspricht 1000 µm



Abb. 33: C884: Deutlich sichtbare Strukturschwäche des Knochens, Osteoid ist nur Ansatzweise sichtbar. Originalvergrößerung 1,25x, Balken entspricht 1000 µm

Anderes Weichgewebe war nur zu einem sehr geringen Anteil in Präparat C 896 zu sehen. Dieses wies eine wabige Struktur auf. Bei den Präparaten C 885 und C 888 war eine deutliche Tendenz zum Einwachsen des Knochens in das Implantat zu sehen (*Abb.*

34, 35). Bei den übrigen Präparaten war diese Tendenz nicht erkennbar. Die Vitalität des vorhandenen Knochens war angesichts der guten Anfärbung der Osteozyten nicht zu beanstanden.



Abb. 34: C885: In den Zement vorgewachsene Gefätsstruktur (grüner Pfeil). Unten: in den Zement vorgewachsene knöcherne Struktur (schwarzer Pfeil). Originalvergrößerung 10x, Balken entspricht 100 µm

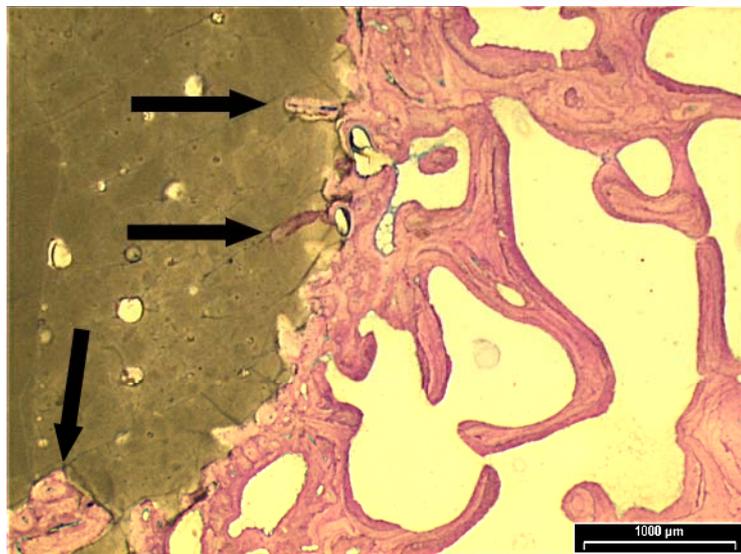


Abb. 35: C888: Deutlich vorgewachsene, bereits mineralisierte knöcherne Strukturen (Pfeile). Originalvergrößerung 1,25x, Balken entspricht 1000 µm

Das Implantat in den Präparaten C 879 und C 885 befand sich zu etwa einem Achtel des Umfangs in direktem Kontakt zur Kortikalis (*Abb. 36*). In fünf der acht Präparate waren auffällig viele Luftblasen enthalten.

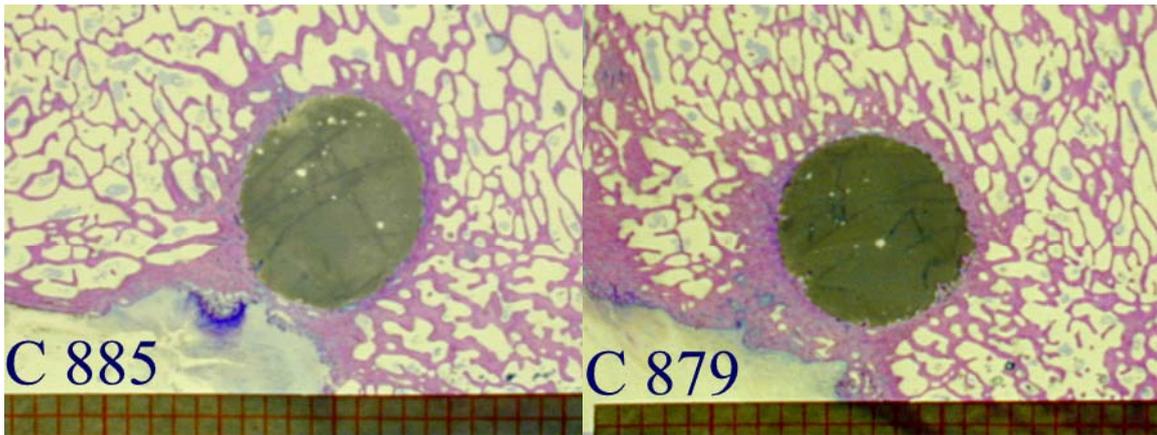


Abb. 36: Die Implantate stehen hier im direktem Kontakt zur Kortikalis.
Quadrat entspricht 1x1 mm

Präparat C 869 fiel wegen der extrem schlechten Knochenstruktur auf, die sich auch makroskopisch im Vergleich mit den anderen Präparaten dieser Gruppe erkennen ließ (*Abb. 37*). Da dieses Tier vorzeitig wegen Komplikationen (Schmerzen, mangelnde Bewegung) getötet werden musste, wurde es aus der Wertung genommen. Präparat C 894 enthielt unmittelbar an das Implantat grenzend eine Leerbohrung. Hier war zu erkennen, dass auch hier kein Knochen eingewachsen war. Ferner war hier vergleichsweise viel Osteoid vorhanden, jedoch nicht unmittelbar um den Zement herum (*Abb. 38, 39*). Knochenaufbau und -abbau in der Nähe des Zementes war gleichzeitig zu beobachten (*Abb. 40*).

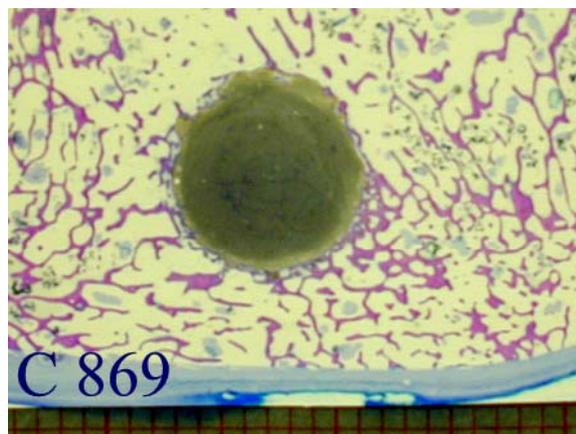


Abb. 37: Dieses Präparat weist eine extrem schwache Knochenstruktur auf.
Quadrat entspricht 1x1 mm

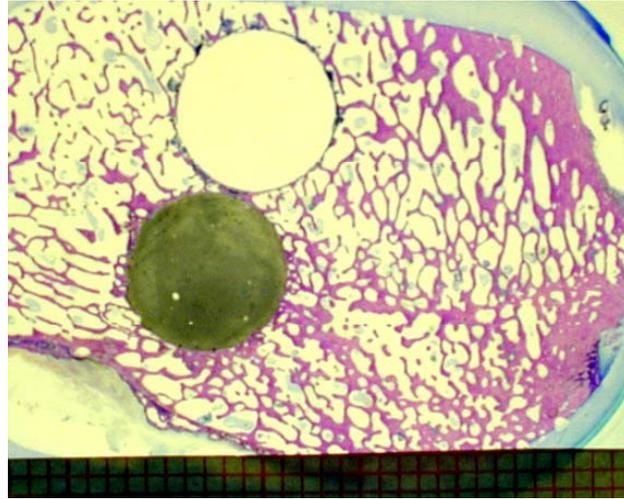


Abb. 38: C894: Man beachte die Leerbohrung, die keine Tendenz zeigte, von neuem Knochen aufgefüllt zu werden. Übersichtsaufnahme, Quadrat entspricht 1x1mm

