

Gentamicin-Hydroxylapatit-Beschichtungen für zementfreie Endoprothesen

Eine experimentelle Studie am Kaninchen zur
Untersuchung der knöchernen Integration und
Biokompatibilität

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Katharina Elisabeth Heerich
aus Göttingen

Gießen 2012

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie
Labor für Experimentelle Unfallchirurgie
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen
unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Dr. med. Dr. h.c. Reinhard Schnettler

Gutachter: Prof. Dr. Dr. V. Alt

Gutachter: Prof. Dr. M. Rickert

Tag der Disputation: 11.12.2012

Meiner Mutter in Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

- 1	EINLEITUNG UND THEORETISCHE GRUNDLAGEN	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Arthrose	1
1.3	Behandlungsmöglichkeiten der Arthrose	3
1.4	Hüftendoprothesen – Historie	4
1.4.1	Prinzipien der zementierten Verankerung	5
1.4.2	Prinzipien der zementfreien Verankerung	6
1.5	Hydroxylapatit	8
1.6	Physiologie der knöchernen Integration von Implantaten	9
1.6.1	Mikroskopie des Knochens	9
1.6.2	Knochenzellen	11
1.6.3	Interzellulärsubstanz	13
1.6.4	Knochenmark	14
1.6.5	Osteogenese und Mineralisation	16
1.6.6	Knochenwachstum und Remodelling/Knochenumbau	17
1.6.7	Knöcherne Integration von Implantaten	18
1.7	Periprothetische Infektionen	19
1.7.1	Pathogenese von periprothetischen Infektionen	19
1.7.2	Formen der Protheseninfektionen	21
1.7.3	Prophylaxe von Protheseninfektionen	22
1.8	Gentamicin	24
1.9	Problemstellung	26
- 2	MATERIAL UND METHODEN	27
2.1	Implantate und Beschichtungstechnologien	27
2.1.1	Implantate	27
2.1.2	Kirschner-Drähte	27
2.1.3	BoneMaster Hydroxylapatit-Beschichtung (C1)	27
2.1.4	Gentamicin-Beschichtung (T1)	28
2.2	Studiendesign	29
2.2.1	Ethikkommissionsvotum	29
2.2.2	Studiendesign	29
2.2.3	Versuchstiere und ihre Unterbringung	30
2.2.4	Randomisierung der Tiere	30
2.2.5	Anästhesie	30
2.2.6	Operationsvorbereitung	31
2.2.7	Implantation der Kirschner-Drähte	31
2.2.8	Postoperative Maßnahmen	33
2.2.9	Euthanasie	33
2.2.10	Probenentnahme und Fixierung des Gewebes	33
2.3	Auswertung der Versuche	34
2.3.1	Herstellung der histologischen Präparate	34
2.4	Histomorphometrische Auswertung	38
2.4.1	Semiquantitative Bestimmung der Knochenneubildung	39

2.4.2	Semiquantitative Bestimmung des Knochen-Implantat-Kontaktes	40
2.4.3	Semiquantitative Bestimmung der Anzahl der Fremdkörperriesenzellen	41
2.4.4	Statistische Berechnungen zur Histomorphometrie	42
2.5	Histologische Auswertung	43
- 3	ERGEBNISSE	45
3.1	Studie mit vier Wochen Implantationsdauer	45
3.1.1	Histomorphometrische Ergebnisse	45
3.1.2	Histologische Ergebnisse	46
3.1.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der 4-Wochen-Studie	53
3.2	Studie mit 12 Wochen Implantationsdauer	54
3.2.1	Histomorphometrische Ergebnisse	54
3.2.2	Histologische Ergebnisse	56
3.2.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der 12-Wochen-Studie	62
- 4	DISKUSSION	63
4.1	Lokale Antibiotikaprophylaxe bei Endoprothesen	63
4.2	Antimikrobielle Beschichtungen für zementfreie Endoprothesen	64
4.3	Verwendetes Tiermodell	65
4.4	Nachteile von Antibiotikabeschichtungen	66
4.5	Knochenneubildung und Biokompatibilität der HA-Gentamicin-Beschichtung	69
4.6	Ausblick	73
- 5	ZUSAMMENFASSUNG	75
- 6	SUMMARY	77
- 7	TABELLENVERZEICHNIS	77
- 8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	79
- 9	LITERATURVERZEICHNIS	81
- 10	PUBLIKATIONEN	100

-	11	ERKLÄRUNG	101
-	12	DANKSAGUNG	102

1 EINLEITUNG UND THEORETISCHE GRUNDLAGEN

1.1 Einleitung

In Europa werden jährlich etwa 500.000 Hüftprothesen implantiert (Breusch et al., 2000), etwa 135.000 hiervon in Deutschland. Die Inzidenz für Infektionen liegt bei 0,5 bis 2% (Geipel und Herrmann, 2005) bei Primäreingriffen. Die Protheseninfektion ist daher eine schwerwiegende Komplikation und macht eine aufwändige und sowohl für den Patienten als auch für das Gesundheitssystem belastende Therapie erforderlich.

Hüftprothesen können mit Hilfe von Knochenzement im Knochen verankert werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, auf diese Verankerung zu verzichten und die Prothese „zementfrei“ zu implantieren. Welches Verfahren man wählt ist, von der jeweiligen Indikationsstellung abhängig. Ohne Verwendung von Zement implantierte Prothesen besitzen durch das Einwachsen des Knochens eine bessere Sekundärstabilität, wodurch sie für junge, aktive Patienten als sinnvoll einzustufen sind. Es zeigen sich in diesem Kollektiv bessere Ergebnisse als bei zementierten Prothesen (Chandler et al., 1981; Stromberg et al., 1988; Debrunner, 2002). Eines der Hauptprobleme bei Prophylaxe von Knocheninfekten besteht darin, lokal im operierten Gewebe eine ausreichend hohe Konzentration an Antibiotika zu erzielen, ohne dass diese jedoch toxische Werte im Serum erreichen. Als Lösungsansatz wurde bereits 1970 PMMA-Zement mit Antibiotikazusatz zur Reduktion der Infektionsraten bei der zementierten Technik verwendet (Buchholz und Engelbrecht, 1970). Für die zementfreie Implantation von Prothesen gab es bisher keine gleichwertige Möglichkeit. Deshalb wurden Überlegungen zur Entwicklung einer effektiven Infektionsprophylaxe auch in diesem Bereich angestellt. Ein möglicher Ansatz ist, die Prothesen mit Antibiotika zu beschichten, welche zusätzlich zu einer Hydroxylapatit(HA)-Matrix auf die Implantate aufgebracht werden. Als Antibiotikum eignet sich z.B. Gentamicin, welches gute Ergebnisse sowohl hinsichtlich der antimikrobiellen Wirksamkeit als auch der Zellverträglichkeit zeigt.

1.2 Arthrose

Bei der Arthrose (Synonym: Arthrosis deformans, Osteoarthritis) handelt es sich um eine degenerative Veränderung der Knorpel- und Knochenstruktur eines oder mehrerer Gelenke. Sie ist primär nicht-entzündlich und führt zu zunehmender

Gelenkdeformierung, wobei das Krankheitsbild variiert, je nachdem welche Gelenke betroffen sind. Häufig sind Hüft- und Kniegelenke, sowie die Gelenke der Wirbelsäule und Hände erkrankt (Cooper, 1998).

Die Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie (2000) definiert die Coxarthrose als eine primäre Knorpelerkrankung mit Gehbehinderung und schmerzhafter Bewegungseinschränkung im Hüftgelenk, die entweder primär ohne erkennbare Ursache – überwiegend im Alter – oder sekundär nach verschiedenen Gelenkerkrankungen auftritt. Ursachen können zum Beispiel Traumata, wie intraartikuläre Frakturen, Fehlbelastungen oder verminderte Belastbarkeit des Knorpelgewebes sein (Debrunner, 2002).

Zu Beginn einer Arthrose wird durch mechanischen Verschleiß die vormals glatte Oberfläche des Gelenkknorpels aufgeraut und die Tangentialfaserschicht verschwindet. Der Knorpel beginnt, „weich“ zu werden (Chondromalazie) und wird schließlich zur Gänze weg geschliffen, so dass die subchondralen Knochen freiliegen und aneinander reiben. Im Röntgenbild ist eine Gelenkspaltverschmälerung zu erkennen. Die artikulierenden Flächen werden gegeneinander verschoben, was sich im Folgenden zur Subluxation und zu schwerer Deformität weiter entwickeln kann. Auf diese Vorgänge antwortet der Knochen reaktiv. Der spongiöse Anteil in der Belastungszone des subchondralen Knochens wird durch Knochenneubildung dichter und erscheint im Röntgenbild als Sklerosierung. Im Zentrum dieser Sklerosezonen entstehen durch den Druck Hohlräume – Zysten – die mit gallertigem Dendritus gefüllt sind und häufig mit der Gelenkfläche in Verbindung stehen. In den Randzonen des artikulierenden Knochens führt die fehlende Belastung zu Knochenbildung – Osteophyten – die den breiter werdenden Gelenkspalt in den unbelasteten Zonen ausfüllen. Durch die zunehmende Inkongruenz des Gelenks werden die laufenden Prozesse verstärkt (Debrunner, 2002).

Klinisch betrachtet beginnt die Arthrose zumeist symptomlos (Jorring, 1980). Hiernach entwickelt sich bei den Patienten ein subjektives Gefühl der Steifigkeit, diffuse Gelenkschmerzen und Schmerzen in der Muskulatur. Diese Schmerzen treten vor allem morgens nach dem Aufstehen und nach längerem Sitzen - in Form eines Anlaufschmerzes - oder nach längerem Stehen und Arbeiten - als Ermüdungsschmerz - auf. Langsam-progredient stellen sich bereits erwähnte Deformitäten ein, die neben Schmerzen und Steifigkeit die Lebensqualität beeinträchtigen (Rössler und Rüter, 1996).

1.3 Behandlungsmöglichkeiten der Arthrose

Es existiert keine kausale Therapie der Arthrose. Die aktuell zur Verfügung stehenden Therapieoptionen sollen die Schmerzen reduzieren, die Gelenkfunktion verbessern und die Progredienz der Veränderungen vermindern. Diese Optionen umfassen konservative Maßnahmen, wobei hier zwischen medikamentös und nicht-medikamentös unterschieden werden muss, und operative Eingriffe.

Aus dem Gebiet der Physiotherapie werden die Balneotherapie und die lokale Einwirkung von Wärme angewandt. Auch das aktive Training der Muskulatur ist von Bedeutung. Vor allem bei Arthrosen der unteren Extremitäten können Hilfsmittel zu Entlastung, wie ein Gehstock oder Änderungen am Schuh, Erleichterung bringen (Debrunner, 2002).

Das American College of Rheumatology empfiehlt in seinen Richtlinien aus dem Jahr 2000 Paracetamol als Mittel der ersten Wahl zur medikamentösen Arthrosetherapie, da es neben seiner guten Verträglichkeit und Wirksamkeit ein günstiges Kostenprofil aufweist (Bradley et al., 1991, Williams et al., 1993, Eccles et al., 1998). An zweiter Stelle werden COX-2-selektive Inhibitoren – bei Patienten mit erhöhtem Risiko für gastrointestinale Komplikationen – und nichtselektive NSAR genannt. Besteht jedoch neben mäßigen bis starken Schmerzen eine gleichzeitige Entzündung kann eine sofortige Therapie mit NSAR in Betracht kommen, wobei diese mit gastroprotektiven Substanzen kombiniert werden können. Die Wirksamkeit von chondroprotektiven Substanzen wie den SYSADOAs (= symptomatic slow-acting drugs for the treatment of osteoarthritis) und den DMOADs (=disease-modifying osteoarthritis drugs) ist nicht nachgewiesen (McAlindon et al., 2000; Witte et al., 2002).

Kortikoide können, vor allem in schmerzhaften Schüben, intraartikulär injiziert werden. So kann teilweise für längere Zeit Besserung erreicht werden. Es besteht jedoch die Gefahr von septischen Arthritiden und plötzlicher, massiver Beschleunigung des Destruktionsprozesses im Gelenk.

Operativ stehen verschiedene Ansätze zur Verfügung. Direkte Eingriffe am Knorpel, wie ein Abtragen der pathologisch erscheinenden Strukturen, oder multiple Bohrungen um die Regeneration anzuregen, sind umstritten.

Die vier wichtigsten Gelenkoperationen bei Arthrosen sind die Osteotomie, Arthrodesen, Gelenkresektionen und die Implantation von Endoprothesen. Die Osteotomie wird gelenknah durchgeführt und soll die zuvor ungünstige Druckverteilung im Gelenk verbessern, indem Fehlstellungen ausgeschaltet, Gelenkflächen umgestellt und Muskelhebelarme verändert werden. Durch die Umstellung der Knochen und der damit anders wirkenden Kräfte soll ein regenerativ wirkendes „bone remodelling“ induziert werden. Die Gelenkresektion ist weitestgehend von der Endoprothetik abgelöst worden, findet aber beispielsweise noch in der Behandlung von infizierten Endoprothesen seine Anwendung. Ziele der Arthrodesen, also der Versteifung eines Gelenkes, sind Schmerzfreiheit und Stabilität unter dem Verlust der Beweglichkeit (Debrunner, 2002). Die Endoprothetik der Hüfte soll im Folgenden näher erläutert werden.

1.4 Hüftendoprothesen – Historie

Erste Versuche auf dem Gebiet der Endoprothetik wurden 1891 durch Themistocles Gluck unternommen, welcher Prothesen aus Elfenbein verwendete (Gluck, 1891; Wessinghage, 1995). Auf Grund der fehlenden aseptischen Bedingungen und des häufigen Vorkommens der Knochentuberkulose waren diese ersten Schritte im Bereich des künstlichen Gelenkersatzes jedoch zum Scheitern verurteilt.

In den 20er Jahren des 20. Jahrhunderts entwickelte Smith-Petersen eine Interpositionskappe für den Hüftkopf (Smith-Petersen, 1939). Dieser wurde nur aufgesteckt und nicht weiter fixiert, wobei es durch Abrieb- und Resorptionsvorgänge häufig zu Implantatlockerungen kam.

Die erste Totalendoprothese der Hüfte wurde 1938 von Philipp Wiles in London eingesetzt. Diese Prothese bestand aus zwei Stahlelementen. Die Pfanne war durch zwei Schrauben fixiert und der Hüftkopf wurde durch einen durch den Schenkelhals geführten Schraubenbolzen verankert. In den 1950er Jahren entwickelte McKee einige Modelle der zementfreien Hüftprothese, wobei auch hier die Pfanne verschraubt wurde. Der Kopf wurde zunächst über den Schenkelhals verschraubt und schließlich verwendete McKee zum Ersatz des Femurkopfes eine in den Markraum versenkte Thomson-Prothese. Den dauerhaftesten Erfolg erzielte Ring in den 1960er Jahren. Auch er verschraubte die Pfanne, verwendete jedoch als Kopfersatz eine in den Markkanal versenkte Moore-Prothese. Die von Thompson und Moore entwickelten Ganzmetallprothesen hatten einen gefensterten Schaft, welcher durch die nun mögliche knöcherne Integration eine bessere Fixation der Prothese in den Knochen gewährleisten sollte.

Um 1950 konnten die Brüder Judet in Paris einen weiteren Meilenstein der Endoprothetik entwickeln. Sie verwendeten Polymethylmetacrylat (PMMA) zur Herstellung einer Femurkopfprothese (Judet und Judet, 1952). Mit diesem PMMA fixierte Haboush 1953 erstmalig einen Prothesenschaft im Knochen.

Sir Charnley (1961) übernahm dieses Konzept und begründete die Philosophie des „Low-friction-Prinzips“. Er erzielte eine hohe Primärstabilität und gute Langzeitergebnisse mit einer Kombination aus einer Polyethylenpfanne und einer Metallschaftprothese mit relativ kleinem Metallkopf. Die Ursache liegt in dem relativ niedrigen entstehenden Abrieb (low friction) dieser Gleitpaarungen.

1.4.1 Prinzipien der zementierten Verankerung

Vor allem für ältere Patienten bietet die zementierte Verankerung der Prothese große Vorteile: Der Patient kann auf Grund der Primärstabilität bereits direkt postoperativ wieder zur Vollbelastung übergehen, weil dieser Schaft keine Zeit zur knöchernen Einheilung benötigt. Diese Prothesen können formschlüssig in die Markhöhle des Femurs eingearbeitet werden und besitzen dadurch eine gute Primärstabilität, wodurch die Gefahr der Entstehung von Frühlockerungen reduziert wird. Durch die Vergrößerung der Kontaktfläche zwischen Implantat und körpereigenem Gewebe werden örtliche Überbelastungen reduziert. Die zementierten Prothesen werden schon seit mehr als vierzig Jahren eingesetzt und es konnten gute Langzeitresultate nachgewiesen werden (Debrunner, 2002; Willert und Buchhorn, 1980). So wurden am Interface von Knochen und Zement vitale Osteozyten noch nach bis zu 22 Jahren nach der Implantation beschrieben (Charnley und Crawford, 1968; Charnley, 1970; Linder und Hansson, 1983; Malcom, 1999; Maloney et al., 1989).

Der Zementmantel kann Mikrofrakturen erleiden, insbesondere dort, wo der Knochen geschwächt, der Zementmantel dünn ist oder an Stellen wo er einer besonders hohen mechanischen Belastung ausgesetzt ist (Debrunner, 2002). Zudem erleidet der Zement einen Qualitätsverlust durch Alterung. Hieraus resultiert eine Lockerung der Prothese. Zusätzlich entsteht keine knöcherne oder andersartige stabile zelluläre Verbindung zwischen dem Knochen und dem Zement. Hierdurch reduziert sich die Stabilität zusätzlich und die Lockerung schreitet fort (Debrunner, 2002). Gewebeschädigungen durch die Toxizität der Monomere und durch die Hitzeentwicklung während der Polymerisation des Zementes lassen sich nicht quantifizieren.

Ein Hauptproblem der zementierten Endoprothetik in dem Bestreben um gute Langzeitergebnisse stellt die aseptische Prothesenlockerung dar (Küsswetter und Rütt, 1985). Als Ursache hierfür sind Abriebpartikel der artikulierenden Gelenkoberflächen zu sehen. Hierdurch können z. B. Osteolysen durch die Fremdkörperreaktion des Gewebes entstehen (Effenberger und Imhof, 2003). Die Makrophagen des periprothetischen Gewebes nehmen diese Abriebpartikel auf und werden hierdurch zur Freisetzung von Zytokinen, wie z. B. IL-1 und TNF α , angeregt. Daraus resultiert die Bildung von Osteoklasten, welche Osteolysen hervorrufen (Sabokbar et al., 2003).

Im Falle einer Revisions-Operation zeigt die zementierte Prothese schlechtere Ergebnisse als bei der Erst-Operation (Hedley et al., 1988; Kavanagh et al., 1985; Pellicci et al., 1979). Zunächst ist die Entfernung des Zementes problematisch; ebenso verhält es sich auch nachfolgend mit der erneuten Fixierung der Prothese, da teilweise große Knochendefekte im Verankerungslager der Prothese vorgefunden werden und die Knochenoberfläche nach der Entfernung des Zementes sehr glatt verbleibt. Aus diesen Gründen wird bei jungen Patienten eine zementfreie Verankerung angestrebt (Willert und Buchhorn, 1999).

1.4.2 Prinzipien der zementfreien Verankerung

Die Fixierung der zementfreien Implantation der Hüftendoprothese erfolgt über „press-fit“. Das Implantat ist etwas größer als die zuletzt verwendete Raspel oder Fräse. Hierdurch versucht man eine maximale Primärstabilität zu erreichen, da das Knochengewebe elastisch ist und die Prothese im Knochen verklemmt werden kann. Die Vorspannung sollte erhalten bleiben bis die Prothese knöchern eingehelt und integriert ist. Bei einer Implantation mittels „press-fit“ entstehen nachfolgend weniger Mikrobewegungen als bei einer genau eingepassten Prothese. Der Schaft wird in den allermeisten Fällen intramedullär eingebracht. Seltener werden andere Techniken (extrakortikale Kegelhülse oder eine durch den Schenkelhals geführte Zugschraube) angewendet. Die zur Verfügung stehenden Schäfte unterscheiden sich in ihrer Formgebung, ihrem Querschnitt und ihrer Kragenaufgabe, aber auch in ihrer Oberflächenbeschaffenheit, z. B. Beschichtung, Porosität etc. deutlich voneinander.

Es existieren verschiedene Werkstoffe, aus denen die Prothesen hergestellt werden. Hier wären zum Beispiel Kobalt-Chrom-Molybdän-Verbindungen (CoCrMo), Keramikverbundwerkstoffe aus Aluminiumoxid (Al_2O_3) oder Titan sowie seine Legierungen sowie Legierungen aus rostfreiem Stahl zu nennen. All diese Werkstoffe

unterscheiden sich in ihrer Verarbeitung, ihrer Korrosionsbeständigkeit, ihrer Gewebeverträglichkeit, ihrer Bruchfestigkeit und ihrer Elastizität.

Titan ist beispielsweise belastungsstabil und weist im biologischen Milieu eine hohe Beständigkeit auf. Es ist gewebefreundlich und somit gut biokompatibel und zeigt eine gute Osteointegration. Seine Oberfläche wird aufgeraut, mit Profilen und Reliefs versehen um das Einwachsverhalten zu verbessern. Kobalt-Chrom besitzt hingegen als Prothesenmaterial ein besseres Gleit- und Abriebverhalten. Zudem lassen seine Legierungen komplizierte Formgebungen zu. Bezüglich der Gleitfähigkeit zeigen Keramiken die größten Vorteile. Zudem weisen sie einen minimalen Abrieb auf. Sie sind jedoch nicht bruchstabil (Ungethüm, 1988; Plötz et al., 1993).

Zementfreie Implantate haben den Vorteil, dass der Knochen einwachsen kann und sie deshalb eine bessere Sekundärstabilität aufweisen. Es wird davon ausgegangen, dass vor allem bei jüngeren Patienten zementfrei implantierte Prothesen im Vergleich zur zementierten Technik längere Langzeitüberlebensraten aufweisen (Debrunner, 2002). Diese Form der Prothese benötigt, wie bereits oben erwähnt, etwa zwölf Wochen zum Einheilen. Bei jüngeren Patienten ist eine zementfreie Implantation zu erwägen. Auf Grund der Lebenserwartung muss von der Notwendigkeit eines Prothesenwechsels ausgegangen werden. Deshalb sollte die Implantation einer Prothese bei jüngeren Patienten erst so spät wie möglich erfolgen.

Bei der zementfreien Implantation ist ein weiterer Vorteil, dass für die Reimplantation einer Prothese mehr Knochen verbleibt, da kein Zement zusätzlich entfernt werden muss.

Um bei einer zementfreien Verankerung ein möglichst gutes An- und Einwachsen des Knochens zu erreichen, muss natürlich zunächst eine Primärstabilität vorhanden sein. Diese wird durch Verkeilen und Verklebungen im Sinne der Erzeugung einer Vorspannung erreicht. Hierauf aufbauend kann man durch die Wahl des Materials oder der Beschichtung eine knöcherne Integration verbessern (Debrunner, 2002).

Zunächst besteht die Möglichkeit, die Oberfläche der Prothese zu verändern. Der knöcherne Integrationsprozess kann durch eine strukturierte, poröse Oberfläche verbessert werden. Besonders hervorzuheben sind hierbei speziell interkonnektierende Oberflächenstrukturen mit einer Porengröße zwischen 100-500 µm (Gradinger et al., 2007), wie sie z.B. bei Hydroxyapatit gegeben ist.

1.5 Hydroxylapatit

Hydroxylapatit gehört zur Gruppe der Kalziumphosphate. Es ist ein nicht hochfestes Material, vor allem, wenn man es mit Materialien wie Titan vergleicht, und es ist spröde (Willmann, 1992).

Hydroxylapatit kann synthetisch oder mit Hilfe von biologischen Ausgangsmaterialien wie Knochen und Korallen hergestellt werden. Es werden unterschiedliche Formen - wie Zylinder, Granulat, Blöcke - in unterschiedlichen Volumendichten und mit differierenden Porengrößen angeboten. Hydroxylapatit besitzt das gleiche Kalzium-Phosphor-Verhältnis von 5:3 und auch dieselbe Kristallstruktur wie die Mineralbestandteile des Knochens (Posner, 1985). Es macht 90% der anorganischen Knochengrundsubstanz aus.

1974 fand Hydroxylapatit seine erste klinische Anwendung als biologischer Werkstoff in der orthopädischen Chirurgie. Seit 1980 wird es in der Zahnheilkunde verwendet. 1985 wurde es erstmalig als Bulbusersatz durch den amerikanischen Augenarzt Perry implantiert (Norda et al., 2000). Als Knochenersatzmaterial dient es vor allem in der Kiefer- und Gesichtschirurgie sowie in der Unfallchirurgie und Orthopädie zur Sanierung von traumatischen und osteomyelitischen Defekten sowie zur Augmentation von Kieferbögen, wenn es hier zu Mangelzuständen als Folge von Knocheninvolution im Alter kommt. Zudem kann Hydroxylapatit für die Aufbesserung von Alveolen und für die Obliteration zystischer Kavitäten verwendet werden (Kent et al., 1986). In der Unfallchirurgie, Orthopädie und Neurochirurgie wird es zum Beispiel im Sinne einer Osteoplastik bei Knochendefekten oder gutartigen Tumoren eingesetzt.

Weitere Einsatzmöglichkeiten ergeben sich in der Beschichtung von orthopädischen Implantaten mit Hydroxylapatit. Hierbei soll die knöcherne Integration ohne die Ausbildung einer bindegewebigen Zwischenschicht von zementfrei eingebrachten Implantaten beschleunigt werden (D'Antonio et al. 1996; Kirschenbaum, 1991; Sauer, 1988). Mehrere Studien konnten zeigen, dass HA-Beschichtungen von zementfreien Prothesen einen vorteilhaften Effekt auf die knöcherne Integration des Implantates haben (Havelin et al., 2000; Oosterbos et al., 2004). Dieser Effekt beruht auf der osteokonduktiven Eigenschaft des HAs, den umliegenden Knochen zum Einwachsen in das HA-Gerüst zu stimulieren. Hierbei sind die räumliche Beschaffenheit und die gewählte Porengröße von über 100 µm und die Poreninterkonnektivität des HA von

Bedeutung (Holmes et al., 1984, Klawitter et al., 1976). Der umgebende Knochen wird angeregt, in das Gerüst aus HA einzuwachsen.

Die Prothesen werden oberflächentechnisch durch ein Plasmasprühverfahren mit HA überzogen. Hierbei wird keramisches Hydroxylapatitpulver in einer Plasmaflamme geschmolzen. Die entstehenden Partikel kondensieren auf der zu beschichtenden Oberfläche und ergeben so die Matrix, in die der Knochen einwachsen und das Implantat im Knochen verankern kann.

Neben der Beschichtung des Implantates mit Hydroxylapatit existieren noch andere Ansätze, wie das Einwachsverhalten der Prothesen verbessert werden soll. So können Implantate beispielsweise mit synthetischen RGD-Peptiden beschichtet werden. Hierbei handelt es sich um die Aminosäuresequenz Arginin, Glycin, Asparagin, die eine hohe Affinität zu transmembranösen Integrinrezeptoren von Zellen besitzt. Durch die Bindung an diese Integrinrezeptoren kann die vermehrte Adhäsion von Osteoblasten an die Implantatoberfläche erreicht werden (Pierschbacher und Ruoslathi, 1984; Puleo und Bizios, 1991; Rezanian et al., 1997). Auf Grundlage dieser Erkenntnisse konnten Beschichtungen für orthopädische und Dentalimplantate entwickelt werden, die eine erhöhte Rate an Knochenneubildung der mit RGD beschichteten vs. der unbeschichteten Prothesen zeigten.

Schließlich besteht in diesem Zusammenhang auch die Möglichkeit, das Hydroxylapatit mit einem Antibiotikum zu überziehen, um zusätzlich zu dem verbesserten Einwuchs eine Infektionsprophylaxe zu erreichen. Diese Möglichkeit ist Gegenstand der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit.

1.6 Physiologie der knöchernen Integration von Implantaten

1.6.1 Mikroskopie des Knochens

Geflechtknochen

Geflecht- oder auch Faserknochen stellt die primitivste Form des Knochens dar. Es handelt sich um verknöchertes Bindegewebe (Rohen und Lütjen-Drecoll, 2000). Das Stadium des Geflechtknochens wird bei der Knochenentwicklung und -bruchheilung durchlaufen und schließlich durch Lamellenknochen ersetzt. Die Kollagenfasern der Grundsubstanz schließen sich zu Bündeln zusammen und haben darin keine

einheitliche Verlaufsrichtung, wodurch keine Lamellenbildung stattfindet. Geflechtknochen enthält mehr Zellen, aber weniger Mineralien als Lamellenknochen und enthält auch Knochenkanälchen für Blutgefäße und Nerven. Er hat eine besondere Festigkeit bei Zug und Biegung. An einigen wenigen Stellen wird der Geflechtknochen beim Erwachsenen nicht durch Lamellenknochen ersetzt wie beispielsweise die Pars petrosa des Os temporale (Leonhardt, 1990; Junquera und Carniero, 1996; Rohen und Lütjen-Drecoll, 2000).

Lamellenknochen

Die Festigkeit des Lamellenknochens ist um ein Vielfaches höher als die des Geflechtknochens (Rohen und Lütjen-Drecoll, 2000). Die Baueinheit des Lamellenknochens ist das Osteon. Hierbei handelt es sich um einen mittig liegenden Zentralkanal, um den herum 3-20 so genannter Speziallamellen angeordnet sind. Die Lamellen sind etwa 3-7 μm dicke, voneinander abgegrenzte Knochenschichten, in oder zwischen denen die Osteozyten in kleinen Hohlräumen, den Lacuna ossea, liegen. Wie schon zuvor beschrieben haben sie über Fortsätze, die durch die Canaliculi ossei ziehen, miteinander Kontakt. Die Canaliculi münden schließlich in den Zentralkanal (Junquera und Carniero, 1996).

Die Zentralkanäle (Havers-Kanäle, Canales centrales) haben etwa einen Durchmesser von 20 bis 300 μm und enthalten die den Knochen ernährenden Blutgefäße und seine Nerven, sowie lockeres Bindegewebe, Vorläuferzellen und die Zellen, die die Knochenoberfläche bekleiden (Leonhardt, 1990; Junquera und Carniero, 1996). Die Bildung der Lamellen erfolgt von außen nach innen auf den Zentralkanal zu. Sie sind zylinderförmig und das Osteon läuft für gewöhnlich parallel zur Oberfläche des Knochens. Die Lamellen sind oft gegabelt und so untereinander verbunden. Die Kollagenfasern in den Lamellen zeigen einen schraubenförmigen, in sich gestreckten Verlauf, wobei sich Steigung und Verlaufsrichtung einander benachbarter Lamellen voneinander unterscheiden, wodurch sie sich gegensinnig kreuzen (Junquera und Carniero, 1996). Durch diese Anordnung ergeben sich bei Zug- oder Druckbelastung des Knochens „versteifende Flächenpressungen“, aus welchen eine hohe Widerstandsfähigkeit des Knochens in allen Richtungen resultiert (Rohen und Lütjen-Drecoll, 2000). Auch innerhalb einer Lamelle verlaufen einige der Fasern in eine andere Richtung als die übrigen oder treten in eine nahe liegende Lamelle über, wodurch ein fest verflochtenes Netz entsteht.

