

**Untersuchungen zur Biokompatibilität eines  
Antibiotikumträgers aus Kalziumsulfat und  
nanopartikulärem Hydroxylapatit und zur  
Pharmakokinetik von Gentamicin, Vancomycin  
und Clindamycin nach Implantation in  
Kaninchenfemura**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**THOMAS REINLE**

---

*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2005

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG  
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757  
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus der Chirurgischen Veterinärklinik  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Betreuer: Prof. Dr. K. H. Bonath

**Untersuchungen zur Biokompatibilität eines  
Antibiotikumträgers aus Kalziumsulfat und  
nanopartikulärem Hydroxylapatit und zur  
Pharmakokinetik von Gentamicin, Vancomycin  
und Clindamycin nach Implantation in  
Kaninchenfemura**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**THOMAS REINLE**

Tierarzt aus Hornberg

Gießen 2005

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

---

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. H. Bonath
2. Berichterstatter: H. Doz. Dr. A. Moritz

Tag der mündlichen Prüfung: 31. März 2005

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet



# 1. INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>3. LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>3</b>
<b>3.1. Kalziumsulfat</b>	<b>3</b>
3.1.1. Eigenschaften und Einsatzmöglichkeiten	3
3.1.2. Die Geschichte des Kalziumsulfates in chronologischer Reihenfolge	3
3.1.3. Zusammenfassung der wichtigsten Forschungsergebnisse	9
<b>3.2. Hydroxylapatit</b>	<b>10</b>
3.2.1. Eigenschaften und Einsatzmöglichkeiten	10
<b>3.3. Lokale Antibiotikumträger</b>	<b>20</b>
<b>3.3.1. Nicht resorbierbare lokale Antibiotikumträger</b>	<b>20</b>
3.3.1.1. Hydroxylapatitkeramiken	20
3.3.1.2. Kunstharze	20
<b>3.3.2. Resorbierbare lokale Antibiotikumträger</b>	<b>22</b>
3.3.2.1. Kalziumsulfat	22
3.3.2.2. Kalziumphosphat	25
3.3.2.3. Kollagene	25
3.3.2.4. Fibrin-Gentamicin-Verbund	25
3.3.2.5. Vancomycin-Spongiosa-Verbund	26
3.3.2.6. Eigenblut-Antibiotikum-Plombe	26
3.3.2.7. Resorbierbare Milchsäure-Oligomere	26
<b>3.4. Grundlegende Eigenschaften der verwendeten Antibiotika</b>	<b>27</b>
3.4.1. Gentamicin	27
3.4.2. Vancomycin	28
3.4.3. Clindamycin	29
<b>3.5. Grundlagen der Knochenentzündung</b>	<b>30</b>
<b>3.6. Allgemeine Grundlagen zu Knochenaufbau und -funktion</b>	<b>33</b>
<b>3.6.1. Knochenaufbau</b>	<b>33</b>
<b>3.6.2. Knochenarten</b>	<b>34</b>
3.6.2.1. Geflechtknochen	34
3.6.2.2. Lamellenknochen	34
<b>3.6.3. Knochenzytologie</b>	<b>35</b>
<b>3.6.4. Knochenheilung</b>	<b>36</b>
3.6.4.1. Primäre Frakturheilung	36
3.6.4.1.1. Kontaktheilung	36
3.6.4.1.2. Spalthheilung	37
3.6.4.1.3. Defektheilung	37
3.6.4.2. Sekundäre Frakturheilung	38
<b>3.7. Die polychrome Fluoreszenzmarkierung des Knochens</b>	<b>38</b>
<b>4. EIGENE UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>40</b>
<b>4.1. Implantate und Lösungen</b>	<b>40</b>
4.1.1. Implantate	40
4.1.2. Lösungen	40
4.1.2.1. Antibiotika	40
4.1.2.2. Fluorochromlösungen	40

4.1.2.3. Perfusionslösung	41
<b>4.2. Versuchstiere</b>	<b>41</b>
<b>4.3. Versuchsanordnung</b>	<b>41</b>
<b>4.4. Operationsdurchführung</b>	<b>43</b>
4.4.1. Operationsvorbereitung	43
4.4.2. Operationstechnik	43
<b>4.5. Postoperative Versuchsanordnung</b>	<b>44</b>
4.5.1. Postoperative Beobachtung	44
4.5.2. Knochenmarkierung	44
<b>4.6. Untersuchung der Antibiotikumfreisetzung in vitro und in vivo</b>	<b>45</b>
4.6.1. Antibiotikumfreisetzung in vitro	45
4.6.2. Antibiotikumfreisetzung in vivo	45
4.6.3. Mikrobiologische Bestimmung der Antibiotikumkonzentrationen im Serum	45
<b>4.7. Histologische Untersuchungen</b>	<b>46</b>
4.7.1. Entnahme von Gewebeproben für die histologische Untersuchung	46
4.7.2. Herstellung der histologischen Präparate	46
4.7.3. Färbung der Präparate	47
4.7.4. Mikroskopie	48
4.7.5. Fotografische Dokumentation der histologischen Befunde	49
<b>5. UNTERSUCHUNGSBEFUNDE</b>	<b>54</b>
<b>5.1. Antibiotikafreisetzung</b>	<b>54</b>
<b>5.2. Knochenverträglichkeit der Wirkstoffträger</b>	<b>55</b>
5.2.1. Postoperativer Verlauf und Röntgenkontrolle	55
5.2.2. 20 Tage nach Implantation	55
5.2.2.1. Röntgenologische Untersuchung	55
5.2.2.2. Histologische Untersuchung	55
5.2.2.2.1. <i>Gentamicin-Implantate</i>	55
5.2.2.2.2. <i>Clindamycin-Implantate</i>	56
5.2.2.2.3. <i>Vancomycin-Implantate</i>	57
5.2.3. 40 Tage nach Implantation	58
5.2.3.1. Röntgenologische Untersuchung	58
5.2.3.2. Histologische Untersuchung	58
5.2.3.2.1. <i>Gentamicin-Implantate</i>	58
5.2.3.2.2. <i>Clindamycin-Implantate</i>	59
5.2.3.2.3. <i>Vancomycin-Implantate</i>	59
5.2.4. Zusammenfassung der Ergebnisse	60
5.2.4.1. 20 Tage nach Implantation	60
5.2.4.2. 40 Tage nach Implantation	61
<b>6. DISKUSSION</b>	<b>62</b>
<b>6.1. Diskussion der Methode</b>	<b>62</b>
6.1.1. Tiermodell	62
6.1.2. Operationsmodell	62
6.1.3. Form und Beschickung der Wirkstoffträger	63
<b>6.2. Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>63</b>
6.2.1. Verwendete Antibiotika	63
6.2.2. Antibiotikumfreisetzung	65

<b>6.2.3. Antibiotikumgehalte der Serumproben</b>	<b>65</b>
<b>6.2.4. Wirkstoffträger</b>	<b>66</b>
6.2.4.1. Vorteile von Kalziumsulfat	66
6.2.4.2. Vorteile von nanopartikulärem Hydroxylapatit (Ostim®)	66
<b>6.2.5. Diffusionseigenschaften</b>	<b>67</b>
<b>6.2.6. Knochenverträglichkeit der Implantate</b>	<b>67</b>
<b>6.2.7. Resorptionszeiten</b>	<b>68</b>
<b>6.2.8. Substitution der Implantate durch Geflechtknochen</b>	<b>69</b>
<b>6.2.9. Ist Kalziumsulfat mit Ostim®-Zugabe ein ideales Knochenimplantat und Trägermaterial für Antibiotika?</b>	<b>70</b>
<b>6.2.10. Ist Clindamycin ungeeignet für die lokale Applikation in Knochen?</b>	<b>70</b>
<b>6.3. Schlussbetrachtung und Ausblick</b>	<b>72</b>
<b>7. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>73</b>
<b>8. SUMMARY</b>	<b>75</b>
<b>9. TABELLEN UND GRAPHIKEN</b>	<b>76</b>
<b>10. REZEPTUREN</b>	<b>80</b>
<b>10.1. Kalziumsulfatkugeln 4 mm</b>	<b>80</b>
<b>10.2. Fixierlösung</b>	<b>80</b>
10.2.1. Karnovsky-Lösung:	80
<b>10.3. Phosphatpufferlösung</b>	<b>80</b>
10.3.1. Phosphatpuffer-Stammlösung 1 M	80
10.3.2. Phosphatpuffer 1/15 M:	81
<b>10.4. Färbelösung</b>	<b>81</b>
10.4.1. Herstellung von 500 ml Toluidinblau-Färbelösung	81
<b>11. MASSEINHEITEN, ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE</b>	<b>82</b>
<b>12. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>84</b>
<b>13. DANKSAGUNG</b>	<b>104</b>



---

## 2. EINLEITUNG

---

In traumatisiertem und infizierten Knochen herrscht Minderdurchblutung, wodurch die Diffusion systemisch applizierter Antibiotika zum eigentlichen Infektionsherd eingeschränkt und die Effektivität herabgesetzt ist. Um bei der Behandlung von Knocheninfekten im Knochen selbst eine ausreichende Antibiotikakonzentration zu erreichen, müsste man deshalb bei einer systemischen Applikation derart hohe Dosen wählen, dass die erzielten Serumspiegel toxisch wären.

Um die Antibiotikakonzentrationen im Knochen zu erhöhen, wurden neue Wirkstoff-Transportsysteme entwickelt. So zum Beispiel antibiotikumbeladene Polymethylmethacrylatkugeln (PMMA-Kugeln; SCOTT UND MITARBEITER, 1988; WAHLIG, 1991) oder Knochenzemente (WAHLIG UND DINGELDEIN, 1980; JOSEFSSON UND MITARBEITER, 1981; VÉCSEI UND STARLINGER, 1982; WAHLIG, 1983), implantierbare osmotische Pumpen (PERRY UND PEARSON, 1991), resorbierbare Milchsäure-Oligomere (WEI UND MITARBEITER, 1991) und mit Wirkstoff beschicktes Kalziumsulfat (PETROVA, 1928; KOVACEVIC, 1953; MACKEY UND MITARBEITER, 1982; VARLET UND DAUCHY, 1983; MACKEY UND VARLET, 1984; VARLET UND MITARBEITER, 1985; DAHNERS UND FUNDERBURK, 1987; MOUSSET UND MITARBEITER, 1992; STRAUSS, DISS. 1999).

Trotz dieser Möglichkeit ist das chirurgische Debridement noch immer die bedeutendste therapeutische Maßnahme zur Sanierung chronischer Knocheninfektionen. Die Antibiotikatherapie ist lediglich als unterstützende Methode anzusehen.

Der Vorteil einer lokalen Antibiotikaapplikation besteht darin, am Infektionsort hohe Wirkstoffkonzentrationen freizusetzen, ohne toxische Serumspiegel zu erzeugen. Des Weiteren werden die bei der chirurgischen Versorgung entstandenen knöchernen Hohlräume durch die antibiotikahaltigen Implantate aufgefüllt.

Die Verwendung von reinen Kalziumsulfatimplantaten erzeugt ein saures Milieu, das zu Wundsekretion und Heilungsverzögerungen führen kann (COETZEE, 1980; PELTIER UND SPEER, 1981). Ziel dieser Studie ist es, ein Trägersystem aus Kalziumsulfat und nanopartikulärem Hydroxylapatit auf seine Biokompatibilität in vivo zu überprüfen.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden ferner die systemischen Antibiotikakonzentrationen nach Implantation von gentamicin-, vancomycin- und clindamycingetränkten Kugeln aus Kalziumsulfat und Hydroxylapatit in Kaninchenfemora ermittelt.

Zur Abklärung der Pharmakokinetik und der Verträglichkeit werden folgende Fragen beantwortet:

- Welche Gentamicin-, Clindamycin und Vancomycingehalte sind am Operationstag und an den folgenden Tagen im Serum messbar?
- Erfolgt der Abbau der Materialien durch Osteoklastentätigkeit oder makrophagenvermittelt?
- Welche Zellen erschließen die Implantatmaterialien?
- Welche Entzündungsreaktionen werden am Implantationsort beobachtet?

---

### 3. LITERATURÜBERSICHT

---

#### 3.1. *Kalziumsulfat*

---

##### 3.1.1. **Eigenschaften und Einsatzmöglichkeiten**

Kalziumsulfat ( $\text{CaSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), eher bekannt unter der Bezeichnung Gips oder Plaster of Paris, kommt in der Natur auch als Anhydrid ( $\text{CaSO}_4$ ) vor. Durch Erhitzen von Kalziumsulfat auf 120 bis 180 °C verliert dieses etwa 75 % seines Wassergehaltes und geht in sein Hemihydrat über, dem so genannten gebrannten Gips oder gebrannten Kalk. Bei erneuter Zugabe von Wasser härtet das Hemihydrat dann in einer exothermen Reaktion bei Temperaturen zwischen 33 und 50 °C zu einer festen Masse, dem Dihydrat, aus (HÖGSET UND BREDBERG, 1986).

Kalziumsulfat ist sowohl als Dihydrat wie auch als Hemihydrat und Anhydrid vollständig anorganisch, röntgenpositiv und nicht toxisch. Die wichtigste Eigenschaft dieses Werkstoffes für die Verwendbarkeit als Implantat in dieser Studie ist seine Porosität, die bei der Herstellung durch unterschiedliche Flüssigkeitsmengen bei der Löschung des Anhydrids in gewissen Grenzen beeinflusst werden kann. Chirurgische Implantate aus Kalziumsulfat können ohne Beeinträchtigung des Materials mittels Gammastrahlen sterilisiert werden.

##### 3.1.2. **Die Geschichte des Kalziumsulfates in chronologischer Reihenfolge**

Erste Beschreibungen über den Einsatz von Kalziumsulfat als Knochenersatzstoff findet man Ende des 19. Jahrhunderts, wo Gips unter der Bezeichnung „Plaster of Paris“ bekannt wurde. Zuvor war Gips ausschließlich zur Immobilisation verletzter Gliedmaßen in Form von Schienen und Bandagen verwendet worden.

Erstmalig erwähnte DREESMANN (1892) den Einsatz von Gips als Implantatmaterial bei osteomyelitischen oder tuberkulösen Knochendefekten des Menschen. Bei dieser so genannten Knochenplombierung wurden die Knochenhöhlen mit gelöstem Kalziumsulfat gefüllt.

STACHOW (1894), ein Mitarbeiter Dreesmanns, versorgte daraufhin operativ verursachte Knochendefekte an langen Röhrenknochen von Schafen mittels „Plaster of Paris“. Der Gips wurde vollständig resorbiert und durch autogenen Knochen ersetzt. Die Gewebereaktionen auf das Kalziumsulfat waren äußerst gering.

KRAUSE (1899) setzte das Implantatmaterial zur Behandlung von tuberkulös und osteomyelitisch entstandenen Knochenhöhlen ein.

„Plaster of Paris“ wurde in der Folgezeit in begrenztem Umfang eingesetzt, bis zum Jahre 1925 erschien jedoch keine weitere Veröffentlichung zu diesem Thema. Erst KOFMANN (1925) berichtete aus Odessa von einem Patienten, den er bereits 1912 an einem Tibiaabszeß erfolgreich mit „Plaster of Paris“ behandelt hatte. OEHLECKER (1925) aus Hamburg benutzte Gips bei der chirurgischen Behandlung gutartiger Knochentumoren und machte ausdrücklich auf die sehr gute Gewebeverträglichkeit aufmerksam.

PETROVA (1928) führte im Institut für Traumatologie in Leningrad Experimente an Hunden durch, wobei er dem Gips 10 %iges Kreolin oder 10 %iges Rivanol zusetzte, um neben nicht-infizierten auch infizierte Knochenwunden behandeln zu können. Alle Versuchstiere wurden geheilt. Im gleichen Jahr erzielte NYSTROM mit einer Gips-Rivanol-Mischung ähnlich gute Ergebnisse.

EDBERG (1930) hingegen veröffentlichte Ergebnisse von sechs Patienten mit Knochenzysten beziehungsweise einem Abszess am Os ileum, bei denen das Material abgestoßen wurde und es nicht zur Heilung kam. Bei Patienten mit tuberkulösen oder osteomyelitischen Knochenveränderungen hingegen war die Behandlung von Erfolg gekrönt.

1939 setzte NORDMANN Gips bei der Behandlung von aseptischen Knochennekrosen in zwei Fällen mit Erfolg ein.

Einen ersten detaillierten Bericht über klinische Erfahrungen beim Einsatz von „Plaster of Paris“ veröffentlichte NIELSON (1944). Er schilderte die Ergebnisse anhand von insgesamt 30 Patienten, 14 davon mit nicht-infizierten Knochendefekten. Von den 16 infizierten Defekten waren zwei tuberkulös. Der weitere Verlauf konnte in neun Fällen über einen Zeitraum von vier bis sieben Jahren verfolgt werden. Es traten keinerlei Implantat-bedingte Komplikationen auf.

BERNER beschrieb 1944 erstmals den Einsatz von Kalziumsulfat mit Zusatz von 20 % reinem Knochen zur Behandlung einer Mandibulazyste. Das Material wurde vollständig resorbiert und durch Knochen ersetzt.

Auch HÄUPTLI (1952) versorgte Patienten mit „Plaster of Paris“ und postulierte, dass Kalziumsulfat die Knochenregeneration stimuliert.

---

KOVACEVIC behandelte 1953 erstmalig hämatogene, akute Osteomyelitiden durch die Zugabe von Penicillin- und Sulfonamid-Pudern zum Kalziumsulfat mit sehr gutem Erfolg. Seine Ergebnisse wurden 1959 von KORENDIASEV durch entsprechende Tierversuche und Studien an Menschen bestätigt.

PELTIER UND LILLO (1956) berichteten über den Einsatz großer „Plaster of Paris“-Pellets, zum Teil mit frischem autologem oder homologem Knochenmaterial versetzt, an Versuchshunden. Dabei konnten sie beobachten, dass Kalziumsulfat, welches nicht von Periost überdeckt war, lediglich geringe Anzeichen einer Resorption, Regeneration oder Knochenapposition zeigte. Bei von Periost überzogenen Defekten wurde das Material hingegen vollständig resorbiert, eine Regeneration blieb jedoch aus, woraus die Untersucher schlossen, dass Kalziumsulfat selbst keine osteoinduktive Eigenschaft besitzt.

1956 publizierten NIKULIN und LJUBOVIC ihre Befunde über die subperiostale Implantation von Gips in Kaninchenknochen. Die Knochenregeneration verlief dabei schneller als beim Einsatz von autologem Knochen. Eine vermehrte Osteogenese durch Kalziumsulfat trat jedoch nur auf, wenn das Implantat in unmittelbarem Kontakt mit Periost oder Knochen stand. Ferner fanden sie unter der Resorption des Kalziumsulfates eine leichte Erhöhung des Serumkalziums sowie der alkalischen Phosphatase.

Ähnliche Untersuchungen hatten MUKOPADHAYA und MEHTA (1957) an Ziegen durchgeführt und beschrieben vergleichbare Resultate.

PELTIER mit BICKEL, LILLO und THEIN (1957) führten histologische Untersuchungen an Hunden durch und fanden kleinere Gipspartikelreste in der Knochenmatrix. Die Knochenregeneration wurde als normal beschrieben, Fremdkörperreaktionen waren nicht zu beobachten. Allerdings konnten sie an der Defektgrenze in der frühen Heilungsphase eine erhöhte Osteoklastentätigkeit nachweisen.

1958 veröffentlichten PELTIER und ORN Untersuchungen mit auto- und allogenen Knochentransplantaten, die mit Kalziumsulfatpellets angereichert waren. Danach waren allogene Knochentransplantate den autogenen überlegen. Eine Kombination von autogenem Knochenmaterial mit Gips schien weder positive noch negative Auswirkungen auf die Defektheilung auszuüben. Anders schien dies jedoch beim Einsatz von allogenen Knochenmaterial mit Gipszuschlag, wo eine deutliche Stimulation der Regeneration zu beobachten war. Bei allogenen Implantaten ohne Gips

blieb diese Stimulation aus. Als weitere positive Eigenschaft des Gipses erwähnten sie, dass bei einer Infektion des Implantationsortes das Implantat mit den Sekreten abfließt und nicht als Sequester zurückbleibt.

1959 berichtete KOVACEVIC erneut von klinischen Erfolgen bei der Behandlung osteomyelitischer Defekte mit „Plaster of Paris“ und antibiotischen Zusätzen.

PELTIER (1959) behandelte Knochenzysten, Osteomyelitiden und Tumoren beim Menschen mit Gipsimplantaten. Der Gips wird dabei im Gegensatz zu autogenem Knochen innerhalb von Wochen resorbiert. Peltier fand, dass das Material zu einer deutlich schnelleren Defektheilung beiträgt und verwies auf die gute Gewebeverträglichkeit. Die im Tierexperiment ermittelte Erhöhung des Serumkalziums konnte in der Untersuchung am Menschen nicht bestätigt werden.

BELL (1960) untersuchte die Absorptionsvorgänge verschiedener Implantate und Knochenersatzstoffe an Hunden. Er setzte die Materialien in den stark durchbluteten Musculus gastrocnemius ein. Gips wurde dabei am schnellsten, im Durchschnitt nach 4,5 Wochen, resorbiert. Autogene Knochentransplantate benötigten hingegen etwa sieben Wochen, xenogene Rinderknochen mindestens 11,5 Wochen. Andere Materialien brauchten noch länger oder wurden gar nicht resorbiert. Auffällig war, dass die Resorptionsgeschwindigkeit von der Körnung des Implantates abhing. Je gröber die Körnung, desto langsamer verlief die Resorption. Nach BELL (1964) ist autogener Knochen dem Kalziumsulfat vorzuziehen, da sich Gips zu schnell auflösen würde.

LEBOURG und BIOU (1961) beschrieben den Einsatz von „Plaster of Paris“ in Maxillen und Mandibeln des Menschen und erklärten die vergleichsweise schnellere Heilung mit der Bereitstellung anorganischer Ionen direkt am Defekt.

BAHN (1962) setzte in beide Unterkieferäste beim Kaninchen einen Defekt. Der eine diente als Leerdefekt, der andere wurde mit gelöstem Kalziumsulfat aufgefüllt. Er beobachtete, dass zunächst die Heilung in den Leerdefekten schneller voranging und erklärte dies mit dem fehlenden Druck, der bei der Aushärtung des Gipses auf das Knochenlager entsteht. Nach Resorption der Gipsimplantate ging die Regeneration hingegen im Implantatlager schneller vonstatten. 1966 berichtete BAHN über den erfolgreichen Einsatz von Kalziumsulfat im Kiefer von Menschen. Postoperative Infektionen waren selten und wenn sie auftraten, konnte der Gips leicht entfernt werden oder floss mit den infizierten Sekreten ab. Eine weitere Operation zur Entnahme von autogenem Knochenmaterial entfiel.

---

CALHOUN UND BLACKLEDGE (1962) untersuchten die Resorption von Kalziumsulfat an Hunden. Dabei wurden drei chirurgische Defekte in den Unterkiefer gesetzt. Ein Defekt wurde mit flüssigem Gips gefüllt, ein weiterer mit einem „Gelfoam“-Schwamm und der dritte diente als Leerdefekt zur Kontrolle. Auch sie kamen zu dem Ergebnis, dass Kalziumsulfat ohne nachteilige Auswirkungen implantiert werden kann und die Knochenheilung zu steigern vermag.

Zahlreiche Studien zum Thema „Plaster of Paris“ in der Zahnheilkunde folgten (zum Beispiel CALHOUN UND MITARBEITER, 1963; ALDERMANN, 1969; MC KEE UND BAILEY, 1984) 1973 konnten DE WET UND JANSEN durch den Einsatz von mit Strontium 85 markiertem „Plaster of Paris“ nachweisen, dass Kalziumsulfat rasch resorbiert und im Körper verteilt wird, was gegen eine Steigerung der Knochenregeneration durch lokale anorganische Ionen spricht.

COETZEE (1980) publizierte den Einsatz von Kalziumsulfat an 120 Hals-Nasen-Ohren-Patienten. Er beschrieb dabei eine Umstrukturierung des Fibrinnetzes zwischen Knochen und Implantat sowie des Periost und des Kalziumsulfates durch einen Zuwachs an proliferativem Bindegewebe. Dabei bestätigten sich die Beobachtungen, die Bahn (1962) sowie Peltier und Mitarbeiter (1957) an Kaninchen und Hunden gemacht hatten: In der frühen Phase kommt am Rand des Kalziumsulfates im Implantatlager zu Blutungen, Entzündungen, nekrotisierenden Knochenfragmenten, einer fibroplastischen Proliferation, Hyalinisierung von Granulationsgewebe und Osteoklastenanhäufungen. Außerdem beobachtet man eine Zunahme von mononukleären Phagozyten, wohingegen Fremdkörperreaktionen ausblieben. Auch COETZEE (1980) stellte in der Frühphase der Heilung eine verzögerte Knochenneubildung fest. Die von Bahn beim Hund beobachtete Verzögerung dauerte etwa sieben Tage, beim Menschen hingegen circa 14 Tage. Anschließend war die Knochenheilung jedoch der physiologischen Regeneration ohne Kalziumsulfat überlegen. Als Ursache gibt COETZEE (1980) den niedrigen pH-Wert der Kalziumsulfatimplantate - je nach Zubereitung etwa 6,4 bis 6,8 - im Vergleich zum physiologischen pH-Wert der extrazellulären Flüssigkeit von 7,4 an. COETZEE bezeichnete den niedrigen pH-Wert als „saure Phase“, die zudem für die Wundsekretion verantwortlich ist. Sie dauert beim Menschen etwa 14 Tage an und geht anschließend in eine „alkalische Phase“ über. Eine Erhöhung des pH-Wertes würde also zu einer

schnelleren Regeneration führen. In Versuchen, bei denen der pH-Wert durch die Verwendung einer 20 %iger NaCl-Lösung angehoben wurde, reagierten die Patienten jedoch mit einer regionalen Lymphadenitis und starken Schmerzen (COETZEE, 1980). Die Entzündung erklärte COETZEE mit einer Störung des Ionengleichgewichtes, wobei die hypertone Lösung über die regionalen Lymphgefäße in die entsprechenden Lymphknoten gelangte, die mit einer maximal fünf Tage dauernden Vergrößerung reagierten. Nach etwa vier Monaten war das gesamte Kalziumsulfat durch normales Knochengewebe ersetzt.

BEESON (1981) kam beim Einsatz von Kalziumsulfat in künstlichen Defekten des Sinus frontalis beim Hund zu ähnlichen Resultaten.

Zur Behandlung von Enchondromen verwendete GELDMACHER (1986) pastösen Gips den er mit Nebacetin siccum anmischte. Die Knochenhöhle wurde damit plombiert und anschließend mit einem Periostlappen abgedeckt. Nach maximal 10 Wochen war die Plombe resorbiert. Die Ergebnisse zeigen die induzierende Wirkung des Gipses auf die Knochenheilung sowie den guten stabilisierenden Effekt.

FRAME, BROWNE UND ROUT (1987) setzten zur Auffüllung künstlicher Defekte an Maxilla und Mandibula beim Hund poröse und solide Hydroxylapatitkörper (HA) ein, auch unter Beigabe von Kalziumsulfat. Sie bestätigten die schnelle Resorbierbarkeit und die gute Biokompatibilität der porösen HA-Materialien. Eine anfängliche leichte Entzündungsreaktion verschwand rasch, ohne die Heilung zu beeinträchtigen. Ein Anstieg der Knochenneubildung über das normale Maß hinaus konnte unter Gips nicht beobachtet werden. Da Kalziumsulfat ein Abwandern der HA-Partikel in das umliegende Gewebe verhindert, vereinfacht der Zusatz von Gips jedoch die Handhabung von Hydroxylapatitzubereitungen. Dies wurde durch Untersuchungen von PARSONS UND MITARBEITER (1988) bestätigt. Zudem beobachteten PARSONS UND MITARBEITER sowie RAWLINGS UND MITARBEITER (1988) und GEORGIADÉ und Mitarbeiter (1993), die ein Gips-HA-Gemisch bei Schädeldefekten von Katzen einsetzten, ein beschleunigtes Einwachsen von neugebildetem Knochengewebe in das Implantat.

Nach AMLER (1987) besitzt Gips keine osteogene Wirkung. Er implantierte in die vordere Augenkammer von Ratten „Plaster of Paris“. Die Knochenbildung blieb aus.

YAMAZAKI (1988) implantierte eine Mischung aus Gips und Bone Morphogenetic Protein (BMP) in den Musculus quadriceps femoris von Mäusen, eine Kontrollgruppe wurde nur

mit Kalziumsulfat behandelt. Auch hier zeigte sich, dass Gips per se, im Gegensatz zu Gips und BMP, keine Knochenbildung in der Muskulatur hervorruft.

HADJIPAVLOU UND MITARBEITER (2000) untersuchten die Unterschiede in der Osteokonduktivität von Plaster of paris und autogenem Material aus dem Hüftbeinkamm und Knochenmark. Dazu implantierte er beides im Lendenwirbelbereich L3 bis L5 von erwachsenen Schafen, indem er die Materialien in Titaniumkäfigen fixierte. Diese wurden zuvor einer Corpectomie von L4 unterzogen. In dieser Studie konnten keine osteokonduktiven Unterschiede von autogenem Knochenmaterial und Plaster of Paris gezeigt werden.

Nach WONG UND WATSON (2001) löst Gips keine allergischen Reaktionen der Haut aus. Ein bei einer Patientin beschriebenes Auftreten von blasigen Ekzemen und blutigen Blasen konnte auf das dort verwendete Benzalkoniumchlorid zurückgeführt werden.

SANTSCHI UND MCGARVEY (2003) untersuchten die invitro-Elutionsraten von Gentamicin aus einem Gips-Gentamicin-Verbund. Sie verwendeten dazu Kugeln, die nach der Tränkung mit dem Antibiotikum gassterilisiert wurden und danach fünf Monate bei Raumtemperatur gelagert wurden. Die Träger wurden zusammen mit porcinem Serum bei 37 ° C auf einem Rüttler für 14 Tage gelagert und regelmäßig Proben entnommen. Anschließend wurden die vorhandenen Antibiotikakonzentrationen und deren Wirksamkeit an equinen E. coli getestet. Dabei wurden 80 % des Gentamicins innerhalb der ersten 48 Stunden freigesetzt. Die Eluate hemmten zu jedem Zeitpunkt das Wachstum des verwendeten E. coli-Stammes. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass der verwendete Gips-Gentamicin-Verbund geeignet ist, um das Antibiotikum lokal zu applizieren.

### **3.1.3. Zusammenfassung der wichtigsten Forschungsergebnisse**

Von der Erstbeschreibung über den Einsatz von Gips als Knochenersatzstoff im Jahre 1892 bis in die achtziger Jahre des vorigen Jahrhunderts finden sich über 150 Veröffentlichungen. Bis in die neunziger Jahre des 20. Jahrhunderts fanden eingehende Studien zur Eignung von „Plaster of Paris“ als lokaler Antibiotikumträger statt. Insgesamt führten diese Untersuchungen zu folgenden Ergebnissen: Gips hat weder am Implantationsort noch an entfernten Körperregionen Nebenwirkungen. Histologisch sind nach Verwendung von Kalziumsulfat keine Fremdkörperriesenzellen nachweisbar. Lediglich im Tierversuch war eine geringgradige Erhöhung des Plasmakalziums sowie der alkalischen Phosphatase messbar. Hatte das Kalziumsulfat nach der Implantation

keinen Kontakt zum Periost oder Knochen, gab es nur wenig Anzeichen für Resorption, Regeneration und Knochenanlagerung. Bei Kontakt zum Knochen oder Periost wurden diese Prozesse jedoch beschleunigt. In der Frühphase nach Gipsimplantation zeigte sich immer wieder das gleiche Bild mit Blutungen, Entzündungen, nekrotisierenden Knochenfragmenten, bindegewebiger Proliferation und Hyalinisierung von Granulationsgewebe sowie Osteoklastenbesiedelung entlang des Implantatlagers. Der durch das Kalziumsulfat bedingte niedrige pH-Wert in dieser frühen Phase hemmt die Knochenheilung. Beim Menschen dauert diese von COETZEE (1980) als „saure Phase“ bezeichnete Periode 14, beim Tier in der Regel etwa sieben Tage. Anschließend ist die Knochenneubildung im Vergleich zur physiologischen Regeneration ohne Gips deutlich beschleunigt. Die Gipsimplantate wurden vollständig durch normalen Knochen ersetzt. Die Totalregeneration von mit Gips aufgefüllten Knochendefekten dauert beim Hund im Durchschnitt drei Monate (PELTIER UND MITARBEITER, 1957).