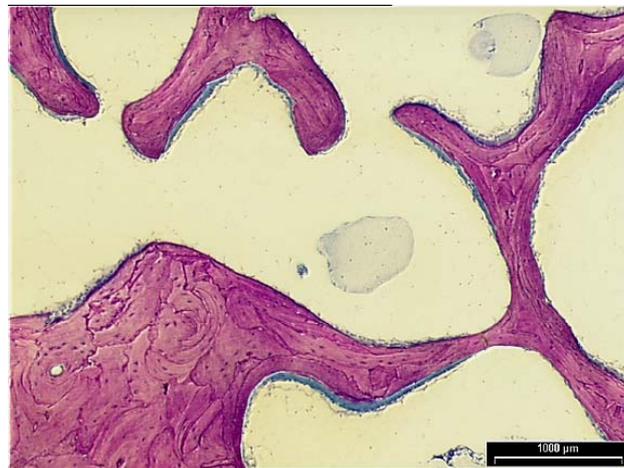


Abb. 39: C894: Osteoidsäume an Knochenlamellen; Knochenauf- und Knochenabbau gleichzeitig zu sehen. Originalvergrößerung 1,25x, Balken entspricht 1000 µm

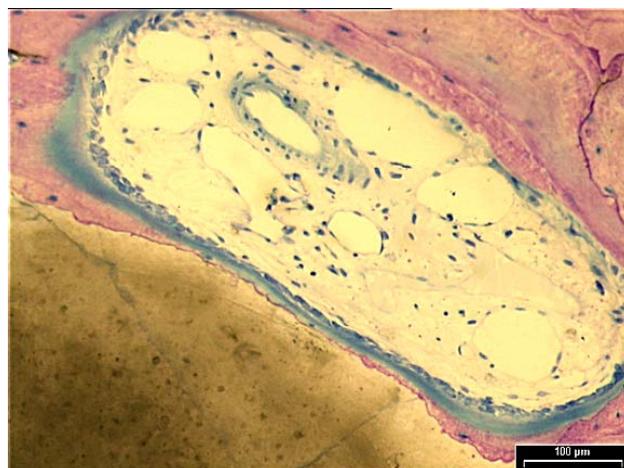


Abb. 40: C885: Gefäßführendes Gebilde mit osteoidproduzierenden Zellen am Rand zum Zement und Resorptionslakunen auf der entgegengesetzten Seite. Originalvergrößerung 10x, Balken entspricht 100 µm

Bei dieser Gruppe gab es, wie auch bei den anderen beiden, keine Anzeichen einer Entzündung oder einer Fremdkörperreaktion. In allen Tibiapräparaten waren nur sehr wenige Zementpartikel vorhanden, die sich vom Implantat gelöst hatten. Auch hier waren aber alle Partikel von Knochen umgeben. Ein ähnliches Bild ergibt sich bei den Beckenkammpräparaten (*Abb. 41*). Ein unterschiedliche Gewebereaktion zwischen den Implantaten in der Tibia und des Beckenkamms konnte auch bei der osteopenischen Tiergruppe nicht festgestellt werden.

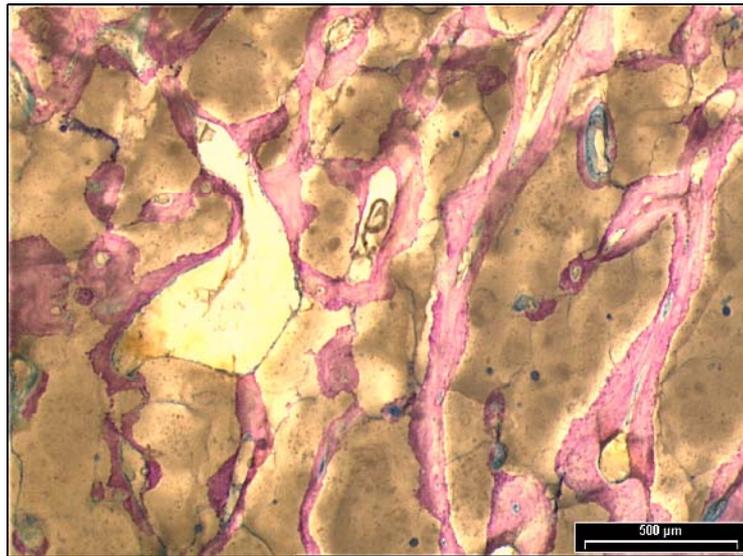


Abb. 41: C 869: Beckenkammpräparat bei geringer Vergrößerung; alle Zementbrocken sind von Knochen ummauert. *Originalvergrößerung 2,5x, Balken entspricht 500 µm*

Insgesamt ist kein eindeutiger Unterschied der Gewebereaktion in den einzelnen Gruppen sichtbar. Somit lassen weder die Resorption (bzw. der Resorptionsmechanismus) noch die Biokompatibilität Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen erkennen.

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer Calciumphosphatzement, der Biocement D (Fa. Biomet Merck) hinsichtlich seiner Biokompatibilität und Resorptionsfähigkeit in vivo über einen Zeitraum von sechs Monaten untersucht. Der zu untersuchende Zement wurde im Rahmen einer Studie zur Erzeugung eines osteoporotischen Großtiermodells in unbehandelten Schafe implantiert und in Schafe, die zur Erzeugung einer Osteopenie ovariectomiert bzw. ovariectomiert und zusätzlich mit Glukokortikoiden behandelt wurden. Die Eignung dieses Versuchsmodells für die Untersuchung von Biomaterialien, die besonders im osteoporotischen Knochen angewendet werden, sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden.

Der Zement wurde in Bohrlochdefekte an der proximalen Tibia sowie im Beckenkamm für einen Zeitraum von sechs Monaten implantiert.

In allen drei Tiergruppen zeigte sich eine gute Biokompatibilität des Zements. Anzeichen einer Entzündung als Reaktion auf das Material konnten nicht beobachtet werden. Im Untersuchungszeitraum wurde in keiner der drei Tiergruppen eine deutliche Volumenreduktion des Zements beobachtet. Es zeigte sich nur ein geringer zellulärer Abbau an den Rändern des Implantats. In allen Fällen war der Zement von einer dichten Knochenschicht umgeben, was seine osteokonduktiven Eigenschaften bestätigt. Diese dichtere Knochenlamelle wurde auch im osteoporotischen Tiermodell ausgebildet.

Im folgenden sollen die Eignung des Versuchsmodells sowie die histologischen Ergebnisse der Studie kritisch diskutiert werden.

4.1. Versuchsmodell

Bei der Untersuchung der Biokompatibilität und Funktionalität von Biomaterialien und Implantaten wird häufig das Schaf als Versuchsmodell eingesetzt. Die Prozesse der Knochenheilung sind beim Schaf aufgrund ihrer Geschwindigkeit und Art auf den Menschen übertragbar [Stürmer et Schuchardt, 1980; Wissing, 1990; Lippuner et al., 1992; Bellino, 2000]. Unterschiede zum Menschen liegen in der Knochenfeinstruktur, der Gefäßversorgung und der Stoffwechselaktivität (der Schafsknochen besteht vorwiegend aus primären Osteonen, der menschliche aus sekundären). Das Remodeling des Schafsknochens geschieht jedoch, wie beim Menschen auch, über Sekundärosteonen [Wissing, 1990]. Gegenüber dem menschlichen Knochen besitzt der Schafsknochen eine größere Stoffwechselaktivität. Andere Versuchstiere wie Ratte, Kaninchen oder Hund haben jedoch eine noch größere Stoffwechselaktivität. Die Größenverhältnisse der Gliedmassen sind beim Schaf besser, wenn Implantate untersucht werden sollen und die Biomechanik ist mit dem menschlichen Organismus vergleichbarer [Stürmer et Schuchardt, 1980]. Zudem ist wegen des fügsamen Verhaltens der Tiere die Haltung unproblematisch und Anschaffungskosten für Schafe als Versuchstiere vertretbarer als bei anderen großen Tieren, was die Entscheidung zugunsten eines Schafsmodells erleichtert. Aufgrund der genannten Vorteile wurde das Schaf bereits in mehreren Studien eingesetzt und wurde auch in der vorliegenden Untersuchung verwendet [Newman et al., 1995; Claes, 1999; Ignatius et al., 1999; Augat et al., 2000].

