

Aus der Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie

des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Markus Rickert

Thermodesinfizierter Knochen als Knochenersatzmaterial

und als Trägersubstanz im Infekt:

Biomechanische, tierexperimentelle und in vitro Untersuchungen

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Venia Legendi

für das Fach Orthopädie und Unfallchirurgie

der Medizinischen Fakultät

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dr. med. Christian Oliver Fölsch

aus Hamburg

2016

Erklärung zur Habilitation

“Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit bzw. die mir zuzuordnenden Teile im Rahmen einer kumulativen Habilitationsschrift, selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere, dass ich für die nach §2 (3) der Habilitationsordnung angeführten bereits veröffentlichten Originalarbeiten als Erst- oder Seniorautor fungiere, da ich den größten Teil der Daten selbst erhoben habe, für das Design der Arbeiten verantwortlich bin und die Manuskripte maßgeblich gestaltet habe. Für alle von mir erwähnten Untersuchungen habe ich die in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegten Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass alle an der Finanzierung der Arbeiten beteiligten Geldgeber in den jeweiligen Publikationen genannt worden sind. Ich versichere außerdem, dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde oder Gegenstand eines anderen Prüfungsverfahrens war. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

Meinen Eltern

Meiner Familie

1. Einleitung

1.1. Historische Entwicklung der Knochenbanken und der Lagerungstemperatur	1
1.2. Klinische Ergebnisse der Knochentransplantation.....	2
1.3. Einfluss von Knochenbankprozeduren auf Eigenschaften des Knochens.....	3
1.4. Klinische Bedeutung der Knochenbanken.....	4
1.5. Lokale antibiotische Therapie in der Knochenchirurgie.....	5

2. Fragestellungen und Thematik der Studien.....7

3. Zusammenfassung der einzelnen Publikationen

3.1. Effekt der Lagerungstemperatur auf allogene Knochentransplantate.....	9
3.2. Einfluss der Thermodesinfektion und Dauer der Kryokonservierung bei verschiedenen Lagerungstemperaturen auf die Auszugskraft von spongiösen Knochen.....	13
3.3. Effekt der Thermodesinfektion auf mechanische Parameter spongiösen Knochens.....	16
3.4. Biokompatibilität von Polymer-Glaskeramik-Zement Cortoss®: In-vitro-Testung mit dem MG63-Zell-Modell.....	19
3.5. Beschichtung mit einer neuen Gentamicinpalmitatformel verhindert implantat-assoziierte Osteomyelitis induziert, durch Methicillin-sensiblen Staphylococcus aureus im Rattenmodell....	22
3.6. Systemische antibiotische Therapie verbessert das Ergebnis einer implantat-assoziierten Osteomyelitis induziert, durch Methicillin-sensiblen Staphylococcus aureus im Rattenmodell nicht signifikant.....	26
3.7. Lyophilisiertes allogen Knochengewebe als Trägersubstanz für Antibiotika.....	30

4. Zusammenfassung	34
5. Fazit	38
6. Danksagung	39
7. Literaturverzeichnis	40

1. Einleitung

1.1. Historische Entwicklung der Knochenbanken und der Lagerungstemperatur

Sir William MacEwen führte 1879 erstmals eine erfolgreiche allogene Knochentransplantation am Menschen durch und beschrieb die Effektivität multipler kleiner Knochentransplantate [1-3]. Plemister schuf 1914 mit der Beschreibung der endostalen Osteogenese eine wichtige Grundlage für die Entwicklung der modernen Knochentransplantation [4] mit zunehmender Verbreitung zu Beginn des 20. Jahrhunderts [5-7]. Lexer berichtete 1908 über die Transplantation von allogenen Knochen [8]. Carrel postulierte 1912 die Notwendigkeit von Knochenbanken [9] und die Entwicklung von Sterilisierungsmethoden wurde diskutiert [9-13]. Thermische Behandlung von Knochentransplantaten wurde 1908 beschrieben [8,14,15] und Gallie publizierte Ergebnisse der Transplantation von autoklavierten Knochen [14]. Empfehlungen zur Lagerung der Knochentransplantate folgten [10,11,16,17]. Ollier diskutierte bereits 1867 eine Lagerungstemperatur von minus 16°C für Knochentransplantate [18]. Albee nahm zellulären Schaden durch Kryokonservierung an und lagerte 1910 allogene Knochen bei einer Temperatur von 4-5°C mit Zusatz von Konservierungsmitteln [5,7]. Inclin und Wilson beschrieben die Lagerung bei -10°C bis -20°C [19-22] und Inclin berichtet 1942 von der erfolgreichen Lagerung autologen Knochens zwischen 37°F und 40°F, entsprechend den Angaben von Bush [19]. Für einen kurzen Zeitraum bis zu drei Wochen hatte Bush eine Lagerungstemperatur von 2-5°C empfohlen und für eine unbestimmte Periode -25°C [19,23]. Hyatt empfahl als optimale Lagerungstemperatur -15°C [24,25]. Die Lagerungstemperatur erniedrigte sich entsprechend weiterer Fortschritte der Kühltechnik bis zu minus 80°C [22,26-28]. Die Empfehlungen zur Lagerungstemperatur wurden nachfolgend in Richtung höherer Temperaturen verändert und für längere Lagerzeiten wurden noch niedrigere Temperaturen empfohlen [26]. Diskutiert wurde der Einfluss der Gefriereschwindigkeit auf Kristallisationsprozesse mit Beeinflussung der Qualität des gelagerten Knochens und eine Lagerungstemperatur von minus 40°C empfohlen [29].

Die ideale Lagerungstemperatur in einer Knochenbank ist nicht bekannt [26]. Der Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Osteoinduktion wird diskutiert [30-32], aber das tatsächliche Aktivitätsniveau von osteoinduktiven Substanzen im Transplantat konnte bisher nicht adäquat

gemessen werden [30,33]. Negative Auswirkungen höherer Lagerungstemperaturen zwischen minus 15°C und minus 30°C auf osteoinduktive Eigenschaften des Knochens konnten nicht konkretisiert werden [34]. Der Einfluss der Lagerungstemperatur und der Dauer der Lagerung auf mechanische und biologische Eigenschaften von Knochentransplantaten nach verschiedenen Aufbereitungsverfahren werden weiterhin unterschiedlich beurteilt [35-46]. Für die Lagerung von nativer allogener Spongiosa wurde während einer Lagerung bis zu 2 Jahren keine relevante Veränderung der mechanischen Eigenschaften festgestellt [42,47]. Eine Verminderung der biologischen Aktivität von Knochentransplantaten wurde nach längerer Lagerung beschrieben [48], wobei gute Transplantationsergebnisse nach Lagerung zwischen minus 20°C und minus 70°C publiziert sind [22,26,27,34,49]. Weaver konnte keine relevanten Veränderungen des Knochens bei Lagerung in einer handelsüblichen Tiefkühltruhe erkennen und beschrieb keine erkennbaren Auffälligkeiten allogenen Knochens nach 308 Tagen Lagerung [50].

1.2. Klinische Ergebnisse der Knochentransplantation

Klinische Untersuchungen zeigten keinen nachteiligen Effekt höherer Lagerungstemperaturen des Knochentransplantates auf das postoperative Ergebnis [22,25,51]. Gute klinische Ergebnisse der Transplantation wurden berichtet aber perioperative Infektionen waren häufig zu beobachten [22,51]. Bauer lagerte Knochen im Tiermodell für 3 Wochen bei 4-10°C und konnte zufriedenstellende Transplantationsergebnisse feststellen [52]. Bei 80% der Patienten konnte Wilson gute klinische Ergebnisse der Transplantation allogenen Knochens nach Lagerung zwischen minus 10°C und minus 20°C zeigen [22]. Die erfolgreiche klinische Anwendung wurde auch von Tomford und Enneking beschrieben [53]. Nach Lagerung allogenen Knochens bei -70°C zeigten sich nach einem Zeitraum von 2 Jahren bei 101 Transplantationen keine Komplikationen [27], aber auch nach einem mittleren Beobachtungszeitraum von 32.5 Jahren konnte bei 85% guten klinischen Ergebnissen kein Unterschied der knöchernen Inkorporation zwischen autologen und allogenen Knochen nach Lagerung bei minus 17°C festgestellt werden [51].

1.3. Einfluss von Knochenbankprozeduren auf Eigenschaften des Knochens

Die Anforderungen an Knochenersatzmaterial sind vielfältig und bisher gibt es noch kein ideales Implantat [54]. Nachteilige Effekte der Lagerungsdauer von nativen allogenen Knochen bei minus 20°C im Vergleich zu minus 80°C auf die Auszugskraft wurden bis zu einer Lagerung von 2 Jahren nicht nachgewiesen [42,55]. Diverse Untersuchungen zeigten eine vermehrte immunogene Reaktion des Implantatlagers bei einer Lagerungstemperatur von -80°C im Vergleich zu -20°C [56-58], während sich die Antigenität des allogenen Knochens durch sehr tiefe Lagerungstemperaturen auch reduziert zeigte [59] und bei Kryokonservierung mit -70°C eine Verminderung der antigenen Wirkung des Transplantates beschrieben wurde [27,60]. Sehr niedrige Lagerungstemperaturen könnten aufgrund von Denaturierung die Immunantwort steigern [34], hingegen provozierte die Lagerung bei minus 20°C keine Reaktion im Transplantatlager [22]. Eine humorale und zelluläre Antwort auf frische und kryokonservierte Transplantate wurde nachgewiesen und relevante Unterschiede der immunogenen Reaktion auf native und kryokonservierte Knochen konnten nicht festgestellt werden [61], aber trotz Verminderung der Antigenität kommt es weiterhin zum Transplantatversagen [62]. Der Inkorporationsprozess von autologen sowie allogenen Knochen beginnt mit Inflammation und die Verminderung der Antigenität geht einher mit der Reduktion des osteogenen Potenzials [63]. Die Antigenität von nativer Spongiosa beruht im Wesentlichen auf den Markraumbestandteilen, denn allogene Knochen transplantate ohne Markraumbestandteile provozierten keine zelluläre Reaktion des Empfängers [58].

Gute mechanische Primärstabilität und langfristige ossäre Inkorporation sind erwünschte Eigenschaften von Knochen transplantaten [64]. Die Lagerung von Knochen transplantaten bei -20°C verursache keine relevanten Auswirkungen auf die mechanischen Eigenschaften im Vergleich zu minus 70°C [44], aber der Einfluss der Lagerungsdauer und der Temperatur sind auch kontrovers, wobei ein potenzieller Einfluss auf die Kollagenstruktur zur Diskussion steht [32]. Die Eigenschaften des Knochens basieren auf der Integrität des mineralisierten Knochengengerüsts und des Kollagenanteils welcher für die plastische Qualität verantwortlich ist [37,65-67], wobei die elastischen Eigenschaften der knöchernen Komponente zugeordnet wurden [66]. Die Torsionsstabilität determiniert wesentliche

geometrische Eigenschaften von spongiösen Knochen und repräsentiert komplexe Eigenschaften des Knochens [68,69].

1.4. Klinische Bedeutung der Knochenbanken

Die steigende Zahl der Implantation von Endoprothesen führt zu einem Anstieg von Folgeeingriffen mit zunehmendem Bedarf an Knochentransplantaten [64,70-74]. Defekte des knöchernen Implantatlagers erfordern zur suffizienten Verankerung von Implantaten häufig eine Augmentation mit allogenen Knochen [55,75]. Die zementfreie Revisionsendoprothetik in Verbindung mit allogener Knochentransplantation bietet langfristig Vorteile für die knöcherne Verankerung und kann einen Wiederaufbau des Knochenlagers erreichen und somit die Grundlage für eine gute Verankerung bei einer erneuten Revision darstellen [76]. Die Implantatverankerung mit PMMA-Zement weist biologische Nachteile auf [77-84], kann aber zur Gewährleistung einer primären Belastbarkeit erforderlich sein, weshalb Zement mit verbesserter Biokompatibilität oder eine andere biologische stabile Verankerung wünschenswert sind [85,86]. Die Verfügbarkeit von autologen Knochenersatzmaterial ist begrenzt und synthetische Materialien sind kostspielig und weisen mechanische Defizite auf [87,88]. Auch allogene Transplantate stehen nicht unbegrenzt zur Verfügung und die Kosten der Transplantate ebenso wie Sicherheitsaspekte sind zu berücksichtigen [89-93]. Kommerziell erhältliche allogene Knochenersatzstoffe stammen von Lebendspendern oder werden postmortal generiert. Während der Implantation einer Hüftendoprothese werden die humanen Femurköpfe entnommen und unmittelbar anschließend der Knochenbankprozedur unterzogen. Die Thermodesinfektion humaner Femurköpfe ist eine kostengünstige validierte Knochenbankprozedur [89-93]. Der Betrieb einer abteilungsinternen Knochenbank gewährleistet jederzeit Zugriff auf Knochentransplantate [89]. Das Marburger Knochenbankmodell führt die Sterilisierung lediglich thermisch durch und inaktiviert sämtliche bekannte Viren [90,91]. Jede Desinfektionsmethode und Knochenbankprozedur beeinflusst die Eigenschaften des Knochentransplantates, wobei biologische und mechanische Eigenschaften von einigen Desinfektionstechniken erheblich beeinträchtigt werden

[39]. Die Verwendung von nativen kryokonservierten allogenen Knochen vermeidet dies, beinhaltet aber ein höheres Infektionsrisiko [26,90,91].

1.5. Lokale antibiotische Therapie in der Knochenchirurgie

Das Infektionsrisiko steigt bei Revisionseingriffen und im Zusammenhang mit großen Implantaten sowie knöchernem Fremdmaterial erheblich [73,74,94,95]. Die lokale Applikation von Antibiotika in Form antibakterieller Beschichtung von Implantatoberflächen gewinnt deshalb zunehmend an Bedeutung [96,97]. Passiv wirkende Beschichtungen von Implantaten können die bakterielle Besiedlung eines Implantates verhindern, entfalten aber in der Umgebung des Implantates keinen weiterreichenden antibakteriellen Effekt. Bei septischen Revisionseingriffen ist aber eine lokale Freisetzung von Antibiotika in therapeutischen Konzentrationen zur aktiven Therapie vorteilhaft. Bakterielle Besiedlung kann zu Biofilmbildung führen und eine Entfernung des Implantates bedingen. Die Beschichtung von Knochenersatzmaterial zusätzlich zur Endoprothesenoberfläche könnte eine weitere Reduktion der Infektionsrate bei Revisionseingriffen bewirken. Die Beimischung von Antibiotika zu PMMA-Zement ist bereits eine etablierte Methode für die lokale antibiotische Therapie bei septischen Revisionseingriffen. Die Auswahl des beigemischten Antibiotikums ist aber aufgrund der thermischen Effekte eingeschränkt und spongiöse Trägersubstanzen versprechen ein größeres sofort verfügbares Freisetzungspotenzial der Antibiotika [77,86,98]. Eine rasche Freisetzung hoher lokaler antibiotischer Konzentrationen könnte die Besiedlung von Implantaten bestmöglich verhindern und auch vermeintlich resistente Bakterien inaktivieren [99]. Für die zementfreie Implantation steht ein vergleichbar standardisiertes Verfahren noch nicht zur Verfügung [100].

Wesentlich für die Wirksamkeit der systemischen antibiotischen Behandlung von Infektionen des Knochens ist die zu erreichende maximale Konzentration am Implantatlager. Andere Faktoren wie das lokale biochemische Milieu und der niedrige Sauerstoffpartialdruck dürften auch einen Einfluss auf Prozesse in der Grenzzone zwischen Implantat und der Umgebung haben [101,102]. Hohe lokale Konzentrationen von Antibiotika sind erforderlich, um multiresistente Bakterien zu therapieren und

Biofilmbildung zu verhindern [103-105]. Entsprechend wirksame Konzentrationen sind im Bereich von transplantierten Knochen nach systemischer Applikation nicht zu erwarten und toxische Nebenwirkungen können die effektive Wirksamkeit von Antibiotika beeinträchtigen und die Dosis limitieren [106,107]. Es bleibt zu klären in welcher Form systemische und lokale Antibiotikatherapie synergistisch wirken können, um potenziell eine Verringerung von Nebenwirkungen zu erreichen [80,100,105,108-113]. Eine synergistische Wirkung am Implantatlager ist denkbar, aber auch eine systemische Wirkung der lokal applizierten Antibiotika kann nicht ausgeschlossen werden. Die Auswirkungen von lokal applizierten Antibiotika auf die ossäre Integration sind dosisabhängig zu berücksichtigen [107,114,115]. Nicht hinreichend hohe antibiotische Konzentrationen oder nicht ausreichende Einwirkungszeiten von Antibiotika im Bereich der Implantation können zur Ausbildung von Resistenzen und Biofilmbildung führen [107,116-118]. Die Bakterien können sich dann der Diagnostik und effektiven Therapie entziehen [106,107]. Eine hohe Eradikationsrate durch gesteigerte lokale Antibiotikumkonzentration könnte der Resistenzbildung entgegen wirken und zudem die Behandlungsdauer erheblich verkürzen, die klinischen Ergebnisse verbessern und Kosten senken. Zu berücksichtigen sind zudem erhebliche Nebenwirkungen und finanzielle Aufwendungen einer langwierigen systemischen antibiotischen Behandlung.

Zur Therapie eines bakteriell besiedelten Implantatlagere ist eine längerfristige Freisetzung antimikrobiell wirksamer Konzentrationen von Antibiotika sinnvoll. Die Porosität der Knochenstruktur hat Einfluss auf die Knochenoberfläche und somit auf die potenzielle Speicherkapazität des Transplantates für Antibiotika, hingegen verringert sich die mechanische Festigkeit mit zunehmender Porosität [118]. Wünschenswert ist eine Trägersubstanz mit idealer Freisetzung des Antibiotikums und gleichzeitiger Fähigkeit einer ossären Integration sowie adäquater primärer Stabilität [119].

2. Fragestellungen und Thematik der Studien

Der Bedarf für allogene Knochentransplantate wächst stetig und die Lagerungsbedingungen sind international nicht einheitlich. Die Lagerung allogenen Knochens in Knochenbanken, bei lediglich minus 20°C, ist mit einer Verringerung von Kosten verbunden und könnte die Verfügbarkeit von allogenen Knochen verbessern. Es bestehen noch Vorbehalte bezüglich einer längeren Lagerung bei minus 20°C. Zunächst erfolgte eine Analyse der Empfehlungen zur Lagerungstemperatur sowie Lagerungsdauer von Transplantaten in Knochenbanken und eine Diskussion der gesicherten wissenschaftlichen Erkenntnisse [26]. Die klinischen Ergebnisse der Transplantation von Knochen nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen werden in die Erörterung einbezogen.

Erkenntnisse der Auswirkungen einer längerfristigen Lagerung thermisch behandelten spongiösen Knochens bei verschiedenen Temperaturen lagen nicht vor. Der Einfluss der Lagerung von thermodesinfizierten Knochen bei minus 20°C im Vergleich zu minus 80°C wurde von uns deshalb, im Hinblick auf mechanische Eigenschaften mittels Messung der Auszugskraft bis zu einem Zeitraum von 2 Jahren untersucht [55]. Weitere biomechanische Eigenschaften sind für die klinische Anwendung von Bedeutung. Der mögliche Einfluss der Thermodesinfektion des Marburger Knochenbankmodells auf Torsionssteifigkeit, Biegebelastung und Kompressionsbelastung der allogenen Spongiosa war Gegenstand zusätzlicher Untersuchungen [120]. Es blieb festzustellen, ob der Einsatz des thermodesinfizierten Knochens unter Berücksichtigung der mechanischen Eigenschaften Einschränkungen unterliegt und somit klinisch relevante Unterschiede zum nativen allogenen Knochentransplantat bestehen.

Beim zunehmenden Trend zur zementfreien Revision von Endoprothesen ergibt sich die Notwendigkeit, knöcherne Defekte vorzugsweise mit ossär integrierbarem Knochenersatzmaterial zu füllen, um eine gute primäre Verankerung mit einer späteren knöchernen Integration zu kombinieren. Modifikationen von PMMA-Zement könnten möglicherweise eine Veränderung biologischer Eigenschaften sowie eine Verbesserung der ossären Integration bedingen. Entsprechend erfolgte eine Untersuchung der Biokompatibilität von PMMA-Zement mit Glaskeramikanteil im Vergleich zu

einem resorbierbaren Calciumphosphatzement in einem in vitro Zell-Modell mit Simulation der Frühphase der Implantation [86].

Hohe lokale Konzentrationen von Antibiotika sind erforderlich um Infektionen von orthopädischen Implantaten in der Frühphase erfolgreich zu therapieren oder zu verhindern. Die Freisetzung initial hoher Dosen der Antibiotika sowie auch eine prolongierte Wirkungsdauer sind wünschenswert. Die Effektivität einer neuen antibiotischen Implantatbeschichtung zur lokalen antibakteriellen Therapie war deshalb Gegenstand von Untersuchungen. Die Wirksamkeit einer vollständig löslichen Applikation von lipophilem Gentamicin-Palmitat auf einem intramedullär im Rattenfemur platzierten Titankörper gegen eine iatrogene Markrauminfektion wurde über einen Zeitraum von 6 Wochen untersucht [121].

Der Stellenwert einer kombinierten lokalen und systemischen Applikation von Antibiotika wird unterschiedlich beurteilt. Ein möglicher Synergismus zwischen Implantatbeschichtung und systemischer intraperitonealer Antibiotikagabe wurde aus diesem Grund zusätzlich untersucht [108]. Mechanische Stabilität und die Möglichkeit der ossären Integration der Trägersubstanz eines Antibiotikums sind vorteilhaft für die klinische Anwendung im Zusammenhang mit orthopädischen Implantaten und knöchernen Defekten. Die Freisetzungskinetik von Antibiotika aus humaner allogener Spongiosa und verschiedenen anderen Knochenersatzstoffen wurde nachfolgend untersucht, um die Kapazität für die ausreichende und rasche Bereitstellung von antibakteriell wirksamen Konzentrationen zu verifizieren [106]. In die Untersuchung wurde auch PMMA-Zement, als bisher etabliertes Verfahren, zur lokalen Freisetzung von Antibiotika einbezogen.

Die Zusammenschau der Ergebnisse sämtlicher Untersuchungen gibt Informationen zur Etablierung eines antibakteriell beschichteten thermodesinfizierten allogenen spongiösen Knochentransplantates. Die Verwendung dieses humanen allogenen Knochens für die zementfreie Revisionsendoprothetik, insbesondere septische Verläufe, könnte ebenso wie nicht behandelte nativer humaner Knochen, eine Alternative zur Verwendung von PMMA-Zement als Trägersubstanz für Antibiotika darstellen.

3. Zusammenfassung der einzelnen Publikationen

3.1. Effekt der Lagerungstemperatur auf allogene Knochentransplantate

Einleitung

Die ideale Lagerungstemperatur zur Kryokonservierung ist bisher nicht bekannt [34,49,63,122,123]. In den 1940er und 1950er Jahren lagen die Lagerungstemperaturen der Knochenbanken höher als heute und klinische Untersuchungen zeigten keinen signifikanten nachteiligen Effekt höherer Lagerungstemperaturen des Knochentransplantates auf das postoperative Ergebnis [22-25,29,51]. Eine relevante Beeinträchtigung biologischer und mechanischer Eigenschaften der Knochentransplantate durch Lagerung bei höheren Temperaturen ist nicht gesichert. Nach der Etablierung der Knochenbank in Bethesda durch Hyatt mit einer Lagerungstemperatur von mindestens -15°C wurden entsprechende Einrichtungen auch in Europa eingerichtet [24,25]. Verschiedene Lagerungstemperaturen wurden hinsichtlich der Lagerungsdauer angeraten und international besteht keine einheitliche Regulierung der Lagerungstemperatur und mit Gründung entsprechender Fachgesellschaften wurden unterschiedliche Empfehlungen getroffen [124-126].

Methode

Die Empfehlungen verschiedener nationaler und internationaler Fachgesellschaften und Institutionen werden in Hinblick auf zugrunde liegende objektivierbare Aspekte diskutiert. Zu berücksichtigen sind hierbei auch politische Vorgaben der Europäischen Union. Es wird untersucht in welcher Form wissenschaftlich begründete Erkenntnisse für die Festlegung einer bestimmten Lagerungstemperatur vorliegen. Unterschiedliche Lagerungstemperaturen und diverse Knochenbankprozeduren werden im Hinblick auf die mechanischen und biologischen Auswirkungen auf den allogenen Knochen und somit die Funktion der Transplantate betrachtet. Auswirkungen von Verfahrenstechniken auf die Sicherheit von Knochenbanken sind zu berücksichtigen.

Ergebnisse

Die „American Association of Tissue Banks“ (AATB), gegründet 1976 war Pionier gefolgt von der Gründung der „European Association of Tissue Banks“ (EATB) 1991 und entsprechend der Direktive der EU 2004/23/EC erfolgte die Abfassung der „Common Standards for Tissue and Cells Banking“ zur Regulierung von Spendern, Implantattestung, Verarbeitung und Lagerungsbedingungen von humanen Gewebe und Zellen. Eine Spezifizierung der Lagerungstemperatur wird in der Direktive 2006/17/EC (EU 2/2006) nicht vorgegeben. Lediglich eine maximale Lagerung bis zu 5 Jahren wird empfohlen und die Transplantate sollen die strukturellen und biomechanischen Eigenschaften bewahren. Die Verordnung von 2006 führte zur Einführung der Transplantationsgesetz (TPG)-Gewebeverordnung und zur Aktualisierung des Arzneimittelgesetzes. Eine Novellierung des deutschen Arzneimittelgesetzes (DAG) erfolgte im Jahr 2008 und die Bundesärztekammer empfahl Lagerung bei minus 70°C wobei auch die Lagerung bei minus 80°C weiterhin angegeben wurde [27-29,124,126]. Die kurzfristige Lagerungstemperatur von minus 70°C für allogene Knochen transplantate und nachfolgend von minus 30°C für 6 Monate wurde von Volkov bereits 1970 beschrieben [59]. Neuere Empfehlungen von EATB und AATB haben die Lagerungstemperatur ebenso angehoben (DAG 1976 - Deutsches Gewebegesetz 2007). Für einen Zeitraum von bis zu 6 Monaten wird von der AATB eine Lagerung bei -20°C als geeignet angesehen und für längere Perioden -40°C (AATB 2008). Entsprechend des Bundesarzneimittelgesetzes wurden in Deutschland Genehmigungen zur Lagerung zwischen -35°C und -45°C für die Dauer bis zu 2 Jahren erteilt. Die EATB empfiehlt die Lagerung bei -40°C (EATB 2004). Die abgeleiteten Leitlinien für technische (2006/17/EC) und biologische Aspekte (2006/86/EC) enthalten keine genauen Angaben zur Lagerungstemperatur.

Diskussion

Die ideale Lagerungstemperatur in einer Knochenbank ist nicht bekannt, wobei gute Ergebnisse bei Lagerung zwischen minus 20°C und minus 70°C publiziert sind [22,28,34,49]. Weaver konnte keine relevanten Veränderungen des Knochens bei Lagerung in einer handelsüblichen Tiefkühltruhe erkennen und beschrieb keine erkennbaren Auffälligkeiten allogenen Knochens nach 308 Tagen Lagerung [50]. Die Lagerungstemperatur für tiefgekühlte Lebensmittel in den USA beträgt seit März

1930 exakt 0°F entsprechend -17,8°C und die Richtlinie 89/108/EWG zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten der EU sieht für eine Lagerung von Lebensmitteln eine Temperatur von -18°C vor. Bei einer Lagerung von -18°C sei mikrobielle Aktivität nicht vorhanden und Zellen wiesen unterhalb einer Temperatur von minus 15°C keinen Stoffwechsel auf [29]. Die enzymatische Autolyse sei im Bereich -20°C bei einer längeren Lagerung hingegen nicht sicher auszuschließen aber bei -30°C [28,29,44]. Bei -20°C wurde eine Proteolyse von 1% festgestellt [127] und Knochentransplantate waren nur in seltenen Fällen ursächlich für eine Infektion [128]. Aufbereitungsprozeduren des Knochens eliminieren enzymatische Aktivität im allogenen Knochen und Kollagenase wird unterhalb von -80°C inaktiviert [28]. Die Bedeutung des eutektischen Punktes von Knochen bei minus 28°C für die Lagerungstemperatur wurde diskutiert und zur Vermeidung von Eiskristallbildung eine Lagerung bei -39°C bis -40°C vorgeschlagen [29,129]. Die aktuellen Empfehlungen der EATB und AATB geben höhere Lagerungstemperaturen zwischen minus 20°C und minus 40°C in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer vor, ohne nachweisbaren negativen Einfluss auf die klinischen Ergebnisse der Knochentransplantation [22,25,51].

Diverse Untersuchungen zeigten eine vermehrte immunogene Reaktion des Implantatlagers bei einer Lagerungstemperatur von -80°C im Vergleich zu -20°C [56-58], während die Antigenität des allogenen Knochens durch sehr tiefe Lagerungstemperaturen reduziert war [59] und bei Kryokonservierung mit -70°C eine Verminderung der antigenen Wirkung des Transplantates beschrieben wurde [27,60]. Die Antigenität von nativen spongiösen Präparaten zeigte sich größer als bei kryokonservierten Knochen [33,130] und Denaturierung beeinflusste die Antigenität mehr als die Kryokonservierung [131]. Bereits Burwell favorisierte die Lagerung bei -20°C, allerdings sollten zelluläre Infiltration in der Frühphase und unterschiedliche metabolische Aktivitäten berücksichtigt werden [22,56,57,132]. Kollagenmatrix erwies sich als lokales Antigen mit Stimulation von Zellproliferation und Differenzierung mesenchymaler Zellen [60]. Gute klinische Ergebnisse der Transplantation allogenen Knochens nach Lagerung zwischen minus 10°C und minus 30°C konnten gezeigt werden [19,21,22]. Es ergibt sich kein sicherer Nachweis der Überlegenheit einer bestimmten Lagerungstemperatur kälter als -20°C bezüglich klinischer Ergebnisse der Knochentransplantation. Es

ist zu diskutieren ob eine Lagerung bei -20°C ohne Beschränkung der Dauer der Lagerung als geeignet betrachtet werden kann [19,21-23,50].

Fazit

Negative Auswirkungen einer Lagerungstemperatur von -20°C auf mechanische Eigenschaften zeigten sich nicht und Sterilisierungsverfahren sollten das Risiko der Proteolyse eliminieren. Die Lagerung von thermodesinfizierten Knochen bei -20°C für mindestens 2 Jahre kann empfohlen werden und nachteilige biologische Aspekte für nativen Knochen sind bei gleicher Lagerung nicht zu erwarten. Das Paul-Ehrlich-Institut folgte mit dem Schreiben vom 20. Oktober 2016 (PEI.H03410.01.1) unserer Änderungsanzeige gemäß § 29 Abs. 2a Nr. 4 Arzneimittelgesetz (AMG). Humane thermodesinfizierte Femurköpfe können dementsprechend nun für einen Zeitraum bis zu 2 Jahren gefrierkonserviert bei minus 20°C gelagert werden.

Effect of Storage Temperature on Allograft Bone

Christian Fölsch^a Wolfram Mittelmeier^b Uwe Bilderbeek^c Nina Timmesfeld^d
Thomas von Garrel^e Hans Peter Matter^f

^a Department of Orthopedic Surgery University Hospital Marburg,

^b Department of Orthopedic Surgery University Hospital Rostock,

^c Orthopedic Practice Grünberg, Gießen,

^d Department of Biometry, University of Marburg,

^e Department of Orthopedic and Trauma Surgery, St. Willehad Hospital Wilhelmshaven,

^f Orthopaedic Clinic and Practice GNG, Gießen, Germany

Keywords

Allogeneic bone graft · Temperature and duration storage
bone bank · Biomechanical and biological properties ·
Processing and sterilization procedures · European directives

Summary

Background: The recommendations for storage temperature of allogeneic bone are varying between -20°C and -70°C and down to -80°C . The necessary temperature of storage is not exactly defined by scientific data, and the effect of different storage temperatures onto the biomechanical and the biological behavior is discussed controversially. **Methods:** The historical development of storage temperature of bone banks is described. A survey on literature concerning the biomechanical and biological properties of allograft bone depending on the procurement and storage temperature is given as well as on national and international regulations on storage conditions of bone banks (European Council, American Association of Tissue Banks (AATB), European Association of Tissue Banks (EATB)). **Results:** Short-term storage up to 6 months is recommended with -20°C and -40°C for a longer period (AATB), and EATB recommends storage at -40°C and even -80°C while the regulations of the German Medical Association (Bundesärztekammer) from 2001 recommend storage at -70°C . Duration of storage at -20°C can be maintained at least for 2 years. The potential risk of proteolysis with higher storage temperatures remains, but a definite impairment of bone ingrowth due to a storage at -20°C was not shown in clinical use, and no adverse biomechanical effects of storage at -20°C could be proven. **Conclusion:** Biomechanical studies showed no clinically relevant impairment of biomechanical properties of cancellous bone due to different storage temperatures. Sterilization procedures bear the advantage of inactivating enzymatic activity though reducing the risk of proteolysis. In those cases a storage temperature of -20°C can be recommended for at least a period of 2 years, and the risk of undesired effects seems to be low for native unprocessed bone.

Schlüsselwörter

Allogenes Knochentransplantat · Lagerungstemperatur und
Lagerungsdauer Knochenbank · Biomechanische und biologische
Eigenschaften · Sterilisation und Aufbereitung ·
Europäische Richtlinien

Zusammenfassung

Hintergrund: Die Empfehlungen für die Lagerungstemperatur von allogenen Knochentransplantaten schwanken zwischen -20°C und -70°C und bis zu -80°C . Detaillierte wissenschaftliche Daten zur exakten Definierung einer Lagerungstemperatur liegen nicht vor, und der Effekt verschiedener Lagerungstemperaturen auf die biomechanischen und biologischen Eigenschaften wird kontrovers diskutiert. **Methoden:** Die historische Entwicklung der Lagerungstemperatur wird beschrieben und ein Überblick über die Literatur bezüglich biomechanischer und biologischer Eigenschaften von allogenen Knochen in Abhängigkeit von Verarbeitung und Lagerungstemperatur sowie die nationalen und internationalen Regulierungen zu Lagerungsbedingungen der Knochenbank (European Council, American Association of Tissue Banks (AATB), European Association of Tissue Banks (EATB)) gegeben. **Ergebnisse:** Es wird keine einheitliche Lagerungstemperatur empfohlen. Die kurzzeitige Lagerung bis zu 6 Monaten kann bei -20°C und längere Lagerung bei -40°C erfolgen (AATB); die EATB empfiehlt eine Lagerung bei -40°C und bis zu -80°C , während die deutsche Bundesärztekammer (2001) eine Lagerung bei -70°C vorschlägt. Die Lagerungsdauer kann bei -20°C mindestens 2 Jahre betragen. Proteolyse ist ein potenzielles Problem bei höheren Lagerungstemperaturen, aber eine Verschlechterung der ossären Integration von Knochentransplantaten bei Lagerungstemperatur von -20°C konnte nicht bewiesen werden, und nachteilige Effekte der Lagerung bei -20°C auf biomechanische Eigenschaften wurden nicht festgestellt. **Schlussfolgerung:** Die Lagerungstemperatur von -20°C beeinflusst die biomechanische Qualität von spongiösen allogenen Knochentransplantaten im Vergleich zu einer Lagerung bei tieferen Temperaturen nicht negativ. Da Sterilisationsverfahren Enzyme inaktivieren, wird Proteolyse reduziert oder vermieden. Für derartig behandelte Transplantate kann eine Lagerungstemperatur bei -20°C empfohlen werden. Für native allogene Knochentransplantate scheint das Risiko von unerwünschten Auswirkungen gering zu sein.

Introduction

MacEwen performed the first interhuman transplantation in a case of osteomyelitis in 1878, and Lexer reported the use of bone allografts in 1908. The necessity for storage of bone has been proclaimed early in the last century by Carrell in 1912, and Inclin, Cloward and Bush made the beginning of modern bone banking due to technical improvements in the 1940s. In March 1930 the first brand distributing deep frozen vegetable was founded in USA and the storage temperature of 0 °F which matches -17.8 °C was implemented. The recommendation of storage at minus 18 °C was continued by the European Guidelines for storage of food (89/108/EWG) [1] and the corresponding national regulations. Different storage temperatures for frozen allogeneic bone between -10 and -196 °C have been discussed [2–5]. The eutectic point of biological tissue is considered relevant for definition of storage temperature which is -21 °C in physiologic salt solution [6]. At the eutectic point of bone at -28 °C maximum ice crystal formation is achieved, and empirically a storage temperature below the eutectic point at -39 to -40 °C was recommended [7]. The absence of free water should inhibit microbial and enzymatic activity. An influence of the temperature and the velocity of freezing onto the biological behavior of the allogeneic bone and the formation of ice crystals were discussed [8–10].

Good clinical results after implantation of allogeneic unprocessed bone were found for storage temperature between -10 and -20 °C [2, 11]. A storage temperature as low as -80 °C for a bone bank has been set empirically [2, 5, 12, 13] and was continued by the German Medical Association (Bundesärztekammer) in 2001 [14]. The costs for this storage procedure are higher compared with a normal fridge. The recommendations of the American Association of Tissue Banks (AATB) [15] and the European Association of Tissue Banks (EATB) [16] and recent interpretations of the German Drug Law (Arzneimittelgesetz) [17, 18] have increased the storage temperature consecutively. As the bone grafts stored within a bone bank are sterile, the question arises whether a storage temperature similar to food could be adequate for bone as well. It remains uncertain whether a relevant affection of biomechanical and biological properties would result from a storage at higher temperature. Proteolytic activity could be expected in fresh frozen allograft bone but processing procedures eliminate enzymatic activity within the bone graft [3, 19]. Though enzymes activity in general appeared to be reduced by freezing, it has to be considered that collagenase gets inactivated below -80 °C [4]. The relevance of a residual enzymatic activity onto the quality of the transplant seems unclear, but chemical alterations due to oxidation are known to reduce vitamin content of food and influence its quality and taste. A shorter period of storage could eventually minimize the influence of the temperature onto the biomechanical and biological behavior. Storage up to 6 months at -20 °C is being recommended by the AATB [15]. It remains in discus-

sion which is the necessary storage temperature and possible length of storage for allograft bone. For these reasons we had previously studied the influence of storage of cancellous bone at -20 °C and -80 °C up to 2 years onto the biomechanical behavior [20] and did not find any difference between the two storage temperatures.

Recommendations and Regulations on Bone Bank Storage Temperature

In the early time of bone banking during the 1940s and 1950s higher freezing temperatures as nowadays were applied by Bush, Böhler, Wilson and Bürkle de la Camp [7]. In 1947 Bush [21] recommended the storage of bone grafts within sealed containers at a temperature of -25 °C, and in 1951 Wilson [2] reported a freezing temperature between -10 and -20 °C. No general regulations and standards of tissue banking existed at that time. With increasing frequency of transplantation of human tissues, the AATB was established in 1976. The storage temperature of a bone bank was empirically set at -80 °C [12–14]. The demand for harmonization and implementation of standards for tissue banking in Europe became evident after the reunification of Europe and led to the foundation of the EATB in June 1992 while different storage temperatures were still used for bone banking [22]. Within the 1990s further political efforts were made in Europe to harmonize and regulate tissue banking and transplantation. In 2002 the European Council (EC) made a proposal to the European Union Council and the parliament to set standards for tissue banking which resulted in the first supranational framework directive 2004/23/EC [23] regulating donation, procurement, testing, processing, preservation, storage, and distribution of human tissues and cells. Accordingly, the EATB and the European Association of Musculo-Skeletal Transplantation (EAMST) set 'Common Standards for Tissue and Cells Banking' [16]. The necessary storage temperature was only defined to be acceptable. There was no international agreement on a specific storage temperature. In Europe the national regulations are made according to the European Directive 2004/23/EC [23]. The resulting guidelines are 2006/17/EC [24] and 2006/86/EC [25] for technical and biological aspects of tissue banking: during storage the allograft bone should retain its structure and preserve the biomechanical properties, and the limitation of storage up to 5 years is recommended but no exact temperature of storage is stated. The EC directives implemented the German Transplantation Law Tissue Enactment (Transplantationsgesetz (TPG)-Gewebeverordnung) and an update of the Arzneimittelgesetz March 26, 2008 [26].

Recent statements of the AATB recommend a storage temperature of -20 °C for up to 6 months of storage and -40 °C for longer periods of deep frozen preservation [15]. Deeper temperatures of -70 °C were recommended by the Bundesärztekammer 2001 [14] and freezing at even lower

temperature at -80°C is still being performed [27–29]. According to the Arzneimittelgesetz a storage temperature between -35 and -45°C was allowed for bone banks up to 2 years of storage [17]. EATB recommends a storage of -40°C but also considers -80°C [16]. The directive for storage of food in Europe (89/108/EC) recommends a storage temperature of -18°C suppressing all microbiologic activity implementing the German directive [1]. Obeying to these conditions food is being stored longer than 12 months and during transport a temperature up to -15°C can be tolerated temporarily. These recommendations remained unchanged in the recent update of the German regulations on deep frozen food.

Effect of Temperature on Biologic Behavior of the Bone Transplant

The storage temperature should ideally suppress proteolysis and lipolysis and a reduction of immunogenicity due to freezing was assumed [9]. But an increase of storage temperature was found to reduce immunogenicity of a graft but very low temperatures were suspected to increase immune response due to denaturation [8]. Storage at -10 to -20°C evoked no adverse reaction within the host [2]. A long-term follow up of patients who had received bone allografts stored at -17°C in the early 1950s had satisfactory results in 85%, and no difference was found between incorporation of autograft and allograft [11]. Bassett [30] presumed that storage above the eutectic point of -28°C might impair the desired host osteogenic response. The effects of soft tissues, cells, and enzymes of the allograft bone onto the host are not entirely understood. It should be discussed which microstructural changes of the tissue appear primarily due to temperature and secondarily due to enzymatic activity; their effects onto the biologic behavior of the allograft needs to be determined. The inactivation of enzymes does not occur completely at a temperature above -80°C [5] but within processed bone no enzymatic activity leading to degradation should be present [19]. This should be an advantage of thermodisinfection, chemical processing, or irradiation of the allograft bone. Some potential osteoinductive proteins should be present in native allograft, but their activity level and relevance could not be measured [30, 31]. Positive effects of processing procedures onto angiogenesis and incorporation of allograft bone in mice have also been shown for osteochondral grafts [32].

There is evidence that allograft bone might achieve similar clinical results compared with autograft bone indicating that cells attached to the autograft are not essential for the incorporation [2, 11]. No relevant promotion of ingrowth of the graft due to cellular or humoral components of its own can be expected [5, 9]. Fresh allografts were found to induce an immune response due to badly denaturated matrix while preservation with freezing reduced antigenicity [29, 32]. Besides collagen, bone matrix [33], bone itself, and bone marrow induced

antigenic responses [9, 34]. The immunogenic capacity was found to be higher for grafts stored at -79°C than for those stored at -20°C [35–37], indicating that denaturation might be one reason for immunogenic reactions [4, 9]. The study of Burwell [37] was in favor for a storage at only -20°C but early cell infiltrations of the implant and metabolic differences of the cells had to be considered generally [2, 9, 36, 37]. Bush [21] showed the safety of storage at -25°C for an indefinite time for rabbit bone.

After storage of human femoral heads at -80°C for at least 6 months viable cells with osteoblastic characteristics were found and the cell growth was independent of the period of freezing [36] but other studies did not find viable cells after freezing [38, 39]. A negative consequence of the presence of viable cells can be graft rejection. Marrow-free bone grafts showed less reactivity than complete allogeneic bone which provoked cellular and humoral immune response [34] but collagenous matrix itself was found to be locally mitogenic [40]. The host reaction towards the implant should be minimized to enhance the incorporation process, the removal of fat and marrow cells from the implant are recommended, and adverse denaturation of the allograft bone due to processing procedures and storage should be avoided [9, 32, 33]. Biologic changes of the allograft during storage which do not increase host immune reaction should not be relevant for the incorporation of the graft. In the literature there is no proven impact of a higher storage temperature at -20°C onto the suppression of proteolysis in fresh frozen allografts. Fresh frozen food is being stored at -18°C for more than 12 months without unacceptable changes of its quality. Therefore, storage of fresh frozen bone allografts at -20°C seems reasonable. After sterilization procedures no relevant impact onto the biological behavior should be expected. Enzymatic activity leading to structural changes of the graft should be restricted [5, 31]. In combination with processing procedures the alteration of the storage temperature to -20°C can be recommended. In case of fresh frozen allograft bone an adverse effect of the higher storage temperature onto the biological behavior seems unlikely. In a previous study we could show that the biomechanical properties are not more affected by a temperature of -20°C than at -80°C [20]. In the beginnings of bone banking good clinical results were reported after transplantation of bone grafts stored at temperatures higher than -20°C [2]. The storage at -20°C for up to 2 years was supported by our study [20].

Effect of Temperature on Biomechanical Features of Allogeneic Bone

An influence of duration of storage and freezing temperature onto biomechanical properties of bone has been discussed controversially [10]. Linde [10] could not find changes of trabecular structure due to freezing at -20°C for up to 100 days and found only minor effects on stiffness but slight

changes of viscoelastic properties. Elasticity of bone is affected by mineralization while plastic behavior is related to collagen [41, 42] and the strength of the bone graft depends on the interaction of mineral content and collagen [42]. Other studies found no influence of deep freezing at -20°C onto the biomechanical properties neither of goat bone within 12 months of storage [43] nor of rat bone after 2 weeks [3]. No adverse effect onto biomechanical features was shown at lower temperatures of -70 and -196°C [3, 42]. Another study on cadaver vertebrae stored at -18°C up to 7 months revealed no biomechanical change due to freezing [44], but a recent study revealed deterioration of dynamic mechanical properties of bovine femoral bone due to deep freezing [45]. No change of the biomechanical properties of bone was found after up to 5 years of storage at -80°C [19]. The duration of freezing did not affect the biomechanical properties of human osteochondral grafts as well [46]. Our previous study, which in contrast to the study of Salai et al. [19], studied two different temperatures, compared the effect of storage for up to 2 years at -80°C to a higher temperature at -20°C ; no adverse effect of deep freezing onto biomechanical properties even after

2 years was noted [20]. From the biomechanical point of view the storage at -20°C is not inferior to a lower temperature.

Conclusion

The effect of processing procedures onto the quality of the allograft bone has to be considered while biomechanical properties are not adversely affected by storage at -20°C in comparison to lower storage temperatures. Sterilization procedures might reduce or eliminate the risk of proteolysis as enzymes might be inactivated. The storage temperature of -20°C should be recommended for storage of sterilized bone allografts for a period of at least 2 years. No relevant adverse biological effects onto the clinical outcome should be expected for fresh frozen bone allograft stored similarly.

Disclosure Statement

The authors declare no conflict of interest.

References

- 1 German Directive on Deep Frozen Food (TLMV). BGBl I February 22, 2007;8:258, implemented by directive 89/108/EC European Council December 21, 1988, L40, pp 34–37.
- 2 Wilson PD: Follow-up study of the use of refrigerated homogenous bone transplants in orthopaedic operations. *J Bone Joint Surg Am* 1951;33A:307–323.
- 3 Pelker RR, Friedlaender GE, Markham TC, Panjabi MM, Moen CJ: Effects of freezing and freeze-drying on the biomechanical properties of rat bone. *J Orthop Res* 1984;1:405–411.
- 4 Tomford WW, Starkweather RJ, Goldman MH: A study of the clinical incidence of infection in the use of banked allograft bone. *J Bone Joint Surg Am* 1981;63:244–248.
- 5 Tomford WW, Doppelt SH, Mankin HJ, Friedlaender GE: 1983 Bone Bank procedures. *Clin Orthop Rel Res* 1983;174:15–21.
- 6 Kerschbaumer F, Russe W, Weiser G, Bauer R: Cryolesions of bone. An experimental study. Part I: examinations in technique of controlled cryolesion on bone. *Arch Orthop Trauma Surg* 1980;96:5–9.
- 7 Kuner EH, Keller H: Bone banks: equipment, tissue collection, cold preservation, organization, safety (in German). *Orthopäde* 1986;15:16–21.
- 8 Ascherl R, Morgalla M, Geissdörfer K, Schmeller ML, Langhammer H, Lechner F, Blumel G: Experimental studies and clinical aspects of cold-preserved allogeneic spongiosa (in German). *Orthopäde* 1986;15:22–29.
- 9 Burwell RG: Studies in the transplantation of bone. V. The capacity of fresh and treated homografts of bone to evoke transplantation immunity. *J Bone Joint Surg Br* 1963;45B:386–401.
- 10 Linde F, Sorensen HC: The effect of different storage methods on the mechanical properties of trabecular bone. *J Biomech* 1993;26:1249–1252.
- 11 Steinberg EL, Luger E, Zwas T, Katznelson A: Very long-term radiographic and bone scan results of frozen autograft and allograft bone grafting in 17 patients (20 grafts) a30 to 35-year-follow-up. *Cell Tissue Bank* 2004;5:97–104.
- 12 Hart MM, Campbell ED Jr, Kartub MG: Bone banking. a cost effective method for establishing a community hospital bone bank. *Clin Orthop Relat Res* 1986 May;(206):295–300.
- 13 American Association of Tissue Banks: Standards and the American Association of Tissue Banks. McLean, AATB, 1987
- 14 Bundesärztekammer, Wissenschaftlicher Beirat: Richtlinien zum Führen einer Knochenbank. *Dtsch Ärztbl* 2001;98:1011–1016.
- 15 American Association of Tissue Banks: AATB Standards for Tissue Banking (Section E: E4.120 Frozen and Cryopreserved Tissue), ed 12. McLean, AATB, 2008, pp 54–55.
- 16 European Association of Tissue Banking: Common Standards for Tissues and Cells Banking (Section D: D 2.500 Cryopreserved Tissue). Berlin, EATB, July 2003, revised November 2004, p 3.
- 17 German 'Arzneimittelgesetz' (AMG) August 24th 1976 §25(1): Permission to store thermodesinfected human femoral heads between -35°C and -45°C up to 2 years for Tissue Bank Charité Berlin July 7, 2007.
- 18 German 'Gewebegesetz': Directive for quality and safety of human tissue and cells. BGBl 2007;Part I Nr. 35:1580–1581.
- 19 Salai M, Brosh T, Keller N, Perelman M, Dudkiewicz I: The effects of prolonged cryopreservation on the biomechanical properties of bone allografts: A microbiological, histological and mechanical study. *Cell Tissue Bank* 2000;1:69–73.
- 20 Matter HP, Garrel T, Bilderbeek U, Mittelmeier W: Biomechanical examinations of cancellous bone concerning the influence of duration and temperature of cryopreservation. *J Biomed Mater Res* 2001;55:40–44.
- 21 Bush LF: The use of homogenous bone grafts. *J Bone Joint Surg* 1947;29:620–628.
- 22 Müller RT, Patsalis T: Quality of bone transplantation procedure in West German orthopaedic hospitals. *Arch Orthop Trauma Surg* 1994;113:149–152.
- 23 Directive 2004/23/EC March 31, 2004 European Parliament and Council of the European Union Setting Standards of Quality and Safety for the Donation, Procurement, Testing, Processing, Preservation, Storage and Distribution of Human Tissues and Cells. EC Nr.1, 102/48 April 7, 2004.
- 24 Directive 2006/17/EC European Commission February 8, 2006 Implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council Regarding Certain Technical Requirements for the Donation, Procurement and Testing of Human Tissues and Cells. EC L38/40 February 9, 2006.
- 25 Directive 2006/86/EC European Commission October 24, 2006 Implementing Directive 2004/23/EC Concerning Technical Requirements of Processing, Storage and Distribution of Human Tissue and Cells. EC L294/32 October 25, 2006.
- 26 Hansen CA, Mejdahl S, Reimann I: Bone banking in Denmark, results of a nationwide survey. *Dan Med Bull* 1994;41:574–576.
- 27 Santic V, Legovic D: Bone bank at University Department of Orthopedic Surgery in Lovran, Croatia. *Acta Med Croatica* 2007;61:487–489.
- 28 von Auer F: Das Gewebegesetz – Hintergründe und Konsequenzen. *Transfus Med Hemother* 2008; 35:407–413.
- 29 Flören M, Kappe T, Reichel H: Analysis of the effectiveness of an internal hospital bone bank. *Orthopäde* 2007;36:667–672.