Die äußere und die innere Oberfläche des Knochens wird von den äußeren und inneren Generallamellen gebildet. Das den Knochen umgebende Periost besteht aus

zwei Lagen. Die innere Schicht besteht aus lockerem, gefäßreichem Bindegewebe, das Knochenvorläuferzellen enthält, welche in direktem Kontakt zum Knochen stehen und sich bei Bedarf in Osteoblasten umwandeln können. Wie das Periost besitzt das Endost osteogenetische Potenz (Geneser, 1990).

1.6.2 Knochenzellen

Knochengewebe entsteht aus dem mesenchymalen (embryonalen) Bindegewebe (Rohen und Lütjen-Drecoll, 2000).

Vorläuferzellen

Vorläuferzellen sind undifferenzierte Zellen mesenchymaler Herkunft, die lebenslänglich im Knochen vorhanden sind und sich in Osteoblasten umwandeln können. Sie liegen an den inneren und äußeren Knochenoberflächen, sowie den Haversschen Kanälen und sind während der Knochenentwicklung aktiv bzw. können im Falle eines Knochenbruchs reaktiviert werden (Junquera und Carniero, 1996). Ihre Zellkerne sind blass und oval und ihr Zytoplasma ist unregelmäßig und hell (Geneser, 1990).

Die Ursprungszelle des Osteozyten ist die multipotente mesenchymale Stammzelle, aus der sich auch Chondroblasten, Fibroblasten, Adipozyten und Myoblasten entwickeln können. Diese Entwicklung verläuft über verschiedene Stufen: den Osteoblast-Vorläufer, den Präosteoblasten, den Osteoblasten, den Präosteozyten bis hin zum terminal differenzierten Osteozyten. Die Präosteoblasten differenzieren sich zu kubischen, Matrix-produzierenden Osteoblasten, nachdem sie zur Knochenoberfläche gelangt sind (Kaiser und Delling, 2002).

Osteoblasten

Aktive Osteoblasten sind 20-30 µm große, kubische bis hochprismatische Zellen, die an der Oberfläche des Knochens einem Epithel gleich eng nebeneinander liegen (Osteoblastenlayer) (Junquera und Carniero, 1996) und durch feine zytoplasmatische Fortsätze miteinander in Verbindung stehen (Cooper, 1966). Sie sind basophil, besitzen ein gut entwickeltes raues endoplasmatisches Retikulum, einen deutlichen Golgi-Apparat und einen asymmetrisch, meist gegenüber der Knochenoberfläche, liegenden Zellkern. Osteoblasten synthetisieren die organischen Anteile der Knochengrundsubstanz (Kollagen, Proteoglykane und Glykoproteine) und alkalische Phosphatase (Junquera und Carniero, 1996). Während der Geflechtknochenbildung (siehe unten) geben die Osteoblasten das Kollagen allseitig perizellulär ab. Im Zuge

der Lamellenknochenbildung sind sie jedoch polarisierende Zellen, die das Kollagen nur am Ort des Kontaktes mit Knochengrundsubstanz abgeben (Schenk und Willenegger, 1977).

Die noch nicht mineralisierte Knochengrundsubstanz wird als Osteoid bezeichnet (Junquera und Carniero, 1996). An dieses geben die Osteoblasten zuvor aufgenommenes Kalzium ab, wo es als Apatit, d. h. in Form von Kalzium-Phosphat-Salzen, eingebaut wird. Eine zusätzliche Rolle bei der Mineralisierung spielen vesikuläre Membranabschnürungen durch die Bildung von Mineralisationskeimen. Die Osteoblasten und die sie umgebenden Kollagenfasern (Sharpeysche Fasern) werden so vom Osteoid umschlossen. Nach Abschluss der aktiven Knochensubstanzproduktion liegen die Osteoblasten wieder als flache Zellen an der Knochenoberfläche (Benninghoff, 1990).

Osteozyten

Die mit Osteoid umgebenen Osteoblasten werden nun Osteozyten genannt. Sie werden längsoval und mit der Zeit enthalten sie weniger Zellorganellen, die der Matrixproduktion dienen. Ihre Zelleiber liegen in knöchernen Höhlen, den so genannten Lakunen, während ihre Zytoplasmafortsätze in den Canaliculi verlaufend über „gap junctions“, die dem Transport von Stoffen dienen, miteinander in Verbindung stehen (Benninghoff, 1990). Lamellenknochen enthält etwa 700 – 900 Osteozyten/mm³ (Rohen und Lütjen-Drecoll, 2000).

Die Osteozyten dienen dem Erhalt des Knochens und der Kalzium-Homöostase. Es gibt zwei verschiedene Formen. Die osteoblastischen Osteozyten konzentrieren Kalziumphosphat in ihrem Zytoplasma, welches zum Aufbau der Hartschubstanz verwendet werden kann. Sie dienen somit der Erhaltung des Knochens. Osteolytische Osteozyten besitzen die Fähigkeit Hartschubstanz abzubauen und somit Kalzium aus dem Knochen freizusetzen (Junquera und Carniero, 1996). Dieser Kalziumabbau und die anschließende Abgabe an das Blut wird durch das Parathormon vermittelt und durch Kalzitinin gehemmt (Geneser, 1990).

Osteoklasten

Osteoklasten entstehen durch die asynchrone Fusion von mononukleären Vorläuferzellen aus dem Knochenmark und ihre Differenzierung erfolgt aus der Granulozyten-Makrophagen-Linie (Chambers 1989, Prallet et al. 1992). Es handelt sich um große (10-100 µm), mehrkernige Zellen mit zumeist 10-20, höchstens jedoch 100

Kerne pro Osteoklast, die in der Lage sind, Knochengrundsubstanz abzubauen. Mit dieser Fähigkeit nehmen sie eine Schlüsselfunktion in der Kontrolle von Knochenumbau und Knochenverlust ein (Amling und Delling, 1997). Osteoklasten sind azidophil und unregelmäßig geformt. Häufig liegen sie während des Knochenabbaus in selbst gebildeten Knocheneinbuchtungen, den Howship-Lakunen. Ihre dem Knochen zugewandte Oberfläche ist unregelmäßig aufgefaltet („ruffled border“) und beweglich, wodurch die Zelloberfläche vergrößert wird. Zwischen den Falten des ruffled border liegen häufig kalziumhaltige Kristalle (Junquera und Carniero, 1996). Die Zellkerne der Osteoklasten präsentieren ein heterogenes Muster unterschiedlicher Größe, Form und Basophilie, was ein Ausdruck der asynchronen Fusion von mononukleären Vorläuferzellen sein könnte (Nijweide et al., 1986). Der engste Kontakt zwischen Osteoklast und Knochen besteht an der so genannten „sealing zone“ (Schenk et al., 1977), wo eine Zell-Substrat Interaktion stattfindet (Neff et al., 1995). Das die sealing zone umgebende Zytoplasma wird als „clear zone“ bezeichnet, da hier nahezu keine Zellorganellen vorhanden sind. Jedoch sind hier besonders viele kontraktile Proteine anzufinden (Marchisio et al., 1984). Osteoklasten besitzen viele Ribosomen, Lysosomen, Mitochondrien und Vakuolen, die zum Teil noch erkennbare Knochenanteile enthalten.

Charakterisiert ist der Osteoklast durch die Expression von Calcitoninrezeptoren (CTR), Carboanhydrase II (CAII), vakuoläre Protonenpumpen (H^+ -ATPase), tatraresistente saure Phosphatase (TRAP⁺) und des Vitronectinrezeptors ($\alpha_v\beta_3$) (Amling und Delling, 1997).

Der Knochenabbau erfolgt durch eine Auflösung des Knochenminerals mittels von den Osteoklasten gebildeter HCL. Der Osteoklast verfügt zudem über Carboanhydrase, ATPase, saure und neutrale Phosphatasen und über Zytochromoxidasen. Die organische Matrix wird nun durch Pinozytose von dem Osteoklast aufgenommen und durch lysosomale und nicht lysosomale Proteasen aufgelöst (Junquera und Carniero, 1996; Benninghoff, 1990; Leonhardt, 1990).

1.6.3 Interzellulärsubstanz

Die Interzellulärsubstanz, auch Knochengrundsubstanz genannt, besteht

- zu etwa 50% aus Mineralien
- zu etwa 25% aus organischen Verbindungen
- zu etwa 25% aus Hydratationswasser.

Der Mineralienanteil besteht aus anorganischem Phosphat (ca. 50%), Kalzium (ca.35%), Zitrat, Karbonat (6-7%), Nitrat, Natrium, Magnesium, Fluor und Spurenstoffen. 99% des Kalziumgehalts des Körpers ist im Knochen enthalten. Die Mineralien liegen als Apatitkristalle (Kalziumphosphatverbindungen) vor, wobei es sich überwiegend um Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) handelt, welches nadelförmig längs der Kollagenfibrillen oder in ihnen liegt und von amorpher Grundsubstanz umgeben ist (Junquera und Carniero, 1996). Die Kristalle haben etwa einen Durchmesser von 3-6 nm und erreichen eine Länge von bis zu 60 nm (Geneser, 1990). Die zu den Kollagenfasern parallele Anordnung der Hydroxylapatitkristalle ergibt einen Verbundbau. Durch die sie umgebende mineralisierte Grundsubstanz sind die einzelnen Fasern nicht mehr gegeneinander verschieblich, woraus eine enorme Festigkeit resultiert. (Rohen und Lütjen-Drecoll, 2000).

Kollagenfasern stellen mit 90-95% den größten Anteil der organischen Verbindungen in der Knochengrundsubstanz. Der Rest besteht aus Osteonektin, Osteocalcin und Glykosaminoglykanen. Osteonektin verbindet das Kollagen des Knochens mit seinen Mineralien, wobei diese Verbindung die Festigkeit und Härte des Knochens ausmacht. Die Zellen des Knochens werden durch Osteopontin mit den Mineralien verbunden.

Die Hydroxylapatitkristalle sind von einem Hydratmantel umgeben, der für den Ionenaustausch zur Einlagerung und Mobilisierung des Kalziums in den Knochen wichtig ist (Junquera und Carniero, 1996).

1.6.4 Knochenmark

Aufbau

Histologisch gliedert sich das Knochenmark in einen gefäßführenden und einen hämatopoetisch aktiven Teil. Die Gefäßversorgung des Knochenmarks erfolgt über die Arteriae nutriciae. Der Stoffaustausch zwischen Blut und Knochenmark erfolgt durch die Wand der Sinusoide. Im Knochenmark befinden sich keine Lymphgefäße. Der oben schon erwähnte hämatopoetisch aktive Teil des Knochenmarks liegt in den Zwischenräumen des gefäßführenden Teils (Geneser, 1990). Die freien Blutbildungszellen liegen hier relativ sortiert nach Blutzellart in Nestern zusammen (colony-forming cells, CFC oder colony-forming units, CFU) (Junquera und Lütjen-Drecoll, 1996). Hier legen sich Erythroblasten um Makrophagen herum in der Nähe der Sinusoide zu so genannten Erythroblasteninseln zusammen. Die Makrophagen

nehmen die abgestoßenen Zellkerne und schadhafte Erythroblasten in Phagozytosevakuolen auf. Etwa 10% der Gesamtproduktion an Erythrozyten ist schadhaft und wird auf diese Weise aus dem Verkehr gezogen. Die Megakaryozyten liegen in der Nähe der Sinusoidwände, durch die hindurch sie Fortsätze in das Lumen hinein strecken. Von diesen Zytoplasmaarmen werden die Thrombozyten abgeschnürt und in den Blutkreislauf entlassen. Manchmal befinden sich die Megakaryozyten jedoch auch im Lumen des Sinusoids und setzen von hier aus Thrombozyten frei. Die Zellen der Granulopoese können sich ab dem Myelozytenstadium eigenständig bewegen, womit sie unabhängig vom Sinusoid liegen können (Geneser, 1990).

Die Stromazellen des Knochenmarks produzieren Fibronectin (Bentley und Talka, 1983), ein Molekül, das in der extrazellulären Matrix abgelagert wird und Zelladhäsion, Zellmigration und Differenzierung vermittelt, und Proteoglycane, die jedoch auch von den hämatopoetisch aktiven Zellen synthetisiert werden. Proteoglycane scheinen in die Regulation der Proliferation und Differenzierung der hämatopoetischen Zellen involviert zu sein (Spooncer et al., 1983). Die extrazelluläre Matrix des Knochenmarks enthält als stabilisierendes Gerüst die Kollagene Typ I, III, V und VI (Bentley, 1982). Kollagen Typ VI konnte im hämatopoetischen Stroma nachgewiesen werden. Das Stroma des Knochenmarks enthält zudem Osteoblasten und multipotente fibroblastische Stromazellen, welche sich in fibroblastische, osteogene, retikuläre oder Fettzellen differenzieren können. Studien zeigen, dass das Knochenmarksgewebe zu einer ausgeprägten Osteogenese fähig ist (Endres et al., 2003).

Physiologie

Die Aufgaben des Knochenmarks sind die Leukopoese, wozu die Granulopoese, die Monozytopoese, die Thrombopoese und die Lymphopoese gehören, und die Erythrozytopoese. Zudem ist es am Abbau der Erythrozyten beteiligt und speichert das hierbei freigesetzte Eisen als Ferritin. Dieses wird von den interstitiellen Makrophagen an Erythroblasten abgegeben, die es für die Synthese von Hämoglobin benötigen.

Das Knochenmark ist zum einen ein Speicherorgan für Fett (Junquera und Carniero, 1996).

1.6.5 Osteogenese und Mineralisation

Die Osteogenese erfolgt als desmale Ossifikation (direkte Knochenbildung) oder als chondrale Ossifikation (indirekte Knochenbildung). Es entsteht immer erst ein unreifer Geflechtknochen, der später abgebaut und durch reifen Lamellenknochen ersetzt wird.

Desmale Ossifikation

Die desmale Ossifikation wird auch als direkte Ossifikation bezeichnet, weil hier der Knochen direkt aus dem Mesenchym entsteht. Zunächst vermehren sich die Mesenchymzellen und wandeln sich in Osteoblasten um. Diese beginnen nun mit der Produktion von Osteoid und in ihrem Verlauf ungerichteten Kollagenfasern, wobei sie über Zytoplasmfortsätze in Verbindung bleiben. Das Osteoid wird durch die Einlagerung von Kalziumphosphat mineralisiert und die nun eingemauerten Osteoblasten wandeln sich in Osteozyten um. Die Bälkchen des frisch entstandenen Geflechtknochens wachsen aufeinander zu und so verschmelzen die einzelnen desmalen Ossifikationszentren miteinander.

Die desmale ist die häufigste Form der Knochenbildung und durch sie entstehen beispielsweise folgende Knochenelemente: die perichondralen Knochenmanschetten der Röhrenknochen, der oberflächlich gelegene Knochen während der chondralen Ossifikation, teilweise der Knochen der Knochenbruchheilung, sowie Teile der Schädelknochen (Benninghoff, 1990; Junquera und Carniero, 1996).

Chondrale Ossifikation

Ein Modell aus hyalinem Knorpel dient als Grundlage und Leitstruktur für die chondralen Ossifikation. Hierbei laufen zwei Vorgänge ab:

- die perichondrale Ossifikation, bei der an der Oberfläche auf desmalem Wege Knochen gebildet wird, und
- die enchondrale Ossifikation, bei der das vorhandene Knorpelmodell abgebaut und durch Geflechtknochen ersetzt wird.

In der Schaftmitte der Knorpelmodelle zukünftiger Röhrenknochen beginnt eine vom Perichondrium ausgehende desmale Ossifikation, bei der schließlich eine Knochenmanschette aus Geflechtknochen entsteht, die die ganze Diaphyse umgreift. Der unter dieser Manschette gelegene Knorpel degeneriert auf Grund der Mangelversorgung und verkalkt. Durch Ab- und Umbauvorgänge sprießen Gefäße ein,

ein Bälkchenwerk aus Geflechtknochen und die primäre Markhöhle entsteht. Durch zunehmendes Vorherrschen der Stammzellen der Blutbildung entwickelt sich die sekundäre Markhöhle.

Die enchondrale Ossifikation beginnt, in dem die Grundsubstanz des knorpeligen Modells verkalkt und nachfolgend Gefäße einsprossen. Die Knorpelzellen hypertrophieren nun und werden abgebaut, wodurch leere Lakunen zurückbleiben, in die wiederum Blutgefäße einwachsen. Über diese Blutgefäße gelangen Mesenchymzellen in die Lakunen, die sich dort zu Osteoblasten differenzieren und Knochen bilden. Durch erneute Ab- und Umbauvorgänge entsteht das eigentliche Knochengüst (Benninghoff, 1990; Junquera und Carniero, 1996).

Mineralisation

Dieser Vorgang ist noch nicht bis in die letzten Einzelheiten geklärt. Es handelt sich hierbei um die Ablagerung von Mineralien in der organischen Matrix des Knochens und auch des Knorpels (Geneser, 1990).

Osteoblasten schnüren Matrixbläschen ab, die in die Interzellulärsubstanz wandern. Sie bestehen u. a. aus Kalziumkomplexen von Phospholipiden und basischen Proteinen, sowie alkalische Phosphatase und Pyrophosphatase. In den Vesikeln bilden sich Kalziumphosphatkristalle, die nach der Auflösung der Vesikel freigesetzt werden (Junquera und Carniero, 1996). Nun wirkt das Kalziumphosphat zusammen mit anderen Ionen als Keimbildner („calcification nodules“) an extrazellulären Nukleationsstellen (Martino et al., 1979). Die Kristalle treten an die Kollagenfibrillen heran und richten sich parallel zu diesen aus. Die Mineralisierung beginnt über einzelne Inseln und schreitet über die Ausbildung von intra- und interfibrillären Kristallen aus (Junquera und Carniero, 1996).

1.6.6 Knochenwachstum und Remodelling/Knochenumbau

Beim Knochenwachstum kommt es zu einer Teilresorption des bereits gebildeten Knochens und gleichzeitiger Knochenneubildung, wodurch die Form und die Funktion des Knochens auch während des Wachstums erhalten bleiben. Diese Verschiebung der Knochenstrukturen wird als Drift bezeichnet (Benninghoff, 1990).

Lange Knochen zeigen ein Dicken- und ein Längenwachstum. Das Dickenwachstum des Diaphysenschaftes erfolgt mittels desmalen Ossifikation radiär ausgehend vom

Periost bei gleichzeitiger Knochenresorption durch Osteoklasten an der Innenfläche. Die trichterartige Form der Epiphysen kommt dadurch zustande, dass sie schneller wachsen als der angrenzende Schaft. Hier erfolgt das Knochenwachstum innen und die Resorption außen (Geneser, 1990; Junquera und Carniero, 1996).

Das Längenwachstum resultiert aus der Proliferation von Teilen der Metaphysen, während der neue Knochen der Verknöcherungszone wieder abgebaut wird. Hierbei besteht ein Gleichgewicht aus Knorpelzellbildung, ihrem Umbau in Knochen und dem Knochenabbau. Wenn der gesamte zur Verfügung stehende Knorpel etwa im 20. Lebensjahr verbraucht ist, endet hier das Wachstum und die Epiphysenplatte existiert nicht mehr (Junquera und Carniero, 1996).

Mit dem Knochenwachstum sind Umbauvorgänge verbunden, bei denen der Knochen – auch bei sekundärer Bildung – immer erst als Geflechtknochen vorliegt. Der Lamellenknochen entsteht in den ersten Lebensjahren. Wichtig ist, dass der Kollagenfaserverlauf den mechanischen Anforderungen angepasst ist, er verändert sich unter gleich bleibenden Bedingungen nicht.

Auch der Lamellenknochen des Erwachsenen unterliegt einem ständigen Umbau. Vorhandene Osteone werden ab- und wieder neu aufgebaut, wobei Lamellenbruchstücke als Schaltlamellen stehen bleiben. Dieser Umbau erfolgt besonders aktiv bei geänderten statischen Verhältnissen, beispielsweise bei einem geschädigten aktiven Bewegungsapparat, vor allem der Kollagenfaserverlauf wird angepasst. Wenn die Belastung des Knochens herabgesetzt ist nimmt die Knochenmasse durch Reduzierung von Zahl und Dicke der Knochenlamellen ab, woraus eine erhöhte Porosität (Osteoporose) entsteht. Diese ist jedoch mit Wiederaufnahme der Belastung reversibel (Junquera und Carniero, 1996).

1.6.7 Knöcherne Integration von Implantaten

Der Erfolg eines Implantates, das zementfrei und somit direkt in den Knochen implantiert wird, ist vor allem von seiner ossären Integration abhängig. Aus dieser Osseointegration resultiert die Sekundärstabilität und Überlebensdauer der Prothese. Hierbei wird der in der Osteokonduktionsphase gebildete Geflechtknochen zunächst durch Remodeling in Lamellenknochen umgewandelt, wodurch das Implantat stabil in die Anforderung der mechanischen Belastung des Knochens integriert wird (Schenk

und Buser, 1998). Die unterschiedlichen Eigenschaften des Implantates wie der Werkstoff, die Biomechanik, die Größe oder das Stress Shielding beeinflussen Interaktion der Zellen und des knöchernen Implantatlagers. Die Beschaffenheit der Implantatoberfläche scheint eine der wichtigsten Einflussgrößen auf die Zellen des Implantatlagers zu sein (Boyan et al., 2001). Zelluläre Abläufe und Reaktionen werden durch eine frühe Regulation der Zelle nach der Implantation beeinflusst (Schwartz et al., 1999). Die Fortsätze der Knochenzellen treten hierbei wohl mit dem Implantat in Kontakt und registrieren die induzierten mechanischen Stimuli, um diese dann weiterzuverarbeiten. Der genaue Mechanismus ist hier jedoch noch nicht bekannt (Steflik et al., 1998). Grundvoraussetzung für die Regeneration von neuem Knochengewebe ist eine gute Knochenqualität mit ausreichender Vaskularisation (Donath, 1988; Fritz, 1999).

1.7 Periprothetische Infektionen

Infektionen treten beim endoprothetischen Hüftgelenkersatz durchschnittlich mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,5 bis 2% bei der Primäroperation auf. Hierbei besteht im ersten postoperativen Jahr die größte Infektionsgefahr mit kumulativen Raten von 6,5 pro 1000 Implantatjahren. Im zweiten Jahr liegt die Rate bei 3,2 und im dritten und jedem jeweils folgenden Jahr bei 1,4 pro 1000 Implantatjahren. In Risikokollektiven liegt die Infektionsrate bei bis zu 5% (Geipel und Herrmann, 2005). Neben den Konsequenzen einer Protheseninfektion mit zugehörigen Revisionsoperationen muss auch noch das bestehende Mortalitätsrisiko des Patienten, das für einen 65 jährigen bei 0,4-1,2% und für einen 80 jährigen Patienten bei 2-7% liegt, bedacht werden (Fisman et al., 2001). Nicht zuletzt sind auch die entstehenden Behandlungskosten für das Gesundheitssystem von erheblicher Relevanz.

1.7.1 Pathogenese von periprothetischen Infektionen

Pathophysiologisch werden periprothetische Infektionen in den meisten Fällen durch Kontamination der Wunde während der Operation hervorgerufen. Desweiteren kann es auch sekundär über hämatogene Streuung bei Bakteriämie, z. B. bei Zahnextraktionen, zu einer Besiedelung des Implantats mit nachfolgender Infektion kommen.

Berberi et al. (1998) ermittelten die Risikofaktoren für eine Protheseninfektion. Zu den gesicherten Faktoren, welche größtenteils lokale Bedingungen beschreiben, zählten

der vorausgegangene Gelenkersatz, ein erhöhter NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance System) Score, postoperative Wundinfektionen ohne Prothesenbeteiligung und maligne Grunderkrankungen. Die wahrscheinlichen sowie ungesicherten Risikofaktoren sind zumeist systemisch, wie beispielsweise eine Rheumatoide Arthritis, eine Kortikosteroidtherapie, sich dicht unter der Hautoberfläche befindende Prothesen, ein Diabetes mellitus und ein hohes Lebensalter. Lazzarini et al. (2004) beschreiben zusätzlich noch Harnwegsinfekte, Leber-/Nierenfunktionsstörungen, Mangelernährung und schwere Infektionskrankheiten in Zusammenhang mit einer erhöhten Rate an Protheseninfektionen. Weitere lokale Einflussfaktoren sind z. B. exzessive Weichteildefekte, arterielle und venöse Durchblutungsstörungen, Neuropathie, postoperative ausgedehnte Hämatome und *in situ* verbleibende nekrotische Gewebereste (Gustilo und Anderson, 1976; Lazzarini et al., 2004; Schnettler und Alt, 2004; Wichmann et al., 1998).

Durch die Anwesenheit des Fremdmaterials im Organismus ist die für eine Infektion notwendige Keimmenge deutlich reduziert (Geipel und Herrmann, 2005). Elek und Conen zeigten schon 1957, dass die Menge an *Staphylococcus aureus* zum Auslösen eines subcutanen Abszesses bei Anwesenheit von Fremdmaterial um den Faktor 1000 niedriger war als ohne die Verwendung von Fremdmaterial. Als Ursache hierfür ist die Fähigkeit vor allem der Staphylokokken, einen extrazellulären Biofilm zu bilden. Durch diese Schutzbarriere werden 1000fach höhere Konzentrationen eines Antibiotikums benötigt, um einen Biofilm-bildenden Stamm bei *Staphylococcus aureus* abzutöten im Gegensatz zu einem entsprechenden Stamm, der keinen solchen Biofilm gebildet hat (Nickel et al., 1985). Der Biofilm dient somit als Schutz für das Bakterium sowohl vor einer Antibiotikatherapie als auch vor dem Immunsystem des Wirtsorganismus. Im Falle einer bakteriellen Implantatbesiedelung mit Biofilmbildung ist nach Gristina und Costerton (1985) eine kurative Behandlung nur noch die komplette Entfernung der Prothese möglich. Ein weiterer Virulenzfaktor der Keime ist das Vorhandensein sogenannter Adhesine, welche über mehrstufige Prozesse die Bindung der Bakterien an die vorhandene Matrix ermöglichen. So verfügen *Staphylococcus epidermidis* Stämme z.B. über Capsular polysaccharide intercellular adhesin (PSA) und proteinaceous autolysin (Rupp et al. 1999). Nach erfolgreicher Adhäsion lagern sich die einzelnen Bakterien über einen polysaccharide intercellular adhesion (PIA) vermittelten Prozess zusammen und beginnen mit der Biofilmbildung (Galdbart et al., 2000).

Im Gegensatz zu *Staphylococcus epidermidis*, welcher vermehrt mit der Prothesenoberfläche interagiert, bindet *Staphylococcus aureus* über spezifische

Adhesinoberflächenmoleküle, zusammenfassend als MSCRAMM (microbial surface components recognising adhesive matrix molecules) bezeichnet, an extrazelluläre Proteine wie Fibrinogen, Fibrin, Kollagen, Elastin, von-Willebrand-Faktor usw., die ihren Ursprung im Wirtsgewebe haben (Lew und Waldvogel, 2004; Vadaux et al., 2000). *Staphylococcus aureus* Stämme können ebenfalls Biofilm bilden und eine begleitende Weichteilinfektion auslösen, indem sie über die Produktion von Exotoxin und Hydrolasen und über endozytotische Aufnahme in den Intrazellularraum von Epithel- und Endothelzellen gelangen können (Ellington et al., 2003; Sinha et al., 1999). Durch die Bildung einer „small colony“ Variante kann sich *Staphylococcus aureus* an sich verändernde Umweltbedingungen anpassen (von Eiff et al., 1998).

Es kann andererseits, ohne bakterielle Infektion, zu einer Fremdkörperreaktion kommen, bei der Granulozyten und Makrophagen aufgrund „frustranter“ Phagozytose des Fremdmaterials, welches nicht phagozytiert werden kann, aktiviert werden. Zudem werden Leukozyten degranuliert, weniger Sauerstoffradikale produziert und es kommt zu einer zellulären Apoptose. Diese Inflammationsreaktion resultiert in einer veränderten T-Zellreaktion, verringerter Makrophagen- und neutrophilen Granulozytenaktivität und auch in einer verminderten Lymphozyten- und Komplementfunktion. Diese Mechanismen führen zu einer lokalen Immundefizienz (Zimmerli et al. 1984). Zusätzlich können physikalische Faktoren wie eine lokale Überwärmung mit hieraus resultierender Perfusionsschädigung im Knochen durch die Polymerisation bestimmter Implantatmaterialien zu einer reduzierten Wirtsabwehr führen (Geipel und Herrmann 2005).

Durch die Freisetzung von Exotoxinen und Mikroembolien im Verlauf der Entzündungsreaktion kommt es über die Freisetzung von Nekrosepartikeln zu einer Herabsetzung der medullären und periostalen Blutversorgung. Hieraus kann eine Sequesterbildung entstehen, bei der vitale Knochenelemente aus dem Verbund gelöst werden, woraus die Lockerung der Prothese und die Entstehung einer chronischen Protheseninfektion resultieren kann (Lew und Waldvogel, 2004).

1.7.2 Formen der Protheseninfektionen

Periprothetische Infektionen werden in Früh- und Spätinfektionen unterteilt (Debrunner, 2002). Geipel und Herrmann (2005) gliedern die Frühinfektion nochmals in eine „akute“ - weniger als zwei Monate nach der Implantation - und eine „verzögerte“ - zwei bis zwölf Monate nach der Implantation - Infektion auf.

Frühinfekte treten innerhalb eines Jahres nach der Operation auf und haben auch in dieser ihren Ursprung. Als Prophylaxe dient also strenge Einhaltung der Asepsis, gewebeschonende Operationstechnik und perioperative Gabe eines Breitspektrumantibiotikums, besonders bei Re-Operation oder erhöhter Infektionsgefahr. Wenn sich dennoch eine Infektion entwickeln sollte, muss diese frühzeitig durch Debridement des infizierten Gewebes und Spülung der Prothese mit hochdosierter systemischer Antibiose therapiert werden mit dem Versuch, die Prothese *in situ* zu belassen. Es besteht die Gefahr der Prothesenlockerung durch Osteolysen, weshalb die Prothese dann entfernt werden muss. Eine Re-Implantation führt nicht immer zum Erfolg (Debrunner, 2002). Das Erregerspektrum des „akuten“ Frühinfektes zeigt üblicherweise solche höherer Virulenz wie *Staphylococcus aureus*, β -hämolyisierende Streptokokken und Enterobakterien. Diese Infektionen können einen fulminanten Verlauf nehmen und gelegentlich geht mit der Protheseninfektion eine Sepsis einher. Die „verzögerten“ Frühinfekte werden zumeist durch koagulasenegative Staphylokokken, α -hämolyisierende Streptokokken, anaerobe Kokken und Korynebakterien ausgelöst und verlaufen oftmals ohne systemische Krankheitszeichen (Geipel und Herrman, 2005).

Spätinfekte, die auch nach mehreren Jahren auftreten können, entstehen durch hämatogene Streuung der Erreger infolge eines anderen Infektes oder als Resultat einer schleichenden Infektion durch eine Kontamination während der Operation. Manifest werden diese meist durch Schmerzen und die Zeichen der Prothesenlockerung, möglicherweise aber auch durch die Entstehung einer Fistel (Debrunner, 2002). Das Erregerspektrum ist breit und erstreckt sich zum Beispiel über Bakterien der Hautflora und des Oropharynx oder über Infektionsquellen des Urogenital- oder Gastrointestinaltraktes (Geipel und Herrmann, 2005).

1.7.3 Prophylaxe von Protheseninfektionen

Neben der Einhaltung der allgemeinen Prinzipien der Infektionsprophylaxe intra- und perioperativ gibt es die Möglichkeit der Antibiotikaprophylaxe. Hierbei muss wiederum zwischen einer systemischen und einer lokalen Applikationsform unterschieden werden. Diese können und sollen jedoch miteinander kombiniert werden.