Sollen Implantate im osteoporotischen Knochen zum Einsatz kommen, so braucht man auch osteoporotische Tiermodelle, die eine adäquate Testung ermöglichen.

Die Ratte als Osteoporosemodell zeigt unter Östrogenmangel eine ähnliche Veränderung des Knochenstoffwechsels wie der osteoporotische menschliche Knochen [Barlet et al., 1994]. Bei orthopädischen Fragestellungen jedoch sind ovariectomierte Ratten als Osteoporosemodelle wegen nicht vergleichbarer Biomechanik und Unterschieden der Morphologie des Knochens ungeeignet. Mehrere Untersuchungen zur Osteoporose an adulten Schafen kommen zu dem Schluss, dass das osteoporotische Schaf ein adäquates und vor allem reproduzierbares Modell darstellt [Thomas et al., 1996; Chavassieux et al., 1997; Thorndike et Turner, 1998]. Studien von *Lill et al.* zeigten

jedoch, dass eine alleinige Ovariectomie nicht den gewünschten Erfolg der Entwicklung einer Osteoporose in Schafen erbringen konnte. Vielmehr war es die Kombination aus Ovariectomie, Steroidbehandlung und calciumrestriktiver Diät, die eindeutig in Richtung einer Osteoporose wies [Lill et al., 2000; Lill et al., 2002a; Lill et al., 2002b].

Im Rahmen der vorliegenden Tierstudie, in der der neue Zement getestet wurde, sollte aufbauend auf den Ergebnissen der Studien der o.g. Autoren ein Osteoporosemodell am Schaf etabliert werden. *Schorlemmer* führte in dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Tierversuch Knochendichtemessungen mit DXA (dual energy x-ray absorptiometry) und CT (Computertomographie), sowie mechanische Untersuchungen durch. Dabei wurde die Knochenmineraldichte mittels DXA-Scanner (Norland XR) an der distalen Tibia, dem Calcaneus und an der lumbalen Wirbelsäule (L1 – L4) präoperativ, nach drei, sechs und 12 Monaten gescannt. Zusätzlich wurde nach sechs Monaten eine Biopsie an der proximalen Tibia genommen, die dann mit Biocement D aufgefüllt wurde. Eine zusätzliche Biopsie erfolgte nach zwölf Monaten. Die Biopsien wurden densitometrisch und biomechanisch untersucht. Bei den Tieren der Gruppe C (ovarektomierte und steroidbehandelte Gruppe) zeigte sich bereits nach sechs Monaten im trabekulären Knochen eine Abnahme der Knochendichte um 20% ($p < 0,01$) im Vergleich zur Kontrollgruppe A und eine Abnahme der biomechanischen Stabilität um 37% ($p < 0,1$). Bei den Messungen nach zwölf Monaten zeigten sich noch größere Unterschiede (Knochendichte -28%, $p < 0,05$; Elastizitätsmodul -62%, $p < 0,05$) [Schorlemmer et al., 2003]. Es kann zusammenfassend festgestellt werden, dass die ovariectomierten und glukokortikoidbehandelten Schafe eine niedrigere Knochendichte und verminderte mechanische Eigenschaften des Knochens aufwiesen.

Dies zeigte sich auch an den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit: die Flächendichte des Knochens vor allem der glukokortikoidbehandelten Tiergruppe C wies geringere Werte (absolut wie auch relativ zur Gesamtauswertefläche) auf, woraus auf eine geringere Knochendichte geschlossen werden kann. Dennoch müssen besonders in dieser Gruppe Reaktionen auf Materialien sorgfältig bewertet werden, da Kortison in die Entzündungs- und Heilungskaskade eingreift und dadurch die Reaktion auf Materialien beeinflussen könnte. In diesem Modell entsteht kein „echter“ osteoporotischer Knochen, der sich

durch eine postmenopausale Stoffwechsellage entwickelt hat, zumal bei Schafen eine Osteoporose, wie sie beim Menschen mit steigendem Alter entsteht, unbekannt ist. Zu beachten ist jedoch, dass die Glukokortikoide zum Zeitpunkt der Behandlung wieder abgesetzt waren. Trotzdem kann eine bleibende Beeinflussung des Knochenstoffwechsels nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Dennoch, es ergab sich kein Unterschied in der Reaktion auf den Zement, da auch in der Gruppe C eine Osteokonduktivität des Materials nachgewiesen werden konnte.

Die Wahl des Implantationsortes (hier: Bohrloch am medialen Anteil des Tibiaplateaus der rechten Tibia) für den Zement war durch die Biopsieentnahmestelle vorgegeben. Spongioser Knochen als Implantationsort ist die typische Lokalisation für zu testende Knochenersatzmaterialien oder Knochenzemente. Das Bohrlochmodell per se ist ein typisches Modell zur Biomaterialtestung, da es einfach und standardisiert hergestellt werden kann. Der Nachteil dieser Methode ist die weitgehend fehlende mechanische Belastung. Eine Belastung der Implantate wäre wünschenswert, da dadurch in vivo auch die Reaktionen des Knochens auf Implantate beeinflusst werden kann [Claes, 1999; Peraus, 2002].

Es erfolgte zusätzlich eine Implantation des Zementes in den Beckenkamm. Die Spongiosa des Beckenkamms ist sehr gut durchblutet. Da die Durchblutungssituation die Biokompatibilität und Resorption von Biomaterialien beeinflusst, könnte sich der Zement an dieser Lokalisation möglicherweise anders verhalten als in der proximalen Tibia.

Die Auswertung erfolgte qualitativ histologisch und quantitativ durch Erfassung der Flächendichte des Knochens. Hierbei wurde die Fläche des Knochens in einem bestimmten Bereich um das Implantat herum (*ROI*) mit einer Vergleichsfläche (*Vgl*) im gleichen Präparat verglichen. Dabei war die Flächendichte des Knochens um das Implantat umso größer, je kleiner der Auswertebereich war. Der Effekt war umso geringer, je größer der Auswertebereich (*FR*) war. Die Steigerung der Knochendichte durch den osteokonduktiven Zement hätte möglicherweise bei zu großen oder auch zu kleinen Auswertefeldern nicht erfasst werden können. Daher wurden mehrere Größen gewählt (*FR*).