- 30 Bassett CA: Clinical implications of cell function in bone grafting. *Clin Orthop* 1972;87:49–59.
- 31 Bormann N, Pruss A, Schmidmaier G, Wildemann B: In vitro testing of the osteoinductive potential of different bone allograft preparations. *Arch Orthop Trauma Surg* 2010;130:143–149.
- 32 Wingenfeld C, Egli RJ, Hempfing A, Ganz R, Leunig M: Cryopreservation of osteochondral allografts: dimethyl sulfoxide promotes angiogenesis and immune tolerance in mice. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84A:1420–1429.
- 33 Friedlaender GE: Bone allografts: The biological consequences of immunological events. *J Bone Joint Surg Am* 1991;73:1119–1122.
- 34 Muscolo DL, Kawai S, Ray RD: Cellular and humoral immune response analysis of bone-allografted rats. *J Bone Joint Surg Am* 1976;58:826–832.
- 35 Heyligers IC, Klein-Nulend J: Detection of living cells in non-processed but deep-frozen bone allografts. *Cell Tissue Bank* 2005;6:25–31.
- 36 Burwell RG, Gowland G, Dexter F: Studies in the transplantation of bone. VI. Further observations concerning the antigenicity of homologous cortical and cancellous bone. *J Bone Joint Surg Br* 1963;45: 597–608.
- 37 Burwell RG: Studies in the transplantation of bone. VII. The fresh composite homograft-autograft of cancellous bone; an analysis of factors leading to osteogenesis in marrow transplants and in marrow-containing bone grafts. *J Bone Joint Surg Br* 1964; 46:110–140.
- 38 Urist MR: Physiologic basis of bone-graft surgery, with special reference to the theory of induction. *Clin Orthop* 1953;1:207–216.
- 39 Urist MR, McLean FC: The local physiology of bone repair with particular reference to the process of new bone formation by induction. *Am J Surg* 1953;85:444–449.
- 40 Rath NC, Reddi AH: Collagenous bone matrix is a local mitogen. *Nature* 1979;278:855–857.
- 41 Hamer AJ, Strachan JR, Black MM, Ibbotson CJ, Stockley I, Elson RA: Biochemical properties of cortical allograft bone using a new method of bone strength measurement. A comparison of fresh, fresh-frozen and irradiated bone. *J Bone Joint Surg Br* 1996;78:363–368.
- 42 Burstein AH, Zika JM, Heiple KG, Klein L: Contribution of collagen and mineral to the elastic-plastic properties of bone. *J Bone Joint Surg Am* 1975;57:956–961.
- 43 van Haaren EH, van der Zwaard BC, van den Veen AJ, Heyligers IC, Wuisman PI, Smit TH: Effect of long-term preservation on the mechanical properties of cortical bone in goats. *Acta Orthop* 2008;79:708–716.
- 44 Panjabi MM, Krag M, Summers D, Videman T: Biomechanical time-tolerance of fresh cadaveric human spine specimens. *J Orthop Res* 1985;3:292–300.
- 45 Mardas M, Kubisz L, Mielcarek S, Biskupski P: The influence of low temperature on dynamic mechanical properties of animal bone. *Pol J Med Phys Eng* 2009;15:153–159.
- 46 Rozen B, Brosh T, Salai M, Herman A, Dudkiewicz I: The effects of prolonged deep freezing on the biomechanical properties of osteochondral allografts. *Cell Tissue Bank* 2009;10:27–31.

3.2. Einfluss der Thermodesinfektion und Dauer der Kryokonservierung bei verschiedenen Lagerungstemperaturen auf die Auszugskraft von spongiösen Knochen

Einleitung

Sterilisierungsverfahren von allogenen Knochentransplantaten im Rahmen verschiedener Knochenbankprozeduren können unerwünschte Auswirkungen auf mechanische und biologische Eigenschaften des Knochens haben [14,27,37,44,47,90,91,131]. Die Entfernung von Blut, Fett und Knochenmarkbestandteilen verbessert aber auch die knöcherne Integration allogenen Knochens erreicht aber nicht die Qualität autologer Transplantate [133,134]. Der Nachweis von Zellen mit osteoblastären Eigenschaften in nativen Knochen nach Kryokonservierung variierte zwischen verschiedenen Spendern von Hüftköpfen und war unabhängig von der Lagerungsdauer bei minus 80°C [135]. Kollagen und Mineralgehalt bedingen als integrale Bestandteile des Knochens dessen biologische und mechanische Eigenschaften [136-143]. Die Thermodesinfektion ist ein guter Kompromiss zwischen mechanischer sowie biologischer Beeinträchtigung und der Sterilisation [144]. Weniger als 14% Reduktion der Auszugsfestigkeit des spongiösen Knochens sind nach Thermodesinfektion maximal zu erwarten und die mittlere Veränderung liegt um 10% [42]. Das Ergebnis ist somit vergleichbar mit anderen Untersuchungen, die bei Temperaturen unter 100°C keine erheblichen Veränderungen des Kollagengerüsts feststellten [145]. Der Einfluss der Temperatur der Kryokonservierung auf thermodesinfizierten im Vergleich zu nativen Knochen blieb festzustellen.

Methodik

Die Auszugskraft wurde bei differenten Lagerungstemperaturen von -20°C und -80°C über einen Lagerungszeitraum bis zu 2 Jahren im Vergleich zwischen thermodesinfizierter und nativ belassener Spongiosa untersucht. Hierzu wurde das Ausrissverhalten von 6.5 mm Spongiosaschrauben aus entsprechend angefertigten Knochenzylindern aus Schweinespongiosa mit einer hydraulischen Testmaschine analysiert. Die 160 Knochenproben wurden aus dem proximalen Humerus von Schweinen im Alter von 6-8 Monaten gewonnen. Der Einfluss der Thermodesinfektion auf die

mechanische Qualität des Knochens wurde auch ohne Lagerungsphase untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte mit „Three-Way ANOVA“ und das Signifikanzniveau wurde bei 5% festgesetzt.

Ergebnisse

Die Thermodesinfektion von Spongiosa im Tiermodell führte zu einer geringfügigen signifikanten Reduktion der Auszugskraft von Spongiosaschrauben. Die mittlere Auszugskraft für thermodesinfizierten Knochen betrug ohne Zwischenlagerung 2729 N während für native Spongiosaprobe ein mittlerer Wert von 2897 N gemessen wurde ($p < 0.0001$). Die mittlere Differenz der maximalen Auszugskraft betrug 275 N mit einem 95% Konfidenzintervall zwischen 166 N und 385 N. Die Auszugskraft wies nach 2 Jahren keine signifikante Differenz zwischen der Lagerung bei minus 20°C und minus 80°C auf. Die native Spongiosa zeigte eine Ausrisskraft von 2809 N bei -20°C im Vergleich zu 2795 N nach Lagerung bei -80°C. Der thermodesinfizierte Knochen hatte bei -20°C eine Ausrisskraft von 2376 N hingegen betrug der Wert 2589 N bei -80°C. Ein Einfluss der Lagerungsdauer auf die untersuchten mechanischen Eigenschaften konnte nicht festgestellt werden.

Diskussion

Es ergibt sich entsprechend der Literatur keine einheitliche Beurteilung der Auswirkung der Lagerungstemperatur auf Materialeigenschaften der Knochentransplantate [32,44]. Die Auszugsfestigkeit von Knochen zeigte sich im Vergleich zur Kompressionsfestigkeit geringer, wobei diese mit dem Knochenmineralsalzgehalt besser korrelierte [137,139]. Thermodesinfektion bei 82.5°C führt zu einer begrenzten Denaturierung und somit sollte von einer Verminderung der Immunogenität des Knochens ausgegangen werden [42], ohne wesentlichen Einfluss auf die Funktion des Kollagens zu haben [30,144,146,147]. Eine Affektion der anorganischen Bestandteile des Knochens konnte unterhalb von 200°C nicht festgestellt werden [145,148]. Eine relevante Veränderung der entsprechenden mechanischen Eigenschaften ist somit nicht zu erwarten. Höhere Temperaturanwendungen führen zu einer Reduktion der Kompressionsfestigkeit auf 60% bei 100°C während bis zu einer Erhitzung von 60°C keine Beeinträchtigung nachgewiesen wurde [144,146,147]. Erhitzen von Knochen bis 100°C verhinderte die Entwicklung einer Immunantwort, denn

Hitzedenaturierung verminderte die Potenz von Histokompatibilitätsantigenen und hatte somit einen potenziell positiven Einfluss auf die ossäre Integration [56,132]. Gleichzeitig führte Erhitzung ab 60°C zu einer Reduktion von Knocheninduktionskapazität und BMP bis zur Inaktivierung bei 100°C [146]. Insgesamt ist analog zu den mechanischen Beeinträchtigungen nur von einer begrenzten Auswirkung der Thermodesinfektion auf biologische Aspekte der Inkorporation sowie das Kollagen auszugehen, während in Gegenwart von autoklavierten Knochen die osteoblastäre Zellproliferation verzögert war [149,150].

Grundsätzliche Einwände gegen eine Lagerung von Knochentransplantaten bei -20°C sind nicht belegt [34,56,57,132,146,151,152]. Die Lagerung allogenen Knochens bei -20°C oder -80°C für 2 Wochen hatte keinen Einfluss auf osteoblastäre Induktion aber nach Lagerung ab 6 Monaten zeigte sich die Aktivität bei minus 20°C reduziert [149]. Die Inkorporation allogenen Knochens nach Hitzeapplikation von 80 °C zeigte sich im Gegensatz zu einer Exposition mit 100°C nicht wesentlich gestört [144]. Bei Lagerung mit -70°C wurde eine geringfügig bessere Knocheninduktion gegenüber einer Lagerungstemperatur von -30°C gemessen [146]. Die untersuchten mechanischen Eigenschaften des thermodesinfizierten Knochens waren in unserer Untersuchung innerhalb von 2 Jahren unabhängig von der Lagerungsdauer und nicht von Lagerung bei -20°C oder -80°C beeinflusst. Ein relevanter Unterschied zur Lagerung nativen Knochens war nicht erkennbar.

Fazit

Entsprechend unserer Untersuchungen ergab sich kein negativer Einfluss einer Lagerung bei minus 20°C oder minus 80°C auf spongiösen Knochen und ebenso war die Lagerungsdauer bis zu 2 Jahren ohne relevanten Einfluss auf die Auszugskraft der thermodesinfizierten Knochentransplantate. Die mittlere Reduktion der Auszugskraft aus spongiösem Knochen durch Thermodesinfektion liegt unterhalb von 10%.

Influence of thermodisinfection and duration of cryopreservation at different temperatures on pull out strength of cancellous bone

Christian Fölsch · Wolfram Mittelmeier · Thomas von Garrel ·
Uwe Bilderbeek · Nina Timmesfeld · Axel Pruss ·
Hans-Peter Matter

Received: 2 January 2014 / Accepted: 21 March 2014 / Published online: 2 April 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract Thermodisinfection of human femoral heads from living donors harvested during hip joint replacement is an established processing procedure. This study was designed to examine the influence of heat sterilization on pull out strength of cancellous bone and storage at different temperatures up to 2 years since we had previously studied the storage of unprocessed cancellous bone. Porcine cancellous bone resembling human bone structure was obtained from 140 proximal humerus of 6–8 months old piglets. Pull out strength of screws after thermodisinfection was compared with unprocessed cancellous bone and tested immediately and after 6, 12 and 24 months of storage at -20 and -80 °C. A three-way ANOVA was performed and significance level was 5 %. The thermodisinfecting bone

showed a pull out force of 2729 N (1657–3568 N). The reduction of pull out strength compared with unprocessed bone over all periods of storage was 276 N on average with 95 % confidence interval ranging from 166 N to 389 N ($p < 0.0001$). Different freezing temperatures did not influence this mechanic property within 24 months storage and showed no difference compared with fresh frozen bone. Thermodisinfection of cancellous bone preserves tensile strength necessary for clinical purposes. The storage at -20 °C for at least 2 years did not show relevant decrease of pull out strength compared with -80 °C without difference between thermodisinfecting and fresh frozen bone. The increase of the storage temperature to -20 °C for at least 2 years should be considered.

C. Fölsch (✉)
Department of Orthopaedic Surgery, Philipps University
Medical School, Philipps University Marburg,
Baldingerstrasse, 35043 Marburg, Germany
e-mail: christian.foelsch@t-online.de

W. Mittelmeier
Department of Orthopaedic Surgery, University Medical
School, Doberaner Strasse, 18057 Rostock, Germany

T. von Garrel
Department of Orthopaedic and Trauma Surgery,
St. Willehad Hospital, Ansgaristrasse 12,
26382 Wilhelmshaven, Germany

U. Bilderbeek
Bahnhofstrasse 2, 35321 Laubach, Germany

N. Timmesfeld
Institute of Medical Biometry and Epidemiology, Philipps
University Marburg, Bunsenstrasse 3, 35037 Marburg,
Germany

A. Pruss
University Tissue Bank, Institute of Transfusion
Medicine, Charité University Medical School,
Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany

H.-P. Matter
GNG – Gesundheitsnetz Gießen, Frankfurter Strasse 1,
35390 Gießen, Germany

Keywords Thermoinfection · Allograft bone · Storage temperature · Duration of storage · Pull out strength cancellous bone

Introduction

Autogenous bone grafts cannot match the overall demand for bone grafts in orthopaedic surgery (Delloye et al. 2007; Palmer et al. 1999). Bone allografts from living donors and postmortem grafts are necessary to match increasing demand (Delloye et al. 2007). Restoration of large bone defects in patients undergoing revision surgery of hip replacements is challenging and the number of primary joint replacements increases worldwide (CDC 2002; Pruss et al. 2003b). The transplantation of allograft bone increases the bone stock which is beneficial for the longevity of the implant and further revision surgery (Palmer et al. 1999).

Native unprocessed frozen femoral heads are a major source for human allograft bone from local and regional tissue banks (Delloye et al. 2007; Ochs et al. 2008). Methods of processing, preservation and sterilization affect quality of bone differently and only autogenous bone graft is osteogenic since allograft bone is not standardized without reproducible mechanical and biological features (Delloye et al. 2007; Ochs et al. 2008). Fresh frozen allografts sustain biophysical properties best but bear a higher risk of transmission of infection compared with processed allograft bone (Delloye et al. 2007). Selection of living donors reduces risk of transmission of diseases compared with harvesting bone graft from post mortem donors but transmission of diseases remains a major concern of bone banking (Buttaro et al. 2012; Delloye et al. 2007; Ochs et al. 2008; McNamara et al. 2010; Palmer et al. 1999, Sakai et al. 2010). The first reported case of HIV-1 transmission from bone graft led to reconsideration of bone bank guide lines (Pruss et al. 2003a, b; McNamara et al. 2010; CDC 1988).

The effects of different disinfection procedures on the mechanic properties and the incorporation of the bone graft have to be considered (Delloye et al. 2007; Tomford et al. 1986; Vastel et al. 2004). Freeze-dried and sterilized bone grafts need to be protected mechanically (Delloye et al. 2007) but good long-term results for impaction grafting for revision

arthroplasty have been shown (Buttaro et al. 2012). Gallie discussed autoclavation of bone grafts in 1918 since modern bone banking developed later (Buttaro et al. 2012; Gallie 1918) and thermoinfection of human allograft bone is a validated and safe method (CDC 1988; Pruss et al. 2003a, b). Collagen and mineral content of bone account for different biophysical properties of bone (Kaplan et al. 1985; Keaveny et al. 1994; Kopperdahl and Keaveny 1998; Yamashita et al. 2001; Wang et al. 2000; Zioupos et al. 1999) and no single method can characterize bone quality completely (Fantner et al. 2004). The tensile strength is less compared with compression (Kaplan et al. 1985) which seems to correlate better with the mineral content (Kopperdahl and Keaveny 1998). The organic matrix is more sustainable to heat since minimal changes were observed at 100 °C and the mineral phase was not affected below 200 °C (Fantner et al. 2004). The perfect bone graft has not been found yet (Ochs et al. 2008).

Bone banks in USA and Europe operate according to guidelines of the AATB, EATB and according to European guidelines 2004/23/EG, 2006/17/EG and 2006/86/EG (Delloye et al. 2007; Fölsch et al. 2012; Hart et al. 1986). The storage temperature of −80 °C was empirical and data to exactly define a preservation temperature are missing (CDC 1988; McNamara et al. 2010; Pruss et al. 2003a). The AATB and EATB have changed recommendations for storage temperature of allograft bone during the last decade and the recommendations for storage temperature remain in discussion (Fölsch et al. 2012). The long-term effect of different storage temperatures on the mechanic properties of thermoinfected bone has not been evaluated. Increasing the storage temperature to −20 °C would reduce costs and prolongation of storage could improve availability of bone grafts and simplify management of a bone bank.

This study examined the influence of thermoinfection and the storage at different freezing temperatures on pull out strength of cancellous porcine bone within 2 years. Matter et al. (2001) did not show a relevant difference of tensile strength at storage at −20 °C compared with −80 °C after 2 years for unprocessed bone. We suppose that thermoinfection at 82.5 °C does not compromise tensile strength relevantly regarding clinical use. The discussion of the guidelines for storage temperatures of bone banks should benefit from further data.



Fig. 1 Humerus of 6-months-old piglet immediate after slaughter

Methods

Procedures

Porcine cancellous bone was used for mechanical testing since structural similarities with human bone exist (Matter et al. 2001). It was harvested from the humeri of healthy piglets at the age between 6 and 8 months immediately after they had been brought to death at the slaughter-house (Fig. 1). The preparation was similar to our previous study on native unprocessed bone (Matter et al. 2001). The same day cancellous cylinders were cut from the head of the humeri with a hollow saw (Fig. 2). The chondral site of the cylinder was removed with a band saw and the length was 50 mm and the diameter measured 25 mm. Cylinders with a fracture or cortical bone segments were excluded. From a total of 295 porcine osseous cylinders 140 underwent thermodisinfection while the other samples had remained unprocessed (Table 1; Matter et al. 2001). Duration of storage varied between 6, 12 and 24 months at temperature -20 and -80 °C. Each group of thermodisinfecting bone consisted of 20 samples (Table 2). Just after preparation the specimens were packed at 4 °C and deep-frozen or primarily underwent thermodisinfection at 82.5 °C for 94 min according to bone bank guidelines providing at least 15 min of inactivation time at 82.5 °C within the center of the cylinder. Samples were randomized and tested immediate and after 6, 12 and 24 months. Specimen for deep-freezing were put into airtight and frigid plastic container (Neoten Polyethylen-LD) with a volume of 100 cm^3 immediately following preparation. Before performing mechanical tests the specimen were gradually warmed up to 22 °C within

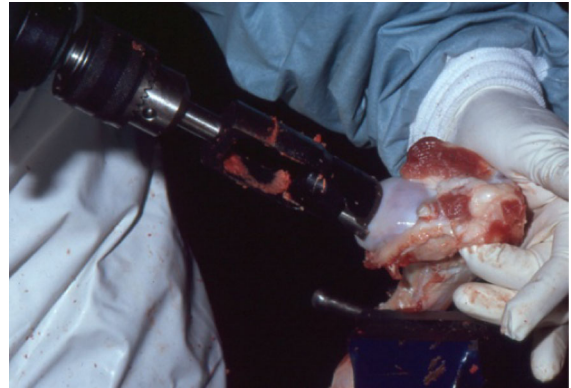


Fig. 2 Harvesting a cylinder from the humeral head including cartilage, subchondral and cancellous bone with a hollow saw

Table 1 Pull out strength F_{max} of screws (N) out of native unprocessed cancellous bone at different temperature and duration of storage including number of specimens

Storage period	None	6 months	12 months	24 months
Temperature	-20 °C	-20 °C	-20 °C	-20 °C
Mean pull-out strength	2897 N	2861 N	2900 N	2809 N
Range	1709 N–3998 N	2305 N–3548 N	2006 N–3832 N	2180 N–3998 N
Number	32	20	23	20
Temperature	-80 °C	-80 °C	-80 °C	-80 °C
Mean pull-out strength	2897 N	2763 N	3083 N	2795 N
Range	1709 N–3998 N	1728 N–3975 N	2086 N–4450 N	2214 N–3449 N
Number	32	20	20	20

the containers for 12 h. The cylinders were fixed in a holding device with an inner diameter 26 mm, wall thickness 2 mm including a clamping mechanism being made for this purpose (Figs. 3, 4).

A 40 mm deep hole was drilled into the proximal end of the osseous cylinder using a standard drill 3.2 mm including centralizing device providing exactly reproducible axis and center. A cancellous bone screw diameter 6.5 mm and thread length 32 mm was inserted into the bone, fixed in the holding device and mounted into the Universal test machine measurement range of four KN (Fig. 4). A preload of 500 N was applied and an axial traction with a speed of 0.05 mm/s was generated until cut out of screw. The

Table 2 Pull out strength Fmax of screws (N) out of thermodisinfectated cancellous bone at different temperature and duration of storage including number of specimens

Storage period	None	6 months	12 months	24 months
Temperature	−20 °C	−20 °C	−20 °C	−20 °C
Mean pull-out strength	2729 N	2525 N	2676 N	2376 N
Range	1657 N–3568 N	1720 N–3998 N	1789 N–3442 N	1622 N–3010 N
Number	20	20	20	20
Temperature	−80 °C	−80 °C	−80 °C	−80 °C
Mean pull-out strength	2729 N	2611 N	2645 N	2589 N
Range	1657 N–3568 N	1824 N–3998 N	1915 N–3744 N	1598 N–3289 N
Number	20	20	20	20



Fig. 3 The bone cylinder fit exactly into a specially designed holding device and the screw is inserted exactly central

resulting force of reaction was digitally recorded in the form of continuous value pairs with the maximum tensile strength being determined as Fmax.

Statistical analysis

To study the influence of thermodisinfection and storage duration on the maximum tensile strength a three-way ANOVA on all data was used. For investigation if there would be a linear trend of the storage period on the maximum tensile strength an analog linear model with storage period as continuous variable and for testing the effect of storage temperature a three-way ANOVA was fitted from the data

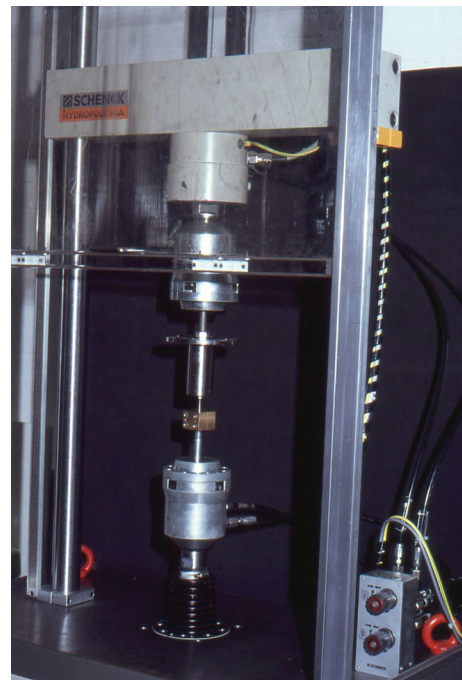


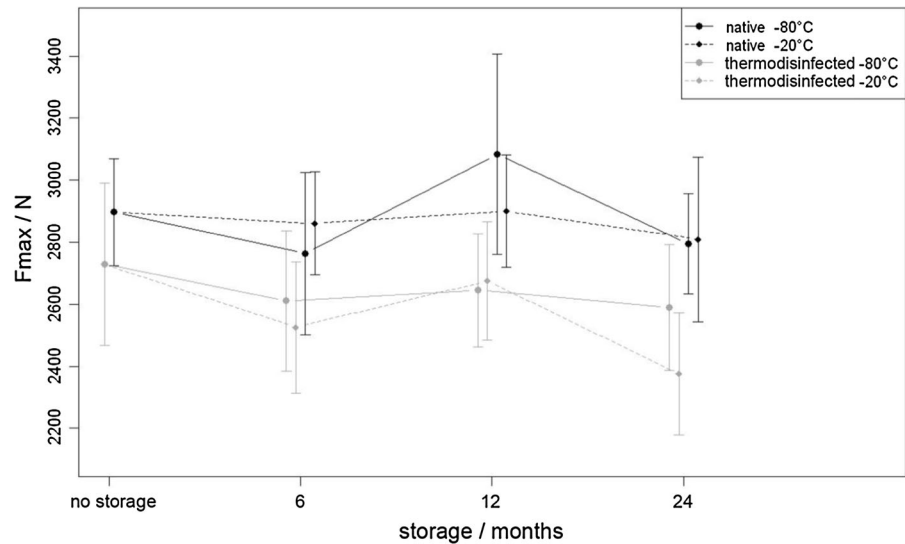
Fig. 4 Hydraulic testing machine (Schenck PSA, Germany) and holding device including clamping mechanism

after 6, 12 and 24 weeks. All primary modeling was done without interaction terms. To check consistency of findings all analyses were done with inclusion of interaction terms in the model revealing only slight changes. The significance level was set to 5 %. No adjustment was made for multiple testing. All analyses were done with the statistical software R (R Development Core Team 2009).

Results

Thermodisinfection leads to small and significant decrease ($p < 0.0001$) of pull out strength compared with unprocessed bone. The mean Fmax for native not stored 32 osseous cylinders was 2897 N (Table 1; Matter et al. 2001) since 20 thermodisinfectated cylinders showed a Fmax of 2729 N (Table 2). The mean Fmax difference between processed and native bone is 275 N with 95 % confidence interval ranging from 166 to 385 N (Fig. 5). The pull out strength Fmax after 2 years of storage is not significantly different at storage temperature −20 and −80 °C ($p = 0.34$, CI −176 N to 60 N). The native bone revealed a pull out force of 2809 N at storage −20 °C and 2795 at

Fig. 5 Pull-out strength of screws (N) from unprocessed and thermodisinfectied cancellous bone without storage and storage for 6, 12 and 24 months at -20 and -80 °C including 95 % confidence intervals



-80 °C (Table 1; Fig. 5). The thermodisinfectied bone had a pull out strength of 2376 N at storage -20 °C and 2589 N at -80 °C (Table 2; Fig. 5). In the ANOVA-model the F_{max} was found to differ significantly ($p = 0.029$) between the storage periods but at storage 12 months the increase of F_{max} is biologically unexplainable (Fig. 5). A linear model was fitted which assumes a linear trend of F_{max} over the time. In this model the effect of storage time was no longer significant ($p = 0.277$).

Discussion

Sterilization procedures affect mechanical and biological properties of the allograft bone since chemical processing and irradiation might have undesirable effects (Gallie 1918; Hamer et al. 1996; Hart et al. 1986; Ochs et al. 2008; Pelker et al. 1984; Pruss et al. 2003b; Thoren et al. 1995). Transmission of diseases due to bone allografts remains a risk despite careful selection of the donor and serologic tests (Buttaro et al. 2012; Palmer et al. 1999; Sakai et al. 2010; Tomford et al. 1983; Tomford 1995). Fresh frozen allograft bone avoids adverse effects on mechanical properties related to processing but bears a risk of infection and induces immunogenic reactions of the host since cells with osteoblastic characteristics were isolated from femoral heads after 6 months storage at minus 80 °C (Heyligers and Klein-Nulend 2005; Langer et al. 1975). Fresh

frozen unprocessed allograft human bone leaves a residual risk of transmission of HIV and other viral diseases (Buttaro et al. 2012; Delloye et al. 2007; Hart et al. 1986). Seroconversion for HIV might be prolonged in single cases and the HIV transmission due to allograft bone in 1984 and 1985 has to be recognized (Buttaro et al. 2012; Ranki et al. 1987). Irradiation inactivates HIV only at a high dose which compromises bone quality considerably although good results of irradiated allograft bone combined with autologous bone marrow have been reported (Ochs et al. 2008). Prions are inactivated by chemical procedures which reduce mechanic and influence biologic properties considerably (Sakai et al. 2010). Thermodisinfection of allograft femoral heads up to 56 mm diameter from living donors is a validated method inactivating all human pathogen vegetative bacteria including HIV, HBV and HBC at 82.5 °C (Delloye et al. 2007; Pruss et al. 2003a). Spores which are not present in the operating theatre are being reduced to at least $\log 1.56_{10}$. Serologic tests for HBC, HCV and HIV are done once and a careful medical history is being taken to exclude donors with risk factors and according to EU-guidelines laboratory tests can be reduced. Patients with neurologic or psychiatric disorders are not eligible as a donor. Harvesting the bone from well known living donors recruited at surgery for hip replacement improves the safety of the bone harvesting and transplantation.

Removal of blood, fat and bone marrow improves the bone ingrowth in allograft bone but it is reduced

compared with autografts (Bos et al. 1985; Delloye et al. 2007; Donk et al. 2003). Homografts of cancellous bone evoked a lymph node reactivity (Burwell and Gowland 1960) but boiling destroyed capacity of bone grafts to evoke immune response in lymph nodes (Burwell et al. 1963). Thermodisinfection at 82.5 °C should reduce immunogenic factors due to denaturation (Matter et al. 2001) since function of collagen and stability of bone might be preserved (Bormann et al. 2010; Shimuzu et al. 1999; Shin et al. 2005; Urist et al. 1967). This could be an advantage of thermodisinfection since an increase of human osteoblastic cell proliferation was found slightly delayed in presence of autoclaved bone (Mejdahl et al. 1998; Piedra et al. 2008). The incorporation of the allograft was not significantly impaired by thermodisinfection at 82.5 °C since the revascularization of the transplant was reduced only slightly but remnants of necrotic bone were found after treatment with 100 °C (Thoren et al. 1995) and vascularization seemed to be impaired by freezing at −80 °C (Holzmann et al. 2010). Despite processing procedures some growth factors and other substances might remain within the bone matrix of the allograft bone but the activity level is not known (Bormann et al. 2010). Only autogenous bone was found to be osteoinductive (Delloye et al. 2007).

The mechanical stability for compression is not affected at 60 °C but diminishes to 60 % at 100 °C (Shimuzu et al. 1999; Shin et al. 2005; Urist et al. 1967) since no affection of the inorganic content of bone was found below 200 °C (Wang et al. 2000; Fantner et al. 2004; Shirakawa et al. 2013) and the fundamental bone structure remained intact up to 600 °C (Rogers and Daniels 2002). Tensile strength of bone was found smaller compared with compressive strength (Kaplan et al. 1985) and compressive strength correlated better with mineral density (Kopperdahl and Keaveny 1998). The organic phase of bone is relevant for several mechanical properties of bone and was found slightly affected at temperatures below 100 °C (Fantner et al. 2004). We found that thermodisinfection of 82.5 °C did only slightly but significantly reduce the pull out strength (Fig. 5) which seems to correlate with minor heat related changes of the collagen since affection of mineral content should not be expected at 82.5 °C (Fantner et al. 2004). A comparable effect was shown for torsional stability in the rabbit model indicating that the integrity of bone architecture and collagen remained intact (Shin et al.

2005). Collagen and mineral content account for different biophysical properties of bone (Kaplan et al. 1985; Keaveny et al. 1994; Kopperdahl and Keaveny 1998; Wang et al. 2000; Yamashita et al. 2001, 2002; Zioupos et al. 1999) since crosslinks are important (Cornwell et al. 2007; Viquet-Carrin et al. 2006). Application of 82.5 °C seems to be a good compromise between sterilization and preservation of mechanical properties. According to 95 % confidence interval a reduction of tensile strength up to <14 % can be expected in single cases since the mean difference for Fmax was less than 10 %. A wide range of interindividual differences of bone morphology has to be considered for allograft bone in general (Delloye et al. 2007). Heat denaturation reduced the potency of histocompatibility antigens and promoted bone induction depending on temperature (Pelker et al. 1984) since heat processing reduced bone induction activity and BMP beginning above 60 °C until total inactivation at 100 °C expecting relevant activity at 80 °C (Urist et al. 1967).

Previous results showed no significant effect of freezing temperature or duration of freezing up to 2 years onto the mechanical property of fresh frozen cancellous bone (Ochs et al. 2008; Matter et al. 2001) but freezing reduced biologic activity in the rat model (Bos et al. 1985; Donk et al. 2003) and the potential immunogenic effect of the allograft persisted (Donk et al. 2003). Frozen bone remains immunogenic and no difference of the induction of the cellular response was found compared with fresh bone (Langer et al. 1975). Proteolysis was discussed as a potential problem of storage of bone grafts (Mejdahl et al. 1998; Pruss et al. 2003b) since thermodisinfection should avoid proteolytic activity but bony incorporation of heat sterilized bone grafts was delayed compared with autograft bone (Shimuzu et al. 1999). The storage temperature at −80 or −20 °C did not affect the pull out strength of fresh frozen and thermodisinfecting cancellous bone grafts after 2 years of storage (Fig. 5). Following 5 years of storage at −80 °C no change of mechanic property for human cortical cryopreserved bone was shown (Salai et al. 2000) and no adverse effects of the freezing procedure itself on the trabecular structure were found (Linde and Sørensen 1993). It should be expected that thermodisinfecting cancellous bone might be stored at a temperature of −20 °C longer than 2 years since no change of bone quality was apparent. The AATB recommends −20 °C for

storage up to 6 months and $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ for longer periods and the EATB advises $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ for any period of storage (Fölsch et al. 2012).

Thermodisinfection offers the opportunity to inactivate all potential relevant pathogens except priones without chemical agents and accurate history taking and donor selection should adequately address the risk of transmission of priones since chemical inactivation of priones would considerably deteriorate mechanical properties of the graft (Ochs et al. 2008; Pruss et al. 2003b) and sterilization at $82.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ causes only minor changes of tensile strength of cancellous bone. The overall costs of thermodisinfection procedure of allograft femoral head in the local hospital bone bank are less compared with commercially available grafts (Hart et al. 1986) since local bone banks save costs for transport, taxes, laboratory tests and make quarantine of grafts unnecessary (McNamara et al. 2010; Pruss et al. 2003b). Huge bone defects require a size and quality of bone transplants which might not be supplied by femoral heads since the impaction of bone grafts or the combination with an implant provides sufficient stability (Buttaro et al. 2012; Fosse et al. 2006). The application of growth factors has been shown to be beneficial to promote osseous integration of allograft bone since mismatches of MHC antigens did not seem to have a relevant influence on the incorporation of long-term deep frozen allograft bone (Fröhlich et al. 2008; Reikeras et al. 2011). Not all mechanic features could be examined (Donnelly 2011) but pull out strength represents important features of integrity of bone architecture and fixation strength of screws. Further studies concerning biology and osseous incorporation of thermodisinfected allograft bone seem necessary.

Conclusions

Thermodisinfection resulted in $<10\%$ mean reduction of pull out strength of cancellous bone which makes the allograft bone suitable for many clinical applications and it can be stored at minus $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for at least 2 years without impairment of tensile strength compared with storage at minus $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ since no different effect of temperature on native and thermodisinfected cancellous bone was found within 2 years. Storage at minus $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ should be considered for preservation of

unprocessed and thermodisinfected allograft bone for at least 2 years.

Acknowledgments We are particularly grateful for the support offered during the biomechanical examination to Prof. Dr. Ing. M. Niebert, Fachhochschule Gießen/Friedberg, Department Biomedizin und Technologie, Gießen and to Prof. Dr. H. Stürz, Director of the Orthopaedic University Clinic, Gießen.

Conflict of interest No benefits in any form have been received or will be received from a commercial party related directly or indirectly to the subject of this article.

References

- Bormann N, Pruss A, Schmidmaier G, Wildemann B (2010) In vitro testing of the osteoinductive potential of different bony allograft preparations. *Arch Orthop Trauma Surg* 130:143–149
- Bos GD, Goldberg M, Gordon NH et al (1985) The long-term fate of fresh and frozen orthotopic bone allografts in genetically defined rats. *Clin Orthop Relat Res* 197:247–254
- Burwell RG, Gowland G (1960) Lymph node reactivity to homografts of cancellous bone. *Nature* 188:159–160
- Burwell RG, Gowland G, Dexter F (1963) Studies in the transplantation of Bone VI. Further observations concerning the antigenicity of homologous cortical and cancellous bone. *J Bone Joint Surg [Br]* 45-B:597–608
- Buttaro MA, Costantini J, Comba F, Piccaluga F (2012) The use of femoral struts and impacted cancellous bone allograft in patients with severe femoral bone loss who undergo revision total hip replacement. *J Bone Joint Surg [Br]* 94-B:167–172
- Center of Disease Control and Prevention (1988) Transmission of HIV through bone transplantation: case report and public health recommendations. *MMWR* 37:597–599
- Center of Disease Control and Prevention (2002) Allograft associated bacterial infections. *MMWR* 51:207–210
- Cornwell KG, Lei P, Andreadis ST, Pins GD (2007) Cross-linking of discrete self-assembled collagen threads: effects on mechanical strength and cell-matrix interactions. *J Biomed Mater Res A* 80:362–371
- Delloy C, Cornu O, Druetz V, Barbier O (2007) Bone allografts. *J Bone Joint Surg* 89-B:574–579
- Donk S, Weernink T, Buma P, Aspenberg P, Sloof T, Schreurs BW (2003) Rinsing morselized allografts improves bone and tissue ingrowth. *Clin Orthop Relat Res* 408:302–310
- Donnelly E (2011) Methods for assessing bone quality: a review. *Clin Orthop Relat Res* 469:2128–2138
- Fantner GE, Birkedal H, Kindt JH et al (2004) Influence of the degradation of the organic matrix on the microscopic fracture behavior of trabecular bone. *Bone* 35:1013–1022
- Fölsch C, Mittelmeier W, Bilderbeek U, Timmesfeld N, von Garrel T, Peter Matter H (2012) Effect of storage temperature on allograft bone. *Transfus Med Hemother* 39:36–40

- Fosse L, Ronningen H, Benum P, Lydersen S, Sandven RB (2006) Factors affecting stiffness properties in impacted morsellized bone used in revision hip surgery: an experimental in vitro study. *J Biomed Mater Res A* 78:423–431
- Fröhlich M, Grayson WL, Wan LQ, Marolt D, Drobnic M, Vunjak-Novakovic G (2008) Tissue engineered bone grafts: biological requirements, tissue culture and clinical relevance. *Curr Stem Cell Res Ther* 3:254–264
- Gallie WE (1918) The use of boiled bone in operative surgery. *Am Orthop Surg* 16:373
- Hamer AJ, Strachan JR, Black MM, Ibbotson CJ, Stockley I, Elson RA (1996) Biomechanical properties of cortical allograft bone using a new method of bone strength measurement. *J Bone Joint Surg [Br]* 78-B:363–368
- Hart MM, Campbell ED, Kartur MG (1986) Bone banking. *Clin Orthop Relat Res* 206:295–300
- Heyligers IC, Klein-Nulend J (2005) Detection of living cells in non-processed but deep frozen bone allografts. *Cell Tissue Bank* 6:25–31
- Holzmann P, Niculescu-Morzsza E, Zwickl H et al (2010) Investigation of bone allografts representing different steps of the bone bank procedure using the CAM-model. *AL-TEX* 27:97–103
- Kaplan SJ, Hayes WC, Stone JL, Beaupré GS (1985) Tensile strength of bovine trabecular bone. *J Biomech* 18:723–727
- Keaveny TM, Wachtel EF, Ford CM (1994) Hayes WC (1994) Differences between tensile and compressive strengths of bovine tibial trabecular bone dependent on modulus. *J Biomech* 27:1137–1146
- Kopperdahl DL, Keaveny TM (1998) Yield strain behavior of trabecular bone. *J Biomech* 31:601–608
- Langer F, Czitrom A, Pritzker KP, Gross AE (1975) The immunogenicity of fresh frozen allogeneic bone. *J Bone Joint Surg [Am]* 57-A:216–220
- Linde F, Sörensen HCF (1993) The Effect of different storage methods on the mechanical properties of trabecular bone. *J Biomechanics* 26:1249–1252
- Matter HP, Garrel T, Bilderbeek U, Mittelmeier W (2001) Biomechanical examinations of cancellous bone concerning the influence of duration and temperature cryopreservation. *J Biomed Mater Res* 55:40–44
- McNamara I, Deshpande S, Porteous M (2010) Impaction grafting of the acetabulum with a mixture of frozen, ground irradiated bone graft and porous synthetic bone substitute (Apapore 60). *J Bone Joint Surg [Br]* 92-B:617–623
- Mejdahl S, Hansen CA, Skjoldt H, Reimann I (1998) Human bone bank allografts stimulate bone resorption and inhibit proliferation in cultures of human osteoblast-like cells. *Acta Orthop Scand* 69:63–68
- Ochs BG, Schmid U, Rieth J, Ateschrang A, Weise K, Ochs U (2008) Acetabular bone reconstruction in revision arthroplasty. *J Bone Joint Surg [Br]* 90-B:1164–1171
- Palmer SH, Gibbons CLM, Athanasou NA (1999) The pathology of bone allograft. *J Bone Joint Surg [Br]* 81-B(2):333–335
- Pelker RR, Friedlaender GE, Markham TC, Panjabi MM, Moen CJ (1984) Effects of freeze-drying on the biomechanical properties of rat bone. *J Orthop Res* 1:405–411
- Piedra C, Vicario C, de Acuna LR, Garcia-Moreno C, Traba ML, Arlandis S, Marco F, Lopez-Duran L (2008) Osteoinductive effect of bone bank allografts on human osteoblasts in culture. *J Orthop Res* 26:200–207
- Pruss A, Kao M, von Garrel T et al (2003a) Virus inactivation in bone tissue transplants (femoral heads) by moist heat with the Marburg bone bank system. *Biologicals* 31:75–82
- Pruss A, Seibold M, Benedix F et al (2003b) Validation of the Marburg bone bank system for thermodesinfection of allogeneic femoral head transplants using selected bacteria, fungi and spores. *Biologicals* 31:287–294
- Ranki A, Valle SL, Krohn M et al (1987) Long latency precedes overt seroconversion in sexually transmitted human-immunodeficiency-virus infection. *Lancet* 330(8559):589–593
- Reikeras O, Reinholt FP, Zinöcker S, Shegarfi H, Rolstad B (2011) Healing of long-term frozen orthotopic bone allografts is not affected by MHC differences between donor and recipient. *Clin Orthop Relat Res* 469:1479–1486
- Rogers KD, Daniels P (2002) An X-ray diffraction study of the effects of heat treatment on bone mineral microstructure. *Biomaterials* 23:2577–2585
- Sakai T, Ohzono K, Nishii T, Miki H, Takao M, Sugano N (2010) Grafting with hydroxyapatite granules for defects of acetabular bone at Revision total hip replacement. *J Bone Joint Surg [Br]* 92-B:1215–1221
- Salai M, Brosh T, Keller N, Perelman M, Dudkiewicz I (2000) The effects of prolonged cryopreservation on the biomechanical properties of bone allografts: a microbiological, histological and mechanical study. *Cell Tissue Bank* 1:69–73
- Shimizu K, Masumi S, Yano H, Fukunaga T (1999) Revascularization and new bone formation in heat-treated bone grafts. *Arch Orthop Trauma Surg* 119:57–61
- Shin S, Yano H, Fukunaga T et al (2005) Biomechanical properties of heat treated bone grafts. *Arch Orthop Trauma Surg* 125:1–5
- Shirakawa H, Furusawa K, Fukui A, Tadano S, Sasaki N (2013) Changes in the viscoelastic properties of cortical bone by selective degradation of matrix protein. *J Biomech* 46:696–701
- R Development Core Team (2009) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org>
- Thoren K, Aspenberg P, Thorgren KG (1995) Lipid extracted bank bone. *Clin Orthop Relat Res* 311:232–246
- Tomford WW (1995) Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts. *J Bone Joint Surg [Am]* 77-A:1742–1754
- Tomford WW, Doppelt SH, Mankin HJ, Friedlaender GE (1983) 1983 Bone Bank Procedures. *Clin Orthop Relat Res* 174:15–21
- Tomford WW, Ploetz JE, Mankin HJ (1986) Bone allografts of femoral heads: procurement and storage. *J Bone Joint Surg [Am]* 68-A:534–537
- Urist MR, Silverman BF, Büring K, Dubuc FL (1967) The bone induction principle. *Clin Orthop* 53:243–283
- Vastel L, Meunier A, Siney H, Sedel L, Courpied JP (2004) Effect of different sterilization processing methods on the mechanical properties of human cancellous bone allografts. *Biomaterials* 25:2105–2110
- Viquet-Carrin S, Garnerio P, Delmas PD (2006) The role of collagen in bone strength. *Osteoporosis Int* 17:319–336

- Wang X, Bank R, TeKoppele J, Hubbard G, Athanasiou K, Agrawal C (2000) Effect of collagen denaturation on the toughness of bone. *Clin Orthop Relat Res* 371:228–239
- Yamashita J, Furman BR, Rawls HR, Wang X, Agrawal M (2001) The use of dynamic mechanical analysis to assess the viscoelastic properties of human cortical bone. *J Biomed Mater Res* 58:47–53
- Yamashita J, Li X, Furman BR, Rawls HR, Wang X, Agrawal CM (2002) Collagen and bone viscoelasticity: a dynamic mechanical analysis. *J Biomed Mater Res* 63:31–36
- Ziopoulos P, Currey J, Hamer A (1999) The role of collagen in the declining mechanical properties of aging human cortical bone. *J Biomed Mater Res* 45:108–116

3.3. Effekt der Thermodesinfektion auf mechanische Parameter spongiösen Knochens

Einleitung

Revisionseingriffe von Endoprothesen erfordern häufig die Wiederherstellung eines belastbaren Knochenlagers und bei steigender Lebenserwartung ist ein weiter steigender Bedarf an allogenen Knochenersatzmaterial anzunehmen [55,64,70,73,74,153,154]. Lokale Variationen der Knochenarchitektur können Einfluss auf verschiedene mechanische Parameter haben mit Frakturentstehung im schwächsten Bereich [155] und die Richtung der Krafteinwirkung beeinflusst die Auswirkungen entsprechend des Winkels [156,157]. Die interindividuellen Differenzen der mechanischen Qualität von Knochentransplantaten sind ebenso zu berücksichtigen und können größeren Schwankungen unterliegen [134]. Knochen ist anisotrop mit variierender Orientierung der Kollagenfibrillen und Mineralkristalle [158] und die Ausrichtung der einwirkenden Kraft ist für die Belastung des Knochens von Bedeutung [157,158]. Die Vernetzung des Kollagens zeigte sich unabhängig vom Mineralgehalt relevant für mechanische Eigenschaften [65]. Das Torsionsversagen ist die häufigste Form des mechanischen Versagens [155] und betrifft insbesondere Knochen mit geringer Dichte [156,159]. Spongiöser Knochen frakturiert häufig in einem schrägen Winkel und somit ist die Torsionssteifigkeit ein wichtiger mechanischer Parameter [155]. Auswirkungen auf das Kollagengerüst und die Torsionsstabilität zeigten sich bei 100°C vergleichbar gering und somit kann eine hochgradige Beeinträchtigung der Integrität von organischer und anorganischer Komponente nicht erwartet werden [145,147]. Unsere Untersuchung erfolgte, um dies für thermodesinfizierten Knochen entsprechend zu untersuchen.

Methode

Die untersuchte Spongiosa entstammte Knochenproben von 6-8 Monate alten Jungschweinen vom proximalen Femur. Die Gruppengröße wurde mit 23 Knochenzylindern Länge 45 mm und Durchmesser 18 mm gewählt, nachdem die Poweranalyse eine Gruppe von sieben berechnet hatte. Der reproduzierbare Entnahmemodus unter Berücksichtigung der Trajektorien wurde mittels Laserkontrolle gewährleistet. Seitendifferenzen als möglicher systematischer Fehler wurden

ausgeschlossen. Es werden jeweils zwei nicht-destruktive Untersuchungen mit Torsionsmessung und Kompressionsmessung gefolgt von Drei-Punkt-Biegebelastung bis zum Versagen mit Laserkontrolle der Krafteinleitung durchgeführt. Die statistische Untersuchung der Vergleichsuntersuchung der rechten und linken Femora erfolgte mit dem nicht-parametrischen Wilcoxon Test und der Einfluss der Thermodesinfektion auf mechanische Parameter erfolgte mit dem parametrischen t-Test mit Signifikanzniveau $p < 0.05$. Als Software diente SPSS (Version 22.0.0.0, IBM, USA).

Ergebnisse

Die mittlere Torsionskraft des spongiösen Knochens betrug 1.28 ± 0.68 GPa für native und 1.02 ± 0.31 GPa für die thermodesinfizierten Probekörper. Der Unterschied von etwa 20% war signifikant ($p = 0.029$). Die Kompressionskraft zeigte mit 6.30 ± 4.72 GPa für nativen im Vergleich zu thermodesinfizierten Knochen mit 4.97 ± 2.23 GPa keine signifikante Differenz, die ebenso nicht für die maximale Biegelast bis zum Versagen nachgewiesen wurde (270.03 ± 116.68 N für native und 228.80 ± 70.49 N für die thermodesinfizierten Präparate). Es ergibt sich somit anhand der berechneten Signifikanzen keine einheitliche Beeinflussung verschiedener mechanischer Parameter der Spongiosa durch die Thermodesinfektion, hingegen sind die gemessenen absoluten Werte in der Größenordnung vergleichbar.

Diskussion

Knochentransplantate unterliegen permanenter Deformation und die erforderlichen mechanischen Eigenschaften werden kontrovers diskutiert und sind im Zusammenhang mit „Impaction Bone Grafting“ von Bedeutung [64,160]. Impaktion von Knochen ist geeignet die Scherkraft zu vergrößern [161] und Hydroxylapatit, mit geringerer Verformung unter Kompression als allogener Knochen, erhöhte den Widerstand gegen Torsion [162]. Temperatureinwirkungen führen zu einer Verminderung der Kompressionsfestigkeit von Knochen auf 60% bei 100°C , während bis zu einer Erhitzung von 60°C keine Beeinträchtigung nachgewiesen wurde [144,146,147]. Eine Affektion der anorganischen Bestandteile des Knochens konnte unterhalb von 200°C nicht festgestellt werden und bis 100°C zeigten sich keine erheblichen Veränderungen des Kollagengerüsts [145,147,148]. Die Cross-Links

der Kollagenfibrillen können zudem Temperaturen bis 200°C überstehen [157]. Unsere Untersuchung der Torsionsstabilität zeigte eine signifikante Reduktion nach Thermodesinfektion im vergleichbaren Rahmen von etwa 20% wobei andere Untersucher erhebliche Schwankungen der Messungen feststellten [69]. Eine signifikante Korrelation zwischen Torsionsversagen und Kompressionsversagen konnten wir nicht erkennen. Eine relevante Auswirkung der Thermodesinfektion auf die mineralische Komponente der Knochentransplantate ist nicht anzunehmen [141,145,148]. Interindividuelle Differenzen der mechanischen Qualität von Knochentransplantaten und lokale Variationen der Knochenarchitektur sowie die Richtung der Krafteinwirkung mögen unterschiedliche Ergebnisse der Beziehung verschiedener mechanischer Parameter bedingen [134,155-157]. Die Auszugsfestigkeit von Knochen zeigte sich im Vergleich zur Kompressionsfestigkeit geringer wobei diese mit dem Knochenmineralsalzgehalt besser korrelierte [137,139]. Unsere Untersuchungen wiesen für die Torsionssteifigkeit eine geringe signifikante Verminderung und für Kompressionssteifigkeit und Biegelast eine geringe nicht signifikante Reduktion durch die Thermodesinfektion nach. Die Verminderung der Biegelast ist vergleichbar mit der bereits nachgewiesenen Reduktion der Auszugskraft bis zu 15% [42]. Die Auswirkung der Thermodesinfektion auf verschiedene biomechanische Parameter spongiösen Knochens erscheint weitgehend vergleichbar obwohl nur die Reduktion der Torsionssteifigkeit signifikant war.

Fazit

Thermodesinfektion verringert die Belastbarkeit spongiösen Knochens für Torsion und Kompression gegenüber nativen Knochen um etwa 20% und die Biegelast verringert sich um 15%. Nur der Einfluss der Thermodesinfektion auf die Minderung der Torsionssteifigkeit zeigte sich signifikant. Für die meisten klinischen Anwendungen erscheint die Beeinträchtigung der gemessenen relevanten mechanischen Parameter nicht von wesentlicher Bedeutung.

Effect of thermodisinfection on mechanic parameters of cancellous bone

Christian Fölsch · Andreas Kellotat · Markus Rickert ·
Bernd Ishaque · Gafar Ahmed · Axel Pruss · Alexander Jahnke

Received: 18 January 2016 / Accepted: 17 June 2016 / Published online: 25 June 2016
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2016

Abstract Revision surgery of joint replacements is increasing and raises the demand for allograft bone since restoration of bone stock is crucial for longevity of implants. Proceedings of bone grafts influence the biological and mechanic properties differently. This study examines the effect of thermodisinfection on mechanic properties of cancellous bone. Bone cylinders from both femoral heads with length 45 mm were taken from twenty-three 6–8 months-old piglets, thermodisinfecting at 82.5 °C according to bone bank guidelines and control remained native. The specimens were stored at –20 °C immediately and were put into 21 °C Ringer’s solution for 3 h before testing. Shear and pressure modulus were tested since three point bending force was examined until destruction. Statistical analysis was done with non-parametric

Wilcoxon, *t* test and SPSS since $p < 0.05$ was significant. Shear modulus was significantly reduced by thermodisinfection to 1.02 ± 0.31 GPa from 1.28 ± 0.68 GPa for unprocessed cancellous bone ($p = 0.029$) since thermodisinfection reduced pressure modulus not significantly from 6.30 ± 4.72 GPa for native specimens to 4.97 ± 2.23 GPa and maximum bending force was 270.03 ± 116.68 N for native and 228.80 ± 70.49 N for thermodisinfecting cancellous bone. Shear and pressure modulus were reduced by thermodisinfection around 20 % and maximum bending force was impaired by about 15 % compared with native cancellous bone since only the reduction of shear modulus reached significance. The results suggest that thermodisinfection similarly affects different mechanic properties of cancellous bone and the reduction of mechanic properties should not relevantly impair clinical use of thermodisinfecting cancellous bone.