1.7.3.1 Systemische Antibiotikaphylaxe zur Vermeidung von Protheseninfektionen

Durch Gewebegängigkeit in Weichteile und Knochen soll das intravenös applizierte Antibiotikum zum Zeitpunkt der größten Kontamination – nämlich intraoperativ – die Entstehung einer Infektion wirksam verhindern. Die meist gebrauchte Substanz hierfür ist Cefazolin (Marcelscu und Osmon, 2005), da es die folgenden Anforderungen an ein systemische Antibiotikaphylaxe erfüllt: gute Weichteil- und Knochengängigkeit, breites Wirtsspektrum – besonders gegen *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* – eine lange Halbwertszeit und eine gute Verträglichkeit (Alt und Schnettler, 2007; De Lalla, 2001). Im Falle einer Allergie wird die Verwendung von Clindamycin oder Vancomycin empfohlen (Bratzler und Houk, 2004; Breithaupt, 2004). Letzteres findet auch Anwendung zur Prophylaxe bekannter Besiedelung des Patienten mit *Staphylococcus aureus* Stämmen (Bratzler und Houk, 2004). Es sollte jedoch von der standardmäßigen Verwendung von Vancomycin Abstand genommen werden, um die Ausbildung von Resistenzen zu vermeiden. Zum anderen besitzen Cephalosporine und Penicillinase-feste Penicilline eine bessere Wirksamkeit gegenüber Staphylokokken (Cantoni et al., 1990; Fishman und Brennen, 1997). Um die Serumspitzenspiegel des Antibiotikums nutzen zu können, sollte es 20 Minuten präoperativ appliziert werden (Bratzler und Houk, 2004). Durch die viermalige Gabe des Antibiotikums am Operationstag können die besten Ergebnisse für die Langzeitüberlebensrate der Prothese mit der geringsten Revisionsrate – unabhängig vom Grund der Revision – erreicht werden (Engesaeter et al., 2003).

1.7.3.2 Lokale Antibiotikaphylaxe zur Vermeidung von Protheseninfektionen

Schon 1970 konnten Buchholz und Engelbrecht die Infektionsraten bei Hüftprothesenoperationen um die Hälfte senken, indem sie Gentamicin als Antibiotikum PMMA-Knochenzement beimischten. Wahlig und Dingeldein (1980) konnten im Folgenden zeigen, dass Gentamicin-beladener Knochenzement eine hohe lokale Konzentration des Antibiotikums erreichte, die systemischen Konzentrationen blieben jedoch niedrig. Damit war die Freisetzungskinetik von Gentamicin – mit einer hohen lokalen Wirksamkeit und einem niedrigen Risiko für systemische Komplikationen – der anderen getesteten Antibiotika überlegen, womit es zum Antibiotikum der Wahl für PMMA-Zement wurde.

Joseffson und Kolmert (1993) verglichen in einer prospektiven Multicenter-Studie aus Schweden Prothesenimplantationen mit einer systemischen Antibiose und einer

Kombination aus systemischer und lokaler Antibiose in Form eines Antibiotika-beladenen Knochenzements. Die Infektionsraten waren für die Kombination aus lokaler und systemischer Antibiose niedriger, jedoch zeigte nur die Daten fünf Jahre postoperativ eine statistische Signifikanz, die nach zehn Jahren nicht mehr bestand. Im Gegensatz hierzu blieben die signifikanten Unterschiede in einer Analyse aus dem norwegischen Hüftprothesenregister auch nach zehn Jahren bestehen. Das Risiko für eine Revisionsoperation war generell 1,4-fach höher. In Unterscheidung der Gründe für die Revision war das Risiko für eine Infektion 1,8-fach, das Risiko einer aseptischen Lockerung 1,3-fach erhöht, wenn statt einer Kombination aus systemischer und lokaler nur die systemische Applikationsform gewählt wurde (Engesaeter et al., 2003).

Noch vor zehn Jahren bestand in Europa Uneinigkeit über die Wirksamkeit von Antibiotika-beladenem Knochenzement (van de Belt et al., 2001). Durch die Daten von Engesaeter et al. (2003) ist die Verwendung von Antibiotika-PMMA-Knochenzement in Europa nun Standard für die Infektionsprophylaxe bei Prothesenprimärimplantation geworden. In den USA hingegen wird die Verwendung bei Primärimplantaten noch immer abgelehnt (Jiranek et al., 2006). In der zementfreien Technik der Prothetik besteht im klinischen Alltag derzeit keine Möglichkeit einer lokalen Anwendung von Antibiotika. Aus diesem Grund versucht man verschiedene Oberflächenbeschichtungen der Prothesen als Trägersubstanzen für die Antibiotika einzusetzen.

1.8 Gentamicin

Gentamicin gehört zur Gruppe der Aminoglykosid-Antibiotika. Das erste Aminoglykosid – Streptomycin – wurde 1944 entwickelt. Gentamicin selbst ist seit 1963 bekannt. Gentamicin wird aus *Micromonospora purpurea* gewonnen. Seine chemische Struktur besteht aus Aminozuckern, welche über glycosidische Bindungen mit den Hydroxylgruppen von Amino- oder Guanin-substituiertem Cyclohexanol verknüpft sind. In kristalliner Form resultieren die Hydrophilie und Stabilität aus den freien OH-Gruppen. Diese sind aber auch die Angriffsorte für inaktivierende Bakterienenzyme. Gentamicin ist farblos, gut wasserlöslich, lösungsstabil im pH-Bereich von 2,2 bis 10 und stabil bei Hitze und Kälte. Ein kurzfristiges Erhitzen auf über 100° C wird durch seine Thermostabilität toleriert. Gentamicin zeigt schon in sehr niedrigen Konzentrationen im aeroben, neutralen oder alkalischen Milieu eine bakterizide Wirksamkeit gegen ein breites Spektrum von Bakterien. Es hat einen raschen

Wirkungseintritt. Durch Kombination mit β -Lactam-Antibiotika kann eine synergistische Wirkungssteigerung erzielt werden. Gentamicin zeigt eine gute Wirksamkeit gegen *Staphylococcus aureus*, koagulasenegative Staphylokokken und einige der α -Streptokokken-Stämme. β -Streptokokken, Enterokokken und der größte Teil der anderen gram-positiven Bakterienarten sind hingegen nur mäßig sensibel bis resistent, wenn man den üblichen Grenzwert der mittleren Hemmkonzentration (MHK) von 4 $\mu\text{g/ml}$ zugrunde legt. Anaerobier sind resistent gegen Gentamicin, weil dessen Transport in die Bakterienzelle sauerstoffabhängig ist (Daschner, 2002; Strauss, 1999).

Die antimikrobielle Wirkung entsteht durch folgenden Mechanismus: Zunächst dringt das Antibiotikum in die Zelle ein und reichert sich dort an. Hiernach bindet es an die 30S-Untereinheit der bakteriellen Ribosomen und blockiert somit deren Akzeptorstelle und die Formylmethionyl-tRNA kann nicht binden. Zudem wird die Bindung der Aminoacyl-tRNA an das Ribosom verhindert und bereits bestehende Peptidketten werden nicht verlängert. Auch die Anlagerung des Antikodons der tRNA an das Kodon der mRNA wird gestört, woraus Ablesefehler bei der Translation resultieren. Infolge dieser Mechanismen entstehen fehlerhafte, so genannte „Nonsens“-Proteine.

Gentamicin kann wegen seiner starken kationischen Eigenschaften kaum nach oraler Einnahme aus dem Darm resorbiert werden, weshalb es parenteral oder lokal angewendet werden muss. Wie alle Aminoglykoside wird es nicht metabolisiert und kaum an Plasmaproteine gebunden. Es zeigt auch nur eine geringe Passage durch die Blut-Liquor-Schranke und penetriert nicht in den intrazellulären Raum. Die Eliminierung von Gentamicin erfolgt mittels glomerulärer Filtration über die Nieren. Die Halbwertszeit beträgt zwei Stunden. Gentamicin besitzt nur eine geringe therapeutische Breite. Es ist oto- und nephrotoxisch. Im Falle einer Plasmakonzentration von über 10 $\mu\text{g/ml}$ – durch Überdosierung oder Kumulation infolge einer Niereninsuffizienz – steigt das Risiko eines irreversiblen Innenohrschadens durch Ablagerung des Gentamicins in dessen Haarzellen an. Zur nephrotoxischen Wirkung kommt es durch Ablagerung der Substanz in der Nierenrinde. Eine Ablagerung in den proximalen Tubuluszellen ist jedoch meist reversibel. Weitere unerwünschte Wirkungen sind Atemdepression, Blutbildveränderungen, Muskelschwäche, Arthralgien, Fieber, Exanthembildung, neuromuskuläre Blockaden und eine vorübergehende Erhöhung der Leberenzymwerte. Allergische Reaktionen treten selten auf. (Daschner, 2002; Kayser et al., 2001) Die Häufigkeit der Komplikationen von Gentamicin-beladenem Knochenzement konnten bei niedriger systemischer Konzentration schon 1980 von Wahlig und Dingeldein als selten eingeschätzt werden.

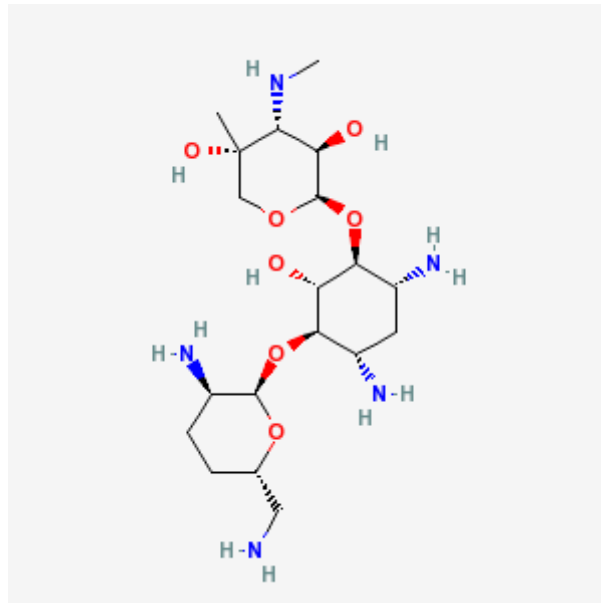


Abb. 1: Strukturformel des Antibiotikums Gentamicin. Aus: www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=Gentamicin (20.06.2010)

1.9 Problemstellung

Auch in der heutigen Zeit handelt es sich bei Protheseninfektionen um gefürchtete Komplikationen in der Unfallchirurgie und Orthopädie. Zur Prophylaxe wurden verschiedene Strategien entwickelt, wie die systemische und lokale Applikation von Antibiotika. Im klinischen Alltag ist die lokale Antibiotikaprophylaxe bislang nur in der zementierten Endoprothetik durch die Beimengung von Antibiotika zum Knochenzement möglich. In der zementfreien Endoprothetik existiert eine solche Möglichkeit bislang nicht. Ein möglicher Ansatz hierfür in der zementfreien Endoprothetik ist, die Prothesenoberfläche mit Antibiotika zu beschichten. Vor kurzem konnte für eine Hydroxylapatit(HA)-Gentamicin-Kombinationsbeschichtung eine signifikante Reduktion von Infektionsraten in einem Kaninchenmodell bei Implantat-assoziierten Infektionen im Vergleich zu reinen HA-beschichteten K-Drähten gezeigt werden (Alt et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurden das knöcherne Einwachsverhalten und die Biokompatibilität einer HA-Gentamicin-Kombinationsbeschichtung mit einer reinen HA-Beschichtung verglichen. Hierzu werden K-Drähte mit den Beschichtungen HA und HA+Gentamicin am Kaninchenmodell zu verschiedenen Zeitpunkten unbeschichteten K-Drähten gegenüber gestellt, um Biokompatibilität und Knochenneubildung zu vergleichen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Implantate und Beschichtungstechnologien

2.1.1 Implantate

Sämtliche Implantate wurden von der Firma Biomet, Berlin, zur Verfügung gestellt. Die Herstellung der Gentamicin-Beschichtung wurde ebenfalls durch die Firma Biomet vorgenommen.

2.1.2 Kirschner-Drähte

Bei den Implantaten handelt es sich um Kirschner-Drähte (K-Drähte) aus rostfreiem Implantatstahl (1.4441:X2CrNiMo 18-15-3), die einen Durchmesser von 2 mm besaßen und 11 cm lang waren. Die K-Drähte hatten auf der einen Seite eine Trokar-Spitze und ihre Oberfläche wurde durch Sandstrahlung aufgeraut (EK54). Sie dienten als Basisimplantate für die weitere Beschichtung (Abbildung 2).



Abbildung 2: Beschichtete Kirschner-Drähte. Oben: HA, unten: HA + Gentamicin

2.1.3 BoneMaster Hydroxylapatit-Beschichtung (C1)

Das Hydroxylapatit wurde durch ein elektrochemisches Verfahren auf die K-Drähte aufgebracht. Um das Implantat mit Hydroxylapatit zu beschichten, wurde es kathodisch in einem $\text{Ca}^{2+}\text{H}_x\text{PPO}_4(3-x)^-$ -enthaltenden Elektrolyt (0,033 M CaCl_2 und 0,02 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, verdünnt in Wasser 1:20) depolarisiert, wobei ein pH von 6,4 und eine Temperatur von 37° Celsius vorherrschte. Für einen Zeitraum von bis zu 120 Minuten

lief der Prozess unter galvanostatischen Bedingungen ab. Hierbei bestanden Stromdichten bis zu -10 mA/cm^2 .

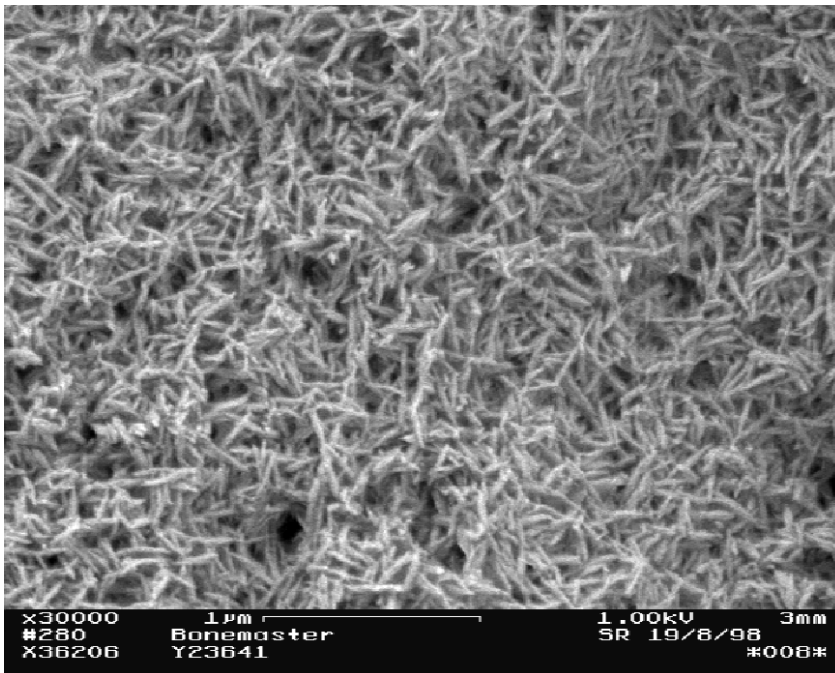


Abbildung 3:
Hydroxylapatitbeschichtung
(Referenz: Roessler et al.,
2003)

Die Hydroxylapatitschicht war maximal $5 \mu\text{m}$ dick und zeigte unter dem Elektronenmikroskop eine nadelartige Morphologie, die durch Kristallite mit typischen Längen von 300 nm und Durchmessern von 60 nm gebildet wurde (**Abbildung 3**).

2.1.4 Gentamicin-Beschichtung (T1)

Auf die Implantate der Gruppe T1 wurde zusätzlich zu dem Hydroxylapatit noch eine Gentamicin-Beschichtung aufgebracht. Durch ein so genanntes Ink.-Jet Verfahren wurde das Antibiotikum Gentamicin tropfenweise aufgetragen. Dieses hat den Vorteil, dass das Tropfenvolumen genau eingestellt werden konnte und somit die gewünschte Schichtdicke auf dem Implantat erreicht wird. Die Belegungsdichte auf dem K- Draht betrug $250 \mu\text{g/cm}^2$. Die Zusammensetzung des aktiven Gentamicins bestand zu 50% aus einer Schicht schwer wasserlöslichen Gentamicincrobenfats (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), welches eine langsame Freisetzungsrage zeigt, und zu weiteren 50% aus einer Schicht leicht wasserlöslichen Gentamicinsulfats (Fujian Fukang Pharmaceutical, Fuzou, China), das eine schnelle Freisetzungsrage aufweist.

2.2 Studiendesign

2.2.1 Ethikkommissionsvotum

Das Versuchsvorhaben wurde nach § 8 Absatz 1 und 2 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18.08.1996 beim zuständigen Regierungspräsidium in Erfurt, Thüringen, angezeigt und von diesem in der vorgelegten Fassung genehmigt (Registrationsnummer: 14-03/04).

Das Versuchsvorhaben erfolgte in der Tierklinik für Groß- und Kleintiere des fzmb e.V. in Bad Langensalza. Die Aufarbeitung der Proben und Auswertung der Ergebnisse fand im Labor für Experimentelle Unfallchirurgie der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen statt.

2.2.2 Studiendesign

In dieser Studie sollen die Biokompatibilität und die knöchernen Integration verschiedener Beschichtungen für Endprothesen ermittelt werden. Dazu wurden die oben beschriebenen K-Drähte in die Tibiae von Kaninchen eingebracht. Nach entweder 4 oder 12 Wochen wurden die Tiere euthanasiert, die Tibiae entnommen und zu histologischen Präparaten aufgearbeitet. Diese wurden zum einen qualitativ untersucht und beschrieben und zum anderen erfolgten quantitative Messungen der Knochenneubildung.

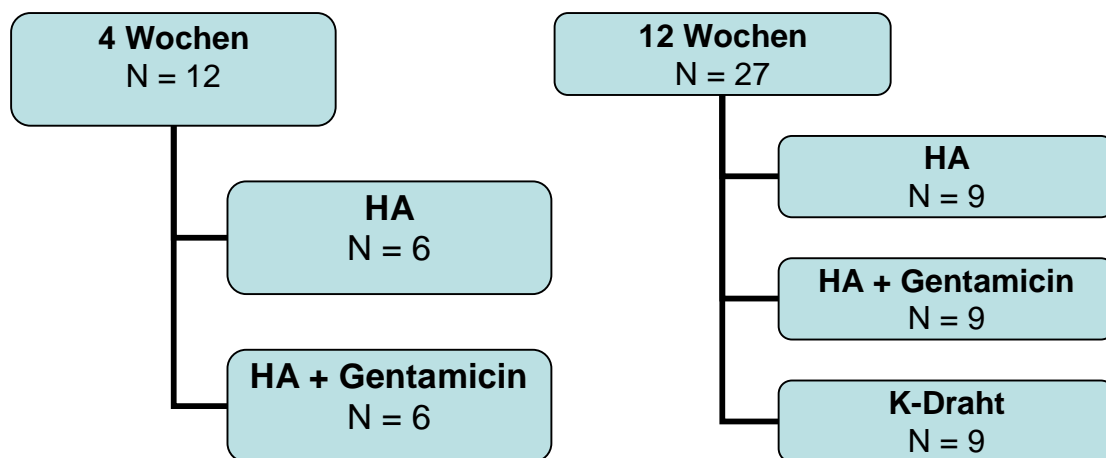


Abbildung 4: Studiendesign mit 2 Standzeiten und einer Beobachtungszeit von 4 bzw. 12 Wochen

2.2.3 Versuchstiere und ihre Unterbringung

Bei den Versuchstieren handelte es sich um 39 Jungtiere der Rasse New Zealand White Rabbits. Die Tiere wurden in der Kleintierzuchtanlage R. Krieg, Wünsch, aufgezogen. Das Gewicht der Jungtiere betrug durchschnittlich 3600 Gramm (2840g bis 4200g). Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Versuche etwa drei Monate alt.

Die Unterbringung und Pflege der Tiere erfolgte in der Tierklinik für Groß- und Kleintiere des fzmb e.V., Bad Langensalza. Sie wurden zwei Wochen vor Versuchsbeginn in einen Laufstall mit Einstreu eingestallt, damit sie sich an ihre neue Umgebung gewöhnen konnten. Während dieser Zeit wurde bei keinem der Tiere eine akute oder chronische Erkrankung beobachtet. Die Kaninchen erhielten täglich Wasser ad libitum, 300g Kaninchenstandartfutter und Heu in ausreichender Menge, wobei die Ernährung ohne Zugabe von Antibiotika erfolgte.

Jeden Tag wurde die regelrechte Nahrungsaufnahme der Tiere, sowie ihr Gewicht, ihre Körpertemperatur, ihre allgemeine Aktivität, wie auch die Wundheilung kontrolliert.

2.2.4 Randomisierung der Tiere

In der ersten Versuchsreihe wurden die Tiere entsprechend der zu testenden Beschichtungen HA und HA-Gentamicin in zwei Gruppen zu je sechs Tieren unterteilt.

Die zweite Versuchsreihe mit der Standzeit von drei Monaten beinhaltete 27 Tiere. Jeweils neun Tiere erhielten HA-beschichtete, HA-Gentamicin beschichtete beziehungsweise komplett unbeschichtete K-Drähte.

Zur Randomisierung der Tiere wurde eine durch einen Zufallsgenerator erstellte Randomisierungstabelle verwendet.

2.2.5 Anästhesie

Sowohl die Durchführung der Anästhesie als auch die perioperative Überwachung wurde von einer Tierärztin durchgeführt und überwacht. Da die Dauer der Operation etwa 20 bis 30 Minuten betrug war eine Injektionsnarkose ausreichend.

Zunächst erfolgte für die Narkose eine anticholinerge Prämedikation mit 0,1 mg/kg Atropin. Die für die präoperativ durchgeführte Röntgenuntersuchung notwendige Analgosedierung erfolgte durch die intramuskuläre Injektion von Ketanest® (Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe). Jedoch wurden nur die Tiere der ersten Versuchsreihe präoperativ geröntgt. Die Operation wurde in einer Injektionsnarkose durchgeführt, bei der nochmals Ketanest® in der Dosierung 60mg/kg KG und zudem das Hypnotikum Xylazin® (Rompun®, Bayer, Leverkusen) in der Dosierung 6 mg/kg KG, sowie Atropin® (Braun, Melsungen) in der Dosierung 0,1 mg/kg KG intramuskulär injiziert wurde.

2.2.6 Operationsvorbereitung

Um den operativen Eingriff vorzubereiten, wurden die anterolaterale Tibiafläche und die Knieregion des rechten Hinterlaufs der Kaninchen mit einer elektrischen Schermaschine geschoren. Auf dem Operationstisch wurden sterile Einmaltücher ausgelegt, worauf das Kaninchen gelagert wurde. Anschließend wurde das Operationsfeld am Kaninchen Unterschenkel mit Braunovidon® (Braun, Melsungen) desinfiziert. Das Areal um das Operationsfeld herum wurde mit sterilen Tüchern abgedeckt. Um eine Kontamination zu verhindern wurde auf eine absolute Sterilität bei sämtlichen Eingriffen geachtet.

(Abb. 5a)

2.2.7 Implantation der Kirschner-Drähte

Die Operationen wurden in einem tierklinischen Operationssaal unter sterilen Bedingungen und Vollnarkose durchgeführt.

Zunächst erfolgte ein etwa 1 cm langer Hautschnitt infrapatellar mit einem Skalpell, wodurch das Ligamentum patellae zur Darstellung kam. Hiernach wurde dieses in Längsrichtung gespalten. Die tibiale Markhöhle wurde mit Hilfe eines Pfriems durch langsames Drehen unter Druckausübung eröffnet (**Abb. 5b**). Durch diese Öffnung wurde der Kirschner-Draht in den Markkanal bis zu dessen Ende intramedullär vorgeschoben (**Abb. 5c**). Hiernach wurde das überstehende Ende des Drahtes auf Höhe der Kortikalis mittels einer Zange gekürzt, so dass er vollständig im Kanal versenkt war. Die korrekte intramedulläre Lage des Drahtes wurde mittels

Röntgenaufnahme im lateralen Strahlengang überprüft. Nun wurde die Wunde mit NaCl gespült. Zunächst wurde das Peritendineum des Ligamentum Patellae und anschließend die Haut genäht (**Abb. 5d**). Die Wunde wurde zusätzlich geklammert und mit Sprühpflaster versorgt. Postoperativ war auf Grund der stabilen Verhältnisse bei allen Tieren die volle Belastbarkeit ihrer operierten Extremitäten gegeben.

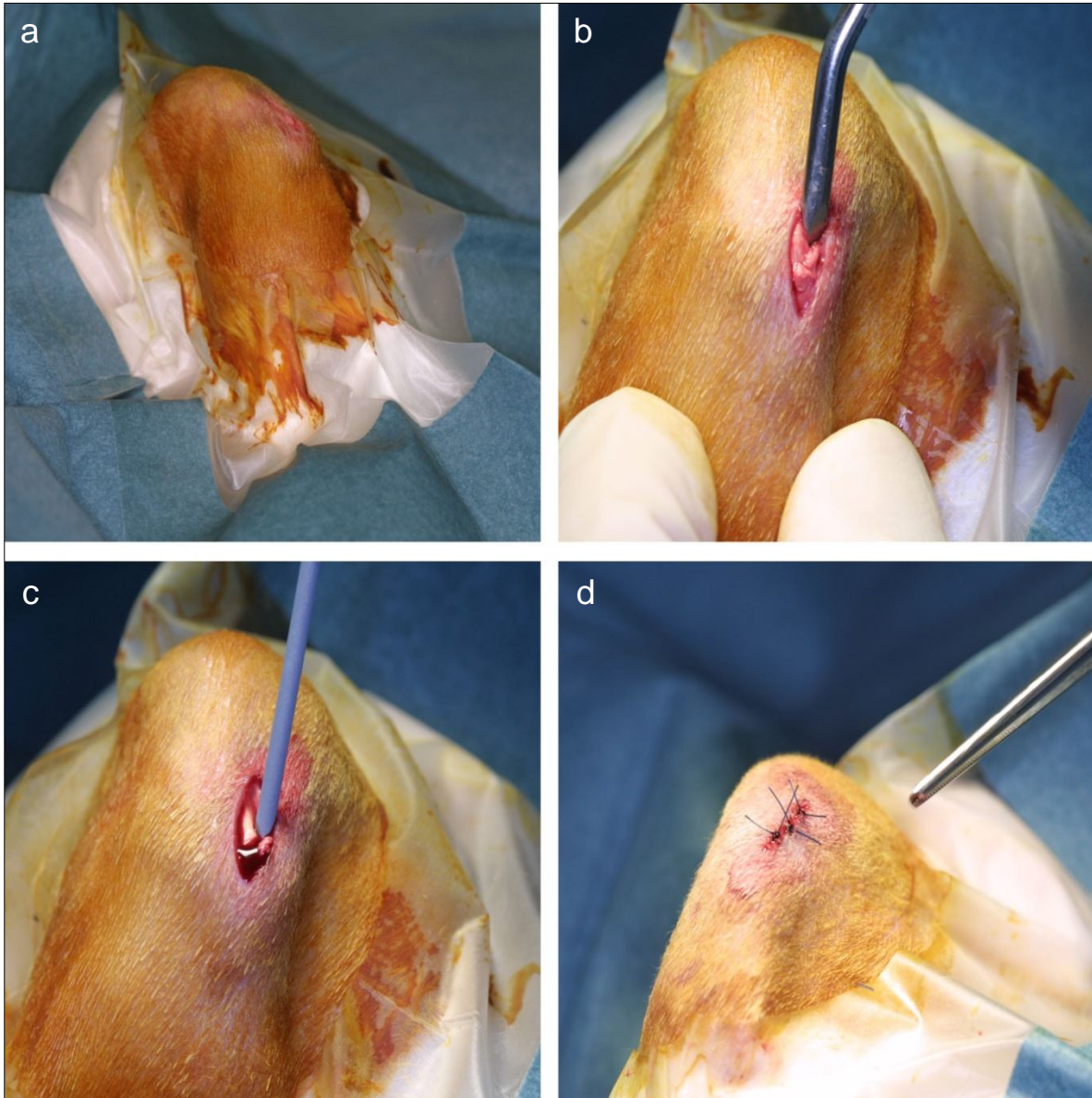


Abbildung 5a: Steril abgedecktes Operationsfeld. **5b:** Eröffnung der Markhöhle mit einem Pfriem. **5c:** Einbringen des Kirschner-Drahtes. **5d:** Verschluss der Wunde mittels Hautnaht.

2.2.8 Postoperative Maßnahmen

Zunächst wurde bei jedem der Tiere eine Röntgenkontrolle durchgeführt, um die ordnungsgemäße Lage der Implantate nachzuweisen.

Bis zum Erwachen aus der Narkose wurden die Tiere unter einer Wärmelampe liegend überwacht. Nachfolgend wurden sie wieder in ihre Boxen gebracht und mit Nahrung versorgt. Um den zu erwartenden Wundschmerz zu therapieren, erhielten die Tiere 0,4 mg/kg KG Carprofen s.c. zur Analgesie.

Der klinische Zustand der Tiere wurde durch eine Tierärztin während der gesamten Dauer der Versuche nach einer eventuell verminderten Futteraufnahme, Apathie und mangelnde Belastung der operierten Extremität täglich überwacht und dokumentiert. Auch die Wundheilung wurde beobachtet.

2.2.9 Euthanasie

Die Euthanasie erfolgte, je nach Versuchsreihe, nach vier oder zwölf Wochen durch eine Tierärztin. Die Tiere erhielten vor der Tötung, die durch die intrakardiale Injektion von 4-5 ml T61[®] (Hoechst Veterinär, Unterschleißheim) erfolgte, erneut Ketanest[®] zur Analgosedierung (siehe oben).

2.2.10 Probenentnahme und Fixierung des Gewebes

Zunächst erfolgte die klinische Inspektion der Tibia. Nachfolgend wurde die Tibia entnommen und direkt nach Explantation in 4%ige Paraformaldehyd (PFA) – Lösung gebracht. In diesem Medium wurde sie für vier Wochen belassen. Anschließend wurde die Tibia mitsamt dem einliegenden K-Draht mit einer Bandsäge in einen proximalen, einen distalen und einen diaphysären Teil zerteilt. Die beiden metaphysären Abschnitte wurden zu einem Transversal- der diaphysäre Teil zu einem Längsschnitt weiter verarbeitet.

2.3 Auswertung der Versuche

2.3.1 Herstellung der histologischen Präparate

Die Präparate wurden mit der Trenn-Dünnschliff-Technik nach K. Donath (1982) aufbereitet, die im Folgenden erläutert wird. Hierbei handelt es sich um eine Methode, mit der man dünne Schliffe unter 10 µm von nicht schneidbaren Geweben, wie z.B. zahntragenden Kieferabschnitten mit Füllungen, Kronen und Brücken, dicke Kortikalis oder eben auch implantattragende Röhrenknochen, herstellen kann. Dieses erfolgte, ebenso wie die Auswertung der Proben, im Laboratorium für Experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität in Gießen.

Entwässerung und Infiltration

Zunächst wurden die unentkalkten Probenstücke in die aufsteigende Alkoholreihe überführt. Die Entwässerungszeiten der einzelnen Stufen sind abhängig von der Gewebescheibendicke. In diesem Fall verblieben die Proben jeweils 48 Stunden in den verschiedenen Konzentrationen.