4.2. Biokompatibilität und Resorption von Biocement D

Die Reaktion des Knochens auf den Zement war bzgl. der Biokompatibilität und Beobachtung von resorptiven Prozessen in allen Gruppen gleich: das osteoporotische Schaf verhielt sich trotz verminderter Knochendichte nicht anders gegenüber dem Zement als die unbehandelten gesunden Schafe. Die Beurteilung der biologischen Reaktion (anhand der unter 2.4.2. definierten Kriterien) brachte in allen drei Gruppen ähnliche Resultate, was v.a. im Vergleich der Gruppe C mit der Kontrollgruppe A wichtig ist. Der Biocement D zeigte in allen Gruppen den gleichen festen Knochenkontakt mit einer dichten Knochenlamelle. Etwaige Reaktionen des Immunsystems, wie z.B. Fremdkörperreaktionen oder Entzündungen auf den eingebrachten Zement, blieben aus. In allen Gruppen wurde das Material fest in den vorhanden Knochen eingebaut. Da der Biocement D nur sehr langsam abgebaut wurde, konnte nur in einzelnen Präparaten eine zelluläre Komponente beim Abbau des Biocement D beobachtet werden (zelluläre Abbau- bzw. Resorptionslakunen). Es zeigte sich bei der quantitativen Auswertung, dass die Knochenfläche um das Implantat (*ROI*) in allen Präparaten im Vergleich zur Spongiosa in der Vergleichsfläche (*Vgl*) erhöht war, und dass in unmittelbarer Nähe zum Zement mehr Knochen vorhanden war, als in entfernteren Bereichen. Dies lässt auf eine Osteokonduktivität des Biocement D schließen. Zugleich kann aus den Ergebnissen der qualitativen Auswertung auf eine gute Biokompatibilität geschlossen werden. Nach sechs Monaten Implantationszeit war das Implantatmaterial noch fast vollständig an den Implantationsorten vorhanden. Es konnte keine wesentliche Resorption festgestellt werden. Da nur vereinzelt Resorptionslakunen zu beobachten waren, ist davon auszugehen, dass der Biocement D nur im Rahmen eines physiologischen Remodeling am Knochenstoffwechsel teilnimmt. Dieser langsame Umbau bzw. Resorption wird in der Literatur für viele Calciumphosphate auch als „creeping substitution“ (s.u.) bezeichnet.

4.3. Biokompatibilität und Resorption im Vergleich mit anderen Zementen

Beim Vergleich mit der Literatur ist festzustellen, dass Calciumphosphatkeramiken im Allgemeinen osteokonduktiv sind, d.h. sie dienen als Leitschiene für das Knochenwachstum [de Groot, 1988]. Sie bauen eine feste Bindung zum Knochen auf, die meist auf einer direkten chemischen Bindung beruht, ohne, dass eine bindegewebige Zwischenschicht ausgebildet wird [Damien et Parsons, 1991; Hamadouche et Sedel, 2000]. Weiterhin haben Calciumphosphate im Allgemeinen eine gute Biokompatibilität. Entzündliche Reaktionen werden so gut wie nie beobachtet. Das trifft für Reinstoffe wie TCP, DCP, HA u.a., sowie für poröse Formkörper oder Granulate zu, die als Knochenersatzmaterialien eingesetzt werden [Claes et al., 1997; Gunther et al., 1998; Dorozhkin et Epple, 2002]. Insbesondere gilt dies auch für Zemente, die in pastöser Form auch zur Augmentation von Implantaten im osteoporotischen Knochen und zur prophylaktischen Behandlung an der Wirbelsäule eingesetzt werden.

Nach der Implantation werden Calciumphosphatzemente in den Knochen integriert. Ihre Osteointegration erfolgt, bedingt durch ihre gute Formbarkeit, sofort. Einige Zemente enthalten amorphes Calciumphosphat (ACP), andere sind kristalliner Natur und liefern als Reaktionsprodukte DCPD (Dicalciumphosphat-dihydrogenat), CDHA (calcium deficient Hydroxylapatit), CA (Karboniertes Apatit) und HA (Hydroxylapatit). Bekannt sind auch Misch-Typen aus Gips-DCPD. Die Fähigkeit der *in vivo* Osteotransduktion (bzw. -konduktion) ist wie folgt zu ordnen: Gips-DCPD > DCPD > CDHA und CA > HA. Die Osteokonduktion der CDHA – Typen kann durch Zugabe von DCP (Dicalciumphosphat) und/oder CaCO₃ (Calciumcarbonat) erhöht werden. Bei Anwendungen, die biomechanische Belastungen ausgesetzt sind, eignen sich CDHA-, CA- und HA-Typ-Calciumphosphatzemente, da sie eine höhere Kompressionssteifigkeit haben als humaner trabekulärer Knochen [Driessens et al., 1998].

Prinzipiell gibt es zwei Resorptionswege beim Abbau von Calciumphosphatzementen. Zum einen die physikalische Lösung, und zum anderen den zellulären Abbau [Thieme et Müller, 1988; Hein et Bartels, 1992]. Während das TCP noch löslich ist, stellt HA ein kaum lösbares Material dar. Die *in vivo* Resorption erfolgt langsam. Hassler et al. nachgewiesen, dass ein Teil der freigesetzten Ca-Ionen aus einem Implantat den

Mineralisierungsprozessen am Implantationsort zur Verfügung steht [Hassler, 1976]. Dies steht jedoch im Widerspruch zur Arbeit von *Fischer-Brandies*, der ca. 20 Jahre später in einer Untersuchung mittels isotoopenmarkierter HA- und TCP-Keramik an Ratten gezeigt hat, dass die Mineralisierung des neu zugebildeten Knochens nicht unmittelbar aus dem Implantat erfolgt, sondern über den Calciumpool des Organismus [Fischer-Brandies et al., 1989]. Somit bleibt die Frage nach der genauen Utilisation des degradierten Calciumphosphats ungeklärt.

Die gute Biokompatibilität von experimentellen Calciumphosphatzementen sind in zahlreichen Tierversuchen vielfach bestätigt worden. Als Versuchsmodell wurde sehr häufig das Kaninchen gewählt. *Pasquier et al.* kommen bei der Entwicklung eines Modells zur perkutanen Applikation von injizierbaren Zementen zum Schluss, dass das **Kaninchen** ein gutes und reproduzierbares Modell darstellt. Verglichen wurde in einem standardisierten Spongiosadefekt am distalen Femur verschiedene Zemente (PMMA, Kollagen-Hydroxylapatit, Calciumphosphatzement, Leerdefekt). Die besten Ergebnisse, die Defektheilung betreffend, wurden hierbei durch den Calciumphosphatzement erzielt [Pasquier et al., 1998].

In weiteren Untersuchungen an **Kaninchen** ergaben viele Studien positive Ergebnisse in Bezug auf den Einsatz von Calciumphosphatzementen. Dabei wurde auch hier vorwiegend der distale Femur als Implantationsort gewählt. Über eine gute Biokompatibilität und z.T. hohe Resorptionsraten wird vor allem in diesem Tiermodell berichtet. *Ohura et al.* vergleichen zwei Zemente (β -TCP-MCPM-CSH mit und ohne β -TCP-Granulat (Größe 500-1000 μ m). Als Kontrolle galten Leerbohrungen. Die Ergebnisse zeigten, dass β -TCP-MCPM-CSH-Zemente die Knochenbildung stimulieren und schnell durch knöchernes Gewebe ersetzt werden. Bei Zugabe von langsam resorbierbarem β -TCP Granulat brauchte dieser Zement länger für die Knochenneubildung [Ohura et al., 1996].

In einer ähnlichen Studie zeigten *Ikenaga et al.*, dass der β -TCP-MCPM-CSH-Zement im gleichen Tiermodell eine höhere mechanische Stabilität und sehr gute Resorptionsraten schon in den ersten 6-12 Wochen post implantationem aufwies [Ikenaga et al., 1998].

Andere Autoren wählten die **Ratte** als Tiermodell. *Kamakura et al.* schafften mittels Trepanation einen Defekt am parietalen Schädelknochen bei der Ratte. In diesem Defekt wurden verschiedene Calciumphosphatzemente (OCP [Octacalciumphosphat], HA und β -TCP) getestet. Es wurde festgestellt, dass OCP am Ende der Untersuchung nach sechs Monaten eine höhere Resorptionsfähigkeit und Osteokonduktivität besaß als HA- und β -TCP-Materialien [Kamakura et al., 2001a; Kamakura et al., 2001b].