C. Fölsch (✉) · M. Rickert · B. Ishaque · G. Ahmed
Department of Orthopaedic Surgery, Justus-Liebig-
University Medical School, Justus-Liebig-University
Giessen, Klinikstrasse 33, 35392 Giessen, Germany
e-mail: christian.foelsch@t-online.de

A. Kellotat · A. Jahnke
Laboratory of Biomechanics, Department of Orthopaedic
Surgery, Justus-Liebig-University Medical School, Justus-
Liebig-University Giessen, Paul-Meimberg-Strasse 3,
35392 Giessen, Germany

A. Pruss
University Tissue Bank, Institute of Transfusion
Medicine, Charité University Medical School,
Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany

Keywords Allograft bone · Thermodisinfection ·
Mechanic properties · Bone bank

Introduction

The increasing number of revision surgery of joint replacements is a major challenge regarding costs (van Haaren et al. 2005), restoration of bone stock and longevity of implants since life expectancy is growing

and the demand for bone graft might exceed the supply (McNamara 2010; Oakley and Kuiper 2006; Slooff et al. 1984; van Haaren et al. 2005; Toms et al. 2004). Allograft bone is necessary to provide long-term bony anchorage of implants (Fölsch et al. 2013; van Haaren et al. 2005) since fibrous tissue might impair fixation at cement–bone interface (Ohashi et al. 2000; Revell et al. 1998; Ullmark and Linder 1998) and shows good long-term results for femoral and acetabular revision (Gilbody et al. 2014; Halliday et al. 2003; Ibrahim et al. 2013; Malkani et al. 1996; Ornstein et al. 2009; Schreurs et al. 2005). Better outcome for impaction bone grafting compared with cemented revision without bone graft were reported (Hailer et al. 2010; McNamara 2010). Impaction bone grafting is an established method to restore bone stock in revision hip and knee arthroplasties (Fölsch et al. 2012; McNamara 2010; Slooff et al. 1984; Toms et al. 2004) since large defects need structural allografts for weight bearing.

There is a complex balance between mechanical demands for initial stability and long-term incorporation (Toms et al. 2004). The optimum size of bone chips for impaction is not known yet (McNamara 2010) since the particle size of the bone chips seems essential for the primary stability of the construct (Putzer et al. 2011; Brewster et al. 1999) and technical aspects influence the outcome as well (Bolland et al. 2007; Dunlop et al. 2003; Fosse et al. 2004; Fosse et al. 2006a, b). Femoral revision with impacted morcelled cortical bone demonstrated less stem subsidence than cancellous bone (McNamara 2010). The risk of transmission of diseases due to bone grafts remains a concern (van Haaren et al. 2005) since thermoinfected allograft bone from living donors femoral heads retrieved during hip replacement surgery seems to bear a lower risk of transmission of pathogens compared with fresh frozen allograft bone (Fölsch et al. 2012).

Bone strength was found greater in compression than in tension (Yeni et al. 2004) and thermoinfection reduces pull-out-strength since tensile tests are standard procedures (Fölsch et al. 2015; Odgaard and Linde 1991). Strength and modulus were found to correlate with apparent density (Yeni et al. 2004) and bone volume fraction predicts mechanical properties of cancellous bone (Yeni et al. 2001). Human cancellous bone is a heterogeneous material since variations in bone volume and trabecular volume best described

variations in ultimate stress and regions with different microarchitecture were susceptible to fracture (Perilli et al. 2008). Shear stress is less well controlled in bones with low ratio bone volume to trabecular volume (Yeni et al. 2001). Main geometrical properties of trabecular bone are determined by effective shear modulus (Klinge 2013) which is an important biomechanical factor since shear modulus showed an analytical error around 10–20 % in cancellous bone region (Matsunga et al. 2013). Cancellous bone often fails at an oblique angle though bone shear properties are an important feature and in a heterogeneous cancellous bone microstructure the weakest region predicted the shear properties of the entire bone specimen (Nazarian et al. 2009). Failure regions of bone were shown to have lower trabecular volume within defined bone volume (Perilli et al. 2008) and low bone volume fraction was the weakest point in compression and tension (Nazarian et al. 2009). Strong density gradients were found in human femoral heads (Garnier et al. 1999) and elastic modulus of cortical bone varies considerably (Wachter et al. 2001, 2002).

Bone is an anisotropic material with collagen fibrils and mineral crystals orientated at various angles (Wachter et al. 2002). Mineral phase predominantly contributes to stiffness and collagen network to toughness of bone (Wachter et al. 2002) since reduction in toughness increased fracture risk independent of bone mineral density (Burr 2002). The contribution of collagen to the overall mechanic properties might be mainly related to fragility (Burr 2002) and the properties of the collagenous matrix did not correlate with density (Banse et al. 2002). Low pyrrol/hydroxyprolin ratio reflected a complex and more connected structure of bone (Banse et al. 2002). Hydroxylslylpyridinoline and lysylpyridinoline cross-links of collagen may survive temperatures up to 200 °C (Wachter et al. 2002).

Underestimated Young's modulus in compressive testing of cancellous bone did not correlate with specimen density since geometry of the specimens was found to influence it (Odgaard and Linde 1991; Perilli et al. 2008). The confined compression modulus after impaction is relatively low compared with cancellous bone of same density (Giesen et al. 1999) and no correlation was found between apparent density and compressive modulus. Reducing fat content of allograft bone improved static and dynamic behavior (Ullmark 2000; Voor et al. 2000). Washed

grafts after removing fat and marrow were more resistant to shearing forces than fresh grafts (Dunlop et al. 2003). Therefore some proceedings of allograft bone might be beneficial compared with fresh frozen allograft bone. Thermodisinfection had shown a significant reduction of pull-out-strength (Fölsch et al. 2015) since it remains in discussion which mechanic properties are essential for a bone graft and the scientific basis of engineering aspects of impaction bone grafting is poorly understood (Toms et al. 2004). The present study was designed to test the influence of thermodisinfection on different relevant mechanic properties of cancellous bone to assess its possible clinical relevance.

Methods

Porcine cancellous bone from 6 to 8 months old piglets was chosen for mechanical tests and the necessary number of specimen was calculated seven with power 0.8 according to previous results (Fölsch et al. 2015). A group size of each 25 native versus thermodisinfecting specimens were chosen since the number reduced to 23 each for technical reasons. Cancellous bone cylinders length 45 mm and diameter 18 mm were harvested from the left and right femoral head with a diamant hollow saw (Fig. 1) (80407.20.10, Dr. Heineman Diamond Tools&Parts

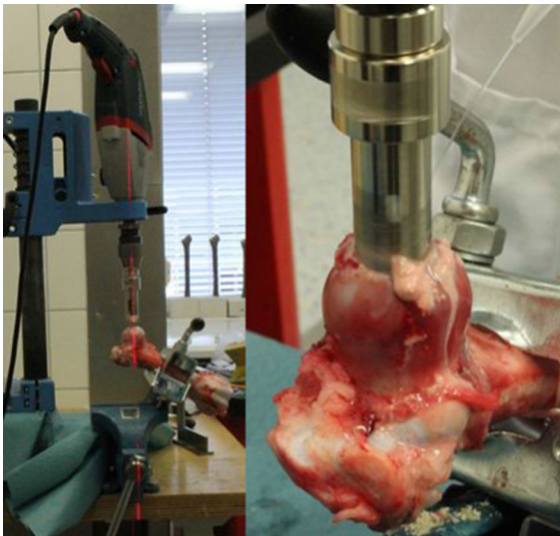


Fig. 1 Preparation and harvesting bone cylinder from piglet head of femur laser controlled

GmbH, Dörzbach, Germany) within 5 h postmortem since the exact vertical direction of the neck of femur was controlled with laser (BALS01B, Timbertech JAGO AG, Stuttgart, Germany) (Fig. 1). To prevent heat the drilling was limited to 150 U/min and constant cooling with normal saline solution was done. The specimens from both sides were stored at -20°C since the samples from the left femur were thermodisinfecting before (Lobator sd-2, Telos, Marburg, Germany) at 82.5°C according to bone bank guidelines (Pruss et al. 2003). Ahead of the mechanic tests the deep frozen specimens were warmed up in normal saline solution inside an oven (2247383, Memmert GmbH&Co.KG, Schwabach, Germany) for 3 h at 21°C . A preliminary destructive three point bending test measuring medio-lateral versus ventro-dorsal load was done to examine influence of different direction of load application on maximum load and examine for possible different values between left and right femur. Magnetic fixation of the specimens allowed variable positioning. Destructive three-point bending test in physiological rotation position was done 5 times each side on native cancellous bone to examine possible side differences of the femur.

The cylinders were mounted in titanium cylinder height 10 mm and wall thickness 2.5 mm including a screw hole 6 mm diameter at the bottom to provide anchorage for the measurement device. Those metal cylinders were fixed to a metal plate thickness 1.5 mm (Silver Rocket, Boldt&Co. OHG, Wermelskirchen, Germany) since a special template fixed the bone specimen exactly vertical to the titanium device with resin based glue (Polyol FC 53 BD, Rencast, Huntsman, Basel, Switzerland) and the screw for load transmission was mounted from the bottom since laser controlled its axial orientation and correct rotation of specimens was ensured. The plate was then rotated 180° controlled by water-level and the other end of the specimens was fixed in similar resin glue aided by a template. Afterwards the complete constructs containing 4 specimens were deep frozen at -20°C . Before performing the mechanic test the four specimens were divided and warmed up separately. Two non-destructive tests were performed followed by one destruction bending test.

The non-destructive torsion test included three cycles using a special designed device each applying $\pm 0.37\text{ Nm}$ (Jahnke et al. 2015; Jakobowitz 2013) (Fig. 2). The setup avoids any compression force

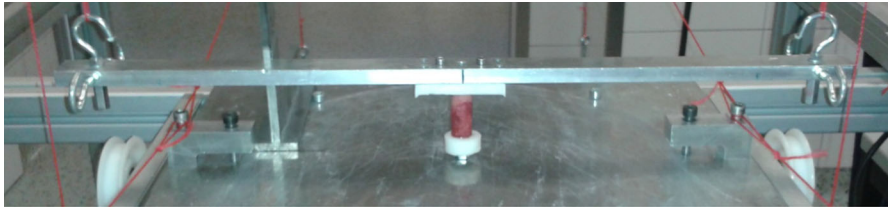


Fig. 2 Device for application of torsion load: 2 weights create torsion of ± 0.37 Nm by reciprocal shifting

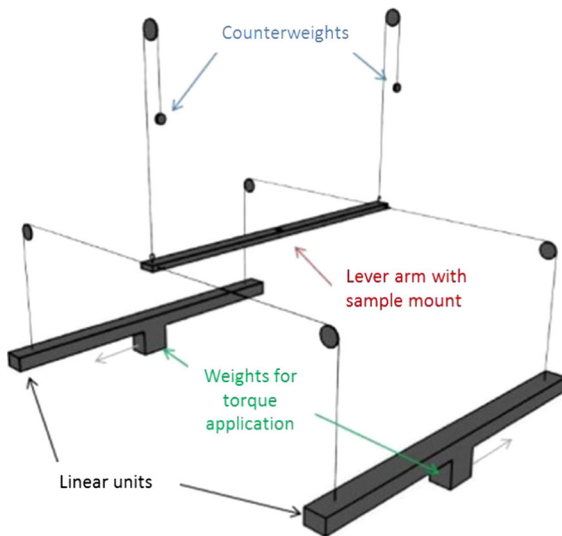


Fig. 3 Scheme of torsion measurement

acting on the specimens (Fig. 3). During cyclic measurements the movement of the specimens is recorded by laser documentation (EN60825-1:2007, Grade 2, 650 nm, Laserfuchs Picotronic GmbH, Koblenz, Germany). Rotation additional to the bone specimens were laser controlled to achieve real values of torsion and avoid structural changes of the bone cylinders. During cyclic measurement the zero position and the maximum position of the laser were projected to a 11657 mm distant scanning screen and photographically documented (EOS 550D, Canon GmbH, Krefeld, Germany) to allow calculation of torsion (Software GIMP, 2.8.4., GNU Image Manipulation Program) (Fig. 4). The pixel number between the laser marks allowed reconstruction of movement of the specimens using software GIMP (2.8.4, GNU Image Manipulation Program). The real torsion angle α was defined: $\alpha = \arctan\left(\frac{x}{s}\right)$ since x is the distance between loaded and not loaded position of the laser and s is the distance between bone cylinder and screen.

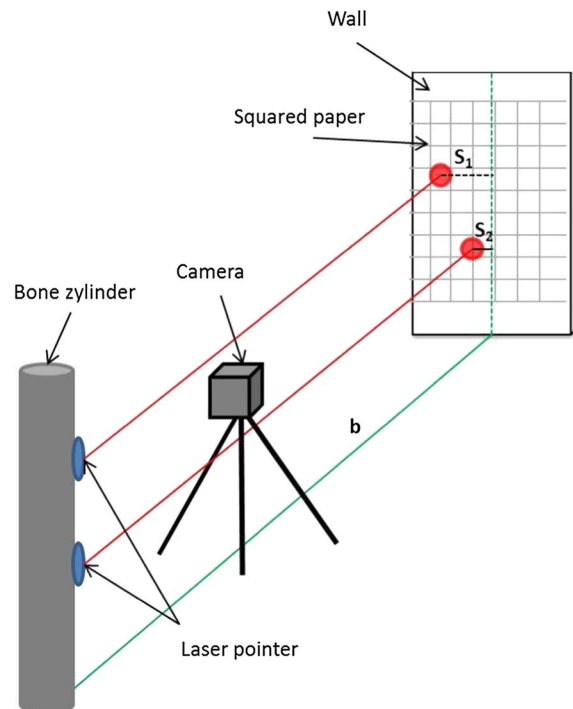


Fig. 4 Scheme of photographic measurement of torsion using laser technology

The cross section is defined with $d = 18$ mm though torsion is $I_p = \frac{\pi \cdot d^4}{32} = 10305.9 \text{ mm}^4$. The shear modulus is calculated $G_T = \frac{T_Z \cdot l}{\alpha \cdot I_p}$ since T_Z is the applied force and l the length of the cylinder.

The non-destructive compression and the destructive three-point bending test used a compression-tension sensor device (S-Beam Junior Load Cell, Futek, Model LSB200, Irvine, CA, USA) with measurement range ± 445 N based on DMS technology. It was mounted to a test machine maximal load 20 kN (Inspect Table Blue, Hegewald&Peschke, Nossen, Germany) with an aluminium holding device individually constructed for this study to fit to the diameter of the cylinder and ensure ideal transmission of movement and

force (Inspect Table Blue, Hegewald&Peschke, Nossen, Germany). The measurement device was connected to the computer via a measurement increaser (Meas-Box, Sensoscon, 67,149 Meckenheim, Germany) for calculation (Sensor2USB, Sensocon, 67,149, Meckenheim, Germany). Before testing the central position of bone specimens in the force applicator was laser controlled. The force was applied with 4 mm/min until a compression of 1 N followed by reduction to 2.5 mm/min until 20 N were applied since the diameter of the specimens remained constant at 254.5 mm² to avoid structural changes of the bone. The force F applied at maximum angle and the primary length of the cylinder l_0 and the change of length Δl and the constant cross section $A = 254.5 \text{ mm}^2$ enable the calculation of pressure modulus $E_C = \frac{F \cdot l_0}{A \cdot \Delta l}$.

For destructive three-point bending test the orientation of the specimen was medio-lateral and the force was applied with 4 mm/min until destruction. The application of the pestle on the specimens was laser controlled before magnetic fixation.

For comparison of left and right femur and considering different directions of load the non-parametric Wilcoxon test was used. For examination of the influence of thermoisinfection on mechanical properties of cancellous bone the parametric t test was performed since $p < 0.05$ was set significant and calculation was done with SPSS (Version 22.0.0.0., IBM, Armonk, NY, USA).

Results

According to technical reasons of preparation of the bone specimens 4 pieces had to be discharged, though a number of 23 bone cylinders each fresh frozen and thermoisinfectated were included in the study. The average CCD-angle was measured $140.0^\circ \pm 3.7^\circ$ left and $140.2^\circ \pm 3.9^\circ$ at right femur showing no significant difference. Damage of two specimens reduced the number of medio-lateral and ventro-dorsal test to each four measurements. Average maximum force was $257.07 \pm 32.02 \text{ N}$ for medio-lateral and $221.32 \pm 41.49 \text{ N}$ for ventro-dorsal direction showing no significant difference ($p = 0.068$). The average maximum bending force of the femurs was $254.69 \pm 66.02 \text{ N}$ at the right compared with $238.21 \pm 64.95 \text{ N}$ at the left side. The Wilcoxon test

revealed no significant difference between both sides ($p = 0.051$).

The average value for shear modulus was $1.28 \pm 0.68 \text{ GPa}$ for native and $1.02 \pm 0.31 \text{ GPa}$ for thermoisinfectated cancellous bone (Table 1). Pressure modulus showed a comparable reduction from native 6.30 ± 4.72 to $4.97 \pm 2.23 \text{ GPa}$ for thermoisinfectated cancellous bone. The maximum bending force until failure showed a reduction from $270.03 \pm 116.68 \text{ N}$ to $228.80 \pm 70.49 \text{ N}$ after thermoisinfection. The failure of all native and thermoisinfectated specimens occurred beneath the former growth plate (Fig. 5). The difference for shear modulus using t test between native and thermoisinfectated bone reached significance ($p = 0.029$) since no significant differences for the other mechanic parameter were shown (Table 1). Thermoisinfection caused $18.90 \pm 3.17 \%$ overall reduction of mechanical properties considering all parameter measured.

Discussion

The increasing number of revision surgery of joint replacements has to cope with loss of bone stock (Holt et al. 2011; McNamara 2010). Cementless revisions of arthroplasties might restore bone stock which is important for longevity of implant and considering further surgery in young patients (Haddad and Rayn 2009; Holt et al. 2011; Oakes and Cabanela 2006) since total femur replacement should be preserved for extensive bone deficiency (Friesecke et al. 2005). The selection of bone grafts depends on the type of bone defect and cancellous bone grafts might be used for cavitary bone defects (Goldberg 2000) since larger defects require larger structural grafts. A primary stable construct seems more important than the volume of bone graft and its contact to the host bone (Haddad and Rayn 2009). It remains in discussion which mechanic properties are essential for a bone graft and the scientific basis of engineering aspects of impaction bone grafting is poorly understood (Toms et al. 2004). Bone graft is underlying permanent deformation and its compression modulus is relatively low compared with cancellous bone of similar density (Giesen et al. 1999). Protected by a stable implant the primary stability of cancellous bone graft seems less important and other properties might be more relevant. Properties of collagen matrix did not correlate with

Table 1 Results of measurement of mechanical parameter

n = 23	Shear modulus [GPa]	Pressure modulus [GPa]	Maximum bending force [N]
MEAN _{native} (SD)	1.28 (\pm 0.68)	6.30 (\pm 4.72)	270.03 (\pm 116.68)
MEAN _{thermo.} (SD)	1.02 (\pm 0.31)	4.97 (\pm 2.23)	228.80 (\pm 70.49)
Rel. deviation [%]	20.31	21.11	15.27
<i>p</i> values	0.029*	0.235	0.074

* Indicates significance $p < 0.05$

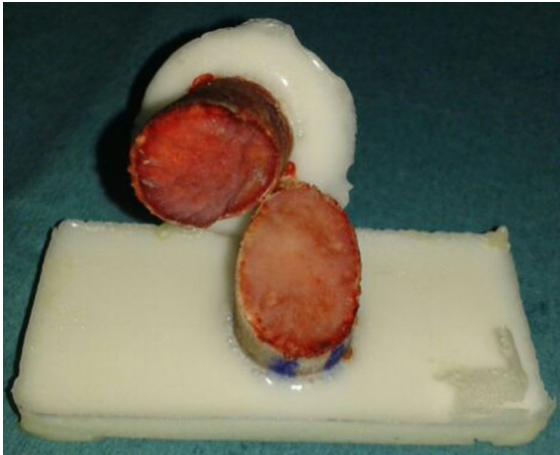


Fig. 5 Fracture line in bone cylinder after three-point bending test until failure

mineral density (Banse et al. 2002) since different results concerning correlation between apparent density and compressive mode and strength were reported (Giesen et al. 1999; Yeni et al. 2001, 2004). Reduction of collagen crosslink impaired toughness of bone increasing fragility independent of mineral density (Burr 2002). Collagen structure and bone mineral architecture combined are relevant for the mechanic behavior of bone since thermal reduction of collagen-crosslinks affected bone strength (Fölsch et al. 2012; Oxlund et al. 1995; Wachter et al. 2001, 2002). The influence of thermoisinfection on different mechanical parameter other than pull out strength (Fölsch et al. 2015) might be relevant regarding clinical application (Fölsch et al. 2012; Wachter et al. 2002). Mechanic properties of cancellous bone do not regularly correlate with each other and thermoisinfection might affect those mechanic qualities differently.

Local variations of architecture and bone volume fraction within specimens have to be considered comparing results of different mechanical properties (Perilli et al. 2008; Wachter et al. 2001). Bone volume fraction predicted cancellous bone mechanical properties and variability of stress was increased in low bone volume fraction of human vertebral bone specimens (Yeni et al. 2001). Human cancellous bone is a heterogeneous material and variations of microarchitecture were predominant for fracture since variations of measurement angle might cause different stress values (Perilli et al. 2008; Harrison et al. 2013). The failure occurred in the middle of the cancellous specimens from femoral heads 26 mm length and diameter 10 mm which had been orientated parallel to weight bearing axis comparable to our study (Perilli et al. 2008) since fixation had been done with ethanol in the other study. Variance of bone morphology might be responsible for not significant changes for pressure modulus and bending force due to thermoisinfection (Table 1) since shear modulus showed an analytical error around 10–20 % in cancellous bone region in another study (Matsunga et al. 2013). Main geometrical properties of trabecular bone are determined by effective shear modulus (Klinge 2013) which is an important biomechanical factor (Matsunga et al. 2013). Mechanical properties depend on different modes of load since bone strength was greater in compression than in tension but that difference was not shown for stiffness (Yeni et al. 2004). The relative reduction of the measured mechanical properties appeared in a dimension, comparable with pull out strength in a previous study (Table 1) (Fölsch et al. 2015). We found a significant reduction of shear stress due to thermoisinfection and a significant influence on compression modulus and bending failure (Table 1) could not be shown since shear modulus depends on more complex factors compared with

compression test (Matsunga et al. 2013). Thermoinfection reduced pull out strength from cancellous bone significantly up to around 15 % (Fölsch et al. 2015) comparable with the not significant reduction of bending failure (Table 1). In a bovine cancellous bone model tensile strength (7.6 MPa) appeared lower than compressive strength (12.4 MPa) (Kaplan et al. 1985). Compression modulus comparable with our study (Table 1) was found higher than shear modulus which is an important parameter for overall failure of specimens (Nazarian et al. 2009) and the most relevant mode of failure (Dunlop et al. 2003). Young's modulus in compressive testing of cancellous bone did not correlate with specimen density since geometry of the specimens was found to influence it (Odgaard and Linde 1991; Perilli et al. 2008). Elastic modulus was less correlated with pore dimensions than yield stress but mineral density correlated with elastic modulus which had a wide range from 0.69 to 3.37 GPa and did not show significant change with age since other mechanical properties in fresh frozen human femur did (Wachter et al. 2002). Bone shear properties are an important feature and in a heterogeneous cancellous bone microstructure the weakest region predicted the shear properties of the entire bone specimen and oblique failure in compression tests shows the importance of shear properties in nonaxisymmetric specimens (Nazarian et al. 2009). The heterogeneity might account for a wide range of measurement values despite laser assisted measurement (Table 1). Shear stress is less well controlled in bones with low bone volume fraction (Yeni et al. 2001). We could show a significant reduction of shear modulus by thermoinfection of around 20 % (Table 1). Bruyère found a shear modulus of 289 MPa and ultimate stress torsion of 4.3 MPa with a strong correlation between shear modulus and torsion since apparent density correlated with shear stress (Garnier et al. 1999). We did not show a correlation between compression modulus and shear modulus.

Preparation procedures might not influence different material qualities similar changing parameter of mechanical properties comparable to each other. Architecture of bone influences the relation between different mechanical properties since in anisotropic cancellous bone shear modulus cannot be determined from Young's modulus (Matsunga et al. 2013) and geometry of bone specimens influenced Young's modulus since elastic strain was not changed

(Odgaard and Linde 1991). This might indicate an apparent independence between different mechanic properties. Failure regions of bone were shown to have lower trabecular volume within defined bone volume (Perilli et al. 2008) and low bone volume fraction was the weakest point in compression and tension (Nazarian et al. 2009). Strong density gradients were found in human femoral heads (Garnier et al. 1999) and elastic modulus of cortical bone also varied considerably (Wachter et al. 2002). For those reasons the mechanical property of an individual bone allograft does not seem exactly predictable and it seems to remain in discussion whether individual factors of the bone graft influence mechanical properties of cancellous bone more than proceedings of the bone bank. This might be another reason for not significant reduction of pressure modulus as well as maximum bending force (Table 1) since a larger number of specimens might reach significance level. Thermoinfection had shown a significant reduction of pull out strength in a larger cohort (Fölsch et al. 2015) since it remains in discussion which mechanic properties are essential for a bone graft and the scientific basis of engineering aspects of impaction bone grafting is poorly understood (Toms et al. 2004). Bone is anisotropic with collagen and mineral crystals at various angles to long axis outlining the importance of direction of load (Wachter et al. 2001, 2002) which should be less important in impaction grafting. The present study was designed to examine the influence of thermoinfection on different defined mechanic properties of cancellous bone.

Diverse preparation methods of bone banks affect mechanical and biological behavior of bone grafts (Fölsch et al. 2012) since there is a complex balance between mechanical demands for initial stability and long-term incorporation (Toms et al. 2004). Washing had no effect on cohesion since addition of blood improved cohesion of allograft bone (Oakley and Kuiper 2006). Washing of bone allograft, removing fat and bone marrow increased resistance against shear forces compared with fresh bone graft (Dunlop et al. 2003) since reduction of water content and even more removal of fat from bone allograft decreased strain and improved static and dynamic behavior of bone (Arts et al. 2006; Ullmark 2000; Voor et al. 2000, 2004, 2008). Some proceedings of bone banks might therefore influence

mechanical properties accordingly and impaction of washed bone grafts might improve mechanical properties. The effect of preparation might become more important than primary features of the bone graft. Impaction of bone grafts was found influenced by content of fluid since swelling of bone is viscoelastic and the viscous component is related to fluid and the elastic feature to bone (Bolland et al. 2007; Fosse et al. 2006a, b). The compression modulus after impaction was lower compared with cancellous bone of same density (Giesen et al. 1999) since impaction was shown to increase shear strength (Brewster et al. 1999). This might indicate that the reduction of mechanic parameter due to thermoinfection (Table 1) appears less important for the overall mechanic behavior of impacted bone allograft. No correlation was found between apparent density and compressive modulus (Giesen et al. 1999) since impaction was found to increase mass density (Lunde et al. 2008). Different correlations between density and compressive modulus described might reflect the influence of microarchitecture and therefore hinder significant changes for some parameter (Table 1). Hydroxyapatit and tricalciumphosphat hardly deformed under loading compared with allograft bone (Verdonshot et al. 2001) and are suitable expander of bone allograft (Bolder et al. 2003a, b) which increase torque resistance of impacted bone graft (Fujishiro et al. 2005) indicating the relevance of density for mechanical property (Arts et al. 2006; McNamara et al. 2012; van Haaren et al. 2005).

The optimal configuration of bone chips has not been defined (McNamara 2010) since size and distribution of bone chips influence impaction and therefore mechanical properties of bone graft (Bolland et al. 2007; Holton et al. 2013; Putzer et al. 2010, 2011; Robinson et al. 2005; Ullmark 2000). Thermoinfection reduced shear modulus significantly and pressure modulus not significantly each around 20 % and maximum bending force was decreased not significantly around 15 % since reduction of pull out force in a previous study was significantly reduced around up to 15 % (Fölsch et al. 2015) which shows comparable results for the destructive bending test in this study. The statistical interpretation without significance should be related to a small number of specimens despite statistical calculation ahead of the study. The lack of significance might be related to

influence of microarchitecture of specimens on the mechanic parameter as discussed in literature making comparisons between studies difficult. Methods of measurement could be responsible for not significant changes which should not be suspected in this setting. During harvesting the outer structure of the specimens might have sustained potential damage affecting the mechanic parameter. A difference concerning significance level might be related to three cyclic measurements of shear modulus according to the device compared with single measurement of compressive modulus and destructive bending test.

It might be assumed that thermoinfection preserves at least around 80 % of mechanic properties of cancellous bone. Preparation of allograft bone might be more important than design of the implanted stem (Malkani et al. 2005) and allograft bone structure appears less important during impaction compared with normal cancellous bone (Brewster et al. 1999; Giesen et al. 1999). Impaction bone grafting for revision of total hip replacements shows good long-term results (Bronsema et al. 2014; Cummins et al. 2011; Ding et al. 2015; Gehrke et al. 2013; Gilbody et al. 2014; Hailer et al. 2010; Heyligers et al. 2014; Ibrahim et al. 2013; Ornstein et al. 2009; teStroet et al. 2015; Schreurs et al. 2005, 2006) and viable transplanted allograft bone was shown (Fujishiro et al. 2008; Ullmark and Linder 1998). Thermoinfected cancellous bone showed a uniform reduction of the mechanic properties measured since the dimension does not seem clinically relevant in case of impaction bone grafting. A significant reduction around 20 % was only found for shear modulus since around 20 % not significant impairment was shown for compressive modulus and 15 % reduction appeared for maximum bending force. A delay of revascularization of 80 °C heat treated allograft bone which reached more than 70 % revascularization after 8 weeks was shown in a rabbit model (Shimuzu et al. 1999). It can be assumed that heat application might have a uniform effect on mechanic and biologic properties of bone grafts (Shimuzu et al. 1999) (Table 1) and the heat treatment did not relevantly impair osseous integration of the bone grafts. Larger numbers of specimens would apparently have created significance level for all mechanic parameter. If no structural weight bearing graft is necessary, the thermoinfected cancellous allograft bone can be considered regarding other advantages (Fölsch et al. 2012).

Conclusion

Thermoisinfection reduces shear strength significantly around 20 % compared with native cancellous bone. Pressure modulus was reduced by 20 % and maximum bending force by around 15 % without reaching significance indicating a uniform influence of heat application on different mechanical properties of cancellous bone. Thermoisinfection preserves relevant mechanical properties of cancellous bone which should be sufficient for many clinical applications including impaction bone grafting.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest No benefits in any form have been received or will be received from a commercial party related directly or indirectly to the subject of this article.

References

- Arts J, Verdonshot N, Buma P, Schreurs B (2006) Larger bone graft size and washing of bone grafts prior to impaction enhances the initial stability of cemented cups. *Acta Orthop* 77:227–233
- Banse X, Devogelaer JP, Lafosse A, Sims TJ, Grynias M, Bailey AJ (2002) Cross-link profile of bone collagen correlates with structural organization of trabeculae. *Bone* 31:70–76
- Bolder S, Schreurs B, Verdonshot N, van Unen J, Gardeniers J, Slooff T (2003a) Particle size of bone graft and method of impaction affect stability of cemented cups. *Acta Orthop Scand* 74:652–657
- Bolder S, Verdonshot N, Schreurs B, Puma P (2003b) The initial stability of cemented acetabular cups can be augmented by mixing morsellised bone grafts with tricalciumphosphate hydroxyapatite particles in bone impaction grafting. *J Arthroplasty* 18:1056–1063
- Bolland B, New A, Madabhushi S, Oreffo R, Dunlop D (2007) Vibration-assisted bone graft-compaction in impaction bone grafting of the femur. *J Bone Joint Surg* 89-B:686–692
- Brewster et al (1999) Mechanical considerations in impaction bone grafting. *J Bone Joint Surg* 81-B:118–124
- Bronsema E, te Stroet MA, Zengerink M, van Kampen A, Schreurs BW (2014) Impaction bone grafting and a cemented cup after acetabular fracture. *Int Orthop* 38:2441–2446
- Burr DB (2002) The contribution of the organic matrix to bone's material properties. *Bone* 31:8–11
- Cummins F, O'Reilly P, Flannery O, Kelly D, Kenny P (2011) Defining the impaction frequency and threshold force required for femoral impaction grafting in revision hip arthroplasty. *Acta Orthop* 82:433–437
- Ding H, Mao Y, Yu B, Zhu Z, Li H, Yu B, Huang J (2015) The use of morsellized allografts without impaction and cemented cage support in acetabular revision surgery: a 4–9 year follow-up. *J Orthop Surg Res* 23:77
- Dunlop DG, Brewster NT, Madabhushi SPG, Usmani AS, Pankaj P, Howie CR (2003) Techniques to improve the shear strength of impacted bone graft. *J Bone Joint Surg* 85-A:639–646
- Fölsch C, Mittelmeier W, Bilderbeek U, Timmesfeld N, von Garrel T, Peter Matter H (2012) Effect of storage temperature on allograft bone. *Transfus Med Hemother* 39:36–40
- Fölsch C, Pinkernell R, Stiletto R (2013) Biocompatibility of polymer-bioglass cement Cortoss®: in vitro test with the MG63 cell model. *Orthopädie* 42:170–176
- Fölsch C, Mittelmeier W, von Garrel T, Bilderbeek U, Timmesfeld N, Pruss A, Matter HP (2015) Influence of thermoisinfection and duration of cryopreservation at different temperatures on pull out strength of cancellous bone. *Cell Tissue Bank* 16:73–81
- Fosse L, Ronningen H, Lund-Larsen J, Benum P, Grande L (2004) Impacted bone stiffness measured during construction of morsellised bone samples. *J Biomech* 37:1757–1766
- Fosse L, Muller S, Ronningen H, Irgens F, Benum P (2006a) Viscoelastic modeling of impacted morsellised bone accurately describes unloading behaviour: An experimental study of stiffness moduli and recoil properties. *J Biomech* 39:2295–3302
- Fosse L, Ronningen H, Benum P, Sandven R (2006b) Influence of water and fat content on compressive stiffness properties of impacted morsellized bone. *Acta Orthop* 1:15–22
- Friesecke C, Plutat J, Block A (2005) Revision arthroplasty with use of a total femur prosthesis. *J Bone Joint Surg* 87:2693–2701
- Fujishiro T, Nishikawa T, Niikura T, Takikawa S, Nishiyama T, Mizono K, Yoshiya S, Kurosaka M (2005) Impaction bone grafting with hydroxyapatite. *Acta Orthop* 76:550–554
- Fujishiro T, Nishikawa T, Niikura T, Takikawa S, Saegusa Y, Kurosaka M, Bauer TW (2008) Histologic analysis of allograft mixed with hydroxyapatite-tricalcium phosphate used in revision femoral impaction bone grafting. *Orthopedics* 31:277
- Garnier KB, Dumas R, Rumelhart C, Arlot ME (1999) Mechanical characterization in shear of human femoral cancellous bone: torsion and shear tests. *Med Eng Phys* 21:641–649
- Gehrke T, Gebauer M, Kendoff D (2013) Femoral stem impaction grafting: extending the role of cement. *Bone Joint* 95-B(11 Suppl A):92–94
- Giesen EBW, Lamerigts NMP, Verdonshot N, Buma P, Schreurs BW, Huiskes R (1999) Mechanical characteristics of impacted morsellised grafts used in revision of total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg* 81-B(6):1052–1057
- Gilbody J, Taylor C, Bartlett GE, Whitehouse SL, Hubble MJW, Timperley AJ, Howell JR, Wilson MJ (2014) Clinical and radiographic outcomes of acetabular impaction grafting without cage reinforcement for revision hip replacement: a minimum 10-year follow-up study. *Bone Joint* 96-B:188–194
- Goldberg VM (2000) Selection of bone grafts for revision total hip arthroplasty. *Clin Orthop Rel Res* 381:68–76
- Haddad F, Rayn F (2009) The role of impaction grafting: the when and how. *Orthopedics* 32(9). doi: [10.3928/01477447-20090728-19](https://doi.org/10.3928/01477447-20090728-19)

- Hailer NP, Garellick G, Kärrholm J (2010) Uncemented and cemented primary total hip arthroplasty in the Swedish hip arthroplasty register. *Acta Orthop* 81:34–41
- Halliday B, English H, Timperley A, Gie G, Ling R (2003) Femoral impaction grafting with cement in revision total hip replacement. Evolution of the technique and results. *J Bone Joint Surg* 85-B:809–817
- Harrison NM, McDonnell P, Mullins L, Wilson N, ÓMahoney D, McHugh PE (2013) Failure modeling of trabecular bone using a non-linear combined damage and fracture voxel finite element approach. *Biomech Model Mechanobiol* 12:225–241
- Heyligers C, Schreurs B, van Haaren E (2014) Femoral revision impaction bone grafting and a cemented polished tapered stem. *Oper Orthop Traumatol* 26:156–161
- Holt G, Hook S, Hubble M (2011) Revision total hip arthroplasty: the femoral side using cemented implants. *Int Orthop* 35:267–273
- Holton C, Bobak P, Wilcox R, Jin Z (2013) Impaction grafted bone chip size effect on initial stability in an acetabular model: mechanical evaluation. *J Orthop* 10:177–181
- Ibrahim MS, Raja S, Haddad FS (2013) Acetabular impaction bone grafting in total hip replacement. *J Bone Joint Surg* 95-B(Suppl A):98–102
- Jahnke A, Jakobowitz E, Ishaque BA, Rickert M, Bischel O (2015) Influence of cerclages on primary stability of tumor megaprotheses subjected to distal femur defects. *Injury*. 2015 Oct 23. pii: S0020-1383(15)00633-6. doi: [10.1016/j.injury.2015.10.031](https://doi.org/10.1016/j.injury.2015.10.031)
- Jakobowitz E (2013) Influence of stem design on the primary stability of megaprotheses of the proximal femur. *Int Orthop* 8:1877–1883
- Kaplan SJ, Hayes WC, Stone JL, Beaupré GS (1985) Tensile strength of bovine trabecular bone. *J Biomech* 18:723–727
- Klinge S (2013) Determination of the geometry of the RVE for cancellous bone using the effective complex shear modulus. *Biomech Model Mechanobiol* 12:401–412
- Lunde K, Kaehler N, Ronningen H, Fosse L (2008) Pressure during compaction of morsellised bone gives an increase in stiffness: an in vitro study. *J Biomech* 41:231–234
- Malkani A (1996) Femoral component revision using impacted morsellized cancellous graft: a biomechanical study of implant stability. *J Bone Joint* 78-B:973–978
- Malkani A, Voor M, Hellmann E, Khalily C, Capello W, Wang M, Bauer T, Crawford C (2005) Histologic and mechanical evaluation of impaction grafting for femoral component revision in a goat model. *Orthopedics* 28:49–58
- Matsunga S, Naito H, Tamatsu Y, Takano N, Abe S, Ide Y (2013) Consideration of shear modulus in biomechanical analysis of peri-implant jaw bone: accuracy verification using image-based multi-scale simulation. *Dent Mater J* 32:425–432
- McNamara IR (2010) Impaction bone grafting in revision hip surgery: past, present and future. *Cell Tissue Bank* 11:57–73
- McNamara I, Rayment A, Brooks R, Best S, Rushton N (2012) The effect of the addition of hydroxyapatite graft substitutes upon the hoop strain and subsequent subsidence of a femoral model during impaction bone grafting. *J Mech Behav Biomed Mater* 5:238–246
- Nazarian A, Meier D, Müller R, Snyder BD (2009) Functional dependence of cancellous bone shear properties on trabecular microstructure evaluated using time-lapsed micro-computed tomographic imaging and torsion testing. *J Orthop Res* 27:1667–1674
- Oakes DA, Cabanela ME (2006) Impaction bone grafting for revision hip arthroplasty: biology and clinical applications. *J Am Acad Orthop Surg* 14:620–628
- Oakley J, Kuiper JH (2006) Factors affecting the cohesion of impaction bone graft. *J Bone Joint* 88-B:828–831
- Odgaard A, Linde F (1991) The underestimating of Young's modulus in compressive testing of cancellous bone specimens. *J Biomech* 24:691–698
- Ohashi H, Kobayashi A, Kadoya Y, Yamao Y (2000) Effect of particles and interface conditions on fibrous tissue interposition between bone and implant. A particle challenge model in rabbit. *J Mater Sci Mater Med* 11:255–259
- Ornstein E, Lindner L, Ranstam J, Lewold S, Eisler T, Torper M (2009) Femoral impaction bone grafting with the Exeter stem—Swedish experience. *J Bone Joint* 91-B:441–446
- Oxlund H, Barckman M, Ortoft G, Andreassen TT (1995) Reduced concentrations of collagen cross-links are associated with reduced strength of bone. *Bone* 17(4 Suppl):365S–371S
- Perilli E, Baleani M, Öhman C, Fognani R, Baruffaldi F, Viceconti M (2008) Dependence of mechanical compressive strength on local variations in microarchitecture in cancellous bone of proximal human femur. *J Biomech* 41:438–446
- Pruss A, Seibold M, Benedix F, Frommelt L, von Garrel T, Gürtler L, Dörffel Y, Pauli G, Göbel UB (2003) Validation of the “Marburg bone bank system” for thermomodification of allogeneic femoral head transplants using selected bacteria, fungi and spores. *Biologicals* 31:287–294
- Putzer D, Coraca-Huber D, Wurm A, Schmoelz W, Nogler M (2010) Optimizing the grain size distribution of allograft bone impaction grafting. *J Orthop Res* 8:1024–1029
- Putzer D, Mayr E, Haid C, Reinhaller A, Nogler M (2011) Impaction bone grafting. *J Bone Joint Surg* 93-B:1049–1053
- Revell PA, Braden M, Freeman MAR (1998) Review of the biological response to a novel bone cement containing poly(ethyl methacrylate) and n-butyl methacrylate. *Biomaterials* 19:1579–1586
- Robinson MC, Fernlund G, Meek R, Masri B, Duncan C, Oxland T (2005) Structural characteristics of impaction allografting for revision total hip arthroplasty. *Clin Biomech* 20:853–855
- Schreurs BW, Arts C, Verdonshot N, Buma P, Slooff JJH, Gardeniers JWM (2005) Femoral component revision with use of impaction bone-grafting and a cemented polished stem. *J Bone Joint Surg* 87-A(11):2499–2507
- Shimuzu K, Masumi S, Yano H, Fukunaga T (1999) Revascularization and new bone formation in heat-treated bone grafts. *Arch Orthop Trauma Surg* 119:57–61
- Slooff T, Huiskes R, van Horn J, Lemmens AJ (1984) Bone grafting in total hip replacement for acetabular protrusion. *Acta Orthop* 55:593–596
- teStroet M, Rijnen WHC, Gardeniers JWM, van Kampen A, Schreurs BW (2015) The outcome of femoral component revision arthroplasty with impaction allograft bone grafting and a cemented polished Exeter stem: a prospective

- cohort study of 208 revision arthroplasties with a mean follow-up of 10 years. *Bone Joint* 97:771–779
- Toms AD, Barker RL, Jones RS, Kuiper JH (2004) Impaction bone-grafting in revision joint replacement surgery. *J Bone Joint Surg* 86:2050–2060
- Ullmark G (2000) Bigger size and defatting of bone chips will increase cup stability. *Arch Orthop Traum Surg* 120:445–447
- Ullmark G, Linder L (1998) Histology of the femur after cancellous impaction grafting using a Charnley prosthesis. *Arch Orthop Trauma Surg* 117:170–172
- van Haaren E, Smit T, Phipps K, Wuisman P, Blunn G, Heyligers I (2005) Tricalcium-phosphate and hydroxyapatite bone-graft extender for use in impaction grafting revision surgery. *J Bone Joint Surg* 87-B:267–271
- Verdonshot N, van Hal C, Schreurs B, Buma P, Huiskes R, Slooff T (2001) Time-dependent mechanical properties of HA/TCP particles in relation to morselized bone grafts for use in impaction grafting. *J Biomed Mater Res* 58:599–604
- Voor MJ, Nawab A, Malkani AL, Ullrich CR (2000) Mechanical properties of compacted morselized cancellous bone graft using one-dimensional consolidation testing. *J Biomech* 33:1683–1688
- Voor MJ, White JE, Grieshaber JE, Malkani AL, Ullrich CR (2004) Impacted morselized cancellous bone: mechanical effects of defatting and augmentation with fine hydroxyapatite particles. *J Biomech* 37:1233–1239
- Voor M, Madsen R, Malkani A, Togawa D, Bauer TW (2008) Impaction grafting for femoral component revision in a goat model using washed morselized cancellous allograft. *Orthopedics* 31:443–450
- Wachter NJ, Augat P, Mentzel M, Sarkar MR, Krischak GD, Kinzl L, Claes LE (2001) Predictive value of bone mineral density and morphology determined by peripheral quantitative computed tomography for cancellous bone strength of the proximal femur. *Bone* 28:133–139
- Wachter NJ, Krischak GD, Mentzel M, Sarkar MR, Ebinger T, Kinzl L, Claes L, Augat P (2002) Correlation of bone mineral density with strength and microstructural parameters of cortical bone in vitro. *Bone* 31:90–95
- Yeni YN, Hou FJ, Vashishth D, Fyhrie DP (2001) Trabecular shear stress in human vertebral cancellous bone: intra- and inter- individual variations. *J Biomech* 34:1341–1346
- Yeni YN, Dong XN, Fyhrie DP, Les CM (2004) The dependence between the strength and stiffness of cancellous and cortical bone tissue for tension and compression: extension of a unifying principle. *Biomed Mater Eng* 14:303–310

3.4. Biokompatibilität von Polymer-Glaskeramik-Zement Cortoss®: In-vitro-Testung mit dem MG63-Zell-Modell

Einleitung

Eine ideale Kombination sämtlicher erwünschter Eigenschaften von Knochenzement konnte bisher nicht erreicht werden [88]. Änderungen der Zementkomposition haben Auswirkungen auf die chemischen und mechanischen Eigenschaften [77]. Es liegen widersprüchliche Untersuchungsergebnisse zur Zytotoxizität von Zementen vor [77,163]. Calciumphosphatzemente weisen eine bessere Biokompatibilität bei geringerer mechanischer Belastbarkeit als PMMA-Zement auf [87,88,164]. Dieser wird von fibrösem Gewebe umgeben ohne direkt an das knöcherne Implantatlager anzubinden [79,82,165-167]. Die Grenzfläche zwischen PMMA-Zement und Knochen bietet keine biologische Aktivität vergleichbar den Calciumphosphatzementen [77,84,85,88,98]. Modifikationen verschiedener Komponenten von PMMA-Zement wurden im Hinblick auf die Biokompatibilität untersucht [88,168,169]. Die Differenzierung und die Proliferation humaner Osteoblasten wurde in vitro durch PMMA-Zement beeinträchtigt ohne Nachweis einer ossären Integration [84,85], hingegen konnte eine Vaskularisierung implantierten allogenen Knochens gezeigt werden [167]. Polymer-Komposit-Zemente mit Glaskeramik zeigten vergleichbare mechanische Eigenschaften wie PMMA-Zement [77,79,88,169] und gleichzeitig eine gute knöcherne Integration in vivo [83]. Die Beurteilung der Frühphase der Interaktion zwischen Zement und den osteoblastären Zellen erfolgte im Zellmodell in vitro.

Methode

Die Biokompatibilität von Knochenzement auf Basis von PMMA wurde im Zellkulturmodell vergleichend zu Calciumphosphatzement untersucht. Zur Anwendung kamen MG63-Zellen American Type Culture Collection. Ein Untersuchungsgang beinhaltete 16 parallele Zellkulturansätze. Von den Knochenzementen wurde tageweise chronologisch Medium gewonnen und auf 96-Loch Well-Platten mit jeweils 5000 Osteosarkomzellen inkubiert. Die Untersuchung der zellulären Funktion erfolgte bis zur Dauer von sechs Tagen. Die metabolische Zellaktivität wurde mittels MTT-Assay photometrisch

bestimmt und die morphologische Untersuchung erfolgte mit Durchlichtmikroskop sowie Rasterelektronenmikroskop. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Student's t-Test mit festgesetzter Signifikanz von $\alpha=0,05$.

Ergebnis

Calciumphosphatzement führte im Zellkulturmodell zu einer geringen und passageren Beeinträchtigung der Vitalität der Osteosarkomzellen. Nach 5 Tagen kam es zu einer Erholung der Zellfunktion. Hingegen zeigte sich in Gegenwart eines auf PMMA basierenden Zementes zu keinem Zeitpunkt Zellaktivität überlebender Zellen. Bereits nach 48 Stunden war bei dem Mediumzusatz des Calciumphosphatzementes eine signifikante Steigerung der zellulären Aktivität erkennbar. Die optische Dichte zeigte sich mit 0.384 ± 0.038 beziehungsweise 0.353 ± 0.085 bei Zugabe von $100\mu\text{l}$ und $200\mu\text{l}$ spezifischen Mediums von Calciumphosphatzement steigend und deutlich höher als in Gegenwart des Mediums vom PMMA-Zement nach 120 Stunden mit Werten von 0.0724 ± 0.0043 und 0.0666 ± 0.0021 . In Gegenwart des spezifischen Mediums vom PMMA-Zement war im Beobachtungszeitraum von 5 Tagen keine signifikante Veränderung der Zellaktivität nachweisbar weder für $100\mu\text{l}$ und $200\mu\text{l}$.

Diskussion

Polymer-Komposit-Zemente mit Glaskeramik zeigten vergleichbare mechanische Eigenschaften wie PMMA-Zement [77,79,88,163,169], aber eine physiologischere Lastübertragung wurde für Glaskeramikzement beschrieben [83], ebenso wie eine geringere exotherme Reaktion [88]. Die Beimischung von Hydroxylapatit zu PMMA-Zement ist aus mechanischen Gründen limitiert [77,165,170], verbessert aber die Proliferation und Differenzierung humaner Osteoblasten in vitro [79] sowie die ossäre Integration mit temporärer inflammatorischer Reaktion [82,85,88,165,166]. Apatitformation auf der Oberfläche von Glaskeramik wurde nach einer Woche beschrieben [77,171] aber diese konnte in unserer Untersuchung nur beim untersuchten Calciumphosphatzement gezeigt werden. Die entsprechende Modifikation von PMMA-Zement mit Glaskeramik führte in vivo nach vorübergehender inflammatorischer Reaktion zu einer Osteokonduktion mit Ausheilung der

entzündlichen Komponente [166]. In den untersuchten 5 Tagen konnte keine osteoblastäre Aktivität in Gegenwart von Cortoss® erkannt werden hingegen ein Anstieg der Aktivität in Anwesenheit von Calciumphosphatzement nach 2 Tagen. Apoptose induziert durch PMMA wurde in vitro im MG63-Zellmodell nachgewiesen [78]. Unsere Ergebnisse sind vereinbar mit einer verzögerten osteoblastären Reaktion in Anwesenheit von Cortoss® [77,166]. Da die MG63-Zellen keine Kontaktinhibition zeigen und im Vergleich zu humanen Osteoblasten eine höhere Proliferationsrate aufweisen, erscheint das gewählte Modell für eine Toxizitätsuntersuchung gut geeignet. Toxische Effekte der Zementkomponenten und thermische Auswirkungen verursachen temporäre und permanente Veränderungen im Implantatlager [77,88,98,172]. In Abhängigkeit vom applizierten Zementvolumen können die lokalen Wirkungen auf oberflächliche Anteile des knöchernen Lagers beschränkt bleiben [161,172]. Die Glaskeramik Cortoss® konnte bekannte gute mechanische Eigenschaften nicht vollständig mit idealer Biokompatibilität kombinieren [88]. Die Fixierung des Zementes im Knochen ist mit Glaskeramik besser als mit Hydroxylapatit aber die Bioaktivität der Glaskeramik wird mit Ausbildung einer dreidimensionalen Polymerisation geringer [170] und der Zusatz von Hydroxylapatit zu PMMA-Zement verbessert die Proliferation und Differenzierung humaner Osteoblasten in vitro [79]. Allogener Knochen ist geeignet eine langfristige ossäre Verankerung von Implantaten zu gewährleisten [73,74] und vermeidet die Bildung fibrösen Gewebes im Interface zwischen PMMA-Zement und Knochen [167,173,174], bedingt aber eine geringere Primärstabilität als PMMA-Komposit-Zement. Die klinische Auswirkung der Beeinträchtigung der relevanten Frühphase der knöchernen Integration bleibt unter Berücksichtigung guter tierexperimenteller Ergebnisse zu diskutieren [83,166].

Fazit

Die Biokompatibilität von Calciumphosphatzement zeigt sich in der simulierten Frühphase der Implantation gegenüber PMMA-Zement mit Glaskeramikanteilen besser. Dieser erwies sich als zelltoxisch. Die Kombination hoher primärer Belastungsstabilität von Cortoss® mit potenziell idealer ossärer Integration konnte in vitro für die Frühphase nicht nachgewiesen werden.

Biokompatibilität von Polymer-Glaskeramik-Zement Cortoss®

In-vitro-Testung mit dem MG63-Zell-Modell

Seit der Beschreibung und Entwicklung durch Charnley ist die Zementverankerung von Endoprothesen zu einem Standardverfahren geworden und die erste Zementaugumentierung eines Wirbelkörpers im Jahr 1987 initialisierte die breite klinische Verwendung zur Stabilisierung frakturierter und metastasierter Wirbel mit Zement [3, 17]. Polymethylmethacrylat (PMMA)-Zement war primär nicht für diese Verwendung entwickelt worden und besitzt eine deutlich höhere Steifigkeit als spongioser Knochen [3, 6]. Die Auswirkungen unterschiedlicher exothermer Reaktionen verschiedener Zemente auf den umgebenden Knochen und das Erreichen einer thermisch schädigenden Temperatur *in vivo* werden kontrovers betrachtet [3, 4, 6, 8, 17, 22, 30]. Freie Monomere haben zusätzlich einen negativen Einfluss auf die Stabilität der Grenzfläche Knochen/Zement, und eine initiale inflammatorische Reaktion auf Implantate ist zu erwarten [16, 20]. PMMA zeigt eine sehr exotherme Reaktion bei der Polymerisation und enthält toxische Komponenten, eine fibröse Grenzzone von 1–3 µm induzierend [3, 8, 17, 36]. Die negativen Auswirkungen von Polymethylmethacrylatzementen auf das Implantatlager können durch den Zusatz zelltoxischer Chemotherapeutika als Behandlungsoption für Knochenmetastasen und primäre Kno-

chentumoren verstärkt werden [3, 6, 8, 15, 17, 22, 26, 29, 30].