Ethanol-Konz (%)	70%	80%	96%	100%	100%	100%
Zeit	2d	2d	2d	2d	2d	2d

Tab. 1: Entwässerungsplan

Anschließend wurden sie in dem Entwässerungssystem 510 (Entwässerungs- und Infiltrationsautomat, EXAKT Apparatebau, Norderstedt) für jeweils 48 Stunden in Technovit®/reinem Ethanol, die in den Mischverhältnissen 30%/70%, 50%/50%, 70%/30% und 100%/0% vorlagen, infiltriert. Für weitere neun Tage wurden die Proben mit Technovit 7200 VLC® mit 1% Dibenzoylperoxid (Exakt-BPO Penetrationsbeschleuniger, Heraeus-Kulzer, Wehrheim) infiltriert.

Infiltrationslösung	Technovit®/ Ethanol 30%/70%	Technovit®/ Ethanol 50%/50%	Technovit®/ Ethanol 70%/30%	Technovit®/ Ethanol 100%/0%
Zeit	2d	2d	2d	2d

Tab. 2: Kunststoffinfiltration

Ausblocken und Polymerisation

Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Gewebeproben mit dem Fixationskleber Technovit 7230 VLC[®] (Heraeus-Kulzer, Wehrheim) in den Einbettmulden der Formen entsprechender Größe fixiert, damit sie sich nicht von der Bodenplatte abheben konnten. Daraufhin werden sie mit Technovit 7200 VLC[®] (Heraeus-Kulzer, Wehrheim) mit 1% BPO blasenfrei überschichtet. Hierbei handelt es sich um einen flüssigen lichthärtenden Einkomponentenkunststoff auf Methylmethacrylatbasis.

Die nachfolgende Polymerisation ist in zwei Stufen untergliedert. Das Präparat wurde zur Vorpolymerisation für zwei Stunden mit Gelblicht aus dem Lichtpolymerisationsgerät Histolux (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) bestrahlt. Hierbei wird ein großer Abstand zum Präparat gewählt, um die Polymerisation langsam einzuleiten und Spannungsrisse zu vermeiden. Die endgültige Polymerisation erfolgte durch Blaulichtbestrahlung über vier Stunden, ebenfalls im Lichtpolymerisationsgerät Histolux (EXAKT Apparatebau, Norderstedt). Hiernach mussten die Blockoberflächen 16 Stunden lang in einem Wärmeschrank mit einer Innentemperatur von 40° Celsius aushärten. Die nachfolgende Abkühlung der Präparate auf Raumtemperatur musste hierbei langsam erfolgen um Spannungsrisse zu vermeiden.

Blockvorbereitung und Kleben

Der polymerisierte Gewebeblock wird nun aus der Einbettform genommen und so angeschliffen, dass die histologisch zu untersuchende Fläche an die Oberfläche gebracht wird. Dazu wurde die Gegenseite auf Plexiglasobjektträger geklebt und mit Hilfe der Vakuum-Klebeeinrichtung (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) angepresst. Nachfolgend wurde die Oberseite der Blöcke mit Hilfe des EXAKT-Mikroschleifsystems[®] angeschliffen und poliert, bis das Technovit 7230 auf der Präparatoberfläche vollständig entfernt war und alle zu untersuchenden Gewebeabschnitte des Präparates frei lagen. Wichtig ist hierbei, dass eine Parallelität zwischen Schleifoberfläche und Plexiglasobjektträger besteht und dass die Präparatoberfläche frei von Unebenheiten ist. Diese Planparallelität wurde mit der Mikrometerschraube ermittelt.

Auf diese angeschliffene Fläche wurde ein Glasobjektträger mit dem Technovit 7210 VLC Präzisionskleber (Heraeus-Kulzer, Wehrheim) und mit Hilfe der Vakuum-Klebeeinrichtung (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) aufgeklebt. Es kam nach etwa zwei bis fünf Minuten zur gleichmäßigen Verteilung des Klebers im Klebspalt, woraufhin die Lampe für die Photopolymerisation eingeschaltet werden konnte. Diese

war nach etwa zehn Minuten abgeschlossen. Nachfolgend wurde die Klebestärke ermittelt.

Herstellung des endgültigen Präparates

Das so entstandene Präparat-Objektträger-Sandwich wurde in das EXAKT-Trennschleifsystem (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) eingespannt, um mit dem wassergekühlten und diamantbeschichteten Trennband etwa 100 µm dicke, dem Glasobjektträger anhaftende, Präparatscheiben zu schneiden. Die Schnittdicke errechnet sich aus der Gesamtdicke des zu schleifenden Schleifpräparates abzüglich der Objektträger- und Klebestärke. Diese wurden nun mit dem EXAKT-Mikroschleifsystem® abgeschliffen und poliert, bis sie die gewünschte Schichtdicke von 5 µm erreicht hatten. Das Gerät besteht aus einem Schleifteller, der als Träger für Sandpapierscheiben dient und dessen Umdrehungszahl reguliert werden kann. Die Dicke der Präparate wurde mit der Mikrometerschraube kontrolliert.

Färbung

Von jedem Versuchstier wurden Schnitte der proximalen und der distalen Diaphyse der Tibia, sowie ein Längsschliff angefertigt, die jeweils mit Toluidinblau, dessen Metachromasie Aussagen über Knochenan- und -umbauvorgänge erlaubt, und Haematoxylin-Eosin angefärbt wurden.

Toluidinblau

Mit Hilfe der Färbung mit Toluidinblau können durch die Metachromasie Aussagen über die Knochenan- und -umbauprozesse gemacht werden. Metachromasie heißt, dass sich eine Struktur aufgrund ihres Bauprinzips in einer von dem angewandten Farbton abweichenden Nuance anfärbt.

Durchführung:

- Anätzen des Schliffes mit 10%igem H₂O₂ für einen Zeitraum von 10 Minuten
- Abspülen des Objektträgers mit Aqua dest.
- 15 Minuten Färben mit Toluidinblau
- Abspülen in Leitungswasser
- Schliff Trocknen und Differenzieren des Schliffes mit Aceton-Alkohol
- Eindecken des Schliffes

Färbeprinzip: Toluidinblau gehört zur Gruppe der Thiazinfarbstoffe. Es kommt in saurem Milieu (pH 4) zu einer elektropolaren Anlagerung des basischen Farbstoffes an die sauren Gruppen der Nukleinsäuren. Da der Farbstoff gut alkohollöslich ist, erfolgt die Differenzierung in Aceton-Alkohol.

Färbeergebnis Toluidinblau: mineralisierte Hartgewebematrix ungefärbt bis blassblau; Zellen und Weichgewebe blau; Knorpelsubstanz metachromatisch bis rotviolett; verkalkte Knochenmatrix dunkelblau.

Haematoxylin-Eosin (HE)

Diese Färbung gehört zur Gruppe der Übersichtsfärbungen. Sie ist eine der am häufigsten benutzten Kernfarbstoffe. Die Substanz muss erst durch Oxidation in den richtigen Farbstoff Hämatein überführt werden.

Durchführung:

- Anätzen des Schliffes mit 10%igem H_2O_2 für einen Zeitraum von 10 Minuten
- Abspülen des Objektträgers mit Aqua dest.
- 5 bis 10 Minuten Färben mit Hämalaun
- 1 Minute Schwenken in Essigwasser (1ml auf 100 ml Aqua dest.)
- 10 Minuten Bläuen in Leitungswasser
- 1 Minute Färben in Eosin
- Abspülen des Schliffes
- Trocknen des Schliffes
- Eindecken des Schliffes

Färbeprinzip: Das Hämatoxylin ist ein saurer Farbstoff und besitzt positive Ladungen. Diese lagern sich an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA des Zellkerns (Chromatin) an. Die tiefblaue Färbung der Kerne wird durch das Bläuen, das heißt die Einstellung des pHs auf < 3 , erreicht.

Eosin ist negativ geladen und bindet deshalb an die positiven Gruppen von beispielsweise Eiweißen mittels elektrostatischer Adsorption. Er ist sehr gut wasserlöslich und schwach sauer und wird gewöhnlich in mit Eisessig angesäuerter wässriger Lösung benutzt.

Färbeergebnis Haematoxylin-Eosin: Zellkerne, Kalk, Knorpelgrundsubstanz und grampositive Bakterien blau; Zytoplasma, Kollagenfasern, Bindegewebe und Erythrozyten rot.

Eindecken der Schliffe

Das Präparat wird in trockenem und entstaubtem Zustand mit einem Deckglas und Technovit 7200 ohne BPO festgeklebt, welcher zunächst drei Minuten mit Blaulicht polymerisiert wurde.

2.4 Histomorphometrische Auswertung

Zur Bestimmung der Knochenneubildung und des direkten Knochen-Implantat-Kontaktes erfolgte die semi-quantitative histomorphometrische Auswertung. Die Bearbeitung und Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm Image Pro[®] Plus (Version 4.5; Media Cybernetics, Inc. Silver Spring, MD 20910, USA). Hierbei wurden die einzelnen Schliffe der transversalen metaphysären Bereiche und der Diaphyse in beiden Färbungen (HE und Toluidin) beurteilt. Im ersten Schritt wurde von jedem histologischen Schnitt ein Foto mit dem Stereomikroskop Stemi SV 11[®] angefertigt und auf den PC übertragen. Der Zoombereich des Mikroskops lag bei 0,6x bis 6,6x (11:1). Es besaß einen verstellbaren Tisch, wodurch die Lage des Präparates stetig korrigiert werden konnte. Die Genauigkeit der Schärfenebene konnte über einen installierten Grob- und Feintrieb erhöht werden. Zur Flächenmessung wurde das Objektiv Achromat S[®] (Carl Zeiss Mikroskopie, Jena) mit einem Vergrößerungsfaktor von 0,4 und einem Arbeitsabstand von 250 mm verwendet. Das Gerät nahm die Farbkorrektur automatisch vor. Das Objektiv, welches für die Längenmessung verwendet wurde war das Planchromat S[®], welches einen Vergrößerungsfaktor von 1,0 besaß. Für die einzelnen Zoombereiche musste eine darauf abgestimmte Kalibrierung verwendet werden, um die Daten in der gleichen Einheit zu erhalten. Der Zoombereich wurde hierbei so gewählt, dass das Implantat vollständig und ein Bereich von Knochenmarkhöhle und Endost dargestellt werden konnten. Bei den proximalen Schnitten betrug Zoombereich und Kalibrierung 5, bei den Längsschnitten 2 und bei den distalen Präparaten 3,2.

Für die histomorphometrische Erfassung erfolgte die Rotmarkierung des Knochengewebes mit Image Pro[®] Plus. Gewebe mit ähnlichen Farbnuancen, wie proliferierendes Bindegewebe, musste selektiv mit dem Programm Photoshop[®] (Adobe,

San Jose, USA) überarbeitet werden, wobei dezidiert darauf geachtet wurde, dass hierbei kein Knochengewebe entfärbt wurde.

2.4.1 Semiquantitative Bestimmung der Knochenneubildung

Die semiquantitative Bestimmung der Knochenneubildung in der Umgebung des Implantates erfolgte, um die knöchernen Integration des Implantates zu beurteilen. Im ersten Schritt wurde eine „Region of Interest“ (ROI) definiert. Der in diesem Areal neugebildete Knochen wurde erfasst. Die Ergebnisbeschreibung erfolgte prozentual in Knochenneubildung in mm^2/ROI in mm^2 . Die Abstände wurden so gewählt, dass ein möglichst großer Bereich um das Implantat herum beurteilt werden konnte, ohne das Endost mit einzubeziehen, da nur neu entstandener Knochen gemessen werden sollte. Als Radius dieser kreisrunden ROI wurde für die proximale Metaphyse 1,5 mm gewählt. Der Flächeninhalt des ROI betrug $7,1 \text{ mm}^2$. Hiervon musste die Fläche des Implantates selbst ($3,1 \text{ mm}^2$) abgezogen werden. Die nun auf neugebildeten Knochen zu untersuchende ringförmige Fläche hatte somit einen Inhalt von $4,0 \text{ mm}^2$. Im Bereich der distalen Diaphyse wurde ein Radius von 1,2 mm definiert, so dass die ringförmige Fläche um das Implantat herum $1,49 \text{ mm}^2$ betrug. (**Abb. 6**)

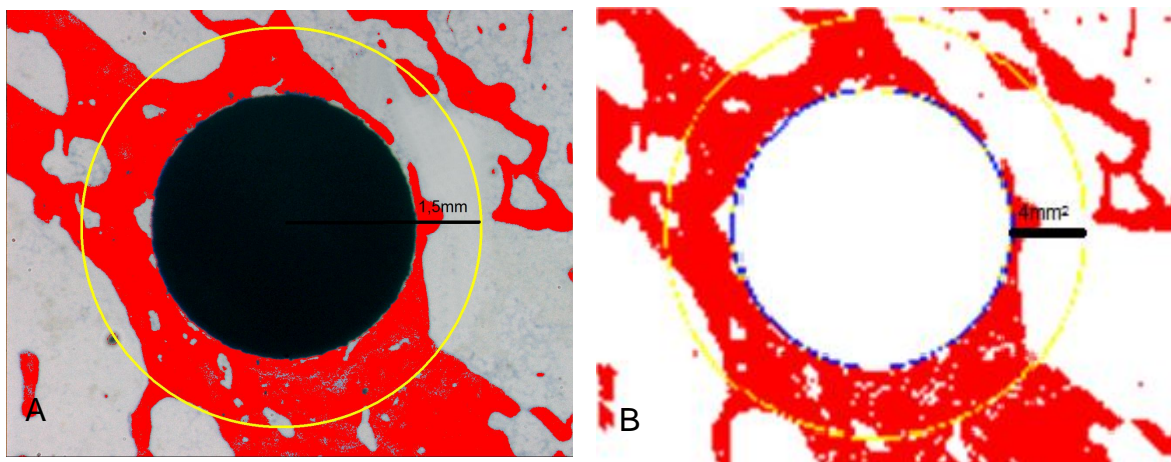


Abbildung 6: Darstellung der Technik der Histomorphometrie der Knochenneubildung bei Querschnittpräparaten. Toluidin-Dünnschliff. In beiden Bildern stellt sich der rot markierte Knochen dar (A). Der gelbe Kreis zeigt die ROI, die mit einem Radius von 1,5 mm um das Implantat herum gewählt wird. Dann wurde die Fläche des Implantates heraus gerechnet und die Fläche zwischen dem gelben und blauen Kreis beinhaltet den zu beurteilenden neugebildeten Knochen (B).

Die Flächen der diaphysären Schliffe waren nicht kreisrund und hatten nicht den genau gleichen Flächeninhalt bei allen Schliffen. Der Abstand von 0,5 mm wurde ober- und unterhalb des Implantates gemessen. (**Abb. 7**)

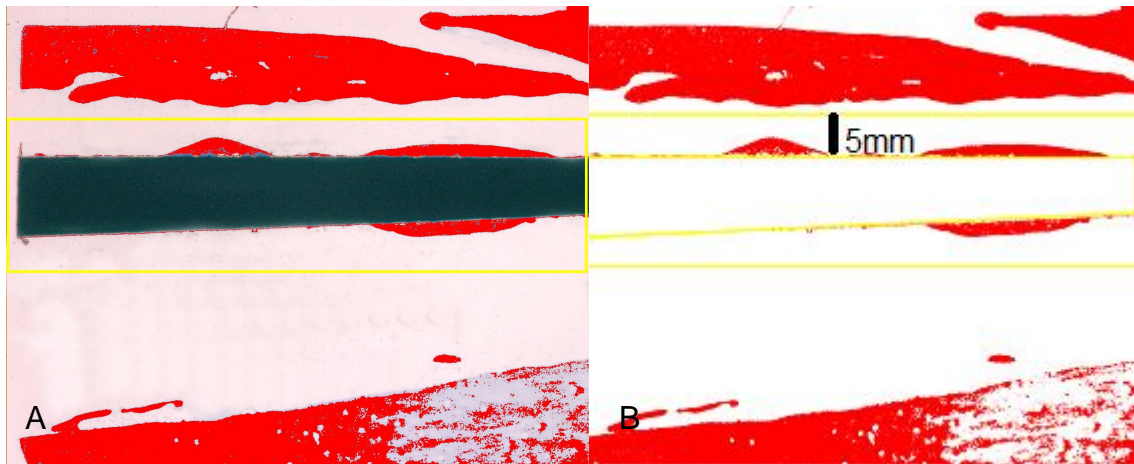
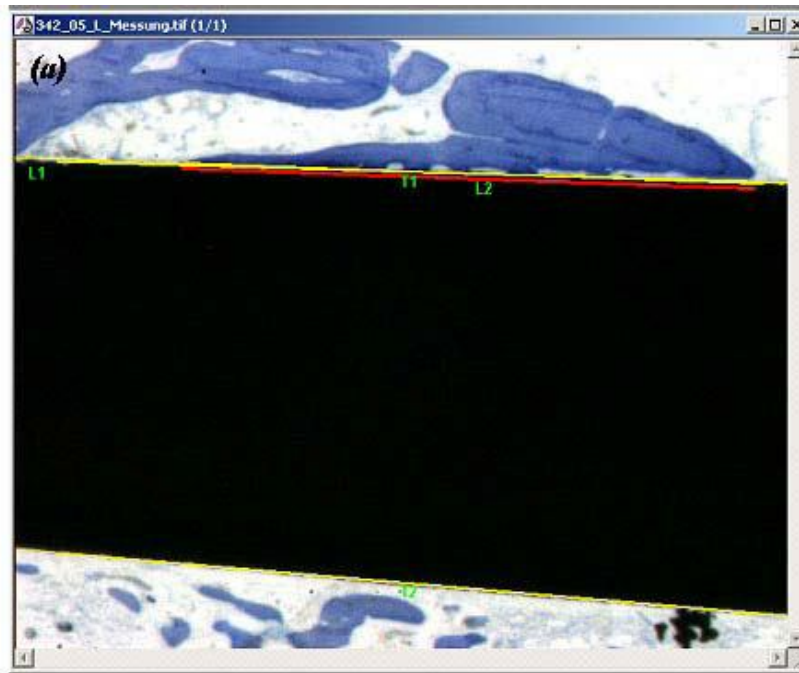


Abbildung 7: Darstellung der Technik der Histomorphometrie zur Bestimmung der Knochenneubildung bei Längsschnittpräparaten. ROI wird mit einem Abstand von 0,5 mm zum Implantat gewählt (A). Die Implantatfläche wird davon subtrahiert, so dass die Fläche für die Knochenneubildung zwischen Implantatrand und äußerem ROI-Rand liegt (B).

2.4.2 Semiquantitative Bestimmung des Knochen-Implantat-Kontaktes

Zur Bestimmung des Knochen-Implantat-Kontaktes wurde ein anderes Objektiv verwendet als bei der Flächenmessung, um die Adhäsionen besser beurteilen zu können. Hierbei handelte es sich um das Planchromate S[®] (Carl Zeiss, Jena; 1,0x). Um die ganze Länge des Schliffes erfassen zu können, wurden mehrere Fotos angefertigt, in denen die Längen einzeln ermittelt wurden. Hieraus wurde jedoch ein Gesamtwert für den jeweiligen Schliff ermittelt, der dann in die Bewertung mit einging. Gemessen wurde die Länge des neugebildeten Knochens, welcher maximal einen Abstand von 0,05 mm vom Implantat hatte. Um auch hier wieder einen Prozentwert ermitteln zu können wurde diese Länge mit der Gesamtlänge des Implantates ins Verhältnis gesetzt. **(Abb. 8)**



(b)

Features Measurements Input/Output Options Advanced Opt.					
	Features	Center X Pos.	Center Y Pos.	Area	Length
1	T1	2,125205	,7248762		4,318650
2	T2	2,121910	3,001646		4,385428
3	L1	,0395387	,6556835		,0856671
4	L2	2,514002	,7380558		3,158734

Abbildung 8: Darstellung der Technik der Histomorphometrie zur Bestimmung des direkten Knochen-Implantat-Kontaktes. Die roten Linien (L1 und L2) stellen den direkten Kontakt zwischen Knochen und Implantat dar, die gelben Linien (T1 und T2) die Länge des Implantates (a). Die exakte Vermessung erfolgte mittels Image Pro Version 4.5 exakt (b).

2.4.3 Semiquantitative Bestimmung der Anzahl der Fremdkörperriesenzellen

Die Bestimmung der Anzahl der multinukleärer Fremdkörperriesenzellen erfolgte, um dadurch Rückschlüsse auf eine potentielle Fremdkörperreaktion auf die Implantate bzw. auf die Beschichtungen zu gewinnen (Gottlander et al., 1997).

Für diese Untersuchung dienten die Längsschnitte des Tibiaschaftes als Grundlage. Die Auswertung des Knochenmarks erfolgte durch eine gitterförmige Zählkammer im Okular eines Axioskop 2 Plus Mikroskops (Carl Zeiss, Jena). Gezählt wurden bei 200facher Vergrößerung alle Zellen mit mehr als drei Zellkernen, die vollständig innerhalb der Zählkammer lagen. Neugebildeter Knochen ging nicht in die Bewertung mit ein. Die Gesamtzahl der Fremdkörperriesenzellen wurde durch den dazugehörigen Oberflächeninhalt dividiert. So konnte eine Durchschnittszahl von Fremdkörperriesenzellen/mm² berechnet werden.

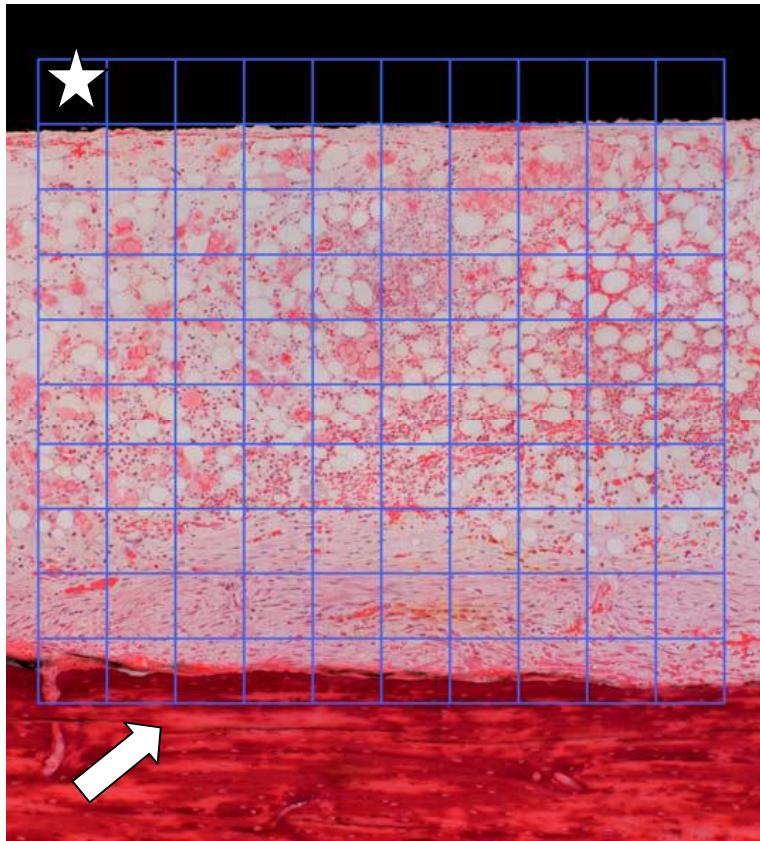


Abbildung 9: Technik zur Bestimmung der Anzahl der Fremdkörperriesenzellen bei Längsschnitten aus dem Schaftbereich. Innerhalb einer netzförmigen Zählkammerstruktur wurden zwischen der Implantatoberfläche (Stern) und dem koritkalem Knochen (Pfeil) alle Zellen mit mehr als drei Zellkernen erfasst. Nur Kästchen, die in Gänze innerhalb des Knochenmarkraums lagen und keinen Kontakt zur Implantatoberfläche oder koritkalem Knochen hatten, wurden berücksichtigt.

2.4.4 Statistische Berechnungen zur Histomorphometrie

Es erfolgte eine deskriptive Darstellung der Knochenneubildungen und des Knochen-Implantatkontaktes, wobei diese jeweils unterteilt nach Schnitt, Untersuchungszeitpunkt und Behandlungsmethode beurteilt wurden. Es wurde, in Anlehnung Rammelt et al. (2006), die Normalverteilung angenommen, da eine eigene Beurteilung der Verteilungsform bei dem recht kleinen Stichprobenumfang nicht möglich war. Mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse und paarweisen Kontrasten wurden die Unterschiede zwischen den zwei Untersuchungszeitpunkten bzw. den unterschiedlichen Behandlungsmethoden verifiziert. Es handelt sich um eine explorative Datenanalyse. Im Ergebnisteil werden die Irrtumswahrscheinlichkeiten für den Fehler der 1. Art im Ergebnisteil mit „p“ angegeben. Eine statistische Signifikanz wurde bei p-Wert < 0,05 angenommen.

Für die statistische Auswertung der Anzahl der Riesenzellen fehlte die Normalverteilung der einzelnen Parameter. Beim Testen der Nullhypothese, dass kein

Unterschied zwischen den jeweiligen Beschichtungen bezogen auf den betrachteten Testparameter besteht, wurde der Kruskal-Wallis-H-Test und der korrespondierende Mehrfachgleichstest angewendet. Die p-Werte wurden mit SPSS für Windows (Version 12.0; SPSS Inc., Chicago, USA) bestimmt. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert < 0,05 angenommen.

2.5 Histologische Auswertung

Die Schnitte wurden an einem Stereomikroskop Stemi SV 11® (Carl Zeiss Mikroskopie, Jena) histologisch ausgewertet. In die Beurteilung gingen die jeweils mit HE und Toluidinblau gefärbten Schriffe der distalen und proximalen Ebene, sowie des Tibiaschaftes ein.

Um die Biokompatibilität und das Einwachsverhalten der beschichteten Drähte beurteilen zu können, wurden verschiedene histopathologische Kriterien zugrunde gelegt.

Zur Beurteilung der histologischen Präparate wurde vor allem auf folgende Phänomene besonderes Augenmerk gelegt:

- Ab- und Umbauvorgänge am Knochen
- Beurteilung der Menge des neu gebildeten Knochens
- Bildung spongiöser Knochensequester
- Beschaffenheit der Mikrostruktur der Kortikalis, die zum Beispiel durch die Morphologie der Haversschen Kanäle, dem Vorhandensein von Kittlinien oder der Aufhebung der lamellären Knochenschichtung geprägt sein kann
- Vorkommen reaktiver Knochenumbildungsvorgängen des Peri- und Endosts
- Osteolysen
- Lakunenbildung
- Vorkommen oder Fehlen von Osteozyten in den Lakunen der Knochenbälkchen.
- Vorkommen von Makrophagen, Fremdkörperriesenzellen und polymorphkernigen Granulozyten im Markraum als Zeichen einer ablaufenden Fremdkörperreaktion
- Existenz von Ödemen und Nekroseherden sowie Granulationsherden im Binnenraum des Knochenmarkkanals, aber auch Zeichen der Regeneration und Blutbildung

- Bestreben das Implantat mit Knochen zu umwachsen und ob ein direkter Kontakt zwischen Knochen und Implantat vorhanden ist; zusätzlich wurde die Entstehung einer bindegewebigen Hülle um das Implantat herum sowie deren Qualität beurteilt.
- Beurteilung der Gesamtintegration des Implantates hinsichtlich der knöchernen „Umschließung“ des Implantates mit Knochen bzw. der fehlenden Integration ausgedrückt durch die Bildung einer bindegewebigen Hülle in direkter Nachbarschaft zum Implantat.

3 ERGEBNISSE

3.1 Studie mit vier Wochen Implantationsdauer

Es wurden für diesen Teil des Versuchs 12 – pro Gruppe sechs – Tiere operiert. Intraoperativ ergaben sich keinerlei Komplikationen. Alle Tiere überlebten den Beobachtungszeitraum und gingen in die Ergebnisauswertung mit ein.

3.1.1 Histomorphometrische Ergebnisse

3.1.1.1 Knochenneubildung

Im Vergleich aller drei untersuchten Regionen kam es zu keinem signifikanten Unterschied in der Rate an Knochenneubildung zwischen der reinen HA und der HA-Gentamicin-Beschichtung (**Tab. 3**). Auffällig war, dass es in beiden Gruppen relativ große Unterschiede in der Knochenneubildungsrate bezogen auf die unterschiedlichen anatomischen Bereiche der Tibia der gleichen Beschichtung gab. In der proximalen Metaphyse und im Tibiaschaft war der größte Anteil an neu gebildetem Knochen in der Gruppe der HA-Beschichtung zu verzeichnen, jedoch ohne statistische Signifikanz. Hingegen wurde im Bereich der distalen Diaphyse die höchste – auch hier ohne statistisch signifikante Unterschiede - prozentuale Knochenneubildungsrate in der HA-Gentamicin-Gruppe erreicht. Desweiteren fiel eine relativ hohe Standardabweichung auf.

		Knochenneubildung der ROI (%)
Proximale Metaphyse	HA	0,79 ± 1,07
	HA-Gentamicin	0,42 ± 0,48
Schaftbereich	HA	3,97 ± 3,73
	HA-Gentamicin	3,05 ± 1,34
Distale Metaphyse	HA	0,59 ± 0,68
	HA-Gentamicin	7,33 ± 12,3

Tabelle 3: Darstellung der prozentualen Knochenneubildungsrate der verschiedenen Beschichtungen in Abhängigkeit von der Schnittebene Bezogen auf die ROI von 4mm² bzw. 1,49 mm² nach vier Wochen.

3.1.1.2 Implantat-Knochen-Kontakt

Der größere Anteil an neu gebildetem Knochen mit direktem Implantat-Kontakt zeigte sich in der HA-Gentamicin Gruppe. Jedoch zeigte sich auch hier keine statistische Signifikanz und es ergaben sich auch relativ hohe Standardabweichungen (**Tab. 4**)

		Knochenneubildung an der Oberfläche des Implantates in % der Implantatlänge
Schaftbereich	HA	7,89 ± 6,8
	HA-Gentamicin	11,0 ± 7,38

Tabelle 4: Angabe des prozentualen Anteils des neu gebildeten Knochens mit direktem Kontakt zum Implantat nach vier Wochen

3.1.1.3 Anzahl der Riesenzellen

Zur Quantifizierung der für eine Fremdkörperreaktion sprechenden Riesenzellen wurden die Längsschliffe aller Beschichtungen ausgewertet. Die Angabe erfolgt in Anzahl/mm². Auch hier lagen zwischen den einzelnen Beschichtungen keine signifikanten Unterschiede vor. In der HA-Gruppe waren durchschnittlich 3,33 Riesenzellen pro mm² zu verzeichnen, in der Kombination mit Gentamicin waren es 5,58. Auch kam es zu recht hohen Standardabweichungen (**Tab. 5**).

		Anzahl der Riesenzellen/mm ²
Schaftbereich	HA	33 ± 2,36
	HA-Gentamicin	5,58 ± 6,11

Tab 5: Angabe der Anzahl der Riesenzellen im Bereich der ROI im Längsschliff in Zellen/mm² nach 4 Wochen.

3.1.2 Histologische Ergebnisse

Die Darstellung der histologischen Ergebnisse erfolgt getrennt nach den einzelnen Beschichtungstypen. Im Folgenden werden die HA- und die HA-Gentamicin-Beschichtung einander gegenüber gestellt, um den Einfluss des Gentamicins auf die Knochenneubildung zu beurteilen.

3.1.2.1 HA-Beschichtung

Von allen Tieren dieser Gruppe konnten verwendbare Präparate hergestellt werden. Alle zeigen sowohl eine Reaktion des Knochens als auch des Knochenmarks auf die Implantation des K-Drahtes.