Über einen β -TCP-Calciumphosphatzement berichten auch *Niedhart et al.* Als Versuchsmodell wurde auch hier die **Ratte** gewählt. Der Zement zeigte in diesem Modell eine sehr gute Biokompatibilität und eine langsame Resorption des Zements nach einer Woche. Nach drei Wochen Implantationszeit schien der Zement jedoch höhere Resorptionsraten aufzuweisen [Niedhart et al., 2001].

Es wurden auch größere Tiere zu Versuchszwecken herangezogen. *Frankenburg et al.* untersuchten einen Calciumphosphatzement an **Hunden**. Die histologische Auswertung ergab eine Osteokonduktivität des Materials, wobei dieses einem langsamen Remodeling unterlag. Bei einer Implantationszeit zwischen 24 Stunden und 78 Wochen zeigte sich, dass der Zement zunehmend von kleineren Blutgefäßen penetriert wurde, um die sich später Havers'sche Systeme bildeten. Die Resorption war nicht vollständig, vielmehr nahm der Zement am Remodeling des Knochens teil. Es war zu keinem Zeitpunkt fibröses Gewebe um die Implantate auszumachen und es waren keine Entzündungszeichen erkennbar [Frankenburg et al., 1998]. Ähnliche Resultate erzielten zahlreiche Autoren mit dem gleichen Tiermodell und Calciumphosphatzementen bestehend aus verschiedenen Kombinationen der Komponenten β -TCP, MCPM, DCP, CDHA und CSH [Lemaitre et al., 1992; Rueger, 1996; Lee et al., 1999; Yuan et al., 1999; Yuan et al., 2000; Yuan et al., 2001].

Schließlich erfolgten Untersuchungen auch an **Schafen**, jedoch ist die Anzahl der durchgeführten Studien mit injizierbaren Calciumphosphatzementen viel geringer im Vergleich zu anderen Tiermodellen. *Flautre et al.* haben in einer vergleichenden experimentellen Studie Calciumphosphatzemente in vorgeformten Blöcken einerseits und in injizierbarer Applikationsform andererseits in Knochendefekten bei Schafen

untersucht. Zuvor wurde die gleiche Studie am Kaninchen durchgeführt. Verglichen wurden die Proben mit Leerbohrungen. Die Degradation im Schafsmodell verlief drei mal langsamer (bei 8fach größerem Defekt), wobei es keinen Unterschied zwischen den vorgeformten Blöcken und der injizierbaren Form gab. Trotzdem ergab die Auswertung, dass das Knochen-Remodeling in den Zementgruppen schneller war als in der Kontrollgruppe mit den Leerbohrungen. Dies wird in der erhöhten Osteoblastenzahl und besseren Interaktion des Zements mit dem umliegenden Gewebe gesehen [Flautre et al., 1999].

Aufgrund der Verbesserung der mechanischen Stabilität der Calciumphosphatzemente wird es zunehmend möglich, diese auch an mechanisch belasteten Implantationsorten einzusetzen, wie z.B. bei der Behandlung von Wirbelkörper-Kompressionsfrakturen. Untersuchungen am Schafsmodell bewiesen dies [Bai et al., 1999; Bai et al., 2001].

Alle bisherigen Tierversuche mit Calciumphosphatzementen ergaben also ähnliche Resultate, wie sie hier in dieser Arbeit erzielt wurden. Es erfolgte die direkte Anbindung von Knochen an den Calciumphosphatzement ohne bindegewebige Zwischenschicht. Im unmittelbaren Bereich um den Zement herum befand sich eine „Zone“ höherer Knochendichte, die sich mit zunehmender Entfernung zum Zement verlor, so dass hier von einer Osteokonduktivität des Biocement D ausgegangen werden kann. Der Zement diente offensichtlich als Leitschiene für das Knochenwachstum. Diese osteostimulative Komponente ist möglicherweise auf die Bereitstellung von Ionen zurückzuführen (s.o.).

Die gute Biokompatibilität und Osteokonduktivität ist auch bei anderen Calciumphosphatzementen vorhanden. Eine herausragende Rolle spielt hier das Norian SRS®, das über die Testphase hinaus bereits **klinische Anwendung** findet. Aber auch über andere injizierbare Knochenzementen (z.B. Biobon®), die dem Biocement D in Zusammensetzung und Eigenschaften sehr ähneln, wird in vielen Einzelfalldarstellungen sowie z.T. schon von deren Einsatz in klinischen Studien berichtet. Knochenzemente werden bei der Behandlung von Kompressionsfrakturen, Auffüllung von Knochendefekten und Augmentation von Implantaten im osteoporotischen Knochen verwendet. Nach abgeschlossener Heilungsphase sollte ein idealer Zement vollständig degradiert sein. Im allgemeinen können abbaubare CPBCs diese Eigenschaft erfüllen.

Eine Vielzahl von Zementen wurde in den letzten Jahren entwickelt, doch die intraoperative Handhabung, die mechanischen Eigenschaften und Resorptionscharakteristiken unterscheiden sich z.T. erheblich. Außerdem fehlen klinische Langzeitstudien, die für einen klinischen Einsatz unerlässlich sind [Claes et al., 1997].

Csizy et al. berichten über die Versorgung einer seltenen benignen Calcaneuszyste mit Norian SRS® in Zusammenhang mit einer pathologischen Fraktur. Es wurde ein 20 cm³-messender Defekt mit dem Calciumphosphatzement aufgefüllt. Die Mobilisation bzw. Gewichtsbelastung erfolgte bereits nach sieben Wochen. Nach zwölf Wochen konnte der Patient gehen und nach sechs Monaten konnte er 20 Minuten lang gehen. Nach zwei Jahren hatte der Patient keinerlei Einschränkungen seiner Belastungsfähigkeit, war sogar in der Lage fünf km zu joggen, allerdings war das Material nach zwei Jahren Implantationsdauer nur geringfügig abgebaut [Csizy et al., 2001]. Das Norian SRS® wird trotz der biomechanischen Unterlegenheit dem Biocement D gegenüber vermehrt auch in belasteten Implantationsorten angewendet.

Zimmermann et al. behandelten 52 weibliche postmenopausale, osteoporotische Patienten mit einer instabilen intraartikulären distalen Radiusfraktur. Die Kontrollgruppe wurde mit perkutanem Pinning und Immobilisation von sechs Wochen behandelt, die Frakturen in der Untersuchungsgruppe wurden mit Norian SRS® versorgt und für drei Wochen immobilisiert. Es stellte sich heraus, dass die Norian-Gruppe nach zwei Jahren bessere Ergebnisse lieferte. Es war ein geringerer Längenverlust des Radius, sowie eine bessere Funktionalität des Handgelenks erzielt worden [Zimmermann et al., 2003]. Zudem wird über den Einsatz und erste positive Erfahrungen auch im Bereich von Oberschenkelhals- und Intertrochantären Frakturen berichtet [Goodman et al., 1998].