Definition der verschiedenen Zemente

Änderungen der Zusammensetzung von Zementen können Auswirkungen auf die chemischen und mechanischen Eigenschaften haben [3, 16, 17, 27–30]. Die Zusammensetzung neuer Zemente für die Vertebro- und Kyphoplastie wurden mit den besonderen Erfordernissen des Applikationsverfahrens abgestimmt [17, 24]. Eine ungeeignete Rheologie kann eine klinische Anwendung trotz guter biologischer Eigenschaften verhindern [3]. Kalziumphosphatzemente bieten den Vorteil der Resorbierbarkeit und knöchernen Integration, aber mechanische Untersuchungen zeigen Nachteile gegenüber PMMA-Zement [2, 6, 12, 14, 19, 20]. Glaskeramiken sind eine alternative Substanzgruppe als Füllmaterial für die Polymerkomponenten mit osteokonduktiver Wirkung und befinden sich seit 1985 in klinischer Anwendung [16, 18]. Knöcherner Kontakt zu Hydroxylapatitimplantaten und Polymerglaskeramikkompositen wurde beschrieben, und der Anteil von Hydroxylapatit an der Implantatoberfläche beeinflusst die biologische Aktivität [16, 20]. Die Beimischung bioaktiver Substanzen kann die ossäre Integration

verbessern aber gleichzeitig die mechanischen Eigenschaften negativ verändern [6, 16, 17, 20, 27–30, 36, 38]. Glaskeramiken gehen zusammen mit Polymerzementen eine feste Verbindung mit dem Knochenlager ein, ohne als Monosubstanz ausreichende mechanische Eigenschaften aufzuweisen [20].

Für die Vertebroplastie werden PMMA-, Kalziumphosphat- und Polymerzemente mit Glaskeramik verwendet. Die Verwendung resorbierbarer Zemente mit verbesserter Biokompatibilität erscheint bei jüngeren Patienten sinnvoll [6]. Glaskeramikpolymerzemente zeigen gute klinische Resultate bei der Augmentation von Wirbelkörpern bei unterschiedlichen Daten zur Biokompatibilität [3, 5, 8, 17, 20, 34]. Polymerzemente mit Glaskeramik können eine ähnliche Primärstabilität wie PMMA-Zement und eine höhere als resorbierbare Zemente erreichen und die Viskosität der Polymer-Glaskeramik Cortoss® bleibt während der Applikation konstant [3, 6, 11, 17, 20]. Kompositzemente aus Polymerkomponente und Glaskeramik wie Cortoss® zeigen einen besseren Kontakt zu trabekulären Strukturen und weisen eine physiologischere Lastübertragung als PMMA-Zemente auf [1, 20, 35]. Tierstudien haben eine gute knöchernen Integration und eine deutliche Verbesserung der mechanischen Belastbarkeit

C. Fölsch · R. Pinkernell · R. Stiletto

Biokompatibilität von Polymer-Glaskeramik-Zement Cortoss®. In-vitro-Testung mit dem MG63-Zell-Modell

Zusammenfassung

Hintergrund. Die Verankerung von Endoprothesen mit Polymethylmethacrylat(PMMA)-Zement wird seit über 50 Jahren vorgenommen und die Zementaugmentierung von Wirbelkörpern ist seit der Erstbeschreibung 1987 ein sehr häufig angewendetes Verfahren geworden. Die Zemente wurden den Anforderungen der minimal-invasiven Applikation in die Wirbelkörper angepasst, und die Kombination guter mechanischer Eigenschaften mit Biokompatibilität ist Gegenstand weiterer Entwicklungen. Unsere Studie untersucht die Eigenschaften eines Polymerzements mit Glaskeramik im Vergleich zu einem Kalziumphosphatzement.

Methode. Mit dem humanen MG63-Zellkultur-Modell wurden der Polymer-Glaskeramik-Zement Cortoss® und der Hydroxylapatit-zement Kyphos® untersucht. Jeweils im Abstand von 24 h nach der ersten Inkubation wurde über 5–6 Tage das Medium in Gegen-

wart definierter Zementscheiben gewonnen. Dieses wurde jeweils 16 Zellkulturanätzen für jeden Zeitraum zugesetzt. Die Vitalitätsbeurteilung der Zellen erfolgte photometrisch mit dem MTT-Assay bei einer Absorption von 550 nm, die morphologische Untersuchung lichtmikroskopisch und mit dem Elektronenmikroskop.

Ergebnisse. Der Kalziumphosphatzement Kyphos® zeigt in den ersten Tagen der Zellkultur eine im Vergleich zur Kontrolle geringe Reduktion der Zellaktivität. Nach 5 Tagen war eine Angleichung an die Kontrolle erkennbar. Elektronenmikroskopisch waren nach einer Woche dreidimensionale Kristallformationen nachweisbar. In Gegenwart von Cortoss® war keine zelluläre Aktivität messbar, und die mikroskopische Untersuchung war negativ. Der zytotoxische Effekt wies zwischen den Tagen 1 und 5 nach der Zementanmischung keine Veränderung auf.

Schlussfolgerung. Der untersuchte Kalziumphosphatzement zeigt eine gute Biokompatibilität und ein Korrelat zur Apatitformation. Der Polymer-Glaskeramik-Zement weist innerhalb der ersten 5 Tage einen ausgeprägten zytotoxischen Effekt auf. Eine Erholungstendenz war in diesem Zeitraum nicht erkennbar. Polymer-Glaskeramik-Zement weist im Vergleich zu Kalziumphosphatzement eine schlechtere Biokompatibilität auf. Eine ideale Kombination physikalischer und biologischer Eigenschaften des Zements erscheint noch nicht erreicht.

Schlüsselwörter

Polymethylmethacrylat(PMMA)-Zement · Kalziumphosphatzement · Zytotoxischer Effekt · Exotherme Reaktion · Biokompatibilität

Biocompatibility of polymer-bioglass cement Cortoss®. In vitro test with the MG63 cell model

Abstract

Background. Polymethylmethacrylate (PMMA) cement has been used for fixation of joint replacements for more than 50 years and cement augmentation of vertebrae has become a popular procedure since the first description in 1987. New cements have now been developed which are better suited to the requirements of minimally invasive application techniques for vertebral bodies. The combination of good mechanical properties and biocompatibility is the concern of present research. This study compared the features of a polymer-bioglass cement with a calcium phosphate cement used for vertebral augmentation.

Methods. The human osteoblast-like cell culture MG63 was used to study the polymer-glass ceramic cement Cortoss® and the hydroxyapatite cement Kyphos®. Every 24 h for

5–6 days a defined volume of the culture medium was harvested in the presence of the bone cements and added to 16 cell cultures for each time period. The viability of cells was determined photometrically at 550 nm with the MTT assay and cell morphology was studied using light and electron microscopy.

Results. In the presence of the calcium phosphate cement an early and small reduction of cell activity was found compared with the controls. At the end of 1 week the viability parameter improved nearly reaching the control level. Electron microscopy showed crystals with a 3-dimensional shape. The cell cultures with Cortoss® showed no cellular activity and the microscopic examinations were negative. This effect was not different at days 1–5 after polymerization of the cement.

Conclusions. The calcium phosphate cement studied showed a good biocompatibility and allowed morphological signs of apatite formation. At least within the first 5 days the polymer-glass ceramic cement showed a reasonable cytotoxic effect. There was no sign of recovery of cell function within that period. The biocompatibility of the polymer-glass ceramic cement appeared significantly worse compared with the calcium phosphate cement. An ideal composition of biomechanical properties and biocompatibility has not been achieved so far.

Keywords

PMMA cement · Calcium phosphate cement · Cytotoxic effect · Exothermic reaction · Biocompatibility

des Übergangs Knochen/Cortoss® im Vergleich zu PMMA-Zement dargestellt [10, 16, 20]. BIS-GMA-basierte Zemente weisen im Vergleich zu PMMA eine verminderte Schrumpfung bei der Aushärtung auf und verbessern somit zusätzlich die Primärstabilität der Verankerung, weisen aber ebenso wie PMMA-

Zemente vom Implantatlager abweichende mechanische Eigenschaften auf [16, 20]. Unsere Untersuchung soll die zelluläre Kompatibilität des neuen Polymerzements mit Glaskeramik Cortoss® in vitro mit dem MG63-Zellmodell für die Frühphase der Implantation untersuchen. Der Kalziumphosphatzement Ky-

phos® mit bekannt guter Biokompatibilität dient als Referenzmaterial. Eine Verbesserung der Zellproliferation und Differenzierung von humanen osteoblastären Zellen in vitro in Gegenwart von Hydroxylapatit wurde beschrieben [9]. Das standardisierte Modell der MG63-Zellen ist neben MC3T3-E1 sowie SaOS-2 den

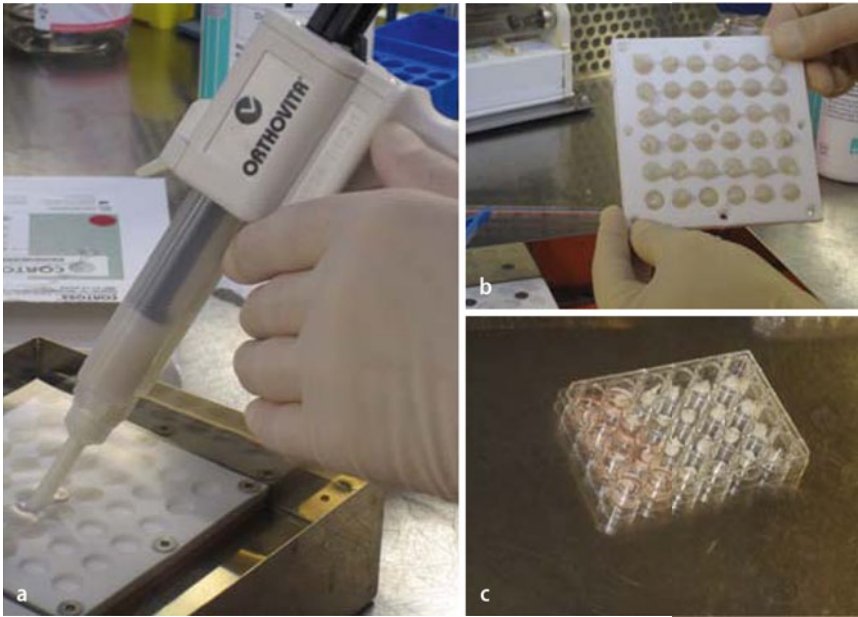


Abb. 1 ▲ **a** Zementaufbereitung und Anfertigung definierter Formkörper, **b** Einbringen der Zementprobekörper in die Platten, **c** Zugabe der Lösungen zum Zement

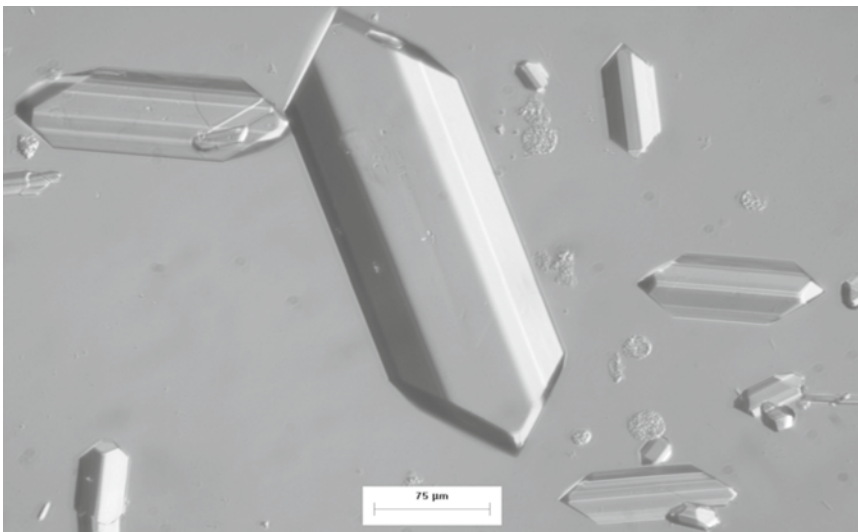


Abb. 2 ▲ Mikroskopischer Nachweis von Kristallen in der Zellkultur mit Medium von Kyphos®-Zement

humanen Osteosarkomzellen zuzuordnen und erscheint weniger störanfällig als Zellkulturen humaner Osteoblasten.

Methodik

Untersucht wurde der Zement Cortoss® (Orthovita, Malvern, PA 19355, USA; 59 Vol% Dimethacrylate: (2,2-bis [4- (2-hydroxy-3-methacryloyloxy-propoxy) phenyl] propane) Bis-GMA, (2,2-bis [4- (2-methacryloxyethoxy)] phenylpropane) Bis-EMA und Triethylene Glycol Dimethacrylat (TEGMA) mit Stabilisator

(2,6-di-tert-butyl-p-cresol) sowie Initiatoragens Benzoyl-Peroxid-DHEPT (di (hydroxy-ethyl) -p-toluidin [32]), aufgefüllt mit Glaskeramik (Na_2O - CaO - P_2O_5 - SiO_2), Baria-boroaluminosilikat und Siliziumdioxid in amorpher Phase. Zum Vergleich wurde der Kalziumphosphatzement KyphOs FS® (Kyphon Inc. Sunnyvale, CA 94089, USA) (77,4% α -Trikalziumphosphat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), 14,3% Magnesiumphosphat $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, 4,7% Magnesiumhydrogenphosphat (MgHPO_4), 3,6% Strontiumkarbonat (SrCO_3) und Diammoniumhydrogenphosphat (NH_4) $_2$ HPO_4

(3,5 M) untersucht. Die Anmischung erfolgte unter sterilen Bedingungen gemäß den Herstellerangaben. Zementscheiben (Abb. 1a) mit einem Durchmesser von 10 mm sowie einer Dicke von 3 mm wurden auf 24 Well-Platten verteilt (Abb. 1b) und mit jeweils 800 µl Medium (RPMI 1640; Roswell Park Memorial Institute) überschichtet (Abb. 1c). Zugesetzt wurden 50 ml fetales Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 3 mg/l NaHCO_3 und 50.000/37.000 U Penicillin/Streptomycin. Anschließend wurde 24 h im Brutschrank (37°C, 5% CO_2 , 100% Luftfeuchtigkeit) inkubiert.

Das Medium wurde täglich über einen Zeitraum von einer Woche abgenommen und bei -20°C gelagert. Die aufgetauten MG63-Zellen (American Type Culture Collection; ATTC, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wurden bis zum Erreichen der Konfluenz in der 6. und 7. Passage kultiviert. Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen alle 48 h gewechselt. In 96 Well-Platten wurden je 5000 Zellen in 100 µl (Zellzähler CASY 1 TTC Version SCI TTC; Schärfe Systems, Reutlingen) in RPMI-Medium ausgesät und 24 h bei 37°C, 5% CO_2 und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Medium wurde nach 24 h abgesaugt und die Zellen mit 100 µl und in einem weiteren Ansatz mit 200 µl des, zu den Zeitpunkten 24, 48, 72, 96 und 120 h bei Cortoss® sowie bei Kyphos® auch 144 h nach der Zementpolymerisation, konditionierten Mediums versetzt. Eine Untersuchung bestand jeweils aus 16 parallel angelegten Zellkulturen. Für Cortoss® wurde eine erste Untersuchungsreihe über 4 Tage und für Kyphos® von 5 Tagen durchgeführt. Die zweite Untersuchungsreihe mit verlängertem Untersuchungszeitraum von 5 und 6 Tagen diente zur Verifizierung der Ergebnisse. Nach 72 h wurden 100 µl der MTT-Lösung (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; Sigma Diagnostics Inc, St. Louis, USA) hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 4 h bei 37°C und 5% CO_2 wurde der Überstand entfernt und DMSO (Dimethylsulfoxid) für das MTT-Assay bei einer Absorption von 550 nm zugegeben. Ein Leerversuch für die Zellkultur diente als Referenz. Die morphologische Untersuchung erfolgte mit dem Durchlichtmikroskop (Aris-

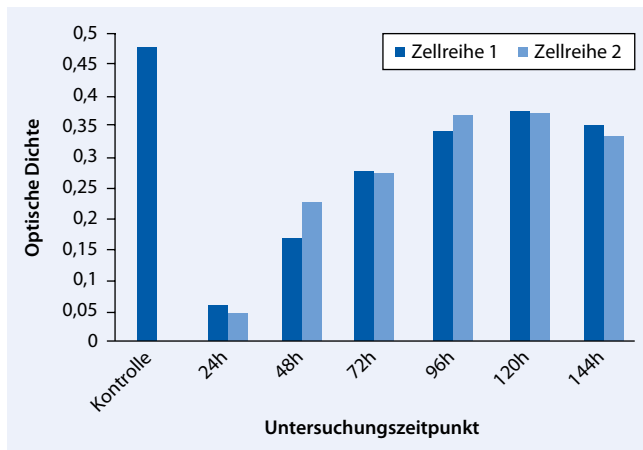


Abb. 3 ▲ Messung der Zellaktivität mittels optischer Dichte nach Zusatz von 100 µl spezifischen Mediums von Kyphos®-Zement von 2 Zellkulturlinien zu den Zeitpunkten 24, 48, 72, 96, 120 und 144 h (6. Wechsel) im Vergleich zur Zellkulturkontrolle

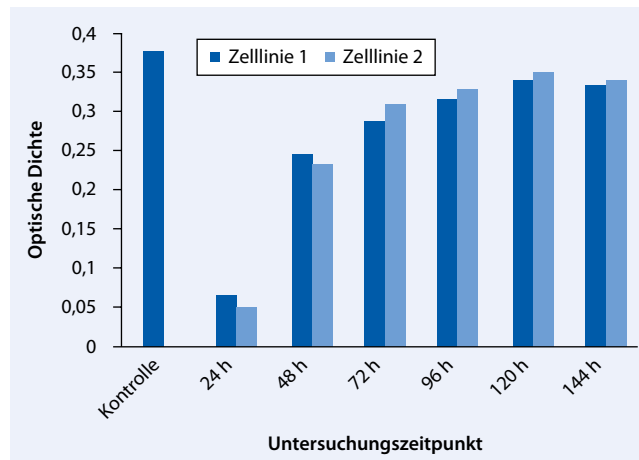


Abb. 4 ▲ Messung der Zellaktivität mittels optischer Dichte nach Zusatz von 200 µl spezifischen Mediums von Kyphos-Zement von 2 Zellkulturlinien zu den Zeitpunkten 24, 48, 72, 96, 120 und 144 h (6. Wechsel) im Vergleich zur Zellkulturkontrolle

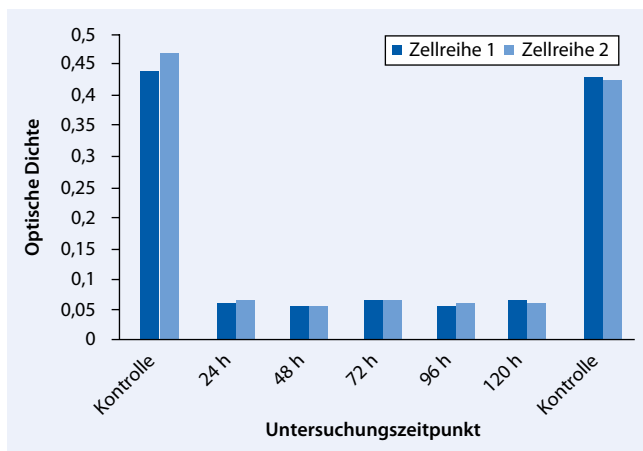


Abb. 5 ◀ Messung der Zellaktivität mittels optischer Dichte nach Zugabe von 100 µl spezifischen Mediums von Cortoss®-Zement von 2 Zellkulturlinien bei 24, 48, 72, 96 und 120 h (5. Wechsel) im Vergleich zur Zellkulturkontrolle zu Beginn der Untersuchung und nach 120 h

tomed; Fa Leitz, Wetzlar) und mit dem Rasterelektronenmikroskop (ISI Sx30; Fa Leitz, Wetzlar). Die statistischen Analysen erfolgten mit dem Student's t-Test, und das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha=0,05$ festgelegt.

Ergebnisse

Der Kyphos®-Zement führte zunächst zu einer geringen Beeinträchtigung der Vitalität der Zellen, die nach 5 Tagen eine Erholung der Zellfunktion im Vergleich zur Kontrollzellkultur zeigten (▣ Abb. 3, 4). Die optische Dichte der Kontrollzellkulturen differierte zwischen verschiedenen Ansätzen und betrug im Mittel $0,4538 \pm 0,068$. Zum Zeitpunkt des ersten Mediumwechsels nach 24 h zeigte das MTT-Assay noch keine signifi-

kante Abweichung von der Leerkontrolle des Mediums (▣ Abb. 3, 4). Bereits nach 48 h war eine signifikante Steigerung der zellulären Aktivität erkennbar (▣ Abb. 3, 4). Die höchsten Werte zeigten sich nach 120 h mit einer optischen Dichte von $0,384 \pm 0,038$ (▣ Abb. 3) sowie von $0,353 \pm 0,085$ (▣ Abb. 4). Ein signifikant differierender Einfluss der Zugabe von 100 µl oder 200 µl spezifischen Mediums auf die Erholung der zellulären Aktivität war nicht erkennbar (▣ Abb. 3, 4). In Gegenwart des Kalziumphosphatzements Kyphos® zeichnete sich am Tag 6 eine geringe Reduktion der zellulären Aktivität auf das Niveau des 4. Tages ab (▣ Abb. 3, 4). Die Kontrollzellkultur wies im zeitlichen Vergleich eine unveränderte optische Dichte auf (▣ Abb. 5, 6). Die mikroskopischen Untersuchun-

gen wiesen in Gegenwart des Mediums des Kyphos®-Zements ein dreidimensionales Aussprossen von Kristallen auf (▣ Abb. 2). Die Zellkulturen in Gegenwart von Cortoss®-Medium zeigten zu keinem Zeitpunkt Zellaktivität überlebender Zellen (▣ Abb. 5, 6). Die optische Dichte betrug nach 120 h bei Zugabe von 100 µl $0,0724 \pm 0,0043$ und bei Zugabe von 200 µl $0,0666 \pm 0,0021$. Eine Voruntersuchung hatte zum Zeitpunkt 96 h nach Zugabe von 100 µl Medium eine optische Dichte von $0,0648 \pm 0,0030$ im Vergleich zu $0,0513 \pm 0,0013$ bei 200 µl Medium gezeigt. Eine signifikante Veränderung der Zellaktivität war im Verlauf von 5 Tagen weder für die Gruppe mit 100 µl noch für die Gruppe mit 200 µl zugesetzten spezifischen Mediums erkennbar ($p < 0,01$) und insgesamt ergab sich kein erkennbar unterschiedlicher Einfluss der zugesetzten Mediummengen auf die Zellen (▣ Abb. 5, 6). Die photometrischen Messungen der optischen Dichte für Cortoss® zeigten zu keinem Zeitpunkt signifikant größere Messwerte als die MTT-Lösung mit einer mittleren optischen Dichte aller Ansätze von $0,064 \pm 0,025$.

Diskussion

PMMA gewährleistet die Stabilität des Knochenzements, ohne eine Bioaktivität aufzuweisen [3, 4, 6, 17, 26, 40], wird von fibrösem Gewebe umgeben und bindet nicht direkt an das knöchernen Im-

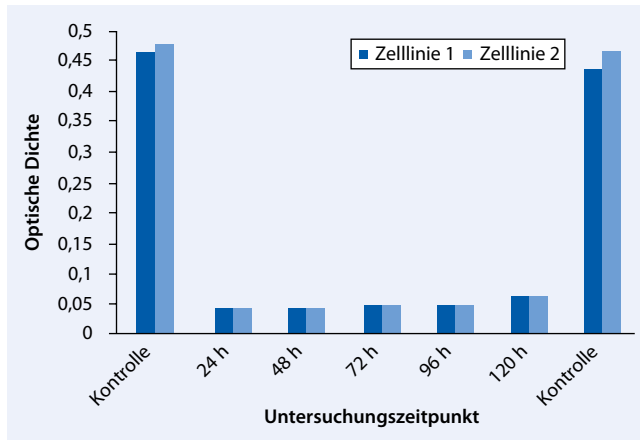


Abb. 6 ◀ Messung der Zellaktivität mittels optischer Dichte mit Zusatz von 200 µl spezifischen Mediums von Cortoss®-Zement von 2 Zellkulturlinien bei 24, 48, 72, 96 und 120 h (5. Wechsel) im Vergleich zur Zellkulturkontrolle zu Beginn der Untersuchung und nach 120 h

plantatlager [8, 27, 36]. Die Differenzierung und die Proliferation humaner Osteoblasten wurden in vitro durch PMMA beeinträchtigt und eine lokale Inflammation ohne Nachweis einer ossären Integration nachgewiesen [6, 40]. Der Zusatz von Hydroxylapatit zu PMMA-Zement verbessert die Proliferation und Differenzierung humaner Osteoblasten in vitro [9]. Die Beimischung von Hydroxylapatit ist aus mechanischen Gründen limitiert, und für Polymer-Glaskeramik-Zemente wird ein Mischungsverhältnis mit 0,4 Volumenanteilen Glaskeramik empfohlen [13, 16, 20]. Die Modifikation von PMMA-Zement mit γ -Methacryloxy-propylthrethoxysilane und Kalziumacetat führte in vivo nach einer vorübergehenden inflammatorischen Reaktion zu einer osteokonduktiven Reaktion mit Ausheilung der Inflammation [36]. Unsere Untersuchungsergebnisse von Cortoss® ergaben korrespondierende Anhaltspunkte für zelluläre Reaktionen der Frühphase der Zementimplantation mit einem In-vitro-Modell und eine im MG63-Zellmodell induzierte PMMA-Zement-Apoptose innerhalb von 24 h [7]. Die MG63-Zellen zeigen keine Kontaktinhibition und weisen im Vergleich mit Zellkulturen normaler humaner Osteoblasten eine höhere Proliferationsrate auf und erscheinen deshalb insbesondere für eine positive Toxizitätsuntersuchung aussagekräftig. Die Synthese von alkalischer Phosphatase und Kalzifikationen wurden für MG63-Zellen nachgewiesen.

Eine ideale Kombination sämtlicher gewünschter Eigenschaften des Zements zur Wirbelaugmentation konnte bisher nicht erreicht werden [17]. Kalziumphos-

phatzemente weisen eine bessere Biokompatibilität und Bioaktivität als PMMA bei geringerer mechanischer Belastbarkeit auf [2, 17, 19, 37]. Polymerzemente mit Glaskeramik können die verminderten mechanischen Eigenschaften durch die Glaskeramikbestandteile mit vermehrter Vernetzung bei der Polymerisation kompensieren [32], aber eine zeitabhängige Reduktion mechanischer Eigenschaften wurde bei Polymerzement mit Glaskeramik festgestellt [3]. Verschiedene Modifikationen der Komponenten von PMMA-Zement zur Verbesserung der Biokompatibilität wurden untersucht [17, 23, 25, 27–31, 33]. Im Vordergrund stehen Glaskeramiken und Kalziumphosphate in Form von Hydroxylapatiten [11, 17, 23, 25, 29, 30, 39] mit variierender Quantität der Beimischung keramischer Anteile, wobei die Umhüllung der bioaktiven Bestandteile durch PMMA-Zement zu berücksichtigen ist [16, 35].

Zytotoxizität

Widersprüchliche Untersuchungsergebnisse bzgl. der Zytotoxizität von Zementen mit den Komponenten Triethylen-glycol-dimethacrylat sowie Bisphenol-A-diglycidyl-ether-dimethylacrylat und Bisphenol-A-glycidyl-dimethylacrylat (Bis-GMA) veranlassten uns, die Biokompatibilität von Cortoss® im Zellkulturmodell in der Frühphase zu untersuchen [3, 5, 11, 25, 29, 30]. Polymer-Komposit-Zemente mit Glaskeramik wie Cortoss® (Bis-GMA), aber auch Zement mit der Komponente Polyethylmethacrylat (PEMA) zeigten vergleichbare mechanische Eigenschaften wie PMMA [3, 6, 8, 11, 17, 39].

Cortoss® ist ein Polymerzement mit Glaskeramik mit konstanter Viskosität und geringerer exothermer Reaktion als PMMA-Zement, und die Steifigkeit von Cortoss® nähert sich nach der Implantation dem E-Modul des Knochens an [2, 3, 6, 12, 14, 17, 19]. Die Inkorporation von Alkoxysilane, CaCl_2 , Hydroxylapatit und Strontium konnte die knöcherne Inkorporation verbessern, ohne die mechanischen Eigenschaften relevant zu beeinträchtigen [6, 8, 27], aber auch Verschlechterungen der mechanischen Belastbarkeit wurden beobachtet [20]. Polymerzemente mit Glaskeramik ermöglichen die Adaptation des Knochenlagers an das Implantat, verhindern die Ausbildung einer fibrösen Grenzschicht, und die Fixierung des Zements im Knochen ist für Glaskeramik besser als für Hydroxylapatit, wobei die Bioaktivität der Glaskeramik mit zunehmender Ausbildung einer dreidimensionalen Polymerisation geringer wird [20]. Bisphosphonate können der Stimulation von Osteoklasten durch PMMA entgegenwirken und die Biokompatibilität zusätzlich verbessern [5, 33]. Ein zeitabhängiger Effekt mit ausgeprägten negativen Auswirkungen auf humane Osteoblasten in vitro wurde für PMMA nachgewiesen, aber die Beimischung von Bisphosphonat zu PMMA-Zement stimulierte eine osteogene Reaktion [5, 40].

Apatitformationen

Apatitformationen an der Oberfläche [3, 21] von BIS-GMA enthaltenden Zementen wie Cortoss® sowie auf anderen Polymer-Komposit-Zementen mit Glaskeramik wurden beschrieben [19, 36]. Unsere Ergebnisse zeigten weder vitale MG63-Zellen noch Apatitformationen in Gegenwart von Cortoss®, aber wir konnten Apatitkristalle in Gegenwart von Kyphos® nachweisen. Unsere Resultate für Cortoss® entsprechen einer Untersuchung der Toxizität von TEG-DMA-Monomeren [3]. Die Monomerkonversion von Cortoss® reduziert seine Toxizität, aber über zytotoxische Nebenwirkungen von BIS-GMA und TEG-DMA wurde berichtet [3]. Cortoss® weist im menschlichen Körper weniger als 5% freie Monomere auf [32] und die Zytotoxizität geht auch bei PMMA-Zement von residuellen Monomeren und Polymerisationsbe-

schleunigern aus [3, 4, 8, 20]. Nach einigen Wochen wurden noch Restmengen von Monomeren von PMMA-Zement gefunden [4]. Unsere Ergebnisse lassen sich mit Untersuchungen vereinbaren, die auf eine verzögerte osteoblastäre Reaktion in Anwesenheit von Cortoss® hinweisen [3]. Wir konnten keine Erholung der zellulären Funktion innerhalb von 5 Tagen nachweisen, tierexperimentelle Studien zeigen allerdings eine gute knöchernen Integration [11, 12, 29].

Zementtemperatur

Eine weitere potenziell toxische Komponente mit Ausbildung von Nekrosen im Implantatlager ist die Temperaturentwicklung des Zements [3, 30]. Die exotherme Polymerisation verschiedener Zemente erreicht unterschiedliche Spitzentemperaturen, deren effektive Temperatur im Interface Knochen/Zement in vivo geringer als in vitro zu erwarten ist [4, 6, 8, 30]. PMMA-Zement weist im Vergleich zu Cortoss® eine höhere Temperaturentwicklung bei der Polymerisation auf [17]. Für die Verankerung des Zements im Knochen sind die Volumenveränderung des Zements bei der Aushärtung und die Nachpolymerisation sowie das Phänomen der Glasübergangstemperatur zusätzlich von Bedeutung [4, 16, 30]. Toxische Effekte der Zementkomponenten und thermische Auswirkungen an der Knochenoberfläche verursachen temporäre und permanente Veränderungen im Interface Knochen/Zement [3, 4, 5, 17, 22, 30]. Die Beschaffenheit des Knochenlagers beeinflusst die Temperaturverteilung, und die thermischen Auswirkungen können abhängig vom Zementvolumen auf wenige Millimeter des Knochenlagers beschränkt sein [22, 30]. Unsere Studienergebnisse waren davon unabhängig, da der Zement erst nach der Polymerisation getestet wurde.

Cortoss® und MG63-Zellen

Unsere Untersuchungsergebnisse zeigen erstmals die negativen Auswirkungen des Polymer-Glaskeramik-Zements Cortoss® auf MG63-Zellen. Mit dem MG63-Zell-Modell wurde in Gegenwart eines Hydroxylapatitzements eine bessere Biokompatibilität als in Gegenwart eines Polymer-

zements mit Glaskeramik nachgewiesen [37]. Eine zelluläre Aktivität in Gegenwart von Cortoss® war im Verlauf des untersuchten Zeitraumes von 5 Tagen bei unveränderter Inhibition nicht nachweisbar. Ein chemisches Verfahren wies nach 7 Tagen eine Apatitformation auf der Oberfläche von Cortoss® nach, während dies bei Zink-Polyalkenoat-Zement nach einem Tag zu erkennen war [3, 21]. Ein zumindest zeitlich limitierter negativer Einfluss auf das Implantatlager beim Einbringen von Cortoss® ist anzunehmen. Bei In-vitro-Untersuchungen ist die mögliche Akkumulation toxischer Substanzen zu berücksichtigen, die in vivo nicht zu erwarten ist [5]. Die korrelierende entzündliche Reaktion verursacht temporäre und permanente Veränderungen im Implantatlager in vivo mit Auswirkungen auf die knöchernen Integration [6, 7, 8, 16, 36]. Der quantitative Einfluss auf das Implantatlager und die langfristigen Auswirkungen sind individuell nicht vorhersehbar. Analog zu Ergebnissen von Tiermodellen konnten wir eine gute Biokompatibilität für den untersuchten Kalziumphosphatzement nachweisen [11, 12, 29]. Die Kristallformation in Gegenwart von Lösungsbestandteilen von Kalziumphosphatzement-Medium ist vergleichbar mit anderen Studien [3, 21].

Zementvergleich

Mechanische Untersuchungen und klinische Studien lassen im Vergleich zu PMMA-Zementen und Polymer-Glaskeramik-Zementen Nachteile der resorbierbaren Zemente erkennen [2, 19]. Die Beimischung von keramischen Bestandteilen zu PMMA kann die ossäre Integration fördern [5, 6, 16, 17, 27, 36]. Exemplarisch für Neuentwicklungen der Polymerzemente mit Glaskeramik des vergangenen Jahrzehnts konnte Cortoss® mechanische Eigenschaften und Biokompatibilität nicht vollständig kombinieren [17]. Bei der Verwendung von Kalziumphosphat sollte eine geringere mechanische Belastbarkeit berücksichtigt werden [19]. Ein zusätzlicher zytotoxischer Effekt durch die Beimischung von Chemotherapeutika wurde für PMMA bei Riesenzelltumoren nachgewiesen [3, 15, 26]. Chemotherapeutika zeigten sich resistent gegen die

Hitzeentwicklung bei der Polymerisation, die Freisetzungskinetik wurde untersucht [26].

Der resorbierbare Kalziumphosphatzement Kyphos® zeigt im Vergleich zu Cortoss® eine bessere Biokompatibilität in der Frühphase der simulierten Implantation in vitro. Neben vitalen Zellen sind innerhalb von einer Woche Kristallformationen in Gegenwart des Mediums des Kalziumphosphatzements nachweisbar, während Cortoss® sich in vitro zelltoxisch verhält. Polymer-Glaskeramik-Zemente weisen aber eine bessere Biokompatibilität als PMMA-Zement auf. Die Kombination guter mechanischen Eigenschaften mit einer sehr guten Biokompatibilität konnte mit Cortoss® noch nicht vollständig erreicht werden. Die In-vitro-Daten lassen in vivo eine Latenz der knöchernen Inkorporation im Vergleich zu Kalziumphosphatzement erwarten. Die Frühphase der Implantation wird als essenziell betrachtet [35], aber tierexperimentelle Untersuchungen zeigen gute Ergebnisse der ossären Intergration von Polymerzementen mit Glaskeramik [11, 12, 29]. Unsere Daten lassen keine Vorhersage der Dauer einer potenziell zytotoxischen Wirkung im Interface Knochen/Zement in vivo zu. Die In-vivo-Untersuchungen unterliegen komplexeren biochemischen Vorgängen als In-vitro-Testverfahren und können zytotoxische Auswirkungen des Implantats maskieren. Eine temporäre zytotoxische Wirkung des Zements könnte bei der Stabilisierung von metastasierten Wirbelkörpern vorteilhaft sein.

Fazit für die Praxis

- Die Entwicklung von Polymerzementen mit Glaskeramik hat verbesserte Eigenschaften für die Augmentation von Wirbelkörpern geschaffen.
- Die Vereinigung sehr guter biologischer Eigenschaften unter Erhalt der erwünschten mechanischen Merkmale des Zements ist noch nicht vollständig erreicht.
- Die Osteokonduktivität von Polymer-Glaskeramik-Zement lässt im Gegensatz zu PMMA-Zement eine dauerhafte ossäre Inkorporation ähnlich den

Kalziumphosphatzementen möglich erscheinen.

- Die in vitro nachgewiesene Toxizität von Polymer-Glaskeramik-Zement im Gegensatz zu Kalziumphosphatzement erscheint in vivo von begrenzter Bedeutung, aber die mechanische Stabilität von Polymerzement mit Glaskeramik ist Kalziumphosphatzement überlegen.
- Die Indikationsstellung für die Wirbelaugmentation mit Kalziumphosphatzement oder Polymer-Glaskeramik-Zement sollte sorgfältig unter Abwägung der klinischen Aspekte erfolgen.
- Die potenziell unzureichenden mechanischen Eigenschaften von Kalziumphosphatzement sind gegen eine schlechtere Bioaktivität von Glaskeramikkompositzement abzuwägen.
- Cortoss® weist eine Kombination positiver mechanischer Eigenschaften von PMMA-Zement und biologischer Aktivität von Kalziumphosphatzement auf.
- Die knöcherne Integration des Zements erscheint für ein langfristig gutes Resultat einer Wirbelkörperaugmentation von wesentlicher Bedeutung.

Korrespondenzadresse



Dr. C. Fölsch
Klinik für Orthopädie und
Rheumatologie,
Philipps-Universität Marburg
Baldingerstraße,
35033 Marburg
foelsch@med.uni-marburg.de

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt für sich und seine Koautoren an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Bae H, Hatten HP, Linovitz R et al (2012) A prospective randomized FDA-DIE-Trial comparing Cortoss with PMMA for vertebroplasty. *Spine* 37:544–550
2. Blattert TR, Jestaedt L, Weckbach A (2009) Suitability of a calcium phosphate cement in osteoporotic vertebral body fracture augmentation: a controlled, randomized, clinical trial of balloon kyphoplasty comparing calcium phosphate versus polymethylmethacrylate. *Spine* 34:108–114
3. Boyd D, Towler MR, Wren A, Clarkin OM (2008) Comparison of an experimental bone cement with surgical Simplex P, Spineplex and Cortoss. *J Mater Sci Mater Med* 19:1745–1752
4. Breusch SJ, Kühn KD (2003) Knochenzemente auf Basis von Polymethylmethacrylat. *Orthopade* 32:41–50
5. Calvo-Fernández T, Parra J, Fernández-Gutiérrez M et al (2010) Biocompatibility of alendronate-loaded acrylic cement for vertebroplasty. *Eur Cell Mater* 20:260–273
6. Cheung KMC, Lu WW, Luk KDK et al (2005) Vertebroplasty by use of a strontium-containing bioactive bone cement. *Spine* 30:584–591
7. Ciapetti G, Granchi D, Savarino L et al (2002) In vitro testing of the potential for orthopedic bone cements to cause apoptosis of osteoblast-like cells. *Biomaterials* 23:617–627
8. Dalby MJ, Di Silvio L, Harper EJ, Bonfield W (2002) In vitro adhesion and biocompatibility of osteoblast-like cells to poly(methylmethacrylate) and poly(ethylmethacrylate) bone cements. *J Mater Sci Mater Med* 13:311–314
9. Dalby MJ, Di Silvio L, Harper EJ, Bonfield W (2002) Increasing hydroxyapatite incorporation into poly(methylmethacrylate) cement increases osteoblast adhesion and response. *Biomaterials* 23:569–576
10. Erbe EM, Clineff TD, Gualtieri G (2001) Comparison of a new bisphenol-a-glycidyl dimethacrylate-based cortical bone void filler with polymethyl methacrylate. *Eur Spine* 10:S147–S152
11. Fujita H, Nakamura T, Tamura J et al (1998) Bioactive bone cement: effect of the amount of glass-ceramic powder on bone-bonding strength. *J Biomed Mater Res* 40:145–152
12. Galovich LA, Perez-Higueras A, Altonaga JR et al (2011) Biomechanical, histological and histomorphometric analyses of calcium phosphate cement compared to PMMA for vertebral augmentation in a validated animal model. *Eur Spine* 20(Suppl 3):376–382
13. Gomez-Vega JM, Saiz E, Tomsia AP et al (2000) Bioactive glass coatings with hydroxyapatite and Bioglass particles on Ti-based implants. 1. Processing. *Biomaterials* 21:105–111
14. Grafe IE, Baier M, Nöldge G et al (2008) Calcium-phosphate and polymethylmethacrylate cement in long-term outcome after kyphoplasty of painful osteoporotic vertebral fractures. *Spine* 33:1284–1290
15. Greco F, Palma L de, Specchia N et al (1992) Polymethylmethacrylate-antiblastic drug compounds: an in vitro study assessing the cytotoxic effect in cancer cell lines – a new method for local chemotherapy of bone metastases. *Orthopedics* 15:189–194
16. Harper EJ (1998) Bioactive bone cements. *Proc Inst Mech Eng H* 212:113–120
17. Heini PF, Berlemann U (2001) Bone substitutes in vertebroplasty. *Eur Spine* 10:S205–S213
18. Hench LL (2006) The story of Bioglass. *J Mater Sci Mater Med* 17:967–978
19. Heo HD, Cho YJ, Sheen SH et al (2009) Morphological changes of injected calcium phosphate cement in osteoporotic compressed vertebral bodies. *Osteoporosis Int* 20:2063–2070
20. Kenny SM, Buggy M (2003) Bone cements and fillers: a review. *J Mater Sci Mater Med* 14:923–938
21. Kokubo T, Takadama H (2006) How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 27:2907–2915
22. Leeson MC, Lippitt SB (1993) Thermal aspects of the use of polymethylmethacrylate in large metaphyseal defects in bone. *Clin Orthop Relat Res* 295:239–245
23. Li YW, Leong JC, Lu WW et al (2000) A novel injectable bioactive bone cement for spinal surgery: a developmental and preclinical study. *J Biomed Mater Res* 52:164–170
24. Liebermann IH, Togawa D, Kayanja MM (2005) Vertebroplasty and kyphoplasty: filler materials. *Spine* 5:3055–3165
25. Lu WW, Cheung KM, Li YW et al (2001) Bioactive bone cement as a principal fixture for spinal burst fracture: an in vitro biomechanical and morphologic study. *Spine* 15:2684–2690
26. Maccauro G, Cittadini A, Casarri M et al (2007) Methotrexate-added acrylic cement: biological and physical properties. *J Mater Sci Mater Med* 18:839–844
27. Miyazaki T, Ohtsuki C, Kyomoto M et al (2003) Bioactive PMMA bone cement prepared by modification with methacryloxypropyltrimethoxy-silane and calcium chloride. *J Biomed Mater Res A* 67:1417–1423
28. Mori A, Ohtsuki C, Miyazaki T et al (2005) Synthesis of bioactive PMMA bone cement via modification with methacryloxypropyltrimethoxy-silane and calcium acetate. *J Mater Sci Mater Med* 16:713–718
29. Moursi AM, Winnard AV, Winnard PL et al (2002) Enhanced osteoblast response to a polymethylmethacrylate-hydroxyapatite composite. *Biomaterials* 23:133–144
30. Nelson DA, Barker ME, Hamlin BH (1997) Thermal effects of acrylic cementation at bone tumour sites. *Int J Hyperthermia* 13:287–306
31. Opara TN, Dalby MJ, Harper EJ et al (2003) The effect of varying percentage of hydroxyapatite in poly(ethylmethacrylate) bone cement on human osteoblast-like cells. *J Mater Sci Mater Med* 14:277–282
32. Pomrink GJ, DiCicco MP, Clineff TD, Erbe EM (2003) Evaluation of the reaction of Cortoss™, a thermoset cortical bone void filler. *Biomaterials* 24:1023–1031
33. Sabokbar A, Fujikawa Y, Murray DW, Athanasou NA (1998) Bisphosphonates in bone cement inhibit PMMA particle induced bone resorption. *Ann Rheum Dis* 57:614–618
34. Smit RS, Velde D van der, Hegemann JH (2008) Augmented pin fixation with Cortoss for an unstable AO-A3 type distal radius fracture in a patient with a manifest osteoporosis. *Arch Orthop Trauma Surg* 128:989–993
35. Sugino A, Miyazaki T, Kawachi G et al (2008) Relationship between apatite-forming ability and mechanical properties of bioactive PMMA-based bone cement modified with calcium salts and alkoxy-silane. *J Mater Sci Mater Med* 19:1399–1405
36. Sugino A, Ohtsuki C, Miyazaki T (2008) In vivo response of bioactive PMMA-based bone cement modified with alkoxy-silane and calcium acetate. *J Biomater Appl* 23:213–228
37. Tan F, Naciri M, Al-Rubeai M (2011) Osteoconductivity and growth factor production by MG63 osteoblastic cells on bioglass-coated orthopedic implants. *Biotechnol Bioeng* 108:454–464
38. Wilke HJ, Mehnert U, Claes LE et al (2006) Biomechanical evaluation of vertebroplasty and kyphoplasty with polymethyl methacrylate or calcium phosphate cement under cyclic loading. *Spine* 31:2934–2941
39. Yamamoto T, Nakamura T, Lida H et al (1998) Development of bioactive bone cement and its clinical applications. *Biomaterials* 19:1479–1482
40. Zamboni G, Colucci S, Cantatore F, Grano M (1998) Response of human osteoblasts to polymethylmethacrylate in vitro. *Calcif Tissue Int* 62:362–365

3.5. Beschichtung mit einer neuen Gentamicinpalmitatformel verhindert implantat-assoziierte Osteomyelitis induziert, durch Methicillin-sensiblen Staphylococcus aureus im Rattenmodell

Einleitung

Die zunehmende Zahl von Endoprothesenimplantationen führt weltweit zu einem Anstieg von septischen Komplikationen und der Bedarf für Endoprothesenwechseloperationen wird weiter ansteigen [120]. In Gegenwart von orthopädischen Implantaten vermindert sich die für einen Infekt erforderliche Zahl von Bakterien um den Faktor 10^6 [175]. Die Adhäsion von Bakterien ist von der Spezies sowie der Oberfläche abhängig und nach permanenter Fixierung beginnen die Bakterien mit der Synthese von Exopolysacchariden sowie der Ausbildung einer dreidimensionalen Matrix [116]. Der ausgereifte Biofilm ist antibiotisch schlechter therapierbar und kann intermittierend Bakterien abgeben [176]. Die Matrix ist meist hydrophob oder gemischt hydrophob und hydrophil und die lokale Wirkung von systemisch applizierten Antibiotika ist nur gering [177]. Bakterien im Biofilm verändern ihr biologisches Verhalten mit verminderter metabolischer Aktivität und verlängerter Generationszeit [178]. Bakterien im Biofilm erscheinen funktionell heterogen und die bakterizide Konzentration steigt für *S. epidermidis* im Biofilm deutlich an und desweiteren haben unterschiedliche Bakterien differente Auswirkungen auf die Architektur des Biofilms [179]. Die minimale inhibitorische Konzentration (MIC) für die Behandlung adhärenter Bakterien zeigte sich 800-fach erhöht [176]. Systemische Applikation von Antibiotika kann die erforderlichen Konzentrationen meist nicht erreichen. Die Vermeidung von Infektionen orthopädischer Implantate ebenso wie eine wirkungsvolle lokale antibakterielle Therapie evidenter Infektionen ist von grosser Bedeutung bei septischen Endoprothesenrevisionen. Lokale Applikation von Antibiotika setzt primär hohe Konzentrationen von Antibiotika frei ohne unerwünschte systemische Nebenwirkungen zu erzeugen [180-186] und die Erfolgsaussichten einer lokalen antibiotischen Therapie stehen im Zusammenhang mit der Zahl der Bakterien [113,187,188]. Deshalb erfolgte die Untersuchung der antibakteriellen Wirksamkeit einer neuen hydrophoben und vollständig resorbierbaren Palmitatbeschichtung mit Gentamicin.

Methodik

Die lokale antimikrobielle Wirksamkeit von antibiotisch beschichteten Titankörpern wurde im Rattenmodell untersucht. Die Beschichtung erfolgte mit Gentamicin-Palmitat und die Implantation wurde als neu implementiertes Modell im Femur von 40 männlichen Sprague-Dawley Ratten vorgenommen. Die Inokulation des Markraums erfolgte mit 100 Keimen von Staphylococcus aureus Typ Rosenbach sensibel für Methicillin. Die Auswirkungen der lokalen Applikation des Antibiotikums wurden im Vergleich zur Kontrolle ohne entsprechende Beschichtung untersucht. Es erfolgte neben anderen Parametern die regelmäßige Bestimmung von Serumhaptoglobin und radiologische Diagnostik sowie abschließende mikrobiologische und histologische Untersuchung nach bis zu 42 Tagen. Diese wurden zudem auch nach kürzeren Zeitintervallen vorgenommen. Die histologische Aufarbeitung des Femurs erfolgte in 50 Schnittebenen anhand des Petty-Scores. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem paired t-Test oder dem multiple t-Test und die Signifikanz wurde mit $p < 0.05$ festgelegt.

Ergebnisse

Die Elutionskinetik der Beschichtung der Titanimplantate zeigte eine hohe Freisetzung von initial 200µg Gentamicin während die Abgabe nach einer Woche sowie nach 2 Wochen und 3 Wochen zwischen 25µg und 30µg lag. Die Beschichtung der intramedullären Implantate mit Gentamicin führte zu einer signifikanten Reduktion des Serumhaptoglobins nach 28 und 42 Tagen. Nach 6 Wochen lag der Wert mit 0.57 ± 0.23 mg/dl signifikant unter dem Wert der nicht beschichteten Implantate mit 1.66 ± 0.46 mg/dl. Die bakterielle Besiedlung der explantierten Titanimplantate zeigte ohne antibiotische Beschichtung ein konfluierendes bakterielles Wachstum während die Gegenwart des Antibiotikums nur punktuelle bakterielle Besiedlungen nach 4 und 6 Wochen nachweisen konnte. Die Anzahl der nachweisbaren bakteriellen Kolonien (CFU) betrug nach 6 Wochen 356 ± 142.60 für die Kontrolle und 21.10 ± 28.94 für die Gruppe mit antibiotischer Beschichtung. Die histologische Untersuchung ergab entsprechend des Petty-Scores von 4.2 ± 0.77 der Kontrollgruppe ohne Therapie jeweils eine akute Osteomyelitis hingegen für die behandelte Gruppe nach 6 Wochen einen Wert von 1.27 ± 0.34 entsprechend einer lokal kontrollierten Infektion.

Diskussion

Die aktuelle Untersuchung nimmt methodisch Bezug auf ein Modell der Rattentibia von Lucke [104]. Die Inokulation der geringsten Zahl von 100 Bakterien zur sicheren Auslösung einer Infektion führte im Femur der Ratte ebenso zu einer histologisch und laborchemisch nachweisbaren Osteomyelitis. Lucke zeigte mit identischem Bakterienstamm in gleicher Menge im Tibiarattenmodell vergleichbare Ergebnisse der Infektionsinduktion und des radiologischen Nachweis von Erosionen nach 14 Tagen sowie Leukozytose am 3. und 7. Tag [104]. Die radiologischen Veränderungen konnten wir nicht zeigen. Die Applikation von Gentamicin auf Titankörper führt zu einer hohen lokalen Konzentration unter Vermeidung von systemischen Nebeneffekten [100,184] und die histologischen Untersuchungen zeigten in unserer Untersuchung nur bei einem beschichteten Implantat Zeichen von Osteomyelitis.

In unserer Untersuchung war die Bakterienzahl der behandelten Gruppe etwa auf 10% der Kontrollgruppe ohne Antibiotikumbeschichtung reduziert. Vereinzelt punktförmige Bakterienansammlungen waren auch auf beschichteten Titanstäben nachweisbar, hingegen konfluierend auf nicht beschichteten Implantaten. In Abhängigkeit vom Keim und dem Tiermodell sowie der Lokalisation sind unterschiedliche Bakterienmengen zur Auslösung eines Infektes erforderlich [189]. Die Erfolgsaussichten einer lokalen Antibiotikagabe hängen vom lokalen Befund sowie der Art und Anzahl der bakteriellen Kontamination ab. Die Studie von Lucke mit Inokulation von 1000 CFU führte nur zu einer Bakterienreduktion von 30% bei lokaler Therapie mit Gentamicin [188]. Ein wesentlicher Einfluss eines chirurgischen Debridements auf das Behandlungsergebnis kann in Abhängigkeit vom Schweregrad der Infektion angenommen werden.