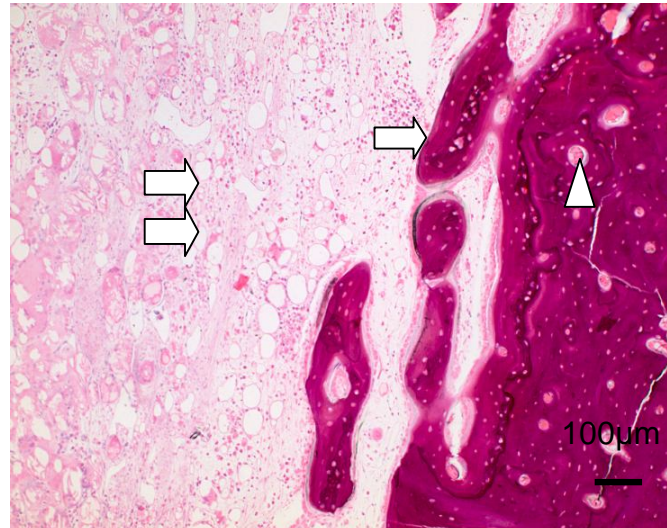


Abb. 10: Detail der distalen Diaphyse bei einem HA-Implantat nach vier Wochen Standzeit. Endostale Knochenneubildungen (Pfeil) und Erweiterung der Haversschen Kanäle in der Kortikalis (Pfeilkopf); ödematisierte Areale im Knochenmark (Doppelpfeil). HE.

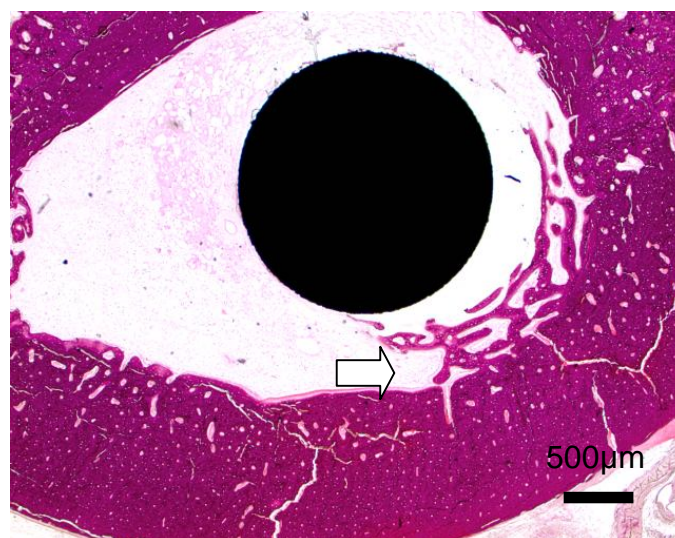


Abbildung 11: Distale Diaphyse nach vier Wochen Standzeit bei einem HA-Implantat. Die neugebildeten Bälkchen bestehen aus Lamellen- und Geflechtknochen. Sie ziehen vom Endost in Richtung des Implantates (Pfeil), ein direkter Kontakt besteht jedoch nicht. Die von Knochen ausgesparte Zirkumferenz des Implantates ist von ödematisiertem KM umgeben. Die Kortikalis zeigt Mineralisierungsstörungen. HE.

Bei allen Tieren fiel eine Reaktion des Peri- und Endosts in Form einer Neubildung von Knochen auf (**Abb. 11**). Dieser Knochen wuchs in parallel zueinander liegenden Säulen, die senkrecht zur ursprünglichen Tibiaoberfläche stehen. Diesen knöchernen Strukturen sind Osteoblasten angelagert. Qualitativ zeigte dies eine Spannbreite von

nur geringen Reaktionen bis hin zu Knochenneubildungen, die sich über die gesamte Oberfläche des Querschnittes der Tibia zogen.

Die Kortikalis zeigt bei fünf der sechs Tiere stark erweiterte Haverssche Kanäle, bei denen zudem manifeste „Remodelling“-Aktivitäten in Form von Knochenneubildungen in Richtung auf deren Lumina stattfanden. Einige der Tiere zeigen kortikale Mineralisierungsstörungen (**Abb. 10 und 11**).

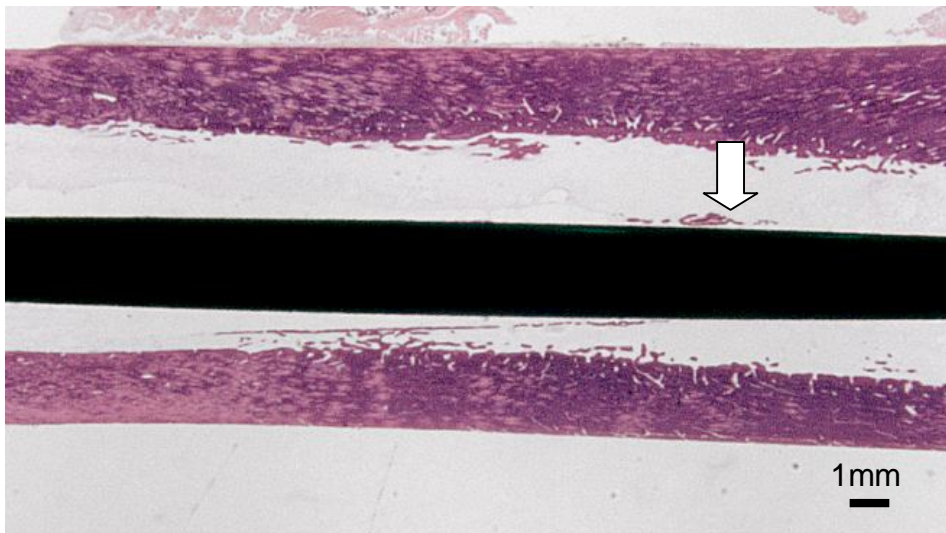


Abbildung 12: Tibiaschaft nach 4 Wochen Standzeit eines mit HA beschichteten Implantates. Diskrete Knochenneubildungen am oberen und unteren Implantatrand (Pfeil).

Vier der Tiere zeigten Knochenneubildungsprozesse entlang der Oberfläche des Endosts. Bei drei Tieren erreichten die endostalen Knochenneubildungen schließlich auch das Implantat. (**Abb.12**) Bei diesen Tieren stand der Knochen dann direkt mit dem Implantat in Verbindung. Wobei auch hier die Spannbreite von einem nur punktförmigen Kontakt bis hin zu einem in seiner Strecke längeren reichte. Es konnten Osteoblastenschichten auf diesen neu gebildeten Knochenbälkchen nachgewiesen werden. Teilweise befand sie sich noch im Stadium des Geflechtknochens, andere Teile waren aber auch schon in Lamellenknochen übergegangen. Bei drei der Tiere war die endostale Oberfläche von tiefen Einbuchtungen in die Kortikalis hinein durchsetzt. (**Abb. 11 und 13**)

Bei keinem der Tiere war ausschließlich ein regelrechtes blutbildendes Knochenmark aufzufinden, bei allen fanden sich Anzeichen einer Fremdkörper-assoziierten Entzündungsreaktion.

Sie zeigten alle Markraumödeme und fünf von ihnen wiesen zusätzlich nekrotische Herde auf. Fremdkörperriesenzellen waren in den Präparaten von drei Tieren und polymorphkernige Granulozyten bei einem Tier zu finden. (**Abb. 14**)

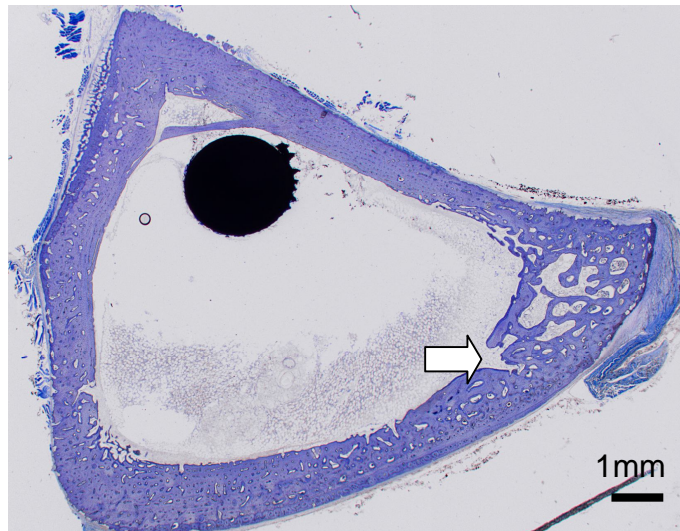


Abb. 13: Übersicht der distalen Diaphyse. Die neugebildeten Bälkchen bestehen aus Lamellenknochen und Herden von Geflechtknochen. Die von Knochen ausgesparte Zirkumferenz des Implantates ist von ödematisiertem KM umgeben. Die endostale Oberfläche von tiefen Einbuchtungen in die Kortikalis hinein durchsetzt (Pfeil). Touluidinblau.

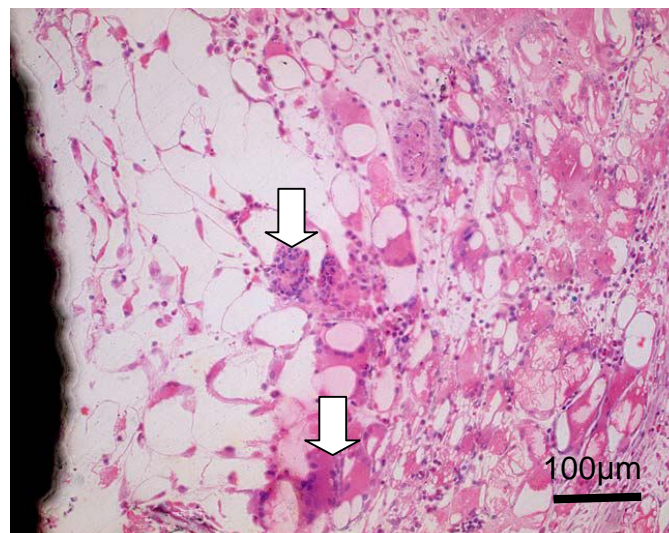


Abb. 14: Detail der distalen Diaphyse, HA-Beschichtung, vier Wochen Versuchsdauer. Mehrkernige Riesenzellen (Pfeil) in nekrotischen Knochenmarkarealen. HE.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der HA-Gruppe nach vier Wochen Standzeit nur eine geringe Knochenneubildungsrate verzeichnet werden konnte. Vor allem im Bereich der proximalen und der distalen Metaphyse kam es nur zu wenig neu

gebildetem Knochen. Etwas mehr neuer Knochen entstand im Schaftbereich, dieser nahm jedoch nur wenig Kontakt mit dem Implantat auf.

Von einer knöchernen Integration des Implantates kann jedoch hier nicht gesprochen werden. Die trabekulären Strukturen des jungen Knochens gingen vom dem Implantat benachbarten Endost aus und verliefen mit Ausrichtung auf das Implantat. Es handelte sich größtenteils um Geflechtknochen.

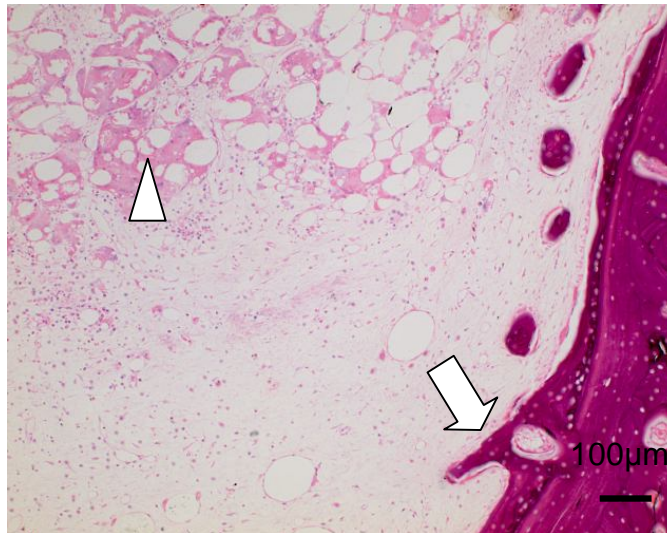


Abbildung 15: Detail der distalen Diaphyse bei mit HA beschichtetem Implantat nach vier Wochen wenige endostale Knochenneubildungen (Pfeil); ödematisierte Areale liegen im Knochenmark (Pfeilkopf). Teilweise besteht eine Markraumfibrose. Intaktes hämatopoetisch aktives Mark ist nur in kleinen Bezirken zu beobachten. HE;

Das Knochenmark zeigte Bereiche mit intakter Hämatopoese und unauffälligen Fettzellen. Zusätzlich gab es jedoch auch Regionen, in denen die Fettzellen ödematös aufgetrieben oder nekrotisch waren. Hier lagen auch häufig Konglomerate aus mehrkernigen Riesenzellen zur Phagozytose des nekrotischen Materials. Die Kortikalis wies, wie bereits oben beschrieben, teilweise Mineralisierungsstörungen auf. Sie zeigte eine Erweiterung der Haversschen Kanäle und von hier ausgehenden Remodelling-Bestrebungen durch Neubildung von Knochen. Auch das benachbarte Periost zeigte sich mancherorts reaktiv.

3.1.2.2 HA-Gentamicin-Beschichtung

Wie auch in der Gruppe der Tiere mit dem nur mit HA beschichteten Implantat waren in allen Präparaten Reaktionen des Periosts vorhanden. Zwei der Tiere wiesen in ihrer Kortikalis dünne, mosaikartig verlaufende Kittlinien auf, die durch schubartigen,

herdförmigen Knochenumbau entstehen. Alle Präparate zeigten Erweiterungen und zentrifugal wachsende Knochenneubildungen der kortikalen Haversschen Kanäle. Mineralisierungsstörungen fielen bei fünf Tieren auf.

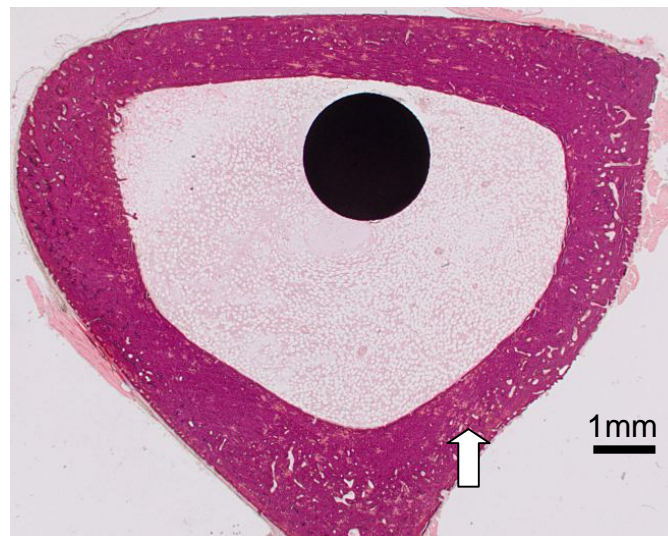


Abbildung 16: Übersicht der proximalen Diaphyse, 4 Wochen Beobachtungsdauer, Beschichtung des Implantates: HA-Gentamicin. Die inselförmigen, heller tingierten Areale in der Kortikalis spiegeln Mineralisierungsstörungen wieder (Pfeil). HE.

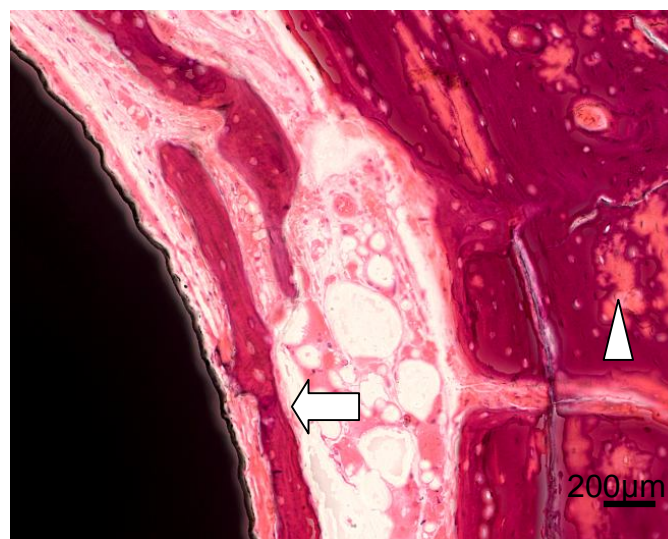


Abbildung 17: Detailansicht der neugebildeten Knochenbälkchen (Pfeil) im Bereich der distalen Diaphyse bei einem Implantat mit HA-Gentamicin-Beschichtung und einem Beobachtungszeitraum von 4 Wochen. Auch hier zeigen die heller tingierten Areale die Mineralisierungsstörungen (Pfeilkopf). HE; Obj. 20

Knochenneubildungen entlang der endostalen Oberfläche fanden sich bei vier Tieren. Die Knochenneubildungen stellten Kontakt zwischen Implantat und Endost bei zwei Tieren her. Direkter Kontakt von Knochen und Implantat war bei vier Tieren zu finden.

Im Knochenmark aller Tiere lagen nekrotische Herde. Ein Markraumödem zeigte jedoch nur eines der Tiere, während andere Tiere ödematisierte Areale in ihrem

Knochenmark zeigten. Fremdkörperriesenzellen fanden sich und polymorphkernige Granulozyten im Mark mehrerer Tiere.

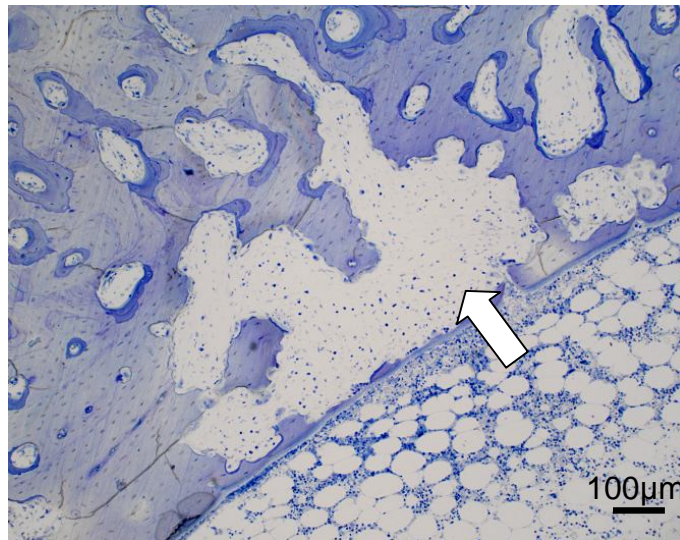


Abbildung 18: Detailansicht der markraumnahen Kortikalis. HA-Gentamicin-Implantat, nach 4 Wochen. Durch osteoklastäre Aktivitäten hervor gerufene knöcherne Substanzverluste (Pfeil), die mit faserreichem Bindegewebe aufgefüllt sind. Toluidinblau;

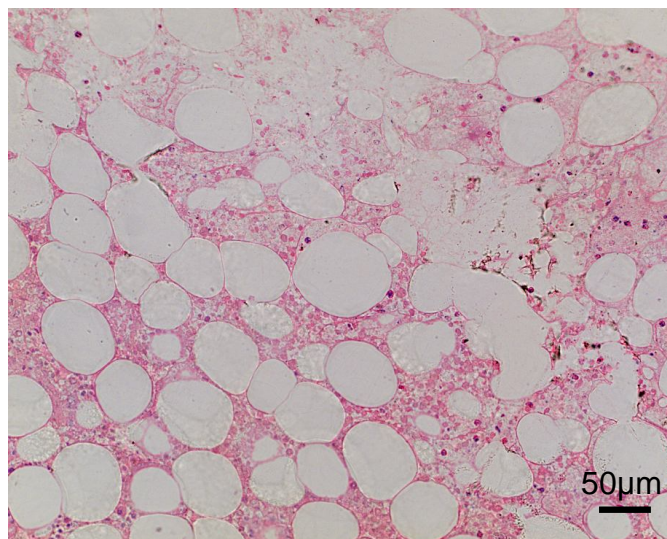


Abb. 19: Detailaufnahme des Knochenmarks im Bereich der proximalen Diaphyse. Nekrotisches Knochenmark mit polymorphkernigen Granulozyten.HE.

In der Zusammenschau kam es auch in dieser Gruppe zu keiner knöchernen Integration des Implantates. Lediglich im Bereich der distalen Metaphyse kam es zu einer gewissen Menge an neu gebildetem Knochen, welcher auch hier seinen Ursprung im Endost hatte und in Richtung des Implantates wuchs. Auch hier handelte es sich zumeist um Geflechtknochen.

Das Knochenmark gestaltete sich ähnlich wie bei den Tieren, bei denen ein reines mit HA beschichtetes Implantat verwendet wurde. Es zeigten sich Ödeme, Nekrosen und Fremdkörperriesenzellen neben intaktem hämatopoetischen Knochenmark.

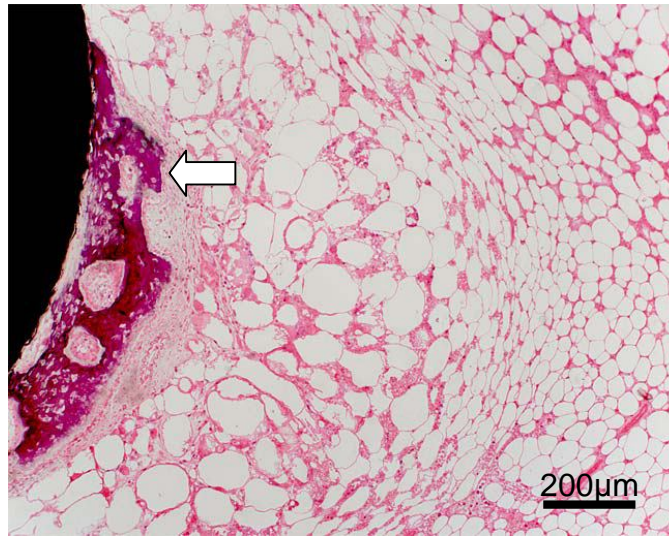


Abb. 20: Detail der distalen Diaphyse. Implantatassoziierte Knochenneubildungen im Stadium des Geflechtknochens (Pfeil). Das Knochenmark ist größtenteils nekrotisch. HE.

In dieser Gruppe zeigten sich ebenfalls Mineralisierungsstörungen der Kortikalis und durch osteoklastäre Aktivität entstandene Lakunen. Der größte Teil der Kortikalis war jedoch intakt.

3.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der 4-Wochen-Studie

In den Auswertungen der Histomorphometrie konnte bei keinem der betrachteten Parameter ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Gruppen gefunden werden. Die Histomorphometrie zeigt in allen Gruppen eine dezente Rate an Knochenneubildung, jedoch mit leichten regionalen Unterschieden. Tendenziell war am meisten Knochen bei Implantaten mit HA-Gentamicin-Beschichtung gebildet worden – mit Ausnahme der proximalen Metaphyse – und auch der Knochen-Implantat-Kontakt war in der HA-Gentamicin-Gruppe am stärksten. Es bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Fremdkörperriesenzellen. In allen Gruppen waren Nekrose- oder ödematischen Areale als Zeichen einer Fremdkörperreaktion zu sehen. Zusammengefasst kam es zu keinen signifikanten Unterschieden durch die Gentamicin-Zusatzbeschichtung im Vergleich zum HA-Kontrollimplantat.

3.2 Studie mit 12 Wochen Implantationsdauer

Dieser verlängerte Beobachtungszeitraum von 12 Wochen wurde gewählt, um weitere Kenntnisse über die weitere Knochenneubildung, Implantatintegration und vor allem auch die Knochenmarksreaktionen zu gewinnen. Neben den Gruppen HA und HA-Gentamicin wurde zusätzlich ein unbeschichteter K-Draht als Kontrollgruppe verwendet. Für jeden Beschichtungstyp wurden neun Tiere und somit insgesamt 27 Kaninchen operiert. In jeder der Gruppen verstarb eines der Tiere vor Ablauf des Untersuchungszeitraumes an einer akuten Durchfallerkrankung.

3.2.1 Histomorphometrische Ergebnisse

3.2.1.1 Knochenneubildung

Nach zwölf Wochen Standzeit zeigten sich in den beiden Gruppen – HA und HA-Gentamicin – deutlich höhere prozentuale Wachstumsraten als in den korrespondierenden Gruppen nach vier Wochen Standzeit. Auffällig ist an dieser Stelle, dass die anteilmäßig größte Osteogenese einheitlich bei beiden Gruppen in der proximalen Schnittebene auftrat. Ebenso wie bei den histomorphometrischen Untersuchungen nach vier Wochen Standzeit ergaben sich recht hohe Standardabweichungen aller Gruppen.

Sowohl die HA- als auch die HA-Gentamicin-Beschichtung zeigten in allen Ebenen eine höhere Rate an Knochenneubildung als die unbeschichteten K-Drähte. Zu signifikanten Unterschieden kam es dabei jedoch nur bei dem Vergleich des HA beschichteten K-Draht im Bereich der distalen Metaphyse mit dem unbeschichteten K-Draht ($p=0,04$). Hingegen wies die HA-Gentamicin-Gruppe in diesem Bereich eine deutlich niedrigere Rate an neu gebildetem Knochen auf im Vergleich zum HA-Implantat. Der Unterschied zu der HA-Beschichtung besaß mit einem $p=0,05$ nahezu statistische Signifikanz. Bei den anderen Schnittebenen wurde eine ähnlich Knochenneubildungsrate erreicht, wie mit einer alleinigen HA-Beschichtung.

Resultierend aus diesen Beobachtungen zeigt sich, dass die Knochenneubildungstendenz der Implantate mit Gentamicinbeschichtung keinen signifikanten Unterschied zu der der gentamicinfreien, ausschließlich mit HA beschichteten K-Drähte bietet. Dennoch war die Rate an Knochenneubildungen stets

geringer. Vor allem im Bereich der distalen Metaphyse wurde mit $p=0,05$ fast ein signifikanter Unterschied erreicht.

		Knochenneubildung der ROI (%)
Proximale Metaphyse	Unbeschichteter K-Draht	9,31 ± 8,12
	HA	35,8 ± 22,0
	HA-Gentamicin	27,3 ± 17,3
Schaftbereich	Unbeschichteter K-Draht	1,50 ± 2,50
	HA	12,2 ± 12,3
	HA-Gentamicin	7,45 ± 4,97
Distale Metaphyse	Unbeschichteter K-Draht	4,03 ± 4,30
	HA	25,4 ± 14,0*
	HA-Gentamicin	4,36 ± 2,65

* $p < 0,05$ gegenüber dem unbeschichteten K-Draht

Tabelle 6: Darstellung der prozentualen Knochenneubildungsrate der verschiedenen Beschichtungen in Abhängigkeit von der Schnittebene Bezogen auf die ROI von 4mm^2 bzw. $1,49\text{mm}^2$ nach 12 Wochen.

3.2.1.2 Implantat-Knochen-Kontakt

Sowohl die alleinige HA-Beschichtung als auch die in Kombination mit Gentamicin erreichten einen langstreckigeren Knochen-Implantat-Kontakt als der unbeschichtete K-Draht. Die HA-Beschichtung erreichte sogar Werte mit einer statistischen Signifikanz von $p=0,04$ gegenüber dem K-Draht. Die HA-Gentamicin-Gruppe lag wiederum – nicht signifikant – unter den Werten der HA-Gruppe. Auch in dieser Untersuchung kam es zu recht hohen Standardabweichungen.

		Knochenneubildung an der Oberfläche des Implantates in % der Implantatlänge
Schaftbereich	Unbeschichteter K-Draht	5,28 ± 9,2
	HA	33,8 ± 12,8*
	HA-Gentamicin	24,7 ± 19,0

* $p < 0,05$ gegenüber dem unbeschichteten K-Draht

Tabelle 7: Angabe des prozentualen Anteils des neu gebildeten Knochens mit direktem Kontakt zum Implantat nach 12 Wochen.

3.2.1.3 Anzahl der Riesenzellen

Fremdkörperriesenzellen zeigten sich bei allen Schliffen dieser Beobachtungsreihe. Ebenso wie in der 4-Wochen-Studie kam es nicht zu signifikant unterschiedlichen Ergebnissen der einzelnen Gruppen und die Standardabweichungen waren relativ hoch. Das geringste Vorkommen von Fremdkörperriesenzellen lag bei dem unbeschichteten K-Draht vor, jedoch – wie erwähnt – ohne statistisch signifikante Unterschiede.

		Anzahl der Riesenzellen/mm²
Schaftbereich	Unbeschichteter K-Draht	1,25 ± 1,59
	HA	2,93 ± 1,52
	HA-Gentamicin	3,12 ± 1,06

Tabelle 8: Angabe der Anzahl der Riesenzellen im Bereich der ROI im Längsschliff in Zellen/mm², 12 Wochen Standzeit.

3.2.2 Histologische Ergebnisse

3.2.2.1 Unbeschichtete K-Drähte

Nach Implantation des unbeschichteten K-Drahtes zeigten sich vom Endost ausgehende schmale trabekuläre Knochenstrukturen, die einen nur punktuellen Kontakt zum Implantat aufnahmen. Die Zirkumferenz des Implantates war zum größten Teil von einer bindegewebigen Schicht umgeben (Abb. 17).

Im Knochenmark zeigten sich Nekroseareale und Fremdkörperriesenzellen als Hinweis auf eine ablaufende Fremdkörperreaktion. Die Kortikalis war von Kittlinien durchzogen, die Lumina der Haversschen Kanäle auf unterschiedliche Durchmesser erweitert. Die Innenseite der Lakunen zeigte sich von Osteoidsäumen ausgekleidet. Zusammenfassend sind diese Vorgänge als Zeichen eines intensiven Remodellings zu werten.

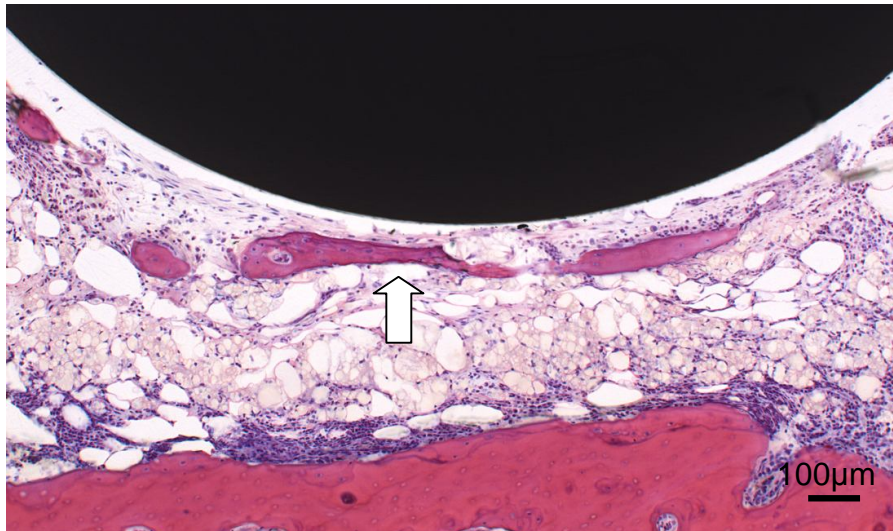


Abb. 21: Vergrößerung der distalen Diaphyse. Die Knochenlamelle (Pfeil) weist keinen direkten Kontakt zum Implantat auf. Das Knochenmark ist durchsetzt von regenerativen Prozessen. HE.