Der Literaturüberblick zeigt, dass Kalziumsulfat durchweg einen positiven Effekt auf die Knochenheilung hat. Die Ursachen werden kontrovers diskutiert. Auch nach über einhundert Jahren der Forschung ist der Mechanismus, der zu einer schnelleren Knochenregeneration durch die Implantation von Kalziumsulfat führt, ungeklärt. Folgende Fakten befürworten jedoch unbestritten den Gips als Implantationsmaterial: er besitzt Platzhalterfunktion, wird schnell resorbiert und beeinflusst die Knochenheilung positiv. Bei der Implantation entstehen keine Nebenwirkungen. Fremdkörperreaktionen sind bisher nicht beschrieben. Durch seine in gewissen Grenzen steuerbare Porosität ist Kalziumsulfat als Trägersubstanz für Medikamente geeignet. Der Werkstoff ist äußerst stabil, hat ein geringes Gewicht, ist leicht zu sterilisieren, zu verarbeiten und ist preiswert.

## 3.2. *Hydroxylapatit*

---

### 3.2.1. **Eigenschaften und Einsatzmöglichkeiten**

Hydroxylapatit (HA) ist ein schwerlösliches komplexes Salz ( $3 \text{Ca}_3[\text{PO}_4]_2 \times \text{Ca}[\text{OH}]_2$ ), das Bestandteil der Mineralsubstanz des Knochens und der Zahnhartsubstanz ist. Es gilt als atoxisch, nicht antigen und vollständig in das körpereigene Knochengewebe integrierbar. (CHANG, 1983; OSBORN, 1985). Dem Hydroxylapatit wird in der Literatur eine gute Biokompatibilität mit Knochengewebe und Weichteilen zugeschrieben (CHANG, 1983; KLEIN UND MITARBEITER, 1983; ROTHSTEIN, 1984; HARVEY, 1985; GUMAER UND MITARBEITER, 1986; FRAME, 1987). Nach einer Implantation von HA treten keine

schwerwiegenden Entzündungsreaktionen oder Abstoßungsreaktionen auf. Untersuchungen dazu wurden vor allem in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts durchgeführt (KLEIN UND MITARBEITER, 1983; RENOUIJ, 1985; GUMAER UND MITARBEITER, 1986; BLOCK UND KENT, 1985; FRAME, 1987). Leichte Entzündungen nach Hydroxylapatit-Einsatz wurden vor allem im Markbereich langer Röhrenknochen beobachtet. Nach LEHTINEN UND MITARBEITERN (1990) heilen sie jedoch innerhalb von maximal acht Wochen vollständig ab, wobei die Form des Implantates keinen Einfluss auf die Entzündungsreaktion haben soll. Hingegen stellten MISIEK UND MITARBEITER 1984 fest, dass in Weichteilgeweben runde Implantate im Vergleich zu scharfkantigen zum schnelleren Abklingen der Entzündung führen. Langzeitstudien haben gezeigt, dass Hydroxylapatit auch noch nach mehreren Jahren vom Körper gut toleriert wird (GUMAER UND MITARBEITER 1986). Knochendefekte heilen nach Einsatz von HA im Allgemeinen komplikationslos. Obwohl Fremdkörperreaktionen normalerweise nicht beobachtet werden, finden sich in der Nähe von dichten Hydroxylapatitkeramiken ab und zu einzelne verstreut liegende Fremdkörperriesenzellen (FRAME 1987). Bei dem auf der Oberfläche von Hydroxylapatit-Implantaten abgelagerten Knochengewebe handelt es sich um physiologisch strukturierten Knochen, der fest mit der Keramikoberfläche verbunden ist.

Allerdings ist Hydroxylapatit ein nicht (CHANG; KLEIN UND MITARBEITER, 1983; OSBORN; RENOUIJ, 1985; EGGLI UND MITARBEITER, 1987, 1988; SCHENK, 1991) beziehungsweise nur sehr schwer (SPECTOR, 1991) resorbierbares Biomaterial. Dagegen sind andere Knochenimplantate auf Kalziumphosphatbasis wie zum Beispiel Trikalziumphosphat leichter abbaubar (WAHLIG UND DINGELDEIN, 1987). In zahlreichen Experimenten suchte man nach Erklärungen für die schlechte Biodegradibilität des Hydroxylapatits. Möglicherweise haben die Zusammensetzung des Fremdstoffes sowie Unreinheiten der Rohstoffe und die Produktionsbedingungen einen Einfluss auf die Biodegradibilität (RENOUIJ, 1985; EGGLI UND MITARBEITER, 1988). Auch der Kalziumphosphatgehalt der Keramiken, die kristallographische Struktur (HA: Apatitform; TCP:  $\beta$ -Whitlockit) und die Geometrie der Implantatpartikel sind unter Umständen einflussnehmend (KLEIN UND MITARBEITER, 1983; RENOUIJ, 1985). Bedeutend für den Abbau der Kalziumphosphat-Keramiken scheint nicht zuletzt auch deren Lösungsverhalten zu sein. HUFFMANN UND MITARBEITER (1957) wiesen nach, dass Hydroxylapatit in allen geprüften Lösungsmitteln nur äußerst schwer löslich ist. In gepufferten Säuren und Basen löst sich Trikalziumphosphat um ein Vielfaches schneller als HA (JARCHO, 1981).

Auch physikalische Parameter des Materials, insbesondere die Dichte und Mikroporosität, haben einen entscheidenden Einfluss auf die Abbaubarkeit von Hydroxylapatit (DE GROOT, 1980). So sollen alle Kalziumphosphat-Verbindungen im wässrigen Milieu der Körperflüssigkeiten an ihren Grenzflächen zu Hydroxylapatit umgesetzt werden - und minimale Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung somit keine Rolle mehr spielen. Für De Groot (1980) ist die Implantatstruktur respektive die Porosität einer Keramik, insbesondere aber die Porengröße die wichtigste Einflussgröße für die Höhe der Bioresorptionsrate. Mikroporen können demnach die Bioresorption durch eine erhöhte Aufspaltungsrate an den Kristallgrenzen fördern. Auf diese Weise werden die kristallinen Brückenverbindungen des Kristallgefüges gelöst, so dass die Einzelkristalle phagozytiert werden könnten (WEINLÄNDER UND MITARBEITER, 1987). Andere Wissenschaftler sind hingegen der Meinung, dass die Porosität keinen Einfluss auf die Abbaubarkeit von HA-Keramiken hat, wenngleich poröse Implantate stark von neugebildetem Knochen penetriert werden (KLEIN UND MITARBEITER, 1983; RENOOIJ, 1985; EGGI UND MITARBEITER, 1987, 1988).

DINGELDEIN UND MITARBEITER (1994) implantierten Hydroxylapatit-Keramik in ein spongiöses Knochenlager von Kaninchen. Der Kristallverbund wies Risse auf, die höchstwahrscheinlich durch einen Fehler im Sintervorgang bedingt waren. Die fehlerhaften Kristallbrücken führten zu Auflösungserscheinungen und vermehrt zu freien Einzelkristallen im Implantatbereich, die von zahlreichen Makrophagen aufgenommen wurden. Das Gesamtkeramikgerüst wurde jedoch nicht abgebaut; lediglich die einzelnen Kristallite unterlagen der Degradibilität. Die Spongiosakeramik wurde nicht in das Remodeling des anliegenden Knochens integriert. Eine Resorption durch Osteoklasten war nicht gegeben. Entgegen dieser Beobachtung wird in der Literatur immer wieder darauf hingewiesen, dass auch die als dauerhaft bezeichneten Substanzen einer gewissen, wenn auch sehr langsamen Degradibilität unterliegen. Obwohl synthetisches HA gemeinhin als nicht resorbierbar angesehen wird, berichtet man in einigen Untersuchungen von seinem verzögerten biologischen Abbau.

Bis auf wenige Ausnahmen wird Keramiken auf der Grundlage von Hydroxylapatit eine osteoinduktive Potenz abgesprochen (MC DAVID UND MITARBEITER, 1979; CHANG, 1983; BLOCK UND KENT, 1985; KENT UND MITARBEITER, 1986; REDDI, 1987; YAMAZAKI, 1988; ALBERS, 1990; SCHENK, 1991). Nur wenige Autoren wie beispielsweise KLEIN UND MITARBEITER (1983) oder YAMAZAKI (1988) vertreten die Meinung, dass HA ein gewisses osteogenetisches Potential besitzt. Eine Induktion der heterotropen Knochenbildung

findet nach YAMAZAKI (1988) lediglich bei porösen Hydroxylapatitimplantaten statt. Bei kompakten Keramiken unterbleibt die heterotrophe Knochenbildung gänzlich. Er erklärt dies durch eine höhere Freisetzung von Kalziumphosphat-Ionen in porösen Keramiken, die über den Mechanismus einer Ionenaustausch-Reaktion die Osteogenese stimulieren. KLEIN UND MITARBEITER (1983) verglichen das osteogenetische Potential von HA und Trikalziumphosphat. Dabei zeigte Hydroxylapatit eine höhere Osteogenität als Trikalziumphosphat. Vergleiche der beiden Substanzen zeigten, dass die Hydroxylapatit-Granula in Bezug auf die peri- und interpartikuläre Osteogenese eine dreimal größere Aktivität aufweisen (OSBORN UND NEWSELY, 1980). WEINLÄNDER (1987) macht die Einschränkung, dass HA per se zwar nicht osteoinduktiv wirksam ist, aber die Fähigkeit besitzt, osteogenetisch aktive Zellen zur Knochenneubildung anzuregen. Hydroxylapatit dient also lediglich als Träger und Leitschiene für Zellen mit osteogenem Potential und besitzt damit die Fähigkeit zur Osteokonduktion (OSBORN, 1985).

Hydroxylapatit ist ein bioaktives Material, bei dem die Osteogenese primär und direkt auf der Implantatoberfläche einsetzt (KLEIN UND MITARBEITER, 1983; OSBORN, 1985; EGGLI UND MITARBEITER 1988). Dabei sind die Grenzflächen der Hydroxylapatit-Keramik osteotrop und dienen als adäquate Matrix für die Differenzierung der Osteoblasten sowie für die Mineralisationsvorgänge (OSBORN, 1985). Von größter Wichtigkeit ist dafür allerdings eine subperiostale Implantation des Materials (BLOCK UND KENT, 1985; FRAME, 1987). Nur so kann eine neue Knochenformation entstehen, die in direkter chemischer Verbindung zu den Keramikpartikeln steht, wodurch das Hydroxylapatit in die Lage versetzt wird, ein so genanntes „*bone-bonding*“ einzugehen (CHANG, 1983; KLEIN UND MITARBEITER, 1983). Die sich in vivo auf den Implantaten ablagernde Phase ist mineralisch und weist die Eigenschaften von Knochenapatit auf. Es handelt sich dabei um einen biologischen Apatit, bei dem die Elektronendiffraktionsmuster und IR-Spektren denen natürlicher Knochensubstanz ähneln. Die diesbezüglichen Unterschiede zu synthetischem Hydroxylapatit sind signifikant. Man vermutet, dass diese biologische Apatitschicht als Substrat für die nachfolgende Proteinadsorption sowie die Anlagerung von Knochenzellen fungiert. Eine solche Ablagerung von biologischem Apatit ist eine obligatorische Vorläuferphase für das "bone-bonding" (SPECTOR, 1991). Detaillierte Erkenntnisse über die Feinstruktur im Bereich der Grenzfläche Hydroxylapatit / Knochen sind in den elektronenmikroskopischen Studien von TRACY UND DOREMUS (1984) sowie DIEBERT UND FISCHER-BRANDIES (1988) beschrieben. Bei dem sich auf der Implantatoberfläche ablagernden Knochen handelt es sich um normal strukturierten

Geflechtknochen, der sukzessive durch reifen Lamellenknochen ersetzt wird (FRAME, 1981; KLEIN UND MITARBEITER, 1983; HOLMES UND HAGLER, 1987). Dabei liegt die Rate an neugebildetem Knochen mit 1,8 Mikrometern pro Tag in etwa im Bereich der Knochenapposition von normalem Knochen (1,0 bis 1,4 Mikrometer / Tag) (HOLMES UND MITARBEITER, 1987). Eine Untersuchung von BLOCK UND KENT (1985) zeigt, dass sich nach Zugabe von autogenem Knochen die Knochenneubildung schneller vollzieht. Das Gefäßsystem sowie das Havers'sche System sind bei der Verwendung von HA und autogenem Knochenmaterial besser ausgebildet.

Der neu gebildete Knochen stellt eine feste Verbindung zwischen dem Hydroxylapatit und dem umliegenden Gewebe her (FRAME, 1981; KENT UND MITARBEITER, 1986). Dabei wird das Biomaterial vollständig in den Knochen integriert (FRAME, 1981; OSBORN, 1985, NAJJAR UND MITARBEITER, 1991). Von größter Wichtigkeit dafür sind sowohl Formschluss und Primärstabilität ("Presssitz") während der Implantation als auch die mechanische Ruhe im Implantatbett über einige Wochen post operationem, da eventuelle wiederholt auftretende Relativbewegungen die direkten Ossifikationsvorgänge behindern (SCHENK, 1991). Nach Abschluss der Heilungsvorgänge ist das Implantat morphologisch nicht mehr von dem neuentstandenen Knochengewebe zu differenzieren. In der rasterelektronenmikroskopischen (REM) Untersuchung wird dabei deutlich, dass die Mineralphasen von Knochen und Implantat direkt ineinander übergehen (OSBORN, 1985). Die Kontaktfläche zwischen den Hydroxylapatitanteilen und dem neu gebildeten Knochen ist extensiv; sie erstreckt sich über weite Bereiche (RENOOIJ, 1985). JARCHO (1992) zeigt auf kristalliner Ebene einen ununterbrochenen Kontakt zwischen dem keramischen Hydroxylapatit und dem Knochenmineral.

Zwischen Knochen- und Implantatgrenzfläche entsteht im Zeitraum von wenigen Wochen ein einheitlicher, fester Verbund (RENOOIJ, 1985), wobei zu bemerken ist, dass ein solch ausschließlicher Knochenkontakt nur bei Hydroxylapatitkeramiken auftritt. Das Haftungsvermögen zwischen Implantat und Knochen wird so immens, dass eine mechanische Trennung („Push-out-Test“) von fest eingewachsenen Hydroxylapatitkeramiken aus dem umgebenden Knochen unmöglich ist. Die dafür benötigten Kräfte übersteigen bei weitem die mechanische Belastbarkeit sowohl des Knochens als auch des Implantates, wodurch es zu Rissen und Brüchen auf beiden Seiten des Interface kommt. (DRISKELL UND MITARBEITER, 1973; EITENMÜLLER UND MITARBEITER, 1990).

Beim Integrationsprozess von Hydroxylapatitkeramiken hat insbesondere die Struktur des Implantates einen großen Einfluss auf die Geschwindigkeit und den Umfang des Knocheneinwuchses. Kompakte Implantate aus dicht gesinterterem Material weisen zwar eine höhere Stabilität sowie Druck- und Zugfestigkeit auf, haben aber den Nachteil, dass die Knochenintegration in die Implantate nur gering ist (YAMAZAKI, 1988). Zum Teil wird in der Literatur beschrieben, dass bei soliden Hydroxylapatit-Keramiken lediglich ein Bindegewebesaum gebildet wird (FROUM UND MITARBEITER, 1982; MOSKOW UND LUBARR, 1983), während die porösen Strukturen auch knöchern integriert werden (KENNEY UND MITARBEITER, 1985; MOORE UND MITARBEITER, 1986; OSBORNE UND MITARBEITER, 1980). Hingegen beschreibt ALBERS (1990) eine osteotrope Leistungsfähigkeit sowohl bei dicht gesinterter als auch bei porös hergestellten Implantaten. Allerdings besteht bei kompakten Implantaten im Vergleich zu porösen Materialien eine zeitliche Verzögerung der knöchernen Integration die vom Implantationsort im Knochen abhängt. Wichtig ist stets die subperiostale Lage. Eine offenporöse Struktur fördert das zügige Durchdringen der Keramik mit Knochengewebe (KÖSTER UND MITARBEITER, 1976, YAMAZAKI, 1988) dabei folgt die Knochenregeneration dem angebotenen Leitgerüst. Durch die festgelegten Porenparameter wie Größe und Volumen zeigt eine solche Keramik eine hervorragende Eignung als Implantat (KÖSTER UND MITARBEITER, 1976).

Nach SCHENK (1991) repräsentiert die Spongiosa die Idealstruktur des Knochens. Diese soll durch poröse Implantate imitiert werden. Die ideale Porenstruktur wurde bisher nur bei Hydroxylapatit-Blöcken aus Koralle (Interpore<sup>®</sup>) oder aus gesinterter Spongiosa (Pyrost<sup>®</sup>) erreicht. Ein großer Nachteil dieser Implantate ist jedoch deren geringe Zug- und Druckfestigkeit. Daraus leitet sich das Ziel ab, eine Keramik herzustellen, die sowohl das geforderte Porengefüge als auch die notwendige mechanische Belastbarkeit aufweist (BAUER UND MITARBEITER, 1987). Für die Einsprossung von Bindegewebe ist ein Mindestporendurchmesser von fünf bis 15 Mikrometern erforderlich. Mineralisiertes Knochengewebe kann sich erst in Poren von etwa 100 Mikrometern Durchmesser entwickeln, während die Bildung osteonähnlicher Strukturen erst ab einem Porendurchmesser von 200 Mikrometern erfolgt (KLAWITTER UND HULBERT, 1971; zitiert nach SCHENK, 1991). Nach EGGLI UND MITARBEITER (1988) nehmen neben der Porengröße vor allem die Verbindungen zwischen den Poren auf das Einwachsen von neuem Knochen Einfluss. Die Verbindungen der einzelnen Poren sind bei Implantaten mit geringem Porendiameter infolge der Dünnwandigkeit der Keramiken besser. Das

neu gebildete Gewebe kann dadurch zügiger penetrieren. Nachteilig ist bei solchen Keramiken die geringe mechanische Stabilität der Implantate. So stellt Hydroxylapatit ein sprödes Material dar, welches für größere Biegekräfte ungeeignet ist (FRAME, 1981). Die Druckfestigkeit kompakter Kalziumphosphat-Keramiken liegt über der von kortikalem Knochen, während die Druckfestigkeit poröser Keramiken in exponentieller Abhängigkeit vom Volumenanteil der Poren steht und dem spongiösen Knochen gleicht. Um den physiologischen Belastungen in einem Implantatbett gewachsen zu sein, ist deshalb bei Kalziumphosphat-Keramiken eine Volumendichte von mindestens 50 % erforderlich (SCHENK, 1991).

Die in klinischer Anwendung befindlichen HA-Keramiken sind in Folge eines Sinterungsprozesses bei der Herstellung praktisch unlöslich und damit nicht oder nur extrem langsam abbaubar. Sie führen jedoch bei stabiler Implantation zu einem direkten Verbund zwischen Keramik und neugebildetem Knochen, womit eine Interposition von Bindegewebe ausbleibt. Infolge des festen Kristallverbundes können sie sich im Laufe von Modeling und Remodeling nicht an die veränderten biomechanischen Gegebenheiten anpassen. Diese Materialien finden hauptsächlich dort Anwendung, wo größere spongiöse Defekte aufzufüllen sind und keine Resorption des Materials erwünscht ist.

Für Anwendungsbereiche, bei denen eine Resorption des Fremdmaterials und sein Ersatz durch neugebildetes Knochengewebe wünschenswert ist, wurde daher nach einem Material gesucht, das sich in seiner Löslichkeit von den herkömmlichen Keramiken unterscheidet, wie diese aber biokompatibel ist und eine ausgeprägte Affinität zu Knochengewebe besitzt.

In Russland wurde daher 1995 ein unter der Bezeichnung Ostim<sup>®</sup> zugelassener, vollsynthetischer, nanopartikulärer, phasenreiner Hydroxylapatit entwickelt. Er liegt in Form einer wässrigen Paste vor und wird als Knochenersatzmaterial bisher in den chirurgischen Disziplinen Traumatologie, Orthopädie und Kieferchirurgie sowie in der Zahnheilkunde verwendet (DINGELDEIN UND ENGART, 2001).

Ostim<sup>®</sup> entspricht den oben genannten Anforderungen und kommt in seinen chemisch-physikalischen Eigenschaften dem Knochenmineral sehr nahe. Seine pastöse Beschaffenheit erleichtert die Applikation und ermöglicht eine rasche Einwanderung knochenbildender Zellen, die sich in dem mit Kalzium- und Phosphationen

---

angereicherten Milieu rasch zu Osteoblasten differenzieren und in der Ostim<sup>®</sup>-Matrix proliferieren (DINGELDEIN UND MITARBEITER, 1999)

Ostim<sup>®</sup> ist ein kristallines Material. Die Größe der lang gestreckten plättchenförmigen Kristalle liegt im Nanometerbereich, sie beträgt im Mittel 18 nm. Mit der Feinheit der Kristalle korreliert eine sehr große Oberfläche, die bei Ostim in getrocknetem Zustand ca. 100 m<sup>2</sup>/g entspricht. Da die Kristalle bei der Trocknung Agglomerate bilden ist die reale Oberfläche noch größer. Im Vergleich hierzu hat zum Beispiel Kalziumsulfat-Pulver nur eine Oberfläche von zwei m<sup>2</sup>/g (SUVOROVA UND BUFFAT, 1999; GLOEDE UND WINKEL, 1999)

Ostim<sup>®</sup> wird vollsynthetisch hergestellt. Es fällt in Form einer wässrigen Suspension an, die je nach Anwendungszweck auf eine bestimmte Konzentration eingestellt wird, wobei das Material mit zunehmender Viskosität eine pastöse Konsistenz annimmt. Zurzeit sind Pasten mit einem Ostim<sup>®</sup>-Anteil von zwischen 25 % bis 35 % in Untersuchung. Die Paste ist weiß und geruchlos, sie enthält keine körnigen Anteile und ist leicht und formschlüssig zu applizieren. Sie wird zu je 2 und 5 ml in einer Applikationskartusche gebrauchsfertig und steril angeboten (DINGELDEIN UND ENGART, 2001).

Die Paste wird Gamma-Strahlen-sterilisiert. Mittels geeigneter Untersuchungsmethoden konnte der Nachweis erbracht werden, dass unter der Bestrahlung keine Radikalbildung erfolgt (BÄCHMANN, 2001; PORSTENDÖRFER, 2000).

Durch die Verlagerung von kritischen Arbeitsschritten bei der Herstellung von Ostim<sup>®</sup> in einen Reinraumbereich wird eine bakterielle Kontamination weitgehend ausgeschlossen. Daher konnten auch bei wiederholten Untersuchungen keine Pyrogene im Ostim<sup>®</sup> nachgewiesen werden (DINGELDEIN UND ENGART, 2001).

Der Wirkungsmechanismus von Ostim<sup>®</sup> beruht auf einer lokalen Stimulation der Knochenheilung. Nach Applikation in örtlich begrenzte Knochendefekte, die aufgrund der pastösen Konsistenz einfach und formschlüssig aufgefüllt werden können, kommt es um den 7. bis 10. Tag zur Einsprossung von Kapillaren in die Ostim<sup>®</sup>-Matrix. Osteoblastenvorläuferzellen migrieren in das Implantat, siedeln sich dort an und differenzieren zu Osteoblasten (DINGELDEIN UND MITARBEITER, 1999). Daher ist es notwendig, dass Ostim<sup>®</sup> stets so implantiert wird, dass es Kontakt zum vitalen Knochenlager hat. Nur dann kann die schnelle Revaskularisierung mit anschließender Knochenneubildung erfolgen. In einem avitalen Lager zeigt Ostim<sup>®</sup> keine Wirkung, da

infolge einer fehlenden Gefäßeinsprossung auch keine knochenbildenden Zellen einwandern können (DINGELDEIN UND ENGART, 2001).

An der Russian State Medical University in Moskau wurden fünf verschiedene Studien an insgesamt 442 Patienten durchgeführt. In der Traumatologie und Orthopädie wurde Ostim<sup>®</sup> bei 53 Patienten mit Frakturen des Humerus, des Radius, der Ulna, des Femur, der Tibia und der Clavicula angewendet. Zum Vergleich wurde eine Gruppe von 48 Patienten mit einem ähnlichen Frakturverteilungsbild und einer ähnlichen Alters- und Geschlechtsverteilung herangezogen und mit konventionellen HA-Keramiken behandelt (KUZMENKO ET AL, 1993).

Neben ausgedehnten biochemischen Untersuchungen wurden bei diesen Patienten der Kalzium-, Kalium- und Natriumgehalt im Serum überprüft und mit den Werten der Kontrollgruppe verglichen. Es fand sich zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied. Die Laboruntersuchungen zur Leber- und Nierenfunktion ergaben ebenfalls keine Unterschiede zu denen der Kontrollgruppe. Der Heilungsverlauf wurde röntgenologisch kontrolliert und beurteilt. Die Untersucher ziehen folgende Schlüsse aus ihren Befunden: Ostim<sup>®</sup>-Paste ist einfach anzuwenden und führt nicht zu Entzündungsreaktionen am Implantationsort. Sie hat keinen negativen Einfluss auf Leber- oder Nierenfunktionen und beeinflusst den Mineralstoffwechsel nicht. Sie bedingt keine Verlängerung der Operationszeit; selbst die Implantation in entzündete Bereiche führt nicht zu Komplikationen oder einem verzögerten Heilverlauf.

Ostim<sup>®</sup> wurde bei weiteren 48 Patienten mit Schenkelhalsfrakturen, Frakturen der Ulna sowie bei Patienten mit verzögerter Knochenheilung angewendet. Am Implantationsort wurden keine lokalen Entzündungsanzeichen beobachtet. Es kam zu keiner Verzögerung der Knochenheilung.

In der Kieferchirurgie wurde Ostim<sup>®</sup> bei 27 Patienten mit Frakturen des Unterkiefers, sowie radikulären Zysten und posttraumatischer Osteomyelitis am Unterkiefer angewendet. Zur Untersuchung kam eine 30 %ige Paste. Vor der Applikation wurde ein sorgfältiges Debridement beziehungsweise eine Zystektomie durchgeführt. Die Wunden wurden nach der Applikation verschlossen. Auch hier fanden sich keine Hinweise auf eine Beeinflussung der Leber- und Nierenfunktion durch Ostim<sup>®</sup>. Der Kalzium- und Phosphatgehalt im Serum blieb nach der Applikation unverändert; er wurde über insgesamt 21 Tage nach der Implantation bestimmt (ZUYEV UND MITARBEITER, 1993). Bei den behandelten Patienten traten weder Komplikationen, noch Verzögerungen der

---

Knochenheilung auf. Im Gegenteil, die Applikation von Ostim<sup>®</sup> beschleunigte den Knochenheilungsprozess, was durch die Ermittlung der Mineralisationsrate im Frakturbereich oder im Knochendefekt belegt wurde.

BEZRUKOV UND MITARBEITER (1998) verwendeten Ostim<sup>®</sup> bei weiteren 49 Patienten mit Zysten im Kieferbereich. Die Kontrollgruppe bestand aus 43 Patienten. Die Nachbeobachtungszeit betrug ein Jahr. Die Röntgenbefunde zeigten in der Ostim<sup>®</sup>-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe drei Monate post operationem ein schnelleres Auffüllen der Zystenbereiche mit neu gebildetem Knochen.

In der Kieferchirurgie setzten PANKRATOV UND MITARBEITER (1995) Ostim<sup>®</sup> bei 65 Patienten mit Frakturen des Unterkiefers ein. Die Ergebnisse wurden mit denen von 60 konventionell behandelten Patienten verglichen. Die Komplikationsrate war in der Ostim<sup>®</sup>-Gruppe geringer und es kam in keinem Fall zu einer Verzögerung der Knochenheilung.

In der Parodontologie wurde Ostim<sup>®</sup> bei insgesamt 200 Patienten angewendet und von ZUYEV UND MITARBEITER (1996) mit 195 konventionell behandelten Patienten verglichen. Die Vergleichsgruppe erhielt anstelle von Ostim<sup>®</sup> demineralisierten Knochen. Beurteilt wurden die Tiefe der Parodontose-Taschen vor und nach der Behandlung, der Hygieneindex und der Blutungsindex. Ostim<sup>®</sup> zeigte im Vergleich zur demineralisierten Knochenmatrix die Tendenz zur effizienteren Knochenregeneration und mit 1,5 % eine geringere Komplikationsrate als die Kontrollgruppe mit 3,5 %. Die Autoren empfehlen bei abszedierender Parodontose eine Kombination von Ostim<sup>®</sup> mit wirksamen Antibiotika. Ostim<sup>®</sup> war in dieser Studie auch wirksam bei Patienten mit deutlichen Infektionsanzeichen und unterschied sich damit positiv von der demineralisierten Knochenmatrix, die im infizierten Bereich zu keinem guten klinischen Resultat führte.

Die Vorteile von Ostim<sup>®</sup> lassen sich nach DINGELDEIN UND ENGART (2001) wie folgt zusammenfassen: Ostim<sup>®</sup> ist ein vollsynthetischer, nanopartikulärer, phasenreiner Hydroxylapatit. Ostim<sup>®</sup> beschleunigt die Proliferationsrate von knochenbildenden Zellen und stimuliert die Knochenheilung. In bisherigen toxikologischen Studien erwies es sich als sehr gut verträglich. Ostim<sup>®</sup> verfügt im Gegensatz zu Hydroxylapatitkeramiken (gesinterte Materialien) über ein deutlich größeres Löslichkeitspotential, welches aber nach der Implantation nicht zu einer Erhöhung des Kalziumspiegels im Serum führt. Ostim<sup>®</sup> verfügt über eine hohe Pufferkapazität.

### 3.3. Lokale Antibiotikumträger

---

#### 3.3.1. Nicht resorbierbare lokale Antibiotikumträger

##### 3.3.1.1. Hydroxylapatitkeramiken

Implantate aus Hydroxylapatit (HA) werden entweder synthetisch oder aus biologischen Ausgangsmaterialien wie Knochen oder Koralle hergestellt. HA gehört mit dem  $\beta$ -Trikalziumphosphat zu den verbreitetsten und am weitesten untersuchten Kalziumphosphatkeramiken. Das Material ist biokompatibel, reizlos und stabil. Die Keramiken werden in unterschiedlicher Porengröße und Volumendichte hergestellt. Nachteilig ist jedoch, dass HA im Gegensatz zum Trikalziumphosphat nicht resorbierbar ist. Das kommunizierende Porensystem mit seinem trabekulären Gerüst ermöglicht jedoch eine vollständige Integration in den umgebenden Knochen. Die hohe Porosität führt ferner zu einer rapiden Freisetzung von integrierten Wirkstoffen, weshalb für eine gleichmäßige Wirkstofffreisetzung über acht Tage sowohl leicht- als auch schwerlösliche Gentamicinsalze verwendet werden können (WAHLIG UND DINGELDEIN, 1987; CORNELL UND MITARBEITER, 1993)

##### 3.3.1.2. Kunstharze

BUCHHOLZ UND ENGELBRECHT (1970) untersuchten den unter der Bezeichnung Palacos<sup>®</sup> vertriebenen gentamicinhaltigen Knochenzement, der bei der Implantation von Prothesen zum Einsatz kommt. Es gelang ihnen, die Infektionsrate drastisch zu senken. Die Ergebnisse wurden in Folgeuntersuchungen von allen Autoren bestätigt (BUCHHOLZ UND ENGELBRECHT, 1970; BUCHHOLZ UND GARTMANN, 1972; WAHLIG UND BUCHHOLZ, 1972; WAHLIG UND MITARBEITER, 1972, 1972; WAHLIG UND DINGELDEIN, 1980; SALVATI UND MITARBEITER, 1986; WAHLIG UND MITARBEITER 1984). Gentamicin erwies sich dabei wegen seiner guten Eigenschaften als Mittel der Wahl. Es wird durch Diffusion aus dem Zement freigesetzt, das postoperative Hämatom sowie Wundsekrete fungieren als Transportmedien.