Antibiotische Therapie beseitigt häufig die Symptome ohne die Infektion zu eradizieren und der Biofilm kann Ausgangspunkt für eine akute Infektion sein. Viele Bakterien haben eine hydrophobe Oberfläche und bakterielle Besiedlung und ossäre Integration von Implantaten bilden ein Wettrennen [107]. Deshalb können hydrophobe Trägersubstanzen wie Palmitat für die Beschichtung vorteilhaft sein [100,108]. Die rasche Freisetzung von Gentamicin aus der Palmitatbeschichtung innerhalb von 30 min ist frühzeitig genug um eine Biofilmbildung zu vermeiden [100]. Resistenzbildung im Biofilm basiert auf multizellularen Strategien und führt zum Auftreten schneller Resistenzen und veränderten

Phänotypen [190]. Deshalb ist eine rasch verfügbare hohe antibiotische Konzentration am Implantat erforderlich. Die Gentamicinpalmitatbeschichtung gewährleistet während des gesamten Untersuchungszeitraums einen suffizienten antibakteriellen Effekt.

Fazit

Die Gentamicinpalmitatbeschichtung von Titankörpern reduziert signifikant die iatrogene intramedulläre bakterielle Besiedlung des Femurs und Implantates in einem Rattenmodell. Die lokale Freisetzung des Antibiotikums ist geeignet Biofilmproduktion für den beobachteten Zeitraum von 6 Wochen zu verhindern.

Coating with a novel gentamicinpalmitate formulation prevents implant-associated osteomyelitis induced by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in a rat model

Christian Fölsch · Maïke Federmann · Klaus D. Kuehn · Clemens Kittinger · Stefan Kogler · Gernot Zarfel · Martina Kerwat · Steve Braun · Susanne Fuchs-Winkelmann · Jürgen R. J. Paletta · Philip P. Roessler

Received: 21 August 2014 / Accepted: 22 October 2014 / Published online: 8 November 2014
© SICOT aisbl 2014

Abstract

Purpose Implant-associated osteomyelitis still represents a demanding challenge due to unfavourable biological conditions, bacterial properties and incremental resistance to antibiotic treatment. Therefore different bactericide or bacteriostatic implant coatings have been developed recently to control local intramedullary infections. Controlled local release of gentamicin base from a highly lipophilic gentamicin palmitate compound achieves extended intramedullary retention times and thus may improve its bactericide effect.

Methods Forty male Sprague-Dawley rats were divided into two groups receiving an intramedullary femoral injection of

10^2 colony-forming units (CFU) of a common methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* strain (MSSA *Rosenbach*) and either an uncoated femur nail (Group I) or a nail coated with gentamicin palmitate (Group II). Animals were observed for 28 and 42 days. Serum haptoglobin and relative weight gain were assessed as well as rollover cultures of explanted femur nails and histological scores of periprosthetic infection in dissected femurs.

Results Implants coated with gentamicin palmitate significantly reduced periprosthetic bacterial growth as well as signs of systemic inflammation compared with uncoated implants. **Conclusions** Gentamicin palmitate appears to be a viable coating for the prevention of implant-associated infections. These findings will have to be confirmed in larger animal models as well as in clinical trials.

C. Fölsch · M. Federmann · S. Fuchs-Winkelmann · J. R. J. Paletta · P. P. Roessler
Department of Orthopaedics and Rheumatology, University Hospital Marburg, Marburg, Germany

P. P. Roessler (✉)
Department of Orthopaedics and Traumatology, University Hospital Bonn, Sigmund-Freud-Str. 25, 53127 Bonn, Germany
e-mail: philip.roessler@ukb.uni-bonn.de

K. D. Kuehn · S. Kogler
Department of Orthopaedics and Orthopaedic Surgery, Medical University of Graz, Graz, Austria

C. Kittinger · G. Zarfel
Institute of Hygiene, Microbiology and Environmental Medicine, Medical University of Graz, Graz, Austria

M. Kerwat
Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Philipps-University Marburg, Marburg, Germany

S. Braun
Department of Diagnostic and Interventional Radiology, University Hospital Marburg, Marburg, Germany

Keywords Osteomyelitis · Rat model · Gentamicin palmitate · Coated implants · *Staphylococcus aureus*

Introduction

Osteomyelitis, a bone marrow infection, is still one of the most feared late complications after excessive bone and soft-tissue surgery, open fractures or implant-associated infections. It is divided into an acute and a chronic form. Chronic osteomyelitis evolves over years with persistent low-grade inflammation, impaired circulation and subsequent bone destruction with formation of sequestrs [1]. Most common pathogens of chronic osteomyelitis are Gram-positive bacteria, especially *Staphylococcus aureus* (MSSA) and *Coagulase-negative Staphylococci* (CoNS), which together make up 75 % of all infections [2]. Moreover Gram-positive bacteria are also the

most common pathogens causing periprosthetic joint infections [3, 4] as well as infections of incorporated biomaterials in general [5]. Due to their pyogenous potential these pathogens induce early osteonecrosis as well as bone resorption by stimulation of osteoclastic activity [1]. Therapy strategies are scarce and mainly focus on implant removal—if applicable—and radical surgical debridement of the infection site in combination with local and systemic application of antibiotics [6–8]. Today the “gold standard” for local application of antimicrobial agents is polymethylmethacrylate (PMMA) loaded with various antibiotics [3, 9, 10]. Delivery from PMMA remains the only local clinical application technique for antibiotics, however it may impair tissue healing itself and therefore bears a considerably high risk of reinfection in the long run [11]. Antibiotic protection of cementless implants, however, has not been possible in clinical practice until today [12].

Challenges of local antibiotic delivery are a high antibiotic release within the first hours exceeding minimum inhibitory concentrations (MICs) of the selected pathogen, as well as a sufficient long-term antibiotic release thereafter. For infections caused by MSSA, failure rates of local therapy strategies are around 20 %. Recent research has therefore focused on the development of new implant designs or coatings to prevent bacterial colonisation and biofilm formation and thus win the so-called “race for the surface” in an early stage [13]. This can be achieved either by implant design itself or by the help of bioactive substances like antibiotics [14]. Gentamicin is an aminoglycoside antibiotic with a relatively wide spectrum of activity, including MSSA as it is seen in acute osteomyelitis. Unfortunately, side effects of a systemic therapy with gentamicin are ototoxicity and severe nephrotoxicity, which limits its use especially in critically ill patients. Local application (e.g. PMMA beads) instead does not seem to cause these adverse reactions [3]. Furthermore, it does not seem to interfere with the formation of new vital bone, as is desired in infected defect situations [15]. Several formulations of gentamicin are already in clinical use. Gentamicinpalmitate has already been shown to have a good activity against MSSA and is also thought to remain intramedullary due to its highly lipophilic fraction [12, 16].

The aim of the present study was to evaluate the efficacy of an implant coating with a novel gentamicinpalmitate (GP) formulation in vivo using an established rat model of acute implant-associated osteomyelitis [17].

Materials and methods

Implants

Coating and sterilisation

Gentamicinpalmitate (GP) coating solutions were prepared by inverse salt exchange (Heraeus Medical, Wehrheim, Germany)

[18]. In doing so the sulphate ions of gentamicinsulphate (GS) are replaced by palmitic acid anions. The protonised gentamicin base (GB) remained unchanged. A methanolic solution of GP was then sprayed homogeneously on 1.5-mm Kirschner wires (k-wires) (Hemoteq, Aachen, Germany).

All wires had a surface of circa 0.97 cm² and were coated with circa 1 mg GP. The total amount of applied GP was determined by analytic weighing directly after the coating procedure. Afterwards the wires were dried for one hour at room temperature (23 °C, 55 % rH) and weighed again. Mean applied GP was 1.0088 g, with a standard deviation of 57.7 µg per wire (5.42 % relative standard deviation). Optimal spraying time was determined at 13 seconds in preparation for this study. Coated and uncoated k-wires were sterilised by γ -radiation with 25 kGy (BGS Beta-Gamma-Service, Wiehl, Germany).

Elution-experiments with sterilised and non-sterilised implants

Coated sterilised and non-sterilised k-wires were incubated in phosphate-buffered saline (PBS) (Biochrom, Berlin, Germany) at 37 °C and samples were taken on five consecutive days. To determine the amount of eluted gentamicin, 100 µl of the eluate were analysed via fluorescent polarisation in the TDx system (Figureott TDx, Figureott Park, IL, USA). Wires stored for four years at room temperature (23 °C, 55 % rH) were analysed again during the experiments to determine stability of the GP coating.

Kinetics of bacterial reduction

An overnight culture of MSSA was diluted in pre-warmed media (37 °C) to a bacterial number of 10⁶ colony-forming units (CFU)/ml resulting in a final volume of 10 ml. This bacterial suspension was then incubated at 37 °C and shaken at 96 rpm for two hours. Subsequently antibiotics and k-wires were added. Samples were drawn after 15, 30, 45 and 60 minutes and then by the hour. The last sample was taken after 24 hours. Aliquots of the samples were plated on agar plates to determine germ number. GS at 50 µg/ml served as a control.

HPLC analysis of eluates

To ascertain the amount of released antibiotic over time, eluates were analysed on high-performance liquid chromatography (HPLC). Ten calibration standards from 100 to 7,500 ng/ml gentamicin as well as a blank sample (with internal standard) were prepared by spiking 200 µl of working solution with internal standard working solutions (18 µl gentamicin).

The study samples were diluted by factor 20 and prepared according to the calibration standards by adding internal

standard working solution. Every sample was analysed three times in a row. LC-MS/MS chromatographic separation was performed on a modular HPLC 1200 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) using a Luna C18 (II) column, 150×2 mm, with two C18 guard columns, 4×2 mm (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) at 25 °C. Injection volume was 2 µl. The mobile phase A was 0.11 M trifluoroacetic acid/methanol (50:50) and mobile phase B was acetonitrile. An isocratic separation for gentamicin was achieved with an A:B ratio of 95:5 at a flow rate of 0.25 ml/min. The runtime was 2.5 min and the total cycle time was less than three minutes. Under these conditions the four gentamicin components C1, C2, C2a and C1a co-eluted. This HPLC method has been used previously to determine gentamicin levels in biopsy samples [19]. The detection of the co-eluted gentamicin components was carried out using an API 4000 QTrap (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). Ionisation was carried out with an electrospray interface (positive polarity) using the mass selective detector in the multiple reaction monitoring mode (MRM). The extracted ion chromatograms of the following ion transitions were stored and calculated: 478.4 → 322.3 m/z (gentamicin C1), 464.4 → 322.3 m/z (gentamicin C2 and C2a), 450.3 → 322.3 m/z (gentamicin C1a) and 468.4 → 163.1 m/z (internal standard). The three ion transitions of gentamicin components were summed by the software Analyst 1.4.2 (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) and calculated with Excel (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Germany).

Pathogen

Induction of osteomyelitis was achieved by inoculation of 10² CFU of *methicillin-susceptible Staphylococcus aureus* (MSSA) namely *Staphylococcus aureus subsp aureus Rosenbach* [20] dissolved in PBS. This facultative anaerobe has a known sensitivity to gentamicin.

Animals

Forty male five month-old Sprague-Dawley rats (Harlan Winkelmann, Borcheln, Germany) were used in the experiment. The animals were kept in individual plastic cages (Macrolon Type III) in a room maintained at a constant temperature of 22.1 °C, 55 % rH with a 12 hour light/dark cycle. They had free access to drinking water and standard laboratory pellets LASQcdiet® Rod16 Rad (LASvendi, Soest, Germany). All experiments were carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health and approved by the local Animal Ethics Committee Regierungspräsidium Giessen under reference number V 54 – 19 c 20 15 (1) MR 20/21 – No. 45/2010.

Surgery

Animals were divided into two groups of 20 rats prior to surgery. Group I served as a negative control, receiving an uncoated implant, whereas Group II received a coated implant. Subgroups of ten animals were killed after observation times of 28 and 42 days in each group.

Surgery was performed under general anaesthesia by weight-adjusted intraperitoneal injection of xylazine 2 % (Rompun®, 10 mg/kg body weight; Bayer CropScience, Leverkusen, Germany) and ketamine hydrochloride (Ketamin WDT, 100 mg/kg body weight; WDT eG, Garbsen, Germany). The left hindleg was shaved around the knee and aseptically prepared with phenoxyethanol (Schülke & Mayr, Norderstedt, Germany). An approximately 10-mm long ventral parapatellar arthrotomy was made to open up the knee joint. The patella was everted, exposing both femoral condyles and the trochlea. The femoral intramedullary cavity was opened in the trochlear groove and carefully reamed up using a small k-wire. After reaching the desired measures, a Hamilton microlitre syringe was used to administer the previously defined amount of inoculum into the intramedullary canal. Afterwards a sterilised k-wire (Group I, uncoated/control, or Group II, coated) was applied avoiding contact to every surrounding tissue. After implantation, the site was closed by suturing up the overlying tissue and skin with fast resorbing Vicryl rapide 4–0 (Ethicon, Norderstedt, Germany). All surgical procedures were performed by experienced surgeons. Due to the infectious nature of these experiments no additional antibiotics were used to prevent wound infection perioperatively.

Radiographs

Radiographic evaluation was performed seven, 14, 28 and 42 days after surgery using digital plain film imaging (Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Germany) in anterior-posterior (AP) and axial views. All animals were anaesthetised as described above for the duration of the radiographic scans. Images were transferred to a Leonardo image analysis workstation (Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Germany) for evaluation.

Blood serum samples and body weight

Blood serum samples were collected by retrobulbar venous plexus puncture under general anaesthesia following radiographic evaluation after seven, 14, 28 and 42 days. All samples were screened for the acute phase protein, haptoglobin, to assess early systemic inflammation [21].

Body weight of all animals was checked after four, seven, ten, 14, 17, 21, 28, 34 and 42 days and expressed in relation to the baseline weight (Δ g) to assess weight gain or loss.

Harvesting of tissue and sectioning

Animals were killed by CO₂ asphyxiation. The condyles at the implantation site were carefully removed using a bone forceps to expose the intramedullary nails. These were pulled out and kept under sterile conditions for direct processing. The whole remaining femur was resected and immediately fixed in 4 % buffered formalin for three days and then decalcified in Osteosoft® EDTA-solution (Merck, Darmstadt, Germany) over a period of 28 days. After that specimens were dehydrated in graded alcohol solution and cedar wood oil and embedded in paraffin. Sections were cut at 5 µm with a 40° stainless-steel blade on a rotation microtome RM2055 (Leica Microsystems, Bensheim, Germany).

Microbiological evaluation

Intramedullary nails were explanted as described above and immediately rolled over a blood agar plate under sterile working conditions. Inoculated blood agar plates were incubated for 48 hours at a temperature of 37 °C. Colony counts were carried out following the incubation time using an indirect viable cell count method. Confluent bacterial growth was set at 500 CFU per plate.

Histology and histomorphometric analysis

Histological staining was performed with a haematoxylin-eosin (HE) (Merck, Darmstadt, Germany) formulation according to standard protocols. Histomorphometric analysis was performed at a primary magnification of fivefold using a digital microscope DM5000 (Leica Microsystems, Bensheim, Germany) and QUIPS analysis software (Leica Microsystems, Bensheim, Germany). Fifty images per specimen were captured and assembled into a montage displaying the whole femur. Four regions of interest (ROIs) were defined dividing the femur into proximal epiphyseal/metaphyseal, proximal diaphyseal, distal diaphyseal and distal epiphyseal/metaphyseal.

Presence of a periprosthetic infection or osteomyelitis was detected for each ROI using a modified Petty Score with evaluation of abscess formation (0–1), bone sequestrs (0–1), cortical thickening or bone formation (0–1), cortical destruction (0–1) and overall appearance (0–2). Total scores (0–6) were calculated as means of all four ROIs.

Statistical analysis

Paired *t*-tests or multiple *t*-tests with a post hoc Holm-Sidak correction were used to evaluate the differences between groups using Graph Pad Prism 6 (Graph Pad, La Jolla, CA, USA). Data are given as means ± standard deviation (SD) if

not indicated otherwise. The level of significance was set at $p < 0.05$.

Results

Release kinetics of coated implants

Elution experiments on freshly coated k-wires

Figure 1 gives an overview on the release of GB of freshly coated γ -sterilised and non-sterilised k-wires. The data of the eluted GB were calculated in µg per cm² of the surface (measurements were carried out with five k-wires). The amount of the released GB was around 200 µg/cm² on the first day and decreased steadily until day five. Release rates of the non-sterilised k-wires were similar.

Measurement of elution over 21 days of long-stored k-wires

Long-stored k-wires were kept in a dry place for two years and ten months. Figure 2 gives an overview on the release of GB of freshly coated k-wires. The release rates of the long-stored k-wires were similar to the release rates of the freshly coated k-wires. The initial burst was similar to that of freshly coated k-wires. The investigated k-wires showed 25–30 µg of GB release on days seven, 14 and 21.

Elimination kinetics of GP compared with GS

Bacterial elimination kinetics of k-wires compared with GS. Both the GP (two years and ten months old) and the GS show similar elimination kinetics in vitro (Fig. 3).

Weight and general condition

Six animals were lost perioperatively or preoperatively due to complications of intraperitoneal anaesthesia. These animals were replaced and respective groups were filled up. No

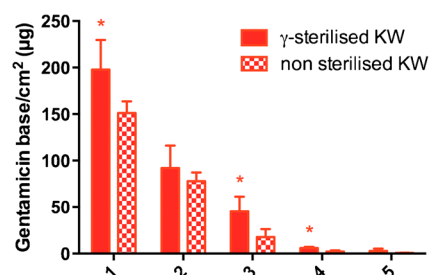


Fig. 1 Released amount of GB from one to five days. Gamma-sterilised k-wires (KW) showed a significantly greater release of GB at one, three and four days compared with non-sterilised KWs

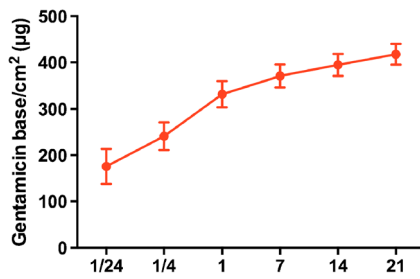


Fig. 2 Cumulative released amounts of GB from 1 h to 21 days of long-stored k-wires. There were no significant differences between long-stored and freshly coated k-wires regarding antibiotic release kinetics as presented in Fig. 1

animals were lost postoperatively or in the course of the experiment.

Relative weight gain in Group I (control) showed an increase from 7.00 ± 1.81 g after four days to 84.86 ± 11.83 g after 42 days, whereas Group II (coated) showed an increase from 6.76 ± 12.45 g after four days to 184.66 ± 28.78 g after 42 days (Fig. 4).

Radiographic evaluation

Radiographs did not show any misplaced k-wires. No specific radiographic signs of acute osteomyelitis could be seen in course of the experiment in any of the groups.

Blood serum analyses

Serum Hp levels started from 1.67 ± 0.63 mg/dl (day seven) in Group I (control) falling to 1.24 ± 0.51 mg/dl (day 13) and rising again to 1.64 ± 0.81 mg/dl (day 28) to remain at 1.66 ± 0.46 mg/dl (day 42). Group II (coated) showed a steady decrease of serum Hp levels starting from 1.29 ± 0.53 mg/dl (day seven) over 0.98 ± 0.65 mg/dl (day 13) to 0.78 ± 0.33 mg/dl (day 28) and finally 0.57 ± 0.23 mg/dl (day 42). Coated implants yielded significantly lower Hp levels after 28 and 42 days compared with uncoated implants.

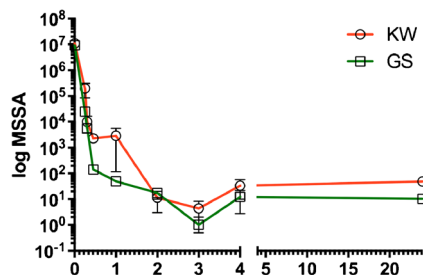


Fig. 3 Bacterial elimination kinetics of coated k-wires (KW) compared with 50 µg/ml of GS (a corresponding value according to the total amount of GB released in the long term elution) over 24 hours

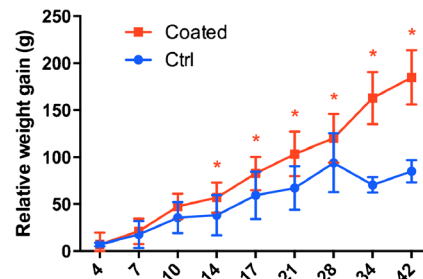


Fig. 4 Relative weight gain compared with the baseline weight in each group. Animals in Group II (coated) show significantly faster weight gain from day 14 on steadily

Microbiological evaluation

Rollover cultures of the explanted k-wires revealed confluent bacterial growth in Group I (control) and disseminated punctiform bacterial growth in Group II (coated) after 28 and 42 days. Bacterial counts revealed a mean of 380.60 ± 134.60 CFU for Group I (control) and 35.10 ± 47.65 CFU for Group II (coated) after 28 days as well as 356.0 ± 142.60 CFU for Group I (control) and 21.10 ± 28.94 CFU for Group II (coated) after 42 days. Differences between both groups were statistically significant at both timepoints (Fig. 5).

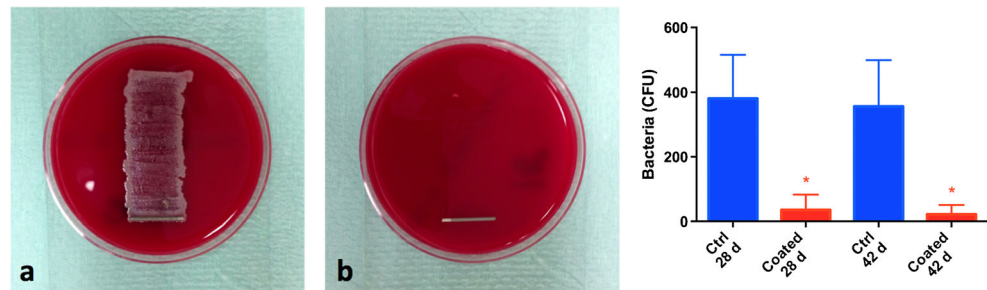
Histology

Mean Petty-Scores in Group I (control) were 4.2 ± 0.55 indicating an acute osteomyelitis, whereas Group II (coated) yielded mean scores of 1.17 ± 0.65 , which holds for one characteristic of implant-associated infection after 28 days. Group I (control) scored 4.2 ± 0.77 , again indicating acute osteomyelitis, whereas Group II (coated) scored 1.27 ± 0.34 , again showing present but locally controlled infection after 42 days (Fig. 6).

Discussion

Implant-associated MSSA osteomyelitis could be successfully prevented throughout the whole period of investigation using a novel GP coating. The present study has focused on a model of intramedullary nailing as described by Lucke et al. [17] previously, only choosing the femur instead of the tibia as implantation site. According to the results of Lucke et al., no soft tissue infections could be noted near the entry sites of the distal femoral condyles [17]. Intramedullary injection of only 10^2 CFU led to induction of histologically and systemically verifiable acute osteomyelitis; however, the radiographic findings of Lucke et al. [17] could not be reproduced in this case. This may be due to the different anatomical shape and greater intramedullary volume of the rat femur in comparison to the

Fig. 5 Control (a) and coated (b) nail rolled over blood agar showing a dense bacterial colonisation in the control group. Corresponding bacterial counts (CFU) support these qualitative results



tibia [22]. Inoculum concentrations of 10^2 CFU may thus be enough to induce osteomyelitis in a rat femoral model, but do not lead to such bony destruction that it can be seen on plain radiographies though. Colonisation of all explanted uncoated k-wires (Group I) could be verified by rollover cultures, whereas all coated k-wires (Group II) remained sterile after explantation.

Type of surface and its composition affect interaction between orthopaedic implants and tissue. Inert surfaces which are not integrated within healthy tissue are most prone to bacterial colonisation and thus—in the long run—biofilm formation [23]. Local application of antibiotics—like from a GP coating, as shown in this study—provides high levels and avoids systemic toxic effects of antimicrobial agents [10]. High local concentrations of antibiotics have been shown to be beneficial in relatively avascular sites and in cases of biofilm [24, 25]. Titanium implants coated with biodegradable PDLA containing 10 % gentamicin have been investigated already [5, 26] and local antibiotic delivery has also successfully been achieved with cancellous bone chips, hydroxyapatite (HA) or PMMA beads [27–29]. Release profiles for different antibiotics range from a few hours to ten days there. To date, however, only antimicrobial silver-coatings are being used on endoprostheses or implants in the clinical setting, but resistance of bacteria against silver has been described already and there are a lot of unfavourable characteristics for this coating as well (e.g. systemic toxicity). PMMA, however, has a major disadvantage when used as a carrier, since the material is not degradable and may cause severe foreign body

reactions. Systemic concentrations of antibiotics were below toxic levels when released from PMMA and elution curves showed levels above MIC until six weeks after implantation in another study [29]. High doses of drug release may interfere with bone ingrowth though and may cause a temporarily induced formation of fibrous tissue without inflammation [11, 30]. Small colony variants of MSSA have been found in osteomyelitis despite gentamicin application, but none were observed in another study [28], which might have been due to higher concentrations of gentamicin compared with the first one. In the present study, punctiform colonies of MSSA were found on the gentamicin-coated titan implants. Nonetheless, bacterial numbers counted were less than 10 % of the uncoated group after 28 and 42 days of infection. Histology showed signs of osteomyelitis only in one case treated with a gentamicin-coated wire. Unfortunately, both HA and PMMA cannot provide primary stability in bone surgery if used alone. Covalently bound antibiotics on metal surfaces like titanium may be a valuable alternative here [9].

Antimicrobial coatings in general, however, are of enormous clinical interest, as the increasing number of joint replacements will inevitably lead to a growing number of septic loosening or chronic septic complications such as osteomyelitis. Today the costs for arthroplasty revisions are several times above those for primary surgery, although results are not regularly satisfying.

With 10^2 CFU, the present study used the lowest known dose of bacterial inoculum to induce infection [31], since a high bacterial inoculation should not be expected in standard

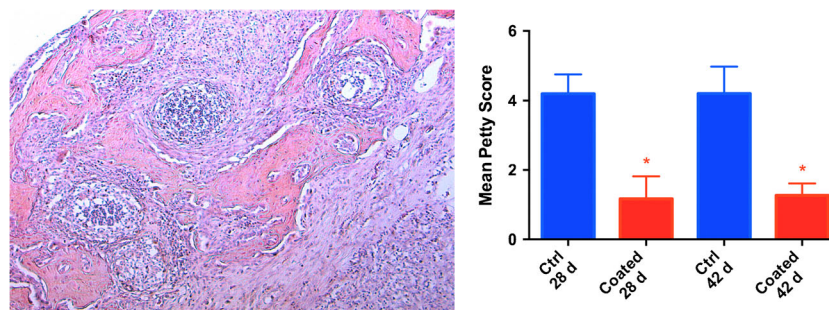


Fig. 6 H&E stained slide (10 \times) from Group I (control) showing disseminated abscess formation in transition from cortical to metaphyseal bone with consecutive destruction. Mean Petty Scores for each group

indicating an acute osteomyelitis after 28 and 42 days in Group I (control) and significantly different signs of suppressed infection in Group II (coated)

operating theatres. In a later study of Lucke et al., only 30 % of implants remained sterile, since the coating of PDLLA contained 10 % of gentamicin and 10^3 CFU/10 μ l of bacteria were inoculated [26]. The rate of sterile implants increased to 85 % if lower concentrations of inoculum were used, pointing out a general need for local application of antibiotics, especially for smaller concentrations of inoculum which come close to clinical situations [31]. The reduction of infections related to the application of local antibiotics have also been described in other models applying doses between 10^2 and 10^3 CFU [5, 17, 31, 32].

GP concentrations reached MIC within 30 min after application [12]. Bone cements containing GS and titan discs coated with GP showed a similar effectiveness against MSSA, both eliminating bacterial numbers ranging between 100 and 100,000 within 24 hours. Coatings of PDLLA, in contrast, as used by Lucke et al., degrade via hydrolysis within three to six months and are metabolised in the citric acid cycle [31]. However, high concentrations of antibiotics can be delivered for a short time. Hydrophobic forces are exerted over distances of 15 nm [23] and the strongly lipophilic GP coating used in the present study prevents or at least reduces colonisation of bacteria from the early seeding around six weeks. Although there is a high early burst release of gentamicin, the concentration remains above MIC until six weeks after implantation.

The effectiveness of antibiotic coatings seems to depend on the concentrations of bacterial inoculum used. Even after inoculation of only 10^2 CFU there is no complete prevention of bacterial colonisation. This does not jeopardise prophylaxis of infection during implantation of metal devices, since the number of bacteria inoculated in operating theatres should be expected to be even lower. Therefore, careful surgical debridement seems necessary to allow the antimicrobial coatings to work properly. The early release of the antibiotic within 30 minutes should be sufficient to avoid biofilm formation and the hydrophobic surface should additionally contribute to prevention of biofilm formation. Lipophilic coatings on the other hand can be expected to remain longer intramedullary than hydrophilic substances.

Conclusions

Gentamicin-palmitate coating significantly reduces bacterial colonisation by MSSA and diminishes a corresponding intramedullary infection. The local concentration of gentamicin appears to be sufficient to prevent biofilm formation for at least six weeks postoperatively in this animal model of implant-associated osteomyelitis. Further studies will have to confirm these results in larger animal models and clinical trials. They will also have to clarify the question if additional systemic antibiotics as used in clinical routines can boost the effects of such a gentamicin-palmitate coating.

Acknowledgments The present study was supported by Synthes GmbH, Umkirch, Germany. The authors thank Mr. Guido Schemken and his staff at the Central Animal Housing Facility in Marburg, as well as Prof. Dr. Markus Schofer and Dr. Stefan Lakemeier for their kind support in performing this study.

Conflict of interest All authors declare that there is no conflict of interest.

References

- Uçkay I, Jugun K, Gamulin A et al (2012) Chronic osteomyelitis. *Curr Infect Dis Rep* 14:566–575
- Li G-Q, Guo F-F, Ou Y et al (2013) Epidemiology and outcomes of surgical site infections following orthopedic surgery. *Am J Infect Control* 41:1268–1271
- Chang Y, Tai C-L, Hsieh P-H, Ueng SWN (2013) Gentamicin in bone cement: a potentially more effective prophylactic measure of infection in joint arthroplasty. *Bone Joint Res* 2: 220–226
- Seghrouchni K, van Delden C, Dominguez D et al (2012) Remission after treatment of osteoarticular infections due to *Pseudomonas aeruginosa* versus *Staphylococcus aureus*: a case-controlled study. *Int Orthop* 36:1065–1071
- Schmidmaier G, Lucke M, Wildemann B et al (2006) Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review. *Injury* 37(Suppl 2):S105–S112
- Lew DP, Waldvogel FA (2004) Osteomyelitis. *Lancet* 364:369–379
- Rod-Fleury T, Dunkel N, Assal M et al (2011) Duration of post-surgical antibiotic therapy for adult chronic osteomyelitis: a single-centre experience. *Int Orthop* 35:1725–1731
- Betz M, Abrassart S, Vaudaux P et al (2014) Increased risk of joint failure in hip prostheses infected with *Staphylococcus aureus* treated with debridement, antibiotics and implant retention compared to *Streptococcus*. *Int Orthop*. doi:10.1007/s00264-014-2510-z
- Antoci V, Adams CS, Parvizi J et al (2008) The inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by vancomycin-modified titanium alloy and implications for the treatment of periprosthetic infection. *Biomaterials* 29:4684–4690
- Joosten U, Joist A, Gosheger G et al (2005) Effectiveness of hydroxyapatite-vancomycin bone cement in the treatment of *Staphylococcus aureus* induced chronic osteomyelitis. *Biomaterials* 26:5251–5258
- Dion A, Langman M, Hall G, Filiaggi M (2005) Vancomycin release behaviour from amorphous calcium polyphosphate matrices intended for osteomyelitis treatment. *Biomaterials* 26:7276–7285
- Kittinger C, Marth E, Windhager R et al (2011) Antimicrobial activity of gentamicin palmitate against high concentrations of *Staphylococcus aureus*. *J Mater Sci Mater Med* 22:1447–1453
- Gracia E, Laclériga A, Monzón M et al (1998) Application of a rat osteomyelitis model to compare in vivo and in vitro the antibiotic efficacy against bacteria with high capacity to form biofilms. *J Surg Res* 79:146–153
- Ozturk AM, Tabak AY, Aktekin CN et al (2008) Alendronate enhances antibiotic-impregnated bone grafts in the treatment of osteomyelitis. *Int Orthop* 32:821–827
- Fassbender M, Minkwitz S, Kronbach Z et al (2013) Local gentamicin application does not interfere with bone healing in a rat model. *Bone* 55:298–304
- Matl FD, Obermeier A, Repmann S et al (2008) New anti-infective coatings of medical implants. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 1957–1963

17. Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S et al (2003) A new model of implant-related osteomyelitis in rats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 67:593–602
18. Vogt S, Kühn K-D, Gopp U, Schnabelrauch M (2005) Resorbable antibiotic coatings for bone substitutes and implantable devices. *Materwiss Werksttech* 36:814–819
19. Heller DN, Peggins JO, Nochetto CB et al (2005) LC/MS/MS measurement of gentamicin in bovine plasma, urine, milk, and biopsy samples taken from kidneys of standing animals. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 821:22–30
20. Cowan ST, Shaw C, Williams RE (1954) Type strain for *Staphylococcus aureus* Rosenbach. *J Gen Microbiol* 10:174–176
21. Giffen PS, Turton J, Andrews CM et al (2003) Markers of experimental acute inflammation in the wistar han rat with particular reference to haptoglobin and C-reactive protein. *Arch Toxicol* 77:392–402
22. Welch JM, Weaver CM, Turner CH (2004) Adaptations to free-fall impact are different in the shafts and bone ends of rat forelimbs. *J Appl Physiol* 97:1859–1865
23. Gristina AG (1987) Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 237:1588–1595
24. Lewis CS, Supronowicz PR, Zhukauskas RM et al (2012) Local antibiotic delivery with demineralized bone matrix. *Cell Tissue Bank* 13:119–127
25. Hanssen AD (2005) Local antibiotic delivery vehicles in the treatment of musculoskeletal infection. *Clin Orthop Relat Res* 437:91–96
26. Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S et al (2003) Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats. *Bone* 32:521–531
27. Lewis CS, Katz J, Baker MI et al (2011) Local antibiotic delivery with bovine cancellous chips. *J Biomater Appl* 26:491–506
28. Joosten U, Joist A, Frebel T et al (2004) Evaluation of an in situ setting injectable calcium phosphate as a new carrier material for gentamicin in the treatment of chronic osteomyelitis: studies in vitro and in vivo. *Biomaterials* 25:4287–4295
29. Cornell CN, Tyndall D, Waller S et al (1993) Treatment of experimental osteomyelitis with antibiotic-impregnated bone graft substitute. *J Orthop Res* 11:619–626
30. Hamanishi C, Kitamoto K, Tanaka S et al (1996) A self-setting TTCP-DCPD apatite cement for release of vancomycin. *J Biomed Mater Res* 33:139–143
31. Lucke M, Wildemann B, Sadoni S et al (2005) Systemic versus local application of gentamicin in prophylaxis of implant-related osteomyelitis in a rat model. *Bone* 36:770–778
32. Helbig L, Simank HG, Lorenz H et al (2014) Establishment of a new methicillin resistant *Staphylococcus aureus* animal model of osteomyelitis. *Int Orthop* 38:891–897

3.6. Systemische antibiotische Therapie verbessert das Ergebnis einer implantat-assoziierten Osteomyelitis induziert, durch Methicillin-sensiblen Staphylococcus aureus im Rattenmodell nicht signifikant

Einleitung

Der Stellenwert der systemischen antibiotischen Therapie scheint nicht vollständig geklärt [191]. Der Vergleich der Wirkungsweise von applizierten Antibiotika ist aufgrund uneinheitlicher Versuchsbedingungen erschwert [192-194]. Zu berücksichtigen sind verschiedene Bakterienstämme in unterschiedlichen Konzentrationen ebenso wie abweichende Konzentrationen von Antibiotika [183]. Unsere Studie benutzte die geringste Bakterienzahl von 100 CFU, erforderlich für die Induktion einer Infektion vergleichbar mit dem Rattentibiamodell von Lucke [195]. Anhand diverser Tiermodelle konnte für unterschiedliche Körperregionen die antibakterielle Wirkung von Antibiotikumbeschichtungen gezeigt werden. Nur die lokale Anwendung von Antibiotika vermeidet systemisch toxische Effekte und bewirkt notwendige hohe lokale Konzentrationen, um multiresistente Keime zu behandeln [121,180,196-198]. Gentamicinbeschichtung von K-Drähten konnte im Tibiamodell der Ratte in 80-90% eine Infektion mit und ohne systemische Therapie gleichermaßen verhindern [113] und 10% Gentamicinbeschichtung zeigte in einer anderen Untersuchung eine signifikante Reduktion der Bakterienzahl [188]. Systemische Gentamicingabe reduzierte die Bakterienzahl um 15% während die Beschichtung des Implantates mit Gentamicin eine Reduktion von 85% erreichte und die Kombination von systemischer und lokaler Therapie das Ergebnis nicht verbesserte [188]. Systemisch applizierte Antibiotika erreichen Knochensequester sowie Biofilm nur unzureichend [199]. Die Kombination aus systemischer und lokaler Antibiotikaapplikation zeigte sich der alleinigen systemischen Therapie überlegen und chirurgisches Debridement verbesserte die Infektkontrolle zusätzlich [179,180,200]. Die Angaben zu einem möglichen Synergieeffekt lokaler und systemischer Applikation von Antibiotika werden aber auch unterschiedlich betrachtet [177,198,201]. Ein möglicher Synergieeffekt systemischer Gabe von Gentamicin zusätzlich zur Implantatbeschichtung mit Gentamicinpalmitat sollte deshalb untersucht werden.

Methode

Die Effektivität der systemischen antibiotischen Therapie im Vergleich oder synergistisch zur lokalen Applikation war Gegenstand einer weiteren Untersuchung. Die Gruppengröße wurde mit einer Power von 0.8 und $\alpha=0.05$ auf eine Zahl von acht berechnet. Die Versuchsbedingungen waren mit dem bereits beschriebenen Ablauf identisch, lediglich erfolgte bei einer weiteren Gruppe von 40 männlichen Sprague-Dawley Ratten im Alter von 5 Monaten neben der Implantation, eines mit Antibiotikum beschichteten Titandrahtes und einer unbeschichteten Kontrolle, zusätzlich die systemische hier intraperitoneale Applikation von Gentamicinsulfat in üblicher Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht. Die Bestimmung verschiedenster Parameter war analog dem Vorversuch allerdings wurde zusätzlich Gentamicin im Serum bestimmt. Zur statistischen Berechnung wurde der paired t-Test oder der multiple t-Test herangezogen und die Signifikanz wurde bei $\alpha=0.05$ bestimmt.

Ergebnis

Die Serumwerte für Haptoglobin waren nach alleiniger intraperitonealer Applikation von Gentamicin von 1.47 ± 1.11 mg/dl nach einer Woche rückläufig auf 0.81 ± 0.47 mg/dl nach 6 Wochen. Bei kombinierter Gabe von Gentamicin als Beschichtung auf dem Implantat sowie systemisch ergab sich ein Abfall des Serumwertes für Haptoglobin nach 1 Woche von 0.88 ± 0.46 mg/dl auf 0.61 ± 0.16 mg/dl nach 6 Wochen. Zwischen beiden Gruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied. Hingegen fanden sich signifikante Differenzen zwischen der Kontrollgruppe ohne jegliche Antibiotikagabe und der Kombinationstherapie nach 1 Woche sowie nach 4 und 6 Wochen. Die Ergebnisse nach intraperitonealer Applikation von Gentamicin zeigten sich von der Kontrolle nicht signifikant different. Die Serumkonzentration von Gentamicin lag zu den Zeitpunkten 1 Woche, 2 Wochen sowie 4 und 6 Wochen unterhalb von 0.5 mg/l. Die Abstriche der Implantate nach intraperitonealer Applikation von Gentamicin zeigten vermehrtes disseminiertes punktförmiges Wachstum von Bakterien und nach kombinierter Therapie wurde ein disseminiertes punktförmiges Wachstum nach 4 und 6 Wochen nachgewiesen während die Kontrollgruppe ein überwiegend konfluierendes Wachstum aufwies. Es zeigte sich eine CFU für die systemische Therapie von 125.60 ± 177.60 nach 4 Wochen abfallend nach 6 Wochen auf 68.50 ± 154.60 und für die Kombinationstherapie wurde nach vier

Wochen eine CFU von 17.40 ± 28.08 sowie nach sechs Wochen 37.67 ± 40.05 gezählt. Signifikante Differenzen konnten zwischen den beiden Gruppen mit antibiotischer Behandlung nicht nachgewiesen werden aber jeweils im Vergleich mit der Kontrolle. Der mittlere Wert des Petty-Scores für die intraperitoneale Therapie betrug nach 4 Wochen 2.47 ± 0.59 und veränderte sich bis zum Ende der 6. Woche nicht signifikant auf 2.26 ± 0.49 . Für die Kombinationstherapie mit lokaler Applikation von Gentamicin zeigte sich nach 4 Wochen ein Wert von 2.48 ± 0.71 ebenso ohne signifikante Änderung nach 6 Wochen auf 2.44 ± 0.41 .

Diskussion

Wir konnten entsprechend anderer Untersuchungen eine signifikante lokale Wirksamkeit einer Beschichtung mit Gentamicinpalmitat gegen eine intramedulläre iatrogene Infektion im Rattenfemur nachweisen [121]. Tiere nur mit systemischer Gabe von Gentamicin entwickelten Zeichen der Osteomyelitis und die kombinierte Applikation verbesserte das Ergebnis nicht signifikant [195]. Unsere Ergebnisse im Femurmodell der Ratte zeigten keine synergistische Wirkung lokaler und systemischer Therapie, aber die Wirksamkeit der alleinigen systemischen Applikation war erkennbar [121]. Hohe lokale Konzentrationen von Antibiotika waren wirksam gegen Biofilmbildung und wurden durch lokale Applikation erreicht [113,121,183,188,202-204], konnten aber auch eine temporäre fibröse Reaktion induzieren [80,205]. Unsere Untersuchung ergab keinen zusätzlichen signifikanten lokalen antibakteriellen Effekt einer kombinierten Therapie gegenüber der alleinigen Implantatbeschichtung [121]. Unsere Untersuchungsergebnisse zeigen keine signifikant differente Wirksamkeit von systemischer und lokaler Applikation, jedoch jeweils mit signifikanter Wirkung gegenüber der Kontrollgruppe [121]. Die systemische antibiotische Therapie zeigte kombiniert mit der lokalen Applikation eine Suppression von systemischen Infektionszeichen wie auch von Lucke beschrieben [188] konnte aber in Kombination mit der lokalen Gabe des Antibiotikums keinen signifikanten Synergismus bezüglich der Reduktion der bakteriellen Besiedlung der Implantate und des Markraums auslösen [121]. Die alleinige systemische Gabe von Gentamicin konnte das Serumhaptoglobin nicht signifikant reduzieren [121]. Eine Auswirkung der antibiotischen Beschichtung der Implantate auf systemische Auswirkungen der lokalen Infektion erscheint deshalb

wahrscheinlich. Die lokale Gabe von Antibiotika verhinderte positive Blutkulturen [180] ebenso wie die lokale Infiltration mit Leukozyten in Gegenwart lokaler Antibiotika verringert war [206]. Die Kombinationstherapie reduzierte das Serumhaptoglobin nach 6 Wochen allerdings stärker als die Monotherapie mit systemischer Gabe. Systemische antibiotische Therapie zeigte sich in anderen Studien ebenso nicht effektiver zur Eradikation von Bakterien auf Implantaten [196-198,201]. Die Literatur ergibt in Abhängigkeit von verschiedenen Modellen mit unterschiedlichen Parametern und Antibiotika keine einheitlichen Angaben zum Zusammenwirken von Antibiotika als Implantatbeschichtung und systemisch applizierter Gabe [207]. Hohe systemische Konzentrationen verschiedener Antibiotika können die erfolgreiche Eradikation resistent erscheinender Bakterien ermöglichen [191,196,198] und systemische Therapie zeigte sich bei Bakterienzahlen von 10^4 und 10^6 nicht ausreichend um Implantatinfektionen zu verhindern, hingegen kontrollierte die lokale Therapie die Bakterien [180]. Die Bedeutung der Kombinationstherapie mit lokaler und systemischer Antibiotikagabe sollte in Abhängigkeit von der Spezies und Anzahl der bakteriellen Besiedlung sowie der betroffenen Körperregion individuell beurteilt werden.

Fazit

Systemische Applikation von Gentamicin reduzierte die bakterielle Besiedlung von intramedullären Femurnägeln im Rattenmodell. Die antibiotische Wirkung einer lokalen Implantatbeschichtung mit Gentamicin wurde im Zusammenwirken mit systemischer Therapie nicht zusätzlich verbessert. Ein synergistischer Effekt war für die Kontrolle systemischer Infektzeichen erkennbar.

Systemic antibiotic therapy does not significantly improve outcome in a rat model of implant-associated osteomyelitis induced by Methicillin susceptible *Staphylococcus aureus*

Christian Fölsch^{1,2} · Maike Federmann² · Stefan Lakemeier⁴ · Klaus D. Kuehn⁵ · Clemens Kittinger⁶ · Martina Kerwat⁷ · Susanne Fuchs-Winkelmann² · Jürgen RJ Paletta² · Philip P. Roessler^{2,3}

Received: 25 May 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract

Introduction Treatment of implant-associated osteomyelitis regularly involves the use of systemic antibiotics in addition to surgical intervention. However, it remains unclear if perioperative systemic application of bactericide substances can improve overall outcome in models of severe intramedullary infection. The present study investigated the use of systemic gentamicin in addition to a controlled local release from a highly lipophilic gentamicinpalmitate compound while the previous study showed efficacy of sole antibiotic implant-coating. **Methods** Forty male Sprague–Dawley rats were divided into two groups receiving an intramedullary femoral injection of 10^2 CFU of a common methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* strain (MSSA *Rosenbach*). Group I received an uncoated implant whereas group II received a

coated implant. All animals received a single shot intraperitoneal application of gentamicinsulfate directly after wound closure while the historical control group III ($n = 20$) had no antibiotic treatment at all. Animals were observed for 28 and 42 days. Serum haptoglobin and relative weight gain were assessed as well as roll over cultures of explanted femur nails and histological scores of periprosthetic infection in dissected femora.

Results Systemic application of gentamicin combined with antibiotic-coated implant did not further reduce bacterial growth significantly compared with systemic or local antibiotic application alone. Combined local and systemic therapy reduced serum haptoglobin significantly after day 7, 28 and 42 whereas systemic application alone did not compare to controls.

Conclusions Systemic perioperative and implant-associated application of antibiotics were both comparably effective to treat implant-associated infections whereas the combined antibiotic therapy further reduced systemic signs of infection time dependent.

✉ Philip P. Roessler
philip.roessler@ukb.uni-bonn.de

- ¹ Department of Orthopaedic Surgery, University Hospital Gießen, Marburg, Germany
- ² Department of Orthopedics and Rheumatology, University Hospital Marburg, Marburg, Germany
- ³ Department of Orthopaedics and Traumatology, University Hospital Bonn, Sigmund-Freud-Str. 25, 53127 Bonn, Germany
- ⁴ Department of Orthopaedics, University Hospital Goettingen, Göttingen, Germany
- ⁵ Department of Orthopaedics and Orthopaedic Surgery, Medical University of Graz, Graz, Austria
- ⁶ Institute of Hygiene, Microbiology and Environmental Medicine, Medical University of Graz, Graz, Austria
- ⁷ Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Philipps-University Marburg, Marburg, Germany

Keywords Osteomyelitis · Rat model · Gentamicinpalmitate · *Staphylococcus aureus* · Systemic antibiotics · Gentamicinsulfate

Introduction

Perioperative application of antibiotics reduces infection rates after implantation of endoprostheses or equal devices [1, 2] and in cases of revision arthroplasty [27]. Risk factors for periprosthetic infections and options for effective strategies for prevention and treatment are under discussion [29–33]. However, systemic perioperative antibiotic therapy alone is usually not sufficient to treat apparent bone

infection or osteomyelitis and also causes considerable side effects [3–5, 26]. High local concentrations of antibiotics are necessary to break up developing biofilms and treat implant-associated infections especially concerning multi resistant bacteria [3, 4, 26]. Here implant coatings with antibiotics have proven to be an effective antimicrobial treatment in different animal models at several anatomic sites: rat spine [3, 6], rat tibia [1, 7, 8], rat femur [2, 9], rabbit forearm [4], rabbit femur [5, 10], rabbit tibia [11, 12] and rabbit spine [13]. Local application of antibiotics has also been reported to be an effective treatment in cases of osteomyelitis [5, 10, 14] and as an infection prevention in cases of severe fractures [15]. Synergistic effects between antibiotic substances and carrier systems have been shown [11]. Some studies found systemic perioperative application of antibiotics superior but there is increasing evidence for the importance of local antibiotic treatment to eradicate bacteria at implantation sites while systemic antibiotic therapy did not significantly reduce bacteria on implant surfaces in several studies and has a lot of impairing side effects which also might be related to local application [1, 2, 6, 13, 16]. For gentamicin with a relatively wide spectrum of activity, these are mainly oto- and severe nephrotoxicity, which may limit its use in high concentrations especially in critically ill patients [17]. At present it remains unknown if the use of perioperative systemic antibiotics in addition to a local delivery may yield better outcomes than local or systemic therapy alone [4, 5, 12, 18]. A vast variety of bacteria used for models of infection and the use of different antibiotics complicate such a comparison using existing studies regarding either systemic application or local application with each other. The present study utilizes an established model of bone infection [1, 8] with local delivery of gentamicin and examines its effectiveness with addition of systemic gentamicin considering results from a previous study [9]. Many implant-associated infections in orthopaedic surgery are caused by bacteria susceptible to gentamicin and aminoglycosides are predominantly prepared for local application from bone cement [4, 25]. The hydrophobic carrier palmitate should reduce bacterial adhesion itself and the antibiotic gentamicin is effective against a broad spectrum of gram negative and positive bacteria, including MSSA [4]. Combination of the lipophilic carrier palmitic acid with the antibiotic gentamicin should create a synergistic antibacterial effect by prolongation of intramedullary retention times.

The aim of the present study was to evaluate the efficacy of a perioperative systemic application of gentamicinsulfate (GS) in addition to an implant coating with a gentamicinpalmitate (GP) formulation compared with control in vivo using an established rat model of acute implant-associated osteomyelitis [8]. Total reduction in colony forming units (CFU) on the explants was set as the primary

outcome measure in accordance to the previous study. Secondary outcome measures were relative weight gain, blood serum parameters of infection and the modified Petty-Score for osteomyelitis. It was hypothesized that an additional systemic antibiotic therapy could further boost the anti-infective effect of locally applied antibiotics contained in the implant coating.

Methods

Implants

Preparation of implants and coating with gentamicinpalmitate (GP) were performed via inverse salt exchange (Heraeus Medical, Wehrheim, Germany) by exchanging sulphate ions of gentamicinsulfate (GS) with palmitic acid anions and homogeneously spraying k-wires with the resulting GP solution (Hemoteq, Aachen, Germany). This has already been described in detail earlier.

All wires had a surface of circa 0.97 cm² and were coated with circa 1 mg of GP. Elution experiments and kinetics of bacterial reduction have also been demonstrated [9].

Pathogen

Induction of osteomyelitis was achieved by inoculation of 10² CFU of *methicillin-susceptible Staphylococcus aureus* (MSSA) namely *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* *Rosenbach* [19] dissolved in phosphate buffered saline (PBS). This facultative anaerobe has a known sensitivity to gentamicin.

Animals

Forty male 5-month-old Sprague–Dawley rats (Harlan Winkelmann GmbH, Borchon, Germany) were used in the experiment. The animals were kept in individual plastic cages (Macrolon Type III) in a room maintained at a constant temperature of 22.1 °C, 55 % rH with a 12 h light/dark cycle. They had free access to drinking water and standard laboratory pellets LASQCDiet[®] Rod16 Rad (LASvendi GmbH, Soest, Germany). All experiments were carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the NIH and approved by the local Animal Ethics Committee Regierungspräsidium Giessen under reference number V 54–19 c 20 15 (1) MR 20/21–No. 45/2010. A previously published cohort of 20 animals served as a negative control in this study and provided a group with sole implant coating for comparison [9].

Surgery

Animals were divided into two groups of 20 rats prior to surgery. Group I received an uncoated implant, whereas group II received a coated implant. All animals received a single shot intraperitoneal (i.p.) application of GS directly after wound closure. Group III served as a negative control and only received an uncoated implant with no additional i.p. antibiotic; these results have been published earlier since all experiments were done at similar time intervals [9]. Subgroups of ten animals were killed after observation times of 28 and 42 days in each group.