3.2.2.2 HA-Beschichtung

Die Knochenneubildungsprozesse nach Implantation der HA-beschichteten K-Drähte waren intensiver im Vergleich zu den unbeschichteten Drähten. In den proximalen Abschnitten umgaben breite Knochenmanschetten die Zirkumferenz der Implantate (**Abb. 22**). In den mittleren Diaphysenabschnitten legten sich oftmals schmale Knochenbälkchen dem Implantat an. Distal manifestierten sich hingegen selten Knochenneubildungsprozesse. Der Kontakt zwischen dem Implantat und dem neu gebildeten Knochen war über weite Strecken eng. Der neu gebildete Knochen zog vom Endost aus zum Implantat und überbrückte so stellenweise den Markraum. Er war von mit Osteoblasten belegten Osteoidsäumen bedeckt.

Bei einigen der Tiere waren unmineralisierte Bereiche im jungen Knochen zu verzeichnen.

Das Knochenmark erschien strukturell weitgehend intakt. Einige Nekroseherde und Fremdkörperreaktionen schienen Implantat-assoziiert in dessen Nachbarschaft zu liegen.

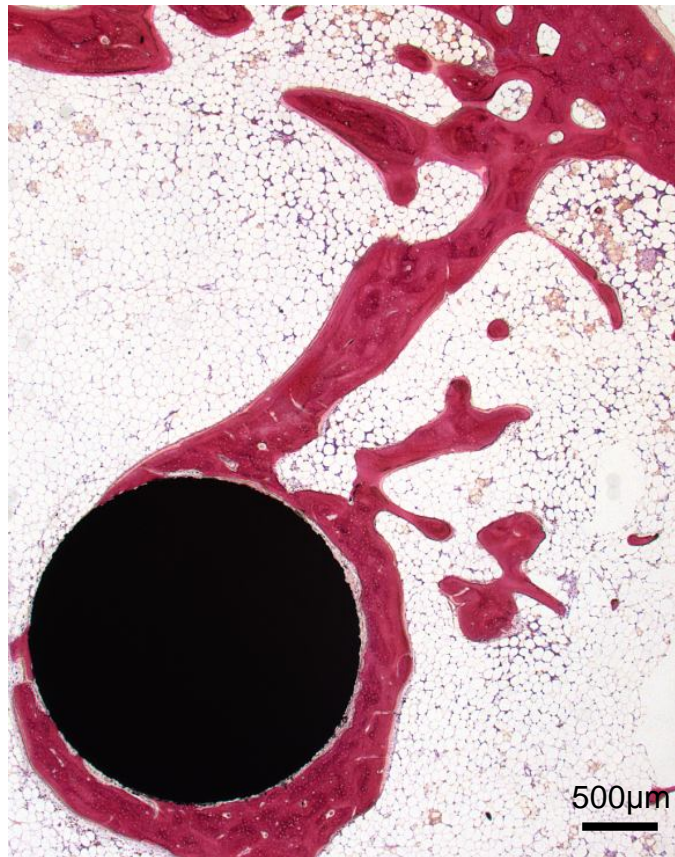


Abbildung 22: Die HA-implantatassoziierte Knochenneubildung besteht überwiegend aus Geflechtknochen. Der Draht ist zu 80% knöchern umbaut. HE.



Abbildung 23a: Querschnitt der proximalen Metaphyse. Hier zeigt sich eine zirkuläre, starke Knochenbildung um das Implantat herum. Hierbei gehen intakte Knochen trabekel in Richtung auf das Implantat.

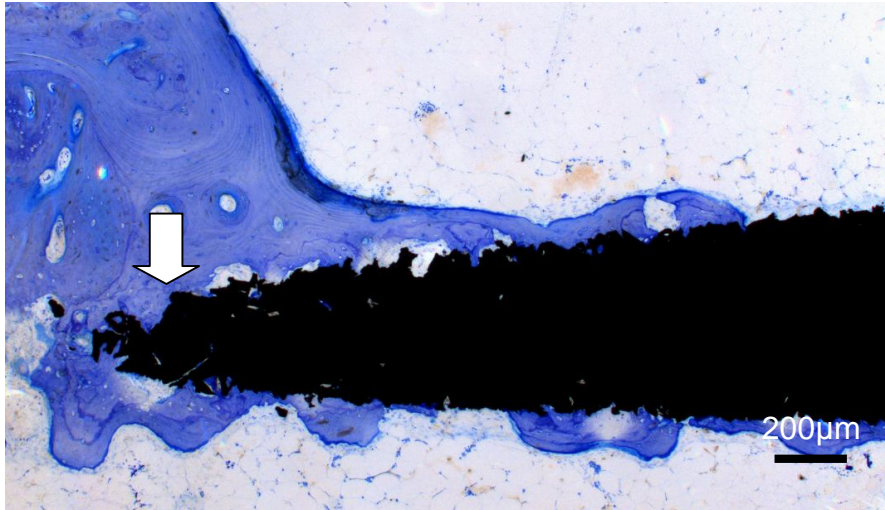


Abb. 23b: Detailvergrößerung der distalen Diaphyse. Neugebildeter Knochen drängt in die Zwischenräume der unregelmäßig gestalteten Implantatoberfläche (Pfeil). Die Osteoidbildung erfolgt in Richtung auf das Implantat. Toluidinblau.

Die Strukturunregelmäßigkeiten der Kortikalis, wie sie bei den unbeschichteten Implantaten auftraten, wurden in dieser Gruppe kaum beobachtet.

Zusammenfassend betrachtet weisen die histologischen Ergebnisse auf eine gute Biokompatibilität der HA-Beschichtung hin und bestätigen die osteokonduktiven Eigenschaften von HA-Matrices.

3.2.2.3 HA-Gentamicin-Beschichtung

Neu gebildeter Knochen umspannte zumeist in den proximalen und mittleren Diaphysenabschnitten die Zirkumferenz der Implantate. Dieser war strukturell intakt und nahm in unterschiedlicher Ausprägung punktuell oder flächenhaft Kontakt mit dem Implantat auf. **(Abb. 24, 25 und 26)**

Dort, wo das Implantat nicht in direkter Beziehung zum Knochen stand, wurde es von einem schmalen Saum aus Bindegewebe umschlossen. Bei dieser Beschichtung zeigten sich auch im distalen Tibiaanteil dem Implantat aufliegender Knochen.

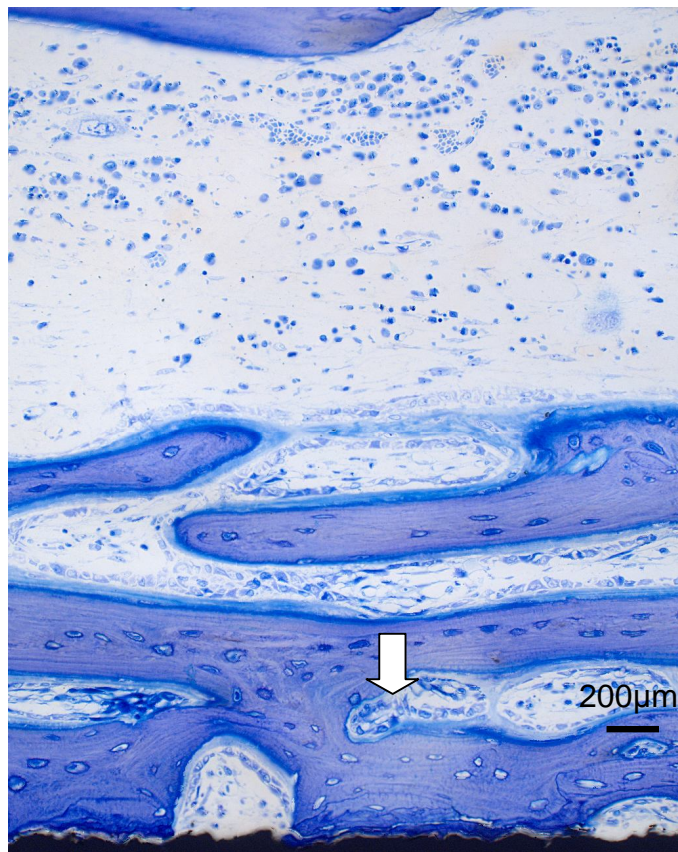


Abb 24: Vergrößerung aus der mittleren Diaphyse. Strukturell intakter Lamellenknochen steht in unmittelbarem Materialkontakt (Pfeil). Die Implantat-assoziierte Oberfläche des Knochens ist durch Remodelling gekennzeichnet.

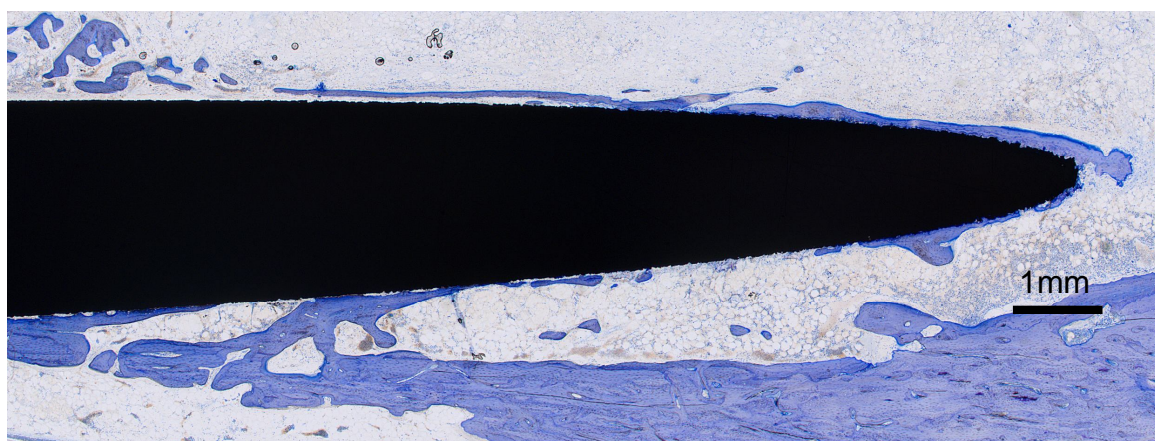


Abb. 25: Die mittlere Diaphyse. Neugebildeter Knochen umschließt große Teile des Implantates und nimmt engen Kontakt auf. Toluidinblau.

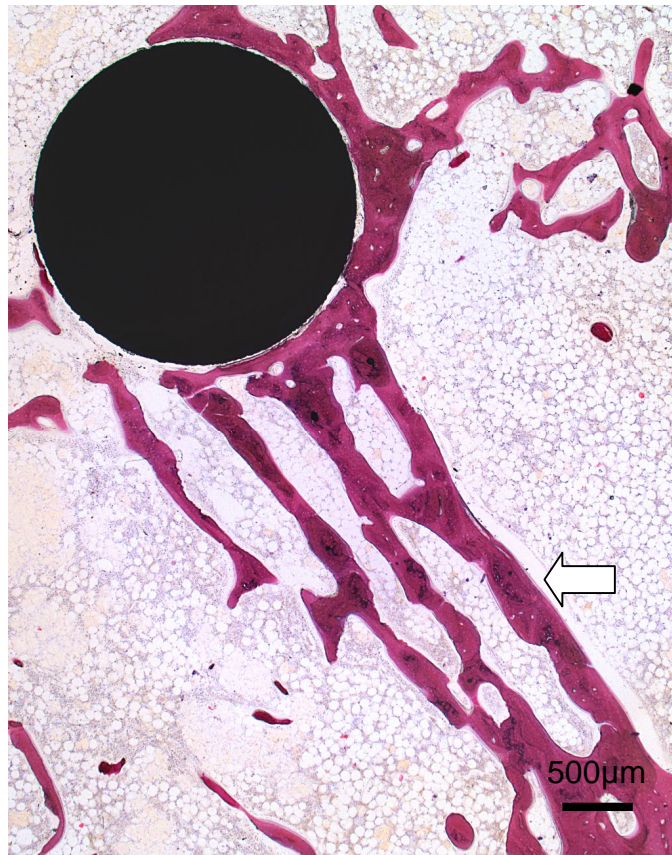


Abb. 26: Übersicht der proximalen Diaphyse. Neugebildete Bälkchen aus Lamellenknochen überbrücken eine weite Wegstrecke im Markraum (Pfeil) und umschließen zu ca. 50% die Zirkumferenz des Implantates. Das Knochenmark ist strukturell intakt. HE.

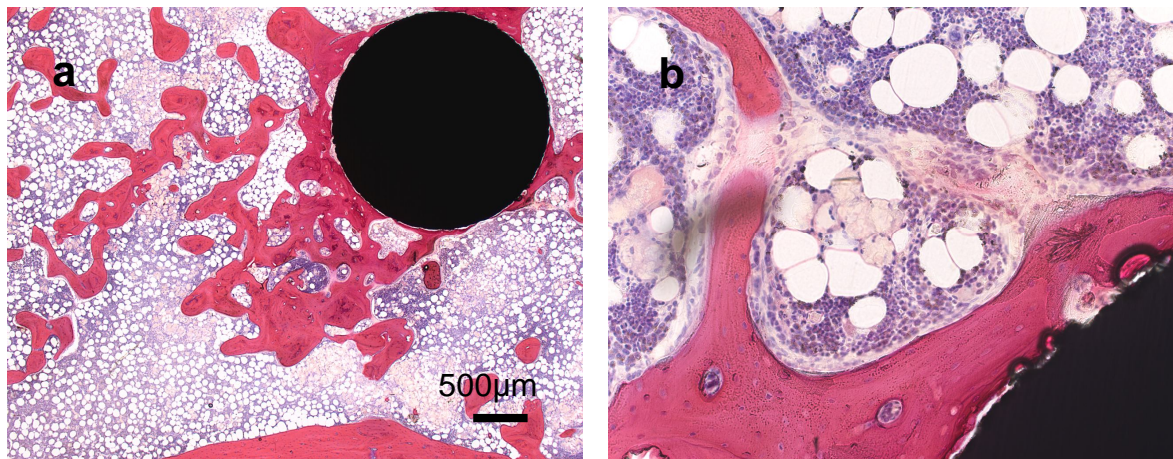


Abbildung 27a: Detail aus der proximalen Diaphyse mit Knochenbälkchen und zellreichem Knochenmark. HE. **b:** Vergrößerung. Ein artifizierter Spaltraum trennt die den neugebildeten Knochen von der Implantatoberfläche. HE.

Moderat ausgeprägte Fremdkörperreaktionen waren bei drei Tieren zu beobachten. Obwohl das Knochenmark weitgehend strukturell intakt war, konnte man bei der überwiegenden Anzahl der Tiere nekrotische Bezirke abgrenzen. Jedoch konnten bei

der Mehrzahl der Tiere keine Fremdkörperriesenzellen gefunden werden. Weitgehende Bezirke des Knochenmarkes waren mit sämtlichen Stufen der Hämatopoese ausgekleidet. Die zuvor beschriebenen Nekroseareale boten in ihrer Größe und Ausprägung ein ähnliches Bild wie die der unbeschichteten K-Drähte.

3.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der 12-Wochen-Studie

Nach zwölf Wochen Beobachtungsdauer waren die Implantate weitgehend knöchern integriert. Der neu gebildete Knochen zeigte eine intakte Mikrostruktur und Osteoblastenaktivität. Es bestand größtenteils ein direkter Kontakt zwischen Knochen und Implantat, wobei dieser stellenweise nicht nur punktuell, sondern auch flächenhaft war.

Die Markräume wiesen in der Mehrzahl flächenhaft intakte Bereiche auf. Ödeme waren nicht mehr zu beobachten. Jedoch traten in allen Gruppen umschriebene Nekrosen und Fremdkörperriesenzellen auf.

Die Irritationen des Periosts, die nach vierwöchiger Standzeit noch prominent waren, waren vollständig abgeklungen. Die Lumina der Haversschen Kanäle waren stellenweise immer noch deutlich erweitert. Bei den Individuen der Gruppen HA und HA-Gentamicin war Osteoidexpression zu erkennen, im Gegensatz zu der Gruppe mit den unbeschichteten Implantaten. Das Endost zeigte bei allen Tieren der Gruppen HA-beschichteten K-Drähte und des unbeschichteten Drahtes Knochenneubildungsprozesse und angelagerte Osteoblasten. Bei den Individuen in der Kombination mit Gentamicin fehlte dieses Bild lediglich bei zwei Tieren.

Waren bei der HA-Gentamicin-Gruppe nach vier Wochen Standzeit noch Mineralisierungsstörungen zu erkennen, so waren diese nach einer zwölfwöchigen Liegedauer abgeklungen.

4 DISKUSSION

Jährlich werden in Europa etwa 500.000 Hüftprothesen implantiert (Breusch et.al., 2000), wobei der Anteil hiervon in Deutschland 135.000 beträgt. Wie bereits eingangs erwähnt, kommt es bei 0,5% bis 2% der Primärimplantationsoperationen zu einer Infektion der Prothesen (Geipel und Herrmann, 2005). Die Infektionsgefahr erhöht sich bei Revisionseingriffen, z.B. nach aseptischer Prothesenlockerung oder vor allem nach vorbestehender Protheseninfektion (Hanssen und Rand, 1999). Eine Protheseninfektion macht eine aufwändige und für den Patienten oftmals belastende Therapie notwendig. Sculco (1993) bezifferte die Kosten im Falle der Infektion einer Totalendoprothese auf 50.000 US\$ pro Fall. Dies unterstreicht die Bedeutung einer effektiven Infektionsprophylaxe auch in der zementfreien Endoprothetik.

4.1 Lokale Antibiotikaprophylaxe bei Endoprothesen

Da die systemische prophylaktische Gabe von Antibiotika in vielen klinischen Studien eine Reduktion von Protheseninfektionen zeigen konnte, ist sie zum Standard in der endoprothetischen Chirurgie geworden (Engesaeter et al., 2003; Hanssen et al., 1997; Marcelscu und Osmon, 2005; Ruchholtz et al., 2004). Als Standardantibiotikum wird hierfür Cephazolin verwendet, da es die notwendigen Voraussetzungen wie ein breites Wirkspektrum, eine lange Halbwertszeit, eine gute Verträglichkeit und eine gute Weichteil- und Knochenpenetration erfüllt (Marcelscu und Osmon, 2005). Cephazolin sollte am Operationstag viermal i. v. appliziert werden. Eine postoperative Verlängerung der Antibiotikagabe führt zu keiner Reduktion der Infektionsrate (Engesaeter et al., 2003).

Die lokale Antibiotikaprophylaxe in der Endoprothetik wird in der internationalen Literatur jedoch noch immer kontrovers diskutiert (van de Belt et al., 2001). In Europa ist die Kombination aus systemischer Prophylaxe und mit Antibiotika-beladenem Knochenzement bereits akzeptiert (Lindgren, 2001). Im Gegensatz hierzu wird in den USA die Verwendung von Antibiotika-Knochenzement zur Infektionsprophylaxe bei Primärimplantationsoperationen abgelehnt (Hanssen und Osmon, 1999; Jiranek et al., 2006).

Joseffson und Kolmert (1993) zeigten in einer randomisierten prospektiven Studie mit einem Kollektiv von 1688 Patienten eine signifikante Reduktion der Infektionen bei der

Primäroperation, wenn Antibiotika-beladener Zement – im Gegensatz Antibiotika-freiem Zement – verwendet wurde. Nach weiteren fünf Jahren konnte keine statistisch signifikante Differenz mehr gezeigt werden. Chiu et al. (2002) führten eine klinische Studie an 340 Patienten mit primären Knieendoprothesen durch. Bei keinem der Patienten in der Antibiotika-Knochenzement-Gruppe trat eine Infektion auf, im Gegensatz zu 3,1 % in dem Kollektiv mit der alleinigen systemischen Antibiotikaphylaxe, was einem statistisch signifikantem Unterschied entspricht. Beide Gruppen erhielten dieselbe Kombination aus systemischer und oraler Antibiose aus Gentamicin und Cephazolin über 7 Tage.

Eine Analyse des Norwegischen Hüftprothesenregisters mit mehr als 22.000 primär operierten Hüftprothesen konnte ebenfalls eine signifikante Infektreduktion und ein statistisch signifikant längeres Überleben der Prothese unter Einsatz eines mit Antibiotika vermischten Knochenzements zeigen. Zu dem gleichen Ergebnis kamen Malchau et al. (1993) in einer weiteren retrospektiven Studie aus Skandinavien.

Zusammenfassend kann aus den vorliegen Daten ein signifikanter Nutzen der Verwendung von Antibiotika-beladenem Knochenzement gefolgert werden. Um die Kosten der Folgetherapien und die Belastung für den Patienten durch eine Protheseninfektion zu senken, sollte die Entwicklung der lokalen Antibiotikaphylaxe auch im Bereich der zementfreien Endoprothetik vorangetrieben werden.

4.2 Antimikrobielle Beschichtungen für zementfreie Endoprothesen

Voraussetzung für die Beschichtung einer Prothese mit Antibiotika ist neben der antimikrobiellen Wirksamkeit, dass die knöchernen Integration der Prothese nicht verschlechtert wird. Deshalb wird die Kombination mit einer Grundbeschichtung zur knöchernen Integration bevorzugt.

In Frage kommt beispielsweise eine Beschichtung mit Hydroxylapatit als Basis, dessen positiver Einfluss auf die knöchernen Integration eines Implantates bereits beschrieben wurde. In diesem Zusammenhang muss das Beschichtungsverfahren betrachtet werden. HA wird meist mittels des sog. Plasma-Spray-Verfahren auf die Prothesenoberfläche aufgebracht. Hierbei kommt es zu einer hohen Hitzeentwicklung. Deshalb ist das zeitgleiche Aufbringen biologisch aktiver Substanzen nicht möglich, da

diese durch die hohen Temperaturen inaktiviert werden (Stigter et al., 2004). Aus diesem Grund sind Verfahren mit niedrigen Temperaturen notwendig.

1997 wurde von Radin et al. erstmals ein Verfahren zur Vancomycin-Beschichtung durch das Eintauchen von mit Keramik beschichteten Titan-Testkörpern in eine Vancomycin-Lösung beschrieben. Durch einen elektrophoretischen Abscheidungsprozess mit einer abschließenden Sinterung bei 900° wurde eine Calcium-Phosphat-Schicht mit einer Dicke von 50-80 µm auf das Titan aufgebracht. Diese Testkörper wurden dann für 6-24 Stunden in eine Vancomycin-Lösung bei 37° C eingetaucht. Somit wurden die hohen Temperaturen des Plasma-Spray-Coatings umgangen. Jedoch zeigte das Antibiotikum bei diesem Verfahren nur eine Wirksamkeit von 24 Stunden. Diese Zeit konnte durch Hinzunahme einer Lipidschicht auf 72 Stunden verlängert werden. Jedoch ist durch diese zusätzliche Lipidschicht eine Reduktion der osteokonduktiven Eigenschaften zu erwarten (Stigter et al., 2004).

Stigter et al. (2004) entwickelten eine weitere Möglichkeit des „biomimetischen“ Coatings. Es wurde eine Co-Präzipitation mit einer Tobramycin-Calcium-Phosphat-Lösung auf Calcium-Phosphat-beschichtete Titan-Implantate mit einem Tobramycin-Gehalt von 0-800 mg/l für 48 Stunden bei 37° C durchgeführt. Der Vorteil der Co-Präzipitation von Tobramycin und Calcium-Phosphat wurde gezeigt, da hier eine zehnmal höhere Konzentration von Tobramycin erreicht werden konnte. Stigter et al. untersuchten zudem das Freisetzungverhalten weitere Antibiotika, wobei alle getesteten Substanzen bei den Freisetzungversuchen im Inhibitionstest gegen *Staphylococcus aureus* wirksam waren.

4.3 Verwendetes Tiermodell

Die Auswahl der Versuchstiere richtet sich nach der Fragestellung der Arbeit und der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Materialien Kaninchen der Rasse New Zealand White Rabbit implantiert. Das Kaninchen wurde bereits häufig als Modell eingesetzt, wenn es um die Erprobung von Knochenersatzmaterialien- oder -implantaten, sowie von lokalen Antibiotikumträgern ging (Nikulín und Ljubovic, 1956; Bahn, 1962; Dahners und Funderburk, 1987). Hieraus resultiert auch der Vorteil, dass die Möglichkeit besteht, die eigenen Ergebnisse mit denen anderer zu vergleichen. Die Tatsache, dass Kaninchen in ihrer Unterbringung und Haltung unproblematisch sind, ist ein weiterer Vorteil dieser Tiere. Die

Körpergröße dieser Tiere ermöglichte es, die K-Drähte in die Markhöhlen der Tibiae einzubringen, ohne dass technische Schwierigkeiten oder Gefahren für die Tiere bestanden. Die Laufställe ermöglichten den Tieren eine gewisse Bewegungsfreiheit und stellten somit eine artgerechte Haltung dar. Zudem konnte so die Belastung der operierten Gliedmaßen der Kaninchen beobachtet werden, wodurch der postoperative Verlauf gut dokumentiert werden konnte. Die Standardisierung des Futters schloss eine weitere Fehlerquelle aus. Da die Tiere bereits zwei Wochen vor Versuchsbeginn eingestallt wurden konnten sie sich in ihre Umgebung eingewöhnen und zugleich konnte in dieser Zeit die Gesundheit der Tiere festgestellt werden.

Andere Versuchsmodelle beinhalten häufig die Verwendung einer Markraumböhrung vor intramedullärer Implantation der Testkörper. Hierbei entsteht Hitze, welche zu Gewebnekrosen und damit zu einer Zerstörung des osteogenen Potentials führen kann. Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit der Markraum der Tibia manuell mit einem Pfriem eröffnet, wobei es zu keiner derartigen Hitzeentwicklung kam. Da die 2,0 mm K-Drähte problemlos in die präformierte tibiale Markhöhle hineinpassten kam es zu keiner Fraktur, so dass stabile Verhältnisse vorherrschten und die Tiere die Extremität voll belasten und der Integrationsprozess des Implantates beginnen konnte. Dabei handelt es sich um ein Modell ohne Belastung der Implantate, da es zu einer biomechanischen Kraftapplikation auf die K-Drähte kommt. Dies muss bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

4.4 Nachteile von Antibiotikabeschichtungen

Der größte Anteil der vorliegenden Studien bezüglich einer lokalen Antibiotikaprophylaxe liegt für mit Antibiotika beladenen PMMA-Zement vor. Allergische Reaktionen werden in der Literatur nicht beschrieben, dementsprechend scheint kein Risiko für die Entwicklung einer solchen zu bestehen.

Besonders die Entwicklung von Resistenzen wird als potentielle Gefahr bei der Verwendung einer lokalen Antibiotikaprophylaxe angesehen. Ursächlich sollen hierfür subinhibitorische Konzentrationen des Antibiotikums am Wirkort sein (Kendall et al., 1995; Kendall et al., 1996; Neut et al., 2003; Ramage et al., 2003; Thomes et al., 2002; van de Belt et al., 2001). Bereits 1980 wurde von Wahlig und Dingeldein die Freisetzungskinetik von verschiedenen Kombinationen aus Antibiotika mit PMMA-Knochenzementen. Als am besten zeigte sich die Verwendung von 0,5 g Gentamicin

pro 34 g Palacos R. Am ersten Tag wurde die höchste Konzentration mit 110 µg/ml erreicht. 3-8 % des Gentamicins wurden innerhalb der ersten zehn Tage frei gesetzt. Danach ist also noch ein großer Teil des Antibiotikums vorhanden.

Ein klinischer Fallbericht von Neut et al. (2003) zeigte, dass bei einer 5 Jahre lang *in situ* verbliebenen Septopal-Gentamicin-PMMA-Kette auch nach mehreren Jahren geringe und damit subinhibitorische Mengen an Gentamicin freigesetzt werden. Diese Septopal-Gentamicin-Kette war außerdem durch gentamicinresistente Staphylokokken besiedelt. Diese prolongierte Freisetzung von Gentamicin konnte zudem mit dem Auftreten von sog. „small colony variants“ von *Staphylococcus aureus* in Verbindung gebracht werden. Diese sind fähig, intrazellulär z.B. in Endothelzellen zu persistieren und Reinfektionen zu verursachen (von Eiff et al., 1998).

Von dem Vorkommen einer prolongierten Gentamicin-Elution mit daraus resultierenden subinhibitorischen Leveln muss auch bei der Verwendung von PMMA-Knochenzement ausgegangen werden (Thomes et al., 2002). Hinzukommt, dass die Oberfläche des PMMA-Zement auch unter Hinzugabe von Antibiotikum ein guter Nährboden für Keime ist. *In vitro* konnte eine abnehmende Empfänglichkeit der Bakterien für Antibiotika nach Adhäsion auf der PMMA-Zement-Oberfläche gezeigt werden (Arciola et al., 2002).

Thomes et al. (2002) entwickelten ein Tiermodell, in dem sie subkutan PMMA-Knochenzementproben applizierten und diese bakteriell mit *Staphylococcus epidermidis* kontaminierten. Dem PMMA-Zement war zum Teil Gentamicin beigemischt. Sie untersuchten hierbei einerseits das nachfolgende Auftreten von Infektionen und andererseits den Anteil von gentamicinresistenten Keimen im Falle einer Infektion. In der Gentamicin-PMMA-Gruppe kam es zu einer niedrigeren Infektionsrate (41% vs. 73%), allerdings war in dieser Gruppe auch ein signifikant höherer Anteil Gentamicin-resistenter Keime zu finden (78% vs, 19%, $p < 0,01$).

Die Ergebnisse klinischer Studien sind in diesem Zusammenhang nicht eindeutig. Schon 1989 konnte gezeigt werden, dass besonders bei Protheseninfektionen mit *Staphylococcus epidermidis* eine Resistenzentwicklung gegen das aus dem PMMA-Knochenzement freigesetztem Antibiotikum zu beobachten ist (Hope et al., 1989). Bei 88% der Keime zeigte sich eine Gentamicin-Resistenz nach Verwendung von Gentamicin-Knochenzement im Rahmen der Erstimplantation der Prothese im Gegensatz von nur 16% beim Einsatz von Antibiotika-freiem Zement.

Hope et al (1989) fanden in einer Untersuchung von Patienten mit infizierten Hüftprothesen in mehreren Fällen eine Infektion, welche durch mehrere Stämme von Koagulase-negativen Staphylokokken gleichzeitig verursacht wurde. Es bestand ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Verwendung von Gentamicin-haltigem Knochenzement und nachfolgender Gentamicin-Resistenz.

Auch in der Arbeit von Rafin et al. (2006) sind Koagulase-negative Staphylokokken die vorherrschenden Erreger einer tiefen Protheseninfektion. Die Autoren folgern, dass Resistenzen gegen das für gewöhnlich als Antibiotikaphylaxe verwandte Gentamicin sich deutlich erhöhen könnten. Sie empfehlen die Beimischung von Fusidinsäure oder Erythromycin zum Gentamicin-haltigen Zement, um eine breitere antibiotische Abschirmung im Falle einer Revisionsoperation zu erreichen.

Im Gegensatz hierzu konnten Anguita-Alonso et al. (2005) in einer Studie an 93 Patienten mit einer Protheseninfektion keine signifikante Erhöhung der Resistenzentwicklung gegenüber Gentamicin bzw. Tobramycin durch deren jeweilige Verwendung bei der Primärimplantation festgestellt werden. Allerdings wurde eine relativ hohe Rate - 41% bzw. 66% - an Resistenzen gegenüber Gentamicin bzw. Tobramycin über alle Protheseninfekte hinweg beschrieben. Es bestand jedoch kein signifikanter Unterschied, ob zuvor ein antibiotikahaltiger Zement verwendet wurde oder nicht.