In einer anderen randomisierten Studie mit 110 Patienten mit distalen Radiusfrakturen wurden zwei Behandlungsmethoden miteinander verglichen. Die erste Gruppe wurde mit Norian SRS (SRS-Gruppe) behandelt, die zweite nach konventionellen Methoden (Kontrollgruppe, Fixierung mit Gipsschiene). In der SRS-Gruppe hatten die Patienten weniger Schmerzen und eine schnellere Wiederherstellung der Funktion und Kraft des betroffenen Arms. Zufriedenstellende Ergebnisse gab es in der SRS-Gruppe nach einem

Jahr zu ca. 82% und in der Kontrollgruppe zu ca. 56%. Die Rate der „malunion“ war ca. 18% und 42% respektive. In dieser Studie kommen *Sanchez et al.* zum Schluss, dass die Injektion eines am Remodeling teilnehmenden Calciumphosphatzements in einen trabekulären Defekt (distale Radiusfraktur) sowohl klinisch wie auch radiologisch ein besseres Resultat als die konventionelle Methode hervorbringt [Sanchez-Sotelo et al., 2000].

Sarkar et al. haben zum ersten Mal den Calciumphosphatzement Biobon® (vormals: α -BSM) bei Menschen angewandt. Nach 2-12 Monaten wurden sogar Biopsien von neun Patienten gewonnen, so dass eine histologische Untersuchung erfolgen konnte. Es wurden dekalzifizierte Umbauzonen im direkten Kontakt zum Zement gesichtet, die ähnlich wie im Tierversuch, keine bindegewebige Abgrenzung aufwiesen. Mehrkernige Zellen an oberflächlichen Lakunen zeigten resorptive Vorgänge, ohne dass entzündliches Gewebe vorhanden gewesen wäre. Der neu gebildete Knochen zeigte normale trabekuläre und osteonale Strukturen. Obwohl die Resorption des Zements unvollständig war, scheint das Material den gesinterten Calciumphosphaten diesbezüglich überlegen zu sein, was auf seine amorphe kristalline Grundstruktur zurückzuführen sein könnte [Sarkar et al., 2001].

Zusammenfassend kann dem Biocement D eine gute Biokompatibilität zugesprochen werden. Es findet nur eine geringe Degradation des Zements in allen Versuchsgruppen statt. Der Zement nimmt vielmehr langsam am physiologischen Remodeling des Knochens teil. Hinsichtlich seiner guten Biokompatibilität und langsamen Resorption unterscheidet sich der Biocement D nicht wesentlich von dem bereits klinisch eingesetzten Norian SRS®. Allerdings weist der Biocement D deutlich bessere mechanische Eigenschaften auf, was seinen klinischen Einsatz besonders als Augmentationsmaterial erweitern könnte.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer Knochenzement (Biocement D, Fa. Biomet Merck) in einem osteoporotischen Schafsmodell untersucht. Das Tiermodell enthielt eine Kontrollgruppe (keine Behandlung), eine ovariectomierte Gruppe B und eine Gruppe C, die ovariectomiert und zusätzlich mit Kortikoiden behandelt wurde. Der Zement wurde in Bohrlochdefekte der Tibia und in den Beckenkamm implantiert. Die Implantationsdauer betrug sechs Monate. Nach dieser Zeit wurden histologische Präparate und Kontakt-Microradiographien hergestellt. Die Auswertung erfolgte quantitativ (Microradiographien) und qualitativ (histologische Schnitte).

Bei der quantitativen Auswertung wurde festgestellt, dass in allen Präparaten die Knochenfläche um den Zement herum (*ROI*) signifikant höher war als in der Vergleichsfläche (*Vgl*) im gleichen Präparat. Um einen osteokonduktiven Effekt des Zements auszumachen, wurden verschieden große Auswertebereiche (*FRs*) gewählt. Mit zunehmender Größe der Auswertebereiche nahm der prozentuale Anteil des Knochens an der Auswertefläche ab. Dieser osteokonduktive Effekt war in allen Tiergruppen vorhanden. Insgesamt wies die Kontrollgruppe A die höchste Knochendichte auf, während die osteopenische bzw. osteoporotische Gruppe C eine sehr schlechte Knochenstruktur im Vergleich zur Kontrollgruppe besaß.

Eine qualitative Auswertung der Tibia- und Beckenkammpräparate erfolgte anhand definierter Kriterien. In keinem der Präparate war das Implantat fibrös umbaut, es waren keinerlei Fremdkörperreaktion sichtbar. Es gab keinen Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen bezüglich der Gewebereaktion.

Biocement D bewies im osteoporotischen Schafsmodell eine sehr gute Biokompatibilität, jedoch wurde das Material nur wenig resorbiert. Vielmehr nimmt Biocement D am Prozess des Remodeling des Knochens teil.

6. Literaturverzeichnis

Augat, P., Gohl, C., Ignatius, A., Claes, L.: "A large animal model of osteoporosis: The ovariectomized and corticoid treated sheep." Osteoporosis International, World Congress on Osteoporosis 2000, Chicago: 153 (2000)

Bai, B., Jazrawi, L. M., Kummer, F. J. et Spivak, J. M.: "The use of an injectable, biodegradable calcium phosphate bone substitute for the prophylactic augmentation of osteoporotic vertebrae and the management of vertebral compression fractures." Spine **24**: 1521-1526 (1999)

Bai, B., Kummer, F. J. et Spivak, J.: "Augmentation of anterior vertebral body screw fixation by an injectable, biodegradable calcium phosphate bone substitute." Spine **26**: 2679-2683 (2001)

Barlet, J. P., Coxam, V., Davicco, M. J. et Gaumet, N.: "Animal models of postmenopausal osteoporosis." Reprod Nutr Dev **34**: 221-236 (1994)

Bellino, F. L.: "Nonprimate animal models of menopause: workshop report." Menopause **7**: 14-24 (2000)

Chavassieux, P., Buffet, A., Vergnaud, P., Garnero, P. et Meunier, P. J.: "Short-term effects of corticosteroids on trabecular bone remodeling in old ewes." Bone **20**: 451-455 (1997)

Claes, L.: "Drill Hole-Plug Models. Workshop "Models in FractureHealing" and "Implant Models", Reisingburg, 1999." (1999)

Claes, L., Hoellen, I. et Ignatius, A.: "Resorbierbare Knochenzemente" Orthopäde **26**: 459-462 (1997)

Cohen, M. S. et Whitman, K.: "Calcium phosphate bone cement - the Norian skeletal repair system in orthopedic surgery." Aorn J **65**: 958-962 (1997)

Constantz, B. R., Ison, I. C., Fulmer, M. T., Poser, R. D., Smith, S. T., VanWagoner, M., Ross, J., Goldstein, S. A., Jupiter, J. B. et Rosenthal, D. I.: "Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone." Science **267**: 1796-1799 (1995)

Csizy, M., Buckley, R. E. et Fennell, C.: "Benign calcaneal bone cyst and pathologic fracture--surgical treatment with injectable calcium-phosphate bone cement (Norian): a case report." Foot Ankle Int **22**: 507-510 (2001)

Damien, C. J. et Parsons, J. R.: "Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications." J Appl Biomater **23**: 187-208 (1991)

de Groot, K.: "Effect of porosity and physicochemical properties on the stability, resorption and strength of calcium phosphate ceramics. In: Ducheyne P. and Lemmons J., (Hrsg) Bioceramics: Materials characteristics versus in vivo behaviour. Academy of Sciences, New York." 227-233 (1988)

del Real, R. P., Ooms, E., Wolke, J. G., Vallet-Regi, M. et Jansen, J. A.: "In vivo bone response to porous calcium phosphate cement." J Biomed Mater Res **65A**: 30-36 (2003)

Doren, M. et Schneider, H. P.: "Identification and treatment of postmenopausal women at risk for the development of osteoporosis." Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol **30**: 431-433 (1992)

Dorozhkin, S. V. et Epple, M.: "Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten." Angew Chem **114**: 3260-3277 (2002)