Aufgrund der Idee von KLEMM (1974, 1976, 1977, 1979, 1980), Antibiotikaträger auch zur Behandlung von chronischen Knocheninfekten anzuwenden, wurden neue Applikationsformen etabliert. Es wurden nunmehr keine massiven Blöcke mehr verarbeitet (VOORHOEVE UND STÖHR, 1973). Zur Anwendung kamen extrakorporal ausgehärtete und mit Antibiotika beladene Kugeln aus Kunstharz (WAHLIG UND BERGMANN, 1974; DINGELDEIN UND WAHLIG, 1976; WAHLIG, BERGMANN UND DINGELDEIN, 1976; WAHLIG UND MITARBEITER, 1976, KNAEPLER UND MITARBEITER, 1985). Vorerst

wurden die PMMA-Kugeln lose in die Knochenhöhle eingelegt. Später reihte man sie auf chirurgischen Draht. Diese so genannten Septopal-Ketten<sup>®</sup> bestehen aus Kugeln mit einem Durchmesser von 7 mm und enthalten 7,5 mg homogen eingearbeitetes Gentamicinsulfat sowie Zirkoniumoxid als Röntgenkontrastmittel. Die Ketten werden in unterschiedlicher Länge und mit unterschiedlicher Anzahl an Kugeln angeboten. Insbesondere für die pädiatrische Chirurgie aber auch für andere chirurgische Indikationen wurden die Septopal-10er-Miniketten<sup>®</sup> entwickelt, deren Kettenglieder elliptische Formen aufweisen (3,3 mm x 5,3 mm) und je 2,8 mg Gentamicinsulfat enthalten. Die Fixation auf Draht ermöglicht ein einfaches Einbringen in den Implantationsort und die ebenso problemlose Entfernung der Implantate. Sofern man die erste Kugel der Kette über der Hautoberfläche belässt, kann das gesamte Implantat ohne erneuten chirurgischen Eingriff innerhalb von 10 Tagen entfernt werden. Wird dieser Zeitraum allerdings überschritten, erfolgt eine bindegewebige Einkapselung des Implantates, was die Entnahme erschwert. Häufig zerreißt der Draht dann. Im Allgemeinen rufen die PMMA-Kugeln keine Entzündung hervor, nach etwa sechs Monaten kann jedoch eine Fremdkörperreaktion erfolgen.

WAHLIG UND MITARBEITER (1978) publizierten eine Studie über gentamicinbeladene PMMA-Kugeln. Diese wurden bei an Osteomyelitis erkrankten Hunden in die Markhöhle der infizierten Femora implantiert und die Pharmakokinetik des Wirkstoffes in Serum und Urin ermittelt. Darüber hinaus entnahmen sie zu unterschiedlichen Zeitpunkten Gewebeproben für die Bestimmung der lokalen Gentamicinkonzentrationen. In vitro wurden dabei von den Kugeln bis zum 80. Tag therapeutisch wirksame Konzentrationen freigesetzt. In vivo war die Infektion sechs Wochen nach Implantation der PMMA-Kugeln bakteriologisch, histologisch und klinisch abgeheilt. Der Knochen der unbehandelten Kontrolltiere blieb hingegen noch weitere Wochen und Monate infiziert. Die Hohlräume, die sich zwischen den Kugeln befanden, wurden innerhalb von vier bis sechs Monaten mit Spongiosa aufgefüllt. Der Kontrolle dienten unbehandelte Tiere, deren Knochen noch über Monate infiziert blieben.

Die Implantate waren sehr gut verträglich. Mikroskopisch konnte aber eine geringgradige Fremdkörperreaktion beobachtet werden. Pharmakokinetisch war nach zwei Stunden sowohl im Serum als auch im Blut der maximale Wirkstoffspiegel erreicht. Im Blut konnte nach 10 Tagen kein Antibiotikum mehr nachgewiesen werden, wohingegen im Harn bis zum 117. Tag Spuren messbar waren. Die höchsten Wirkstoffkonzentrationen wurden in Gewebeproben, am Ort der Infektion, gemessen.

Sie lagen für etliche Wochen deutlich höher als die minimale Hemmkonzentration (MHK). Bei einer parenteralen Antibiotikumapplikation von 80 mg Gentamicin, die intramuskulär verabreicht wurden, konnten Blutspiegel von 3 – 5 µg/ml und Harnkonzentrationen von 80 bis 200 µg/ml ermittelt werden. Im Falle der Verwendung von PMMA-Kugeln, die am ersten Tag etwa die gleiche Menge Antibiotikum freisetzen, liegen die Werte mit nur 0,5 µg/ml im Serum und 7 µg/ml im Urin um ein Vielfaches niedriger.

GERHART UND MITARBEITER (1993) untersuchten einen bioabbaubaren Knochenzement zur Prophylaxe und Behandlung von Osteomyelitis, den sie mit Gentamicin, Vancomycin oder beiden Antibiotika beschickten. Es waren dabei keine signifikanten Unterschiede zu finden. Die Autoren propagieren dennoch die gleichzeitige Verwendung verschiedener Antibiotika, um durch das erweiterte Spektrum einer Resistenzentwicklung entgegenzuwirken (MICHÉA-HAMZEHPUR UND MITARBEITER, 1986).

CHU UND MITARBEITER (2004) heben in ihrer Studie die hervorragenden Eigenschaften von PMMA bei der Implantation von Hüftprothesen hervor. Probleme bereitet PMMA jedoch immer wieder im Hinblick auf dessen unbefriedigende mechanische Belastbarkeit und die exothermen Reaktionseigenschaften. Sie verglichen dabei PMMA mit HA-Zuschlag (HA-Gruppe) mit PMMA mit bovinem Knochenzuschlag (BB-Gruppe). In beiden Gruppen erhöhte der Zuschlag die Wasseradsorption. Die Zugabe von bovinem Knochen schien jedoch die exothermen Temperaturspitzen zu senken, sodass nach Meinung der Autoren die BB-Gruppe die ideale Kombination sei.

### **3.3.2. Resorbierbare lokale Antibiotikumträger**

#### **3.3.2.1. Kalziumsulfat**

Kalziumsulfat kam erstmals 1928 als Therapeutikumträger zum Einsatz. PETROVA UND NYSTROM mischten dabei dem Gips Kreolin oder Rivanol zu. Jedoch kam der eigentliche Durchbruch des Gipses als lokaler Antibiotikaträger erst durch KOVACEVIC (1953) zustande, der hämatogene Osteomyelitiden mit Penizillin- und Sulfonamidpulver beladenem Kalziumsulfat behandelte. Zwischenzeitlich war der Einsatz von Gips als lokaler Antibiotikumträger nahezu in Vergessenheit geraten.

In ihrer Studie über antibiotikumbeladene Kalziumsulfatpellets haben MACKEY, VARLET UND DEBEAUMONT (1982) das Thema wieder aufgegriffen und intensiviert. Unter der Voraussetzung, dass Kalziumsulfat gebundenes Antibiotikum gleichmäßig abgibt, liegt der Vorteil im Vergleich zu PMMA-Kugeln darin, dass die Implantate nicht wieder

entfernt werden müssen. Es kamen verschiedene Antibiotika zum Einsatz, unter anderem auch Gentamicin. MACKEY, VARLET UND DEBEAUMONT (1982) wählten Implantate in Pelletform, weil sie davon ausgingen, dass kleineren Pellets aufgrund ihrer größeren Oberfläche schneller resorbiert würden und der Wirkstoff besser diffundieren könne. Die In-vitro-Freisetzung zeigte eine deutlich längere Hemmung des Bakterienwachstums als bei vergleichbaren Kunstharzzementen. Gentamicinbeladene Kalziumsulfatpräparate setzten in den ersten 24 Stunden etwa 80 % ihres Wirkstoffes frei. Unter Verwendung der halben Konzentration diffundierten innerhalb von 24 Stunden dagegen ca. 60 % aus dem Gips. Allerdings zeigt Gips für die verschiedenen Antibiotika stark unterschiedliche Bindungskapazitäten und Freisetzungsgeschwindigkeiten.

MOUSSET UND MITARBEITER (1995) testeten Kalziumsulfatimplantate mit 11 verschiedenen Antibiotika. Insbesondere wurden deren Pharmakokinetik und die Thermostabilität ermittelt. Dabei zeigten Aminoglykosid-Antibiotika die beste thermische Stabilität, eine hohe Diffusionsrate während der ersten sieben Tage und therapeutisch wirksame Konzentrationen bis zum 11. Tag. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass auch Glykopeptid-Antibiotika sich sehr gut zur Beschickung von Gipsimplantaten eignen. Cephalosporine und Penizilline hingegen waren nicht geeignet, da sie bereits bei 37 °C innerhalb weniger Tage inaktiviert wurden und der Wirkstoff aus dem Trägermaterial zu schnell diffundierte.

HÖGSET UND BREDBERG (1986) befassten sich deshalb mit dem Problem der Exothermie und ermittelten die Temperaturen beim Aushärten von Gips. Es kamen zwei unterschiedliche Anrührflüssigkeiten in vitro zum Einsatz. Sowohl die Temperaturen als auch die Dauer der exothermen Wärmeentwicklung sind ausschlaggebend für eventuelle irreversible thermische Schäden der zellulären Strukturen des Implantatlagers und die Inaktivierung der Antibiotika. Die Temperaturen waren jedoch so gering, dass die Untersucher thermische Schäden ausschließen. Die Untersuchungen zur Biokompatibilität erfolgten durch Implantation von Kalziumsulfat in die paraspinale Muskulatur von Schweinen. Histologisch waren weder Infektions- noch Abstoßungsreaktionen nachzuweisen. Innerhalb von vier Wochen waren die Implantate von Bindegewebe umgeben, das auch in die Poren einwuchs. Nach acht Wochen waren in der Peripherie Kapillaren zu finden. Mehrkernige Makrophagen waren lediglich zwei Monate nach Implantation vereinzelt erkennbar, woraus die Autoren schlossen, dass Gips vermehrt chemisch und nicht zellulär abgebaut wird.

DAHNER UND FUNDERBURK (1987) verwendeten antibiotikumbeladenes Kalziumsulfat zur Behandlung osteomyelitiskranker Kaninchen. Dabei kamen gentamicinhaltiger wie auch antibiotikumfreier pastöser Gips zur Anwendung. Als Kontrolltiere dienten Kaninchen mit Tibialeerdefekt. Bereits eine Stunde post implantationem lagen die Konzentrationsmaxima der Antibiotika im Blut vor. Fünf Wochen nach dem Eingriff wurden alle Tiere getötet und geröntgt. Die gesamte Tibia wurde pulverisiert und anschließend die Keimzahl und der Gentamicingehalt im Pulver bestimmt. Dabei konnten in nur zwei Knochenproben messbare Antibiotikumkonzentrationen nachgewiesen werden. Da bei dieser lokalen Antibiotikatherapie nur zwei der insgesamt neun Tiere keine Bakterien aufwiesen kamen die Autoren zu dem Schluss, dass beim Vorliegen von Osteomyelitiden die lokale Verabreichung durch eine systemische Antibiose ergänzt werden müsse.

Im Jahre 1993 untersuchten MICLAU UND MITARBEITER in einer In-vitro-Studie die Freisetzung von Tobramycin aus verschiedenen Implantatmaterialien. Dabei wurden Kalziumsulfat, PMMA, demineralisierte Knochenmatrix und autologes Knochenransplantat untersucht. Innerhalb der ersten 24 Stunden setzte Knochenransplantat 70 %, demineralisierte Knochenmatrix 45 %, Kalziumsulfat 17 und PMMA 7% des Wirkstoffes frei. Aufgrund dieser Befunde folgerten MICLAU UND MITARBEITER, dass für eine kurze antibiotische Versorgung demineralisierte Knochenmatrix und Knochenransplantat am besten geeignet und somit das Implantat der Wahl insbesondere bei offenen, bakteriell kontaminierten Frakturen sind. Gips und PMMA hingegen eignen sich eher für Langzeitbehandlungen, zum Beispiel von Osteomyelitiden.

HERNIGOU UND MITARBEITER (1987) überprüften die Möglichkeit, Gips als lokalen Träger antimittotischer Substanzen wie Methotrexat bei der Behandlung von Knochentumoren zu verwenden. In vitro wurden Gipsimplantate und Kunstharzzement untersucht mit dem Ergebnis, dass die Freisetzung aus dem Kalziumsulfat höher war. In der in-vivo Studie implantierten die Autoren bei Ratten mit Osteosarkomen methotrexathaltige Kalziumsulfatzylinder, womit Gips erstmalig als Träger für ein lokales Chemotherapeutikum diente.

BOWYER UND CUMBERLAND (1994) untersuchten die Freisetzung verschiedener Antibiotika aus den Trägerstoffen Kalziumsulfat und PMMA. Sie sind der Auffassung,

Gips aufgrund des initial hohen Wirkstoffaustrittes nur zur kurzzeitigen Infektionsprophylaxe einzusetzen.

Im Gegensatz zu BOWYER UND CUMBERLAND (1994) sind jedoch SANTSCHI UND MCGARVEY (2003) der Meinung, dass Gips als lokaler Antibiotikaträger gerade wegen der initial hohen Freisetzung von Gentamicin geeignet ist.

### **3.3.2.2. Kalziumphosphat**

Bei Trikalziumphosphat (TCP) handelt es sich um ein synthetisches Material, das ebenso wie Hydroxylapatit als Granulat oder kompaktes Material mit unterschiedlichen Porengrößen beziehungsweise Gesamtporenvolumina vorliegt (BERUTO UND MITARBEITER, 2000). Die Vorteile von Trikalziumphosphat beruhen auf der Tatsache, dass es vom Knochen schnell durchbaut wird und dann im Laufe von Wochen oder Monaten resorbiert und durch Knochengewebe ersetzt wird. Wegen der starken Porosität ist auch hierbei auf eine Kombination von leicht- und schwerlöslichen Antibiotikazubereitungen zu achten, um eine möglichst kontinuierliche und langandauernde Antibiotikafreisetzung zu erreichen. Reines Gentamicinsulfat ist bereits nach drei Tagen nahezu vollständig freigesetzt. (WAHLIG UND DINGELDEIN, 1987; WAHLIG UND MITARBEITER, 1987).

### **3.3.2.3. Kollagene**

Für die Behandlung von Knocheninfektionen ist so genanntes strukturiertes Kollagen als Trägermaterial für Antibiotika geeignet. Es handelt sich dabei um entmineralisierte Knochenmatrix. Der Vorteil liegt darin, dass die Spongiosastruktur vollständig erhalten ist. Die Resorption nimmt mehrere Wochen in Anspruch. Daneben gibt es noch das Kollagenvlies, welches eine Resorptionszeit von nur etwa 10 Tagen aufweist und somit als Wirkstoffträger bei Weichteilinfektionen zum Einsatz kommt. Beiden Kollagenarten gemein ist die schnelle Wirkstofffreisetzung. Für eine protrahierte Freisetzung ist die Beschickung der Matrix mit einer Kombination aus Gentamicinsulfat und einem schwerlöslichen Gentamicinsalz notwendig (WAHLIG UND DINGELDEIN, 1987).

### **3.3.2.4. Fibrin-Gentamicin-Verbund**

Für seine Herstellung wird hochkonzentriertes humanes Fibrinogen, dem eine thrombinhaltige Lösung zugesetzt wird, als biologischer Gewebekleber verwendet (COTTA UND BRAUN, 1982). Durch die Zugabe eines Antibiotikums zum Fibrinogen vor dessen Vernetzung entsteht der Fibrin-Antibiotikum-Verbund. Dieser wird zur ergänzenden Lokalbehandlung von Knochen- und Weichteilinfektionen eingesetzt

(BRAUN UND MITARBEITER, 1980, 1982, 1984, 1985; BRAUN, 1986). Als Antibiotikum wird Gentamicin verwendet. Der Fibrin-Gentamicin-Verbund besitzt nach BRAUN UND MITARBEITER (1988) gegenüber den Gentamicin-PMMA-Kugelketten als wesentliche Vorteile eine physiologische Matrix, gute Formbarkeit und die initial hohe Elutionskinetik.

#### **3.3.2.5. Vancomycin-Spongiosa-Verbund**

Der Vancomycin-Spongiosa-Verbund wurde mit der Maßgabe entwickelt, einen Antibiotikaträger zu haben, durch den hohe Spiegel eines oder mehrerer Wirkstoffe in infizierten Knochen erzielt und über einen möglichst langen Zeitraum ohne systemische Nebenwirkungen aufrecht erhalten werden können. Darüber hinaus sollte der Träger auch mechanische Aufgaben übernehmen und die Regeneration des geschädigten Knochenlagers anregen. Er wird durch Aufbereitung humaner Spongiosa hergestellt, die in einer hochkonzentrierten Vancomycin-Stammlösung inkubiert wird. Durch diesen Verbund ist es möglich, eine kontinuierliche Abgabe von therapeutisch wirksamen Dosen über einen mehrwöchigen Zeitraum zu erzielen. Der Hauptvorteil liegt in der Infektsanierung und der Rekonstruktion von Knochendefekten durch einen einzigen operativen Eingriff (WINKLER UND MITARBEITER, 1997).

#### **3.3.2.6. Eigenblut-Antibiotikum-Plombe**

Hierbei wird autogenes Trägermaterial mit dem Wirkstoff oder den Wirkstoffen beschickt und implantiert. Aufgrund des körpereigenen Trägermaterials ist das Implantat sehr gut verträglich und wird über eine bindegewebige Zwischenstufe nach etwa sieben Wochen knöchern durchbaut. Es eignet sich jedoch nur für kleinere umschriebene Prozesse. Eine weitere Voraussetzung ist ein sorgfältig durchgeführtes Debridement (FAUPEL UND MITARBEITER, 1986; SCHULTE, 1974).

#### **3.3.2.7. Resorbierbare Milchsäure-Oligomere**

Diese stellen ein weiteres Beispiel für abbaubare Antibiotikaträger dar. WEI UND MITARBEITER (1991) verwendeten Dideoxykanamycin B als antibiotischen Zusatz und implantierten die Milchsäure-Oligomere in Kaninchenfemora. Anhand von Konzentrationsbestimmungen in Kortikalis, Spongiosa und Knochenmark konnte gezeigt werden, dass die Wirkstoffgehalte in den verschiedenen Knochengeweben die minimale Hemmkonzentration für Osteomyelitiserreger sechs Wochen lang übersteigen. Darüber hinaus wiesen die Wirkstoffträger keine systemischen Nebenwirkungen auf und waren somit für die lokale Antibiotikumbehandlung geeignet.

---

### 3.4. *Grundlegende Eigenschaften der verwendeten Antibiotika*

---

Die dominierende Keimart bei Knocheninfekten sind Staphylokokken. In nahezu 70 Prozent der Fälle wird dabei *Staphylokokkus aureus* isoliert. Andere gram-positive Keime wie *Staphylokokkus epidermidis* und Streptokokken kommen in einer Häufigkeit von etwa 20 Prozent vor.

Gram-negative Keime wie zum Beispiel *Pseudomonaden*, *Escherichia coli* und *Enterobacteriaceae* sind dagegen in nur 10 % aller bakteriellen Knocheninfekte zu isolieren (VÉCSEI UND MITARBEITER, 1995). Anaerobe Keime wie *Clostridium welchii* trifft man primär bei offenen Frakturen an.

Ein großes Problem in der Behandlung von Knocheninfektionen bakterieller Genese stellen die zunehmenden Resistenzen dar. Beispielsweise sind nahezu 50 % aller *Staphylokokkus aureus*-Stämme mittlerweile unempfindlich gegenüber Cephalosporinen. Gram-positive Kokken können hingegen zurzeit noch durch den Einsatz von Vancomycin bekämpft werden (GRAZIANI UND MITARBEITER, 1988; KUECHLE UND MITARBEITER, 1991; WINKLER UND MITARBEITER, 1997). Allerdings besteht auch hier die Gefahr, dass durch unsachgemäßen Einsatz resistente Stämme entstehen.

#### **3.4.1. Gentamicin**

Gentamicin zählt zur Gruppe der Aminoglykosid-Antibiotika. Seit der Isolierung von Streptomycin im Jahre 1944 spielen die Aminoglykoside eine wichtige Rolle in der Bekämpfung von Infektionen, die hauptsächlich von gram-negativen Keimen ausgehen. Gentamicin wird aus *Micromonospora purpurea* gewonnen und ist seit 1963 bekannt. Die Substanz ist farblos, gut wasserlöslich und im pH-Bereich von 2,2 bis 10 lösungstabil. Die Thermostabilität erlaubt kurzfristiges Erhitzen auf über 100 °C. Die chemische Struktur basiert auf Aminozuckern, die über glykosidische Bindungen mit Hydroxylgruppen von Amino- oder Guanin-substituiertem Cyclohexanol verknüpft sind. Die freien OH-Gruppen sind für die Hydrophilie und Stabilität in kristalliner Form verantwortlich, bilden aber auch Angriffziele für inaktivierende Bakterienenzyme.

Ihr antibakterieller Effekt beruht auf der Anbindung an die 30S-Untereinheit der bakteriellen Ribosomen und einer dadurch bedingten Störung der Proteinbiosynthese des Bakteriums. Durch die Produktion so genannter „Nonsens-Proteine“ kommt es zu einem bakteriziden Effekt. Zur Penetration des Wirkstoffes in die Bakterienzelle ist ein sauerstoffabhängiger Transportprozess notwendig, weswegen Anaerobier resistent sind.

Resistenzen entwickeln sich über die Resistenz-Faktoren. Hierbei werden bestimmte Enzyme gebildet, die die Bildung von positiv geladenen Molekülen verhindern. Infolge der Zerstörung des Protonengradienten ist eine Wirkstoffaufnahme in die Zelle nicht möglich.

Die starken kationischen Eigenschaften führen auch dazu, dass Gentamicin nach oraler Applikation kaum aus dem Darm resorbiert werden kann. Eliminiert werden die Aminoglykosid-Antibiotika über die glomeruläre Filtration; die Halbwertszeit liegt hier bei etwa zwei Stunden.

Gentamicin hat eine geringe therapeutische Breite. Es ist oto- und nephrotoxisch. Steigen die Plasmakonzentrationen durch Überdosierung oder Kumulation infolge Nierenschädigung auf über 10 µg/ml an, so nimmt das Risiko irreversibler Innenohrschädigungen zu, wobei das Gentamicin sich in den Haarzellen des Innenohres ablagert. Die Kumulation in den proximalen Tubuluszellen hingegen ist meist reversibel.

### **3.4.2. Vancomycin**

Vancomycin zählt zur Gruppe der Glykopeptid-Antibiotika und wird aus *Streptomyces orientalis* isoliert. Im sauren und alkalischen Milieu ist Vancomycin gut löslich, verhält sich jedoch unter alkalischen Bedingungen instabil.

Die antibakterielle Wirkung beruht auf der Störung der Quervernetzung des Peptidoglykangerüsts in der Zellwand gram-positiver Bakterien. Gegen gram-negative Erreger ist Vancomycin unwirksam.

Kreuzresistenzen zu anderen Antibiotika gibt es nicht, jedoch weisen bestimmte Erreger, wie zum Beispiel Streptokokken der *Leuconostoc*-Gruppe eine plasmidgebundene natürliche Resistenz auf. Dieser Resistenzmechanismus geht mittlerweile auch auf andere Enterokokken, hochresistente Corynebakterien oder das multiresistente *Clostridium difficile* über.

Für eine bakterizide Therapie wird in der Regel die Kombination mit einem Aminoglykosidantibiotikum befürwortet. Vancomycin wird bevorzugt bei frischen Parenchyminfektionen beziehungsweise Sepsis mit parenchymatösem Sepsisherd eingesetzt, sofern die Nierenfunktion stabil ist.

Ebenso wie Gentamicin ist das Vancomycin nephro- und ototoxisch und kann Überempfindlichkeitsreaktionen und lokale Unverträglichkeiten hervorrufen. Das

Antibiotikum muss wie das Gentamicin parenteral verabreicht werden. Die Blut-Liquor-Schranke passiert es nicht und es geht kaum in die interstitielle Flüssigkeit über. 10 bis 50 % des Vancomycins werden an Proteine gebunden, jedoch nur wenig metabolisiert.

### 3.4.3. Clindamycin

Clindamycin gehört zur Gruppe der Lincomycine, auch Lincosamide genannt. Es ist als chlorierter Abkömmling des Lincomycins, wie dieses, ein Monoglykosid und verfügt über eine Aminosäure-ähnliche Seitenkette.

Das Wirkungsspektrum des Clindamycins ähnelt dem der Macrolid-Antibiotika. Die Wirkungsintensität wird im alkalischen und anaeroben Bereich gefördert. Linco- und Clindamycin zeigen eine Kreuzresistenz. Resistenzen werden plasmidgebunden vererbt und durch eine Methylierung des Adeninanteils in der 50S-Untereinheit der Ribosomen verursacht.

Lincomycine können sowohl lokal als auch parenteral verabreicht werden. Clindamycin ist äußerst lipidlöslich und zeigt eine gute Penetration durch Membranen. Im Weichteil- und Knochengewebe finden sich bis maximal 75 % der Serumkonzentrationen, in Pleuraflüssigkeit und Milch sind Konzentrationen bis 100 Prozent möglich. Clindamycin ist plazentagängig. Im Knochen geht es keine feste Bindung ein, wodurch es antimikrobiell aktiv bleibt. Es penetriert auch in Zellen und reichert sich in Leukozyten an, wodurch in Entzündungsherden noch höhere Konzentrationen erreicht werden.

Nach oraler Gabe werden die Lincomycine hauptsächlich über Galle und Kot, nach parenteraler Gabe vorwiegend über Nieren und Galle ausgeschieden. Bei Leber- und / oder Nierenschäden verlängert sich die Eliminationshalbwertszeit bis auf das Doppelte.

Clindamycin kommt als Alternativ-Therapie bei Infektionen mit penicillinresistenten, grampositiven Erregern oder Allergien gegen  $\beta$ -Lactame in Frage. Auch für den gezielten Einsatz gegen Mykoplasmen- und Anaerobierinfektionen und insbesondere bei chronisch-rezidivierenden Infektionen mit fibrinös-kollagenen Entzündungsherden (zum Beispiel bei Osteomyelitis) ist Clindamycin geeignet.

Gastrointestinale Störungen durch Veränderung der physiologischen Darmflora, insbesondere des Colons, sind die häufigste Nebenwirkung bei Herbivoren. Oftmals entsteht das klinische Bild einer schweren Typhlocolitis mit fatalem Verlauf. Bei Milchrind, Schaf und Pferd kommen auch Aborte vor. Infolge ihres neuromuskulären Blockadeeffektes, der durch Calciumgaben reversibel ist, sollten Anaesthetica und

Muskelrelaxantien nicht in Kombination mit einer Clindamycintherapie eingesetzt werden. Beim Hund ist eine Hepatopathie mit Anstieg der Glutamat-Laktat-Dehydrogenase (GLDH) und des Cholesterins möglich.

### *3.5. Grundlagen der Knochenentzündung*

---

Unter Entzündung versteht man einen komplexen Abwehrvorgang des Organismus, der durch Reaktionen von Gefäßwand und Zellen im Bereich der entzündlichen Noxe gekennzeichnet ist und sich klinisch in Rubor, Dolor, Calor, Tumor und Functio laesa äußert.

Die entzündlichen Vorgänge können örtlich begrenzt sein (Entzündungsherd), werden aber häufig auch von Allgemeinreaktionen des Körpers wie Störung des Allgemeinbefindens und Fieber begleitet. Der Entzündung geht stets eine primäre Gewebsschädigung voraus, die durch physikalische, chemische, infektiöse oder immunpathologische Ursachen bedingt sein kann. Der Ablauf einer Entzündung ist weitgehend unabhängig von ihrer Lokalisation im Körper und von der Art der auslösenden Noxe, jedoch sind Zeitdauer, Ausbreitung und Form der Entzündung insbesondere von Art und Menge der Noxe sowie von der allgemeinen Reaktionslage des Körpers und den biochemischen Eigenschaften des betroffenen Gewebes abhängig.

Ziel einer Entzündung ist im Idealfall die Regeneration (*restitutio ad integrum*), bzw. die Reparation des geschädigten Gewebes durch Narben- oder Ersatzgewebe. Oftmals kann sie jedoch in einen chronischen Verlauf übergehen.

Unter einer Osteomyelitis versteht man eine durch Phlegmone und Abszedierung gekennzeichnete Infektion von Knochenmark, Knochen und Periost. Sie kann akut oder chronisch verlaufen. Alle Entzündungen des Knochens spielen sich dabei vornehmlich im Gefäß- und Bindegewebsbereich ab. Der Knochen selbst zeigt durch Veränderungen in Form von Nekrosen, Resorption und Apposition von Knochensubstanz seine Beteiligung an der Entzündung.

Bei den Osteomyelitiden werden ursächlich zwei Hauptgruppen unterschieden; die aseptische und die septische Entzündung.

Eine einfache aseptische Entzündung des Knochens wird meist mechanisch, traumatisch oder mechanisch-traumatisch verursacht. Die Initialphase ist durch Blutung oder Hämatome im Bereich des Periostes gekennzeichnet. Die Ausdehnung der

---

Blutungen ist dabei vom Ausmaß des Traumas abhängig. Ebenfalls in die Gruppe der aseptischen Entzündung fallen resorptiv-entzündliche Vorgänge, wie sie bei der Heilung von Knochenbrüchen und Fissuren ablaufen.

Eine septische Osteomyelitis wird vornehmlich durch bakterielle Infektion hervorgerufen und aufrechterhalten. Die Beteiligung von Pilzen, Viren und Parasiten ist eher selten. Die Infektion kann zum einen auf direktem Wege erfolgen, wie es zum Beispiel bei offenen Knochenverletzungen oder den Knochen erreichende Stichverletzungen der Fall sein kann. Bei der indirekten Infektion werden die Keime hämatogen oder lymphatisch an den Ort des Geschehens transportiert. Auch der Übergriff von unmittelbar im Bereich von Knochen manifesten Entzündungen gehört in die Gruppe der indirekten septischen Entzündung. Durch diese Vorgänge kann aus jeder ursprünglich aseptischen Osteomyelitis eine (sekundär) septische Entzündung entstehen.

Eine weitere Einteilung erfolgt je nach der Beteiligung der einzelnen Strukturen in Periostitis, Ostitis und Osteomyelitis. Sind sämtliche Knochenanteile betroffen, spricht man von einer Panostitis.

Bei den bakteriell verursachten Osteomyelitiden ist häufig eine eitrige Periostitis als Auslöser zu finden. Diese ist je nach beteiligtem Erreger entweder von nekrotisierend-eitriger oder von serös-hämorrhagischer Natur.

Die Exsudationen führen zu einem Abheben des Periostes sowie zur Knochenresorption. Bei Fortbestehen als Phlegmone kann der Prozess entweder auf alle vorhandenen Knochenstrukturen übergreifen und somit eine Osteomyelitis verursachen oder aber einen lokal begrenzten Abszess bilden. Bricht dieser Abszess nach außen durch, spricht man von einer Knochenfistel. In den Bereichen, in denen das Periost durch die Exsudation abgehoben ist, entwickelt sich oftmals eine durch die Minderversorgung bedingte Nekrose oder Sequestrierung der kortikalen Knochenbereiche. Bei chronischen Entzündungen können aber auch fibröse oder knöcherne Gewebezubildungen beobachtet werden.

Bei den bakteriell bedingten Osteomyelitiden wird das Erregerspektrum von Staphylokokken dominiert, wobei *Staphylokokkus aureus* in mehr als der Hälfte der bakteriell bedingten Entzündungen nachzuweisen ist. Auch *Enterobacteriaceae* sind in über einem Fünftel der Fälle beteiligt. An dritter Stelle stehen *Pseudomonaden* und *Streptokokken*. Bei den Haussäugetieren sind nekrotisierende Osteomyelitiden am häufigsten und werden insbesondere durch *Fusobacterium necrophorum* sowie

saprophytäre und pathogene Mischfloren hervorgerufen und nur in seltenen Fällen durch Spirochäten, Brucellen, Salmonellen und *Yersinia pseudotuberculosis* verursacht.

Mykotische Ursachen sind als primäre Ursache für eine Knocheninfektion sehr selten zu finden. In Mittelamerika kommen bei Hunden und Menschen gelegentlich durch Kokzidioidomykosen bedingte Osteomyelitiden vor. Bei Pferden kann *Pythium insidiosum* an chronischen Knochenentzündungen beteiligt sein.

Bei viral verursachten Knochenentzündungen kommt es entweder zu Blutungen und Nekrosen oder zu einer Osteosklerose. Sowohl Nekrosen als auch Sklerosen werden dabei durch Gefäßendothelschädigungen mitverursacht. Das Auftreten von Knochenentzündungen, die eher mit Blutungen und Nekrosen einhergehen, wird häufig bei der Schweinepest, der Hepatitis contagiosa canis und dem Felinen Herpesvirus beobachtet. Osteosklerose kommt oft bei Staupe und dem Felinen Leukämievirus vor.

Differentialdiagnostisch muss das Vorliegen von Tumoren ausgeschlossen werden. Bei den Knochentumoren werden chondrogene, osteogene, bindegewebige Tumoren und vom Markgewebe und den Blutgefäßen ausgehende sowie sekundäre Tumoren unterschieden.

Parasiten sind recht selten an Osteomyelitiden beteiligt, da keine derartig spezialisierten Parasiten bekannt sind. Im Knochen nachgewiesene Parasiten sind also eher zufällige Vorkommnisse. Die diagnostizierten Parasiten sind meist durch Übergreifen von umliegenden Prozessen oder durch hämatogene Absiedelung in den betroffenen Knochen gelangt. In seltenen Fällen findet man Echinokokken bei Rind und Pferd vornehmlich im Schulterblatt oder in den Rippen. Kariöse Knochenentzündungen kommen beim Pferd infolge eines Befalls mit *Halicephalobus deletrix* vor.