Vor allem die prolongierte Freisetzung von Antibiotika aus dem PMMA-Zement wird für das Auftreten von Resistenzen verantwortlich gemacht (Kendall et al., 1995; Kendall et al., 1996; Neut et al., 2003; Ramage et al., 2003; Thomes et al., 2002; van de Belt et al., 2001).

Allerdings weisen die Freisetzungskinetik der Gentamicin-Beschichtungen für zementfreie Endoprothesen aus der vorliegenden Arbeit deutliche Unterschiede auf gegenüber denjenigen von Antibiotika-PMMA-Zement. Bei der untersuchten Gentamicin-HA-Beschichtung wird innerhalb von 12 bzw. 24 Stunden ein Anteil von 95% bzw. 99% des gesamten Gentamicins frei gesetzt. Hieraus kann man folgern, dass durch die initiale hohe Freisetzung des Antibiotikums die spätere, prolongierte Freisetzung mit subinhibitorischen Spiegeln verhindert wird. Theoretisch wird somit die Resistenzentwicklung nicht begünstigt.

Jedoch liegen derzeit diesbezüglich noch keine näheren Erkenntnisse vor. Dies sollte allerdings Gegenstand künftiger sowohl experimenteller als auch klinischer Untersuchungen sein.

Eine potentielle Toxizität wird ebenfalls als Risiko einer lokalen Antibiotikaphylaxe diskutiert. Jedoch konnten Wahlig und Dingeldein schon 1980 die Wahrscheinlichkeit des Entstehens systemischer Komplikationen als gering einstufen. Es sind keine Fälle systemischer Reaktion nach Verwendung von Antibiotika-Zement publiziert (Jiranek et al., 2006). Es kann also von einem systemisch unbedenklichen Einsatz einer lokalen Antibiotika-Phylaxe ausgegangen werden.

Damit beschränkt sich die Toxizitätsgefahr auf die lokale Umgebung im direkten Umfeld des freigesetzten Antibiotikums, die im Folgenden vor dem Hintergrund der Ergebnisse der Knochenneubildung, Implantatintegration und dem Auftreten von Fremdkörperriesenzellen in der vorliegenden Arbeit diskutiert werden sollen.

4.5 Knochenneubildung und Biokompatibilität der HA-Gentamicin-Beschichtung

Bezüglich der lokalen Toxizität aufgrund einer Verwendung von Antibiotika-Knochenzement gibt es aus klinischer Sicht keine Hinweise. Hingegen existieren mehrere *in vitro* Untersuchungen, bei denen ein negativer Effekt verschiedener Antibiotika auf die Osteoblasten- und Osteozyten-Funktion beschrieben wurde.

Ince, Schütze, Hendrich et al. haben 2007 die Wirkung von Gentamicin auf fetale Osteoblasten und endotheliale Zellen unter dem Aspekt des Vergleichs mit Polyhexaniden untersucht, da diese eine begrenzte bakterielle Toleranzentwicklung und ein breites Wirkungsspektrum aufweisen. Im Gegensatz zu diesen zeigte hoch dosiertes Gentamicin jedoch keinen negativen Einfluss auf die fetalen Osteoblasten oder die Anzahl und Vitalität der endothelialen Zellen. Die Untersuchungen von Chang et al. (2006) zeigten hingegen Hemmung der Proliferation und Differenzierung von menschlichen mesenchymalen Stammzellen, sowie die Beeinträchtigung des Heilungsprozesses von Knochen unter hohen Dosen Gentamicins von 100 µg/ml und 200 µg/ml. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Ince, Schütze, Karl et al. (2006) im Rahmen einer anderen *in vitro* Studie mit einer C2C12 Zelllinie, welche sich nachweislich und reproduzierbar zu Osteoblasten differenzieren. Auch hier zeigte sich, bei lokaler Anwendung hoher Dosen mit einer Konzentration von 200–800 µg/ml

Gentamicin eine reduzierte Zell-Vitalität und Aktivität der alkalischen Phosphatase. Es kam jedoch zu keiner Reduktion der Zellzahl oder Verminderung der Expression von osteogenen Genen. Hingegen sehen Ince, Schütze und Karl (2006) die Vitalität und Aktivität der osteogenen Zellen *in vivo* als essenziell für die Knochenneubildung und den Heilungsprozess nach einem Trauma oder einer Prothesen-Implantation an.

Neben diesen *in vitro* Studien existieren nur wenige tierexperimentelle Arbeiten über das Zusammenspiel von Antibiotika und knöchernen Prozessen. Haleem et al. (2004) untersuchten die Frakturheilung von Ratten nach systemischer Gabe von Gentamicin und Vancomycin. Es wurde 7 Tage nach einer geschlossenen Frakturierung des Rattenfemurs 1,5 mg/kg Körpergewicht Gentamicin und 25 mg/kg Körpergewicht Vancomycin über insgesamt drei Wochen verabreicht. Die Serumspiegel lagen bei 4,5 µg/ml Gentamicin bzw. 35,1 µg/ml Vancomycin. Es zeigte sich kein negativer Effekt auf die Frakturheilung nach einer Beobachtungszeit von insgesamt 4 Wochen im Vergleich zu der antibiotikafreien Gruppe. Dasselbe Studienprotokoll zeigte hingegen eine deutliche Störung der Frakturheilungsvorgänge nach systemischer Verabreichung von Antibiotika der Chinolon-Gruppe (Levofloxacin, Trovofloxacin und Ciprofloxacin) (Huddleston et al., 2000; Perry et al., 2003).

Die zuvor dargestellten Arbeiten beziehen sich auf die Vorgänge der Frakturheilung, weshalb die Beobachtungen nur schwerlich auf die Vorgänge des knöchernen Einwachsverhaltens in der zementfreien Endoprothetik übertragen werden können. Arbeiten bezüglich der Knochenneubildung bzw. Implantatintegration im Zusammenhang mit zementfreien Endoprothesen sind in der Literatur zur Zeit noch nicht zu finden.

In der vorliegenden Studie zeigten die Gentamicin-HA-Beschichtung weder nach 4 noch nach 12 Wochen statistisch signifikante Unterschiede bei der Knochenneubildung, beim Knochen-Implantat-Kontakt und bei der Anzahl von Fremdkörperriesenzellen im Knochenmark im Vergleich zu Gentamicin-freien HA-Beschichtungen. Trotzdem konnte bei der zusätzlichen Gentamicin-Beschichtung sowohl in der 4- als auch in der 12-Wochen-Gruppe tendentiell eine geringere Knochenneubildung und ein geringerer Knochen-Implantat-Kontakts als bei der Antibiotika-freien Gruppe festgestellt werden. Fast Signifikanzniveau mit $p=0,05$ wurde bezüglich der Knochenneubildung im Bereich der distalen Metaphyse im Vergleich der HA- mit der HA-Gentamicin-Beschichtung erreicht.

In der vorliegenden Studie zeigen detailhistologisch die Präparate aller Gruppen vom Periost ausgehende Knochenneubildungen nach vier Wochen. Es verlaufen mosaikartige Kittlinien innerhalb der Kortikalis und Knochenneubildungen innerhalb der Haversschen Kanäle, welche auf Schübe herdförmigen Knochenumbaus hinweisen und im Sinne von Remodelingaktivitäten verstanden werden können. Vom Endost aus in Richtung der Implantate verlaufende Knochenneubildung ist Hinweis auf die osteokonduktive Potenz der Beschichtung, teilweise zeigt sich auch direkter Materialkontakt oder sogar das Bestreben, das Material vollständig zu umwachsen. Quantitativ ähneln sich die Ergebnisse nach vier Wochen Standzeit zwischen der Gruppe mit der alleinigen Hydroxylapatitbeschichtung und jener in Kombination mit Gentamicin. Etwas unterschiedlich sind die vor allem in der HA-Gentamicin-Gruppe auftretenden Mineralisierungsstörungen innerhalb der Knochenmatrix. Diese wurden jedoch, nach einer Standzeit von zwölf Wochen durch Osteoblastentätigkeit kompensiert. Nach 12 Wochen zeigt sich weitgehend strukturell intakter Knochen, welcher Kontakt zum Implantat aufnimmt.

Zusammenfassend zeigten sich in der vorliegenden Studie keine signifikanten Differenzen zwischen den HA-Gentamicin- und den HA-beschichteten K-Drähten. Jedoch war ein negativer Trend bei der Knochenneubildung durch die Gentamicin-Beschichtung auszumachen. Die Ursachen hierfür können viele Ursprünge haben und können mit der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden.

Die Nephro- und Ototoxizität durch Gentamicin ist durch eine endozytische intrazelluläre Aufnahme des Moleküls über den sog. Megalin-Rezeptor vermittelt (Moestrup et al., 1995; Schmitz et al., 2002). Dieser Rezeptor wird jedoch nicht im Knochen exprimiert (Lundgren et al., 1997). Diese rezeptorvermittelte, intrazelluläre Aufnahme ist also vermutlich nicht Ursache für die in dieser Studie beobachtete Tendenz in der Störung der Knochenneubildung und Implantatintegration. Eine lysosmale Akkumulation wird als weiterer Mechanismus für die Toxizität von Aminoglykosiden diskutiert (Servais et al., 2005). Hierbei kommt es zu lysosomalen Rupturen und damit zu einer intrazellulären Überladung der Zelle mit Gentamicin. Es folgt die Apoptose der Zelle (Silverblatt und Kuehn, 1979; Tulkens und van Hoof, 1980). In der Literatur sind ebenfalls Hinweise für eine Mitochondrien- oder eine über den extrazellulären Calcium-Rezeptorvermittelte Apoptose der Zelle durch Aminoglykoside (Davey et al., 1970; Ward et al., 2005).

Abschließend ist die molekulare Genese der tendenziell gestörten Knochenneubildung durch die vorliegende Studie nicht zu klären. Diesbezüglich wurden keine Untersuchungen durchgeführt. Interessant ist dabei die Tatsache, dass der potentiell toxische Effekt des Gentamicins durch eine auf 24 Stunden beschränkte Freisetzung des Antibiotikums entstehen muss, da während dieser Zeit bereits 98% des Wirkstoffes am Ort des Geschehens freigesetzt werden. Eine prolongierte Freisetzung über mehrere Wochen hinweg, die zu einem „chronischen“ Negativeffekt auf die Knochenzellen führen könnte, kann hiermit ausgeschlossen werden. Die Wirkstoffe der trägergebundenen Antibiotika werden in hohen Konzentrationen lokal am Ort der Infektion freigesetzt und erzeugen keinen toxischen Serumspiegel. Hierbei liegen die Dosen weit über den minimalen Hemmkonzentrationen und minimalen bakteriziden Konzentrationen der gängigsten Erreger von Knocheninfekten.

Die sich bei den Vier-Wochen-Tieren aufzeigenden Entzündungsreaktionen im Markraum, welche sich durch Ödeme, Fremdkörperriesenzellen und Nekrosezonen darstellen, stehen nach zwölf Wochen einem weitgehend intakten Knochenmark gegenüber. Es zeigen sich nur noch einzelne Nekrosezonen, Ödeme lassen sich nicht mehr finden. Somit kann man die Entzündungsreaktionen nach vier Wochen als Übergangsphase zwischen Fremdkörper-assoziiertes Entzündungsreaktion und knöcherner Regeneration interpretieren. Zudem liegt auf Grund der Bestrebung des Endost, die Implantate knöchern zu integrieren, die Annahme einer osteokonduktiven Potenz der Beschichtungen nahe. Die HA-Gruppe und die HA-Gentamicin-Gruppe zeigen quantitativ mehr Wachstum als nach vier Wochen Standzeit. Signifikant sind jedoch nur die Unterschiede im Knochenwachstum zwischen HA und den unbeschichteten K-Drähten der distalen und der Längsschliffen nach zwölf Wochen Standzeit. Auch dieses deutet auf eine osteokonduktive Potenz zumindest der Hydroxylapatitbeschichtung hin.

Im Bezug auf die Anzahl der Fremdkörperriesenzellen konnten keine statistisch signifikanten Differenzen zwischen den Beschichtungsgruppen aufgezeigt werden. Es kam zu einem Rückgang in allen Gruppen nach 12 Wochen im Vergleich zu den 4-Wochen-Ergebnissen. In keiner der Gruppen zeigte sich eine statistisch signifikante Reduktion. Allerdings waren in der Gruppe der unbeschichteten K-Drähten nach 12 Wochen tendenziell weniger Riesenzellen zu verzeichnen. In allen Gruppen waren die mehrkernigen Riesenzellen meist im nekrotischen bzw. ödematösen Knochenmark zu finden. Sie sind somit höchstwahrscheinlich als eine normale Reaktion auf das Operationstrauma und die intramedulläre Implantation des K-Drahtes zu werten, wie

sie in der Literatur beschrieben ist (Willert und Buchhorn, 1999). Zwischen HA und dem Erscheinen von Fremdkörperriesenzellen wurde eine Verbindung beschrieben (Gottlander et al., 1997; Røkkum et al., 2002). Fraglich verhindern von der Beschichtungsoberfläche freigesetzte HA-Partikel eine vollständige Phagozytose und lösen so eine Fremdkörperreaktion aus (Gottlander et al., 1997).

Das chemisch hergestellte und das Hydroxylapatit des natürlichen Knochens unterscheiden sich nach Stea et al. 1995 nicht voneinander. Dieses zeigt sich auch bei der Implantation von Hydroxylapatit in Bindegewebe. Es entwickelte sich bei subcutaner wie auch bei intramuskulärer Injektion um das HA herum eine Kapsel aus Bindegewebe (Denissen 1980, Piccuch 1982, Drobeck 1984, Harvey 1985, Sun 1997). Hochtemperaturbehandelte HA-Keramik unterscheidet sich im Prinzip nur durch die Form und die Größe ihrer Kristalle vom biologischen Hydroxylapatit (Liebendörfer und Tröster 1997). Eine gute Biokompatibilität des Hydroxylapatit nach Implantation in den Knochen, ohne Ausbildung einer Entzündungsreaktion, wird beispielsweise in den Versuchen von Rothstein et al. (1984), Tracy et al. (1984), Gumaer et al. (1986), Najjar et al. (1991), Moroni et al. 1994 aufgezeigt. Für gewöhnlich zeigen sich auch keine Fremdkörper- oder Abstoßungsreaktionen (Chang et al. 1983, Renooij 1985). Hydroxylapatit wird über Jahre im Organismus toleriert (Drobeck 1984, Gumaer 1986). Norda et al. (2000) zeigten dieses bei einer Untersuchung mit 52 Patienten, denen ein Bulbusersatz aus Hydroxylapatit 12 bis 41 Monate zuvor implantiert wurde. Es wurden jedoch milde Entzündungsreaktionen im Markraum nach der HA-Implantation zeigten sich jedoch bei Lehtinen et al. (1990). Diese waren hingegen nach sechs bis acht Wochen abgeheilt. Auch bei Frame et al. (1987) konnten in der Umgebung dichter HA-Keramiken einzelne Fremdkörperriesenzellen gefunden werden. Drobeck (1984) zeigte, dass in einigen der Fälle nach der Implantation einige isoliert liegende Makrophagen in Implantatnähe gefunden wurden. Wenn dieses jedoch geschah, so wurde sie nicht klinisch manifest, sondern war nur histologisch nachweisbar.

4.6 Ausblick

Auf Grund der sich verändernden Bevölkerungsstruktur mit der steigenden Lebenserwartung wird sich die Anzahl der notwendigen Endoprothesen in den westlichen Industrienationen stetig erhöhen (Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung, 2007; Kurtz et al., 2005). Wegen der Konsequenzen eines periprothetischen Infektes muss auf eine optimale Infektionsprophylaxe Wert gelegt werden. Die systemische

Antibiotikaprophylaxe ist bereits etabliert. Additiv scheint jedoch auch in der zementfreien Endoprothetik wie in der zementierten Technik eine lokale Prophylaxe sinnvoll. Bei der Beladung von Knochenzement mit Antibiotika liegen bereits umfassende und klinische Erfahrungen vor. Auf dieser Basis werden nun auf Versuche bezüglich der zementfreien Technik durchgeführt. Die ersten Ergebnisse einer Gentamicin-Beschichtung bezüglich antimikrobieller Wirksamkeit und Knocheneinwachsverhalten wurden in der hier vorliegenden Arbeit vorgestellt. Die Ergebnisse zeigen die Möglichkeit der Verbesserung der Infektionsprophylaxe durch eine Beschichtung des Implantates mit Gentamicin. Jedoch muss auf der anderen Seite die Auswirkung einer Beschichtung auf die knöchernen Intergration betrachtet werden. Dieses Zusammenspiel zwischen verbesserter Infektionsprophylaxe und ungestörter Knochenintegration wird die Herausforderung für die Forschung in diesem Gebiet bleiben.

In der Gesamtheit werden zementfreie Endoprothesen in Zukunft nicht mehr nur als biomechanische Implantate sein, sondern zugleich als Trägersubstanzen dienen, um die Infektionsprophylaxe und die knöchernen Integration zu verbessern. Hierbei geht es um eine „Biologisierung“ oder „Biofunktionalisierung des Implantates“. Es werden zusätzlich zu der etablierten HA-Beschichtung weitere Beschichtungstechnologien nach entsprechender präklinischer und klinischer Forschung in der zementfreien Endoprothetik etabliert werden, die dazu beitragen werden, die Behandlungsergebnisse für Patienten mit Gelenkendoprothesen zu verbessern.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das knöchernen Einwachsverhalten, die Implantatintegration und die Biokompatibilität von mit Hydroxylapatit bzw. mit Hydroxylapatit und Gentamicin beschichteten, zementfreien Prothesen zu untersuchen. K-Drähte mit diesen beiden Beschichtungen wurden in Kaninchentibiae eingebracht und diese nach einer Versuchsdauer von 4 bzw. 12 Wochen untersucht. Für die vorliegende Studie wurden 39 Tiere operiert, wobei jeweils 6 Tiere für die Gentamicin-HA-Beschichtung und die HA-Beschichtung für den 4-Wochen-Untersuchungszeitpunkt verwendet wurden. In der Langzeitstudie mit einer Versuchsdauer von 12 Wochen befanden sich jeweils 9 Tiere in den drei Untersuchungsgruppen: Gentamicin- HA-, HA- bzw. unbeschichteter K-Draht-Gruppe. Jedem der Tiere wurde ein 2,0 mm durchmessender Stahl-K-Draht mit der entsprechenden Beschichtung bzw. unbeschichtet entsprechend der Randomisierungsliste in den Tibiamarkkanal implantiert. Nach 4 und 12 Wochen wurden die Tiere euthanasiert, die Tibiae entnommen und drei verschiedene anatomischen Regionen der Tibia (proximale Metaphyse, Schaftbereich, distale Metaphyse) wurden bezüglich Knochenneubildung, direktem Knochen-Implantat-Kontakt und Anzahl von multinukleären Riesenzellen semiquantitativ und qualitativ analysiert. Nach vier Wochen Standzeit zeigten sich in den Untersuchungen zur Knochenneubildung und Biokompatibilität histomorphometrisch weder bei der Bestimmung der Knochenneubildungsrate noch beim Knochen-Implantat-Kontakt oder bei der Anzahl der Riesenzellen im Knochenmark statistisch signifikante Unterschiede zwischen der reinen HA- und der Gentamicin-HA-Gruppe. In der Detailhistologie kam es ebenfalls zu keinen fassbaren Unterschieden zwischen den einzelnen Gruppen, wobei jedoch in allen Gruppen Knochenmarknekroseherde und auch eine gewisse Anzahl von Fremdkörperriesenzellen zu verzeichnen waren.

Nach zwölf Wochen Standzeit zeigte sich in sowohl in der HA als auch in der HA-Gentamicin-Gruppe eine deutlich höhere Knochenneubildung als in den korrespondierenden Gruppen nach vier Wochen. Die HA- und auch die HA-Gentamicin-Beschichtung zeigten in allen Ebenen eine höhere Rate an Knochenneubildung als die unbeschichteten K-Drähte. Zu signifikanten Unterschieden kam es dabei jedoch nur bei dem Vergleich des HA beschichteten K-Draht im Bereich der distalen Metaphyse mit dem unbeschichteten K-Draht. Hingegen wies die HA-Gentamicin-Gruppe in diesem Bereich eine deutlich niedrigere Rate an neu gebildetem Knochen auf im Vergleich zum HA-Implantat. Der Unterschied zu der HA-Beschichtung besaß mit einem $p=0,05$ nahezu statistische Signifikanz, aber statistisch signifikante

Unterschiede zwischen der HA- und der HA-Gentamicin-Gruppe nach 12 Wochen bestanden somit nicht. Die Anzahl der Fremdkörperriesenzellen war in allen Gruppen deutlich rückläufig und ohne statistische Signifikanz zwischen den Gruppen.

Resultierend aus diesen Beobachtungen kann gesagt werden, dass die Knochenneubildungstendenz und Fremdkörperreaktion der Implantate mit Gentamicinbeschichtung keine signifikanten Unterschied zu der der gentamicinfreien, ausschließlich mit HA beschichteten K-Drähte aufweist und somit von einer guten Biokompatibilität der Gentamicin-HA-Beschichtung ausgegangen werden kann.

6 SUMMARY

The purpose of this study was the assessment of new bone formation, implant integration and of the biocompatibility of gentamicin –HA coated K-wires in a rabbit model.

In total, the study was conducted with 39 rabbits for two time points. For the 4-week study 12 rabbits were randomly assigned to the gentamicin-HA or pure HA-coating group. For the 12-week study, 27 animals were tested with a gentamicin-HA, HA or uncoated K-wire, with 9 animals per group, respectively. A 2.0mm steel K-wire with the respective coating was placed into the intramedullary canal of the tibia in the rats. After the observation phase of 4 or 12 weeks, the tibiae were assessed. Three different areas of the tibia, namely the proximal metaphysis, the shaft area and the distal metaphysis were examined. The applied assessment criteria were quantitative and qualitative histology for new bone formation, direct implant bone contact and formation of multinucleated giant cells.

There were no statistically significant differences between the bone formation rate, the direct bone-implant contact and the number of multinucleated giant cells between the HA- and gentamicin-HA –groups after the initial four-weeks observation period. These results were confirmed by detailed histological investigations on new bone formation and biocompatibility of the gentamicin coatings. No major differences could be detected and bone marrow necrosis and multinucleated giant cells could be found for all implant type regions.

After 12 weeks, there was a strong enhancement of new bone formation in the HA- and in the gentamicin-HA group compared to the 4-weeks results. Both HA and the gentamicin-HA group showed higher new bone formation compared to the uncoated K-wire- group. However, there was only a statistically significant difference in new bone formation between the HA- and the uncoated implant group at the distal metaphysis. There was a strong reduction in new bone formation in this area in the HA-gentamicin group compared to the HA group which reached almost statistical significance ($p=0.05$). However, there were no statistically significant differences in new bone formation or direct implant-bone contact between the two groups. The number of multinucleated giant cells decreased in all groups without any statistically significant differences of the groups.

In conclusion, there was no statistically significant differences between the HA and the gentamicin-HA group in bone formation, implant integration or in the number of giant cells. Therefore, a good biocompatibility of the gentamicin-HA coating can be assumed.

7 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Entwässerungsplan	S. 34
Tab. 2:	Kunststoffinfiltration	S. 34
Tab. 3:	Darstellung der prozentualen Knochenneubildungsrate der verschiedenen Beschichtungen in Abhängigkeit von der Schnittebene Bezogen auf die ROI	S. 45
Tab. 4:	Angabe des Prozentualen Anteils des neu gebildeten Knochens mit direktem Kontakt zum Implantat	S. 46
Tab. 5:	Angabe der Anzahl der Riesenzellen im Bereich der ROI im Längsschliff in Zellen/mm ² , 4 Wochen Standzeit	S. 46
Tab. 6:	Darstellung der prozentualen Knochenneubildungsrate der verschiedenen Beschichtungen in Abhängigkeit von der Schnittebene Bezogen auf die ROI	S. 55
Tab. 7:	Angabe des Prozentualen Anteils des neu gebildeten Knochens mit direktem Kontakt zum Implantat	S. 55
Tab. 8:	Angabe der Anzahl der Riesenzellen im Bereich der ROI im Längsschliff in Zellen/mm ² , 12 Wochen Standzeit	S. 56

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Strukturformel des Antibiotikums Gentamicin	S. 26
Abb. 2:	Beschichtete Kirschner-Drähte	S. 27
Abb. 3:	Hydroxylapatitbeschichtung	S. 28
Abb. 4:	Einteilung der Versuchstiere	S. 29
Abb. 5a:	Steril abgedecktes Operationsfeld	S. 32
Abb. 5b:	Eröffnung der Markhöhle mit einem Pfriem	S. 32
Abb. 5c:	Einbringen des Kirschner-Drahtes	S. 32
Abb. 5d:	Verschluss der Wunde mittels Hautnaht	S. 32
Abb. 6a&b:	Darstellung der Technik der Histomorphometrie der Knochenneubildung bei Querschnittpräparaten	S. 39
Abb. 7a&b:	Darstellung der Technik der Histomorphometrie zur Bestimmung der Knochenneubildung bei Längsschnittpräparaten	S. 40
Abb. 8a&b:	Darstellung der Technik der Histomorphometrie zur Bestimmung des direkten Knochen-Implantatkontaktes	S. 41
Abb. 9:	Technik zur Bestimmung der Anzahl der Fremdkörperriesenzellen bei Längsschnitten aus dem Schaftbereich	S. 42
Abb. 10:	Detail der distalen Diaphyse, HA-Beschichtung, vier Wochen Versuchsdauer. Mehrkernige Riesenzellen im Knochenmark	S. 47
Abb. 11:	Distale Diaphyse nach vier Wochen Standzeit	S. 47
Abb. 12:	Tibiaschaft nach 4 Wochen Standzeit eines mit HA beschichteten Implantates	S. 48
Abb. 13:	Übersicht der distalen Diaphyse. Die neugebildeten Bälkchen bestehen aus Lamellenknochen und Herden von Geflechtknochen	S. 49
Abb. 14:	Detail der distalen Diaphyse, HA-Beschichtung, vier Wochen Versuchsdauer. Mehrkernige Riesenzellen im Knochenmark	S. 49
Abb. 15:	Detail der distalen Diaphyse bei mit HA beschichtetem Implantat. Nach vier Wochen zeigen sich wenige endostale Knochenneubildungen; ödematisierte Areale liegen im Knochenmark	S. 50
Abb. 16:	Übersicht der proximalen Diaphyse, 4 Wochen Beobachtungsdauer, Beschichtung des Implantates: HA-Gentamicin. Die inselförmigen, heller tingierten Areale in der	

	Kortikalis spiegeln Mineralisierungsstörungen wieder	S. 51
Abb. 17:	Detailansicht der neugebildeten Knochenbälkchen im Bereich der distalen Diaphyse bei einem Implantat mit HA-Gentamicin-Beschichtung und einem Beobachtungszeitraum von 4 Wochen	S. 51
Abb. 18:	Detailansicht der markraum-nahen Kortikalis. HA-Gentamicin-Implantat, Beurteilung nach 4 Wochen. Durch osteoklastäre Aktivitäten hervor gerufene knöcherne Substanzverluste, die mit faserreichem Bindegewebe aufgefüllt sind	S. 52
Abb. 19:	Detailaufnahme des Knochenmarks im Bereich der proximalen Diaphyse. Nekrotisches Knochenmark mit polymorphkernigen Granulozyten	S. 52
Abb. 20:	Detail der distalen Diaphyse. Implantatassoziierte Knochenneubildungen im Stadium des Geflechtknochens. Das Knochenmark ist größtenteils nekrotisch	S. 53
Abb. 21:	Detailvergrößerung aus einem HE-gefärbten Schliff der distalen Diaphyse. Die schmale Knochenlamelle weist keinen direkten Kontakt zum Implantat auf. Das Knochenmark ist durchsetzt von regenerativen Prozessen	S. 57
Abb. 22:	Die implantatassoziierte Knochenneubildung besteht überwiegend aus Geflecht-knochen. Der Draht ist zu 80% knöchern umbaut	S. 58
Abb. 23a:	Querschnitt der proximalen Metaphyse. Hier zeigt sich eine zirkuläre, starke Knochenbildung um das Implantat herum. Hierbei gehen intakte Knochen trabekel in Richtung auf das Implantat	S. 58
Abb. 23b:	Detailvergrößerung der distalen Diaphyse	S. 59
Abb. 24:	Vergrößerung aus der mittleren Diaphyse. Strukturell intakter Lamellenknochen steht in unmittelbarem Materialkontakt. Die Implantat-assoziierte Oberfläche des Knochens ist durch Remodelling gekennzeichnet	S. 60
Abb. 25:	Die mittlere Diaphyse	S. 60
Abb. 26:	Übersicht der proximalen Diaphyse. Neugebildete Bälkchen aus Lamellenknochen überbrücken eine weite Wegstrecke im Markraum und umschließen zu ca. 50% die Zirkumferenz des Implantates. Das Knochenmark ist strukturell intakt	S. 61
Abb. 27a:	Detail aus der proximalen Diaphyse mit Knochenbälkchen und zellreichem Knochenmark	S. 61
Abb.27b:	Ein artifizierlicher Spaltraum trennt die den neugebildeten Knochen von der Implantatoberfläche	S. 61

9 LITERATURVERZEICHNIS

- Alt V., Schnettler R. (2007) Infektionen. In: Wirth C, Mutschler W, Hrsg. Praxis der Orthopädie und Unfallchirurgie. Thieme, Stuttgart, New York. S. 170-182.
- Alt V., Bitschnau A., Oesterling J., Sewing A., Meyer C., Kraus R., Meissner S. A., Wenisch S, Domann E., Schnettler R. (2006) The effects of combined gentamicin-hydroxyapatite coating for cementless joint prostheses on the reduction of infection rates in a rabbit infection prophylaxis model. *Biomaterials*; 27(26): 4627-34.
- American College of Rheumatology (2000) Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee: 2000 update. American College of Rheumatology Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines. *Arthritis Rheumatology*; 43: 1905-1919.
- Amling M., Dellling G. (1997) Differenzierung und Funktion der Osteoklasten Neue Ergebnisse und Modellvorstellungen. *Osteologie* : 5-14.
- Anguita-Alonso P., Hanssen A.D., Osmon D.R., Trampuz A., Steckelberg J.M., Patel R. (2005) High rate of aminoglycoside resistance among staphylococci causing prosthetic joint infection. *Clinical Orthopaedic and Related Research*; 439: 43-47.
- Arciola C.R., Campoccia D., Montanaro L. (2002) Effects on antibiotic resistance of *Staphylococcus epidermidis* following adhesion to polymethylmethacrylate and to silicone surfaces. *Biomaterials*; 23:1495-1502.
- Bahn S.L. (1962) An investigation into the use of plaster of paris in filling defects in membranous bones. Master thesis. Boston University School of Medicine, Boston Mass.
- Benninghoff, A. (1994) Anatomie. Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. Band 1. Urban & Schwarzenberg, 15. Auflage, München Wien Baltimore, S. 145-159.