Driessens, F. C., Boltong, M. G., De Maeyer, E. A. P., Vercruyse, C. W. J., Wenz, R. Verbeeck, R. M. H.: "Comparative study of some experimental or commercial calcium phosphate bone cements." Bioceramics **11**: 231-233 (1998)

Driessens, F. C., Planell, J. A., Boltong, M. G., Khairoun, I. et Ginebra, M. P.: "Osteotransductive bone cements." Proc Inst Mech Eng [H] **212**: 427-435 (1998)

Elder, S., Frankenburg, E., Goulet, J., Yetkinler, D., Poser, R. et Goldstein, S.: "Biomechanical evaluation of calcium phosphate cement-augmented fixation of unstable intertrochanteric fractures." J Orthop Trauma **14**: 386-393 (2000)

Ertel, S. I., Ratner, B. D., Kaul, A., Schway, M. B. et Horbett, T. A.: "In vitro study of the intrinsic toxicity of synthetic surfaces to cells." J Biomed Mater Res **28**: 667-675. (1994)

Fernandez, E., Ginebra, M. P., Boltong, M. G., Driessens, F. C., Ginebra, J., De Maeyer, E. A., Verbeeck, R. M. et Planell, J. A.: "Kinetic study of the setting reaction of a calcium phosphate bone cement." J Biomed Mater Res **32**: 367-374 (1996)

Fischer-Brandies, E., Diekert, E., Bauer, G., Feder, F. H., Reidel, G. et Mollenstedt, S.: "Organ specific deposition of ⁴⁵Ca labelled calcium phosphate ceramic material." Dtsch Zahnarztl Z **44**: 436-437 (1989)

Flautre, B., Delecourt, C., Blary, M. C., Van Landuyt, P., Lemaitre, J. et Hardouin, P.: "Volume effect on biological properties of a calcium phosphate hydraulic cement: experimental study in sheep." Bone **25**: 35-39 (1999)

Frankenburg, E. P., Goldstein, S. A., Bauer, T. W., Harris, S. A. et Poser, R. D.: "Biomechanical and histological evaluation of a calcium phosphate cement." J Bone Joint Surg Am **80**: 1112-1124 (1998)

Goodman, S. B., Bauer, T. W., Carter, D., Casteleyn, P. P., Goldstein, S. A., Kyle, R. F., Larsson, S., Stankewich, C. J., Swiontkowski, M. F., Tencer, A. F., Yetkinler, D. N. et Poser, R. D.: "Norian SRS cement augmentation in hip fracture treatment. Laboratory and initial clinical results." Clin Orthop: 42-50 (1998)

Gough, J. E. et Downes, S.: "Osteoblast cell death on methacrylate polymers involves apoptosis." J Biomed Mater Res **57**: 497-505 (2001)

Günther, K. P., Scharf, H. P., Pesch, H. J. et Puhl, W.: "Einwachsverhalten von Knochenzementen. Tierexperimentelle Untersuchung." Orthopäde **27**: 105-117 (1998)

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

Harrington, K. D.: "The use of methylmethacrylate as an adjunct in the internal fixation of unstable comminuted intertrochanteric fractures in osteoporotic patients." J Bone Joint Surg Am **57**: 744-750 (1975)

Harrington, K. D.: "The use of methylmethacrylate for vertebral-body replacement and anterior stabilization of pathological fracture-dislocations of the spine due to metastatic malignant disease." J Bone Joint Surg Am **63**: 36-46 (1981)

Harrington, K. D., Sim, F. H., Enis, J. E., Johnston, J. O., Diok, H. M. et Gristina, A. G.: "Methylmethacrylate as an adjunct in internal fixation of pathological fractures. Experience with three hundred and seventy-five cases." J Bone Joint Surg Am **58**: 1047-1055 (1976)

Hassler, C. R., McCraoy, L.A.: "Studies on the degradability of large TCP-segments. 2nd Annual Meeting of the Society of Biomaterials.": 122 (1976)

Hein, W. et Bartels, T.: "Langzeitergebnisse nach Implantation von alpha-TCP in der Orthopädie." Osteologie **1**: 28 (1992)

Hench, L. L.: "Bioactive materials: The potential or tissue regeneration." J Biomed Mater Res **41**: 511-518 (1998)

Ignatius, A.: "Entwicklung von resorbierbaren Kompositmaterialien zur Knochendefektauffüllung." Medizinische Habilitationsschrift, Universität Ulm (2001)

Ignatius, A., Simon, U., Augat, P. et Claes, L.: "A Partially Loaded Epiphyseal Implant Model." Workshop "Models in Fracture Healing" and "Implant Models", Reimsburg. (1999)

Ikenaga, M., Hardouin, P., Lemaitre, J., Andrianjatovo, H. et Flautre, B.: "Biomechanical characterization of a biodegradable calcium phosphate hydraulic cement: a comparison

with porous biphasic calcium phosphate ceramics." J Biomed Mater Res **40**: 139-144. (1998)

Kamakura, S., Sasano, Y., Nakajo, S., Shimizu, T., Suzuki, O., Katou, F., Kagayama, M. et Motegi, K.: "Implantation of octacalcium phosphate combined with transforming growth factor-beta1 enhances bone repair as well as resorption of the implant in rat skull defects." J Biomed Mater Res **57**: 175-182. (2001a)

Kamakura, S., Sasano, Y., Shimizu, T., Hatori, K., Suzuki, O., Kagayama, M. et Motegi, K.: "Implanted octacalcium phosphate is more resorbable than beta-tricalcium phosphate and hydroxyapatite." J Biomed Mater Res **59**: 29-34. (2001b)

Khairoun, I., Boltong, M. G., Driessens, F. C. et Planell, J. A.: "Effect of calcium carbonate on clinical compliance of apatitic calcium phosphate bone cement." J Biomed Mater Res **38**: 356-360. (1997a)

Khairoun, I., Boltong, M. G., Driessens, F. C. et Planell, J. A.: "Effect of calcium carbonate on the compliance of an apatitic calcium phosphate bone cement." Biomaterials **18**: 1535-1539. (1997b)

Knabe, C., Driessens, F. C., Planell, J. A., Gildenhaar, R., Berger, G., Reif, D., Fitzner, R., Radlanski, R. J. et Gross, U.: "Evaluation of calcium phosphates and experimental calcium phosphate bone cements using osteogenic cultures." J Biomed Mater Res **52**: 498-508 (2000)

Kuokkanen, H., Raty, S., Korkala, O., Niskanen, R. et Syrjanen, K. J.: "Osteosynthesis and allogeneic bone grafting in complex osteoporotic fractures." Orthopedics **24**: 249-252 (2001)

Langstaff, S., Sayer, M., Smith, T. J. et Pugh, S. M.: "Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates. Part II: evaluation of biological response." Biomaterials **22**: 135-150 (2001)

Lee, D. D., Tofighi, A., Aiolova, M., Chakravarthy, P., Catalano, A., Majahad, A. et Knaack, D.: "alpha-BSM: a biomimetic bone substitute and drug delivery vehicle." Clin Orthop: 396-405 (1999)

Lemaitre, J., Munting, E. et Mirtchi, A. A.: "Setting, hardening and resorption of calcium phosphate hydraulic cements." Rev Stomatol Chir Maxillofac **93**: 163-165 (1992)

Lill, C. A., Fluegel, A. K. et Schneider, E.: "Sheep model for fracture treatment in osteoporotic bone: a pilot study about different induction regimens." J Orthop Trauma **14**: 559-566 (2000)

Lill, C. A., Fluegel, A. K. et Schneider, E.: "Effect of ovariectomy, malnutrition and glucocorticoid application on bone properties in sheep: a pilot study." Osteoporos Int **13**: 480-486 (2002a)