---

## 3.6. *Allgemeine Grundlagen zu Knochenaufbau und -funktion*

---

### 3.6.1. **Knochenaufbau**

Knochen bestehen aus einer äußeren, sehr dichten Knochenschicht, der so genannten Kompakta. Im Inneren befindet sich eine Schicht feiner Röhren-, Plättchen- und Bälkchenstruktur, die Spongiosa. Die Knochen werden rein deskriptiv in kurze, lange und platte Knochen eingeteilt.

Lange Knochen werden auch als Röhrenknochen bezeichnet. Sie bestehen aus einem länglichen stabilen Schaft, der Diaphyse. Diese weist eine dicke Kompakta und eine sehr dünne Spongiosa auf. Nach innen begrenzt der Schaft die primäre Knochenhöhle (Markraum). Der Diaphyse liegt außen die Knochenhaut (Periost) auf. Die beiden Knochenenden (Epiphysen) bestehen hingegen nur aus einer sehr dünnen Kompakta und sind nahezu vollständig von Spongiosa ausgefüllt. Das von ihr gebildete Hohlraumsystem zwischen dem Bälkchenwerk wird als sekundäre Markhöhle bezeichnet. Der Kompakta der Epiphyse liegt der Gelenkknorpel auf. Zwischen Epiphyse und Diaphyse befindet sich die Wachstumszone (Metaphyse), auch Epiphysenfuge genannt. (NICKEL UND MITARBEITER, 1984).

Die kurzen Knochen sind vollständig mit Spongiosa gefüllt. Ihre Kompakta ist sehr dünn. Platte Knochen haben ebenfalls keine primäre Markhöhle. Sie verfügen über eine dünne Kompakta und eine schmale Spongiosa.

Auch nach Abschluss des Wachstums ist der Knochen einem ständigen Umbau (Remodeling) unterworfen. Dabei wird Knochengewebe erneuert. Außerdem erfolgt eine ständige Anpassung an sich ändernde Druck- und Zugverhältnisse. Lediglich die äußere Form ist genetisch festgelegt (Wolff'sches Gesetz; WOLFF, 1882). Eine Verbreiterung findet dabei durch Anlagerung neuen Knochens auf der periostalen Seite statt. Endostal erfolgt ein Knochenabbau, da dort die Resorptionsvorgänge die Neubildung übertreffen.

Aufgrund ihrer großen Oberfläche trägt die Spongiosa, die nur etwa 15 bis 20 Prozent eines Skelettes ausmacht, etwa zur Hälfte der Knochenumbauvorgänge bei. Die Umbaurate hängt zum einen von der Aktivität der Osteoklasten und Osteoblasten und zum anderen vom Ausmaß der Bereiche ab, in denen gerade ein Remodeling stattfindet (FROST, 1969; MOSEKILDE UND SOGAARD, 1990; PARFITT, 1992). Im Falle einer unvollständigen Wiederauffüllung von so genannten Resorptionslakunen kann es zu einer erhöhten Porosität kommen. Physiologischer Weise liegt diese bei kompakten

Knochen bei unter fünf Prozent. Sie nimmt mit steigender Umbaurate zu und kann zum Verlust von Knochenmasse führen (BROULIK UND MITARBEITER, 1982). In spongiösem Knochen bewirkt eine gesteigerte Resorption die Verschmälerung der Bälkchen bis hin zum vollständigen Verlust von Trabekeln (DARBY UND MEUNIER, 1981; DEMPSTER UND MITARBEITER, 1986; ERIKSEN, 1986, ERIKSEN UND MITARBEITER, 1987; ERIKSEN UND MITARBEITER, 1990; MOSEKILDE UND SOGAARD, 1990; SCHENK, 1991; PARFITT, 1992).

Eine Vermehrung der Knochenmasse kann hingegen durch die Stimulation der Neubildung, zum Beispiel mit Fluoriden, Parathormon oder 1,25 Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> erreicht werden (NEER UND MITARBEITER, 1990; RIGGS UND MITARBEITER, 1990).

### **3.6.2. Knochenarten**

Histologisch sind nach JUNQUEIRA UND CARNEIRO (1986) zwei Arten von Knochengewebe zu unterscheiden: Geflechtknochen, auch Faserknochen genannt, und Lamellenknochen.

#### **3.6.2.1. Geflechtknochen**

Dieser zeichnet sich vor allem dadurch aus, dass die Kollagenfasern der Grundsubstanz keinen gerichteten Verlauf zeigen. Die Mineralisation ist geringer als im lamellären Knochen. Geflechtknochen wird am Anfang der Knochenentwicklung gebildet und später dann nahezu komplett durch Lamellenknochen ersetzt.

#### **3.6.2.2. Lamellenknochen**

Im Lamellenknochen sind die Kollagenfibrillen gerichtet. Er besteht aus einzelnen Lamellen, die voneinander abgesetzt sind. Diese weisen eine Dicke von etwa drei bis sieben µm auf. Der Faserverlauf sowie der Neigungswinkel der einzelnen Lamellen sind unterschiedlich.

Man unterscheidet Speziallamellen und Generallamellen. Die Speziallamellen sind konzentrisch angeordnet und bilden die Osteone. Im Inneren eines Osteons befindet sich der gefäßführende Havers'sche Kanal. Durch die Schichtung der Osteone wird die Stabilität des Knochens erhöht. Die Generallamellen umschließen die Osteone und füllen als so genannte Schaltlamellen die Räume zwischen den Osteonen auf. Die einzelnen Havers'schen Kanäle stehen durch die so genannten Volkmannschen Kanäle in Verbindung. Diese verlaufen in einem Neunzig-Grad-Winkel zu den Havers'schen Kanälen.

### 3.6.3. Knochenzytologie

Damit neuer Knochen gebildet werden kann, müssen zwei Grundvoraussetzungen vorhanden sein: das Vorkommen von Zellen, die ein hohes osteogenes Potential besitzen und ein Stimulus, der diese zur Differenzierung in Osteoblasten veranlasst. Gebildet werden Osteoblasten aus Stromazellen mesenchymalen Ursprungs, die die Vorläuferzellen für Osteoblasten, Fettzellen, Fibroblasten, Retikulozyten und Chondrozyten sind. Die Gruppe der Osteoblasten wird durch eine heterogene Zellgruppe gebildet, die reife Osteoblasten, Osteozyten und Knochenbelegzellen umfasst. Die Stammzellen der Osteoblasten, die so genannten determinierten Osteoprogenitorzellen (DOPC) finden sich im Periost, Endost und Knochenmark sowie in den Zellpopulationen der Gefäßkanäle und stehen immer in Beziehung zu Blutgefäßen (FRIEDENSTEIN, 1973). Nach ihrer Aktivierung können sie sich mitotisch vermehren und zu Osteoblasten differenzieren.

Inaktive Osteoblasten sind klein und flach. Nach ihrer Aktivierung werden sie kuboid und liegen dicht gedrängt an der Oberfläche der Knochenbälkchen. Sie werden dann als „bone lining cells“ (Knochenbelegzellen) bezeichnet. Diese vermögen, die in den Knochenkanälchen zirkulierende Knochenflüssigkeit gegen die extrazelluläre Flüssigkeit abzugrenzen und somit dort eine Kalziumübersättigung zu bewirken. Dadurch können kurzfristig lokal begrenzte Kalziummängel abgepuffert werden (PARFITT, 1987). Histochemisch sind die Osteoblasten durch einen hohen Gehalt an alkalischer Phosphatase charakterisiert, durch welche sie die Mineralisation der Knochenmatrix steuern (SCHENK, 1989 zitiert in BONATH UND PRIEUR, 1998).

Osteoblasten bilden die Knochengrundsubstanz, Osteoid genannt. Hierfür bilden sie Kollagene, Glykoproteine, Proteoglykane und andere organische Matrixanteile. Diese machen rund ein Drittel der Knochenmatrix aus. Sie binden an der Zellmembran Kalzium, welches durch Exozytose ausgeschleust wird.

Durch die in Vesikeln enthaltene alkalische Phosphatase wird aus organischen Verbindungen Phosphat freigesetzt. Dieses reagiert mit dem intrazellulär vorhandenen Kalzium zu Hydroxylapatitkristallen ( $3 \text{Ca}_3[\text{PO}_4]_2 \times \text{Ca}[\text{OH}]_2$ ), die dann aus der Zelle geschleust werden. Dort heften sich die Hydroxylapatitkristalle an die extrazellulären Eiweiße, vor allem an die Kollagene und wachsen durch Apposition von Salzen aus der interstitiellen Flüssigkeit.

Im Zuge dieser Vorgänge „mauern“ sich die Osteoblasten allmählich ein. Ab diesem Zeitpunkt stehen sie nur noch über feine zytoplasmatische Fortsätze untereinander in Kontakt und werden als Osteozyten bezeichnet. Die jungen Osteozyten nehmen so lange an der Matrixproduktion teil, bis sie sich vollkommen eingeschlossen haben. Danach beteiligen sie sich nicht mehr an den Umbauvorgängen

Die Aufgabe des Knochenabbaus übernehmen hochspezialisierte Zellen, die so genannten Osteoklasten. Sie sind zur Resorption von Knochen befähigt und leiten sich höchstwahrscheinlich von multipotenten Precursorzellen des Knochenmarks ab, aus denen auch Monozyten und Makrophagen hervorgehen. Durch Fusion der Vorläuferzellen entstehen mehrkernige Makrophagen, die zumeist weniger als 10 zentrale Kerne besitzen (KAHN UND SIMMONS, 1975). Es wurden aber auch schon Zellen mit bis zu 100 Kernen beschrieben. Die Osteoklasten kommen hauptsächlich endostal und nur zum Teil auf der periostalen Knochenoberfläche vor.

### **3.6.4. Knochenheilung**

Als Modell für die Knochenheilung haben sich die Vorgänge während der Frakturheilung durchgesetzt, weshalb im Folgenden die primäre und sekundäre Knochenheilung beschrieben werden.

#### **3.6.4.1. Primäre Frakturheilung**

Sie erfolgt, wenn zum einen die gebrochenen Knochenenden nahe genug zueinander stehen und zum anderen Stabilität der Knochenfragmente zueinander besteht. Die Knochenheilung erfolgt dabei im Sinne einer Regeneration. Eine Kallusbildung bleibt hierbei aus (PERREN, 1981, 1993). Drei Arten werden unterschieden: Kontakt-, Spalt- und Defektheilung (WILLENEGGER UND MITARBEITER, 1971; SCHENK UND WILLENEGGER, 1977; SCHENK, 1978; KRAMERS, 1998 zitiert in BONATH UND PRIEUR, 1998).

##### *3.6.4.1.1. Kontaktheilung*

Nach SCHENK UND WILLENEGGER (1977) beträgt der maximale Abstand der Knochenenden für eine primäre Knochenheilung 0,5 mm. Im Zuge der Regeneration wird der beteiligte Knochen zum Teil resorbiert und ersetzt (FROST, 1960, 1963, 1966, 1969, 1972; SCHENK, 1978). Ein im Umbau begriffenes Osteon wird dabei als "bone remodeling unit", kurz BRU, bezeichnet (FROST, 1964; RASMUSSEN UND BORDIER, 1974; PARFITT, 1983). Die Regeneration beginnt mit der für die Knochenresorption nötigen Osteoklastenaktivierung. Nach Abschluss der Resorptionsphase wandern Osteoblastenvorstufen, so genannte Präosteoblasten, in die betroffene Region ein. Dort

differenzieren sich die Präosteoblasten zu reifen Osteoblasten und sezernieren die Knochenmatrix (Osteoid). Abschließend erfolgt, nach einer gewissen Verzögerung, die Mineralisation des Osteoids.

Dieser Ablauf wird in der ARF-Regel zusammengefasst (ARF = Aktivierung, Resorption, Formation). Dabei ergibt sich für eine BRU in kompaktem Knochen folgendes Bild: Osteoklasten bilden einen trichterförmigen Resorptionskanal, in den Osteoblasten einwandern und zentripetal neuen Knochen anlagern. Dadurch wird der primär entstandene Resorptionskanal wieder bis zum Endkaliber des Havers'schen Kanals eingengt (SCHENK UND WILLENEGGER, 1967; JAWORSKI UND LOK, 1972). Bei spongiösem Knochen vollziehen sich diese Vorgänge hingegen an den Oberflächen der Trabekel.

Bei einer Kontaktheilung muss also zuerst durch Resorption Raum geschaffen werden, damit die Knochenneubildung stattfinden kann.

#### *3.6.4.1.2. Spaltheilung*

Ist der Frakturspalt weiter als 0,5 mm, ist eine Kontaktheilung mit direkter knöcherner Überbrückung nicht mehr möglich und es erfolgt die so genannte Spaltheilung. Hierbei fällt die Osteoklastenaktivierung weg, da bereits genügend Raum für die Knochenneubildung vorhanden ist. Die Spaltheilung ist vielmehr durch das Einwachsen von Blutgefäßen und Begleitzellen in den Spaltraum gekennzeichnet. Danach wandern Osteoblasten ein, die sofort mit der Apposition von neuem Knochen an der Bruchstelle beginnen. Die Bildung von Lamellenknochen ist dabei recht selten; in der Regel wird Geflechtknochen gebildet, der von der Struktur her einfacher ist und schneller wächst. Dieser wird dann in einer zweiten Phase der Spaltheilung in Lamellenknochen umgebaut.

#### *3.6.4.1.3. Defektheilung*

Bei der Defektheilung hängt die Art von der Größe des Defektes ab. Dies wurde von JOHNER (1972) beim Kaninchen ausführlich untersucht. Er versah die Tibia von Kaninchen mit Bohrlöchern von 0,1 bis über 1 mm Durchmesser. Knochendefekte mit einem Durchmesser unter 0,2 mm werden in der Regel direkt mit Lamellenknochen verschlossen. Bei Verletzungen im Bereich von etwa 0,2 bis 0,8 mm wird dagegen zuerst Geflechtknochen gebildet, der später durch lamellären Knochen ersetzt wird (SCHENK UND WILLENEGGER, 1977). Bei noch größeren Defekten kommt zusätzlich Bindegewebe im Defektverschluss vor, das anschließend in Geflechtknochen umgewandelt wird, aus dem letztendlich lamelläres Knochengewebe entsteht.

### **3.6.4.2. Sekundäre Frakturheilung**

Die sekundäre Knochenheilung ist durch die Bildung von Kallus gekennzeichnet und findet unter instabilen Verhältnissen der Bruchenden statt. Man bezeichnet sie auch als indirekte Heilung. Auch sie beginnt mit einer initialen Entzündungsreaktion. Aus Blut, lokalen Mastzellen und verletzten Gewebszellen werden Entzündungsmediatoren, angiogenetische Substanzen und Wachstumsfaktoren freigesetzt (FROST, 1989; GRUNDNESS UND REIKERAS, 1993); anschließend weicht das Frakturhämatom den Fibroblasten, Entzündungszellen, Kollagenen und neugebildeten Kapillaren. Unterstützt wird die Neueinsprossung der Gefäße von Hyaluronsäure. Bei der sekundären Frakturheilung erfolgt die Stabilisation schrittweise. Nach der initialen Stabilisierung durch das Einsprossen von Bindegewebe und Kapillaren entsteht so genannter weicher Kallus, mit dem der Frakturbereich bindegewebig überbrückt und Granulationsgewebe durch Faserknorpel ersetzt wird. Diesem Stadium folgt die Bildung des harten Kallus. Dabei wird der entstandene Faserknorpel mineralisiert und weiter ausgebaut. In der Endphase wird Geflechtknochen in lamellären Knochen umgewandelt, überschüssiger Kallus abgebaut und die ursprüngliche Knochenarchitektur wieder hergestellt.

### **3.7. *Die polychrome Fluoreszenzmarkierung des Knochens***

---

MIZALDUS beschrieb bereits im Jahr 1599 eine Verfärbung bei Schafsknochen, wenn die Tiere zuvor mit der Krappwurzel (*Rubia tinctorum*) gefüttert worden waren. Dies wurde später von BELCHIER (1736) bestätigt. Schon 1868 konnte der Hauptfarbstoff der Krappwurzel, das Alizarin, synthetisch hergestellt werden (GRAEBE UND LIEBERMANN). Seit Beginn des 20. Jahrhunderts wird das Alizarin in Form eines wasserlöslichen Alizarinderivates parenteral zur Knochenmarkierung verabreicht (GOTTLIEB, 1914).

Durch die Verwendung von farblich unterschiedlichen Fluorochromen können die zeitlichen Fenster der Knochenbildungsvorgänge deutlich besser untersucht werden. HARRIS (1960) publizierte die Knochenmarkierung mit Alizarinrot und Tetrazyklin. 1966 führten SUZUKI UND MATHEWS die Fluoreszinderivate Di-Carbomethyl-Aminoethyl-Fluorescein (DCAF) und Calceingrün ein. MODIS UND MITARBEITER (1969) veröffentlichten erstmalig den Einsatz einer Dreifarbenmarkierung mit Tetrazyklin, DCAF und Alizarinrot S. Mittlerweile verwendet man anstelle von Alizarinrot S das Alizarinkomplexon, das weniger Nebenwirkungen aufweist (RAHN UND PERREN, 1972). In einer tierexperimentellen Studie konnte nachgewiesen werden, dass die zur

Knochenmarkierung benötigten Dosierungen keine Gefahr für die Versuchstiere aufweisen (RAHN UND PERREN, 1972, 1975).

Bei diesen Farbstoffen handelt es sich um Chelatbildner, die eine Bindung mit dem neugebildeten mineralisierten Knochen eingehen und im ultravioletten Licht mit unterschiedlicher Wellenlänge fluoreszieren (RAHN, 1976).

Durch die zu unterschiedlichen Zeiten vorgenommene Verabreichung können im histologischen Präparat mittels der Fluoreszenzmikroskopie der Verlauf, das Ausmaß und der Ort der Knochenneubildung genauestens untersucht werden (RAHN UND MITARBEITER, 1970; 1980).

## **4. EIGENE UNTERSUCHUNGEN**

---

### *4.1. Implantate und Lösungen*

---

#### **4.1.1. Implantate**

Die Korrelation zwischen der Menge der Anmischflüssigkeit und der Porosität der fertigen Implantate sowie zwischen der Porosität und der Wirkstofffreisetzung wurden in früheren Studien eingehend untersucht. So wurde in dieser Arbeit die günstigste Variante für den Wirkstoffträger ausgewählt. Diese hatte sich auch in den Studien von HÄRTTER (1998) und STRAUSS (1999) bewährt. Die Implantatkugel bestehen aus Kalziumsulfat, dem 30 % nanopartikuläres Hydroxylapatit (Ostim®) zugegeben wurde.

#### **4.1.2. Lösungen**

##### **4.1.2.1. Antibiotika**

Die für die Implantation in die Kaninchenfemura vorgesehenen Kugeln wurden alle unmittelbar vor der Implantation mit der jeweiligen Antibiotikumlösung getränkt. Dabei kamen Gentamicin (Gentamicinsulfat BP 88, Charge: 950512, Fa. Pharma Resources), Vancomycin (Vancomycinhydrochlorid, Charge: X00336/S100395, Fa. Lilly) sowie Clindamycin (Clindamycinhydrochlorid BP 93, Charge: S510062, Fa. Pharma Resources) zum Einsatz.

##### **4.1.2.2. Fluorochromlösungen**

Die intravitale Knochenmarkierung erfolgte durch die subcutane Applikation der folgenden Fluorochrome:

1. Calcein ( $C_{30}H_{26}N_2O_{13}$ ), Fa. Sigma  
Gute Gewebeverträglichkeit  
Fluoreszenz bei 540 nm, leuchtend grün
2. Alizarincomplexon ( $C_{19}H_{15}NO_8 \times 2H_2O$ ), Fa. Sigma  
Gute Gewebeverträglichkeit  
Fluoreszenz bei 625 nm, tiefrot
3. Oxytetracyclin (Terramycin® 100, Fa. Pfizer)  
Gute Gewebeverträglichkeit  
Fluoreszenz bei 525 nm, gelb

#### 4.1.2.3. Perfusionslösung

Das Gewebe wurde nach der schmerzlosen Tötung der Versuchstiere mit Karnovsky-Lösung fixiert. Diese wurde über die Blutgefäße infundiert. Anschließend wurden die entnommenen Gewebeproben bis zur weiteren Untersuchung in dieser Lösung aufbewahrt.

#### 4.2. Versuchstiere

---

Als Versuchstiere dienten 36, etwa neun Monate alte, weibliche Kaninchen der Rasse Weiße Neuseeländer mit einem Gewicht zwischen 3,5 und 5,0 kg. Alle Tiere stammten von einem Kaninchenzüchter aus Euskirchen und wurden während der Studie in der Versuchstierhaltung der Chirurgischen Veterinärklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen untergebracht. Je drei Versuchstiergruppen à vier Tiere wurden in etwa 6 m<sup>2</sup> großen Laufställen auf Stroheinstreu gehalten. Jeder Laufstall enthielt einen etwa 0,7 m<sup>2</sup> großen Unterschlupf, der zusätzliche als erhöhte Liegefläche diente. Durch über Zeitschaltuhren gesteuertes Kunstlicht war ein Tag-Nacht-Rhythmus von zwölf zu zwölf Stunden gewährleistet. Zur Fütterung wurde ein Kaninchenmischfutter (Fa. Raiffeisen) und Heu verwendet. Wasser stand ad libitum zur Verfügung. Während der Eingewöhnungsphase an die neue Unterkunft wurden die Tiere klinisch, hämatologisch, bakteriologisch und parasitologisch untersucht. Alle Tiere wurden mit einer Pasteurellenvaccine behandelt. Sie waren mit Ohrmarken individuell gekennzeichnet und erhielten zusätzliche eine Versuchsnummer, die mit wasserunlöslicher Farbe auf der Ohrinnenseite aufgetragen wurde.

#### 4.3. Versuchsanordnung

---

Die Versuchstiere wurden in Gruppen für die Kurzzeituntersuchung (Follow up: 20 Tage) und Langzeituntersuchung (Follow up: 40 Tage) eingeteilt.

Die Kurzzeittiere bestanden aus sechs Gruppen (A-F) mit je vier Tieren (1 - 4), die folgende Implantate erhielten:

- Gruppe A: Verschluss des Defektes im Patellargleitlager:

Kalziumsulfatzylinder mit Kalziumcarbonat,

Implantation: Kugeln mit Gentamicin

- Gruppe B: Verschluss des Defektes im Patellargleitlager:  
Kalziumsulfatzylinder mit Kalziumoxid  
Implantation: Kugeln mit Gentamicin
- Gruppe C: Verschluss des Defektes im Patellargleitlager:  
Kalziumsulfatzylinder mit HA  
Implantation: Kugeln mit Clindamycin
- Gruppe D: Verschluss des Defektes im Patellargleitlager:  
Kalziumsulfatzylinder ohne Beigaben  
Implantation: Kugeln mit Clindamycin
- Gruppe E: Verschluss des Defektes im Patellargleitlager:  
HA in Form einer 30 %igen Paste  
Implantation: Kugeln mit Vancomycin
- Gruppe F: Verschluss des Defektes im Patellargleitlager:  
Leerdefekt  
Implantation: Kugeln mit Vancomycin

Die Langzeittiere bestanden aus drei Gruppen (G-I) mit je vier Tieren (1-4), mit den folgenden Implantaten:

- Gruppe G: Verschluss des Defektes im Patellargleitlager:  
HA in Form einer 30 %igen Paste  
Implantation: Kugeln mit Gentamicin
- Gruppe H: Verschluss des Defektes im Patellargleitlager:  
Kalziumsulfatzylinder ohne Beigabe,  
Implantation: Kugeln mit Clindamycin

- Gruppe I: Verschluss des Defektes im Patellargleitlager:

Leerdefekt,

Implantation: Kugeln mit Vancomycin

---

#### 4.4. Operationsdurchführung

---

##### 4.4.1. Operationsvorbereitung

Die Operation wurde unter Allgemeinnarkose durchgeführt. Dazu wurden die Tiere mit Atropin s.c. in einer Dosierung von 0,1 mg/kg KGW (Fa. Cp-pharma) prämediziert. 10 Minuten später wurde die Narkose mit 60 mg/kg KGW Ketamin (Fa. Chassot) und 4 mg/kg KGW Xylazin (Fa. Bayer) i.m. eingeleitet. Dann erfolgte das Scheren des linken Kniegelenkbereiches sowie der Haut über der Vena saphena des rechten Beines zur Vereinfachung der Blutentnahme. Anschließend wurde das Tier in Rückenlage fixiert. Die Narkose wurde über eine Atemmaske mittels eines Isofluran-Lachgas-Sauerstoff-Gemisches aufrechterhalten. Sie wurde mit 3 bis 4,5 Vol% Isofluran angeflutet. Zur Erhaltung waren je nach Individuum 1 bis 2 Vol% notwendig. Sauerstoff kam mit einem Liter pro Minute, Lachgas mit zwei Litern pro Minute zum Einsatz. Das Operationsfeld an der linken Gliedmaße wurde mit Alkohol entfettet, mit Braunol<sup>®</sup> desinfiziert und mit sterilen Tüchern abgedeckt.

##### 4.4.2. Operationstechnik

Nach lateraler Inzision von Haut, Hautfaszie und Kniegelenkkapsel wurde die Patella zur Darstellung des femoropatellaren Gleitlagers nach medial luxiert. Anschließend wurde mit einer wassergekühlten Diamanthohlfräse (Außendurchmesser: 4,5 mm, DBCS-System, Fa. Merck) im Zentrum des femoropatellaren Gleitlagers ein Knorpel-Knochen-Zylinder entfernt und damit die Markhöhle eröffnet. Metaphysäre Knochenspannen wurden zur Erweiterung des Markraumes mit einer flexiblen Kunststoffsonde, die über den Fräsdefekt eingeführt wurde, beseitigt. Durch Spülung des Markraumes mit physiologischer Kochsalzlösung wurden Bohrspäne und Knochenreste entfernt. Anschließend wurden zehn kugelförmigen Implantate in den Markraum eingesetzt. Unmittelbar zuvor waren diese mit den entsprechenden Antibiotikumlösungen (Gentamicin-, Clindamycin- bzw. Vancomycinlösung) für drei Minuten getränkt worden. Nach Implantation der letzten Kugel wurde der zuvor entfernte Knorpel-Knochen-Zylinder entweder durch einen reinen Kalziumsulfatzylinder ersetzt, oder durch einen Kalziumsulfatzylinder, dem Kalziumkarbonat, Kalziumoxyd oder

Kalziumapatit zugesetzt waren. Die eingesetzten Zylinder enthielten keinen Wirkstoff. Um eine feste Verankerung der Verschlusszylinder zu gewährleisten waren ihre Durchmesser um 0,1 mm größer als der Fräsdefekt und mussten durch leichte Hammerschläge und mäßigen Druck eingepasst werden. Auf diese Weise wurde das Implantat press-fit verankert und benötigte keine zusätzliche Fixierung. Nach Reposition der Patella wurde die Gelenkkapsel mit Einzelheften verschlossen (Vicryl 3 metric, Fa. Ethicon). Anschließend wurden Faszie und Unterhaut mit Einzelheften (Vicryl 3 metric) vernäht; die Haut wurde mit Mersilene® (6 metric) in Einzelheften genäht und die Wunde mit Nobecutan-Spray (Fa. Astra Chemicals) abgedeckt.

#### *4.5. Postoperative Versuchsanordnung*

---

##### **4.5.1. Postoperative Beobachtung**

Unmittelbar post operationem ist eine latero-laterale Röntgenaufnahme der operierten Gliedmaße angefertigt worden. Alle Implantate liegen zu diesem Zeitpunkt im distalen Bereich des Femurs und füllen dessen Markhöhle bis maximal zur Hälfte aus. Einige Implantate sind beim Einsetzen zerbrochen. Der Sitz der Verschlusszylinder wird ebenfalls kontrolliert und ist bei allen Probanden gegeben. Anschließend wurden die Tiere in kleine, leicht einsehbare Einzelkäfige mit Rotlichtquelle verbracht. Erst nach dem völligen Erwachen kamen die Kaninchen wieder in ihre Laufställe. Postoperativ wurden Bewegungsaktivität, Heilungsverlauf der OP-Wunde und Temperatur sowie allgemeine Parameter des Wohlbefindens wie Futteraufnahme und Körpergewicht regelmäßig kontrolliert, beurteilt und protokolliert.

##### **4.5.2. Knochenmarkierung**

Zur Darstellung der räumlich-zeitlichen Ein- und Umbauvorgängen einschließlich der Menge des neugebildeten Knochens wurden den Versuchstieren Fluorochromfarbstoffe verabreicht (FROST 1969, RAHN 1979; ERIKSEN 1986, HÄRTTER 1998, STRAUSS 1999). Dabei wurden alle Kaninchen (Kurzzeit- und Langzeittiere) nach folgendem Schema markiert:

- 07. und 11. Tag    Calceingrün                    10 mg/kg KGW
- 14. und 18. Tag    Alizarinkomplexon                    30 mg/kg KGW

Die Tiere der Langzeitgruppe (Gruppen G, H, I) wurden zusätzlich am 31. und 35. Tag mit 30 mg/kg KGW Oxytetracyclin markiert. Die Applikation der Farbstoffe erfolgte

gemäß der von HÄRTTER (1998) und STRAUß (1999) beschriebenen Vorgehensweise in gelöster Form mittels subcutanen Injektionen.

#### *4.6. Untersuchung der Antibiotikumfreisetzung in vitro und in vivo*

---

##### **4.6.1. Antibiotikumfreisetzung in vitro**

Zur Überprüfung der Wirkstofffreisetzung wurde die Elutionsrate in vitro bestimmt. Dafür wurden Kalziumsulfatkugeln mit einem Durchmesser von vier mm gammastrahlensterilisiert und bei Zimmertemperatur für drei Minuten mit der jeweiligen Antibiotikallösung getränkt. Anschließend wurden die Kugeln eine halbe Stunde luftgetrocknet. Die Wirkstofffreisetzung erfolgte in 5 ml Phosphatpuffer mit einem pH von 7,4. Dabei wurde das Medium alle zwei Stunden ausgewechselt. Ab der achten Stunde erfolgte der Mediumwechsel alle 24 Stunden. Je Antibiotikum wurden sechs Kugeln untersucht. Die einzelnen Eluate wurden bis zur weiteren Untersuchung bei -18 °C tiefgefroren.

##### **4.6.2. Antibiotikumfreisetzung in vivo**

Für die Bestimmung der Gentamicin-, Vancomycin- und Clindamycinkonzentrationen im Serum wurde den Kaninchen 2, 4, 6, 8, 24, 48 und 72 Stunden nach Implantation der antibiotikumgetränkten Kugeln etwa 2 ml Blut aus der Vena saphena entnommen. Nach einer etwa zweistündigen Lagerung bei Zimmertemperatur wurden die Proben bei 4.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und vorsichtig abdekantiert. Anschließend erfolgte, bis zur weiteren Bestimmung, eine Lagerung der Seren bei -18 °C.

##### **4.6.3. Mikrobiologische Bestimmung der Antibiotikumkonzentrationen im Serum**

Die mikrobiologische Antibiotikumbestimmung erfolgte durch Dr. E. Dingeldein, Fa. Coripharm, Dieburg mittels Agar-Diffusionstest unter Verwendung von *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) als Testkeim. Dabei macht man sich zunutze, dass bei der Bebrütung von Platten, die den Testkeim enthalten, vorhandene Antibiotika dessen Wachstum hemmen. Dies zeigt sich in den so genannten „Hemmhöfen“, die im Durchmesser den vorhandenen Antibiotikakonzentrationen direkt proportional sind. Die entstandenen Hemmhöfe können mit einer Standardgerade verglichen werden, die über parallel ermittelte Hemmhöfe von fünf Standardkonzentrationen in einem halblogarithmischen Raster (Dosenlogarithmen gegen zugehörige Hemmhofdurchmesser) erstellt wurde.

## 4.7. *Histologische Untersuchungen*

---

### 4.7.1. **Entnahme von Gewebeproben für die histologische Untersuchung**

Die Tiere wurden entweder 20 Tage (Kurzzeitgruppe) oder 40 Tage post operationem (Langzeitgruppe) erneut anästhesiert (siehe Kapitel 4.4.1). Nach Laparotomie wurden Vena cava caudalis und die Aorta abdominalis weit kaudal ligiert und mit Feinnadelkathetern versehen. Somit konnte das Blut der hinteren Körperregion unter Umgehung des Herzens durch Ringer-Lösung ersetzt werden. Im Anschluss erfolgten die schmerzlose Tötung mit Embutramid (T61<sup>®</sup>, Fa. Intervet) intrakardial und die Perfusion der Gliedmaßen mit etwa 300 ml körperwarmer Karnovsky-Lösung. Nach Entnahme des Femurs (Exartikulation im Hüft- und Kniegelenk, Entfernen von Weichteilgewebe, weitere Präparation) wurde dieser bis zur weiteren Bearbeitung in Karnovsky-Lösung gelagert.