Surgery was performed under general anesthesia by weight-adjusted intraperitoneal injection of xylazine 2 % (Rompun[®], 10 mg/kg body weight, Bayer CropScience AG, Leverkusen, Germany) and ketamine hydrochloride (Ketamin WDT, 100 mg/kg body weight, WDT eG, Garbsen, Germany). The left hindleg was shaved around the knee and aseptically prepared with phenoxyethanol (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Germany). An approximately 10 mm long ventral parapatellar arthrotomy was made to open up the knee joint. The patella was everted exposing both femoral condyles and the trochlea. The femoral intramedullary cavity was opened in the trochlear groove and carefully reamed up using a small k-wire. After reaching the desired measures a Hamilton microliter syringe was used to administer the previously defined amount of inoculum into the intramedullary canal. Afterwards a sterilized k-wire (group I: uncoated or group II: coated) was applied avoiding contact to every surrounding tissue. After implantation the site was closed by suturing up the overlying tissue and skin with fast resorbing Vicryl rapide 4-0 (Ethicon GmbH, Norderstedt, Germany). All surgical procedures were performed by experienced surgeons. Every animal received a single shot i.p. injection of GS after wound closure (Re-fobacin[®], 4 mg/kg body weight, Merck Serono, Darmstadt, Germany) similar to other studies [8].

Blood serum samples and body weight

Blood serum samples were collected by retrobulbar venous plexus puncture under general anesthesia following radiographic evaluation after 7, 14, 28 and 42 days. All samples were screened for the acute phase protein Haptoglobin to assess early systemic inflammation [20]. Body weight of all animals was checked after 4, 7, 10, 14, 17, 21, 28, 34 and 42 days and expressed in relation to the baseline weight (Δg) to assess weight gain or loss. Gentamicin was measured at day 7 and 14 (KIMS Technology, Beckman Coulter, Krefeld, Germany).

Harvesting of tissue and sectioning

Animals were killed by CO₂-asphyxiation. The condyles at the implantation site were carefully removed using a bone forceps to expose the intramedullary nails. These were pulled out and kept under sterile conditions for direct processing. The whole remaining femur was resected and immediately fixed in 4 % buffered formalin for three days and then decalcified in Osteosoft[®] EDTA-solution (Merck AG, Darmstadt, Germany) over a period of 28 days. After that specimens were dehydrated in graded alcohol solution and cedar wood oil and embedded in paraffin. Sections were cut at 5 μ m with a 40° stainless-steel blade on a rotation microtome RM2055 (Leica Microsystems GmbH, Bensheim, Germany).

Microbiological evaluation

Intramedullary nails were explanted as described above and immediately rolled over a blood agar plate under sterile working conditions. Inoculated blood agar plates were incubated for 48 h at a temperature of 37 °C. Colony counts were carried out following the incubation time using an indirect viable cell count method. Confluent bacterial growth was set at 500 CFU per plate.

Histology and histomorphometric analysis

Histological staining was performed with a Hematoxylin-Eosin (HE) (Merck AG, Darmstadt, Germany) formulation according to standard protocols. Histomorphometric analysis was performed at a primary magnification of fivefold using a digital microscope DM5000 (Leica Microsystems GmbH, Bensheim, Germany) and QUIPS analysis software (Leica Microsystems GmbH, Bensheim, Germany). Fifty images per specimen were captured and assembled into a montage displaying the whole femur. Four regions of interest (ROI) were defined dividing the femur into proximal epi-/metaphyseal, proximal diaphyseal, distal diaphyseal and distal epi-/metaphyseal.

Presence of a periprosthetic infection or osteomyelitis was detected for each ROI using a modified Petty-Score with evaluation of abscess formation (0–1), bone sequestrations (0–1), cortical thickening or bone formation (0–1), cortical destruction (0–1) and overall appearance (0–2). Total scores (0–6) were calculated as means of all four ROIs.

Statistical analysis

Power analysis of the study was done considering former results from literature [8] and the necessary group size of eight animals was calculated (Power 0.8, $\alpha = 0.05$). Paired

t tests or multiple *t* tests with a post hoc Holm-Sidak correction were used to evaluate the differences between groups using Graph Pad Prism 6 (Graph Pad Inc., La Jolla, CA, USA). Data are given as mean \pm standard deviation (SD) if not indicated otherwise. The level of significance was set at $p < 0.05$.

Results

Weight and general condition

Four animals were lost peri- or preoperatively due to complications of i.p. anesthesia. These animals were replaced and respective groups were filled up. Two animals were lost postoperatively or in the course of the experiment.

Relative weight gain in group I (i.p.) showed an increase from 12.38 ± 17.48 g after 4 days to 134.88 ± 18.02 g after 42 days whereas group II (Combi) showed an increase from 5.50 ± 7.82 g after 4 days to 119.67 ± 9.91 g after 42 days (Fig. 1). Significant differences to group III (Ctrl) could be reached and maintained in both groups from after 34 days.

Blood serum analyses

Serum Hp levels started from 1.47 ± 1.11 mg/dL (day 7) in group I (i.p.) falling to 0.92 ± 0.68 mg/dL (day 13) and rising again to 1.25 ± 0.74 mg/dL (day 28) to finally reach 0.81 ± 0.47 mg/dL (day 42). Group II (Combi) showed an initial serum Hp level of 0.88 ± 0.46 mg/dL (day 7) rising to 1.17 ± 0.73 mg/dL (day 13) and falling again to 0.87 ± 0.49 mg/dL (day 28) and finally 0.61 ± 0.16 mg/dL (day 42). No significant differences between both groups could be detected after 28 or 42 days. Significant

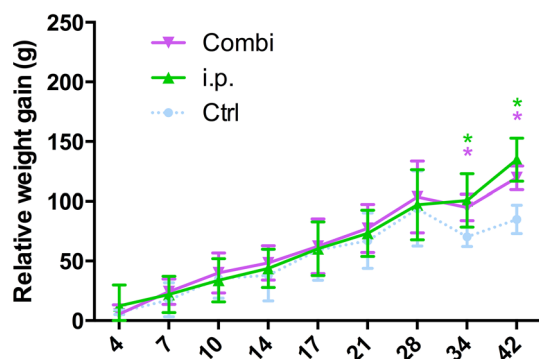


Fig. 1 Relative weight gain as compared to the baseline weight in each group. No significant differences can be recorded between group I (i.p.) and group II (Combi). However both groups show significant differences as compared to group III (Ctrl) from 34 days onward

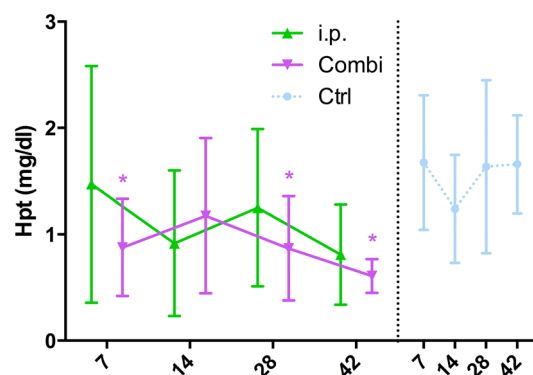


Fig. 2 Haptoglobin levels of both groups do not differ significantly over time. However group II (Combi) shows significant differences as compared to group III (Ctrl) at almost every timepoint

differences as compared to group III (Ctrl) could be found after 7, 28 and 42 days in group II (Combi), but not in group I (i.p.) (Fig. 2). Serum concentrations of gentamicin were measured below 0.5 mg/l at day 7, 14, 28 and 42.

Microbiological evaluation

Rollover cultures of the explanted K-wires revealed increased disseminated punctiform growth in group I (i.p.) and disseminated punctiform bacterial growth in groups II (Combi) after 28 and 42 days. Group III (Ctrl) showed a predominantly confluent growth. Bacterial counts revealed a mean of 125.60 ± 177.60 CFU for Group I (i.p.) and 17.40 ± 28.08 CFU for group II (Combi) after 28 days as well as 68.50 ± 154.60 CFU for group I (i.p.) and 37.67 ± 40.05 CFU for group II (Combi) after 42 days. There were no significant differences between both groups, but between each group and group III (Ctrl) at both timepoints (Fig. 3).

Histology

Mean Petty-Scores in group I (i.p.) were 2.47 ± 0.59 and in group II (Combi) were 2.48 ± 0.71 which hold for at least one characteristic of implant-associated infection after 28 days. Group I (i.p.) scored 2.26 ± 0.49 and group II (Combi) scored 2.44 ± 0.41 again showing a comparable pattern after 42 days. Mean Petty-Scores of group III (Ctrl) showed present, but locally controlled infection (Fig. 4).

Discussion

As for the primary outcome measure systemic i.p. antibiotic treatment with gentamicin has been shown to reduce bacterial colonization on the implants significantly as compared to untreated controls. However, it could not

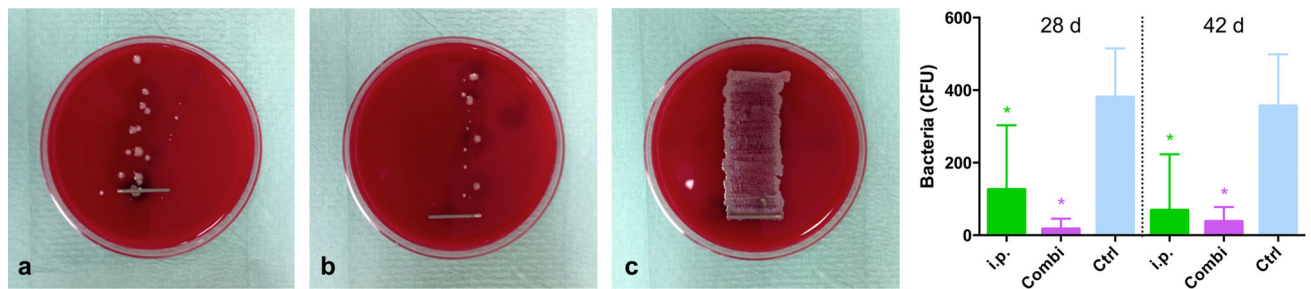


Fig. 3 I.p. (a) and Combi (b) group nail rolled over blood agar showing no significant differences in bacterial growth. Both groups show significant differences as compared to group III (Ctrl), which

shows confluent bacterial growth. Corresponding bacterial counts (CFU) can be found beneath

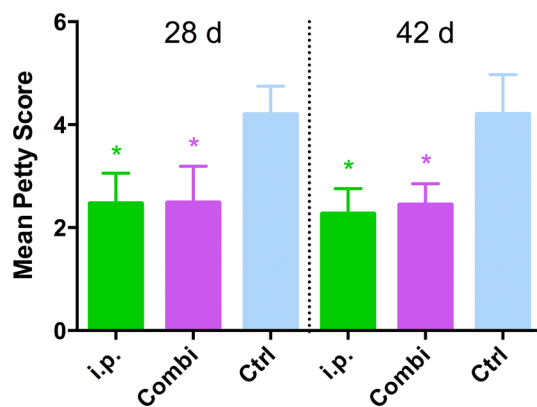


Fig. 4 Mean Petty-Scores showing no differences between group I (i.p.) and group II (Combi) as both groups are resembling a locally controlled infection with scores around 2. Significant differences of both groups as compared to group III (Ctrl) demonstrate that no intervention results into severe osteomyelitis

significantly further boost the anti-infective effect of locally applied antibiotics from the implant coating. The primary hypothesis has thus to be dismissed.

In a previous publication another subset of this animal model showed a significant reduction of bacterial implant colonization as measured by CFU for sole implant coating with GP only without any systemic treatment as compared to controls [9]. In summary of both experiments a significant difference between sole systemic or sole local application of antibiotics could not be noted, nor did one find an exponential effect of the combination therapy as mentioned.

Bacterial growth on roll-out cultures of explanted k-wires was equally punctiform in groups I (i.p.) and II (Combi) showing no significant improvement for combined therapy versus systemic treatment while different effects on the secondary outcome parameter serum haptoglobin could be noted, which was also reported in another similar study [16]. Serum haptoglobin was significantly reduced after simultaneous local and intraperitoneal application of gentamicin at day 7, 28 and 42 compared with group III

(Ctrl), [9] but not for group I (i.p.) whereas no significant difference between group I and II was found at day 28 and 42. This might demonstrate a transitory systemic effect of intraperitoneal application of gentamicin. Serum haptoglobin was 1.67 ± 0.63 mg/dL for group III (Ctrl) at day 7 reaching 1.66 ± 0.46 mg/dL at day 42 [9] whereas the groups I, II and the sole antibiotic-coated implant group [9] showed more reduction till day 42. The gentamicin coated implant reduced serum haptoglobin from 1.29 ± 0.53 mg/dL day 7 to 0.57 ± 0.23 mg/dL day 42 [9] and the combination therapy reduces the value from 0.88 ± 0.46 mg/dL day 7 to 0.61 ± 0.16 mg/dL day 42 whereas the sole systemic treatment reached 0.81 ± 0.47 mg/dL at day 42. Group II (Combi) showed a significant lower serum haptoglobin from day 7 to 13 compared with group II (i.p.) and antibiotic coating alone revealed 1.29 ± 0.53 mg/dL at day 7 [9] compared with 1.47 ± 1.11 mg/dL for group II (i.p.). From day 7 to day 42 serum haptoglobin in group II (Combi) was significantly different from control but not for group I (i.p.). This might indicate a transitory systemic effect of the localized intramedullary infection which is more attenuated by combination of systemic and local antibiotic treatment compared to systemic application alone. Local antibiotic treatment prevented prevalence of positive blood cultures in contrast to the controls which all showed positive cultures [10] and local infiltration with white blood cells was less in locally antibiotic treatment [2, 6]. Significant reduction of systemic signs of infection (Combi) have been noted supported by the changes in serumhaptoglobin whereas systemic application of antibiotics has been shown to be ineffective to eradicate bacteria on implants in the animal model in several studies [3–5, 26].

Systemic white blood cells increased after 3–7 days post surgery in infected animals and returned to baseline values after day 14 in another study although body weight and temperature did not show differences [16]. Significant differences of relative body weight gain were found between group III (Ctrl) and groups I and II using systemic

gentamicin and combined treatment from 34 days onward in this study however.

Groups I and II of infected animals showed significant different body weight compared with group III (Ctrl) [9] from 34 days onward but no difference between each other. Only one characteristic implant-associated infection under locally applied gentamicin was shown in our previous study while a locally controlled infection was present in all controls [9]. The effectiveness to control and eradicate bacteria from bone marrow cavity and biofilm from implants has been shown in animal models at different anatomic sites using several antibiotics and different numbers of bacteria for inoculation of an artificial infection [1, 26]. Gentamicin microspheres reduced infection rate with *S. aureus* in the rabbit spinal implant model from 75 to 38 % created by titanium rods infected with 10^5 CFU [13]. In the present study even 10^2 CFU were sufficient to create an implant-associated infection and this seemed more realistic, as inoculum counts higher than 100 are unlikely regarding contamination in a standard surgical setting.

Present practice in septic surgery involves the removal of all implants as they may further promote infection, as well as thorough debridement and local and systemic antibacterial treatment [34]. The importance and effectiveness of a systemic antibiotic treatment is not fully understood until now, however it may help to reduce infection rates even further also addressing soft tissue infection [27]. Perioperative single shot antibiotics are thought to reduce local bacterial colonization of all connective tissue and thus reduce the rates of intraoperative contamination of implants and soft tissue [1, 27, 28, 31]. Relatively high concentrations of systemic antibiotics are needed to achieve satisfying tissue levels especially considering treatment of multi resistant bacteria and thus systemic side effects play an important role here [26, 27]. Local delivery might provide very high tissue levels without most of these side effects and thus appears to be beneficial [26] while high antibiotic concentrations might overcome concentration-dependent susceptibility [4]. Severe foreign body reactions and resorption problems have been solved in search for an ideal carrier substance [9]. Several animal studies showed a local antibacterial effect of various antibiotics released from different carrier substances [1, 2, 6, 9–11]. Release kinetics most often depended on the base carrier substance and were usually high within the first 48 h after application [5, 11]. This is of crucial importance, as sustained high local concentrations over a certain time point may result into drug resistant bacterial strains. Peak releases of antibiotics from hydrogel were shown after 2 h and complete release was achieved after 4 days; 80 % thereof within 24 h [10, 11]. Complete release from fibrin sealant took up to

10 days [6] and release from mPEG-PLGA hydrogel took up to 4 weeks to compare dimensions [5]. Release of antibiotic from hydroxyapatite was completed within 48 h up to a couple of days [21–23] and the dose of gentamicin released from bone substitute was higher compared with that from bone cement strongly depending on porosity and implant size [21]. Release kinetics of gentamicin from palmitate showed a peak within the first 24 h and prolonged antibacterial activity for not more than 1 week [24]. This was found beneficial by the authors in search of an ideal carrier substance, as it represented a good compromise between early high concentrations offering a minimum inhibition concentration (MIC) and an average time of sustained release. These considerations are represented by the implant fabricated especially for this study.

As the number of applied bacteria varies considerably between different studies, a comparison of the efficacy of an antibiotic treatment appears to be difficult. Local application of ceftazidime for example decreased CFU isolates by approximately two orders of magnitude as compared to systemic application and a combination of both principles further reduced bacterial colonization while other studies showed no significant difference between systemic and local applications of ceftazidime [2]. PDLLA coated titanium wires loaded with gentamicin controlled bone marrow infection induced with 10^2 CFU of *S. aureus* in rat tibiae [1] and an additional systemic application of gentamicin did not improve these results as compared to the control group [1, 7]. GP showed a comparable effects on bacterial growth in the rat femur in this study as did gentamicin-coated Poly-Lactide in the rat tibia in other ones [1, 7, 16].

Degradation and other properties of carrier influence the release kinetics and the duration of antibacterial effect [26]. The duration of release and degradation of the GP in our study can be varied according to the construction of the carrier and might be adopted to clinical needs. Detailed release kinetics of GP have been reported earlier [9, 24].

Loading of implants with different antibiotics according to clinical requirements and the effectiveness of additional systemic antibiotic therapy with different concentrations needs further consideration in an experimental setting. Larger groups of animals might probably show significant synergistic effects of systemic antibiotic therapy and implant coating. Therefore other animal studies will have to verify these results. The correlation between serum levels of antibiotics and the local concentration in bone also requires further examination as well as the impact of high systemic concentrations of antibiotics due to systemic application as local application alone may already offer a comparable control of bacterial implant colonization.

Conclusion

Systemic perioperative application of gentamicin reduced bacterial colonization of uncoated femur nails in this model of intramedullary infection as compared to negative controls, but did not further boost the antibacterial effect of a local carrier-based application of gentamicin. A synergistic effect of systemic application of gentamicin combined with coating of implants was shown regarding systemic signs of infection.

Acknowledgments The present study was supported by Synthes GmbH, Umkirch, Germany. The authors thank Mr. Guido Schemken and his staff at the Central Animal Housing Facility in Marburg as well as Prof. Dr. Markus Schofer for their kind support in performing this study.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest All authors declare that there is no conflict of interest.

References

- Lucke M, Wildemann B, Sadoni S et al (2005) Systemic versus local application of gentamicin in prophylaxis of implant-related osteomyelitis in a rat model. *Bone* 36:770–778. doi:[10.1016/j.bone.2005.01.008](https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.01.008)
- Cavanaugh DL, Berry J, Yarboro SR, Dahners LE (2009) Better prophylaxis against surgical site infection with local as well as systemic antibiotics. An in vivo study. *J Bone Joint Surg Am* 91:1907–1912. doi:[10.2106/JBJS.G.01237](https://doi.org/10.2106/JBJS.G.01237)
- Ofluoglu EA, Bulent E, Derya AM et al (2012) Efficiency of antibiotic-loaded polymethylmethacrylate rods for treatment of the implant-related infections in rat spine. *J Spinal Disord Tech* 25:E48–E52. doi:[10.1097/BSD.0b013e3182425b93](https://doi.org/10.1097/BSD.0b013e3182425b93)
- Overstreet D, McLaren A, Calara F et al (2015) Local gentamicin delivery from resorbable viscous hydrogels is therapeutically effective. *Clin Orthop Relat Res* 473:337–347. doi:[10.1007/s11999-014-3935-9](https://doi.org/10.1007/s11999-014-3935-9)
- Peng K-T, Chen C-F, Chu I-M et al (2010) Treatment of osteomyelitis with teicoplanin-encapsulated biodegradable thermosensitive hydrogel nanoparticles. *Biomaterials* 31:5227–5236. doi:[10.1016/j.biomaterials.2010.03.027](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.03.027)
- Cashman JD, Jackson JK, Mugabe C et al (2013) The use of tissue sealants to deliver antibiotics to an orthopaedic surgical site with a titanium implant. *J Orthop Sci* 18:165–174. doi:[10.1007/s00776-012-0325-6](https://doi.org/10.1007/s00776-012-0325-6)
- Schmidmaier G, Lucke M, Wildemann B et al (2006) Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review. *Injury* 37(Suppl 2):S105–S112. doi:[10.1016/j.injury.2006.04.016](https://doi.org/10.1016/j.injury.2006.04.016)
- Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S et al (2003) A new model of implant-related osteomyelitis in rats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 67:593–602. doi:[10.1002/jbm.b.10051](https://doi.org/10.1002/jbm.b.10051)
- Fölsch C, Federmann M, Kuehn KD et al (2014) Coating with a novel gentamicinpalmitate formulation prevents implant-associated osteomyelitis induced by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in a rat model. *Int Orthop*. doi:[10.1007/s00264-014-2582-9](https://doi.org/10.1007/s00264-014-2582-9)
- Giavaresi G, Meani E, Sartori M et al (2013) Efficacy of antibacterial-loaded coating in an in vivo model of acutely highly contaminated implant. *Int Orthop* 38:1505–1512. doi:[10.1007/s00264-013-2237-2](https://doi.org/10.1007/s00264-013-2237-2)
- Drago L, Boot W, Dimas K et al (2014) Does implant coating with antibacterial-loaded hydrogel reduce bacterial colonization and biofilm formation in vitro? *Clin Orthop Relat Res* 472:3311–3323. doi:[10.1007/s11999-014-3558-1](https://doi.org/10.1007/s11999-014-3558-1)
- Mader JT, Stevens CM, Stevens JH et al (2002) Treatment of experimental osteomyelitis with a fibrin sealant antibiotic implant. *Clin Orthop Relat Res* 403:58–72
- Stall AC, Becker E, Ludwig SC et al (2009) Reduction of post-operative spinal implant infection using gentamicin microspheres. *Spine (Phila Pa 1976)* 34:479–483. doi:[10.1097/BRS.0b013e318197e96c](https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e318197e96c)
- McLaren A, Giers MB, Fraser J et al (2014) Antimicrobial distribution from local delivery depends on dose: a pilot study with MRI. *Clin Orthop Relat Res* 472:3324–3329. doi:[10.1007/s11999-014-3493-1](https://doi.org/10.1007/s11999-014-3493-1)
- Craig J, Fuchs T, Jenks M et al (2014) Systematic review and meta-analysis of the additional benefit of local prophylactic antibiotic therapy for infection rates in open tibia fractures treated with intramedullary nailing. *Int Orthop* 38:1025–1030. doi:[10.1007/s00264-014-2293-2](https://doi.org/10.1007/s00264-014-2293-2)
- Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S et al (2003) Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats. *Bone* 32:521–531
- Chang Y, Tai C-L, Hsieh P-H, Ueng SWN (2013) Gentamicin in bone cement: a potentially more effective prophylactic measure of infection in joint arthroplasty. *Bone Joint Res* 2:220–226. doi:[10.1302/2046-3758.210.2000188](https://doi.org/10.1302/2046-3758.210.2000188)
- Hallström H, Persson GR, Lindgren S et al (2012) Systemic antibiotics and debridement of peri-implant mucositis. A randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 39:574–581. doi:[10.1111/j.1600-051X.2012.01884.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2012.01884.x)
- Cowan ST, Shaw C, Williams RE (1954) Type strain for *Staphylococcus aureus* Rosenbach. *J Gen Microbiol* 10:174–176
- Giffen PS, Turton J, Andrews CM et al (2003) Markers of experimental acute inflammation in the Wistar Han rat with particular reference to haptoglobin and C-reactive protein. *Arch Toxicol* 77:392–402. doi:[10.1007/s00204-003-0458-7](https://doi.org/10.1007/s00204-003-0458-7)
- Laurent F, Bignon A, Goldnadel J et al (2008) A new concept of gentamicin loaded HAP/TCP bone substitute for prophylactic action: in vitro release validation. *J Mater Sci Mater Med* 19:947–951. doi:[10.1007/s10856-007-0163-9](https://doi.org/10.1007/s10856-007-0163-9)
- Fleiter N, Walter G, Bösebeck H et al (2014) Clinical use and safety of a novel gentamicin-releasing resorbable bone graft substitute in the treatment of osteomyelitis/osteitis. *Bone Joint Res* 3:223–229. doi:[10.1302/2046-3758.37.2000301](https://doi.org/10.1302/2046-3758.37.2000301)
- Viguier E, Bignon A, Laurent F et al (2011) A new concept of gentamicin loaded HAP/TCP bone substitute for prophylactic action: in vivo pharmacokinetic study. *J Mater Sci Mater Med* 22:879–886. doi:[10.1007/s10856-011-4279-6](https://doi.org/10.1007/s10856-011-4279-6)
- Kittinger C, Marth E, Windhager R et al (2011) Antimicrobial activity of gentamicin palmitate against high concentrations of *Staphylococcus aureus*. *J Mater Sci Mater Med* 22:1447–1453. doi:[10.1007/s10856-011-4333-4](https://doi.org/10.1007/s10856-011-4333-4)
- Diefenbeck M, Mückley T, Hofmann GO (2006) Prophylaxis and treatment of implant-related infections by local application of antibiotics. *Injury* 37:S95–S104. doi:[10.1016/j.injury.2006.04.015](https://doi.org/10.1016/j.injury.2006.04.015)
- Bormann N, Schwabe P, Smith MD, Wildemann B (2014) Analysis of parameters influencing the release of antibiotics mixed with bone grafting material using a reliable mixing procedure. *Bone* 59:162–172
- Liu C, Kakis A, Nichols A, Ries MD, Vail TP, Bozic KJ (2014) Targeted use of vancomycin as perioperative prophylaxis reduces periprosthetic joint infection in revision TKA. *Clin Orthop Relat Res* 472:227–231

28. Kapadia BH, Berg RA, Daley JA, Fritz J, Bhave A, Mont MA (2016) Periprosthetic joint infection. *Lancet* 387(10016):386–394
29. Jiranek WA, Waligora AC, Hess SR, Golladay GL (2015) Surgical treatment of prosthetic joint infections of the hip and knee: changing paradigms? *J Arthroplasty* 30:912–918
30. Alijanipour P, Heller S, Parvizi J (2014) Prevention of periprosthetic joint infection: what are the effective strategies? *J Knee Surg* 27:251–258
31. Thelwall S, Harrington P, Sheridan E, Lamagni T (2015) Impact of obesity on the risk of wound infection following surgery: results from a nationwide prospective multicentre cohort study in England. *Clin Microbiol Infect.* doi:[10.1016/j.cmi.2015.07.003](https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.07.003)
32. Shahi A, Parvizi J (2015) Prevention of periprosthetic joint infection. *Arch Bone Jt Surg* 3:72–81
33. Mortazavi SM, Vegari D, Ho A, Zmistowski B, Parvizi J (2011) Two-stage exchange arthroplasty for infected total knee arthroplasty: predictors of failure. *Clin Orthop Relat Res* 469:3049–3054
34. Parvizi J, Gehrke T, Chen AF (2013) Proceedings of the international consensus on periprosthetic joint infection. *Bone Joint J* 95:1450–1452

3.7. Lyophilisiertes allogenes Knochengewebe als Trägersubstanz für Antibiotika

Einleitung

Die Freisetzungskinetik verschiedener Antibiotika von Trägersubstanzen variiert zwischen einigen Stunden bis zu 10 Tagen [191,203,208-210] und wird maßgeblich von der Trägersubstanz bestimmt [153,180,192,200,201,207,211-213]. Eine Vielzahl von Tiermodellen konnte die Wirksamkeit unterschiedlicher Antibiotika auf verschiedenen Trägersubstanzen nachweisen [108,121,180,195,200,206,207]. Hydrogel setzt 100% des Antibiotikums frei und führt zu primär höherer Freisetzung als aus PMMA-Zement [118]. Die lokale Applikation von Antibiotika kann Konzentrationen bis zu 1000fach über der systemischen Therapie erreichen [178] mit möglichen negativem Einfluss auf die Osteoblastenfunktion [207]. Diese erheblichen lokalen Konzentrationen können erforderlich sein, um Bakterien im Biofilm und multiresistente Bakterien erfolgreich zu bekämpfen [34,95,214]. Zudem ist ein rascher Wirkungseintritt mit unmittelbarer Freisetzung des Antibiotikums zur Vermeidung einer bakteriellen Besiedlung von Implantaten und der möglichen Ausbildung von Biofilm wesentlich [107,214]. Gleichzeitig ist aber auch eine prolongierte Freisetzung des Antibiotikums erforderlich, um ein potenziell infiziertes Knochenlager nach chirurgischen Debridement auch medikamentös erfolgreich zu therapieren [108,177,178]. Die Auffüllung von Knochendefekten bei Revisionseingriffen von Endoprothesen erfordert eine ossär integrierbare Trägersubstanz mit ausreichender Primärstabilität. Deshalb ist die Elutionskinetik verschiedener Antibiotika aus humanem allogenen spongiösen Knochen sowie weiteren Knochenersatzstoffen als Trägersubstanzen von Interesse.

Methode

Es wurde die Freisetzungskinetik von Antibiotika aus humanem allogenen lyophilisierten Knochenersatzmaterial sowie aus nativer Spongiosa, entnommen aus humanen Femurköpfen von Lebendspendern, untersucht. Die angefertigten Knochenchips wurden mit Gentamicinsulfat, Gentamicinpalmitat und Vancomycin gemischt. Alternativ wurde die Freisetzung von Gentamicinsulfat und Vancomycin aus einem Gemisch von Calciumcarbonat und Calciumsulfat

getestet. Die Trägersubstanzen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Antibiotika beladen und als Vergleichsmaterial wurde auch PMMA-Zement untersucht. Die antibakterielle Wirkung auf drei verschiedene Bakterienstämme wurde untersucht. Die Mikroorganismen *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* ACC 29213 sowie der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* MRSA DSM 46320 kamen zur Anwendung. Die Konzentration der Antibiotika wurde mit einem konventionellen mikrobiologischen Agar-Diffusions-Assay bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mit „Two-Way-ANOVA“ und „Bonferroni’s multiple comparison test“ für die Berechnungen der Elutionskonzentrationen sowie mit dem „One-Way-ANOVA“ mit „Bonferroni’s multiple comparison test“ zur Beurteilung der kumulativen Differenzen und Beeinträchtigungen der Mikroorganismen. Weitere statistische Berechnungen erfolgten mit dem parametrischen t-Test mit Signifikanzniveau $p < 0.05$ und SPSS.

Ergebnis

Die höhere Konzentration von 6.4% Gentamicinsulfat und Gentamicinpalmitat zeigte im Vergleich zu den Konzentrationen 1.6% und 3.2% signifikant höhere Elutionsraten aus der nativen Spongiosa wobei die höchste Freisetzung bis zum 5. Tag erfolgte. Entsprechend war auch bei PMMA bis zum 5. Tag eine signifikante Elution erkennbar. Die Freisetzung der Antibiotika aus dem lyophilisierten Knochen folgte ebenso dem Konzentrationsgefälle. Auch die Mischung der Spongiosa mit dem Gemisch aus Calciumcarbonat und Calciumsulfat, beladen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Gentamicin und Vancomycin, folgte einer konzentrationsabhängigen Freisetzungskinetik wobei die höchste Elution am 3. und 4. Tag zu verzeichnen war. Die antibakterielle Wirkung von nativer und lyophilisierter Spongiosa, beladen mit Gentamicinsulfat und Gentamicinpalmitat, zeigte sich signifikant besser als die Freisetzung aus dem Gemisch aus Calciumcarbonat und Calciumsulfat ($p < 0.05$). Die Hemmung der Bakterien durch Gentamicin zeigte sich konzentrationsabhängig und PMMA-Zement wies eine vergleichbare Wirkung auf. Die antibakterielle Vancomycinwirkung fiel deutlich schneller ab. Nach 14 Tagen führte die Freisetzung von Gentamicin aus der lyophilisierten humanen Spongiosa noch zu einer Inhibitionszone von 2 cm gegen *Staphylococcus aureus* und MRSA.

Diskussion

Die erfolgreiche Anwendung impaktierten allogenen Knochens wurde in Verbindung mit verschiedenen Antibiotika beschrieben [194,213,215,216] und nur Frühinfektionen von orthopädischen Implantaten konnten erfolgreich mit systemischer antibiotischer Therapie behandelt werden [175,214]. Verschiedene in vitro Studien zeigten die suffiziente Freisetzung von Antibiotika aus Knochentransplantaten [217-220] und PMMA-Zement zeigte in unserer Untersuchung eine maximale Freisetzung des Antibiotikums am 2. Tag. Nachteile von Zement sind die limitierte Freisetzung des Antibiotikums aus dem Zementkörper sowie die möglicherweise notwendige chirurgische Entfernung des Zementes und die fehlende Kompatibilität von PMMA mit verschiedenen Antibiotika [208]. Die Freisetzungskinetik von lyophilisiertem spongiösen allogenen Knochen unterschied sich nicht vom nativen Knochen. Dies lässt auf die Relevanz der Mikrostruktur für die Kinetik schließen [212]. Eine initial hohe Freisetzung von Antibiotika aus spongiösen Knochen wurde auch für andere Knochen-Präparate berichtet [194,212,216,221]. Innerhalb von 2 Tagen erfolgte eine Freisetzung von Gentamicin aus humaner demineralisierter Matrix von bis zu 78% unabhängig von der gewählten Konzentration mit Inhibition der Bakterien in vitro bis zum 12. Tag bei Erhalt der osteoinduktiven Wirkung [204]. Die Kombination der Beschichtung aus Gentamicinsulfat und Gentamicinpalmitat führte zu einer hohen initialen sowie prolongierten Freisetzung. Die Kinetik von Gentamicinpalmitat zeigte einen raschen Wirkungseintritt und eine Wirkungsdauer von 1 Woche [100,108] und Gentamicin zeigte im Gegensatz zu Cefazolin eine überlegene lokale Wirksamkeit [222]. Die lyophilisierten und nativen Spongiosapräparate zeigten in der vorliegenden Untersuchung die höchste Freisetzung von Gentamicin bis zum dritten Tag in Abhängigkeit von der primären Konzentration. Die Freisetzung von Gentamicin zeigte sich initial im Vergleich höher als für Vancomycin und die weniger porösen Trägersubstanzen PMMA und Calciumcarbonat/Calciumsulfat wiesen eine im Vergleich zu den Knochenchips verzögerte Freisetzung und kürzere antimikrobiell wirksame Freisetzung bis zum zehnten Tag auf [99]. Die kumulative Wirkung allogener lyophilisierter und nativer Spongiosa beladen mit Gentamicinsulfat und Gentamicinpalmitat gegen *S. aureus* und MRSA zeigte sich besser als mit Beimischung synthetischer Bestandteile mit höherer Dichte. Die nativen allogenen Knochenpräparate wiesen keine relevante Differenz gegenüber den lyophilisierten

humanen Knochenproben mit antimikrobieller Wirkung bis zum vierzehnten Tag auf. Der lyophilisierte allogene Knochen und die native Spongiosa, beladen mit Gentamicinpalmitat und Gentamicinsulfat, wiesen gegenüber *S. aureus* sowie MRSA die größten Inhibitionszonen auf. Die Konzentration wäre innerhalb der ersten Woche ausreichend die bakterielle Besiedlung eines Implantates zu verhindern. Höhere Antibiotikakonzentrationen würden die Wirkung entsprechend verlängern und intensivieren. Der allogene lyophilisierte Knochen und der native humane spongiöse Knochen weisen eine vergleichbare Elutionskinetik für Antibiotika auf und die Beschichtung mit Gentamicinsulfat und Gentamicinpalmitat gewährleistet eine unmittelbare Freisetzung und ausreichende Wirkspiegel im gesamten Beobachtungszeitraum.

Fazit

Die Freisetzung von Gentamicin aus nativem und lyophilisiertem humanen spongiösen Knochen ist geeignet, initial und prolongiert für 2 Wochen eine ausreichend antibakterielle Wirkung zu gewährleisten. Es werden frühzeitig höhere Antibiotikumkonzentrationen als aus PMMA-Zement abgegeben. Allogener humaner spongiöser Knochen erscheint als Trägersubstanz für Antibiotika geeignet.

Lyophilized allogeneic bone tissue as an antibiotic carrier

Débora C. Coraça-Huber · Christoph G. Ammann · Michael Nogler · Manfred Fille · Lars Frommelt · Klaus-Dieter Kühn · Christian Fölsch

Received: 11 May 2016 / Accepted: 1 September 2016
© The Author(s) 2016. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract The rising number of primary joint replacements worldwide causes an increase of revision surgery of endoprostheses due bacterial infection. Revision surgery using non-cemented implants seems beneficial for the long-term outcome and the use of antibiotic-impregnated bone grafts might control the infection and give a good support for the implant. In this study we evaluated the release of antibiotics from fresh-frozen and lyophilized allogeneic bone grafts. Lyophilized bone chips and fresh frozen bone chips were mixed with gentamicin sulphate, gentamicin palmitate, vancomycin, calcium carbonate/calcium sulphate impregnated with gentamicin sulphate, and calcium carbonate/calcium sulphate bone substitute material impregnated with vancomycin. The efficacy of each preparation was measured by drug release tests and bacterial susceptibility using *B. subtilis*, *S. aureus*

and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The release of gentamicin from lyophilized bone was similar to the release rate from fresh frozen bone during all the experimental time. That fact might be related to the similar porosity and microstructure of the bone chips. The release of gentamicin from lyophilized and fresh frozen bone was high in the first and second day, decreasing and keeping a low rate until the end of the second week. Depending on the surgical strategy either polymethylmethacrylate or allogeneic bone are able to deliver sufficient concentrations of gentamicin to achieve bacterial inhibition within two weeks after surgery. In case of uncemented revision of joint replacements allogeneic bone is able to deliver therapeutic doses of gentamicin and peak levels immediately after implantation during a fortnight. The use of lyophilized and fresh frozen bone

D. C. Coraça-Huber (✉) · C. G. Ammann · M. Nogler
Experimental Orthopaedics, Department of Orthopaedic
Surgery, Medical University of Innsbruck, Innrain 36,
6020 Innsbruck, Austria
e-mail: debora.coraca-huber@i-med.ac.at

M. Fille
Division of Hygiene and Medical Microbiology, Medical
University Innsbruck, Schöpfstr. 41, 3rd Floor, Innsbruck,
Austria

L. Frommelt
Institute for Infectiology, Clinical Microbiology and
Hospital Care, ENDO Clinic Hamburg, Holstenstraße 2,
Hamburg, Germany

K.-D. Kühn
Department of Orthopaedics and Orthopaedic Surgery,
Medical University Graz, Auenbruggerplatz 5, Graz,
Austria

C. Fölsch
Department of Orthopaedics and Orthopaedic Surgery,
Medical University of Giessen, Baldingerstraße, Marburg,
Germany

allografts as antibiotic carriers is recommended for prophylaxis of bone infection.

Keywords Bone grafts · Antibiotics · Lyophilized bone chips · Local delivery · Joint infection

Introduction

Bone grafts are used for reconstructing bone defects caused by implant associated complications, trauma and tumors (Putzer et al. 2011; Hinsenkamp et al. 2012). While autografts can be used, donor site morbidity can be avoided using allografts. (Barbour and King 2003; Butler et al. 2005; Haimi et al. 2008). Bone grafts might derive from post mortem donors or might be donated from femoral heads of living patients undergoing hip arthroplasty creating bone chips to fill bone defects during revision surgery of joint replacements since impaction bone grafting increases primary stability and bone stock which is essential for the longevity of the implant.

However, fresh frozen bone chips bear a higher risk of transmission of diseases and local contamination compared with processed bone grafts (Brewster et al. 1999; Hofmann et al. 2005). Surgery with bone allografts is complex and time-consuming; therefore it is per se prone to a higher infection rate (2.0–2.5 %) (Blom et al. 2003; Parvizi et al. 2007, 2008). Additionally, the impaction used for placing bone transplants can disrupts the local circulation and reduce the bone ingrowth (Tagil and Aspenberg 1998; Duffy et al. 2007; Buttaro et al. 2012; Ding et al. 2015). In the case of a site infection, systemically administered antibiotics cannot reach the infected bone graft (Isefuku et al. 2003). As a known complication factor, biofilms can be formed on the surface of foreign materials thus increasing antibiotic resistance (Coraça-Huber et al. 2012a, b). *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* are the germs which mostly colonize implant surfaces (Christensen et al. 1989).

The number of infection related to multi resistant bacteria is increasing (Ascherl 2010). Also, biofilm forming bacteria is a major concern for treatment of implant-related infections (Costerton et al. 1999; Patel 2005; Frommelt 2006; Esteban et al. 2010; Coraça-Huber et al. 2012a). Biofilm has been defined as

multicellular community composed of prokaryotic and or eukaryotic cells embedded in matrix (Frommelt 2004; Esteban et al. 2010). In this case, sessile bacteria become antibiotic-resistant making treatment and diagnosis difficult (Patel 2005). Antibiotic treatment are directed against planktonic bacteria which relieves symptoms but does not cure the infection and therefore might delay adequate treatment (Frommelt 2006). High antibiotic concentrations at the implantation site, immediately available after surgery, should prevent development of biofilm.

Antibiotics delivered from an implanted biomaterial can be potentially used to prevent infections caused by biofilm formation, providing high concentrations of antibiotics at the surgical site without local or systemic toxicity. In addition, these materials should be osteoconductive and osteoinductive, thus supporting bone healing without further surgery (Saraf et al. 2010). Promising results have been achieved using bone substitutes or bone grafts mixed with bone substitutes and antibiotics. Among a broad variety of materials, calcium sulphate and calcium carbonate beads proved to be a suitable osteoconductive material for bone reconstruction (Wichelhaus et al. 2001; Evaniew et al. 2013; Roberts et al. 2013; Coraça-Huber et al. 2015).

Gentamicin sulphate (GS) salt is commonly used antibiotic for local application in orthopaedic surgery, for example mixed with PMMA cements. Gentamicin base (GB) consists of a mixture of gentamicin C1, C1a and C2 a + b. Gentamicin sulphate is highly water soluble. This substance can be used as a coating material for biomaterials and tissues by turning the water-soluble GS into a low-soluble gentamicin fatty acid salt (converting gentamicin sulphate to gentamicin palmitate; GP) (Kühn et al. 2003; Kuhn et al. 2008; Coraça-Huber et al. 2013a, b). Herafill[®] powder is used in the composition of bioabsorbable beads and is composed of calcium sulphate, calcium carbonate and glycerine tripalmitate as bonding additive. It contains 1 % of GS corresponding to 2.5 g of GB. Herafill[®] is also manufactured as granules to be used as a bone void filling material as well as an antibiotic carrier (Coraça-Huber et al. 2014).

In this study we evaluated two different preparations of femoral heads allografts as antibiotic carrier. Lyophilized bone chips and fresh frozen bone chips were mixed with gentamicin sulphate, gentamicin palmitate, vancomycin, calcium carbonate/calcium

sulphate impregnated with gentamicin sulphate, and calcium carbonate/calcium sulphate bone substitute material impregnated with vancomycin. The efficacy of each preparation was measured by drug release tests and bacterial susceptibility using *B. subtilis*, *S. aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Materials and methods

Bone tissue

Different preparation of femoral heads allografts obtained from living donors (telos GmbH, Marburg, Germany and Tissue Bank, Charité–Medical University Berlin, Berlin, Germany) were used as antibiotic carrier. Two different preparations were tested: lyophilized bone chips (BChT) and fresh frozen bone chips (FF-BChT). All patients gave their written consent that the removed tissue was allowed to be used for research purposes.

Antibiotic and reference substances

Gentamicin sulphate (GS), gentamicin palmitate (GP), vancomycin (V), calcium carbonate/calcium sulphate bone substitute material impregnated with 5 and 10 % gentamicin sulphate (HeraG; Herafill[®]) and calcium carbonate/calcium sulphate bone substitute material impregnated with 5 and 10 % vancomycin hydrochloride (HeraV; Herafill[®]) were used in this study. Polymethylmethacrylate beads impregnated with gentamicin sulfate (Heraeus PMMA Chain G30, Heraeus Medical GmbH, Wehrheim, Germany; approximately 4.5 mg gentamicin per bead) and calcium carbonate/calcium sulfate bone substitute beads impregnated with gentamicin sulfate (Herafill[®] beads G[®], Heraeus Medical GmbH, Wehrheim, Germany; 2.5 mg gentamicin per bead) were used as reference materials. Also, FF-BChT (telos GmbH, Marburg, Germany and Tissue Bank, Charité–Medical University Berlin, Berlin, Germany) samples were used as reference materials.

Microorganisms

Bacillus subtilis (Merck KGaA, Germany in Test Agar pH 8.0 Merck KGaA, Germany), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (American Type Culture Collection, LGC Standards GmbH, Wesel, Germany) and

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* MRSA DSM 46320 (Leibniz Institute DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen—German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany) were used for antibiotic delivery and antibiotic susceptibility assays.

Gentamicin base release

To evaluate the release rate of antibiotics from allografts, the BChT samples were mixed with GS, GS + GP, V, HeraG, HeraV. The exactly concentration of each mixtures is detailed on Table 1. The antibiotic release assay was carried out using phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Germany). For that, 3 ml of PBS were added into each tube containing 1 cm³ of each BChT mixture. The tubes were vortexed for 1 min and placed on a shaker at 37 °C. Daily, from 1 to 14 days, the elution medium was completely removed and fresh PBS was added. The removed elution was vortexed and stored at −20 °C until the tests.

Bacillus subtilis assay for estimation of antibiotic release concentrations

Concentrations of the delivered antibiotic in the elution were determined by a conventional microbiological agar diffusion assay using *Bacillus subtilis* as the indicator strain already described by Coraça-Huber et al. (2015). Using a 6-mm diameter metal punch, a hole was made at the center of each *B. subtilis* agar plate into which 100 µL of each collected elution or 100 µL of 10-fold dilutions of each standard concentration was added. The plates containing the samples were incubated at 37 °C for 24 h. After the incubation, the diameter of the zones of inhibition in centimeters (cm) was measured for each plate with a ruler. The diameter was confirmed with a second measurement. The size of punched area was subtracted for the final measurement. The standard curve was obtained by logarithmic regression and used to predict the concentration of GB in each elution. This assay was carried out in triplicate.

Staphylococcus aureus and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* susceptibility tests

Staphylococcus aureus ATCC 29213 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* MRSA DSM 46320

Table 1 Mixtures used for antibiotic delivery tests

Mixtures used for the antibiotic delivery assay	
Test groups	Concentration mixtures
BChT + GS/GP (1.6 % GB)	1 g BChT + 0.016 g GB (0.014 g GS) + 0.016 g GB (0.04 g GP)
BChT + GS/GP (3.2 % GB)	1 g BChT + 0.032 g GB (0.028 g GS) + 0.032 g GB (0.08 g GP)
BChT + GS/GP (6.4 % GB)	1 g BChT + 0.064 g GB (0.056 g GS) + 0.064 g GB (0.16 g GP)
BChT + HeraG 10 % (1.6 %GB)	1 g BChT + 0.016 GB (0.16 g GS)
BChT + HeraG 10 % (3.2 %GB)	1 g BChT + 0.032 GB (0.32 g GS)
BChT + HeraG 10 % (6.4 %GB)	1 g BChT + 0.064 GB (0.64 g GS)
BChT + HeraG 5 % (6.4 %GB)	1 g BChT + 0.064 (1.28 g GS)
BChT + HeraV 10 % (2 %VB)	1 g BChT + 0.02 g VB (0.2 g V)
BChT + HeraV 10 % (4 %VB)	1 g BChT + 0.04 g VB (0.4 g V)
BChT + HeraV 10 % (8 %VB)	1 g BChT + 0.08 g VB (0.8 g V)
BChT + HeraV 5 % (8 %VB)	1 g BChT + 0.08 g VB (1.6 g V)
Reference groups	Concentration mixtures
BChT + GS	1 g BChT + 1 mL (gentamicin 1 mg/mL) (Witso et al. 2005)
BChT + V	1 g BChT + 1 mL (vancomycin 1 mg/mL) (Witso et al. 2005)
PMMA beads	≈ 1 g gentamicin sulfate/bead
Herafill beads	2.5 mg gentamicin sulfate/bead
FF-BChT + GS + GP (1.6 % GB)	1 g FF-BChT + 0.016 g GB (0.014 g GS) + 0.016 g GB (0.04 g GP)
FF-BChT + GS/GP (3.2 % GB)	1 g FF-BChT + 0.032 g GB(0.028 g GS) + 0.032 g GB (0.08 g GP)
FF-BChT + GS/GP + (6.4 % GB)	1gFF-BChT + 0.064 g GB(0.056 g GS) + 0.064 g GB (0.16 g GP)

Test groups: lyophilized bone chips mixed with gentamicin sulfate and gentamicin palmitate powder (BChT + GS/GP); gentamicin base powder (GB); lyophilized bone chips mixed with calcium carbonate/calcium sulphate impregnated with gentamicin sulphate powder (BChT + HeraG); lyophilized bone chips mixed with calcium carbonate/calcium sulphate granulate impregnated with vancomycin (BChT + HeraV); Reference groups: lyophilized bone chips impregnated with gentamicin sulphate by immersion (BChT + GS) (Witso et al. 2005); lyophilized bone chips impregnated with vancomycin by immersion (BChT + V) (Witso et al. 2005) polymethylmethacrylate beads impregnated with gentamicin sulfate (PMMA beads); calcium carbonate/calcium sulfate bone substitute beads impregnated with gentamicin sulfate (Herafill beads); fresh frozen bone chips mixed with gentamicin sulfate and gentamicin palmitate (FF-BChT + GS/GP). The mixtures were kept for 24 h prior de addition of PBS for the elution tests

suspensions at 2×10^5 cells (0.5 McFarland) were prepared and 10 μ L were inoculated using Müller-Hinton agar plates. With a 6-mm diameter metal punch, a hole was made on the center of each plate where 100 μ L of each sample was added. The plates were incubated at 37 °C for 24 h. After 24 h, the zones of inhibition were measured on each plate with a ruler. The diameter was confirmed with a second measurement. The size of the punched area was subtracted for the final measurement. These tests were carried out in triplicate.

Statistical analysis

Statistical evaluation was carried out to detect differences between the delivery rate and susceptibility tests between the samples tested. To evaluate the

differences between the samples taking into consideration the elution concentration along the time Two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test was applied. To detect the cumulative differences and susceptibility of microorganisms between the mixtures One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test was carried out.

Results

Bacillus subtilis assay for estimation of antibiotic release concentrations

Taking into consideration the release of antibiotics from the BChT and PMMA and Herafill beads we

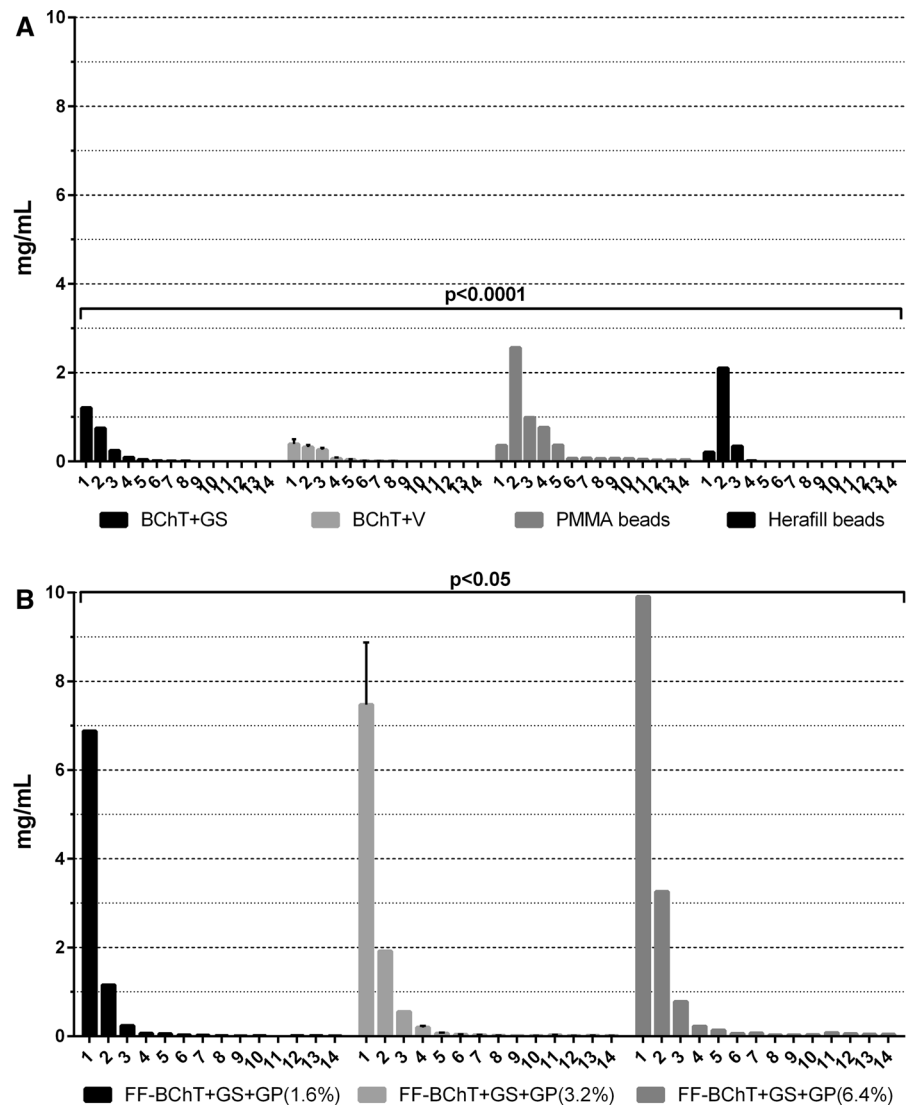
could observe that the BChT + GS and PMMA beads showed a significant higher delivery rate in comparison with BChT + V and Herafill beads. PMMA beads were the only material that allowed delivery of antibiotic at least until the 14th day. However, the significant release was observed only until the 5th day ($p < 0.0001$; Fig. 1a). The antibiotic delivery rate from fresh frozen samples followed the concentration of GS + GP from each group where FF-BChT + GS + GP 6.4 % showed significant higher concentration in comparison with FF-BChT + GS + GP 1.6 and 3.2 %. The highest concentration were detected until the 5th day of elution ($p < 0.05$; Fig. 1b). The antibiotic concentration in the elution of BChT + GS + GP also followed the mixture concentration. Here BChT + GS + GP 6.4 % showed higher antibiotic release when compared to BChT + GS + GP 1.6 and 3.2 %. The highest delivery was detected only until the 3rd elution day ($p < 0.001$; Fig. 2a). The antibiotic delivery from the BChT mixed with HeraG also followed the concentration of the mixtures made prior the elution tests. Here BChT + HeraG 10 % (6.4 %GB) and BChT + HeraG 5 % (6.4 %GB) showed no significant differences between the concentrations of antibiotic released. The two groups showed the highest levels of antibiotic being released until the 4th elution day. Although, BChT + HeraG 10 % (6.4 %GB) and BChT + HeraG 5 % (6.4 %GB) delivery significant different concentration ($p < 0.05$) of the antibiotic in comparison to BChT + HeraG 10 % (1.6 %GB) and BChT + HeraG 10 % (3.2 %GB). In these two groups the highest delivery was detected until the 2nd elution day (Fig. 2b). A similar pathway could be observed between the groups of BChT mixed with HeraV. Here BChT + HeraV (8 %VB) and BChT + HeraV 5 % (8 % VB) showed very high concentration release in comparison with BChT + HeraV 10 % (2 % VB) and BChT + HeraV 10 % (4 % VB). However BChT + HeraV 10 % (8 % VB) showed significant higher delivery ($p < 0.05$) in comparison with BChT + HeraV 10 % (2 % VB) and in comparison with BChT + HeraV 10 % (2 % VB) and BChT + HeraV 10 % (4 % VB; $p < 0.0001$). Also here, the highest delivery rate was detected until the 3rd and 4th elution day (Fig. 2c).