Lill, C. A., Gerlach, U. V., Eckhardt, C., Goldhahn, J. et Schneider, E.: "Bone changes due to glucocorticoid application in an ovariectomized animal model for fracture treatment in osteoporosis." Osteoporos Int **13**: 407-414 (2002b)

Lippuner, K., Vogel, R., Tepic, S., Rahn, B. A., Cordey, J. et Perren, S. M.: "Effect of animal species and age on plate-induced vascular damage in cortical bone." Arch Orthop Trauma Surg **111**: 78-84 (1992)

Newman, E., Turner, A. S. et Wark, J. D.: "The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models." Bone **16**: 277-284 (1995)

Niedhart, C., Maus, U., Redmann, E. et Siebert, C. H.: "In vivo testing of a new in situ setting beta-tricalcium phosphate cement for osseous reconstruction." J Biomed Mater Res **55**: 530-537 (2001)

Ohura, K., Bohner, M., Hardouin, P., Lemaitre, J., Pasquier, G. et Flautre, B.: "Resorption of, and bone formation from, new beta-tricalcium phosphate- monocalcium phosphate cements: an in vivo study." J Biomed Mater Res **30**: 193-200 (1996)

Pasquier, G., Lemaitre, J., Flautre, B., Ikenaga, M. et Hardouin, P.: "Development of a model which makes it possible to test injectable bone substitutes and evaluation of a calcium phosphate cement." Bull Acad Natl Med **182**: 1851-1864 (1998)

Peraus, M.: "Knöcherner Integration und Biokompatibilität oberflächenmodifizierter Keramiken im Schafsmodell." Dissertationsschrift der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München (2002)

Rueger, J. M.: "Knochenersatzmittel. State of the art und: Wohin gehen wir?" Unfallchirurg **99**: 228-236 (1996)

Rueger, J. M.: "Knochenersatzmittel. Heutiger Stand und Ausblick.." Orthopäde **27**: 72-79 (1998)

Sanchez-Sotelo, J., Munuera, L. et Madero, R.: "Treatment of fractures of the distal radius with a remodellable bone cement: a prospective, randomised study using Norian SRS." J Bone Joint Surg Br **82**: 856-863 (2000)

Sarkar, M. R., Wachter, N., Patka, P. et Kinzl, L.: "First histological observations on the incorporation of a novel calcium phosphate bone substitute material in human cancellous bone." J Biomed Mater Res **58**: 329-334 (2001)

Schorlemmer, S., Gohl, C., Iwabu, S., Ignatius, A., Claes, L. et Augat, P.: "Effects of glucocorticoids on density, structure and mechanical properties of trabecular bone." 49th Annual Meeting of the Orthopedic Research Society, New Orleans: 1049 (2003)

Shao, J., Sarkar, M., Kinzl, L., Claes, L. et Luo, Y.: "Resorbable calcium phosphate cement augmentation of pedicle screw fixation in the human lumbar spine." Hong Kong Journal of Orthopedic Surgery **4**: 2-10 (2000)

Stürmer, K. M. et Schuchardt, W.: "Neue Aspekte der gedeckten Marknagelung und des Aufbohrens der Markhöhle im Tierexperiment. III. Knochenheilung, Gefäßversorgung und Knochenumbau." Unfallheilkunde **83**: 433-445 (1980)

Stutzle, H., Hallfeldt, K., Mandelkow, H., Kessler, S. et Schweiberer, L.: "Knochenneubildung durch Knochenersatzmaterialien." Orthopäde **27**: 118-125 (1998)

Thieme, V. et Müller, E.: "Filling cystic bone defects with surface-modified alpha-TCP. A clinical, radiographical and histological study." Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschirurgie **12**: 18-24 (1988)

Thomas, T., Vico, L., Skerry, T. M., Caulin, F., Lanyon, L. E., Alexandre, C. et Lafage, M. H.: "Architectural modifications and cellular response during disuse-related bone loss in calcaneus of the sheep." J Appl Physiol **80**: 198-202 (1996)

Thorndike, E. A. et Turner, A. S.: "In search of an animal model for postmenopausal diseases." Front Biosci **3**: 17-26 (1998)

Vanderschot, P., Schepers, E., Vanschoonwinkel, A. et Broos, P.: "A newly designed vertebral replacement implant to reconstruct the thoracolumbar spine anteriorly." Acta Chir Belg **102**: 37-45 (2002)

Wissing, H.: "Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspezies für experimentelle Untersuchungen am Knochen." Hefte zur Unfallheilkunde **212**: 479-488 (1990)

Yetkinler, D. N., Ladd, A. L., Poser, R. D., Constantz, B. R. et Carter, D.: "Biomechanical evaluation of fixation of intra-articular fractures of the distal part of the radius in cadavera: Kirschner wires compared with calcium-phosphate bone cement." J Bone Joint Surg Am **81**: 391-399 (1999)

Yuan, H., de Bruijn, J. D., Li, Y., Feng, J., Yang, Z., de Groot, K. et Zhang, X.: "Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissue of dogs: a comparative study between porous alpha-TCP and beta-TCP." J Mat Sci: Materials in Medicine **12**: 7-13 (2001)

Yuan, H., Kurashina, K., de Bruijn, J. D., Li, Y., de Groot, K. et Zhang, X.: "A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics." Biomaterials **20**: 1799-1806 (1999)

Yuan, H., Li, Y., de Bruijn, J. D., de Groot, K. et Zhang, X.: "Tissue responses of calcium phosphate cement: a study in dogs." Biomaterials **21**: 1283-1290 (2000)

Zimmermann, R., Gabl, M., Lutz, M., Angermann, P., Gschwentner, M. et Pechlaner, S.: "Injectable calcium phosphate bone cement Norian SRS for the treatment of intra-articular compression fractures of the distal radius in osteoporotic women." Arch Orthop Trauma Surg **123**: 22-27 (2003)

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Lutz Claes möchte ich dafür danken, dass er mir die Möglichkeit geboten hat an seinem Institut zu promovieren. Sein kritischer Blick und seine Ratschläge waren oft notwendig, um auch die feinen Details der Materie zu entdecken und sich ihnen zu widmen. Seine Ansprüche bzgl. der Vortragstechnik gaben einem die Möglichkeit, mit den gestellten Aufgaben zu wachsen.

Mein herzlichster und verbindlichster Dank gilt PD Dr. Anita Ignatius, die von Anfang an unermüdlich dazu bereit war, mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Ihre Bereitschaft, die Arbeit mit Korrekturen immer wieder auf den richtigen Pfad zu leiten und ihr ermunterndes Wort zeugen von großem Engagement und einer hervorragenden Betreuung der Doktoranden.

Herrn PD Dr. Peter Augat danke ich für die Beratung in statistischen Fragen und der Programmierung der Software für die Bildverarbeitung.

Herrn Prof. R. Brenner (Leiter der Sektion Biochemie der Gelenks- und Bindegewebserkrankungen am RKU Ulm) danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferats.

Frau Müller-Mollenar und ihrem Histo-Team danke ich herzlich für die Einarbeitung in histologische Arbeitstechniken und jegliche Mithilfe bei der Herstellung der Präparate.

Ich danke allen Mitarbeitern im Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, die ich hier nicht explizit erwähnt habe, die jedoch mit ihrer Diskussionsbereitschaft und mit ihrem Rat zu dieser Arbeit in irgendeiner Form beigetragen haben.

„Last but not least“ gilt mein Dank meiner Familie, vor allem meinen Eltern und meinen Brüdern, die mich im gesamten Studium bedingungslos unterstützt haben. Ihr Verständnis und ihre Großzügigkeit haben erst alles ermöglicht.