### 4.7.2. **Herstellung der histologischen Präparate**

Die Knochen wurden mit der von DONATH UND BREUNER (1982) entwickelten Trenn-Dünnschliff-Technik bearbeitet. Diese ermöglicht es, histologische Knochenpräparate von unter 10 µm Dicke anzufertigen (DONATH, 1986, 1995). Der Kontakt zwischen Implantat und Knochen (Interface) bleibt dabei erhalten.

Um eine vollständige Fixation zu gewährleisten verblieben die Knochen vor dem Zuschnitt für etwa drei Tage in der Karnovsky-Lösung. Danach wurde der Femurkondylus vom Femurschaft abgetrennt und median im Bereich des Verschlusszylinders geteilt. Von beiden Hälften wurden anschließend mit einer diamantbesetzten Bandsäge (Exakt-Trennschleifsystem) parallele Schnitte angefertigt. Diese wurden noch einmal für etwa 12 Stunden zur Fixation in Karnovsky-Lösung eingelegt.

Zur Dehydratation durchliefen die Proben eine aufsteigende Glykolmethacrylatreihe. Im Anschluss daran erfolgte die Infiltration durch Einlegen der Proben in Lösungen der Kunststoffe Glykolmethacrylat und Technovit 7.200 VLC<sup>®</sup> (Fa. Kulzer) im Verhältnis 1:1 für 12 Stunden.

Die kunststoffinfiltrierten Proben wurden in Einbettungsmatrizen mit dem Einbettungskunststoff Technovit<sup>®</sup> bedeckt und dieser durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge von 450 nm polymerisiert. Für die Trenn-Dünnschlifftechnik eignen sich nur

sehr harte Kunststoffe, da sonst das Schleifpapier verklebt und somit Schleifartefakte entstehen.

Die Polymerisation erfolgte in zwei Schritten unter Vakuum, um Spannungsrisse zu vermeiden und eventuell vorhandene Luftblasen zu eliminieren. Der ausgehärtete Kunststoffblock wurde anschließend mittels eines doppelseitigen Klebebandes mit der zu untersuchenden Seite auf einem Plexiglasobjektträger fixiert. Auf der Gegenseite wurde Technovit 4.000<sup>®</sup> (Fa. Kulzer) aufgebracht und ein Plexiglasobjektträger exakt waagrecht befestigt. Der Technovitaushärtung folgten die Entfernung des unteren Objektträgers und des Klebebandes. Anschließend wurde der Block im Exakt-Mikro-Schleifsystem vorsichtig planparallel zum Objektträger geschliffen. Dies wurde an mehreren Stellen mittels einer Mikrometerschraube kontrolliert, bevor auf die plangeschliffene Fläche mit einer dünnen Schicht Präzisionsphotokleber (Fa. Kulzer) ein Glasobjektträger aufgeklebt wurde. Unter Zuhilfenahme einer Exakt-Präzisionsklebepresse konnte die Entstehung von Luftblasen weitestgehend vermieden werden.

Als weiterer Arbeitsschritt folgte nun die Abtrennung des Glasobjektträgers mit der anhaftenden und zu untersuchenden Region vom Restblock durch den Zuschnitt im Exakt-Trenn-Schleifsystem und die Behandlung im Exakt-Mikro-Schleifsystem. Damit können automatisiert Dicken im Mikrometerbereich geschliffen werden. Abschließend wurden die Schnitte mit feinkörnigem Sandpapier nachbehandelt, mit Toluidinblau gefärbt und mit Technovit 7.200 VLC<sup>®</sup> eingedeckelt.

#### **4.7.3. Färbung der Präparate**

Für eine gute Interpretation der Knochenumbauvorgänge und der zellulären Reaktionen in den Knochenschnitten eignet sich besonders die Toluidinblau-Färbung. Diese einfache und schnell durchführbare metachromatische Färbung erlaubt es, einzelne Strukturen gut zu erkennen. Zur Färbung wurden die Präparate für etwa 10-15 Minuten in 10 %igem Wasserstoffsuperoxid geschwenkt und danach mit Wasser gespült. Nach der Trocknung erfolgte die Färbung für 15 Minuten in Toluidinblau-Lösung (Rezeptur siehe Kapitel 10.4). Die gefärbten Schnitte wurden erneut mit Wasser gespült, getrocknet und mit einem Deckglas versehen.

#### **4.7.4. Mikroskopie**

Die mikroskopische Beurteilung der Proben erfolgte am Lichtmikroskop Axioplan 2 der Fa. Zeiss. Dieses war mit einem Personalcomputer mit entsprechender Software gekoppelt. Zur Verwendung kamen ein zehnfach vergrößerndes Okular und 2,5- bis 100-fach vergrößernde Objektive. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden folgende Farbfilter mit entsprechenden Wellenlängen benötigt:

- Blauviolettfilter      395 – 440 nm
- Blaufilter              450 – 490 nm
- Grünfilter              530 – 585 nm
- Universalfilter        400 / 495 / 570 nm

#### 4.7.5. Fotografische Dokumentation der histologischen Befunde



Abb. 1:

Latero-laterale Röntgenaufnahme unmittelbar nach der Implantation. Das Bild zeigt die in den Markraum eingesetzten Implantate (Hier als Beispiel Gentamicin, Kaninchen A4).



Abb. 2:

Latero-laterale Röntgenaufnahme 20 Tage post implantationem. Die Implantate zeigen im Bereich des Femurkondylus geringgradige Auflösungserscheinungen. (Hier Beispielsweise Vancomycin, Kaninchen E3).



Abb. 3:

Latero-laterale Röntgenaufnahme 40 Tage nach Implantation. Die Implantate zeigen kaum Auflösungserscheinungen (Hier zum Beispiel Clindamycin, Kaninchen H2).



Abb. 4:

Latero-laterale Röntgenaufnahme 40 Tage post implantationem. Alle Implantate, die mit Gentamicin oder Vancomycin getränkt wurden, zeigen eine nahezu vollständige Auflösung. Die Konturen der Implantatreste sind kaum erkennbar. (Beispiel Kaninchen F1, Vancomycin).

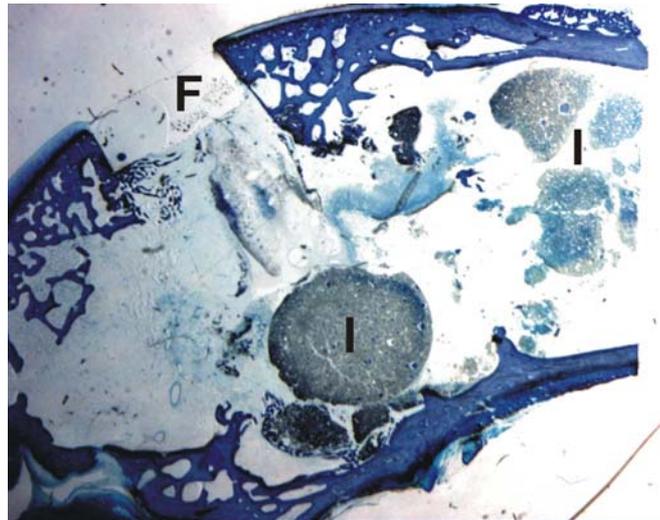


Abb. 5:

Femurkondylus 20 Tage nach der Implantation. Die Übersicht zeigt den Fräsdefekt (F) und die Implantate bzw. deren Bruchstücke (I). Die Implantate weisen bereits deutliche Zerfallerscheinungen auf. Knochendünnschliff, Toluidinblau-Färbung, Kaninchen B2 (Gentamicin), 1,2 x 10.

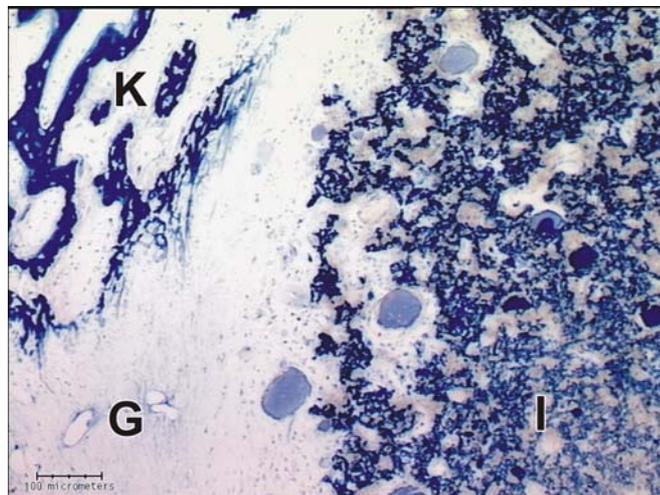


Abb. 6:

Femurkondylus 20 Tage nach Implantation. Im rechten Bildbereich befindet sich das Implantat (I), das deutliche Auflösungserscheinungen zeigt. Im linken oberen Bildbereich zeigt sich der neugebildete Knochen (K), dazwischen Bindegewebe mit einsprossenden Gefäßen (G). Knochendünnschliff, Toluidinblau-Färbung, Kaninchen A1 (Gentamicin), 10 x 10.

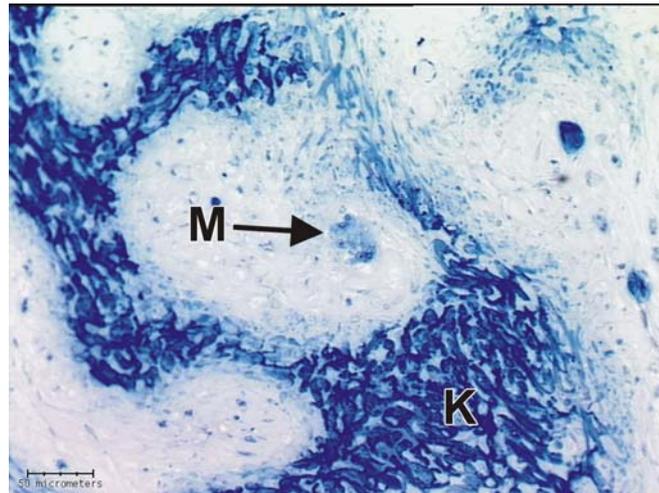


Abb. 7:

Femurkondylus 20 Tage nach Implantation. Im Bereich des neugebildeten Knochens (K) finden sich vermehrt ein- und mehrkernige Makrophagen (M). Knochendünnschliff, Toluidinblau-Färbung, Kaninchen E2 (Vancomycin), 20 x 10.

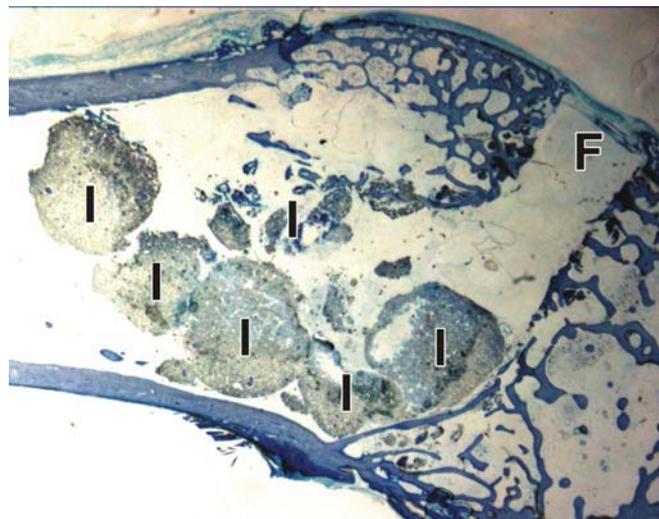


Abb. 8:

Femurkondylus 40 Tage nach Implantation. Die Implantate, die mit Clindamycin getränkt wurden, zeigen kaum Auflösungserscheinungen und erscheinen sehr kompakt (I). Knochenneubildung ist weder im Bereich des Fräsdefektes (F) noch im Bereich um die Implantate zu erkennen. Knochendünnschliff, Toluidinblau-Färbung, Kaninchen H1 (Clindamycin), 1,2 x 10.

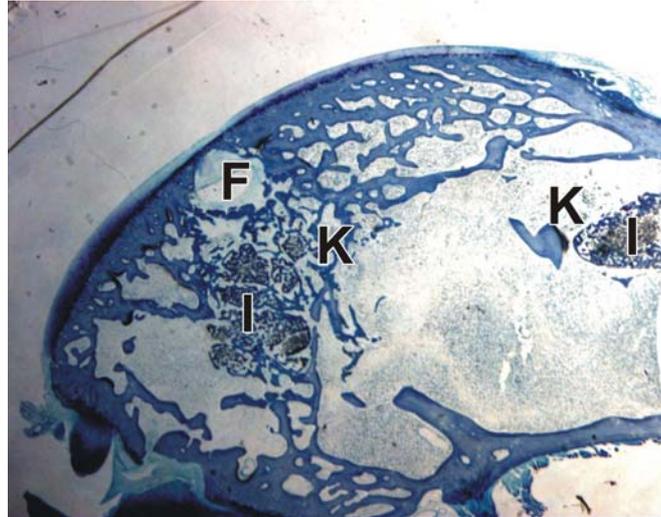


Abb. 9:

Femurkondylus 40 Tage nach Implantation. Von den Implantaten, die mit Gentamicin oder Vancomycin getränkt wurden, sind nur noch stark aufgelockerte Reste erkennbar (I). Diese sind von neu gebildetem Knochen (K) eingeschlossen. Der Fräsdefekt ist knöchern durchbaut (F). Knochendünnschliff, Toluidinblau-Färbung, Kaninchen F4 (Vancomycin), 1,2 x 10.

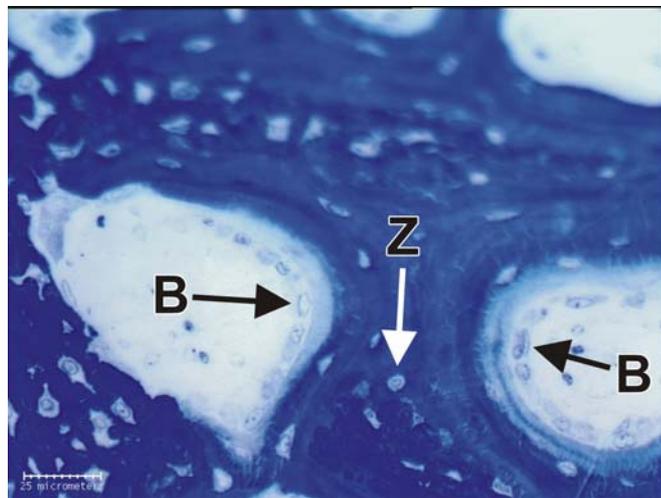


Abb. 10:

Neugebildeter Knochen des Femurkondylus, 40 Tage nach Implantation. Deutlich sind die Osteoblastenlayer (B) sowie Osteozyten (Z) zu erkennen. Knochendünnschliff, Toluidinblau-Färbung, Kaninchen I4 (Vancomycin), 40 x 10.

## 5. UNTERSUCHUNGSBEFUNDE

---

### 5.1. *Antibiotikafreisetzung*

---

Die Antibiotikumspiegel in den Blutseren der meisten Versuchstiere erreichen schon zwei Stunden nach Implantation ihren Höchstwert und zeigen bis Versuchende einen kontinuierlichen Konzentrationsabfall (Abb. 11-13, Tabellen 1-3). Bei der Verwendung von Vancomycin sind jedoch ab der achten Stunde post implantationem kaum noch Veränderungen der Serumkonzentration zu beobachten. Einige Probanden weisen erst nach vier beziehungsweise acht Stunden, einige mit Clindamycin behandelte Tiere sogar erst nach 24 Stunden einen maximalen Serumspiegel auf, dessen weiterer Verlauf jedoch dem der anderen Tiere vergleichbar ist. Zum Ende der Beobachtungszeit nähern sich die Werte der Nullmarke.

Die maximalen Wirkstoffkonzentrationen liegen bei Gentamicin zwischen 1,74 und 6,08 µg/ml, bei Vancomycin zwischen 0,44 und 3,82 µg/ml und bei Clindamycin zwischen 0,12 und 0,31 µg/ml (Abb.11-13, Tab. 1-3). Zum Zeitpunkt der ersten Messung weist Gentamicin einen Mittelwert von etwa 3,5 µg/ml auf, der somit fast dreimal so hoch liegt, wie der nach zwei Stunden gemessene Vancomycingehalt beziehungsweise circa 17 mal so hoch wie der Zwei-Stunden-Wert des Clindamycin (Abb. 11-13, Tabellen 1-3).

Beim Gentamicin ist der Abfall innerhalb der ersten acht Stunden am stärksten und wird danach geringer. Beim Vancomycin hingegen fällt zwischen der vierten und achten Stunde nach Implantation der Serumspiegel am stärksten ab und steigt anschließend innerhalb der folgenden 16 Stunden wieder leicht an, um danach nur noch geringfügig abzufallen. Clindamycin zeigt wie das Gentamicin einen kontinuierlichen Abfall der Serumkonzentration, wobei das Clindamycin anfänglich weniger stark abfällt und erst ab der achten und ganz deutlich ab der 24. Stunde post implantationem an Konzentration im Serum verliert.

Nach 48 Stunden ist Clindamycin nicht mehr nachweisbar. Gentamicin kommt noch in Spuren vor und Vancomycin ist im Mittel mit 0,5 µg/ml nachweisbar.

## 5.2. *Knochenverträglichkeit der Wirkstoffträger*

---

Die Verträglichkeit und Resorption der Wirkstoffträger im Knochengewebe wurden röntgenologisch und histologisch beurteilt.

### 5.2.1. **Postoperativer Verlauf und Röntgenkontrolle**

Unmittelbar post operationem wurde eine latero-laterale Röntgenaufnahme der operierten Gliedmaße angefertigt. Alle Implantate liegen zu diesem Zeitpunkt in der distalen Hälfte der Markhöhle. Einige Implantate sind beim Einsetzen zerbrochen. Der Sitz der Verschlusszylinder wird ebenfalls kontrolliert und ist bei allen Probanden korrekt (Abb. 1).

Während der postoperativen Phase ist bei vier Tieren ab dem zweiten Tag die Belastung der operierten Hintergliedmaße eingeschränkt. Wundheilungsstörungen können nicht beobachtet werden. Vereinzelt treten nach Bissverletzungen durch die Artgenossen kleine putride subkutane Abszesse auf, die aber nach Spaltung und Spülung bald wieder abheilen und das Allgemeinbefinden nicht stören. Auf eine parenterale Antibiotikungabe wurde verzichtet.

### 5.2.2. **20 Tage nach Implantation**

#### 5.2.2.1. **Röntgenologische Untersuchung**

Unmittelbar post mortem werden erneut latero-laterale Röntgenaufnahmen der operierten Gliedmaßen angefertigt. Die Implantate befinden sich alle im distalen Bereich des Femurs und füllen diesen bis etwa zur Hälfte auf. Die Kugelimplantate weisen nur geringgradige Auflösungserscheinungen auf, die sich im Röntgenbild hauptsächlich durch den Verlust der runden Kontur darstellen. Post mortem zeigen besonders die proximalen Implantate deutliche Resorptionserscheinungen in Form einer Verkleinerung bzw. des Verlustes ihrer runden Kontur, während die distalen Implantate noch größtenteils unverändert erscheinen (Abb. 2).

#### 5.2.2.2. **Histologische Untersuchung**

##### 5.2.2.2.1. *Gentamicin-Implantate*

Die Implantate zeigen 20 Tage nach Implantation deutliche Resorptionserscheinungen. Die runde Kontur ist bis auf wenige Ausnahmen aufgehoben. Bei mehreren Präparaten sind Keilstücke aus den Kugeln herausgebrochen, die auch auf der Bruchseite resorptionsbedingte Veränderungen in Form einer unregelmäßig gestalteten und aufgelockerten Oberfläche mit Einbuchtungen aufweisen, weshalb ein Sägeartefakt

ausgeschlossen werden kann (Abb. 5). Der Implantatverbund erscheint zentral kompakt. Die Implantate zeigen zum Teil eine sehr deutliche Gefäßneubildung und Einwanderung von ein- und mehrkernigen Makrophagen. Granulozyten sind nicht nachweisbar (Abb. 6). In der Peripherie lösen sich insbesondere die Kalziumsulfatanteile schneller als die Hydroxylapatitanteile und geben diesem Bereich eine aufgelockerte Struktur.

Zirkulär um die Implantate befindet sich eine dünne Schicht aus kollagenen Bindegewebsfasern, in denen vermehrt Fibrozyten vorkommen. Weiter peripher sind zahlreiche Makrophagen und ganz vereinzelt Granulozyten zu finden.

Stellenweise sieht man um die Implantate Areale mit ausgeprägter Gefäßneubildung und Makrophagen. In diesen Bereichen finden sich neugebildete Knochenbälkchen, die, vom Lagerknochen ausgehend, zum Teil bis kurz vor die Implantate reichen. Es handelt sich dabei ausnahmslos um lamellären Knochen. Entlang dieser Knochenbälkchen finden sich deutliche Osteoidsäume mit Osteoblastenlayern. Im Zentrum liegen die knochenbildenden Zellen bereits eingemauert als Osteozyten vor.

#### *5.2.2.2. Clindamycin-Implantate*

Auch hier zeigen sich 20 Tage nach der Implantation deutliche Resorptionserscheinungen in Form von ungleichmäßigen Oberflächen mit starken Konturverlusten. Diese sind in der Clindamycin-Gruppe ausgeprägter, als bei den Tieren der Gentamicin-Gruppe. Bei einigen Präparaten sind Teilstücke aus den Kugeln herausgebrochen, die auch auf der Bruchseite resorptionsbedingte Unregelmäßigkeiten der Ränder aufweisen. Der Implantatverbund ist zentral ebenfalls fest gefügt. Die Peripherie erscheint durch beginnende Lösungsvorgänge aufgelockert. Die Implantate zeigen teilweise eine geringgradige Gefäßneubildung und Immigration von ein- und mehrkernigen Makrophagen, die auch in der Umgebung des neugebildeten Knochens vorkommen (Abb. 7). Im Implantatbereich sind keine Granulozyten nachweisbar.

Dicht um die Implantate schließt sich eine dünne Schicht aus kollagenem Bindegewebe mit gehäuftem Vorkommen von Fibrozyten an, die aber nicht so massiv erscheint, wie bei den Gentamicinimplantaten. Im Randgebiet der Implantate sind zahlreiche Makrophagen und ganz vereinzelt Granulozyten zu finden.

Um die Implantate finden sich Areale mit mäßiger Gefäßneubildung und Makrophagenimmigration. In diesen Bereichen zeigen sich neugebildete Knochenbälkchen, die vom Lagerknochen ausgehen. Die Knochenneubildung ist jedoch

weit weniger stark ausgeprägt, als bei den Tieren, denen gentamicinetränkte Kugeln implantiert wurden. Bei der Hälfte der Tiere ist nahezu keine Knochenneubildung zu beobachten. Lediglich die Probanden, bei denen der Defektverschluss Hydroxylapatit enthielt, weisen eine deutliche Knochenneubildung auf, die aber bei weitem nicht so stark ist, wie in der Gentamicin-Gruppe.

Es handelt sich dabei ausschließlich um lamellären Knochen. Auf diesen Knochenbälkchen finden sich Osteoidsäume mit vereinzelt Osteoblastenlayern.

#### 5.2.2.2.3. *Vancomycin-Implantate*

In dieser Gruppe zeigen die Implantate 20 Tage nach Insertion deutliche Resorptionserscheinungen, die in ihrer Art und Ausprägung etwa denen der Gentamicin-Gruppe entsprechen. Auch hier ist die gleichmäßige runde Form bis auf wenige Ausnahmen aufgehoben. Bei mehreren Präparaten sind Implantatanteile aus den Kugeln herausgebrochen. Das Zentrum der Implantate und Implantatteilstücke ist dicht gefügt, wohingegen die Peripherie durch die beginnende Auflösung und Resorption aufgelockert und unregelmäßig erscheint. Die Implantate zeigen allerdings zentral weder Gefäßeinsprossung noch Einwanderung von ein- und mehrkernigen Makrophagen.

Um die Implantate befindet sich eine kreisförmige, fibrozytenreiche, dünne Bindegewebsschicht aus kollagenen Fasern. Diese ist geringgradig dicker als bei der Gentamicin-Gruppe. In der Peripherie der Implantate sind nur wenige Makrophagen und vereinzelt Granulozyten zu finden.

In verschiedenen Bereichen um die Implantate finden sich Areale mit ausgeprägter Gefäßneubildung und Makrophagenimmigration. Hier sieht man neugebildete Knochenbälkchen, die vom Lagerknochen ausgehen und meist bis unmittelbar vor die Implantate reichen. Einige Implantate sind zirkulär bereits nahezu oder vollständig von neu gebildetem lamellären Knochen umschlossen. Auf diesen Knochenbälkchen finden sich deutliche Osteoidsäume mit Osteoblastenlayern (Abb. 10).

### **5.2.3. 40 Tage nach Implantation**

#### **5.2.3.1. Röntgenologische Untersuchung**

Unmittelbar post mortem werden erneut latero-laterale Röntgenaufnahmen der operierten Gliedmaßen angefertigt. 40 Tage post implantationem sind bei den Tieren, deren Implantate mit Gentamicin oder Vancomycin getränkt waren, keine oder nur noch schemenhafte Implantatreste im Röntgenbild zu erkennen (Abb. 4). Der Fräsdefekt ist bei diesen Tieren vollständig knöchern durchbaut.

Bei Tieren, deren Implantate mit Clindamycin getränkt waren, ist hingegen kein wirklicher Fortschritt der Resorption zu erkennen (Abb. 3). Nahezu alle Kugeln besitzen noch ihre runde Form. Der Fräsdefekt ist nur zum Teil knöchern durchbaut und dann weitaus dünner, als dies bei Tieren der Fall ist, deren Implantate mit Gentamicin oder Vancomycin getränkt waren.

#### **5.2.3.2. Histologische Untersuchung**

##### *5.2.3.2.1. Gentamicin-Implantate*

40 Tage nach der Implantation sind die Resorptionsvorgänge deutlich fortgeschritten. Nahezu alle Implantate haben ihre rundliche Kontur verloren und sind zumeist nur noch als Bruchstücke vorhanden. Der Kalziumsulfatanteil ist stark zurückgegangen, wodurch der gesamte Materialverbund weiter aufgelockert wurde.

Der Bindegewebesaum um die Implantate ist schmaler als in der Kurzzeitgruppe. Es finden sich dort in geringerer Zahl ein- und mehrkernige Makrophagen, als dies nach 20 Tagen der Fall war. Im Unterschied dazu ist die Peripherie der Implantate von mehr Makrophagen besiedelt. Die Zellzahl nimmt zum Zentrum hin geringgradig ab. Im Kugelrandbereich sind vermehrt, im Zentrum dagegen nur vereinzelt Gefäße zu erkennen.

Im Kondylusbereich liegt vermehrt neugebildeter Knochen, der insbesondere vom Osteotomiebereich und vom Lagerknochen her bis an die Implantate reicht und diese auch bis auf einzelne Ausnahmen umschließt. Das Osteotomieareal ist bis auf wenige Ausnahmen knöchern durchbaut. Um Implantatreste erkennt man Inseln neugebildeten Knochens, der auch hier die Implantate komplett umgibt (Abb. 9). Es handelt sich dabei um Lamellenknochen, der zum größten Teil kalzifiziert ist. Dieser ist von einem dünnen Osteoidsaum umgeben, an den sich weniger Osteoblastenlayer anlagern als in der Kurzzeitgruppe. Zwischen den neugebildeten Knochenbälkchen kommen ein- und mehrkernige Makrophagen vor. Auch hier sind Gefäßeinsprossungen zu beobachten.

#### 5.2.3.2.2. *Clindamycin-Implantate*

Im Gegensatz zur Gentamicin-Gruppe ist beim Clindamycin kein deutliches Fortschreiten der Resorptionsvorgänge an den Implantaten zu verzeichnen. Die Kugeln haben, im Vergleich zur Kurzzeitgruppe, kaum an Größe verloren und besitzen zum größten Teil auch noch ihre runde Kontur. Der Materialverbund erscheint immer noch sehr kompakt (Abb. 8). Es finden sich im Randbereich der Implantate vermehrt neugebildete Gefäße sowie ein- und mehrkernige Makrophagen. Die Zellzahl nimmt zum Implantatzentrum hin ab. Im Innern der Kugeln selbst sind keine Zellen zu finden.

Um die implantierten Kugeln ist nur stellenweise eine dünne Schicht von kollagenem Bindegewebe zu finden. Bei allen Präparaten dieser Gruppe besteht nur eine geringgradige Tendenz zur Knochenneubildung. Lediglich bei einem Präparat ist die Osteotomiestelle knöchern durchbaut. Die Knochenneubildungsprozesse beschränken sich in der Regel auf den Bereich des Fräskanals. Es handelt sich dabei um kalzifizierten Geflechtknochen, der nur stellenweise von einem sehr dünnen Osteoidsaum umgeben ist. In den Bereichen wo neuer Knochen gebildet wurde, befinden sich vermehrt Gefäßeinsprossungen und Makrophagen.

#### 5.2.3.2.3. *Vancomycin-Implantate*

40 Tage nach der Implantation sind die Resorptionsvorgänge bei der Vancomycin-Gruppe deutlich fortgeschritten. Nahezu alle Implantate haben ihre rundliche Kontur verloren und liegen zumeist nur noch als Bruchstücke vor. Durch die Auflösungs- und Resorptionsvorgänge ist der Materialverbund stark aufgelockert.

Der Bindegewebesaum um die Implantate ist schmaler als in der Kurzzeitgruppe. Es finden sich dort etwas weniger ein- und mehrkernige Makrophagen, als dies nach 20 Tagen der Fall war. Die Zellzahl nimmt zum Zentrum hin geringgradig ab. Im Kugelrandbereich und vereinzelt auch im Zentrum sind vermehrt Gefäße zu finden.

Im Kondylusbereich zeigt sich vermehrt neugebildeter Knochen, der insbesondere vom Osteotomiebereich ausgeht. Der Defektbereich ist bis auf wenige Ausnahmen knöchern durchbaut und reicht vom Lagerknochen her bis an die Implantate, die er bis auf einzelne Ausnahmen umschließt. Um Implantatreste finden sich Inseln neugebildeten Knochens, der auch hier die Implantate komplett umgibt. Es handelt sich dabei um Lamellenknochen, der zum größten Teil kalzifiziert ist. Dieser ist von einem dünnen Osteoidsaum umgeben. Entsprechend assoziierte Osteoblasten sind seltener zu beobachten, als in der Kurzzeitgruppe. Im neugebildeten Knochen sind deutlich

eingeschlossene Ostim<sup>®</sup>-Anteile zu sehen. Zwischen den neugebildeten Knochenbälkchen sind ein- und mehrkernige Makrophagen sowie Gefäßeinsprossungen zu erkennen.

## **5.2.4. Zusammenfassung der Ergebnisse**

### **5.2.4.1. 20 Tage nach Implantation**

In den Präparaten der Kurzzeitgruppen kann folgendes beobachtet werden:

- Die Implantate zeigen starke Auflösungserscheinungen.
- Die Kugeln sind von kollagenem Bindegewebe umgeben.
- Das die Implantate umgebende kollagene Bindegewebe weist eine deutliche Gefäßeinsprossung auf.
- In der Peripherie der Implantate kommen zahlreiche ein- und mehrkernige Makrophagen vor.
- Es findet Knochenneubildung statt.
- Resorptionslakunen sind nur vereinzelt zu beobachten

Die Präparate der Kurzzeitgruppen weisen folgende Reaktionsunterschiede auf:

- Die Auflösungserscheinungen der Implantate sind bei Präparaten der Clindamycin-Gruppen geringgradig stärker als bei den Vancomycin- und Gentamicin-Gruppen.
- Der Bindegewebesaum um die Kugeln ist bei der Clindamycin-Gruppe am dünnsten und bei der Vancomycin-Gruppe am dicksten.
- Eine deutliche Knochenneubildung zeigen die Tiere der Gentamicin- und der Vancomycin-Gruppe. In der Clindamycin-Gruppe findet bei Tieren, bei denen der Osteotomiebereich mit reinem Kalziumsulfat verschlossen wurde, nahezu keine Knochenneubildung statt. Die Knochenneubildung ist dagegen besser, jedoch immer noch geringer als bei den übrigen beiden Gruppen, wenn der Osteotomiebereich mit einer Mischung aus Kalziumsulfat und Hydroxylapatit verschlossen wurde.
- Der neugebildete Knochen reicht bei den Tieren der Gentamicin- und der Vancomycin-Gruppe bis nahe an die Implantate.
- Auch in der Peripherie findet Knochenneubildung statt.