Staphylococcus aureus and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* susceptibility tests

Here we calculated the cumulative values from all time intervals to show the mixture with better antibacterial effect. Within the group of reference samples, against *S. aureus*, the best activity was observed by PMMA beads and all the FF-BChT + GS + GP. Also BChT + GS showed high efficacy. These mixtures showed significant higher activity ($p < 0.05$) in comparison with the other mixtures. BChT + V and Herafill beads showed less activity and no significant difference between each other (Fig. 3a). Similar results were obtained with the samples tested against MRSA (Fig. 3b). The cumulative results for the susceptibility tests against *S. aureus* and MRSA for the BChT mixed with GS + GP, HeraG and HeraV, showed that the activity of BChT mixed with GS + GP was significantly higher in comparison with BChT mixed with HeraG and HeraV ($p < 0.05$; Fig. 4a, b). Besides the cumulative results for the susceptibility tests against *S. aureus* and MRSA, the measurement of the zone of inhibition is also presented for each time interval. In the reference groups we can also observe the highest efficacy of PMMA beads and BChT + GS against *S. aureus* and MRSA in comparison with BChT + V and Herafill beads (Fig. 5a, b). For the fresh frozen samples, besides the difference in antibiotic concentration, the three groups (FF + BChT + GS + GP 1.6 %, FF + BChT + GS + GP 3.2 %, FF + BChT + GS + GP 6.4 %) showed similar effect against the microorganisms showing its activity until the 14th elution day (Fig. 5c, d). For the samples of the test group, the mixture that most efficiently delivered the antibiotic substances until the last day was BChT + GS + GP, for all concentration of gentamicin base used. Here we can see that even at the last day, all the concentration reached a zone of inhibition of approximately 2 cm. The efficiency of BChT + GS + GP was similar against *S. aureus* and MRSA. The mixtures of BChT with HeraG showed high antimicrobial activity until the end of the first week for *S. aureus* and MRSA. The mixture of BChT with HeraV showed less activity against the microorganisms in comparison with BChT +

Fig. 1 Reference groups: antibiotic release concentrations obtained from *Bacillus subtilis* assay.

a Lyophilized bone chips impregnated with gentamicin sulphate by immersion (1 mg/mL; BChT + GS); lyophilized bone chips impregnated with vancomycin sulphate by immersion (1 mg/mL; BChT + V) polymethylmethacrylate beads impregnated with gentamicin sulfate (PMMA beads); calcium carbonate/calcium sulfate bone substitute beads impregnated with gentamicin sulfate (Herafill beads); **b** fresh-frozen bone fragments mixed with gentamicin sulfate and gentamicin palmitate 1.6 % of gentamicin base (FF-BChT + GS + GP 1.6 %); fresh-frozen bone fragments mixed with gentamicin sulfate and gentamicin palmitate 3.2 % of gentamicin base (FF-BChT + GS + GP 3.2 %); fresh-frozen bone fragments mixed with gentamicin sulfate and gentamicin palmitate 6.4 % of gentamicin base (FF + BChT + GS + GP 6.4 %)



GS + GP, however, this activity could be observed until the 10th elution day (Fig. 6).

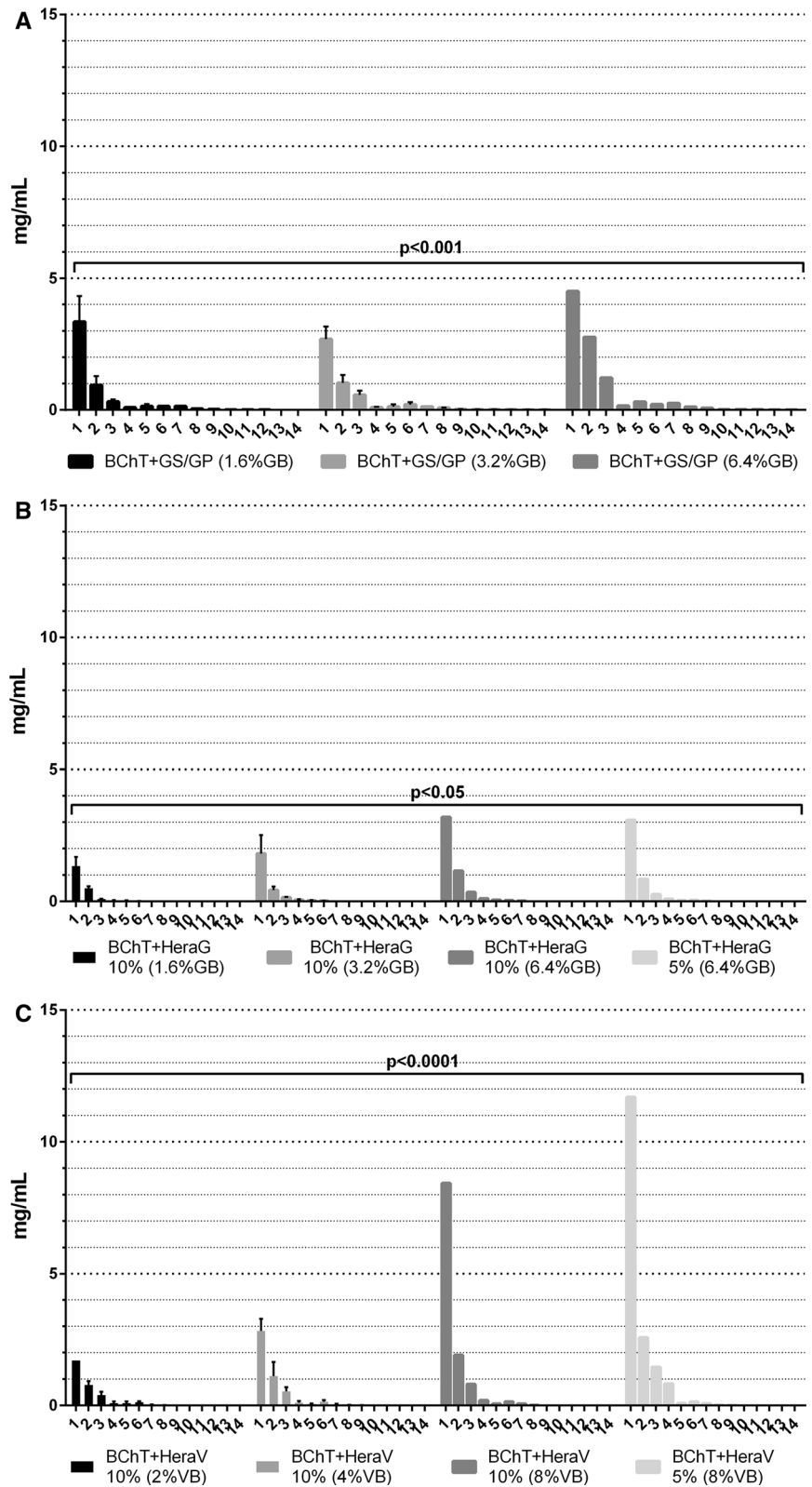
Discussion

Once an infection is established, the removal of implanted devices is necessary for a proper treatment (Zimmerli et al. 2004; Frommelt 2006). Biomaterial-mediated infections are resistant to antibiotic treatment even at high doses (Gristina 1987). Only early infections might be managed with systemic antibiotic therapy (Zimmerli et al. 2004; Frommelt 2006). Surgical debridement removing all suspicious tissue

is essential to achieve control of infection and good long-term results (Frommelt 2006). Early detection of infection and aggressive treatment has a high eradication rate since only 64 % of all infections occurred within the first 12 months of primary surgery (Phillips et al. 2006).

In this study we evaluated two different preparations of femoral heads allografts as antibiotic carrier. Lyophilized and fresh frozen bone chips. Lyophilisation of bone allografts can be conducted under complete screening of donors, does not use any chemical agents for preparation and can help decrease the contaminants. The lyophilisation process of bone causes only a small reduction of pull-out force which

Fig. 2 Test groups: antibiotic release concentrations obtained from *Bacillus subtilis* assay. **a** Lyophilized bone chips mixed with gentamicin sulfate and gentamicin palmitate 1.6 % of gentamicin base (BChT + GS + GP 1.6 %); lyophilized bone chips mixed with gentamicin sulfate and gentamicin palmitate 3.2 % of gentamicin base (BChT + GS + GP 3.2 %); lyophilized bone chips mixed with gentamicin sulfate and gentamicin palmitate 6.4 % of gentamicin base (BChT + GS + GP 6.4 %); **b** lyophilized bone chips mixed with HerafillG 10 % with 1.6 % gentamicin base (BChT + HeraG 10 %—1.6 %GB); lyophilized bone chips mixed with HerafillG 10 % with 3.2 % gentamicin base (BChT + HeraG 10 %—3.2 %GB); lyophilized bone chips mixed with HerafillG 10 % with 6.4 % gentamicin base (BChT + HeraG 10 %—6.4 %GB); lyophilized bone chips mixed with HerafillG 5 % with 6.4 % gentamicin base (BChT + HeraG 5 %—6.4 %GB); **c** lyophilized bone chips mixed with HerafillV 10 % with 2 % vancomycin base (BChT + HeraV 10 %—2 %VB); lyophilized bone chips mixed with Herafill V 10 % with 4 % vancomycin base (BChT + HeraV 10 %—4 %VB); lyophilized bone chips mixed with HerafillV 10 % with 8 % vancomycin base (BChT + HeraV 10 %—8 %VB); lyophilized bone chips mixed with HerafillV 5 % with 8 % vancomycin base (BChT + HeraV 5 %—8 %VB)



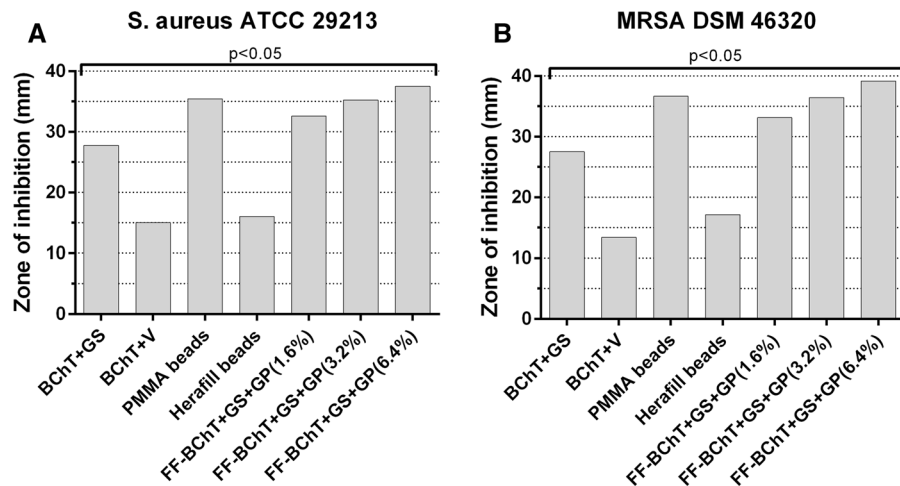


Fig. 3 Cumulative results for susceptibility tests of antibiotic released against **a** *S. aureus* ATCC 29213 and **b** MRSA DSM 46320. Reference groups: Lyophilized bone chips impregnated with gentamicin sulphate by immersion (1 mg/mL; BChT + GS); lyophilized bone chips impregnated with vancomycin sulphate by immersion (1 mg/mL; BChT + V) polymethylmethacrylate beads impregnated with gentamicin sulfate (PMMA beads); calcium carbonate/calcium sulfate bone substitute beads impregnated with gentamicin sulfate (Herafill

beads); fresh-frozen bone fragments mixed with gentamicin sulfate and gentamicin palmitate 1.6 % of gentamicin base (FF-BChT + GS + GP 1.6 %); fresh-frozen bone fragments mixed with gentamicin sulfate and gentamicin palmitate 3.2 % of gentamicin base (FF-BChT + GS + GP 3.2 %); fresh-frozen bone fragments mixed with gentamicin sulfate and gentamicin palmitate 6.4 % of gentamicin base (FF + BChT + GS + GP 6.4 %)

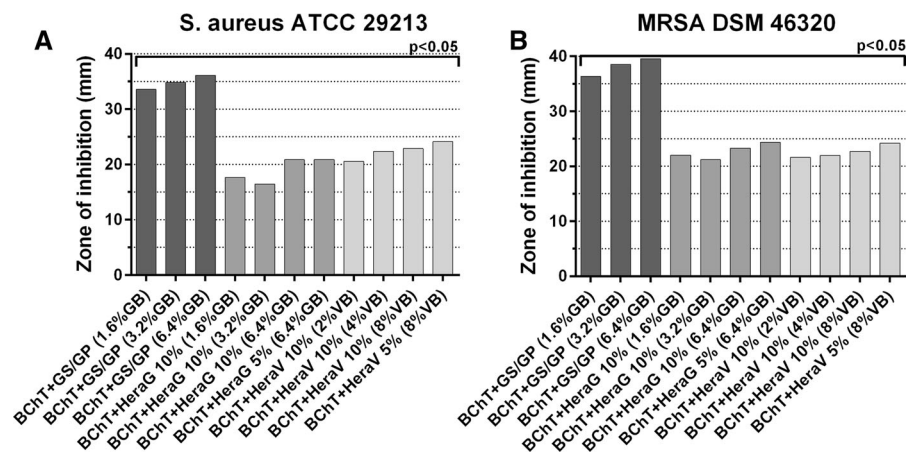


Fig. 4 Cumulative results for susceptibility tests of antibiotic released against **a** *S. aureus* ATCC 29213 and **b** MRSA DSM 46320. Test groups: lyophilized bone chips mixed with gentamicin sulfate and gentamicin palmitate 1.6 % of gentamicin base (BChT + GS + GP 1.6 %); lyophilized bone chips mixed with gentamicin sulfate and gentamicin palmitate 3.2 % of gentamicin base (BChT + GS + GP 3.2 %); lyophilized bone chips mixed with gentamicin sulfate and gentamicin palmitate 6.4 % of gentamicin base (BChT + GS + GP 6.4 %); lyophilized bone chips mixed with HerafillG 10 % with 1.6 % gentamicin base (BChT + HeraG 10 %—1.6 %GB); lyophilized bone chips mixed with HerafillG 10 % with 3.2 % gentamicin base (BChT + HeraG 10 %—

3.2 %GB); lyophilized bone chips mixed with HerafillG 10 % with 6.4 % gentamicin base (BChT + HeraG 10 %—6.4 %GB); lyophilized bone chips mixed with HerafillG 5 % with 6.4 % gentamicin base (BChT + HeraG 5 %—6.4 %GB); lyophilized bone chips mixed with HerafillV 10 % with 2 % vancomycin base (BChT + HeraV 10 %—2 %VB); lyophilized bone chips mixed with HerafillV 10 % with 4 % vancomycin base (BChT + HeraV 10 %—4 %VB); lyophilized bone chips mixed with HerafillV 10 % with 8 % vancomycin base (BChT + HeraV 10 %—8 %VB); lyophilized bone chips mixed with HerafillV 10 % with 8 % vancomycin base (BChT + HeraV 5 %—8 %VB)

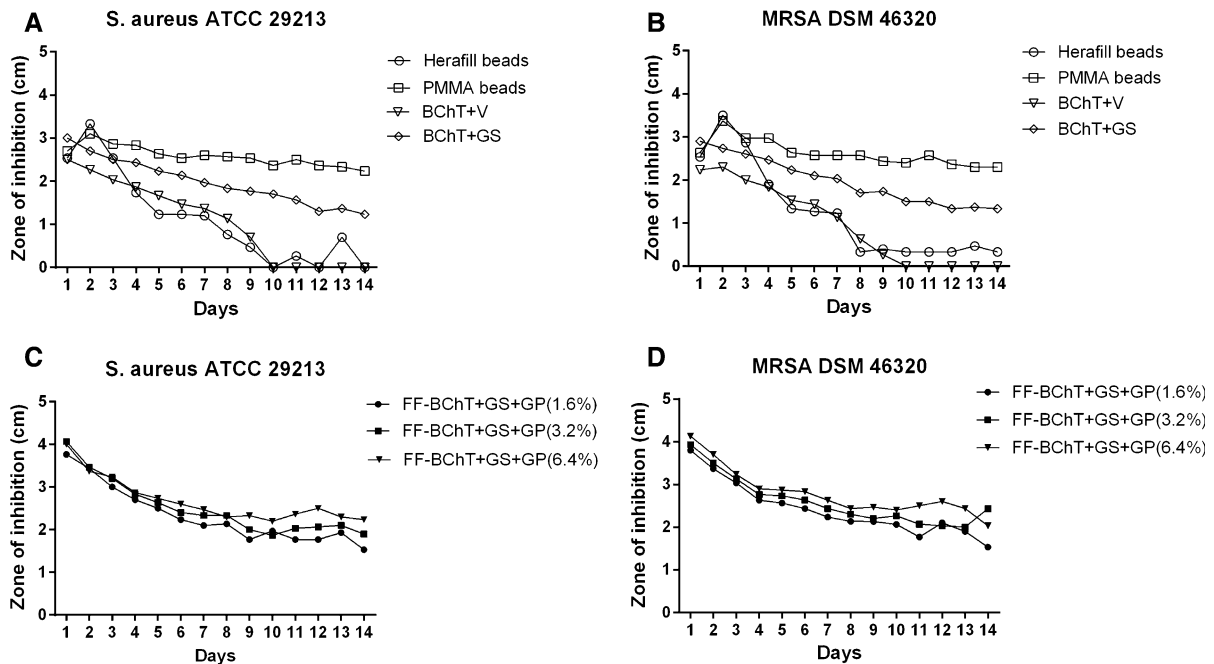


Fig. 5 Susceptibility tests of antibiotic released against **a** *S. aureus* ATCC 29213 and **b** MRSA DSM 46320. Reference groups: **a, b** lyophilized bone chips impregnated with gentamicin sulphate by immersion (1 mg/mL; BChT + GS); lyophilized bone chips impregnated with vancomycin sulphate by immersion (1 mg/mL; BChT + V) polymethylmethacrylate beads impregnated with gentamicin sulfate (PMMA beads); calcium carbonate/calcium sulfate bone substitute beads impregnated with gentamicin sulfate (Herafill beads); **c,**

d fresh-frozen bone fragments mixed with gentamicin sulfate and gentamicin palmitate 1.6 % of gentamicin base (FF-BChT + GS + GP 1.6 %); fresh-frozen bone fragments mixed with gentamicin sulfate and gentamicin palmitate 3.2 % of gentamicin base (FF-BChT + GS + GP 3.2 %); fresh-frozen bone fragments mixed with gentamicin sulfate and gentamicin palmitate 6.4 % of gentamicin base (FF + BChT + GS + GP 6.4 %)

is not relevant regarding impactation of bone allograft in revision surgery arthroplasty (Folsch et al. 2012).

The allografts in this study were mixed with gentamicin sulphate, gentamicin palmitate, vancomycin, calcium carbonate/calcium sulphate impregnated with gentamicin sulphate, and calcium carbonate/calcium sulphate bone substitute material (Herafill®) impregnated with vancomycin. Local administration of antibiotics delivered from cement was introduced in orthopaedic surgeries in 1970 (Buchholz and Engelbrecht 1970). Cancellous bone grafts were reported as antibiotic delivery system and bone grafts are commonly used to augment bone defects (Lindsey et al. 1993; Goldberg 2000). Impacted morselized allograft bone is a recognized method to obtain additional support for arthroplasty in revision surgery (Toms et al. 2004; Oakes and Cabanela 2006; Barckman et al. 2014). Antibiotic-supplemented impacted bone grafts improve outcome in revision surgery of infected endoprostheses

since systemic applied antibiotics do not reach sufficient concentrations around the grafts (Buttaro et al. 2005; Winkler et al. 2006; Barckman et al. 2014). Surgical revision of arthroplasty without cement but augmentation with bone grafts improves the bone stock and might be beneficial for the longevity of the implant and further revision surgery since the number of cementless primary joint replacements is increasing in many countries. Antibiotic-loading of bone grafts seems appropriate to deliver adequate local concentrations similar to PMMA and even higher initial release within 24 h. Good restoration of bone stock and low infection rate after revision of total hip replacements was shown for vancomycin-loaded impacted bone allograft (Buttaro et al. 2005; Winkler et al. 2006) since in vitro studies have shown the ability of bone grafts to deliver antibiotics (Witso et al. 2005; Coraça-Huber et al. 2013a, b; Barckman et al. 2014; Coraça-Huber et al. 2015).

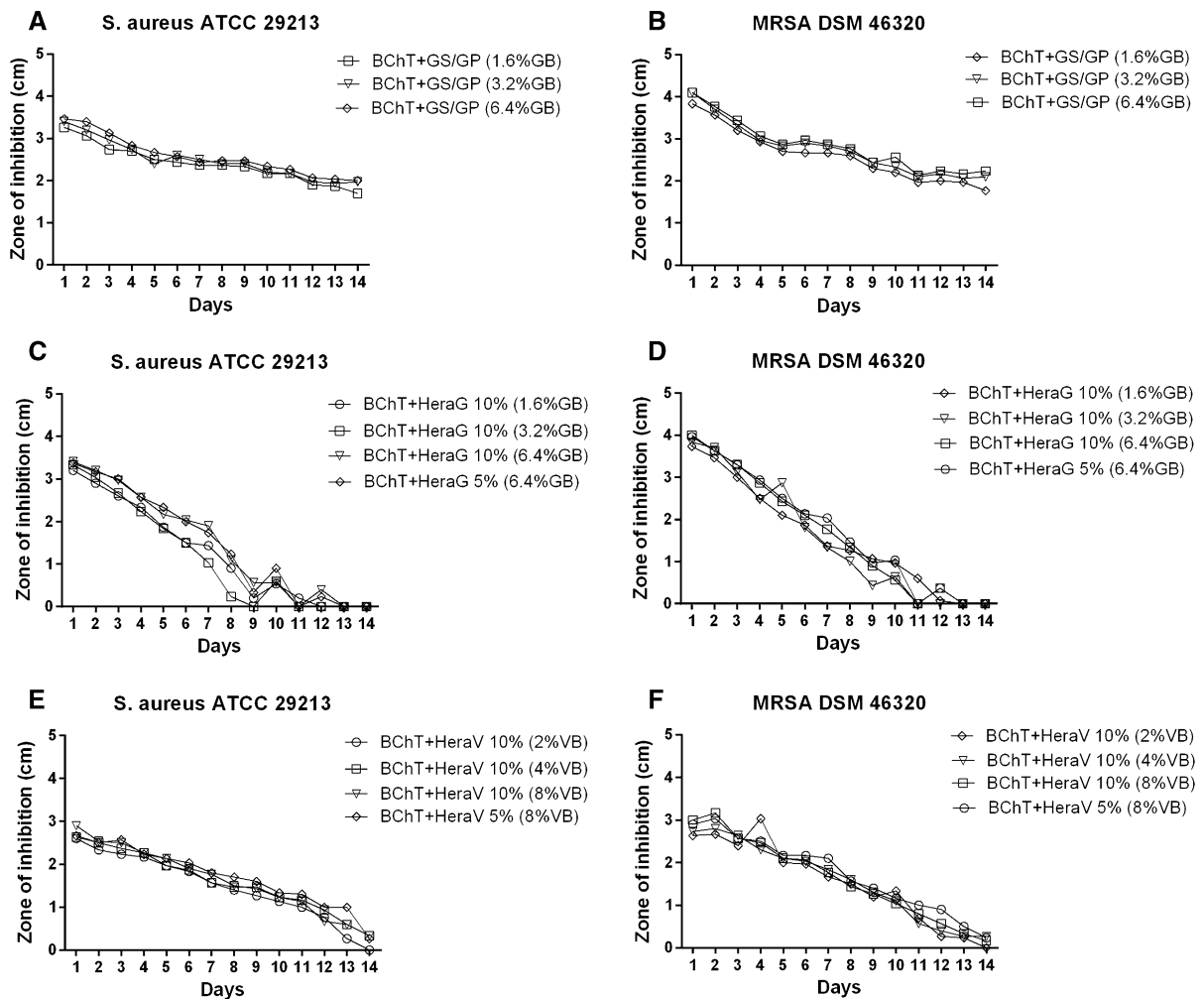


Fig. 6 Susceptibility tests of antibiotic released against (a, c, e) *S. aureus* ATCC 29213 and (b, d, f) MRSA DSM 46320. Test groups: a, b lyophilized bone chips mixed with gentamicin sulfate and gentamicin palmitate 1.6 % of gentamicin base (BChT + GS + GP 1.6 %); lyophilized bone chips mixed with gentamicin sulfate and gentamicin palmitate 3.2 % of gentamicin base (BChT + GS + GP 3.2 %); lyophilized bone chips mixed with gentamicin sulfate and gentamicin palmitate 6.4 % of gentamicin base (BChT + GS + GP 6.4 %); c, d lyophilized bone chips mixed with HerafillG 10 % with 1.6 % gentamicin base (BChT + HeraG 10 %—1.6 %GB); lyophilized bone chips mixed with HerafillG 10 % with 3.2 % gentamicin base (BChT + HeraG 10 %—3.2 %GB); lyophilized bone chips

mixed with HerafillG 10 % with 6.4 % gentamicin base (BChT + HeraG 10 %—6.4 %GB); lyophilized bone chips mixed with HerafillG 5 % with 6.4 % gentamicin base (BChT + HeraG 5 %—6.4 %GB); e, f lyophilized bone chips mixed with HerafillV 10 % with 2 % vancomycin base (BChT + HeraV 10 %—2 %VB); lyophilized bone chips mixed with Herafill V 10 % with 4 % vancomycin base (BChT + HeraV 10 %—4 %VB); lyophilized bone chips mixed with HerafillV 10 % with 8 % vancomycin base (BChT + HeraV 10 %—8 %VB); lyophilized bone chips mixed with HerafillV 5 % with 8 % vancomycin base (BChT + HeraV 5 %—8 %VB)

The mixing of bone allografts with antibiotic salts in this study was carried out manually. As this procedure can be easily applied, we affirm that this is a suitable method for an operation room. As we used as one of the reference tests, some authors first dilute the antibiotic powder in a saline solution and then soak

the bone grafts in this solution before use (Winkler et al. 2000; Witso et al. 2005). We believe that this is an efficient method for bone chips incorporation with antibiotics since the tissue would act as a sponge absorbing the solution. According to these authors, that could also be an alternative for long-term storage

of the grafts with antibiotic solutions. However, according to Sorger et al., the preservation of the grafts for up to 100 h in an antibiotic solution might influence the mechanical stability of the bone (Sorger et al. 2001). Based on Parrish et al. (1973), mechanical testing of osteochondral and structural allografts impregnated with antibiotics in solutions should be performed before this option is taken into clinical use.

In this study, drug concentrations were determined using a conventional microbiological agar well diffusion assay with *Bacillus subtilis* as indicator strain (Stevens et al. 2005; Witso et al. 2005). Because of the hydrophobic profile of GP which does not allow the obtainment of a homogeneous elution, we suggest this method for the concentration estimation instead of spectrometry techniques which could not show accurate results in these conditions. Due to its hydrophobic profile, it is expected that the GP coats not only the bone tissue but also the fat around the BCh (fresh frozen samples), which could increase the adsorption areas of the carrier. In this study, samples coated with GS + GP showed higher and longer release rates compared to the other substances. This could be due to its hydrophobic profile and affinity with the graft's fat tissue in some cases. Therefore, it could be an advantage of the combination of two the gentamicin salts (GS + GP), comparing with pure or other hydrophilic drugs that its concentrations are kept at homogeneous and constant rates. This could improve the protection of the bone grafts against infections for longer periods.

For the bacterial susceptibility, we tested the eluted substances against *S. aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in this study. A range of bacterial species have been implicated in bone and joint infections, although staphylococcal species have been consistently shown to be the most common causative agents, representing approximately 75 % of all strains. Among the staphylococci, *Staphylococcus aureus* remains a frequently isolated pathogen, causing 30–35 % of all orthopaedic implant related infections (Arciola et al. 2005; Schäfer et al. 2008; Esteban et al. 2010; Montanaro et al. 2011; Schwotzer et al. 2014) especially methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) (Parvizi et al. 2009).

PMMA beads showed a constant delivery of gentamicin within 14 days with a peak release at day

2 since lyophilized allogeneic bone revealed a constant decline of delivery both providing an inhibition of *S. aureus* and MRSA after 2 weeks. Herafill® beads did not deliver antibiotics longer than day nine and Herafill® and PMMA had a high peak release at day two compared with lyophilized allogeneic bone. Besides the positive results with PMMA in this study and the fact that PMMA is the gold standard biomaterial for local delivery of antibiotics, the efficacy of this material bears many limitations. Such shortcomings include limited antibiotic release, incompatibility with many antimicrobial agents, and the need for follow-up surgeries to remove the non-biodegradable cement before surgical reconstruction of the lost bone (Inzana et al. 2016). Herafill® on the other hand could be used as adjuvant in the bone impacting surgeries once it offers the mechanical stability and capacity of antibiotic local delivery. The capacity of bone grafts to act as gentamicin carriers once mixed with Herafill® granules has been confirmed by Coraça-Huber et al. The combination of the Herafill® granules in different sizes with two gentamicin salts (GS + GP) showed equivalent efficacy against *S. aureus* and *S. epidermidis* (Coraça-Huber et al. 2015).

The release of gentamicin from lyophilized allogeneic bone was similar to the release rate from fresh frozen bone during all the experimental time. That fact might be related to the similar porosity and microstructure of the bone chips (Witso et al. 2002). The release of gentamicin from lyophilized and fresh frozen bone was high in the first and second delivery day, decreasing and keeping a low rate until the end of the second week. Similar pathway for the delivery of antibiotic from bone samples was observed and described by Buttaro et al. 2005 and Winkler et al. 2008 where high initial release of antibiotics for cancellous bone was detected as well.

The release of vancomycin from lyophilized bone was effective against *S. aureus* until the 9th release day and MRSA only until 7th release day. Better results were observed by the release vancomycin from lyophilized bone mixed with Herafill®. Here Herafill® mixed with vancomycin showed effect against *S. aureus* until day the 14th release day (8 % VB) and MRSA until the 13th release day (8 % VB). Witso et al. also showed the total elution time for vancomycin of 26–32 days in one of his studies using

human cancellous bone as bone carrier (Witso et al. 2002). Witso did not describe a difference of release of vancomycin depending on the degree of morselizing of cancellous bone. Lyophilized bone mixed with Herafill®G (up to 6.4 % GB) releases effective rates of antibiotics against *S. aureus* until 8th day and MRSA until 9th day.

In conclusion, lyophilized and fresh frozen bone chips showed a release rate of GB from 10 to 0.3 mg/mL from 1st to 4th day (FF-BChT) and from 4 to 0.4 mg/mL from 1st to 3rd day. Although it is a low concentration of gentamicin, based on the literature this amount would be enough to reach the minimal inhibitory concentration (MIC) required for killing *S. aureus* in planktonic form (Alt et al. 2004; Coraça-Huber et al. 2012a). In this way, during the period of 7 days after implantation, the surgical site would be protected against bacterial infection. Until the end of 14 days, the release was low but still efficient to reduce bacteria counts. To maximize the delivery and protection against infection, higher concentration could be loaded to the bone allografts prior implantation.

Conclusion

Lyophilized and fresh frozen bone allografts once used as antibiotic carrier, provide efficient release concentration to inhibit bacterial growth in vitro. The protection of the grafts up to two weeks depending on the amount of antibiotic loaded and a combination of hydrophilic and hydrophobic antibiotics (e.g. gentamicin sulfate and gentamicin palmitate) are recommendable. The use of lyophilized and fresh frozen bone allografts as antibiotic carriers is recommended for prophylaxis of bone infection.

Acknowledgments Open access funding provided by University of Innsbruck and Medical University of Innsbruck. This study was supported by the Unit for Experimental Orthopedics, Department for Orthopedic Surgery, Medical University Innsbruck and by telos GmbH, Marburg, Germany. We would like to thank Andrea Windisch and Nina Schrenk for the technical support. All the substances were kindly donated by Heraeus Medical GmbH (Wehrheim, Germany).

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium,

provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- Alt V, Bechert T, Steinrucke P, Wagener M, Seidel P, Dingeldein E, Domann E, Schnettler R (2004) In vitro testing of antimicrobial activity of bone cement. *Antimicrob Agents Chemother* 48(11):4084–4088
- Arciola C, Gamberini S, Campoccia D, Visai L, Speziale P, Baldassarri L, Montanaro L (2005) A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. *J Biomed Mater Res Part A* 75A(2):408–413
- Ascherl R (2010) Infection management of megaimplants. *Orthopade* 39(10):980–993
- Barbour SA, King W (2003) The safe and effective use of allograft tissue—an update. *Am J Sports Med* 31(5):791–797
- Barckman J, Baas J, Sorensen M, Lange J, Bechtold JE, Soballe K (2014) Does tobramycin impregnation of allograft bone affect implant fixation?—an experimental study in 12 dogs. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 102(1):173–180
- Blom AW, Taylor AH, Pattison G, Whitehouse S, Bannister GC (2003) Infection after total hip arthroplasty. The Avon experience. *J Bone Joint Surg Br* 85(7):956–959
- Brewster NT, Gillespie WJ, Howie CR, Madabhushi SP, Usmani AS, Fairbairn DR (1999) Mechanical considerations in impaction bone grafting. *J Bone Joint Surg Br* 81(1):118–124
- Buchholz HW, Engelbrecht H (1970) Depot effects of various antibiotics mixed with Palacos resins. *Chirurg* 41(11):511–515
- Butler AM, Morgan DA, Verheul R, Walsh WR (2005) Mechanical properties of gamma irradiated morselized bone during compaction. *Biomaterials* 26(30):6009–6013
- Buttaro MA, Gimenez MI, Greco G, Barcan L, Piccaluga F (2005) High active local levels of vancomycin without nephrotoxicity released from impacted bone allografts in 20 revision hip arthroplasties. *Acta Orthop* 76(3):336–340
- Buttaro MA, de la Rosa DM, Comba F, Piccaluga F (2012) High failure rate with the GAP II ring and impacted allograft bone in severe acetabular defects. *Clin Orthop Relat Res* 470(11):3148–3155
- Christensen GD, Baddour LM, Hasty DL, Lowrance JH, Simpson WA (1989) Microbial and foreign body factors in the pathogenesis of medical device infections. In: Bisno AL, Waldvogel FA (eds) *Infection associated with indwelling medical devices*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 4–27
- Coraça-Huber DC, Fille M, Hausdorfer J, Pfaller K, Nogler M (2012a) Evaluation of MBEC-HTP biofilm model for studies of implant associated infections. *J Orthop Res* 30(7):1176–1180
- Coraça-Huber DC, Fille M, Hausdorfer J, Pfaller K, Nogler M (2012b) *Staphylococcus aureus* biofilm formation and

- antibiotic susceptibility tests on polystyrene and metal surfaces. *J Appl Microbiol* 112(6):1235–1243
- Coraça-Huber DC, Hausdorfer J, Fille M, Nogler M (2013a) Effect of storage temperature on gentamicin release from antibiotic-coated bone chips. *Cell Tissue Bank* 14(3):395–400. doi:[10.1007/s10561-012-9339-8](https://doi.org/10.1007/s10561-012-9339-8)
- Coraça-Huber DC, Putzer D, Fille M, Hausdorfer J, Nogler M, Kuhn KD (2013b) Gentamicin palmitate as a new antibiotic formulation for mixing with bone tissue and local release. *Cell Tissue Bank* 15(1):139–144. doi:[10.1007/s10561-013-9384-y](https://doi.org/10.1007/s10561-013-9384-y)
- Coraça-Huber D, Hausdorfer J, Fille M, Nogler M, Kuhn KD (2014) Calcium carbonate powder containing gentamicin for mixing with bone grafts. *Orthopedics* 37(8):e669–e672. doi:[10.3928/01477447-20140728-50](https://doi.org/10.3928/01477447-20140728-50)
- Coraça-Huber DC, Wurm A, Fille M, Hausdorfer J, Nogler M, Vogt S, Kuhn KD (2015) Antibiotic-loaded calcium carbonate/calcium sulfate granules as co-adjutant for bone grafting. *J Mater Sci Mater Med* 26(1):5344
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284(5418):1318–1322
- Ding H, Mao Y, Yu B, Zhu Z, Li H, Yu B, Huang J (2015) The use of morselized allografts without impaction and cemented cage support in acetabular revision surgery: a 4- to 9-year follow-up. *J Orthop Surg Res* 10(1):1–8
- Duffy GP, O'Connor MI, Brodersen MP (2007) Fatigue failure of the GAP ring. *J Arthroplasty* 22(5):711–714
- Esteban J, Molina-Manso D, Spiliopoulou I, Cordero-Ampuero J, Fernandez-Roblas R, Foka A, Gomez-Barrena E (2010) Biofilm development by clinical isolates of *Staphylococcus* spp. from retrieved orthopedic prostheses. *Acta Orthop* 81(6):674–679
- Evaniew N, Tan V, Parasu N, Jurriaans E, Finlay K, Dehesi B, Ghert M (2013) Use of a calcium sulfate-calcium phosphate synthetic bone graft composite in the surgical management of primary bone tumors. *Orthopedics* 36(2):e216–e222
- Folsch C, Mittelmeier W, Bilderbeek U, Timmesfeld N, von Garrel T, Peter Matter H (2012) Effect of storage temperature on allograft bone. *Transfus Med Hemother* 39(1):36–40
- Frommelt L (2004) Guidelines on antimicrobial therapy in situations of periprosthetic THR infection. *Orthopade* 33(7):822–828
- Frommelt L (2006) Principles of systemic antimicrobial therapy in foreign material associated infection in bone tissue, with special focus on periprosthetic infection. *Injury* 37(Suppl 2):S87–S94
- Goldberg VM (2000) Selection of bone grafts for revision total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 381:68–76
- Gristina AG (1987) Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 237(4822):1588–1595
- Haimi S, Vienonen A, Hirn M, Pelto M, Virtanen V, Suuronen R (2008) The effect of chemical cleansing procedures combined with peracetic acid-ethanol sterilization on biomechanical properties of cortical bone. *Biologicals* 36(2):99–104
- Hinsenkamp M, Muylle L, Eastlund T, Fehily D, Noel L, Strong DM (2012) Adverse reactions and events related to musculoskeletal allografts: reviewed by the World Health Organisation Project NOTIFY. *Int Orthop* 36(3):633–641
- Hofmann A, Konrad L, Hessmann MH, Kuchle R, Korner J, Rompe JD, Rommens PM (2005) The influence of bone allograft processing on osteoblast attachment and function. *J Orthop Res* 23(4):846–854
- Inzana JA, Schwarz EM, Kates SL, Awad HA (2016) Biomaterials approaches to treating implant-associated osteomyelitis. *Biomaterials* 81:58–71
- Isefuku S, Joyner CJ, Simpson AH (2003) Gentamicin may have an adverse effect on osteogenesis. *J Orthop Trauma* 17(3):212–216
- Kuhn KD, Weber C, Kreis S, Holzgrabe U (2008) Evaluation of the stability of gentamicin in different antibiotic carriers using a validated MEKC method. *J Pharm Biomed Anal* 48(3):612–618
- Kühn K, Vogt S, Schnabelrauch M (2003) Porous implants with antibiotic coating, their preparation and use. *EP* 1374923:B1
- Lindsey RW, Probe R, Miclau T, Alexander JW, Perren SM (1993) The effects of antibiotic-impregnated autogeneic cancellous bone graft on bone healing. *Clin Orthop Relat Res* 291:303–312
- Montanaro L, Speziale P, Campoccia D, Ravaoli S, Cangini I, Pietrocola G, Giannini S, Arciola CR (2011) Scenery of *Staphylococcus* implant infections in orthopedics. *Future Microbiol* 6(11):1329–1349
- Oakes DA, Cabanela ME (2006) Impaction bone grafting for revision hip arthroplasty: biology and clinical applications. *J Am Acad Orthop Surg* 14(11):620–628
- Parrish FF (1973) Allograft replacement of all or part of the end of a long bone following excision of a tumor. *J Bone Joint Surg Am* 55(1):1–22
- Parvizi J, Pour AE, Keshavarzi NR, D'Apuzzo M, Sharkey PF, Hozack WJ (2007) Revision total hip arthroplasty in octogenarians. A case–control study. *J Bone Joint Surg Am* 89(12):2612–2618
- Parvizi J, Saleh KJ, Ragland PS, Pour AE, Mont MA (2008) Efficacy of antibiotic-impregnated cement in total hip replacement. *Acta Orthop* 79(3):335–341
- Parvizi J, Azzam K, Ghanem E, Austin MS, Rothman RH (2009) Periprosthetic infection due to resistant staphylococci: serious problems on the horizon. *Clin Orthop Relat Res* 467(7):1732–1739
- Patel R (2005) Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin Orthop Relat Res* 437:41–47
- Phillips JE, Crane TP, Noy M, Elliott TS, Grimer RJ (2006) The incidence of deep prosthetic infections in a specialist orthopaedic hospital: a 15-year prospective survey. *J Bone Joint Surg Br* 88(7):943–948
- Putzer D, Mayr E, Haid C, Reinthaler A, Nogler M (2011) Impaction bone grafting: a laboratory comparison of two methods. *J Bone Joint Surg Br* 93(8):1049–1053
- Roberts R, McConoughey SJ, Calhoun JH (2013) Size and composition of synthetic calcium sulfate beads influence dissolution and elution rates in vitro. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 102(4):667–673. doi:[10.1002/jbm.b.33045](https://doi.org/10.1002/jbm.b.33045)
- Saraf SK, Yadav A, Nagwani S, Sen M (2010) Decal bone matrix as a local antibiotic delivery vehicle in a MRSA-infected bone model: an experimental study. *Indian J Orthop* 44(3):246–251

- Schäfer P, Fink B, Sandow D, Margull A, Berger I, Frommelt L (2008) Prolonged bacterial culture to identify late periprosthetic joint infection: a promising strategy. *Clin Infect Dis* 47(11):1403–1409
- Schwotzer N, Wahl P, Fracheboud D, Gautier E, Chuard C (2014) Optimal culture incubation time in orthopedic device-associated infections: a retrospective analysis of prolonged 14-day incubation. *J Clin Microbiol* 52(1):61–66
- Sorger JI, Hornicek FJ, Zavatta M, Menzner JP, Gebhardt MC, Tomford WW, Mankin HJ (2001) Allograft fractures revisited. *Clin Orthop Relat Res* 382:66–74
- Stevens CM, Tetsworth KD, Calhoun JH, Mader JT (2005) An articulated antibiotic spacer used for infected total knee arthroplasty: a comparative in vitro elution study of Simplex and Palacos bone cements. *J Orthop Res* 23(1):27–33
- Tagil M, Aspenberg P (1998) Impaction of cancellous bone grafts impairs osteoconduction in titanium chambers. *Clin Orthop Relat Res* 352:231–238
- Toms AD, Barker RL, Jones RS, Kuiper JH (2004) Impaction bone-grafting in revision joint replacement surgery. *J Bone Joint Surg Am* 86-A(9):2050–2060
- Wichelhaus TA, Dingeldein E, Rauschmann M, Kluge S, Dieterich R, Schafer V, Brade V (2001) Elution characteristics of vancomycin, teicoplanin, gentamicin and clindamycin from calcium sulphate beads. *J Antimicrob Chemother* 48(1):117–119
- Winkler H, Janata O, Berger C, Wein W, Georgopoulos A (2000) In vitro release of vancomycin and tobramycin from impregnated human and bovine bone grafts. *J Antimicrob Chemother* 46(3):423–428
- Winkler H, Kaudela K, Stoiber A, Menschik F (2006) Bone grafts impregnated with antibiotics as a tool for treating infected implants in orthopedic surgery—one stage revision results. *Cell Tissue Bank* 7(4):319–323
- Winkler H, Stoiber A, Kaudela K, Winter F, Menschik F (2008) One stage uncemented revision of infected total hip replacement using cancellous allograft bone impregnated with antibiotics. *J Bone Joint Surg Br* 90(12):1580–1584
- Witso E, Persen L, Benum P, Bergh K (2002) Release of netilmicin and vancomycin from cancellous bone. *Acta Orthop Scand* 73(2):199–205
- Witso E, Persen L, Benum P, Bergh K (2005) Cortical allograft as a vehicle for antibiotic delivery. *Acta Orthop* 76(4):481–486
- Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE (2004) Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 351:1645–1654

4. Zusammenfassung

In der Literatur besteht keine Einigkeit über die notwendige Lagerungstemperatur von Knochenbanken. Anhand der publizierten klinischen Ergebnisse der Transplantation allogenen Knochens nach Lagerung bei Temperaturen von -20°C ergab sich kein eindeutig nachweisbarer nachteiliger Effekt im Vergleich zur Lagerung bei -80°C . Internationale Fachgesellschaften haben die empfohlene Lagerungstemperatur sukzessiv mittlerweile bis auf -20°C für die Lagerung bis zu 6 Monaten angehoben. Die Lagerung des allogenen Knochens bei -20°C im Vergleich zu -80°C hatte keine nachweisbaren negativen Einflüsse auf die Auszugskraft aus nativen und thermodesinfizierten spongiösen Knochen. Thermodesinfektion führt zu einer Denaturierung von Enzymen und bewirkt somit potenziell eine Verminderung proteolytischer Effekte im Knochentransplantat. Dies könnte gegenüber den nativen allogenen Knochentransplantaten vorteilhaft sein und die klinische Relevanz osteoinduktiver Substanzen in nativen Knochentransplantaten wird zudem kontrovers betrachtet. Somit erscheint, bei fehlendem Einfluss der gewählten Lagerungstemperaturen auf mechanische Eigenschaften des spongiösen Knochens, eine längere Lagerung der thermodesinfizierten aber auch der nativen Knochentransplantate bei -20°C bis zu 2 Jahren möglich. Der zunehmende Bedarf an allogenen Knochen dürfte einen weiter steigenden Umsatz mit resultierender geringerer Verweildauer der Transplantate in der Knochenbank bedingen. Die Lagerung der Knochentransplantate bei -20°C würde den logistischen Aufwand für den Betrieb der Knochenbank reduzieren und die Verfügbarkeit verbessern.

Verschiedene biomechanische Parameter des spongiösen Knochens werden durch die Knochenbankprozedur der Thermodesinfektion beeinflusst. Die Auszugskraft und die Torsionsfestigkeit weisen eine signifikante Reduktion gegenüber dem nativen Knochen auf. Hingegen waren eine signifikante Verminderung der Biegelast und der Kompressionsbelastung nach Thermodesinfektion nicht nachweisbar. Die thermisch bedingten Veränderungen der Knochenmatrix wirken sich unter Berücksichtigung der Anisotropie des Knochens und nur wenig abweichender absoluter Werte weitgehend gleichförmig auf die untersuchten mechanischen Qualitäten aus. Die klinische Anwendung des thermodesinfizierten allogenen Knochens erfährt durch die Reduktion der

Auszugskraft bis 15% und der Torsionsfestigkeit bis 20% für die meisten Indikationen keine relevante Einschränkung im Vergleich zum nativen Knochen. Bei zementfreien Revisionsoperationen von Endoprothesen ist, aufgrund einer Verdichtung der thermodesinfizierten Spongiosa bei der Implantation, eine geringere Bedeutung der beeinflussten mechanischen Parameter anzunehmen. Ebenso ergibt sich für die Verwendung bei dorsalen Spondylodesen kein erkennbarer mechanischer Nachteil des thermodesinfizierten Knochens.

Der PMMA-Glaskeramik-Kompositzement Cortoss® zeigte im Gegensatz zu einem Calciumphosphatzement eine zelltoxische Wirkung in der simulierten Frühphase der Implantation in vitro. Die osteoblastäre Aktivität in Gegenwart von Cortoss® war innerhalb des gesamten Beobachtungszeitraums von 5 Tagen nicht nachweisbar. Eine bessere Biokompatibilität von Glaskeramikzementen im Vergleich zu PMMA-Zement wurde in anderen Untersuchungen gezeigt. Toxische und thermische Auswirkungen von Zementkomponenten im Implantatlager sowie die Ausbildung fibrösen Gewebes im Interface zwischen PMMA-Zement und Knochenlager sind beschrieben. Die klinische Relevanz der Beeinträchtigung der osteoblastären Funktion durch PMMA-Glaskeramik-Kompositzement in der Frühphase bleibt zu diskutieren. Polymerzemente mit Glaskeramik gewährleisteten hingegen eine bessere Fixation im Knochen als Hydroxylapatit. Ein Zement mit Vereinigung aller gewünschten mechanischen und biologischen Eigenschaften steht noch nicht zur Verfügung. Die Verwendung allogenen Knochenersatzmaterials mit dem Potenzial ossärer Integration erscheint zur zementfreien Endoprothesenrevision vorteilhaft um das Knochenlager langfristig zu verbessern und damit die Voraussetzungen für nachfolgende Revisionen zu optimieren. Die biologischen Vorteile des thermodesinfizierten spongiösen Knochens gegenüber PMMA-Zement dürften die initial geringfügige Beeinträchtigung der mechanischen Eigenschaften in der klinischen Anwendung dauerhaft überwiegen.

Die lokale Applikation von Gentamicinpalmitat auf Titanimplantate wies im Femurmodell der Ratte eine signifikante antibakterielle Wirkung im Markraum nach und reduzierte systemische Entzündungszeichen, nachdem die geringste Bakterienanzahl zur sicheren Auslösung eines iatrogenen Infektes gewählt wurde. Histologische Veränderungen einer Osteomyelitis wurden mit der

Gentamicinbeschichtung während des gesamten Zeitraums von 6 Wochen verhindert. Systemische intraperitoneale Applikation von Gentamicin zeigte in unseren Untersuchungen keine bessere Kontrolle der Bakterien als die lokale Beschichtung aber eine signifikante Wirkung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Keine der beiden Applikationsformen zeigte sich der anderen in der antibakteriellen Wirkung signifikant überlegen und die Kombination von Implantatbeschichtung und systemischer Gabe von Gentamicin führte nicht zu einer signifikanten Verbesserung der antibiotischen Wirkung mit weiterer Reduktion der Keimzahl. Als Synergieeffekt beider Applikationsformen zeigte sich eine bessere Kontrolle systemischer Infektzeichen. Serumhaptoglobin war zu verschiedenen Zeitpunkten der Untersuchung sowie nach 6 Wochen im Vergleich mit der jeweiligen antibiotischen Monotherapie signifikant erniedrigt. Die Anzahl der Bakterien, ebenso wie die Spezies, beeinflussen die Effektivität einer lokalen antibiotischen Therapie. Eine langfristige antibiotische Behandlung wird von der Gentamicinpalmitatbeschichtung entsprechend gewährleistet. Die chirurgische Infektsanierung wird jedoch als zusätzliche Maßnahme weiterhin unverzichtbar bleiben. Für isolierte ossäre Infektionen kann die alleinige lokale Anwendung eines Antibiotikums ausreichend sein, hingegen ist eine zusätzliche systemische Gabe bei ausgedehnten Befunden insbesondere in Verbindung mit Weichteilinfektionen als vorteilhaft zu betrachten. Eine kürzere Phase systemischer Applikation von Antibiotika könnte bei gleichzeitiger lokaler Implantatbeschichtung möglich sein und würde allgemeine Nebenwirkungen reduzieren und Kosten senken.