- 
- Die Knochenneubildung in den Clindamycin-Gruppen fehlt oder ist im Bereich der Fräsrän­der nur mäßig ausgeprägt.

#### **5.2.4.2. 40 Tage nach Implantation**

In den Präparaten der Langzeitgruppen kann folgendes beobachtet werden:

- Die Fräsdefekte sind größtenteils mit neu gebildetem Knochen durchbaut.
- Der neugebildete Knochen umschließt meist die Implantate. Einzelne Implantatbruchstücke sind ebenfalls von neu gebildetem Knochen umgeben.
- Der Bindegewebesaum um die Kugeln ist schmaler und zellärmer als in den Kurzzeitgruppen.
- Die Implantate zeigen Gefäßeinsprossung und eine zum Zentrum hin abnehmende Anzahl an ein- und mehrkernige Makrophagen.

Die Präparate der Langzeitgruppen weisen folgende Reaktionsunterschiede auf:

- Gegenüber den Gentamicin- und den Vancomycin-Gruppen zeigen die Implantate der Clindamycin-Gruppen kein deutliches Fortschreiten der Resorptionsvorgänge.
- Die Knochenneubildung in den Clindamycin-Gruppen ist im Vergleich zu den übrigen Gruppen sehr gering.
- In den Gentamicin- und der Vancomycin-Gruppen sind vermehrt Gefäße sowie ein- und mehrkernige Makrophagen zu finden.
- In den Clindamycin-Gruppen sind zentral keine Zellen zu finden.

## 6. DISKUSSION

---

### 6.1. *Diskussion der Methode*

---

#### 6.1.1. **Tiermodell**

Das Kaninchen ist für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit das ideale Versuchsmodelltier. Es ist leicht zu halten und wurde bereits bei ähnlichen Fragestellungen eingesetzt (NIKULIN UND LJUBOVIC, 1956; BAHN, 1962; DAHNERS UND FUNDERBURK, 1987; HÄRTTER, 1998; STRAUSS, 1999). Seine Körpergröße gewährleistet, dass die Implantate ohne technische Schwierigkeiten und ohne Gefahr für die Tiere in ausreichender Menge in den Femurmarkraum implantiert werden können. Zudem lassen sich die Befunde mit denen vorangegangener Arbeiten (siehe oben) vergleichen.

Für die Untersuchungen wurden adulte weibliche Tiere ausgewählt. Somit war ein abgeschlossenes Knochenwachstum garantiert und die erhöhten Stoffwechselraten von Jungtieren konnten umgangen werden. Geschlechtsspezifische Unterschiede im Stoffwechsel als mögliche Fehlerquelle waren ausgeschlossen. Außerdem ist die Gruppenhaltung von weiblichen Kaninchen aufgrund eines weniger stark ausgeprägten Territorialverhaltens einfacher als die männlicher Tiere. Die Laufställe gewährleisteten einen artgerechten Bewegungsfreiraum und ermöglichten die Beurteilung der Belastung der operierten Gliedmaßen in Ruhe und Bewegung. In der Eingewöhnungsphase wurden alle Tiere klinisch, parasitologisch und hämatologisch untersucht. Es zeigte sich, dass zu Versuchsbeginn alle Kaninchen bei gutem Allgemeinbefinden waren.

#### 6.1.2. **Operationsmodell**

Problematisch ist die bei der Verwendung von Knochenbohrern entstehende Hitze, die oftmals zu Gewebenekrosen und somit zu einer Zerstörung des osteogenen Potentials führt. Deshalb wurde in dieser Studie, wie in den vorangegangenen Untersuchungen, eine Diamanthohlfräse mit Innenspülung benutzt, mit der ein vitales und nahezu unbeschädigtes Implantatlager gefräst werden konnte. Die verwendeten Implantatmaterialien kamen wie auch das Operationsmodell in anderen Studien bereits zum Einsatz (NIKULIN UND LJUBOVIC, 1956; BAHN, 1962; DAHNERS UND FUNDERBURK, 1987; HÄRTTER, 1998; STRAUSS, 1999). Sie haben sich bewährt, so dass aufgrund des Standards vergleichbare Ergebnisse zu erwarten sind.

### **6.1.3. Form und Beschickung der Wirkstoffträger**

Den Wirkstoffträgern früherer Untersuchungen wurde das Antibiotikum bereits im Fertigungsprozess zugegeben (MACKEY UND MITARBEITER, 1982; DAHNERS UND FUNDERBURK, 1987; MICLAU UND MITARBEITER, 1993; BOWYER UND CUMBERLAND, 1994; MOUSSET UND MITARBEITER, 1995). Für die vorliegende Arbeit wurden dagegen wirkstofffreie Implantate hergestellt und das Antibiotikum erst unmittelbar vor der Implantation zugefügt (HÄRTTER, 1998; STRAUSS, 1999). Der Vorteil dieser Vorgehensweise liegt zum einen im geringeren Materialaufwand; nicht für jede erdenkliche Wirkstoffkombination müssen Implantate vorrätig gehalten werden, was auch die Handhabung vereinfacht. Der Wirkstoffträger kann bedarfsweise mit der gewünschten Wirkstoffart, -menge und -zusammensetzung bestückt werden, was eine gezielte Therapie möglich macht, wie sie mit einer Standardzubereitung nicht immer gegeben wäre.

Auch die Form der Implantate hat Vorteile: Im Vergleich zu pelletförmigen Implantaten (RANDOLPH UND MITARBEITER, 1996) vermeidet die Kugelform das Verkanten der Wirkstoffträger im Markraum und die Implantate können dichter gepackt werden.

Darüber hinaus müssen resorbierbare Antibiotikumträger im Vergleich mit nicht resorbierbaren Septopal-Ketten, nicht in einer zweiten Operation entfernt werden. Somit entfallen die mit einem erneuten Eingriff verbundenen Risiken der Narkose, der erneuten Traumatisierung des Gewebes und die Gefahr von Infektionen.

## *6.2. Diskussion der Ergebnisse*

---

### **6.2.1. Verwendete Antibiotika**

Entscheidendes therapeutisches Kriterium für den Einsatz eines Antibiotikums ist dessen Wirkungsbreite gegen nahezu alle bei einer Osteomyelitis vorkommenden Keime. Dies sind insbesondere Staphylokokkus aureus, koagulase-negative Staphylokokken, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli und Enterobacter sp. (DINGELDEIN UND MITARBEITER, 1983). Bei der Implantation von Gelenkprothesen spielen darüber hinaus Staphylokokkus epidermidis, Enterokokkus faecalis und Corynebakterien eine wichtige Rolle (KUECHLE UND MITARBEITER, 1991; KLARE UND MITARBEITER, 2003).

Gentamicin wurde aufgrund seines bakteriziden und breiten Wirkspektrums in Verbindung mit Knochenzementen und PMMA-Kugeln bereits umfassend untersucht

und erwies sich bei der Behandlung von Knocheninfektionen als sehr geeignet (BUCHHOLZ UND GARTMANN, 1972; VOORHOEVE UND STÖHR, 1973; KLEMM, 1974, 1976, 1977, 1979, 1980; DINGELDEIN UND WAHLIG, 1976; WAHLIG ET AL, 1976; WAHLIG UND DINGELDEIN, 1980; BRAUN UND MITARBEITER, 1980, 1982; VÉCSEI UND STARLINGER, 1982; DINGELDEIN UND MITARBEITER, 1983; KNAEPLER UND MITARBEITER, 1985; GERHART UND MITARBEITER, 1993; STRAUSS, 1999).

In den letzten Jahren werden multiresistente Keime für Osteomyelitiden zunehmend problematisch. Insbesondere gram-positive Erreger wie *Staphylokokkus aureus*, *Staphylokokkus epidermidis*, *Enterokokkus faecalis* und *Corynebakterien* bilden Multiresistenzen aus. Dennoch können nahezu alle diese Kokkenstämme erfolgreich mit Vancomycin bekämpft werden (GRAZIANI UND MITARBEITER, 1988; MCLAREN, 1988; SCOTT UND MITARBEITER, 1988; LAWSON UND MITARBEITER, 1990; KUECHLE UND MITARBEITER, 1991; WINKLER UND MITARBEITER, 1997; KLARE UND MITARBEITER, 2003). Die Zunahme multiresistenter Bakterienstämme zwingt jedoch zu einem immer häufigeren Einsatz von Reserveantibiotika. Auch werden in letzter Zeit Resistenzen von Streptokokken der *Leuconostoc*-Gruppe beobachtet, die zunehmend die Enterokokken, *Corynebakterien* und insbesondere das multiresistente *Clostridium difficile* betreffen. Vancomycin wird im alkalischen Milieu instabil, entfaltet aber in der zumeist sauren Umgebung von Implantaten seine Wirksamkeit. Allerdings hemmt ein niedriger Gewebe-pH die Knochenheilung stark.

Wie Vancomycin zählt auch Clindamycin zu den so genannten Reserveantibiotika für multiresistente gram-positive Keime. Sein Wirkungsspektrum ähnelt dem der Macrolid-Antibiotika. Die Wirkungsintensität wird im alkalischen und anaeroben Milieu gefördert. Clindamycin ist lipidlöslich und hat eine gute Membranpermeabilität. Im Weich- und Knochengewebe finden sich bis maximal 75 % der Serumkonzentrationen, in Pleuraflüssigkeit und Milch werden Konzentrationen bis 100 % erreicht. Im Knochen geht es keine feste Bindung ein und bleibt damit antimikrobiell aktiv. Es penetriert in Zellen und reichert sich in Leukozyten an, so dass in Entzündungsherden höhere Konzentrationen erreicht werden.

Clindamycin kommt daher als alternatives Therapeutikum bei penicillinresistenten, grampositiven Erregern oder bei einer Allergie gegen  $\beta$ -Lactame zum Einsatz. Es kann gezielt gegen Mykoplasmen- und Anaerobierinfektionen und insbesondere bei chronisch-rezidivierenden Infektionen mit fibrinös-kollagenen Entzündungszellen (z. B.

Osteomyelitis) und anderen Knocheninfektionen mit clindamycin-empfindlichen Erregern eingesetzt werden.

### **6.2.2. Antibiotikumfreisetzung**

Der Vorteil der lokalen Antibiotikumtherapie liegt in der maximalen lokalen Wirkstoffkonzentration bei sehr geringen systemischen Serumspiegeln. Da der Wirkstoff mit den Implantaten direkt an den Ort seines Bedarfes verbracht wird, werden weitaus geringere Antibiotikamengen benötigt, als dies bei einer systemischen Antibiose der Fall ist. Bei systemischer Gabe müssen die zwischen Applikations- und Wirkungsort befindlichen Barrieren wie Organe, Zellen, Membranen, Moleküle, überwunden werden. Große Mengen des Wirkstoffes werden bereits vor Erreichen des Wirkortes ausgeschieden beziehungsweise inaktiviert. Dagegen sind im Zuge einer lokalen Antibiotikatherapie direkt am Ort der Infektion hohe Wirkstoffspiegel gewährleistet. Die Serumspiegel sind bei einer lokalen Osteomyelitisbehandlung mit gentamicin-, vancomycin- oder clindamycingetränkten Wirkstoffträgern gering, weshalb Nebenwirkungen wie Oto- und Nephrotoxizität eher auszuschließen sind.

### **6.2.3. Antibiotikumgehalte der Serumproben**

Nahezu alle im Rahmen dieser Studie untersuchten Serumproben zeigen bereits zwei Stunden nach Implantation der antibiotikumhaltigen Kugeln maximale Serumkonzentrationen an. Lediglich beim Vancomycin werden die Wirkstoffmaxima nach acht und – vereinzelt - 24 Stunden erreicht. In Untersuchungen von DAHNERS UND FUNDERBURK (1987) fanden sich die Wirkstoffmaxima für Gentamicin bereits nach einer Stunde. In der vorliegenden Studie erfolgte die erste Probenentnahme zwei Stunden post operationem; es ist anzunehmen, dass das Maximum der Serumkonzentration schon vor der ersten Probenentnahme erreicht war.

Die äußerst niedrigen Serumspiegel lassen sich mit den geringen Wirkstoffmengen erklären, die vom Träger am Implantationsort abgegeben werden (WAHLIG, 1986). Daneben vermindern die oben genannten Barrieren die systemische Verteilung der Antibiotika. Ferner hat der durch die Operation traumatisierte Implantationsort naturgemäß weit weniger Blutkapillaren als gesundes Gewebe. Große Antibiotikamengen bleiben lokal gewebegebunden und werden erst allmählich renal oder hepatogen ausgeschieden. Dies führt zu der gewünschten hohen Wirkstoffkonzentration am Implantationsort, bei gleichzeitig sehr niedriger Konzentration in der Peripherie.

## **6.2.4. Wirkstoffträger**

### **6.2.4.1. Vorteile von Kalziumsulfat**

Im Jahre 1928 wurde von Petrova erstmalig Kalziumsulfat als Trägerstoff für Antibiotika eingesetzt. Penizillin- und Sulfonamidbestückte Implantate waren bei der Osteomyelitisbehandlung von durchschlagendem Erfolg (PETROVA, 1928; NYSTROM, 1928; KOVACEVIC, 1953). Im Gegensatz zu Kunstharzen ist die Resorbierbarkeit des Kalziumsulfates ein wesentlicher Vorteil (HÄUPTLI, 1952; NIKULIN UND LJUBOVIC, 1956; PELTIER, 1959; BELL, 1960; LEBOURG UND BIOU, 1961; BAHN, 1962; CALHOUN UND BLECKLEDGE, 1962; FRAME, 1975; COETZEE, 1980; BEESON, 1981; GELDMACHER, 1986; FRAME UND MITARBEITER, 1987; YAMAZAKI UND MITARBEITER, 1988). Die Nachoperation zur Implantatentfernung entfällt und damit das Risiko einer Infektion. Auch eine Auffüllung der Explantationsräumen erübrigt sich, da mit der Resorption von Kalziumsulfat die Knochenneubildung Hand in Hand geht (HÄUPTLI, 1952; NIKULIN UND LJUBOVIC, 1956; PELTIER, 1959, 1961; BAHN, 1962; CALHOUN UND MITARBEITER, 1963; COETZEE, 1980; BEESON, 1981; HÖGSET UND BREDBERG, 1986; ELKINS UND JONES, 1988).

### **6.2.4.2. Vorteile von nanopartikulärem Hydroxylapatit (Ostim®)**

Nanopartikuläres Hydroxylapatit (HA) wurde als Ostim® 1995 in Russland für die Stomatologie, die Parodontologie, die Gesichts- und Kieferchirurgie, die Traumatologie und die Orthopädie zugelassen (DINGELDEIN UND ENGART, 2001). Nanopartikuläres HA ist biokompatibel und besitzt eine hohe Affinität zum Knochengewebe, unterscheidet sich aber in seiner Löslichkeit von herkömmlichen Keramiken. Es ist in seinen chemisch-physikalischen Eigenschaften dem Knochenmineral sehr ähnlich. Die pastöse Applikationsform ermöglicht das schnelle Einwandern knochenbildender Zellen, die sich in dem mit Kalzium- und Phosphationen angereicherten Milieu rasch zu Osteoblasten differenzieren und in der HA-Matrix proliferieren (DINGELDEIN UND MITARBEITER, 1999).

Ostim® ist eine kristalline Substanz aus lang gestreckten plättchenförmigen Kristallen von circa 18 nm Größe. Daher rührt seine sehr große Oberfläche von etwa 100 m<sup>2</sup> pro g. Dagegen hat Kalziumsulfatpulver nur eine Oberfläche von zwei m<sup>2</sup> pro Gramm (GLOEDE UND WINKEL, 1999). Ostim® beschleunigt die Proliferationsrate von knochenbildenden Zellen und stimuliert die Knochenheilung. Es zeigt ein deutlich höheres Lösungspotential, ohne zu einer Erhöhung des Kalziumspiegels im Serum zu führen. Ostim® verfügt über eine außerordentlich hohe Pufferkapazität, die das initial herrschende saure Milieu zu neutralisieren vermag und schafft somit die ideale Voraussetzungen für eine rasche Knochenneubildung (DINGELDEIN UND ENGART, 2001).

### **6.2.5. Diffusionseigenschaften**

In Verbindung mit Kalziumsulfat zeigen Antibiotika eine hervorragende Diffusion (STRAUSS, 1999), die von verschiedenen Autoren bestätigt wird (MACKEY UND MITARBEITER, 1982; MACKEY UND VARLET, 1984; MOUSSET UND MITARBEITER, 1995). BOWYER UND CUMBERLAND (1994) sowie MICLAU UND MITARBEITER (1993) wiesen nach, dass, im Gegensatz zu nicht resorbierbaren PMMA-Kugeln, Kalziumsulfatimplantate nahezu den gesamten Wirkstoff freisetzen. Die vorliegende Studie zeigt, dass Ostim<sup>®</sup> aufgrund des hohen Löslichkeitspotentials und seines geringen Anteils im Implantat von 30 % keinen negativen Einfluss auf die Diffusion der Antibiotika hat.

### **6.2.6. Knochenverträglichkeit der Implantate**

Die Implantate, bestehend aus Kalziumsulfat plus 30 % nanopartikulärem HA (Ostim<sup>®</sup>), waren nach 20 Tagen von einem Granulationsgewebesaum umgeben, der nach 40 Tagen geringer war. Er enthielt zu beiden Untersuchungszeitpunkten Kapillaren, Mesenchymzellen, und Makrophagen; nach 40 Tagen waren die Zellzahlen deutlich geringer. Entgegen den Ergebnissen von STRAUSS (1999), die reines Kalziumsulfat als Trägerstoff verwendete, waren Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen in allen Präparaten nur vereinzelt zu sehen, was auf die Pufferfähigkeit des nanopartikulären Ostim<sup>®</sup> zurückgeführt werden kann. Von der Clindamycin-Gruppe abgesehen beherrschten im Zuge der Phagozytose von nekrotischem Zellmaterial ein- und mehrkernige Makrophagen auch noch nach 40 Tagen in der Umgebung der Implantate das Zellbild.

Bei der Verwendung von reinem Kalziumsulfat als Wirkstoffträger fand STRAUSS (1999) vermehrte Sekretbildung, die auch von anderen Autoren beschrieben wird (DREESMANN, 1892; NYSTROM 1928; COETZEE 1980; GEORGIADÉ UND MITARBEITER 1993). Sekretbildung wurde in der vorliegenden Studie nicht oder nur in geringem Maße beobachtet. Serome und saurer pH-Wert verzögern die Knochenheilung (BAHN, 1966; PELTIER UND SPEER, 1981), weshalb HA als Puffer zugegeben wurde. HÄRTTER (1998) verwendete Kalziumsulfat unter Zugabe von 20 % Hydroxylapatit, konnte jedoch keine schnellere Knochenheilung oder höhere Osteogeneserate nachweisen. Sie beschreibt lediglich die Annäherung der neugebildeten Knochenbälkchen an die Implantate innerhalb von 28 Tagen. In der vorliegenden Studie sind diese aber bereits nach 20 Tagen wenigstens teilweise umbaut und es finden sich um periphere Implantatreste Inseln neugebildeten Knochens.

STRAUSS (1999) beschreibt nach der Implantation von reinem Gips eine deutliche Fremdkörperreaktion. COETZEE (1980) erklärt das mit der „sauren Phase“ während der Resorption. Auch HÄRTTER (1998) fand trotz Verwendung von 20 % Hydroxylapatit eine deutliche Fremdkörperreaktion. Eine solche Reaktion ist in der vorliegenden Studie bei der Verwendung von 30 % nanopartikulärem HA (Ostim®) in Kalziumsulfat, nicht zu beobachten. Es finden sich nur vereinzelt Granulozyten, Lymphozyten oder Plasmazellen.

Im Unterschied zu den Ergebnissen von STRAUSS (1999), wo neugebildete Knochenbälkchen lediglich auf der implantatabgewandten Seite Osteoblastentätigkeit zeigten, sind bei der Verwendung von nanopartikulärem HA (Ostim®) die Osteoblastenlayer auch auf der implantatzugewandten Seite vorhanden.

Die Ostim®-Partikel sind nach 40 Tagen größtenteils in den neugebildeten Knochen integriert. Es handelt sich dabei fast ausschließlich um lamellären Knochen. Lediglich bei der Clindamycin-Gruppe herrscht Geflechtknochen vor.

#### **6.2.7. Resorptionszeiten**

Die Resorption der Implantate im Knochengewebe war bereits nach 20 Tagen deutlich zu erkennen. In der Röntgenkontrolle zeigten die kugelförmigen Implantate einen Verlust der rundlichen Kontur, zum Teil waren nur noch Implantat-Fragmente vorhanden. Die Auflösung war nach 40 Tagen, mit Ausnahme der Clindamycin-Gruppe, weiter fortgeschritten. Die von STRAUSS (1999) bei der Verwendung von reinem Gips beobachtete vollständige Auflösung lag jedoch nicht vor. Nanopartikuläres HA (Ostim®) wird weniger resorbiert als vielmehr in den neugebildeten Knochen integriert, wo es dann weiteren Um- und Abbauvorgängen unterliegt (DINGELDEIN UND ENGART, 2001), sodass auch nach 40 Tagen noch deutliche Implantatreste nachgewiesen werden konnten.

Die Resorptionszeiten für Kalziumsulfat variieren von Autor zu Autor. Es gibt Angaben zwischen drei und vier Wochen (LEBOURG UND BIOU, 1961; BAHN, 1962; FRAME UND MITARBEITER, 1987), vier und zehn (GELDMACHER, 1986), sechs und zehn (PELTIER UND LILLO, 1956), acht und 16 (COETZEE, 1980) sowie 24 Wochen (BEESON, 1981). Dies ist durch die unterschiedlichen Applikationsformen (Paste, Pellets, Kugeln) zu erklären. Auch hat die Implantatgröße einen direkten Einfluss auf die Resorptionsgeschwindigkeit. So werden multiple kleine Körper aufgrund ihrer insgesamt größeren Oberfläche schneller resorbiert als große massive Objekte (STRAUSS, 1999).

---

Möglicherweise haben aber auch physikalisch-chemische Unterschiede der Implantate wie Porosität oder auch das Anmischverfahren einen Einfluss.

#### **6.2.8. Substitution der Implantate durch Geflechtknochen**

Der knöcherne Ersatz der Implantate im Knochengewebe konnte sowohl 20 als auch 40 Tage post implantationem bestätigt werden und übertraf, mit Ausnahme der Clindamycin-Gruppe, die Einheilung der bisher verwendeten Implantatmaterialien und damit unsere Erwartungen bei weitem. Nicht nur die Osteotomiestelle war nach 40 Tagen vollständig knöchern durchbaut. Man fand auch in der Peripherie, um abgesprengte Implantatinseln, die keine Verbindung zum Lagerknochen hatten, neugebildeten Knochen. Ob die in dieser Studie beobachtete starke osteokonduktive Wirkung einzig auf der Zugabe von Ostim<sup>®</sup> beruht, muss noch geklärt werden.

Im Unterschied zu anderen Studien (HÄRTTER, 1998; STRAUSS, 1999) konnte in der vorliegenden Untersuchung eine verstärkte und früher einsetzende Knochenneubildung beobachtet werden. Diese Reaktion könnte mit der sehr starken Pufferkapazität des Ostims<sup>®</sup> zusammenhängen, die die initial „saure Phase“ in eine alkalische überführt. COETZEE (1980) beschrieb, dass die pH- Differenz zwischen dem sauren Gips und der extrazellulären Flüssigkeit anfänglich zu einer Hemmung der Knochenregeneration führt und erklärt damit auch die von BAHN (1962) beobachtete Heilungsverzögerung, ein Stadium, das beim Menschen etwa 10 – 14 Tage anhält. Für die Pufferwirkung des Ostims<sup>®</sup> spricht zudem die von STRAUSS (1999) am siebten und 14. Tag gemachte Beobachtung, dass Knochenneubildung nur an der den Gipsimplantaten abgewandten Seiten stattfindet. Dieses Phänomen konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht beobachtet werden. Auch die implantatzugewandte Seite war von Osteoid und Osteoblastenlayern besetzt.

### **6.2.9. Ist Kalziumsulfat mit Ostim<sup>®</sup>-Zugabe ein ideales Knochenimplantat und Trägermaterial für Antibiotika?**

Nach CAPLAN (1990) muss ein ideales Knochenimplantat folgende Kriterien erfüllen:

- Das Material soll den Defekt vollständig ausfüllen, um auszuschließen, dass umgebendes Weichgewebe in diesen vorfällt und die Reparatur stört.
- Das Material soll einen Zelltransport zulassen, muss also Poren gewisser Größe aufweisen.
- Das Implantatmaterial muss die Blutgefäßbildung ermöglichen, da vaskuläre Diskontinuität zur Knorpel- und nicht zur Knochenbildung führt.
- Das ideale Implantat soll biokompatibel sein. Es darf nicht immunogen wirken und muss mit dem Wirtsgewebe und den neugebildeten Zellen eine Verbindung eingehen.
- Das Material soll osteoinduktiv wirken und resorbierbar sein.

Kalziumsulfat erfüllt die von Caplan geforderten Eigenschaften eines idealen Knochenimplantates (STRAUSS, 1999), mit Ausnahme der Osteoinduktion.

Ostim<sup>®</sup> dagegen erfüllt ausnahmslos die von Caplan geforderten Eigenschaften (DINGELDEIN UND ENGART, 2001).

Die in dieser Studie geprüfte Kombination aus Kalziumsulfat und Ostim<sup>®</sup> erfüllt in vollem Umfang die oben genannten Kriterien.

### **6.2.10. Ist Clindamycin ungeeignet für die lokale Applikation in Knochen?**

Die vorliegende Studie hat gezeigt, dass die Kombination aus 30 % nanopartikulärem Hydroxylapatit (Ostim<sup>®</sup>) und 70 % Kalziumsulfat den bisher verwendeten lokalen Antibiotikumträgern weit überlegen ist. Durch den leicht alkalischen pH von 7,5 und seine Pufferkapazität ist diese Kombination in der Lage, die von COETZEE (1980) beschriebene saure Initialphase zu neutralisieren. Ein weiterer Vorteil des nanopartikulären Hydroxylapatits ist seine gegenüber herkömmlichem HA höhere Löslichkeit (DINGELDEIN UND ENGART, 2001). Im Vergleich zu früheren Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den Gentamicin- bzw. Vancomycin-Gruppen, die Knochenheilung beschleunigt ist.

Davon ausgenommen ist jedoch die Clindamycin-Gruppe. Clindamycin gilt allgemein als das Antibiotikum der Wahl bei infizierten Knochenbrüchen und Osteomyelitiden. Bisher

zeigte es keine negativen Auswirkungen auf die Knochenheilung (DEPPE UND MITARBEITER, 2003). Vor allem die besondere Penetrationsfähigkeit des Clindamycins in thrombofibrinotisch und kollagenös veränderte Entzündungsherde chronischer Osteomyelitiden sowie seine Anreicherung in Granulozyten scheinen Clindamycin für den lokalen Einsatz am Knochen zu prädestinieren (ROSIN, 1996).

Entscheidende Reaktionsunterschiede traten ausschließlich bei clindamycinhaltigen Implantaten auf. Im Einzelnen waren dies die deutlich geringere Einsprossung von Kapillaren, die verminderte Einwanderung von ein- und mehrkernigen Makrophagen, das Vorherrschen von Geflechtknochen und eine daraus resultierende geringere Resorption der Implantate.

Die naheliegende Erklärung für den negativen Einfluss des Clindamycins auf die Knochenheilung ist eine zu hohe Dosierung. Zwar wurden nur minimale systemische Konzentrationen von maximal 0,31 µg/ml gemessen. Es ist jedoch möglich, dass die systemische Verteilung des Clindamycins durch die Traumatisierung des Implantatbereiches verlangsamt war und initial toxische lokale Spiegel zur Wirkung kamen. Dies wird umso wahrscheinlicher, wenn man die hohe Bindung des Clindamycins an Zellen und Granulozyten bedenkt. Relativiert wird dies jedoch wieder durch die Tatsache, dass Lincosamide sich in thrombotischem Gewebe besonders stark anreichern können (ROSIN, 1996). Infolge zelltoxischer Prozesse hat Clindamycin die für die Knochenheilung und -regeneration wichtige initiale Einsprossung von Blutgefäßen vermutlich inhibiert. Dies wiederum führte über die unzureichende Immigration von ein- und mehrkernigen Granulozyten und dem fehlenden Abtransport von Wundsekret zur Verzögerung der Knochenheilung in diesem Bereich, was letztendlich auch das ausschließliche Vorkommen von Lagerknochen erklärt.

Weitere denkbare Erklärungsansätze sind die Pharmakokinetik, die Pharmakodynamik, die Resorption oder das Verteilungsvolumen des Clindamycins, zu deren Abklärung jedoch weitere Studien notwendig sind.

### 6.3. *Schlussbetrachtung und Ausblick*

---

Untersuchungen zur Verträglichkeit von Wirkstoffträger-Antibiotika-Systemen als Knochenimplantate sind wegen ihrer Bedeutung für Knocheninfektionen von hohem therapeutischem Interesse. In den letzten Jahren sind diese Systeme ständig weiter verbessert worden. Ein Hauptproblem war bisher die Verfügbarkeit eines Stoffes mit starker osteoinduktiver Wirkung und einer Pufferkapazität, die die „saure Initialphase“, die mit erheblichen Wundheilungsstörungen einhergeht, in eine alkalische überführt.

Mit der Kombination von Kalziumsulfat und Ostim<sup>®</sup>, einem nanopartikulären, synthetisch hergestellten Hydroxylapatit, scheint dieser Circulus vitiosus erstmals durchbrochen. Gleichzeitig weist diese Trägerstoffkombination eine gute Antibiotikafreisetzung auf. Die im Serum gemessenen Wirkstoffmengen sind dabei so gering, dass Nebenwirkungen wie Oto- oder Nephrotoxizität der lokal applizierten Antibiotika nicht zu erwarten sind. Die niedrigen Serumspiegel erlauben sogar, den Wirkstoff bei entsprechender Indikation zusätzlich systemisch zu verabreichen. Initiale Entzündungsreaktionen konnten in dieser Studie nicht oder nur in stark abgeschwächter Form nachgewiesen werden.

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Studie war die Abklärung der Pharmakokinetik und der Verträglichkeit von Kalziumsulfat in Kombination mit Ostim<sup>®</sup>, einem nanopartikulären, synthetisch hergestellten Hydroxylapatit, die als lokale Wirkstoffträger eingesetzt wurden. Hierfür wurden der Markraum eines Femurs bei 36 Kaninchen eröffnet und pro Tier zehn Kalziumsulfatkugeln mit 30 % Ostim<sup>®</sup>-Anteil eingesetzt, die mit Gentamicin-, Vancomycin- oder Clindamycinlösung getränkt worden waren. Der knöchernen Defekt wurde für eine parallel laufende Studie mit verschiedenen Implantaten ohne Wirkstoff verschlossen, deren Bearbeitung einer weiteren Arbeit überlassen bleibt.

Für die Analyse der Antibiotikakonzentrationen im Serum wurde zwei, vier, acht, 24 und 48 Stunden nach der Implantation Serumproben gewonnen und der Wirkstoffgehalt mikrobiologisch bestimmt. Nach 20 Tagen wurden 24 Tiere und nach 40 Tagen die verbliebenen 12 Tiere getötet und entsprechende Gewebeproben entnommen.

Die maximalen Serumkonzentrationen waren bei den meisten Tieren bereits zwei Stunden nach Implantation erreicht und lagen zwischen 1,74 und 6,08 µg/ml für Gentamicin, 0,44 und 3,82 µg/ml für Vancomycin und 0,12 und 0,31 µg/ml für Clindamycin. Innerhalb der ersten acht Stunden nach Implantation nahmen die Antibiotikagehalte im Blut bereits wieder stark ab. Nach 48 Stunden konnten Gentamicin und Clindamycin nur noch in Spuren oder gar nicht mehr nachgewiesen werden. Vancomycin war auch nach 48 Stunden noch in geringen Mengen nachweisbar.

Hinsichtlich der Verträglichkeit lösten die Implantate im Knochen nur teilweise eine Entzündungsreaktion aus. Sie unterlagen nach 20 Tagen bereits starken Auflösungs- und Resorptionsvorgängen. Diese waren nach 40 Tagen weiter fortgeschritten. Die bindegewebige Einkapselung war gering. Eine lakunäre Resorption fand nur in Ausnahmefällen und in geringem Ausmaß statt. Die Abbauvorgänge übernahmen vor allem ein- und mehrkernige Makrophagen.

Knochenneubildung war in allen Gruppen zu finden, außerdem Inseln neugebildeten Knochengewebes um zentrale Implantatreste, bei denen keine Verbindung zu Zellen mit osteogenem Potential bestand. Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass die initial herrschende „saure Phase“ von der gewählten Wirkstoffträgerkombination durchbrochen und in eine alkalische überführt wird, wodurch in Verbindung mit der osteogenen Wirkung des Ostims<sup>®</sup> eine schnellere Knochenregeneration erreicht wird.

Aufgrund dieser Ergebnisse erfüllt die hier gewählte Kombination aus Kalziumsulfat mit nanopartikulärem HA (Ostim®) die von Caplan geforderten Kriterien eines idealen Knochenimplantates.

---

## 8. SUMMARY

---

The aim of this study was to elucidate the pharmacokinetics of calcium sulphate and its compatibility with Ostim<sup>®</sup>, a nano-particulate, synthetic hydroxylapatite, used as a local carrier for active substrates. The femur marrow chambers of 36 rabbits were opened for this purpose and 10 calcium sulphate pellets, containing 30 % Ostim<sup>®</sup>, were implanted per animal. The pellets were drenched either in Gentamicin, Vancomycin or Clindamycin solution. The damage to the bones was closed using cylinders of varying composition (without active ingredient) as part of a concurrent study.

Blood samples were taken 2, 4, 8, 24 and 48 hours after implantation to measure the serum concentrations of the antibiotics, which were obtained via a microbiological assay. 24 of the animals were culled on day 20, the rest on day 40 and tissue samples were taken.

In most of these animals the highest serum concentrations were observed 2 hours after implantation. The values ranged from 1.74 to 6.08 mg/ml for Gentamicin, 0.44 to 3.82 mg/ml for Vancomycin and 0.12 to 0.31 mg/ml for Clindamycin. In the first 8 hours a marked reduction in these concentrations was observed. After 48 hours Gentamicin and Clindamycin were only observed as traces, if at all, though Vancomycin could still be measured in low concentrations at this time.

With regard to the compatibility of the implants, inflammation occurred only in some of the bones. The implanted pellets showed marked disintegration and absorption after 20 days, which increased to day 40. Encapsulation by connective tissue was slight. Lacunal reabsorption occurred only in exceptional cases and again was slight. Macrophages were mainly responsible for the disintegration.

In all groups osteoregeneration was observed. Also islands of regenerated bone were observed around central implant remains without connection to any cells with osteogenic potential. These observations lead to the conclusion that the combination of the chosen active substances overcame the initial "acidic phase", thus the created alkaline conditions in combination with osteogenic effects of Ostim<sup>®</sup> aided bone regeneration.

The chosen combination of calcium sulphate and Ostim<sup>®</sup> seems to perfectly fit the criteria given by Caplan for an ideal bone implant.

## 9. TABELLEN UND GRAPHIKEN

Tab. 1:

Gentamicinkonzentrationen in  $\mu\text{g/ml}$  im peripheren Blut 2 – 48 Stunden nach Applikation in den Markraum. Arithmetischer Mittelwerte und Standardabweichungen zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten

Tier	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h
A 1	4,79	1,11	0,41	0,10	0,06
A 2	1,74	1,37	0,92	0,32	0,09
A 3	2,93	1,14	0,80	0,40	0,14
A 4	5,72	3,22	0,89	0,19	0,01
B 1	5,67	2,75	0,84	0,14	0,01
B 2	2,20	1,56	0,82	0,43	0,09
B 3	3,09	1,78	0,65	0,31	0,01
B 4	6,08	2,55	0,72	0,21	0,01
I 1	2,54	1,86	0,71	0,21	0,06
I 2	2,40	2,49	0,55	0,30	0,05
I 3	2,56	2,13	0,76	0,20	0,00
I 4	2,80	0,45	0,19	0,12	0,00
Arithmetischer Mittelwert	3,54	1,87	0,69	0,24	0,04
Standardabweichung	0,45	0,23	0,06	0,03	0,02

Tab. 2:

Vancomycinkonzentrationen in  $\mu\text{g/ml}$  im peripheren Blut 2 – 48 Stunden nach Applikation in den Markraum. Arithmetischer Mittelwerte und Standardabweichungen zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten

Tiere	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h
D 1	3,82	1,95	0,82	0,59	0,54
D 2	1,60	1,54	0,68	0,57	0,57
D 3	0,62	0,76	0,38	0,55	0,51
D 4	0,67	0,96	0,51	0,50	0,59
F 1	0,64	0,57	0,44	0,91	0,84
F 2	0,76	0,93	0,56	0,50	0,45
F 3	0,96	1,03	0,46	0,48	0,54
F 4	1,52	0,95	0,61	0,59	0,40
G 1	1,28	0,92	0,55	0,57	0,58
G 2	0,39	0,44	0,42	0,35	0,36
G 3	0,88	0,67	0,35	0,59	0,69
G 4	0,61	0,72	0,28	0,48	0,30
Arithmetischer Mittelwert	1,15	0,95	0,51	0,56	0,53
Standardabweichung	0,27	0,12	0,04	0,04	0,04

Tab. 3:

Clindamycinkonzentrationen in  $\mu\text{g/ml}$  im peripheren Blut 2 – 48 Stunden nach Applikation in den Markraum. Arithmetischer Mittelwerte und Standardabweichungen zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten

Clindamycin	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h
C 1	0,01	0,18	0,3	0,19	0,00
C 2	0,21	0,21	0,27	0,21	0,00
C 3	0,01	0,01	0,01	0,13	0,00
C 4	0,01	0,01	0,01	0,12	0,00
E 1	0,17	0,19	0,22	0,12	0,00
E 2	0,20	0,17	0,01	0,11	0,00
E 3	0,23	0,23	0,25	0,15	0,00
E 4	0,31	0,21	0,18	0,00	0,00
H 1	0,22	0,00	0,00	0,00	0,00
H 2	0,19	0,19	0,18	0,17	0,00
H 3	0,31	0,24	0,17	0,00	0,00
H 4	0,18	0,22	0,16	0,17	0,00
Arithmetischer Mittelwert	0,17	0,16	0,15	0,11	0,00
Standardabweichung	0,10	0,09	0,11	0,07	0,00

Abb. 11:

Plasmakonzentrationen von Gentamicin im Plasma von Kaninchen 2 – 48 Stunden nach Applikation in den Markraum (arithmetische Mittelwerte, Standardabweichungen) in  $\mu\text{g/ml}$  zu verschiedenen Entnahmezeitpunkten post operationem

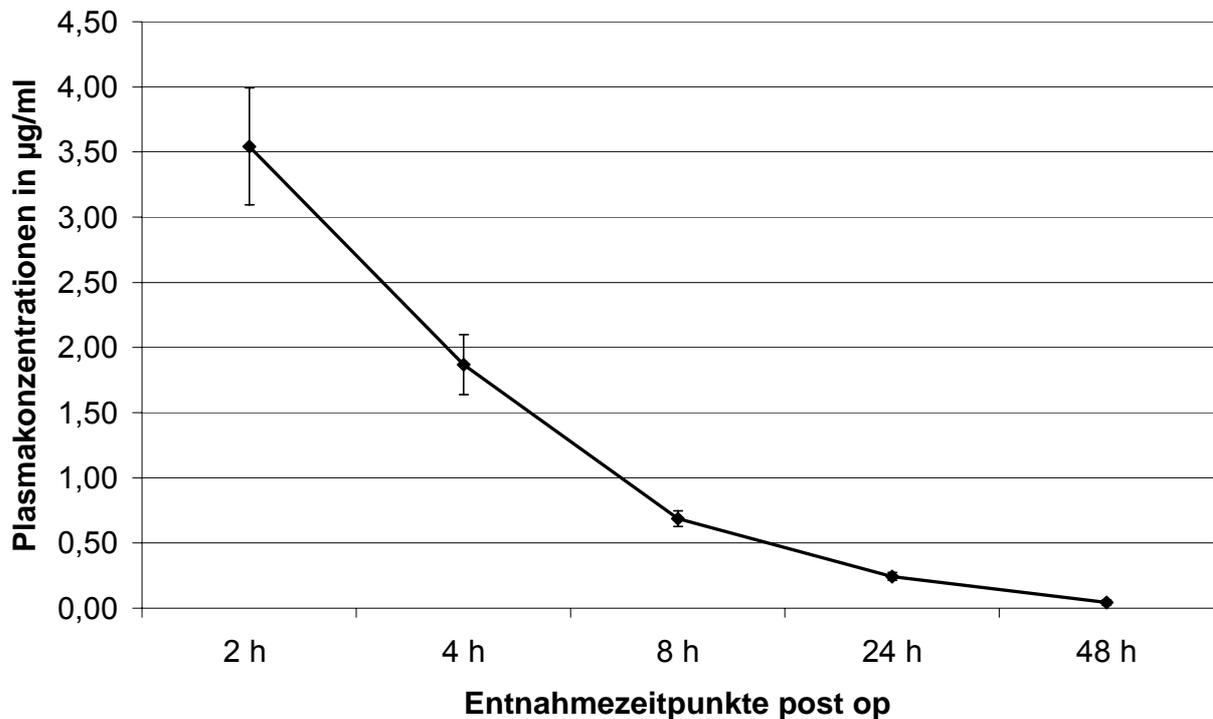


Abb. 12:

Plasmakonzentrationen von Vancomycin im Plasma von Kaninchen 2 – 48 Stunden nach Applikation in den Markraum (arithmetische Mittelwerte, Standardabweichungen) in µg/ml zu verschiedenen Entnahmezeitpunkten post operationem

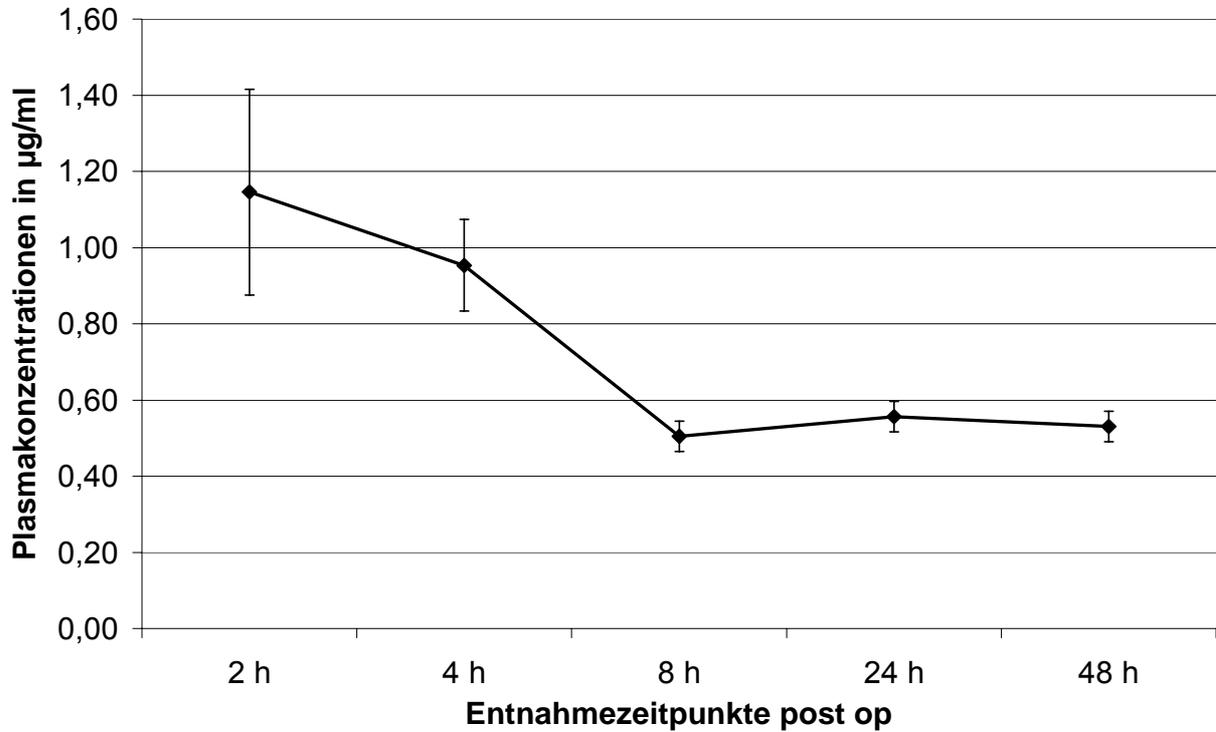
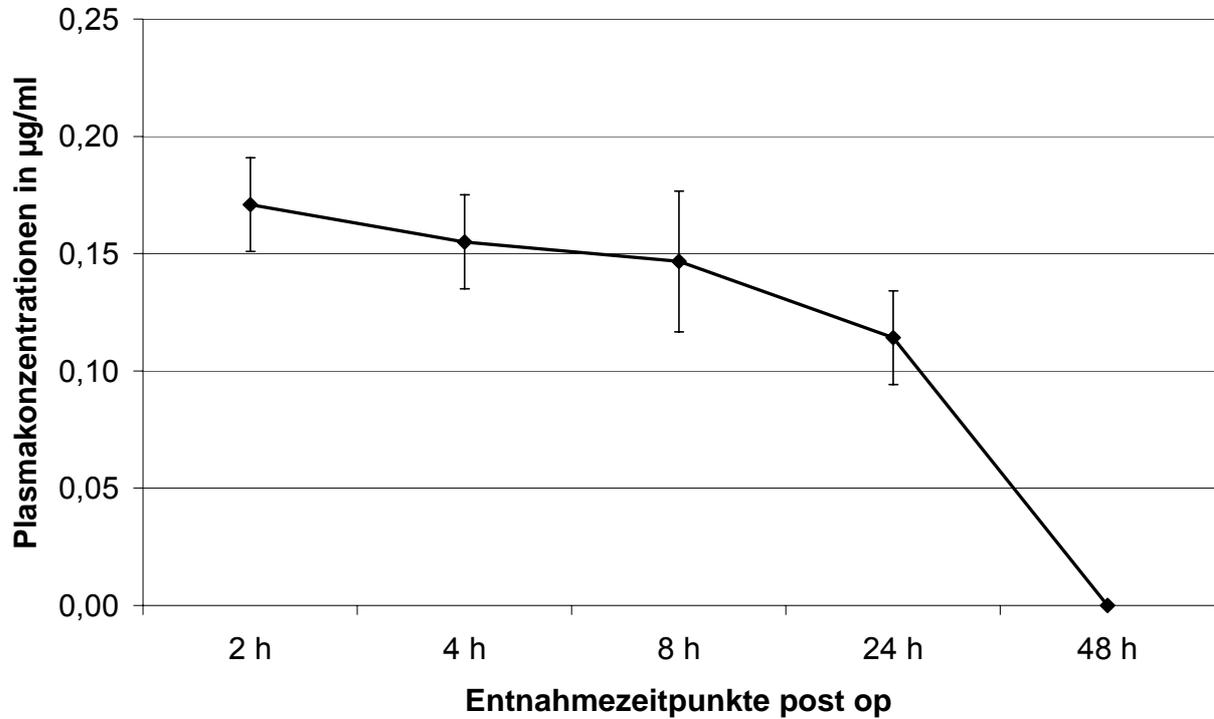


Abb. 13:

Plasmakonzentrationen von Clindamycin im Plasma von Kaninchen 2 – 48 Stunden nach Applikation in den Markraum (arithmetische Mittelwerte, Standardabweichungen) in µg/ml zu verschiedenen Entnahmezeitpunkten post operationem



## **10. REZEPTUREN**

---

### *10.1. Kalziumsulfatkugeln 4 mm*

---

50 g Gips Spezial (Fa. Coripharm, Dieburg), werden in ein Optivac-Anmischsystem eingefüllt. Nach Zugabe von 20 ml VE-Wasser wird unter Verwendung eines Mischpaddels leicht umgerührt. Einer zweiminütigen Ruhephase folgt das Mischen unter Vakuum für zwei weitere Minuten. Die Masse wird ohne Schnorchel in eine Silikonkautschuk-PE-Form für 60 Kugeln eingefüllt. Nach Verschluss der Form lässt man den Gips bei Raumtemperatur eine Stunde ruhen. Im Anschluss werden die Kugeln entnommen und entgratet. Danach verbleiben sie für mindestens drei Tage bei 37 ° C im Trockenschrank. Jeweils 10 Kugeln werden in Polystyrolröhrchen eingefüllt, in PE-Beutel verpackt und mit einer Strahlendosis von 25 kGy (Fa. Beta-Gamma Service) gammastrahlensterilisiert.

### *10.2. Fixierlösung*

---

#### **10.2.1. Karnovsky-Lösung:**

- 40 g Paraformaldehyd
- 1,2 ml 1 N NaOH
- 100 ml Glutardialdehyd 50 %
- 1000 ml Phosphatpuffer nach Sörensen
- 500 ml VE-Wasser
- pH-Wert 7,2 bis 7,4

### *10.3. Phosphatpufferlösung*

---

#### **10.3.1. Phosphatpuffer-Stammlösung 1 M**

- 112,5 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 30,0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- ad 1000 ml VE-Wasser

**10.3.2. Phosphatpuffer 1/15 M:**

23,97 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

4,35 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

in 2,5 l VE-Wasser lösen

**10.4. Färbelösung**

---

**10.4.1. Herstellung von 500 ml Toluidinblau-Färbelösung**

Für Lösung A werden 4 g Natriumtetraborat und 4 g Toluidinblau mit 400 ml Aqua destilata versetzt und mittels Magnetrührer etwa 15 Minuten gerührt. Lösung B wird aus 100 ml Aqua destilata und 1 g Pyronin G hergestellt und ebenfalls für etwa 15 Minuten vermischt. Anschließend werden beide Lösungen zusammengegeben und wiederum für 15 Minuten verrührt. Im Anschluss daran wird die Lösung zweimal filtriert. In diesem Zustand ist die Toluidinblau-Färbelösung gebrauchsfertig.

**11. MASSEINHEITEN, ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE**

---

Abb.	Abbildung
BMP	bone morphogenetic protein
BRU	bone remodeling unit
°C	Grad Celsius
CaSO <sub>4</sub>	Kalziumsulfat
DCAF	di-Carbomethyl-Aminoethyl-Fluorescin
DOPC	determinierte osteoprogenitor cells
h	Stunde
HA	Hydroxylapatit
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffsuperoxid
i. m.	intramuskulär
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
kGy	Kilogray
l	Liter
M	molar
max	Maximum
m	Meter
mg	Milligramm
min	Minimum
ml	Milliliter
nm	Nanometer
µg	Mikrogramm

---

$\mu\text{l}$	Mikroliter
NaOH	Natronlauge
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	di-Natriumhydrogenphosphat
n	Anzahl der Tiere
PC	Personal Computer
PE	Polyethylen
pH	negativer dekadischer Logarithmus der $\text{H}^+$ -Ionenkonzentration
PMMA	Polymethylmethacrylat
S	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TCP	Trikalziumphosphat
VE-Wasser	Voll entsalztes Wasser
Vol%	Volumenprozent
$\bar{x}$	arithmetischer Mittelwert
$\bar{x}_g$	geometrischer Mittelwert
%	Prozent

**12. LITERATURVERZEICHNIS**

---

**Albers H.-K.**

*Tierexperimentelle Untersuchungen zur Behandlung von parodontalen Knochentaschen mit Hilfe von Hydroxylapatit-Keramik*  
ZWR 9, 714 – 721, 1990

**Aldermann N. E.**

*Sterile plaster of Paris as an implant in the infrabony environment: A preliminary study*  
J. Periodontol., 40, 11 – 13, 1969

**Amler M. H.**

*Osteogenic potential of nonvital tissues and synthetic implant materials*  
J. Periodontol., 58: 758-761, 1987

**Bächmann K.**

*Analysenbericht Nr. 403-405 HK, 407-409 HK, Spectroskopie von Suspension und Paste*  
Technische Universität Darmstadt. Interner Bericht, 2001

**Bahn S. L.**

*An investigation into the use of plaster of paris in filling defects in membranous bones, master's thesis.*  
Boston University School of Medicine, Boston Mass., 1962

**Bahn S. L.**

*Plaster: A bone substitute*  
Oral Surg 21: 672-681, 1966

**Bauer G., Donath K., Dumbach J., Sitzmann F., Spitzer W. J.**

*Vergleich verschiedener Kalziumphosphat-Keramiken zum Knochenersatz*  
Zahnärztl. Implantol., 3, 101 – 106, 1987

**Beeson W. H.**

*Plaster of paris as an alloplastic implant in the frontal sinus*  
Arch Otolaryngol 107: 664-669, 1981

**Belchier J.**

*An account of the bones of animals being changed to a red colour by aliment only*  
Phil Trans 39: 287-288, 1736  
Nachdruck in Clin Orthop 40: 3, 1965

**Belchier J.**

*A further account of the bones of animals being changed to a red colour by aliment only*  
Phil Trans 39: 299-300, 1736  
Nachdruck in Clin Orthop 40: 4, 1965

**Bell W. H.**

*Resorption characteristics of bone and plaster*  
Oral Surg 39: 727, 1960

**Bell W. H.**

*Resorption characteristics of bone and bone substitutes*  
*Oral Surg* 17: 650-657, 1964

**Berner A.**

*Un cas de kysté mandibulaire plombé au plâtre*  
*Schweiz. Med. Wschr.* 25: 183-185, 1944

**Beruto D. T., Mezzasalma S. A., Capurro M., Botter R., Cirillo P.**

*Use of alpha-tricalcium phosphate (TCP) as powders and as an aqueous dispersion to modify processing, microstructure, and mechanical properties of polymethylmethacrylate (PMMA) bone cements and to produce bone-substitute compounds*  
*J. Biomed. Mater Res*, 49 (4), 498 – 505, 2000

**Bezrukov V. M., Grigoryants L. A., Zuyev V. P., Pankratov A.S.**

*Surgical treatment of Cysts of the jaws making use of ultrahighly dispersed hydroxyapatite*  
*Stomatologija* 77 (1) 31- 5, 1998

**Block M. S. und Kent J.**

*Healing of mandibular ridge augmentation using Hydroxylapatite with and without autogenous bone indogs*  
*J. Oral Maxillofac. Surg.*, 43, 3 – 7, 1985

**Bonath K. H, Prieur W. D.**

*Kleintierkrankheiten Band 3*  
*Orthopädische Chirurgie und Traumatologie*  
UTB, Ulmer, Stuttgart, 34-36, 1998

**Bowyer G. W., Cumberland N.**

*Antibiotic release from impregnated pellets and beads*  
*J. Trauma* 36: 331-335, 1994

**Braun A.**

*Herstellung und Anwendung des Fibrin-Antibiotikum-Verbundes*  
*In: Reifferscheid M. (Hrsg) Neue Techniken der operativen Medizin*  
Springer, Berlin, 98, 1986

**Braun A., Kratzat R., Heine W., Pasch B.**

*Der Fibrin-Antibiotikum-Verbund im Tierexperiment zur lokalen Therapie des staphylokokkeninfizierten Knochens*  
*Hefte Unfallheilkd* 148: 809, 1980

**Braun A., Schumacher G., Kratzat R., Heine W., Pasch B., Roessler H.**

*Der Fibrin-Antibiotikum-Verbund im Tierexperiment*  
*In: Cotta H., Braun A. (Hrsg) Fibrinkleber in Orthopädie und Traumatologie*  
Thieme, Stuttgart, 172, 1982

**Braun A., Güssbacher A., Wahlig H., Dingeldein E.**

*Der Fibrin-Antibiotikum-Verbund als ergänzende Lokalbehandlung der Osteomyelitis*  
*In: Scheele J. (Hrsg) Fibrinklebung*  
Springer, Berlin, 206, 1984

**Braun A., Güssbacher A., Heine W., Dingeldein E.**

*Fibrin-Antibiotic-Complex: Laboratory investigation and clinical results*  
In: Uthoff H. (ed) *Current concepts of infections in orthopaedic surgery*  
Springer, Berlin, 265, 1985

**Braun A., Lücke R., Ewerbeck V., Dingeldein E.**

*Verschluss von Knochen- und Weichteilfisteln mit dem Fibrin-Gentamicin-Verbund*  
In: Cotta H., Braun A. (Hrsg) *Knochen- und Gelenkinfektionen*  
Springer, Berlin, 105-114, 1988

**Broulik P., Kragstrup J., Mosekilde L., Melsen F.**

*Osteon crosssectional size in the iliac crest*  
*Acta Pathol. Microbiol. Scand. A 90: 339-344, 1982*

**Buchholz H., Engelbrecht H.**

*Über die Depotwirkung einiger Antibiotika bei Vermischung mit dem Kunstharz Palacos*  
*Chirurg 41: 511-515, 1970*

**Buchholz H., Gartmann H. D.**

*Infektionsprophylaxe und operative Behandlung der schleichenden tiefen Infektionen bei der totalen Endoprothese*  
*Chirurg 43: 446-453, 1972*

**Calhoun N. R., Bleckledge G. T.**

*Plaster of paris implants in the mandible of dogs*  
*Q. Nat. Dent. Assoc. 21: 13-15, 1962*

**Calhoun N. R., Greene G. W., Blackledge G. T.**

*Effects of plaster of paris implants on osteogenesis in the mandible of dogs*  
*J. Dent. Res. 42: 1244, 1963*

**Caplan A. I.**

*Cell delivery and tissue regeneration*  
*J. Controlled Release 11: 157-165, 1990*

**Chang C. S.**

*Histologic study of Hydroxylapatite as an implant material for mandibular augmentation*  
*J. Oral Maxillofac. Surg., 41, 729 - 737, 1983*

**Chu K. T., Oshida Y., Hancock E. B., Kowolik M. J., Barco T., Zunt S. L.**

*Hydroxyapatite/PMMA composites as bone cements*  
*Biomed. Mater Eng., 14 (1), 87 – 105, 2004*

**Coetzee A. S.**

*Regeneration of bone in the presence of calcium sulfate*  
*Arch Otolaryngol 106: 405-409, 1980*

**Cornell C. N., Tyndall D., Waller S., Lane J. M., Brause B. D.**

*Treatment of experimental osteomyelitis with antibiotic-impregnated bone graft substitute*  
*J. Orthop. Res. 11, 619 – 626, 1993*

**Cotta H., Braun A.**

*Fibrinkleber in der Orthopädie und Traumatologie*  
Thieme, Stuttgart, 1982

**Dahners L. E., Funderburk C. H.**

*Gentamicin-loaded plaster of paris as a treatment of experimental osteomyelitis in rabbits*  
*Clin. Orthop.* 219: 278-282, 1987

**Darby A. J., Meunier P. I.**

*Mean wall thickness and formation periost of trabecular bone packets in idiopathic osteoporosis*  
*Calcif. Tissue Int.* 33: 199-204, 1981

**De Groot K.**

*Bioceramics consisting of calcium phosphate salts*  
*Biomat.*, 1, 47 – 50, 1980

**De Wet I. S., Jansen C.**

*The use of plaster of paris to fill large defects in bone*  
*S. Afr. J. Surg.* 11: 1-8, 1973

**Dempster D. W., Shane E., Horbert W., Lindsay R.**

*A simple method for correlative light and scanning electron microscopy of human iliac crest bone biopsies: Qualitative observations in normal and osteoporotic subjects*  
*J. Bone Miner Res.* 1: 15-21, 1986

**Deppe H., Stemberger A., Hillemanns M.**

*Effects of osteopromotive and anti-infective membranes on bone regeneration: an experimental study in rat mandibular defects.*  
*Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 2003 May-Jun; 18(3): 369-76. In

**Dielert E., Fischer-Brandies E., Bagambisa F.**

*REM-Untersuchungen an den Grenzschichtstrukturen Hydroxylapatit-Knochen*  
*Dtsch. Zahnärztl. Z.*, 43, 22 – 25, 1988

**Dingeldein E., Wahlig H.**

*Freisetzung von Gentamycin aus Kunststoffkugeln während der Behandlung chronischer Knocheninfektionen*  
VII. Kongress über Dringliche Medizinische Hilfe, Prag. Abstract VIII, 17, 1976

**Dingeldein E., Wahlig H., Klemm K.**

*Gentamicin-PMMA beads in the treatment of chronic bone infections - bacteriological evaluations*

*Proc. 13th Int. Congr. Chemotherapy, Vienna 43: 24-27, 1983*

**Dingeldein E., Donath K., Wahlig H., Bauer H. J.**

*Einheilung einer porösen Hydroxylapatit-Keramik biologischer Herkunft im spongiösen Knochenlager von Kaninchen*

*Osteosynthese Internat., 2, 112 – 116, 1994*

**Dingeldein E., Strauß A., Donath K.**

*Untersuchung zum Einfluß von Ostim auf die Knochenheilung bei Kaninchen und zur Biokompatibilität von Kalziumsulfatkugeln mit Ostim. Interner Bericht, 1999*

**Dingeldein E., Engart B.**

*Ostim®-Paste Produktinformation*

*Osartis GmbH & Co. KG, Obernburg, 2001*

**Donath K.**

*Reaktionen des Knochengewebes auf Implantate, besonders im Kieferbereich*

*Acta Med. Austriaca, Supplement 35, 1986*

**Donath K.**

*Preparation of histologic sections*

*EXAKT-Kulzer-Publication, Norderstedt, 1995*

**Donath K., Breuner G.**

*A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue*

*J. Oral. Path. 11: 318-326, 1982*

**Draenert K., Draenert Y.**

*Ein neues Verfahren für die Knochenbiopsie und die Knorpel-Knochen-Transplantation*

*Sandorama 2: 31-38, 1987*

**Dreesmann H.**

*Ueber Knochenplombierung*

*Beitr. Klin. Chir. 9: 804-810, 1892*

**Driskell T. D., Hassler C. R., McCoy L. R.**

*The significance of resorbable bioceramics in the repair of bone defects*

*Proc. 36<sup>th</sup> Ann. Conf. Eng. Med. Bio., 15, 199, 1973*

**Edberg E.**

*Some experiences of filling osseous cavities with plaster*

*Acta Chir. Scand. 67: 313-319, 1930*

**Eggl P.S., Mueller W., Schenk R. K.**

*The role of pore size on bone ingrowth and implant substitution in Hydroxylapatite and Tricalcium phosphate ceramics. A histologic and morphometric study in rabbits*

*In: Biomaterials and Clinical Applications. Eds.: Pizzoferrato A., Marchetti P. G., Ravaglioli A., Lee A. J. C., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 53 – 56, 1987*

**Eggl P.S., Mueller W. , Schenk R. K.**

*Porous Hydroxyapatite and Tricalcium Phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits*  
*Clin. Orthop. Rel. Res.*, 232, 127 – 137, 1988

**Eitenmüller J., Schmickal T., David A., Muhr G.**

*Vergleichende Untersuchungen über das Anwachsverhalten und die Knochenhaftung verschiedener Implantatwerkstoffe*  
*Unfallchirurgie*, 93, 405 – 411, 1990

**Elkins A. D., Jones L. P.**

*The effect of plaster of paris and autogenous cancellous bone on the healing of cortical defects in the femurs of dogs*  
*Vet. Surg.* 17: 71-76, 1988

**Eriksen E. F.**

*Normal and pathological remodeling of human trabecular bone: three-dimensional reconstruction of the remodeling sequence in normal and in metabolic bone disease*  
*Endocr. Rev.* 7: 379-408, 1986

**Eriksen E., Riggs B. L., Kumar R.**

*Osteoporosis: Recent concepts and approaches to treatment*  
*New Dev. Med.* 2: 11-23, 1987

**Eriksen E. F., Hodgsons S. F., Eastell R., Cedel S. L., O'Fallon W. M., Riggs B. L.**

*Cancellous bone remodeling in type 1 (postmenopausal) osteoporosis: Quantitative assessment of rates of formation, resorption, and bone loss at tissue and cellular levels*  
*J. Bone Miner Res.* 5: 311-319, 1990

**Faupel L., Kunze K., Ecke H.**

*Die Eigenblut-Antibiotikaplombe als wirksame Therapie der chronischen Osteomyelitis*  
*Unfallchirurgie* 12: 110-113, 1986

**Frame J. W.**

*Porous calcium sulphate dihydrate as a biodegradable implant in bone*  
*J. Dent.* 3: 177, 1975

**Frame J. W.**

*Hydroxylapatite as a bone substitute in the jaws*  
*Biomat.*, 2, 19 – 22, 1981

**Frame J. W., Browne R. M., Rout P. G. J.**

*Ridge augmentation using solid and porous hydroxylapatite particles with autogenous bone or plaster*  
*J. Oral Maxillofac. Surg.* 45: 771-777, 1987

**Friedenstein A.**

*Determined and inducible osteogenic precursor cells*  
*Ciba Found. Symp.* 11: 169, 1973

**Frost H. M.**

*Lamellar osteoid mineralized per day in man*  
*Henry Ford Hosp. Bull. 8: 267, 1960*

**Frost H. M.**

*Bone remodeling dynamics*  
*Thomas, Springfield 111, 1963*

**Frost H. M.**

*Dynamics of bone remodeling*  
*In: Frost H. M. (ed) Bone biodynamics*  
*Little Brown, Boston, 313, 1964*