Als Träger für Antibiotika erscheinen Substanzen mit guter primärer Verankerung und potenziell knöcherner Integration sinnvoll. Die Kombination aus Gentamicinpalmitat und Gentamicinsulfat gewährleistete eine unmittelbare Freisetzung hoher Konzentrationen des Antibiotikums sowie eine ausreichend prolongierte antimikrobielle Wirkung für einen Zeitraum von 2 Wochen. Höhere und länger bestehende Wirkspiegel können in Abhängigkeit von der primär eingesetzten Konzentration des Antibiotikums erreicht werden. Die initiale Freisetzung des Gentamicins aus dem Knochen zeigte sich frühzeitiger als bei PMMA-Zement. Die komplett lösliche Trägersubstanz Palmitat ist hydrophob und fördert eine lokale Anreicherung im Markraum. Humane native Spongiosa zeigte gegenüber lyophilisierter Spongiosa keine relevant abweichende Pharmakokinetik der Antibiotika. Die initial hohe Freisetzung des Antibiotikums aus dem spongiösen Knochen ist ein wesentlicher Vorteil

gegenüber PMMA-Zement im Wettlauf um die Besiedlung der Implantatoberfläche bereits innerhalb der ersten Stunden nach der Implantation. In der Frühphase der ossären Integration konkurrieren Bakterien und osteoblastäre Zellen um die Besiedlung der Implantatoberfläche. Die Vermeidung von Biofilmbildung erfordert die Verhinderung einer frühzeitigen Adhäsion von Bakterien auf dem Implantat. Spätere Behandlungsmaßnahmen sind weniger erfolgversprechend. Eine knöcherne Integration von Implantaten könnte zudem eine verminderte sekundäre bakterielle Besiedlung derselben erwarten lassen. Mit lokaler Applikation von Antibiotika können antibiotische Konzentrationen deutlich oberhalb der minimal inhibitorischen Konzentration der jeweiligen Antibiogrammtestung erreicht werden und somit auch potenziell Bakterien therapiert werden, die primär als nicht sensibel für ein bestimmtes Antibiotikum eingestuft wurden. Dies kann die Effektivität der antibiotischen Therapie wesentlich verbessern. Eine Dosissteigerung kann in Abhängigkeit von der zu therapierenden Infektion notwendig sein und eine systemische Applikation erreicht die erforderlichen therapeutisch wirksamen lokalen Konzentrationen häufig nicht. Allogener Knochen kann zudem mit verschiedenen Antibiotika in variablen Konzentrationen versetzt werden. Es ergibt sich potenziell ein größeres Anwendungsspektrum als für PMMA-Zement. Eine veränderte Freisetzungskinetik nach Impaktion spongiösen Knochens ist jedoch zu berücksichtigen.

5. Fazit

Die Lagerung allogener nativer und thermodesinfizierter Knochentransplantate bei -20°C kann bis zu 2 Jahren empfohlen werden und somit eine Reduktion der Kosten der Knochenbank bewirken. Denaturierung durch Thermodesinfektion vermindert im Vergleich zu nativen Knochenpräparaten potenziell den Ablauf enzymatischer Prozesse ohne wesentliche Beeinflussung mechanischer Eigenschaften. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigen thermodesinfizierten allogenen Knochen als mechanisch geeignetes Knochenersatzmaterial mit geringer signifikanter Reduktion der Auszugskraft sowie der Torsionssteifigkeit und ohne signifikante Beeinflussung weiterer mechanischer Parameter. Gleichzeitig wurde eine bessere Biokompatibilität für Calciumphosphatzement im Gegensatz zu konventionellen Knochenzement nachgewiesen. Gentamicinpalmitat zeigte als Implantatbeschichtung eine suffiziente lokale antibakterielle Wirkung und die Elutionskinetik von Gentamicinpalmitat und Gentamicinsulfat ist potenziell geeignet, eine Biofilmbildung zu verhindern und gleichzeitig prolongiert antibiotisch zu wirken. Auch die systemische Gabe von Gentamicin wies einen signifikanten antibiotischen Effekt auf. Eine synergistische antibakterielle Wirkung lokaler und systemischer Applikation von Gentamicin konnte an den Implantaten nicht nachgewiesen werden. Die lokale Applikation von Antibiotika kann somit als gleichwertig mit der systemischen Therapie betrachtet werden, bei gleichzeitiger Vermeidung von systemischen Nebenwirkungen. Die Implantatbeschichtung erscheint hingegen geeignet, sehr hohe lokale Konzentrationen von Antibiotika zu erzielen, die zur Eradikation von Bakterien und zur Vermeidung einer Biofilmbildung erforderlich sein können. Die Kombination einer adäquaten Freisetzungskinetik von Antibiotika aus humanen allogenen spongiösen Knochen mit guten mechanischen Eigenschaften lässt diese zum Einsatz in der septischen Knochenchirurgie geeignet erscheinen. Die Etablierung thermodesinfizierten oder nativen spongiösen Knochens als Trägersubstanz für lokale antibiotische Therapie bei zementfreier Endoprothesenrevision erscheint möglich und sinnvoll. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um den Grenzbereich zwischen Implantat und Knochenlager im Infekt sowie Interaktionen zwischen Bakterien, osteoblastären Zellen und Antibiotika eingehender zu analysieren.

6. Danksagung

Ich danke Herrn **Prof. Dr. Markus Rickert** für die vertrauensvolle Zusammenarbeit in der Klinik sowie die persönliche Unterstützung bei wissenschaftlichen Projekten und der Verfassung der Habilitationsschrift. Danken möchte ich auch Herrn **Prof. Dr. H.-P. Kruse** aus Hamburg für das Dissertationsthema und die stete Unterstützung bei der Verfassung der Dissertation.

Mein Dank gilt auch Herrn **Prof. Dr. Konrad Schwemmler** als Ratgeber und Lehrer für die klinische und operative ärztliche Ausbildung und damit verbunden den Beginn meiner Tätigkeit an der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Herrn **Prof. Dr. Henning Stürz** gebührt besonderer Dank für die Einführung in die Wirbelsäulenchirurgie und die umfassende allgemeine orthopädische und operative Ausbildung. Für die Weiterbildung im Bereich der Unfallchirurgie danke ich Herrn **Prof. Dr. Klaus Kunze** und Herrn **Prof. Dr. Leo Gotzen**. Dank für Rat und Ausbildung gebührt zudem Herrn **Prof. S. Hughes** aus Edinburgh. Zu danken ist auch Herrn **Dr. Patrick Moulin** aus der Schweiz für intensive Ausbildung in der Wirbelsäulenchirurgie. Herr **PD. Dr. Thomas Naumann** ist als Ratgeber und orthopädischer Lehrer insbesondere für die Kinderorthopädie zu würdigen und zu danken. Bei Frau **Prof. Dr. Susanne Fuchs-Winkelmann** möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeiten in Marburg insbesondere der tierexperimentellen Studien bedanken.

Ich möchte mich zudem sehr bei Herrn **Prof. Dr. Wolfram Mittelmeier** für wichtige Ratschläge und Unterstützung bei wissenschaftlichen Projekten bedanken ebenso wie auch bei Herrn **Prof. Dr. Axel Pruss**.

Ich danke Herrn **Alexander Jahnke** sehr für die Unterstützung bei der Durchführung der biomechanischen Studien sowie für gemeinsame Planungen und kontinuierliche fruchtbare Diskussionen. Besonderer Dank gilt Herrn **Dr. Jürgen Paletta** für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der tierexperimentellen Studien in Marburg. Dank gilt auch Herrn **Guido Schemken** als Betreuer der Versuchstiere in Marburg und Herrn **PD. Dr. Stefan Lakemeier** sowie Herrn **Dr. Philip Roessler** bei der Planung und Durchführung der Tierexperimente sowie auch die Unterstützung von **Prof. Dr. Klaus Dieter Kühn** zu erwähnen ist. Zu danken ist in diesem Zusammenhang auch Herrn **Prof. Dr. Markus Schofer**. Frau **Prof. Dr. Nina Timmesfeld** danke ich für langjährige Unterstützung bei umfangreichen statistischen Berechnungen. Danken möchte ich auch allen, nicht persönlich genannten Mitwirkenden, bei der Durchführung verschiedener Untersuchungen im Rahmen von Dissertationen und anderen wissenschaftlichen Projekten.

Der größte Dank gilt meiner Familie und speziell meiner lieben Ehefrau **Sibylle**, ohne deren Unterstützung die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

7. Literaturverzeichnis:

1. Hernigou P: Bone transplantation and tissue engineering. Part II: bone graft and osteogenesis in the seventeenth, eighteenth and nineteenth centuries (Duhamel, Haller, Ollier and MacEwen). *Int Orthop* 2015, 39:193-204.
2. MacEwen W: Observations concerning transplantation of bone: illustrated by a case of inter-human osseous transplantation whereby over two-thirds of the shaft of a humerus was restored. *Proc R Soc (Lond)* 1881, 32: 232-247.
3. MacEwen W: The osteogenic factors in the development and repair of bone. *Ann Surg* 1887, 6:289-306.
4. Phemister DB: The fate of transplanted bone and regenerative power of its various constituents. *Surg Gynecol* 1914, 19:303-333.
5. Albee F: Discussion of preservation of tissues and application in surgery by Alexis Carrel. *J Am Med Assoc (JAMA)* 1912, 59:527-536.
6. Albee F: Fundamentals in bone transplantation. Experience in 3000 bone-graft operations. *J Am Med Assoc* 1923, 81:1429-1432.
7. Hernigou P: Bone transplantation and tissue engineering part III: allografts, bone grafting and bone banking in the twentieth century. *Int Orthop* 2015, 39:577-587.
8. Lexer E: Ueber gelenktransplantation. *Med Klin* 1908, 4:817-820.
9. Carrel A: The preservation of tissues and its application in surgery. *JAMA* 1912, 59:523-527.
10. Lexer E: Die Verwendung der freien knochenplastik nebst versuchen ueber gelenkversteifung und gelenktransplantation. *Arch Klin Chir* 1908, 86:939-954.
11. Lexer E: Free transplantation. *Ann Surg* 1914, 60:166-194.
12. Orell S: Experimentalchirurgische Studie über Knochentransplantate und ihre Anwendung in der praktischen Chirurgie. *Dtsch Z Chir* 1931, 232:701-713.
13. Orell S: Surgical bone grafting with 'os purum', 'os novum' and boiled bone. *J Bone Joint Surg* 1937, 19: 873-885.
14. Gallie WE: The use of boiled bone in operative surgery. *Am Orthop Surg* 1918, 16:373-383.
15. Gallie WE: The transplantation of bone. *Br Med J* 1931, 2:840-844.
16. Curtis BF: Cases of bone implantation and transplantation for cyst of tibia, osteomyelitis cavities and ununited fractures. *Am J Med Sci* 1893, 106:30-43.
17. Gallie WE: The history of a bone graft. *Am J Orthop Surg* 1914, 12:201-212.
18. Ollier L: *Traité experimental et Clinique de la regeneration des os et de la production artificielle du tissue osseux*. Victor Masson et fils Paris 1867, Vols. 1 et 2:412-457.
19. Bush LF, Garber CZ: The bone bank. *J Amer Med Assoc* 1948, 137:588-594.
20. Inclan A: The use of preserved bone graft in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Am* 1942, 24:81-96.
21. Wilson PD: Experiences with a bone bank. *Ann Surg* 1947, 126:932-946.

22. Wilson PD: Follow-up study of the use of refrigerated homogenous bone transplants in orthopaedic operations. *J Bone Joint Surg Am* 1951, 33:307-323.
23. Bush LF: The use of homogenous bone grafts. *J Bone Joint Surg Am* 1947, 29:620-628.
24. Hyatt GW: Fundamentals in the use and preservation of homogenous bone. *US Armed Forces Med J* 1950, 1: 841-852.
25. Hyatt GW, Turner TC, Bassett CAL, Pate JW, Sawyer PN: New methods for preserving bone, skin and blood vessels. *Postgrad Med* 1952, 12:239-254.
26. Fölsch C, Mittelmeier W, Bilderbeek U, Timmesfeld N, von Garrel T, Peter Matter H: Effect of Storage Temperature on Allograft Bone. *Transfus Med Hemother* 2012, 39:36-40.
27. Hart MM, Campbell ED, Kartub MG: Bone banking. A cost effective method for establishing a community hospital bone bank. *Clin Orthop Relat Res* 1986, 206:295-300.
28. Tomford WW, Doppelt SH, Mankin HJ, Friedlaender GE: 1983 Bone bank procedures. *Clin Orthop Relat Res* 1983, 174:15-21.
29. Kuner EH, Keller H: Knochenbank: Ausstattung, Gewebebegewinnung, Kältekonserverung, Organisation, Sicherheit. *Orthopäde* 1986, 15:16-21.
30. Bormann N, Pruss A, Schmidmaier G, Wildemann B: In vitro testing of osteoinductive potential of different bony allograft preparations. *Arch Orthop Trauma Surg* 2010, 130:143-149.
31. Burchardt H: The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res* 1983, 174:28-42.
32. Linde F, Sorensen HC: The effect of different storage methods on the mechanical properties of trabecular bone. *J Biomech* 1993, 26:1249-1252.
33. Bassett CAL: Clinical implications of cell function in bone grafting. *Clin Orthop Relat Res* 1972, 87:49-59.
34. Ascherl R, Morgalla M, Geissdörfer K, Schmeller ML, Langhammer H, Lechner F, Blumel G: Experimentelle Untersuchungen und klinische Aspekte zur Kältekonserverung allogener Spongiosa. *Orthopäde* 1986, 15:22-29.
35. Burstein AH, Zika JM, Heiple KG, Klein L: Contribution of collagen and mineral to the elastic-plastic properties of bone. *J Bone Joint Surg Am* 1975, 57:956-961.
36. Butler AM: Mechanical properties of gamma irradiated morselized bone during compaction. *Biomaterials* 2005, 26:6009-6013.
37. Haim S, Vienonen A, Hirn M, Pelto M, Virtan V, Suuronen R: The effect of chemical cleansing procedures combined with peracetic acid-ethanol sterilization on biomechanic properties of cortical bone. *Biologicals* 2008, 36:99-104.
38. Hamer AJ, Strachan JR, Black MM, Ibbotson CJ, Stockley I, Elson RA: Biochemical properties of cortical allograft bone using a new method of bone strength measurement. A comparison of fresh, fresh-frozen and irradiated bone. *J Bone Joint Surg Br* 1996, 78:363-368.
39. Hofmann A: The influence of bone allograft processing on osteoblast attachment and function. *J Orthop Res* 2005, 23:846-854.
40. Linde F, Sorensen HC: The effect of different storage methods on the mechanical properties of trabecular bone. *J Biomech* 1993, 26:1249-1252.

41. Mardas M, Kubisz L, Mielcarek S, Biskupski P: The influence of low temperature on dynamic mechanical properties of animal bone. *Pol J Med Phys Eng* 2009, 15:153-159.
42. Matter HP, Garrel T, Bilderbeek U, Mittelmeier W: Biomechanical examinations of cancellous bone concerning the influence of duration and temperature of cryopreservation. *J Biomed Mater Res* 2001, 55:40-44.
43. Panjabi MM, Krag M, Summers D, Videman T: Biomechanical time-tolerance of fresh cadaveric human spine specimens. *J Orthop Res* 1985, 3:292-300.
44. Pelker RR, Friedländer GE, Markham TC, Panjabi MM, Moen CJ: Effects of freezing and freeze-drying on the biomechanical properties of rat bone. *J Orthop Res* 1984, 1:405-411.
45. Salai M, Brosh T, Keller N, Perelman M, Dudkiewicz I: The effects of prolonged cryopreservation on the biomechanical properties of bone allografts: a microbiological, histological and mechanical study. *Cell Tissue Bank* 2000, 1:69-73.
46. Vastel L, Meunier A, Siney H, Sedel L, Courpied JP: Effect of different sterilization processing methods on the mechanical properties of human cancellous bone allografts. *Biomaterials* 2004, 25:2105-2110.
47. Ochs BG, Schmid U, Rieth J, Ateschrang A, Weise K, Ochs U: Acetabular bone reconstruction in revision arthroplasty. *J Bone Joint Surg Br* 2008, 90:1164-1171.
48. Bos GD, Goldberg VM, Gordon NH, Dollinger BM, Zika JM, Powell AE, Heiple KG: The long-term fate of fresh and frozen orthotopic bone allografts in genetically defined rats. *Clin Orthop Relat Res* 1985, 197:247-254.
49. Goldberg VM, Bos GD, Heiple KG, Zika JM, Powell AE: Improved acceptance of frozen bone allografts in genetically mismatched dogs by immunosuppression. *J Bone Joint Surg Am* 1984, 66:937-955.
50. Weaver JB: Experiences in the use of homogenous (bone bank) bone. *J Bone Joint Surg Am* 1949, 31:778-792.
51. Steinberg EL, Luger E, Zwass T, Katznelson A: Very long-term radiographic and bone scan results of frozen autograft and allograft bone grafting in 17 patients (20 grafts) A 30 to 35-year-follow-up. *Cell Tissue Bank* 2004, 5:97-104.
52. Bauer H: Ueber knochentransplantation. *Zentralbl Chir* 1910, 37:20-21.
53. Enneking WF: Transplanting allografts. *J Am Coll Surg* 2005, 201:5-6.
54. Goldberg VM: Selection of bone grafts for revision total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 2000, 381:68-76.
55. Fölsch C, Mittelmeier W, von Garrel T, Bilderbeek U, Timmesfeld N, Pruss A, Matter HP: Influence of thermoinfection and duration of cryopreservation at different temperatures on pull out strength of cancellous bone. *Cell Tissue Bank* 2015, 16:73-81.
56. Burwell RG: Studies in the transplantation of bone V. The capacity of fresh and treated homografts of bone to evoke transplantation immunity. *J Bone Joint Surg Br* 1963, 45:386-401.
57. Burwell RG: Studies in the transplantation of bone VII. The fresh composite homograft-autograft of cancellous bone: an analysis of factors leading to osteogenesis in marrow transplants and in marrow-containing bone grafts. *J Bone Joint Surg Br* 1964, 46:110-140.
58. Burwell RG, Gowland G: Studies in the transplantation of bone III. The immune response of lymph nodes draining components of fresh homologous cancellous bone and homologous bone treated by different methods. *J Bone Joint Surg Br* 1962, 44:131-148.
59. Volkov M: Allotransplantations of joints. *J Bone Joint Surg Br* 1970, 52:49-53.

60. Rath NC, Reddi AH: Collagenous bone matrix is a local mitogen. *Nature* 1979, 278:855-857.
61. Langer F, Czitrom A, Pritzker KP, Gross AE: The immunogenicity of fresh frozen allogeneic bone. *J Bone Joint Surg Am* 1975, 57:216-220.
62. Goldberg VM, Stevenson S: Natural history of Autografts and allografts. *Clin Orthop Relat Res* 1987, 225:7-16.
63. Friedländer GE: Bone allografts: the biological consequences of immunological events. *J Bone Joint Surg Am* 1991, 73:1119-1122.
64. Toms AD, Barker RL, Jones RS, Kuiper JH: Impaction bone-grafting in revision joint replacement surgery. *J Bone Joint Surg Br* 2004, 86:2050-2060.
65. Burr DB: The contribution of the organic matrix to bone's material properties. *Bone* 2002, 31:8-11.
66. Burstein AH, Zika JM, Heiple KG, Klein L: Contribution of collagen and mineral to the elastic-plastic properties of bone. *J Bone Joint Surg Am* 1975, 57:956-961.
67. Oxlund H, Barckman M, Ortoft G, Andreassen TT: Reduced concentrations of collagen cross-links are associated with reduced strength of bone. *Bone* 1995, 17(4 Suppl):365S-371S.
68. Klinge S: Determination of geometry of the RVE for cancellous bone using the effective complex shear modulus. *Biomech Model Mechanobiol* 2013, 12:401-412.
69. Matsunga S, Naito H, Tamatsu Y, Takano N, Abe S, Ide Y: Consideration of shear modulus in biomechanical analysis of peri-implant jaw bone: accuracy verification using image-based multi-scale simulation. *Dentals Materials Journal* 2013, 32:425-432.
70. McNamara IR: Impaction bone grafting in revision hip surgery: past, present and future. *Cell Tissue Bank* 2010, 11:57-73.
71. Oakley J, Kuiper JH: Factors affecting the cohesion of impaction bone graft. *J Bone Joint Surg Br* 2006, 88:828-831.
72. teStroet M, Rijnen WHC, Gardeniers JWM, van Kampen A, Schreurs BW: The outcome of femoral component revision arthroplasty with impaction allograft bone grafting and a cemented polished Exeter stem: A prospective cohort study of 208 revision arthroplasties with a mean follow-up of ten years. *Bone Joint* 2015, 97-B:771-779.
73. van Haaren E, Smit T, Phipps K, Wuisman P, Blunn G, Heyligers I: Tricalcium-phosphate and hydroxyapatite bone-graft expander for use in impaction grafting revision surgery. *J Bone Joint Surg* 2005, 87-B:267-271.
74. van Haaren EH, van der Zwaard BC, van den Veen AJ, Heyligers IC, Wuisman PI, Smit TH: Effect of long-term preservation on the mechanical properties of cortical bone in goats. *Acta Orthop* 2008, 79:708-716.
75. Slooff T, Huiskes R, van Horn J, Lemmens AJ: Bone grafting in total hip replacement for acetabular protrusion. *Acta Orthop* 1984, 55:593-96.
76. Sabokbar A, Fujikawa Y, Murray DW, Athanasou NA: Bisphosphonates in bone cement inhibit PMMA particle induced bone resorption. *Ann Rheum Dis* 1998, 57:614-618.
77. Boyd D, Towler MR, Wren A, Clarkin OM: Comparison of an experimental bone cement with surgical Simplex P, Spineplex and Cortoss. *J Mater Sci Mater Med* 2008, 19:1745-1752.

- 78.** Ciapetti G, Granchi D, Savarino L, Cenni E, Magrini E, Baldini N, Giunti A: In vitro testing of the potential for orthopedic bone cements to cause apoptosis of osteoblast-like cells. *Biomaterials* 2002, 23:617-627.
- 79.** Dalby MJ, Di Silvio L, Harper EJ, Bonfield W: Increasing hydroxyapatite incorporation into poly(methylmethacrylate) cement increases osteoblast adhesion and response. *Biomaterials* 2002, 23:569-576.
- 80.** Dion A, Langmann M, Hall G, Filiaggi M: Vancomycin release behaviour from amorphous calcium polyphosphate matrices intended for osteomyelitis treatment. *Biomaterials* 2005, 26:7276-7285.
- 81.** Fölsch C, Goost H, Figiel J, Paletta JR, Schultz W, Lakemeier S: Correlation of pull-out strength of cement-augmented pedicle screws with CT-volumetric measurement of cement. *Biomed Tech (Berlin)* 2012, 57:473-480.
- 82.** Miyazaki T, Ohtsuki C, Kyomoto M, Tanihara M, Mori A, Kuramoto K: Bioactive PMMA bone cement prepared by modification with methacryloxypropyltrimeth-oxysilane and calcium chloride. *J Biomed Mater Res A* 2003, 67:1417-1423.
- 83.** Sugino A, Miyazaki T, Kawachi G, Kikuta K, Ohtsuki C: Relationship between apatite-forming ability and mechanical properties of bioactive PMMA-based bone cement modified with calcium salts and alkoxy silane. *J Mater Sci Mater Med* 2008, 19:1399-1405.
- 84.** Zambonin G, Colucci S, Cantatore F, Grano M: Response of human osteoblasts to polymethylmethacrylate in vitro. *Calcif Tissue Int* 1998, 62:362-365.
- 85.** Cheung KMC, Luk KD, Wong CT, Chan D, Shen XJ, Qui GX, Zheng ZM, Li CH, Liu SL, Chan WK, Leong JC: Vertebroplasty by use of a strontium-containing bioactive bone cement. *Spine* 2005, 30:584-591.
- 86.** Fölsch C, Pinkernell R, Stiletto R: Biokompatibilität von Polymer-Glaskeramik-Zement Cortoss®: In-vitro-Testung mit dem MG63-Zell-Modell. *Orthopäde* 2013, 42:170-176.
- 87.** Blattert TR, Jestaedt L, Weckbach A: Suitability of calcium phosphate cement in osteoporotic vertebral body fracture augmentation: a controlled, randomized clinical trial of balloon kyphoplasty comparing calcium phosphate versus polymethylmethacrylate. *Spine* 2009, 34:108-114.
- 88.** Heini PF, Berlemann U: Bone substitutes in vertebroplasty. *Eur Spine J* 2001, 10:S205-S213.
- 89.** Flören M, Kappe T, Reichel H: Analysis of the effectiveness of an internal hospital bone bank. *Orthopäde* 2007, 36:667-672.
- 90.** Pruss A, Kao M, von Garrel T, Frommelt L, Gürtler L, Benedix F, Pauli G: Virus inactivation in bone tissue transplants (femoral heads) by moist heat with the Marburg bone bank system. *Biologicals* 2003, 31:75-82.
- 91.** Pruss A, Seibold M, Benedix F, von Garrel T, Gürtler L, Dörffel Y, Pauli G, Göbel UB: Validation of the "Marburg bone bank system" for thermodisinfection of allogeneic femoral head transplants using selected bacteria, fungi and spores. *Biologicals* 2003, 31:287-294.
- 92.** Ranki A, Valle SL, Krohn M, Anttonen J, Allain JP, Leuther M, Franchini G, Krohn K: Long latency precedes overt seroconversion in sexually transmitted human-immunodeficiency-virus infection. *Lancet* 1987, 330:589-593.
- 93.** Tomford WW, Ploetz RN, Mankin HJ: Bone allografts of femoral heads: procurement and storage. *J Bone Joint Surg Am* 1986, 68:534-537.
- 94.** Ascherl R: Infektionsmanagement bei Megaimplantaten. *Orthopäde* 2010, 39:980-993.
- 95.** Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP: Bacterial biofilms: a common cause of persistent infection. *Science* 1999, 284:1318-1322.

- 96.** Alijanipour P, Heller S, Parvizi J: Prevention of periprosthetic joint infection: what are the effective strategies? *J Knee Surg* 2014, 27:251-258.
- 97.** Shahi A, Parvizi J: Prevention of periprosthetic joint infection. *Arch Bone Jt Surg* 2015, 3:72-81.
- 98.** Breusch SJ, Kühn KD: Knochenzemente auf Basis von Polymethylacrylat. *Orthopäde* 2003, 32:41-50.
- 99.** Parvizi J: Periprosthetic infection due to resistant staphylococci: serious problems on the horizon. *Clin Orthop Relat Res* 2009, 467:1732-1739.
- 100.** Kittinger C, Marth E, Windhager R, Weinberg AM, Zarfel G, Baumert R, Felisch S, Kuehn KD: Weinberg AM, Antimicrobial activity of gentamicin palmitate against high concentrations of *Staphylococcus aureus*. *J Mater Sci Mater Med* 2011, 22:1447-1453.
- 101.** Hess DJ, Henry-Stanley MJ, Luszczek ER, Beilman GJ, Wells CL: Anoxia inhibits biofilm development and modulates antibiotic activity. *J Surg Res* 2013, 184:488-494.
- 102.** Nold P, Hackstein H, Riedlinger T, Kasper C, Neumann A, Mernerger M, Fölsch C, Schmitt J, Fuchs-Winkelmann S, Barckhausen C, Killer M, Neubauer A, Brendel C: Immunosuppressive capabilities of mesenchymal stromal cells are maintained under hypoxic growth conditions and after gamma irradiation. *Cytotherapy* 2015, 17:152-162.
- 103.** Chang Y, Tai C-L, Hsieh P-H, Ueng SWN: Gentamicin in bone cement: a potentially more effective prophylactic measure of infection in joint arthroplasty. *Bone Joint Res* 2013, 2:220-226.
- 104.** Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S, Wildemann B, Schiller R, Stemberger A, Hass NP, Raschke M: A new model of implant-related osteomyelitis in rats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2003, 67:593-602.
- 105.** Seghrouchni K, van Delden C, Dominguez D, Benkabouche M, Bernard L, Assal M, Hoffmeyer P, Uckay I: Remission after treatment of osteoarticular infections due to *Pseudomonas aeruginosa* versus *Staphylococcus aureus*: a case-controlled study. *Int Orthop* 2012, 36:1065-1071.
- 106.** Coraca-Huber D, Ammann C, Nogler M, Fille M, Frommelt L, Kühn KD, Fölsch C: Lyophilized allogeneic bone tissue as an antibiotic carrier. *Cell Tissue Bank* 2016, Sep 8. [Epub ahead of print]
- 107.** Gristina AG: Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 1987, 237: 1588-1595.
- 108.** Fölsch C, Federmann M, Lakemeier S, Kühn KD, Kittinger C, Kerwat M, Fuchs-Winkelmann S, Paletta JRL, Roessler PP: Systemic antibiotic therapy does not significantly improve outcome in a rat model of implant-associated osteomyelitis induced by Methicillin susceptible *Staphylococcus aureus*. *Arch Orthop Trauma Surg* 2016, DOI 10.1007/s00402-016-2419-7.
- 109.** Gracia E, Laclériga A, Monzón M, Leiva J, Oteiza C, Amorena B: Application of a rat osteomyelitis model to compare in vivo and in vitro the antibiotic efficacy against bacteria with high capacity to form biofilms. *J Surg Res* 1998, 79:146-153.
- 110.** Lew DP, Waldvogel FA: Osteomyelitis. *Lancet* 2004, 364:369-379.
- 111.** Li G-Q, Guo F-F, Ou, Ou Y, Dong GW, Zhou W: Epidemiology and outcomes of surgical site infections following orthopaedic surgery. *Am J Infect Control* 2013, 41:1268-1271.
- 112.** Matl FD, Obermeier A, Repman, Friess W, Stemberger A, Kuehn KD: New anti-infective coatings of medical implants. *Antimicrob Agents Chemother* 2008, 52:1957-1963.
- 113.** Schmidmaier G, Lucke M, Wildemann B, Haas NP, Raschke M: Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review. *Injury* 2006, 37:S105-S112.

- 114.** Barckmann J: Does tobramycin impregnation of allograft bone affect implant fixation? – an experimental study in 12 dogs. *J Biomed Mater Res Appl Biomater* 2014, 102:173-180.
- 115.** Fassbender M, Minkwitz S, Kronbach Z, Strobel C, Kadow-Romacker A, Schmidmaier G, Wildemann B: Local gentamicin application does not interfere with bone healing in a rat model. *Bone* 2013, 55:298-304.
- 116.** Cheng G, Zhang Z, Chen S, Bryes JD, Jiang S: Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. *Biomaterials* 2007, 28:4192-4199.
- 117.** Donlan RM: Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002, 8:881-890.
- 118.** Penn-Barwell JG, Murray CK, Wenke JC: Local antibiotic delivery by a bioabsorbable gel is superior to PMMA bead depot in reducing infection in an open fracture model. *J Orthop Trauma* 2014, 28:370-375.
- 119.** Bruyère Garnier K, Dumas R, Rumelhart C, Arlot ME: Mechanical characterization in shear of human femoral cancellous bone: torsion and shear tests. *Med Eng Phys* 1999, 21:641-649.
- 120.** Fölsch C, Kellotat A, Rickert M, Ishaque B, Ahmed G, Pruss A, Jahnke A: Effect of thermoinfection on mechanic parameters of cancellous bone. *Cell Tissue Bank* 2016; Jun 25. [Epub ahead of print]
- 121.** Fölsch C, Federmann M, Kühn KD, Kittinger C, Kogler S, Zarfel G, Kerwat M, Braun S, Fuchs-Winkelmann S, Paletta JRL, Roessler PP: Coating with a novel gentamicinpalmitate formulation prevents implant-associated osteomyelitis induced by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in a rat model. *Int Orthop* 2015, 39:981-988.
- 122.** Friedländer GE: Bone-banking. *J Bone Joint Surg Am* 1982, 64:307-311.
- 123.** Friedländer GE, Strong DM, Sell KW: Studies on the antigenicity of bone II. Donor specific anti-HLA antibodies in human recipients of freeze-dried allografts. *J Bone Joint Surg Am* 1984, 66:107-112.
- 124.** Hansen CA, Mejdahl S, Reimann I: Bone banking in Denmark: results of a nationwide survey. *Dan Med Bull* 1994, 41:574-576.
- 125.** Müller RT, Patsalis T: Quality of bone transplantation procedure in West German orthopaedic hospitals. *Arch Orthop Trauma Surg* 1994, 113:149-152.
- 126.** Santic V, Legovic D: Bone bank at University Department of Orthopaedic Surgery in Lovran, Croatia. *Acta Med Croatia* 2007, 61:487-489.
- 127.** Finn DB: Denaturation of protein in muscle juice by freezing. *Proc Roy Soc* 1932, 111:396-411.
- 128.** Tomford WW, Starkweather RJ, Goldman MH: A study of the clinical incidence of infection in the use of banked allograft bone. *J Bone Joint Surg Am* 1981, 63:244-248.
- 129.** Kerschbaumer F, Russe W, Weiser G, Bauer R: Cryolesions of bone. An experimental study Part I: examinations in technique of controlled cryolesion on bone. *Arch Orthop Trauma Surg* 1980, 96:5-9.
- 130.** Bassett CAL: Current concepts of bone formation. *J Bone Joint Surg Br* 1962, 44:1217-1244.
- 131.** Thorén K, Aspenberg P, Thorngren KG: Lipid extracted bank bone. *Clin Orthop Relat Res* 1995, 311:232-246.
- 132.** Burwell RG, Gowland G, Dexter F: Studies in the transplantation of bone VI. Further observations concerning the antigenicity of homologous cortical and cancellous bone. *J Bone Joint Surg Br* 1963, 45:597-608.
- 133.** Donk S, Weernink T, Buma P, Aspenberg P, Sloof T, Schreurs BW: Rinsing morselized allografts improves bone and tissue ingrowth. *Clin Orthop Relat Res* 2003, 408:302-310.

- 134.** Rozen B, Brosh T, Salai M, Herman A, Dudkiewicz I: The effects of prolonged cryopreservation on the biomechanical properties of bone allografts: a microbiological, histological and mechanical study. *Cell Tissue Bank* 2009, 10:27-31.
- 135.** Heyligers IC, Klein-Nulend J: Detection of living cells in non-processed but deep frozen bone allografts. *Cell Tissue Bank* 2005, 6:25-31.
- 136.** Cornwell KG, Lei P, Andreadis ST, Pins GD: Cross-linking of discrete self-assembled collagen threads: effects of mechanical strength and cell-matrix interactions. *J Biomed Mater Res A* 2007, 80:362-371.
- 137.** Kaplan SJ, Hayes WC, Stone JL, Beaupré GS: Tensile strength of bovine trabecular bone. *J Biomech* 1985, 18:723-727.
- 138.** Keaveny TM, Wachtel TF, Ford CM, Hayes WC: Differences between tensile and compressive strengths of bovine tibial trabecular bone dependent on modulus. *J Biomech* 1994, 27:1137-1146.
- 139.** Kopperdahl DL, Keaveny TM: Yield strain behavior of trabecular bone. *J Biomech* 1998, 31:601-608.
- 140.** Viquet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD: The role of collagen in bone strength. *Osteoporosis Int* 2006, 17: 319-336.
- 141.** Wang X, Bank R, TeKoppele J, Hubbard G, Athanasiou K, Agrawal C: Effect of collagen denaturation on the toughness of bone. *Clin Orthop Relat Res* 2000, 371:228-239.
- 142.** Yamashita J, Li X, Furman BR, Rawls HR, Wang X, Agrawal CM: Collagen and bone viscoelasticity: a dynamic mechanical analysis. *J Biomed Mater Res A* 2002, 63:31-36.
- 143.** Zioupos P, Currey J, Hamer A: The role of collagen in the declining mechanical properties of aging human cortical bone. *J Biomed Mater Res* 1999, 45:108-116.
- 144.** Shimuzu K, Masumi S, Yano H, Fukunaga T, Ikebe S, Shin S: Revascularization and new bone formation in heat-treated bone grafts. *Ach Orthop Trauma Surg* 1999, 119:57-61.
- 145.** Fantner GE, Birkedal H, Kindt JH, Hassenkam T, Weaver JC, Cutroni JA, Bosma BL, Bawazer L, Finch MM, Cidade GA, Morse DE, Stucky GD, Hansma PK: Influence of the degradation of the organic matrix on the microscopic fracture behavior of trabecular bone. *Bone* 2004, 35:1013-1022.
- 146.** Urist MR, Silverman BF, Büring K, Dubuc FL, Rosenberg JM: The bone induction principle. *Clin Orthop Relat Res* 1967, 53:243-283.
- 147.** Shin S, Yano H, Fukunaga, Ikebe S, Shimuzu K, Kaku N, Nagatomi H, Masumi S: Biomechanical properties of heat treated bone grafts. *Arch Orthop Trauma Surg* 2005, 125:1-5.
- 148.** Shirakawa H, Furusawa K, Fukui A, Tadano S, Sasaki S: Changes in the viscoelastic properties of cortical bone by selective degradation of matrix protein. *J Biomech* 2013, 46:696-701.
- 149.** Mejdahl S, Hansen CA, Skjodt H, Reimann I: Human bone bank allografts stimulate bone resorption and inhibit proliferation in cultures of human osteoblast-like cells. *Acta Orthop Scand* 1998, 69:63-68.
- 150.** Piedra C, Vicario C, de Acuna LR, Garcia-Moreno C, Traba ML, Arlandis S, Marco F, Lopez-Duran L: Osteoinductive effect of bone bank allografts on human osteoblasts in culture. *J Orthop Res* 2008, 26:200-207.
- 151.** Urist MR: Physiologic base of bone-graft surgery, with special reference to the theory of induction. *Clin Orthop Relat Res* 1953, 1:207-216.
- 152.** Urist MR, McLean FC: The local physiology of bone repair with particular reference to the process of new bone formation by induction. *Am J Surg* 1953, 85:444-449.

- 153.** Laurent F, Bignon A, Goldnagel J, Chevalier J, Fantozzi G, Viguier E, Roger T, Boivin G, Hartmann D: A new concept of gentamicin-loaded HAP/TCP bone substitute for prophylactic action: in vitro release validation. *J Mater Sci Mater Med* 2008, 19:947-951.
- 154.** Oakley J, Kuiper JH: Factors affecting the cohesion of impaction bone graft. *J Bone Joint Surg Br* 2006, 88:828-831.
- 155.** Nazarian A, Meier D, Müller R, Snyder BD: Functional dependence of cancellous bone shear properties on trabecular microstructure evaluated using time-lapsed micro-computed tomographic imaging and torsion testing. *J Orthop Res* 2009, 27:1667-1674.
- 156.** Perilli E, Balean M, Öhman C, Fognani R, Baruffaldi F, Vicecotti M: Dependence of mechanical compressive strength on local variations in microarchitecture in cancellous bone of proximal human femur. *J Biomech* 2008, 41:438-446.
- 157.** Wachter NJ, Augat P, Mentzel M, Sarkar MR, Krischak GD, Kinzl L, Claes LE: Predictive value of bone mineral density and morphology determined by peripheral quantitative computed tomography for cancellous bone strength of the proximal femur. *Bone* 2001, 28:133-139.
- 158.** Wachter NJ, Krischak GD, Mentzel M, Sarkar MR, Ebinger T, Kinzl L, Claes L, Augat P: Correlation of bone mineral density with strength and microstructural parameters of cortical bone in vitro. *Bone* 2002, 31:90-95.
- 159.** Yeni YN, Hou FJ, Vashishth D, Fyhie DP: Trabecular shear stress in human vertebral cancellous bone: intra- and inter- individual variations. *J Biomech* 2001, 34:1341-1346.
- 160.** Giesen EBW, Lamerigts NMP, Verdonshot N, Buma P, Schreurs BW, Huiskes R: Mechanical characteristics of impacted morsellised grafts used in revision of total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg* 1999, 81-B:1052-1057.
- 161.** Brewster NT, Gillespie WJ, Howie CR, Madabhushi SP, Usmani AS, Fairbairn DR: Mechanical considerations in impaction bone grafting. *J Bone Joint Surg Br* 1999, 81:118-124.
- 162.** Fujishiro T, Nishikawa T, Niikura T, Takikawa S, Nishiyama T, Mizono K, Yoshiya S, Kurosaka M: Impaction bone grafting with hydroxyapatite. *Acta Orthop* 2005, 76:550-554.
- 163.** Fujita H, Nakamura T, Tamura J: Bioactive bone cement: effect of the amount of glass-ceramic powder on bone-bonding strength. *J Biomed Mater Res* 1998, 40:145-152.
- 164.** Tan F, Naciri M, Al Rubeai M: Osteoinductivity and growth factor production by MG63 osteoblastic cells on bioglasscoated orthopedic implants. *Biotechnol Bioeng* 2011, 108:454-464.
- 165.** Harper EJ: Bioactive bone cements. *Proc Inst Mech Eng H* 1998, 212:113-120.
- 166.** Sugino A, Ohtsuki C, Miyazaki T: In vivo response of bioactive PMMA-based bone cement modified with alkoxy silane and calcium acetate. *J Biomater Appl* 2008, 23:213-228.
- 167.** Ullmark G, Linder L: Histology of the femur after cancellous impaction grafting using a Charnley prosthesis. *Arch Orthop Trauma Surg* 1998, 117:170-172.
- 168.** Li Y, Leong C, Lu WW, LukKD, Cheung KM, Chiu KY, Chow SP: A novel injectable bioactive bone cement for spinal surgery: a developmental and preclinical study. *J Biomed Mater Res* 2000, 52:164-170.
- 169.** Yamamuro T, Nakamura T, Lida H, Lida H, Kawanabe K, Matsuda Y, Ido K, Tamura J, Senaha Y: Development of bioactive bone cement and its clinical application. *Biomaterials* 1998, 19:1479-1482.

- 170.** Kenny SM, Buggy M: Bone cements and fillers: a review. *J Mater Sci Mater Med* 2003, 14:923-938.
- 171.** Kokubo T, Takadama H: How useful is SBF in predicting in vivo bone activity? *Biomaterials* 2006, 27:2907-2915.
- 172.** Leeson M, Lippitt S: Thermal aspects of the use of polymethylmethacrylate in large metaphyseal defects in bone. *Clin Orthop Relat Res* 1993, 295:239-245.
- 173.** Ohashi H, Kobayashi A, Kadoya Y, Yamao Y: Effect of particles and interface conditions on fibrous tissue interposition between bone and implant. A particle challenge model in rabbit. *J Mater Science: Mater Med* 2000, 11:255-259.
- 174.** Revell PA, Braden M, Freeman MAR: Review of the biological response to a novel bone cement containing poly(ethyl methacrylate) and n-butyl methacrylate. *Biomaterials* 1998, 19:1579-1586.
- 175.** Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE: Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 2004, 351:1645-1654.
- 176.** Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM: Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 195, 49:711-745.
- 177.** Mader JT, Stevens CM, Stevens JH, Ruble R, Lathrop JT, Calhoun JH: Treatment of experimental osteomyelitis with a fibrin sealant antibiotic implant. *Clin Orthop Relat Res* 2002, 403:58-72.
- 178.** Diefenbeck M, Mückley T, Hofmann GO: Prophylaxis and treatment of implant-related infections by local application of antibiotics. *Injury* 2006, 37:S95-S104.
- 179.** Patel R: Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin Orthop Relat Res* 2005, 437:41-47.
- 180.** Giavaresi G, Meani E, Sartori M, Ferrari A, Bellini D, Sacchetta AC, Meraner J, Sambri A, Vocale C, Sambri V, Fini M, Romanò CL: Efficacy of antibacterial-loaded coating in an in vivo model of acutely highly contaminated implant. *Int Orthop* 2013, 38:1505-1512.
- 181.** Hajdu S, Lassnigg A, Graninger W, Hirschl AM, Presterl E: Effects of vancomycin, daptomycin, fosfomycin, Tigecycline and ceftriaxone on *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *J Orthop Res* 2009, 27:1361-1365.
- 182.** Jennings JA, Carpenter DP, Troxel S, Beenken KE, Smeltzer MS, Courtney HS, Haggard WO: Novel antibiotic-loaded point-of-care implant coating inhibits biofilm. *Clin Orthop Relat Res* 2015, 473:2270-2282.
- 183.** Joosten U, Joist A, Frebel T, Brandt B, Diederichs S, von Eiff C: Evaluation of an in situ setting injectable calcium phosphate as a new carrier material for gentamicin in the treatment of chronic osteomyelitis: studies in vitro and in vivo. *Biomaterials* 2004, 25:4287-4295.
- 184.** Joosten U, Joist A, Gosheger G, Liljenquist U, Brandt B, von Eiff C: Effectiveness of hydroxyapatite-vancomycin bone cement in the treatment of *Staphylococcus aureus* induced chronic osteomyelitis. *Biomaterials* 2005, 26:5251-5258.
- 185.** Lalidou F, Kolios G, Drosos GI: Bone infections and graft substitutes for local antibiotic therapy. *Surg Technol Int* 2014, 24: 353-362.
- 186.** van de Belt H, Neut D, Schenk W, van Horn J, van der Mei HC, Busscher HJ: *Staphylococcus aureus* biofilm formation on different gentamicin-loaded polymethylmethacrylate bone cements. *Biomaterials* 2001, 22: 1607-1611.
- 187.** Helbig L, Simank HG, Lorenz H, Putz C, Wöfl C, Suda AJ, Moghaddam A, Schmidmaier G, Guehring T: Establishment of a new methicillin resistant *Staphylococcus aureus* animal model of osteomyelitis. *Int Orthop* 2014, 38:891-897.

- 188.** Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S, Wildemann B, Schiller R, Haas NP, Raschke M: Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats. *Bone* 2003, 32:521-531.
- 189.** Poelstra KA, Barekzi NA, Grainger DW, Gristina AG, Schuler TC: A novel spinal implant infection model in rabbits. *Spine* 2000, 25:406-410.
- 190.** Stewart P, Costerton W: Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001, 358:135-138.
- 191.** Liu C, Kakis A, Nichols A, Ries MD, Vail TP, Bozic KJ: Targeted use of vancomycin as perioperative prophylaxis reduces periprosthetic joint infection in revision TKA. *Clin Orthop Relat Res* 2014, 472:227-231.
- 192.** Coraca-Huber DC: Staphylococcus aureus biofilm formation and antibiotic susceptibility tests on polystyrene and metal surfaces. *J Appl Microbiol* 2012, 112:1235-1243.
- 193.** Winkler H, Janato O, Berger C, Wein W, Georgopoulos A: In vitro release of vancomycin and tobramycin from impregnated human and bovine bone grafts. *J Antimicrob Chemother* 2000, 46:423-428.
- 194.** Witso E, Persen L, Benum P, Bergh K: Release of netilmicin and vancomycin from cancellous bone. *Acta Orthop Scand* 2002, 73:199-205.
- 195.** Lucke M, Wildemann B, Sadoni S, Surke C, Schiller R, Stemberger A, Raschke M, Haas NP, Schmidmaier G: Systemic versus local application of gentamicin in prophylaxis of implant-related osteomyelitis in a rat model. *Bone* 2005, 36:770-778.
- 196.** Bormann N, Schwabe P, Smith MD, Wildemann B: Analysis of parameters influencing the release of antibiotics mixed with bone grafting material using a reliable mixing procedure. *Bone* 2014, 59:162-172.
- 197.** Ofluoglu EA, Bulent E, Derya AM, Sancar BY, Akin G, Bekir T, Erhan E: Efficiency of antibiotic-loaded polymethylacrylate rods for treatment of the implant-related infections in rat spine. *J Spinal Disord Tech* 2012, 25:48-5
- 198.** Overstreet D, McLaren A, Calara F, Vernon B, McLemore R: Local gentamicin delivery from resorbable viscous hydrogels is therapeutically effective. *Clin Orthop Relat Res* 2015, 473:337-347.
- 199.** Cornell CN, Tyndall D, Waller S, Lane JM, Brause BD: Treatment of experimental osteomyelitis with antibiotic-impregnated bone graft substitute. *J Orthop Res* 1993; 11:619-626.
- 200.** Drago L, Boot W, Dimas K, Malizos K, Hänsch GM, Stuyck J, Gawlitta D, Romanò CL: Does implant coating with antibacterial-loaded hydrogel reduce bacterial colonization and biofilm formation in vitro? *Clin Orthop Relat Res* 2014, 472:3311-3323.
- 201.** Peng KT, Chen CF, Chu IM, Li YM, Hsu WH, Hsu RW, Chang PJ: Treatment of osteomyelitis with teicoplanin-encapsulated biodegradable thermosensitive hydrogel nanoparticles. *Biomaterials* 2010, 31:5227-5236.
- 202.** Hanssen AD: Local antibiotic delivery vehicles in the treatment of musculoskeletal infection. *Clin Orthop Relat Res* 2005, 237:91-96.
- 203.** Lewis CS, Katz J, Baker MI, Supronowicz PR, Gill E, Cobb RR: Local antibiotic delivery with bovine cancellous chips. *J Biomater Appl* 2011, 26:491-506.
- 204.** Lewis CS, Supronowicz PR, Zhukauskas RM, Gill E, Cobb RR: Local antibiotic delivery with demineralized bone matrix. *Cell Tissue Bank* 2012, 13:119-127.
- 205.** Hamanishi C, Kitamoto K, Tanaka S, Otsuka M, Doi Y, Kitahashi T: A self-setting TTCP-DCPD apatite cement for release of vancomycin. *J Biomed Mater Res* 1996, 33:139-143.

- 206.** Cashman JD, Jackson JK, Mugabe C, Gilchrist S, Ball K, Tredwell S, Burt HM: The use of tissue sealants to deliver antibiotics to an orthopaedic surgical site with a titanium implant. *J Orthop Sci* 2013, 18:165-174.
- 207.** Cavanaugh DL, Berry J, Yarboro SR, Dahners LE: Better prophylaxis against surgical site infection with local as well as systemic antibiotics. An in vivo study. *J Bone Joint Surg Am* 2009, 91:1907-1912.
- 208.** Inzana JA, Schwarz EM, Kates SL, Awad HA: Biomaterials approaches to treating implant-associated osteomyelitis. *Biomaterials* 2016, 81:58-71.
- 209.** Jiranek WA, Waligora AC, Hess SR, Golladay GL: Surgical treatment of prosthetic joint infections of the hip and knee: changing paradigms? *J Arthroplasty* 2015, 30:912-918.
- 210.** Kapadia BH, Berg RA, Daley JA, Fritz J, Bhave A, Mont MA: Periprosthetic joint infection. *Lancet* 2016, 387:386-394.
- 211.** Fleiter N, Walter G, Bösebeck H, Vogt S, Büchner H, Hirschberger W, Hoffmann R: Clinical use and safety of a novel gentamicin-releasing resorbable bone graft substitute in the treatment of osteomyelitis/osteitis. *Bone Joint Res* 2014, 3:223-229.
- 212.** Viguiet E, Bignon A, Laurent F, Goehrig D, Boivin G, Chevalier J: A new concept of gentamicin loaded HAP/TCP bone substitute for prophylactic action: in vivo pharmacokinetic study. *J Mater Sci Mater Med* 2011, 22:879-886.
- 213.** Winkler H: One stage uncemented revision of infected total hip replacement using allograft bone impregnated with antibiotics. *J Bone Joint Surg Br* 2008, 90:1580-1584.
- 214.** Frommelt L: Principles of systemic antimicrobial therapy in foreign material associated infection in bone tissue, with special focus on periprosthetic infection. *Injury* 2006, 37 Suppl 2:S87-S94.
- 215.** Buttaro MA, Costantini J, Comba F, Piccaluga F: The use of femoral struts and impacted cancellous bone allograft in patients with severe femoral bone loss who undergo revision total hip replacement. *J Bone Joint Surg Br* 2012, 94:167-172.
- 216.** Winkler H: Bone grafts impregnated with antibiotics as a tool for treating infected implants in orthopedic surgery – one stage revision results. *Cell Tissue Bank* 2006, 7:319-323.
- 217.** Coraca-Huber DC, Hausdorfer J, Fille M, Nogler M: Effect of storage temperature on gentamicin release from antibiotic-coated bone chips. *Cell Tissue Bank* 2013, 14:395-400.
- 218.** Coraca-Huber DC, Putzer D, Fille M, Hausdorfer J, Nogler M, Kühn KD: Gentamicin palmitate as a new antibiotic formulation for mixing with bone tissue and local release. *Cell Tissue Bank* 2014, 15:139-144.
- 219.** Coraca-Huber DC, Wurm A, Fille M, Hausdorfer J, Nogler M, Vogt S, Kühn KD: Antibiotic-loaded calcium carbonate/calcium sulfate granules as co-adjutant for bone grafting. *J Mater Sci Mater Med* 2015, DOI 10.1007/s10856-014-5344-8.
- 220.** Witso E, Persen L, Benum P, Bergh K: Cortical allograft as a vehicle for antibiotic delivery. *Acta Orthop* 2005, 76:481-486.
- 221.** Buttaro MA: High active local levels of vancomycin without nephrotoxicity released from impacted bone allografts in 20 revision hip arthroplasties. *Acta Orthopaedica* 2005, 76:336-340.
- 222.** van der Horst AS, Medda S, Ledbetter E, Liu A, Weinhold P, Del Gaizo DJ, Dahners L: Combined local and systemic antibiotic treatment is effective against experimental *Staphylococcus aureus* peri-implant biofilm infection. *J Orthop Res* 2015, 33:1320-1326.