**Frost H. M.**

*Bone dynamics in osteoporosis and osteomalacia*  
*Thomas, Springfield 111, 1966*

**Frost, H. M.**

*Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling*  
*Calcif. Tissue Int. 3: 211-237, 1969*

**Frost H. M.**

*The physiology of cartilaginous, fibrous and bony tissue*  
*Thomas, Springfield 111, 1972*

**Frost H. M.**

*The biology of fracture healing*  
*Clin. Orthop. Rel. Res. 248: 283-293, 1989*

**Froum S. J., Kushner L., Scopp J.W. und Stahl S. S.**

*Human clinical and histologic responses to Durapatite implants in intraosseous lesions. Case reports*  
*J. Periodont., 53, 719, 1982*

**Geldmacher J.**

*Enchondromtherapie mit Gipsplombe - Renaissance eines Behandlungsprinzips*  
*Handchir. Mikrochir. Plastchir. 18: 336-338, 1986*

**Georgiade N. G., Hanker J., Ruff G., Levin S.**

*The use of particulate hydroxyapatite and plaster of paris in aesthetic and reconstructive surgery*  
*Aesth. Plast. Surg. 17: 85-92, 1993*

**Gerhart T. N., Roux R. D., Hanff P. A., Horowitz G. L., Renschaw A. A., Hayes W. C.**

*Antibiotic-loaded biodegradable bone cement for prophylaxis and treatment of experimental osteomyelitis in rats*  
*J. Orthop. Res. 11: 250-255, 1993*

**Gloede W., Winkel S.**

*Untersuchungen an Gipsproben*  
*Interner Bericht des Institut Fresenius, 1999*

**Gottlieb B.**

*Die vitale Färbung der kalkhaltigen Gewebe*  
*Anat. Anz. 46: 179-194, 1914*

**Graebe und Liebermann 1868 zitiert nach Rahn B. A. und Perren S. M.**

*Die mehrfarbige Floureszenzmarkierung des Knochenanbaus*  
*Chem. Rd. 28: 12-15, 1975*

**Graziani A. L., Lawson L. A., Gibson G. A., Steinberg M. A., Mac Gregor R. R.**

*Vancomycin concentrations in infected and noninfected human bone*  
*Antimicrob. Agents Chemother. 32: 1320-1322, 1988*

**Grundness O., Reikeras O.**

*The importance of the hematoma for fracture healing in rats*  
*Acta Orthop. Scand. 64: 340-342, 1993*

**Gumaer K. I., Sherer A. D., Slighter R. G., Rothstein S. S., Drobeck, H.P.**

*Tissue response in dogs to dense Hydroxylapatite implantation in the femur*  
*J. Oral Maxillofac. Surg., 44, 618 – 627, 1986*

**Hadjipavlou A. G., Simmons J. W., Yang J., Nicodemus C. L., Esch O., Simmons D. J.**

*Plaster of Paris as an osteoconductive material for interbody vertebral fusion in mature sheep*  
*Spine, 25.1, 10-5 discussion 16, 2000*

**Harris W. H.**

*A microscopic method of determining rates of bone growth*  
*Nature 188:1038-1039,1960*

**Härtter S.**

*Experimentelle Untersuchungen zum Einfluß von Kalziumsulfat auf die Knochenheilung bei Kaninchen*  
*Vet. med. Diss., Gießen, 1998*  
*Fachverlag Köhler, Gießen, Blomaterialien in der Medizin, ISBN 3-922306-61-6*

**Härtter S., Dingeldein E., Bonath K. H.**

*Knochenersatzstoffe - Therapeutika der Zukunft in der Kleintierpraxis*  
*Die experimentelle Untersuchung eines Knochenfüllstoffes am Beispiel des Kalziumsulfates*  
*Kleintierpraxis, 43: 813-826, 1998*

**Hauptli O.**

*Die Gipsplombe zur Ausfüllung von fehlendem Knochengewebe*  
*Schweiz. Med. Wschr. 82: 161-168, 1952*

**Harvey W. K.**

*Evaluation of a subcutaneously implanted Hdroxylapatite-Avitene mixture in rabbits*  
*J. Oral Maxillofac. Surg., 43, 277 – 280, 1985*

**Hernigou P., Thiery J. P., Benoit J. P., Voisin M. C., Leroux P., Hagege G., Döläpine G., Goutallier D.**

*Experimental study on osteosarcoma of local chemotherapy diffusing from surgical acrylic cement and plaster*  
*Rev. Chir. Orthop.* 73: 517-529, 1987

**Högset O., Bredberg G.**

*Plaster of paris: Thermal properties and biocompatibility. A study on an alternative implant material for ear surgery*  
*Acta Otolaryngol. Stockh.* 101: 445-452, 1986

**Holmes R. E., Hagler H. K.**

*Porous Hydroxylapatite as a bone graft substitute in mandibular contour augmentation: A histometric study*  
*J. Oral Maxillofac. Surg.*, 45, 421 – 429, 1987

**Holmes R. E., Buchholz R. W., Mooney V.**

*Porous Hydroxylapatite as a bone graft substitute in diaphyseal defects: A histometric study*  
*J. Orthop. Res.*, 5, 114 – 121, 1987

**Huffmann E. O., Cate W. E., Deming M. E., Elmore K. L.**

*Rates of solution of calcium phosphates acid solutions*  
*Agric. Food. Chem.*, 5, 226, 1957

**Jarcho M.**

*Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics*  
*Clin. Orthop. Rel. Res.*, 157, 259 – 278, 1981

**Jarcho M.**

*Retrospective analysis of Hydroxylapatite development for oral implant applications*  
*Dent. Clin. North Am.*, 36, 19 – 26, 1992

**Jaworski Z. F., Lok E.**

*The rate of osteoclastic bone erosion in haversian remodeling sites of adult dog rib*  
*Calcif. Tissue Int.* 10: 103, 1972

**Johner R.**

*Zur Knochenheilung in Abhängigkeit von der Defektgröße*  
*Helv. Chir. Acta* 79: 409-411, 1972

**Josefsson G., Lindberg L., Wiklander B.**

*Systemic antibiotics and gentamicin-containing bone cement in the prophylaxis of postoperative infections in total hip arthroplasty*  
*Clin. Orthop.* 159: 194-200, 1981

**Junqueira L. C., Carneiro J.**

*Histologie*  
*Lehrbuch der Cytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen*  
Springer Verlag, Berlin, 1986

**Kahn A. J., Simmons D. J.**

*Investigation of the cell lineage in bone using a chimera of chick and quail embryonic tissue*

*Nature* 258: 325-327, 1975

**Kenney E. B., Lekovic V., Ferreira S. A., Han T., Dimitrijevic B., Carranza R. J.**

*Bone formation within porous hydroxylapatite implants in human periodontal defects*

*J. Periodont.*, 57, 76, 1985

**Kent J. N., Zide Mr.R., Kay J. F., Jarcho M.**

*Hydroxylapatite blocks and particles as bone graft substitutes in orthognatic and reconstructive surgery*

*J. Oral Maxillofax. Surg.*, 44, 597 – 605, 1986

**Klare I., Konstabel C., Badstubner D., Werner G., WitteW.**

*Occurrence and spread of antibiotic resistances in Enterococcus faecium*

*Int. J. Food. Microbiol.*, 88, 269 – 290, 2003

**Klein C., Driessen A., de Groot K.**

*Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue*

*J. Biomed. Mat. Res.*, 17, 769 – 784, 1983

**Klemm K.**

*Behandlung der posttraumatischen Osteomyelitis mit antibiotkahaltigen Kunststoffkugeln*

*Symposium Traumatologicum, Brünn, 1974*

**Klemm K.**

*Die Anwendung von Gentamicin-Kunststoffkugeln in der Behandlung sekundärer Knocheninfektionen*

*Tagung der Vereinigung Nordwestdeutscher Chirurgen, Osnabrück, 1976*

**Klemm K.**

*The treatment of chronic bone infections with gentamicin-PMMA chains and beads*

*Unfallchirurgie/Accident Surgery, Special issue 20-25, 1977*

**Klemm K.**

*Gentamicin-PMMA-Kugeln in der Behandlung abszedierender Knochen- und Weichteilinfektionen*

*Zbl. Chir.* 934, 1979

**Klemm K.**

*Die Behandlung abszedierender Knochen- und Weichteilinfektionen*

*Chir. Gegenwart* 35: 1-14, 1980

**Knaepler H., Klemm K., Dingeldein E., Wahlig H.**

*Gentamicin-PMMA-Miniketten in der septischen Knochen- und Weichteilchirurgie*

*Unfallchirurg* 88: 457-464, 1985

**Kösters K., Karbe E., Kramer H., Heide H., König R.**

*Experimenteller Knochenersatz durch resorbierbre Calciumphosphat-Keramik*

*Langenbecks Arch. Chri.*, 341, 77 – 86, 1976

**Kofmann S.**

*Gips als Plombenmaterial*  
*Zbl. Chir. 52: 1817-1818, 1925*

**Korendiasev M. A.**

*The significance of plaster of paris filling to obliterate bone cavities and defects*  
*Ortop. Travmatoi. Protez. 20: 18-23, 1959*

**Kovacevic B. L.**

*Ein Beitrag zum Problem der hämatogenen Osteomyelitis*  
*Dt. Zs. Chir. 276: 432-443, 1953*

**Kovacevic B.**

*Moderna terapija hematogenog nespecificnog osteomijelitisa*  
*Lijecnicki Vjesnik 81: 133-139, 1959*

**Krause F.**

*Tuberculose der Knochen und Gelenke*  
*Enke Verlag, Stuttgart, 1899*

**Kuechle D. K., Landon G. C., Musher D. M., Noble P. C.**

*Elution of vancomycin, daptomycin and amikacin from acrylic bone cement*  
*Clin. Orthop. 264: 302-308, 1991*

**Kuzmenko V. V., Bezverkhi V. V., Pivovarov Yu. P.**

*Report on clinical trials of hydroxyapatite ("Ostim-apatite")*  
*Russian State Medical University. Dep. of traumatology, orthopedics and extreme surgery, 1993*

**Lawson K. J., Marks K. E., Brems J., Rehm S.**

*Vancomycin vs tobramycin elution from polymethylmethacrylate: An in vitro study*  
*Orthopedics 13: 521-524, 1990*

**Lebourg L., Biou C.**

*The imbedding of plaster of paris in surgical cavities of the jaws*  
*Sem. Hop. Paris. 37: 1195-1197, 1961*

**Lehtinen R., Kuusilehto A., Nikkanen U.-M.**

*Bone response to Hydroxylapatite particles of different shapes in rabbit tibia*  
*J. Oral Maxillofac. Surg., 48, 1075 – 1078, 1990*

**Mackey D., Varlet A., Debeaumont D.**

*Antibiotic loaded plaster of paris pellets: An in vitro study of a possible method of local antibiotic therapy in bone infection*  
*Clin. Orthop. 167: 263-268, 1982*

**Mackey D., Varlet A.**

*Antibiotic impregnated gypsum pellets in the surgical management of chronic osteomyelitis*  
*Inter. Med. 9: Supp., 1984*

**McDavid P. T., Boone M. E., Kafray A. H., Mitchell D. F.**

*Effect of autogenous marrow and calcitonin on reactions to a ceramic*  
*J. Dent. Res.*, 58, 478, 1979

**McKee J. C., Bailey B. J.**

*Calcium sulfate as a mandibular implant.*  
*Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 92, 277 – 286, 1984

**McLaren A.**

*Antibiotic impregnated bone graft: Post-op levels of vancomycin and tobramycin*  
*Trans. Orthop. Trauma Assoc.* 50, 1988

**Michéa-Hamzhepour M., Pechère J. C., Marchou B., Auckenthaler R.**

*Combination therapy: A way to limit emergence of resistance?*  
*Am. J. Med.* 80: 138-142, 1986

**Miclau T., Dahnert L. E., Lindsey R. W.**

*In vitro pharmacokinetics of antibiotic release from locally implantable materials*  
*J. Orthop. Res.* 11: 627-632, 1993

**Misiek D. J., Kent N. J., Carr R. F.**

*Soft tissue responses to hydroxyapatite of different shapes*  
*J. Oral Maxillofac. Surg.*, 42, 150, 1984

**Mizaldus A. Centuriae IX. Memorabilium, Frankofurti, 1599**

*zitiert nach Gottlieb B.*  
*Anat. Anz.* 46: 179-194, 1914

**Modis L., Petko M., Földes I.**

*Histochemical examination of supporting tissues by means of fluorescence. 11*  
*Fluorochromes as an indicator of lamellar bone mineralisation*  
*Acta Morph. Hung.* 17:157-166, 1969

**Moore R. L., Kraal J. H., Jasper S. J.**

*Evaluation of coralline hydroxylapatite periodontal implant material*  
*J. Dent. Res.*, 65, Special Issue, 305/1214, 1986

**Mosekilde L., Sogaard C.**

*Consequences of the remodeling process for vertebral structure and strength*  
*In: Christiansen C., Overgaard K. (eds) Osteoporosis*  
*Osteopress ApS*, 607-609, 1990

**Moskow B. S., Lubarr A.**

*Histological assessment of human periodontal defect after durapatite ceramic implant.*  
*Reports of a case*  
*J. Periodont.*, 54, 455 – 463, 1983

**Mousset B., Benoit M. A., Vandamme T., Bouillet R., Delloye C., Gillard J.**

*Antibiotic sustained release in infected bones*  
*Sixth International conference on Pharmaceutical Technology, Paris, 1992*

**Mousset B., Benoit M. A., Delloye C., Bouillet R., Gillard J.**

*Biodegradable implants for potential use in bone infection*  
*Int. Orthop. (SICOT) 19: 157-161, 1995*

**Mukopadhaya B., Mehta M. J.**

*Experimental diaphysectomy, a preliminary review*  
*Ind. J. Surg. 19: 438-440, 1957*

**Najjar T.A., Lerdrit W., Parsons J. R., Newark N. J.**

*Enhanced osseointegration of hydroxylapatite implant material*  
*Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol., 71, 9 – 15, 1991*

**Neer R., Siovik D., Daly M., Lo C., Potts J., Nussbaum S.**

*Treatment of postmenopausal osteoporosis with daily parathyroid hormone plus calcitriol*  
*In: Christiansen C., Overgaard K. (eds) Osteoporosis*  
*Osteopress ApS, 1314-1317, 1990*

**Nickel R., Schummer A., Seiferle E.**

*Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Bd. 1 Bewegungsapparat*  
*Parey, Hamburg, 1984*

**Nielson A.**

*Filling of sterile and infected bone cavities by means of plaster of paris*  
*Acta Chir. Scand. 91: 17-27, 1944*

**Nikulin A., Ljubovic E.**

*Der Gipsstift in der experimentellen Knochenregeneration*  
*Acta Med. Jugl. 10: 1-36, 1956*

**Nordmann O.**

*Die Behandlung der Lunatrumnekrose und ähnlicher Erkrankungen mit der Gipsplombe*  
*Zbl. Chir. 66: 834-839, 1939*

**Nystrom G.**

*Plugging of bone cavities with rivanol-plaster porridge*  
*Acta Chir. Scand. 63: 296, 1928*

**Oehlecker F.**

*Über Knochenplombe*  
*Zbl. Chir. 52: 993, 1925*

**Osborn J. F.**

*Die physiologische Integration von Hydroxylapatit-Keramik in das Knochengewebe*  
*Hefte Unfallheilkd., 174, 101 – 105, 1985*

**Osborn J. F., Newesely H.**

*The material science of calcium phosphate ceramics*  
*Biomat., 1, 108 – 111, 1980 a*

**Pankratov A. S., Zuyev V. P., Alekseeva A. N.**

*The use of Hydroxyapatite with ultrahigh dispersity in the combined treatment of patients with mandibular fractures*  
*Stomatologija, 74 (4), 22-5, 1995*

**Parfitt A. M.**

*The physiological and clinical significance of bone histomorphometric data*  
*In: Recker R. R. (ed) Bone histomorphometry: Techniques and interpretation,*  
*CRC Press, Boca Raton FL: 143-223, 1983*

**Parfitt A. M.**

*Bone and plasma calcium homeostasis*  
*Bone 8: 1-8, 1987*

**Parfitt A. M.**

*The physiologic and pathogenetic significance of bone histomorphometric data*  
*In: Coe F., Favus M., (eds) Disorders of bone and mineral metabolism*  
*Raven Press, New York, 475-489, 1992*

**Parsons J. R., Ricci J. L., Alexander H. und Bajpai P. K.**

*Osteoconductive composite grouts for orthopedic use*  
*Ann. N. Y. Acad.Sci., 523, 190 – 207, 1988*

**Peltier L. F.**

*The use of plaster of paris to fill large defects in bone*  
*Am. J. Surg. 97: 311-315, 1959*

**Peltier L. F.**

*The use of plaster of paris to fill defects in bone*  
*Clin. Orthop. 21: 1-29, 1961*

**Peltier L. F., Bickel E. Y., Lillo R., Thein M. S.**

*The use of plaster of paris to fill defects in bone*  
*Ann. Surg. 146: 61-69, 1957*

**Peltier L. F., Lillo R.**

*The substitution of plaster of paris rods for portions of the diaphysis of the radius of dogs*  
*Surg. F. 6: 556-558, 1956*

**Peltier L. F., Orn D.**

*The effect of the addition of plaster of paris to autogenous and homogenous bone grafts in dogs*  
*Surg. F. 8: 571-574, 1958*

**Peltier L. F., Speer D. P.**

*Calcium Sulfate*  
*In: Hebel M. B., Reddi A. H. (eds) Bone grafts and bone substitutes*  
*Saunders Co., Philadelphia, 243-246, 1981*

**Perren S. M.***Primary bone healing**In: Bojrab M. (ed) Pathophysiology in small animal surgery**Lea & Febiger, Philadelphia, 519-527, 1981***Perren S. M.***Primary bone healing**In: Bojrab M. und Mitarbeiter (eds) Disease mechanisms in small animal surgery**Lea & Febiger, 663-670, 1993***Perry C. R., Pearson R. L.***Local antibiotic delivery in the treatment of bone and joint infections**Clin. Orthop. 263: 215-226, 1991***Petrova A.***Gipsfüllung von Knochenhöhlen bei Osteomyelitis**Zentr. Org. ges. Chir. 43: 485, 1928***Porstendörfer J.***Aktivitätsanalysen an 6 Ostim<sup>®</sup>-Proben**Georg-Augustus-Universität Göttingen. Isotopenlaboratorium. Interner Bericht, 2000***Rahn B. A.***Die polychrome Sequenzmarkierung des Knochens**Instrumentelle Aspekte und experimentelle Anwendung**Chem. Rd., Sonderdruck einer Artikelserie, 60-63, 1976***Rahn B. A.***Die polychrome Sequenzmarkierung des Knochens**Nova Acta Leo 44: 249-255, 1979***Rahn R. A., Bacellar F., Trapp L., Perren S. M.***Methode zur Fluoreszenzmorphometrie des Knochenbaues**Akt. Traum. 10: 109-115, 1980***Rahn B. A., Fleisch H., Moor R., Perren S. M.***The effect of fluorescent labels on bone growth and calcification in tissue culture**Eur. Surg. Res. 2: 137, 1970***Rahn B. A., Perren S. M.***Alizarinkomplexon, Fluorochrom zur Markierung von Knochen- und Dentinanbau**Experientia 28: 180, 1972***Rahn B. A., Perren S. M.***Die mehrfarbige Fluoreszenzmarkierung des Knochenbaus**Chem. Rd. 28: 12-15, 1975***Randolph D. A., Negri J. L., Devine T. R., Gitelis S.***Internationale Patentschrift PCTIUS 96102930, 1996*

**Rasmussen H., Bordier P.**

*The physiological and cellular basis of metabolic bone disease*  
Williams and Wilkins, Baltimore, 1974

**Rawlings, C. E., Wilkins, R. H., Hanker, J. S., Georgiade, N. G., Harrelsons, J. M.**

*Evaluation in cats of a material for cranioplasty*  
*J. Neurosurg.*, 69, 264 – 275, 1988

**Reddi A. H.**

*Biologic principles of bone induction*  
*Orthop. Clin. North. Am.*, 18, 207 – 212, 1987

**Renooij W.**

*Bioresorption of Ceramic Strontium-85-Labeled Calcium Phosphate Implants in dog femora*  
*Clin. Orthop. Rel. Res.*, 197, 272 – 283, 1985

**Riggs B. L., Hodgson S. F., O'Fallon W. M., Chao E. Y. S., Wahner H. W., Muhs J. M. und Mitarbeiter**

*Effect of fluoride treatment on the fracture rate in postmenopausal women with osteoporosis*  
*N. Engl. J. Med.*, 332: 802-807, 1990

**Rosin H.**

*Antibiotika und Chemotherapeutika. Antiinfektiöse Therapie. Aus: Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K.; Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, 1996*

**Rothstein S. S.**

*Use of Hydroxylapatite for the augmentation of deficient alveolar ridges*  
*J. Oral Maxillofac. Surg.*, 42, 224 – 230, 1984

**Salvati E. A., Cailaghan J. J., Brause B. D., Klein R. F., Small R. D.**

*Reimplantation in infection*  
*Clin. Orthop.* 207: 83-93, 1986

**Santschi E. M. und McGarvey L**

*In vitro elution of gentamicin from Plaster of Paris beads*  
*Vet. Surg.*, 32 (2), 128 – 133, 2003

**Schenk R. K.**

*Die Histologie der primären Knochenheilung im Lichte neuer Konzeptionen über den Knochenbau*  
*Unfallheilkunde* 81: 219, 1978

**Schenk R. K.**

*Zur Problematik der Knochenersatzstoffe: Histophysiologie des Knochenumbaus und der Substitution von Knochenersatzstoffen*  
*Hefte Unfallheilkd.*, 216, 23 – 35, 1991

**Schenk R. K., Willenegger H.**

*Morphological findings in primary fracture healing*  
*Symp. Biol. Hung. 7: 75, 1967*

**Schenk R. K., Willenegger H.**

*Zur Histologie der primären Knochenheilung.*  
*Modifikationen und Grenzen der Spalthheilung in Abhängigkeit der Defektgröße*  
*Unfallheilkunde 80: 155, 1977*

**Schnettler R.**

*Experimentelle Untersuchungen zum Einwachsverhalten von autogenen und*  
*allogenen Spongiosatransplantaten im Vergleich zu Keramik, DBM und basischem*  
*Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF)*  
*Habilitationsschrift, Jena, 1993*

**Schnettler R., Dingeldein E., Tausch W., Ritter B.**

*Untersuchungen zur knöchernen Integration einer Hydroxyl-Keramik (Endobon®) und*  
*Fibroblast Growth Factor" im Vergleich zu autogenen Spongiosazylindern*  
*Osteo. Int. 2: 118-126, 1994*

**Schulte W.**

*Blutgerinnung in der Mundhöhle*  
*Dt. Zahn. A. Ztg. 29: 644-648, 1974*

**Scott D. M., Rotschafer J. C., Behrens F.**

*Use of vancomycin and tobramycin polymethylmethacrylate impregnated beads in the*  
*management of chronic osteomyelitis*  
*Drug Intell. Clin. Pharm. 22: 480-483, 1988*

**Spector M.**

*Charakterisierung biokeramischer Kalziumphosphat-Implantate*  
*Hefte Unfallheilkd., 216, 11 – 22, 1991*

**Stachow**

*Versuch über Knochenplombierung bei höhlenförmigen Defekten des Knochens*  
*Beitr. klin. Chir. 12: 389-408, 1894*

**Strauss A.**

*Untersuchung zur Pharmakokinetik und lokalen Verträglichkeit von Kalziumsulfat-*  
*Kugeln, getränkt mit Gentamicin und Vancomycin, nach Applikation in den*  
*Femurmarkraum von Kaninchen*  
*Vet. med. Diss., Gießen, 1999*  
*Fachverlag Köhler, Gießen, Blomaterialien in der Medizin, ISBN 3-934229-00-X*

**Suvorova E.I., Buffat P.A.**

*Electron diffraction from micro- and nanoparticles of hydroxyapatite*  
*Journal of Microscopy, 196, 46 – 58, 1999*

**Suzuki H. K., Mathews A.**

*Two-color-fluorescent labeling of mineralizing tissue with tetracycline and 2,4 bis*  
*(N, N'-di-[carbomethyl] aminomethyl) fluorescein*  
*Stain Technol. 41: 57-60, 1966*

**Tracy B. M., Doremus R. H.**

*Direct electron microscopy studies of the bone-hydroxylapatite interface*  
*J. Biomed. Mat. Res.*, 18, 719 – 726, 1984

**Varlet A., Dauchy P.**

*Billes de platre de paris aux antibiotiques dans le traitement de l'infection osseuse.*  
*Nouvelles associations platre-antibiotiques*  
*Rev. Chir. Orthop.* 69: 239-244, 1983

**Varlet A., Dauchy P., Hingrez M.**

*Osteogenesis induced by the addition of demineralized bone matrix to plaster pellets with antibiotics: Animal experiment*  
*Rev. Chir. Orthop.* 71: 73-78, 1985

**Vécsei V. In: Vécsei V., Nonnemann H., Klemm K., Kempf I. (Hrsg)**

*Heilungskomplikationen und Infektionen*  
*Thieme Verlag, Stuttgart, 1995*

**Vécsei V., Starlinger M.**

*Gentamycin-PMMA bead chains in the treatment of posttraumatic osseous and tissue infections*  
*Arch. Orthop. Trauma Surg.* 99: 259-263, 1982

**Voorhoeve A., Stöhr C.**

*Ergebnisse bei der Behandlung der chronisch-eitrigen Osteomyelitis mit einem Palacos-Gentamicin-Gemisch*  
*Münch Med. Wschr.*, 924-930, 1973

**Wahlig H.**

*Antibiotic loaded acrylic cements: Elution properties*  
*In: Elson R. A. (ed) Revision arthroplasty 2. Harrogate*  
*Franklin Scientific Publications, London, 56-63, 1983*

**Wahlig H.**

*In: Wahlig H. (Hrsg) die Geschichte der Biomaterialien als Wirkstoffträger*  
*Medizinisch Pharmazeutische Studiengesellschaft eV*  
*Universitätsdruckerei und Verlag Schmidt, 1986*

**Wahlig H.**

*Septopal - A review of its properties and pharmacokinetics*  
*In: Antibiotic carriers. A new approach to the local treatment of infection in surgery*  
*Medizinisch-pharmazeutische Verlagsges mbH, 9-18, 1991*

**Wahlig H., Bergmann R.**

*Experimentelle Untersuchungen zur Anwendung eines antibiotikum-haltigen Kunststoffes bei Osteomyelitis*  
*Symposium Traumatologicum, Brünn, 1974*

**Wahlig H., Bergmann R., Dingeldein E.**

*Gentamycin-Kunststoffkugeln in der Osteomyelitisbehandlung*  
*VII. Kongress über Dringliche Medizinische Hilfe, Prag. Abstract VIII, 16, 1976*

**Wahlig H., Buchholz H. W.**

*Experimentelle und klinische Untersuchungen zur Freisetzung von Gentamicin aus einem Knochenzement*  
*Chirurg 43: 441-445, 1972*

**Wahlig H., Dingeldein E.**

*Antibiotics and bone cements: Experimental and clinical long-term observations*  
*Acta Orthop. Scand. 51: 49-56, 1980*

**Wahlig H., Dingeldein E.**

*Biomaterialien als Wirkstoffträger für die lokale Anwendung in Chirurgie und Orthopädie*  
*Primär- und Revisionsalloarthroplastik Hüft- und Kniegelenk.*  
*Symposium der Endo-Klinik, Springer Verlag, Hamburg, 357-367, 1987*

**Wahlig H., Dingeldein E., Bergmann R.**

*Pharmakokinetische Untersuchungen bei der Behandlung chronischer Osteomyelitiden mit Gentamicin-Kunststoffkugeln*  
*Tagung der Vereinigung Nordwestdeutscher Chirurgen, Osnabrück, 1976*

**Wahlig H., Dingeldein E., Bergmann R., Reuss K.**

*The release of gentamicin from polymethylmethacrylate beads*  
*An experimental and pharmacokinetic study*  
*J. Bone Joint Surg. 60 B: 270-275, 1978*

**Wahlig H., Dingeldein E., Buchholz H., Buchholz M., Bachmann F.**

*Pharmacokinetic study of gentamicin-loaded cement in total hip replacement*  
*Effects of varying dosage*  
*J. Bone Joint Surg. 66 B: 175-179, 1984*

**Wahlig H., Dingeldein E., Wagner W.**

*Pharmakokinetik und Gewebeverträglichkeit einer Tricalciumphosphat-Keramik mit einem neuen schwerlöslichen Gentamicinsalz*  
*Z. Zahnärztl. Implantol. 111: 179-182, 1987*

**Wahlig H., Hameister W., Grieben A.**

*Über die Freisetzung von Gentamicin aus Polymethylmethacrylat*  
*I. Experimentelle Untersuchung in vitro*  
*Arch. klin. Chir., 169-192, 1972*

**Wahlig H., Schliep H., Bergmann R., Hameister W., Grieben A.**

*Über die Freisetzung von Gentamicin aus Polymethylmethacrylat*  
*II. Experimentelle Untersuchungen in vivo*  
*Arch. klin. Chir. 331: 193-212, 1972*

**Wei G., Kotoura Y., Oka M., Yamamuro T., Wada R., Hyon S., Ikada Y.**

*A bioresorbable delivery system for antibiotic treatment of osteomyelitis. The use of lactic acid oligomer as a carrier*  
*J. Bone Joint Surg. 73: 246-252, 1991*

**Weinländer M., Grundschober F., Ülenk jr. H.**

*Tierexperimentelle Untersuchungen zur Auffüllung von Knochendefekten mit Hydroxylapatit-Keramik*  
*Zschr. Stomatol., 84, 195 – 205, 1987*

**Willenegger H., Perren S. M., Schenk R. K.**

*Primäre und sekundäre Knochenbruchheilung*  
*Chirurg 42: 24-52, 1971*

**Winkler H. und Mitarbeiter**

*Knochentransplantate als Antibiotikaträger*  
*Erste Erfahrungen mit dem Vancomycin Spongiosa Verbund*  
*Med. Report 25: 14, 1997*

**Wolff J.**

*Das Gesetz der Transformation der Knochen*  
*Hirschwald, Berlin, 1882*

**Wong D. A., Watson A. B.**

*Allergic contact dermatitis due to benzalkonium chloride in plaster of Paris*  
*Austral. J. Dermatol., 42-1,33-5, 2001*

**Yamazaki Y., Shinichiro O., Akimoto Y., Shioda S.**

*Response of the mouse femoral muscle to an implant of a composite of bone morphogenetic protein and plaster of paris*  
*Clin. Orthop. 234: 240-249, 1988*

**Zuyev V. P., Minkin L. N., Pivovarov Yu. P.**

*Report on additional clinical trials of hydroxyapatite Preparations ("Ostim-Apatite")*  
*Russian State Medical University, Dep.of maxillofacial surgery and stomatology, 1993*

**Zuyev V. P., Dimitrieva L. A., Pankratov A. S., Filatova N. A.**

*The comparative characteristics of stimulators of reparative osteogenesis in the treatment of periodontal disease*  
*Stomatologija 75 (5), 31-4, 1996*

### **13. DANKSAGUNG**

---

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die mich bei meiner Arbeit an dieser Dissertation unterstützt haben. Einigen Personen sei dabei besonders gedankt:

Herrn Professor Dr. Klaus H. Bonath für das Überlassen des Themas sowie die mir jederzeit gewährte fachliche Unterstützung und Beratung bei der Anfertigung dieser Dissertation.

Dr. Elvira Dingeldein und der Firma Coripharm für die großzügige fachliche und materielle Unterstützung.

Dr. Tobias Lackner, der mich in bei der Pflege und der Operation der Tiere sowie bei der Röntgenbildanfertigung und der Photodokumentation sehr unterstützt hat.

PD Dr. Sabine Wenisch für die fachliche Durchsicht der histologischen Rohfassung und die histologische Fachbetreuung.

Maren Cassens für ihren unermüdlichen Einsatz im Labor, die vielen Stunden am Schleifgerät und ihre fachliche und persönliche Hilfe.

Dr. Christian Hackenbroich, Walter Gilbert, Holger Wissmann und Astrid Gerlach für die geduldig gewährte Zeit und für die fachliche, organisatorische und persönliche Unterstützung.

Peter Bowen und Matthias Johannes Kleutgen für die Mithilfe bei der Übersetzung der Zusammenfassung.

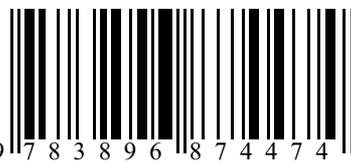


**édition scientifique**  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
GLEIBERGER WEG 4  
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-447-0



9 7 8 3 8 9 6 8 7 4 4 7 4