- Bentley S.A. (1982) Collagen synthesis by bone marrow stromal cells: a quantitative study. *British Journal of Haematology*; 50: 491-497.
- Bentley S.A., Talka T.S. (1983) Fibronectin-mediated attachment of hematopoietic cells to stromal elements in continuous bone marrow cultures. *Experimental Hematology*; 11: 129-138.
- Barbari E.F., Hanssen A.D., Duffy M.C., Steckelberg J.M., Ilstrup D.M., Harmsen W.S., Osmon D.R. (1998) Risk factors for prosthetic joint infection: case-control study. *Clinical Infectious Diseases*; 27: 1247-1254.
- Boyan B.D., Dean D.D., Lohmann C.H., Cochran D.L., Sylvia V.L., Schwartz Z. The Titanium-Bone Cell Interface In Vitro: The role of the surface in promoting osteointegration. In: *Titanium in Medicine*, DM Brunette, P Tengvall, P Thomsen, and M Textor (2001a), Springer-Verlag, Heidelberg, Germany; 561-585.
- Bradley J.D., Brandt K.D., Katz B.P., Kalasinski L.A., Ryan S.I. (1991) Comparison of an antiinflammatory dose of ibuprofen, an analgesic dose of ibuprofen and acetaminophen in the treatment of patients with osteoarthritis of the knee. *New England Journal of Medicine*; 325: 87-91.
- Bratzler D.W., Houck P.M. (2004) Antimicrobial prophylaxis for surgery. *Clinical Infectious Diseases* 38: 1706-1715.
- Breithaupt H. (2004) Orale und parenterale Antibiotikatherapie. In: Schnettler R., Steinau U. (Hrsg.). *Septische Knochenchirurgie*. Thieme, Stuttgart, Berlin, New York, S. 76-81.
- Breusch S.J., Aldinger P.R., Thomsen M., Ewerbeck V., Lukoschek M. (2000a) Verankerungsprinzipien in der Hüftendoprothetik – Teil I: Prothesenstiel. *Der Unfallchirurg*; 103: 918-931.
- Breusch S.J., Aldinger P.R., Thomsen M., Ewerbeck V., Lukoschek M. (2000b) Verankerungsprinzipien in der Hüftendoprothetik – Teil II: Pfannenkomponente. *Der Unfallchirurg*; 103: 1017-1031.

- Buchholz H.W., Engelbrecht E. (1970) Über die Depotwirkung einiger Antibiotika bei Vermischung mit dem Kunstharz Palacos. *Chirurgie*; 40: 511-515.
- Buchholz H.W., Engelbrecht E., Lodenkaemper H., Roettger J., Siegel A., Elson R.A. (1981) Management of deep infection of total hip replacement. *Journal of Bone and Joint Surgery - British Volume*; 63: 342-353.
- Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung: www.bib-demographie.de/index2.html. Aufrufdatum der Internetseite: 18.07.2010.
- Cantoni L., Glauser M.P., Bille J. (1990) Comparative efficacy of daptomycin, vancomycin and cloxacillin for the treatment of *Staphylococcus aureus* endocarditis in rats and role of test conditions in this determination. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 34: 2348-2353.
- Chandler H.P., Reineck F.T., Wixson R.L., McCarthy J.C.
Total hip replacement in patients younger than thirty years old: A 5 year follow-up study. *The Journal of Bone and Joint Surgery – American Volume* 1981; 63: 1426-1434
- Chambers T.J. (1989) The origin of the osteoclast. In: *Bone and Mineral Research*, edited by Peck W.A., Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam: 1-25.
- Chang, Y., Goldberg, V, Caplan, A. (2006) Toxic Effects of Gentamicin on Marrow-derived Human Mesenchymal Stem Cells. *Clinical Orthopaedics & Related Research*; 452: 242-249
- Chang C.S, Matukas V.J., Lemons J.E. (1983) Histologic study of hydroxylapatite as an implant material for mandibular augmentation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*; 41: 729-737
- Charnley J. (1961) Arthroplasty of the hip: A new operation. *Lancet* 27:1129-1132.

- Charnley J. (1970) The reaction of bone to self-curing acrylic cement. A long-term histological study in man. *The Journal of Bone and Joint Surgery – British Volume*; 52: 340-353.
- Charnley J., Crawford W.J. (1968) Histology of bone in contact to self-curing acrylic cement. *The Journal of Bone and Joint Surgery – British Volume*; 50: 228.
- Chiu F.Y., Chen C.M., Lin C.F., Lo W.H. (2002) Cefuroxime-impregnated cement in primary total knee arthroplasty: a prospective, randomized study of three hundred and forty knees. *Journal of Bone Joint Surgery – American Volume*; 84: 759-762.
- Cooper C. (1998) Osteoarthritis: Epidemiology. Hrsg.: Klippel J., Dieppe P., *Rheumatology*, Mosby, London, S. 2.1-2.8 .
- Cooper R., Milgram J. W., Robinson R.A. (1966) Morphology of the osteon. *The Journal of Bone and Joint Surgery – American Volume*; 48 (7): 1239-1271.
- Dahners L.E., Funderburk C.H (1987) Gentamicin-loaded plaster of paris as a treatment of experimental osteomyelitis in rabbits. *Clinical Orthopaedics and Related Research*; 219: 278-282.
- D'Antonio J.A., Capello W.N., Manley M.T. (1996) Remodeling of bone around hydroxyapatite-coated femoral stems. *The Journal of Bone and Joint Surgery – American Volume*; 78: 1226-1234.
- Daschner F. (2002) *Antibiotika am Krankenbett*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, S. 87-88.
- Davey P.J., Haslam J.M., Linnane A.W. (1970) Biogenesis of mitochondria 12. The effects of aminoglycoside antibiotics on the mitochondrial and cytoplasmic protein-synthesizing systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemical and Biophysics* 136: 54-64.

- Debrunner, A.M. (2002) Orthopädie - Orthopädische Chirurgie. Patientenorientierte Diagnostik und Therapie des Bewegungsapparates. Verlag Hans Huber, 4. Auflage, Bern, S. 78-79, 579-594, 986-1011.
- De Lalla F. (2001) Antibiotic prophylaxis in orthopedic prosthetic surgery. *Journal of Chemotherapy* 13: 48-53.
- Denissen H.W., de Groot K., Makkes P.Ch., van den Hooff A., Klopper P. J. (1980) Tissue response to dense apatite implants in rats. *Journal of Biomedical Material Research, Part A*; 14: 713-721.
- Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie Qualitätssicherung in der Rheumatologie: Coxarthrose – Gonarthrose. http://www.rheumanet.org/qs_dgrh/default.htm. Zugriffsdatum: 28.10.2008
- Donath K., Breuner G. (1982) A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *Journal of Oral Pathology*; 11: 318-326.
- Donath K. (1988) Vergleichende histologische Untersuchung verschiedener enossaler Implantattypen. *Zeitschrift für Zahnärztliche Implantologie*; IV: 106-108.
- Drobeck H.P., Rohrer M.D., Beck-Mannagetta J. (1984) Histologic observation of soft tissue responses to implanted, multifaceted particles and discs of hydroxylapatite. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*; 42: 143-149
- Eccles M., Freemantle N., Mason J. (1998) North of England evidence based guideline development project: summary guideline for non-steroidal anti-inflammatory drugs versus basic analgesia in treating the pain of degenerative arthritis. The North of England Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Guideline Development Group. *British Medical Journal*; 317: 526-530.
- Effenberger H, Imhof M (2003) Primäre Hüftendoprothetik. In: Wirth CJ und Zichner L (Hrsg.), *Orthopädie und Orthopädische Chirurgie. Becken, Hüfte*. Thieme, Stuttgart, New York. S. 330-381.

- Elek S.D., Conen P.E. (1957) The virulence of staphylococcus pyogenes for man. *British Journal of Experimental Pathology*; 38: 573-586.
- Ellington J.K., Harris M., Webb L., Smith B., Smith T., Tan K., Hudson M. (2003) Intracellular Staphylococcus aureus. A mechanism for the indolence of osteomyelitis. *Journal of Bone Joint Surgery - British volume* 85: 918-921.
- Endres S., Efe T., Schickl G., Wilke A. (2003) Analyse einer humanen Knochenmark-Langzeitkultur. Teil II: Extrazellulärmatrix und deren Mineralisierung. *Osteologie*; 12: 184-196.
- Engesaeter L.B., Lie S.A., Espehaug B., Furnes O., Vollset S.E., Havelin L.I. (2003) Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty: effects of antibiotic prophylaxis systemically and in bone cement on the revision rate of 22,170 primary hip replacements followed 0-14 years in the Norwegian Arthroplasty Register. *Acta Orthopaedica Scandinavica*; 74: 644-651.
- Fishman N.O., Brennan P.J. (1997) Optimizing use of antimicrobial agents: pitfalls and consequences of inappropriate therapy. *Journal of Clinical Outcome Management*; 4: 25-33.
- Fisman D.N., Reilly D.T., Karchmer A.W., Goldie S.J. (2001) Clinical effectiveness and cost-effectiveness of 2 management strategies for infected total hip arthroplasty in the elderly. *Clinical Infectious Diseases*; 32: 419–430.
- Frame J.W., Rout P.G., Browne R.M. (1987) Ridge augmentation using solid and porous hydroxylapatite particles with and without autogenous bone or plaster. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*; 45: 771-777.
- Fritz M.E. (1999) Two-stage implant systems. *Advances in Dental Research*; 13: 162-169.
- Galdbart J.O., Allignet J., Tung H.S., Ryden C., El Solh N. (2000) Screening for Staphylococcus epidermidis markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. *The Journal of Infectious Diseases*; 182: 351–355.

- Geipel U., Herrmann M. (2005) The infected implant: Bacteriology. Unfallchirurg; 108: 961-975.
- Geneser F. (1990) Histologie. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, S. 205-209 und S. 216-237.
- Gluck T. (1891) Referat über die durch das moderne chirurgische Experiment gewonnenen positiven Resultate betreffend die Naht und den Ersatz von Defecten höherer Gewebe, sowie über die Verwerthung resorbirbarer und lebendiger Tampons in der Chirurgie. Archiv für Klinische Chirurgie; 41: 187.
- Gottlander M., Johansson C.B., Albrektsson T. (1997) Short- and long-term animal studies with a plasma-sprayed calcium phosphate-coated implant. Clinical Oral Implants Research; 8: 345-351.
- Gradinger R., Hecht H., Gollwitzer H. (2007) Degenerative Erkrankungen. Koxarthrose. In: Wirt CJ und Mutschler W. Praxis der Orthopädie und Unfallchirurgie. Thieme Stuttgart, New York, S. 601-606.
- Gristina A.G., Costeron J.W. (1985) Bacterial adherence to biomaterials and tissue. The significance of its role in clinical sepsis. The Journal of Bone and Joint Surgery - American Volume 67: 264-273.
- Gumaer K.I., Sherer A.D., Slighter R.G., Rothstein S. S., Drobeck H.P. (1986) Tissue response in dogs to dense hydroxylapatite implantation in the femur. The British journal of oral and maxillofacial surgery; 44: 618-627.
- Gustilo R.B., Anderson T.J. (1976) Prevention of infection in the treatment of one thousand and twenty-five open fractures of long bones: retrospective and prospective analyses. Journal of Bone and Joint Surgery - American Volume; 58: 453-458.
- Haboush E.J. (1953) A new operation for arthroplasty of the hip based on biomechanics, photoelasticity, fast setting dental acrylic, and other considerations. Bulletin Hospital for Joint Diseases; 14: 242–247.

- Haleem A.A., Rouse M.S., Lewallen D.G., Hanssen A.D., Steckelberg J.M., Patel R. (2004) Gentamicin and vancomycin do not impair experimental fracture healing. *Clinical Orthopaedic and Related Research*; 427: 22-24.
- Hanssen A.D., Rand J.A. (1999) Evaluation and treatment of infection at the site of a total hip or knee arthroplasty. *Instructional Course Lectures 1999*; 48: 111-122.
- Hanssen A.D., Osmon D.R. (1999) The use of prophylactic antimicrobial agents during and after hip arthroplasty. *Clinical Orthopaedic Related Research*; 369: 124-138.
- Hanssen A.D., Osmon D.R., Nelson C.L. (1997) Prevention of deep periprosthetic joint infection. *Instructional Course Lectures*; 46: 555-567.
- Harvey W.K., Pincock L.J., Matukas V.J., Lemons J.E. (1985) Evaluation of a subcutaneously implanted Hydroxylapatite-Avitene mixture in rabbits. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*; 43: 277-280.
- Havelin L.I., Engesaeter L.B., Espehaug B., Furnes O., Lie S.A., Vollset S.E. (2000) The Norwegian Arthroplasty Register: 11 years and 73,000 arthroplasties. *Acta Orthopaedica Scandinavia*; 71: 337-353.
- Hedley A.K., Gruen T.A., Ruoff D.P. (1988) Revision of failed total hip arthroplasties with uncemented porous-coated anatomic components. *Clinical Orthopaedics and Related Research*; 235: 75.
- Holmes R., Mooney V., Bucholz R., Tencer A. (1984) A coralline hydroxyapatite bone graft substitute. Preliminary report. *Clinical Orthopaedics and Related Research*; 188: 252-262.
- Hope P.G., Kristinsson K.G., Norman P., Elson R.A. (1989) Deep infection of cemented total hip arthroplasties caused by coagulase-negative staphylococci. *Journal of Bone and Joint Surgery - British Volume* 71: 851-855.

- Huddleston P., Steckelberg J., Hanssen A., Rouse M., Patel R. (2000) Ciprofloxacin inhibition of experimental fracture healing. *Journal of Bone Joint Surgery - American Volume*; 82:161–173.
- Ince A., Schütze N., Hendrich C, Jakob F., Eulert J., Löhrl J.F. (2007) Effect of polyhexanide and gentamycin on human osteoblasts and endothelial cells. *Swiss Medical Weekly*; 137:139-45
- Ince A, Schütze N., Karl N., Löhrl J.F. Eulert J. (2006) Gentamicin negatively influenced osteogenic function in vitro. *International Orthopaedics*; 31(2): 223–228.
- Jiranek W.A., Hanssen A.D., Greenwald A.S. (2006) Antibiotic-loaded bone cement for infection prophylaxis in total joint replacement. *Journal of Bone and Joint Surgery - American Volume* 88: 2487-2500.
- Jorring K. (1980) Osteoarthritis of the hip : epidemiology and clinical role. *Acta orthopaedica Scandinavia*; 51: 523-530.
- Josefsson G., Kolmert L. (1993) Prophylaxis with systemic antibiotics versus gentamicin bone cement in total hip arthroplasty: a ten year survey of 1688 hips. *Clinical Orthopaedics and Related Research*; 292: 210-214.
- Judet R., Judet J. (1952). Résection-reconstruction de la hanche: arthroplastie par prothèse acrylique. Expansion Scientifique Française, Paris.
- Junqueira L.C., Carneiro J. (1996) Histologie. Lehrbuch der Cytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen. Springer Verlag, 4. Auflage, Bern, 190-217.
- Kaiser E., Dellling G. (2002) Osteozyten - ein Organ im Aufwind morphologischer und zellbiologischer Forschung! *Osteologie*; 219-236.
- Kavanagh B., Ilstrup D.M., Fitzgerald R.H. (1985) Revision total hip arthroplasty. *Journal of Bone and Joint Surgery - American Volume*; 67: 517.

- Kayser F.H., Bienz K.A., Eckert J., Zinkernagel R.M. (2001) Medizinische Mikrobiologie Verstehen-Lernen-Nachschnellen. Thieme, Stuttgart, New York, S. 239-244 und S. 427-428.
- Kendall R.W., Duncan C.P., Beauchamp C.P. (1995) Bacterial growth on antibioticloaded acrylic cement. A prospective in vivo retrieval study. *Journal of Arthroplasty*; 10: 817-822.
- Kendall R.W., Duncan C.P., Smith J.A., Ngui-Yen J.H. (1996) Persistence of bacteria on antibiotic loaded acrylic depots. A reason for caution. *Clinical Orthopaedics and Related Research*; 329: 273-280.
- Kent J.N., Finger I.M., Quinn J.H., Guerra L.R. (1986) Hydroxylapatite alveolar ridge reconstruction. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*; 44: 37-49.
- Kent J.N., Zide M.R., Kay J.N., Jarcho M. (1986) Hydroxylapatite blocks and particles as bone graft substitutes in orthognatic and reconstructive surgery. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*; 44: 597-605.
- Kirschenbaum I.C.H. (1991) Basic principles of hydroxyapatite in joint replacement surgery. *Seminars Arthroplasty*; 2: 252-259.
- Klawitter J.J., Bagwell J.G., Weinstein A.M., Sauer B.W. (1976) An evaluation of bone growth into porous high density polyethylene. *Journal of Biomedical Materials Research*; 10: 311-323.
- Küsswetter W, Rütt A (1985) Schwierigkeiten und Risiken bei zementfreien Hüftendoprothesen. *Aktuelle Schwerpunkte in Chirurgie und Orthopädie* 29: 8-12.
- Kurtz S., Mowat F., Ong K., Chan N., Lau E., Halpern M. (2005) Arthroplasty in the United States from 1990 Through 2002. *Journal of Bone Joint Surgery - American Volume*; 87: 1487-1497.
- Lazzarini L., Mader J.T., Calhoun J.H. (2004) Osteomyelitis in Long Bones. *Journal of Bone and Joint Surgery - American Volume* 86: 2305-2318.

- Lehtinen R., Kuusilehto A., Nikkanen U.-M. (1990) Bone responses to hydroxyapatite particles of different shapes in rabbit tibia. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*; 48: 1075-1078.
- Leonhardt H. (1990) *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. Taschenlehrbuch der gesamten Anatomie. Band 3.* Thieme, 8. Auflage, Stuttgart New York, 137-151.
- Lew D.P., Waldvogel F.A. (2004) Osteomyelitis. *Lancet*; 364: 369-379.
- Lindgren L (2001) Joint prosthetic infections: A success story. *Acta Orthopaedica Scandinavia*; 72: 553-556.
- Liebendörfer A., Tröster S. (1997) Hydroxyapatitkeramik im klinischen Einsatz. *Unfallchirurgie*; 23: 60-68.
- Linder L., Hansson H. (1983) Ultrastructural aspects of the interface between bone and cement in man. Report of three cases. *Journal of Bone and Joint Surgery*; 65 : 646-649.
- Lundgren S., Carling T., Hjalms G., Juhlin C., Rastad J., Pihlgren U., Rask L., Akerstrom G., Hellman P. (1997) Tissue distribution of human p330/megalin, a putative Ca(2+)-sensing protein. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*; 45: 383-392.
- Malchau H., Herberts P., Ahnfelt L. (1993) Prognosis of total hip replacement in Sweden. Follow-up of 92,675 operations performed 1978-1990. *Acta Orthopaedica Scandinavia*; 64: 497-506.
- Malcom A.J. (1999) Pathology of cemented low-friction arthroplasties in autopsy specimens. In: Older J (ed) *Implant bone interface.* Springer, Berlin Heidelberg New York Tokio, 77-82.
- Maloney W.J., Jasty M., Burke D.W., O'Connor D.O., Zalenski E.B., Bragdon C.R., Harris W.H. (1989) Biomechanical and histologic investigation of cemented total hip arthroplasties. *Clinical Orthopaedics*; 249: 129-140.

- Marcellscu C.E., Osmon D.R. (2005) Antibiotic prophylaxis in orthopaedic surgery. *Infectious Disease Clinics of North America*; 19: 931-946.
- Marchisio P.C., Naldini L., Cirillo D., Primavera M.V., Teti A., Zambonin-Zallone A., (1984) Cell-substratum interactions of cultured avian osteoclasts is mediated by specific adhesion structures. *The Journal of Cell Biology*; 99: 1696-1705.
- Martino L. J., Yeager V.L., Tylor J.J. (1979) An ultrastructural study of the role of calcification nodules in the mineralization of woven bone. *Calcified Tissue International*; 27: 57-64.
- McAlindon T.E., LaValley M.P., Gulin J.P., Felson D.T. (2000) Glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis: a systematic quality assessment and meta-analysis. *Journal of the American Medical Association*; 283: 1469-1475.
- McKee K (1951) Artificial hip joint. *Journal of Bone and Joint Surgery British Volume* 33: 465.
- Moestrup S.K., Cui S., Vorum H., Bregengard C., Bjorn S.E., Norris K., Gliemann J., Christensen E.I. (1995) Evidence that epithelial glycoprotein 330/megalin mediates uptake of polybasic drugs. *Journal of Clinical Investigation*; 96: 404- 1413.
- Moroni A., Caja V.L., Stea S., Visentin M. (1994) Improvement of the bone external fixation pin interface hydroxyapatite coating. *Bioceramics*; 8: 174-176
- Najjar T.A., Lerdrit W., Parsons J.R. et al. (1991) Enhanced osseointegration of hydroxylapatite implant material. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*; 71: 9-15.
- Neff L., Gailit J., Baron R. (1995) Ultrastructural demonstration of the av subunit of the vitronectin receptor in the sealing zone of resorbing osteoclasts. *Journal of Bone and Mineral Research*; 10 suppl. 1: 329.
- Neut D., van de Belt H., van Horn J.R., van der Mei H.C., Busscher H.J. (2003) Residual gentamicin-release from antibiotic-loaded polymethylmethacrylate beads after 5 years of implantation. *Biomaterials*; 24: 1829-1831.

- Nickel J.C., Ruseska I., Wright J.B., Costerton J.W. (1985) Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 27: 619-624.
- Nijweide P.J., Burger E.H., Feyen J.H. (1986) Cells of bone: Proliferation, differentiation and hormonal regulation. *Physiological Reviews*; 66: 855-886.
- Nikulin A., Ljubovic E. (1956) Der Gipsstift in der experimentellen Knochenregeneration. *Acta Med Jugl*; 10: 1-36.
- Norda A. G., Meyer-Rüsenberg H. W. (2000) Long-term results of Implantation of hydroxylapatite as artificial eye. *Ophthalmology*; 97: 91-9.
- Oosterbos C.J., Rahmy AI, Tonino AJ, Witpeerd W (2004) High survival rate of hydroxyapatite-coated hip prostheses: 100 consecutive hips followed for 10 years. *Acta Orthopaedica Scandinavia*; 75: 127-133.
- Pellicci P.M., Salvati E.A., Robinson H.J. (1979) Mechanical failures in total hip replacement requiring reoperation. *Journal of Bone and Joint Surgery – American Volume*; 61: 28-36.
- Perry A.C., Prpa B., Rouse M.S., Piper K.E., Hanssen A.D., Steckelberg J.M., Patel R. (2003) Levofloxacin and trovafloxacin inhibition of experimental fracturehealing. *Clinical Orthopaedic and Related Research*; 414: 95-100.
- Pierschbacher M.D., Ruoslahti E. (1984) Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*; 309: 30-33.
- Piecuch J.F. (1982) Extraskelatal implantation of a porous hydroxyapatite ceramic. *Journal of Dental Research*; 61 (12): 1458-1460.
- Plötz W., Rechl H., Burgkart R.(1993) Derzeitiger Stand der zementlosen Hüftgelenksendoprothetik. *Fortschritte in der Medizin*; 24: 369-373.

- Posner A.S. (1985) The mineral of bone. *Clinical Orthopaedics and Related Research*; 200: 87-99.
- Prallet B., Male P., Neff L., Baron R. (1992) Identification of a functional mononuclear precursor of the osteoclast in chicken medullary bone marrow cultures. *Journal of Bone and Mineral Research*; 7: 405-414.
- Puleo D.A., Bizios R. (1991) RGDS tetrapeptide binds to osteoblasts and inhibits fibronectin-mediated adhesion. *Bone*; 12: 271-276.
- Radin S., Campbell J. T., Ducheyne P., Cuckler J. M. (1997) Calcium phosphate ceramic coatings as carriers of vancomycin. *Biomaterials*; 18(11):777-82.
- Ramage G., Tunney M.M., Patrick S., Gorman S.P., Nixon J.R. (2003) Formation of *Propionibacterium acnes* biofilms on orthopaedic biomaterials and their susceptibility to antimicrobials. *Biomaterials*; 24:3221-3227.
- Rammelt S, Illert T, Bierbaum S, Scharnweber D, Zwipp H, Schneiders W (2006) Coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulphate. *Biomaterials*; 27: 5561-5571.
- Renooij W. (1985) Bioresorption of ceramic strontium-85-labeled calcium phosphate implants in dog femora. *Clinical Orthopaedics and Related Research*; 197: 272-283.
- Rezania A., Thomas C.H., Branger A.B., Waters C.M., Healy K.E. (1997). The detachment strength and morphology of bone cells contacting materials modified with a peptide sequence found within bone sialoprotein. *Journal of Biomedical Material Research*; 37: 9-19.
- Røkkum M., Reigstad A., Johansson C.B. (2002) HA particles can be released from well-fixed HA-coated stems: histopathology of biopsies from 20 hips 2-8 years after implantation. *Acta Orthopaedica Scandinavia*; 73: 298-306.
- Rössler S., Sewing A., Stolzel M., Born R., Scharnweber D., Dard M., Worch H. (2003) Electrochemically assisted deposition of thin calcium phosphate coatings

- at near-physiological pH and temperature. *Journal of Biomedical Material Research Part A* 64: 655-663.
- Rössler H., Rütther W. (1996) *Orthopädie*. Urban & Schwarzenberg, 1996, 17. Auflage, S. 9-10 und S. 158-159.
 - Rohen J.W., Lütjen-Drecoll E. (2000) *Funktionelle Histologie*. Schattauer, 4. Auflage, Stuttgart New York, 116-126.
 - Rothstein S.S., Paris D.A., Zacek M.P (1984) Use of hydroxylapatite for the augmentation of deficient alveolar ridges. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*; 42: 224-230.
 - Ruchholtz S., Träger G., Nast-Kolb D. (2004) Die infizierte Hüftgelenksendoprothese. *Der Unfallchirurg*; 107: 307-317.
 - Rupp M.E., Ulphani J.S., Fey P.D., Bartscht K., Mack D. (1999) Characterization of the importance of polysaccharide intercellular/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. *Infection and Immunity*; 67: 2627-2632.
 - Sabokbar A, Kudo O, Athanasou NA (2003) Two distinct cellular mechanisms of osteoclast formation and bone resorption in periprosthetic osteolysis. *Journal of Orthopaedic Research*; 21: 73-80.
 - Sauer G. (1988) Long-term fixation of hip endoprostheses by coating with hydroxyapatite? An analysis of the literature. *Biomedical technology (Berl)*; 33: 300-305.
 - Schenk R.K. und Buser D. (1998) Osseointegration: a reality. *Periodontology*; 17: 22-35.
 - Schenk R.K., Willenegger H.R. (1977) Zur Histologie der primären Knochenheilung – Modifikationen der Grenzen der Spalthheilung in Abhängigkeit von der Defektgröße. *Unfallheilkunde*; 80 (5): 155-160.

- Schmitz C., Hilpert J., Jacobsen C., Boensch C., Christensen E.I., Luft F.C., Willnow T.E. (2002) Megalin deficiency offers protection from renal aminoglycoside accumulation. *Journal of Biological Chemistry*; 277: 618-622.
- Schnettler R., Alt V. (2004) Pathophysiologie und Klassifikation der Osteitis. In: Schnettler R, Steinau U (Hrsg.). *Septische Knochenchirurgie*. Thieme, Stuttgart, Berlin, New York, S. 5-14.
- Schwartz Z., Lohmann C.H., Oefinger J., Bonewald L.F., Dean D.D., Boyan B.D. (1999) Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells in the osteoblastic lineage. *Advances in Dental Research*; 13: 38-48.
- Sculco T.P. (1993) The economic impact of an infected total joint arthroplasty. *Instruct Course Lecture*; 42: 349-356.
- Servais H., Van Der Smissen P., Thirion G., Van der Essen G., Van Bambeke F., Tulkens P.M., Mingeot-Leclercq M.P. (2005) Gentamicin-induced apoptosis in LLC-PK1 cells: involvement of lysosomes and mitochondria. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 206: 321-333.
- Silverblatt F.J., Kuehn C. (1979) Autoradiography of gentamicin uptake by the rat proximal tubule cell. *Kidney International*; 15: 335-345.
- Sinha B., François P.P., Nüsse O., Foti M., Hartford O.M., Vaudaux P., Foster T.J., Lew D.P., Herrmann M., Krause K.H. (1999) Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5 \beta 1$. *Cellular Microbiology*; 1: 101-117.
- Smith-Petersen M.N. (1939) Arthroplasty of the hip. A new method. *Journal of Bone and Joint Surgery*; 105: 269-288.
- Spooncer E., Gallagher J.T., Krisza F., Dexter T.M. (1983) Regulation of hematopoiesis in long-term bone marrow cultures. IV. Glycosaminoglycan synthesis and the stimulation of hematopoiesis by beta-D-xylosides. *The Journal of Cell Biology*; 96: 510-514.

- Stea S., Visentin M., Savarino L. Et al. (1995) Quantitative analysis of the bone hydroxyapatite coating interface. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*; 6: 455-459.
- Stefflik D.E., Corpe R.S., Lake F.T, Young T.R., Sisk A.L., Parr G.R., Hanes P.J., Berkery D.J. (1998) Ultrastructural analyses of the attachment (bonding) zone between bone and implanted biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research*; 39: 611-620.
- Stigter M., Bezemer J., de Groot K., Layrolle P. (2004) Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy. *Journal of Controlled Release*; 99: 127–137.
- Strauß A. (1999) Lokaler Antibiotikumträger aus Kalziumsulfat – Verträglichkeit im Gewebe und Pharmakokinetik der angewendeten Antibiotika nach Implantation in Kaninchen. Fachverlag Köhler, Gießen, S. 22-23 und S. 90.
- Stromberg C.N., Herberts P., Ahnfelt L. (1988) Revision total hip arthroplasty in Patients younger than 55 years old: Clinical & radiologic results after 4 years. *Journal of Arthroplasty*; 3: 47
- Sun J.-S., Tsuang Y.-H., Yao C.-H. et al (1997) Effects of calcium phosphate bioceramics on skeletal muscle cells. *Journal of Biomedical Materials Research*; 34: 227-233.
- Thomes B., Murray P., Bouchier-Hayes D. (2002) Development of resistant strains of *Staphylococcus epidermidis* on gentamicin-loaded bone cement in vivo. *Journal of Bone and Joint Surgery British Volume*; 84: 758-60.
- Tracy B.M., Doremus R.H. (1984) Direct electron microscopy studies of the bone-hydroxylapatite interface. *Journal of Biomedical Materials Research*; 18: 719-726.
- Tulkens P, van Hoof F (1980) Comparative toxicity of aminoglycoside antibiotics towards the lysosomes in a cell culture model. *Toxicology* 17: 195-199.
- Ungethüm M. (1988) Werkstoffe (Kunststoff, Keramik, Metall) und Konstruktionsmerkmale zementloser Prothesen. In: Hipp E., Gradinger R.,

Rechl H. (Hrsg.), Zementlose Hüftgelenksendoprothetik, Demeter, Gräfelfing, 30-33.

- Vadaux P., Francois P., Lew D.P., Waldvogel P.A. (2000) Host factors predisposing to and influencing therapy of foreign body infections. In: Waldvogel FA, Bisno AL (eds) Infections associated with indwelling devices. The American Society for Microbiology Press, p. 1-26.
- van de Belt H., Neut D., Schenk W., van Horn J.R., van der Mei H.C., Busscher H.J. (2001) Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone cements. *Acta Orthopaedica Scandinavia*; 72: 557-571.
- von Eiff C, Lindner N, Proctor RA, Winkelmann W, Peters G (1998) Development of gentamicin-resistant small colony variants of *S. aureus* after implantation of gentamicin chains in osteomyelitis as a possible cause of recurrence. *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete* 136: 268-271.
- Wahlig H., Dingeldein E. (1980) Antibiotics and bone cements. Experimental and clinical long-term observations. *Acta Orthopaedica Scandinavia*; 51: 49-56.
- Ward D.T., Maldonado-Perez D., Hollins L., Riccardi D. (2005) Aminoglycosides induce acute cell signaling and chronic cell death in renal cells that express the calcium-sensing receptor. *Journal of the American Society of Nephrology*; 16: 1236-1244.
- Wessinghage D. (1995) Themistocles Gluck: Von der Organexstirpation zum Gelenkersatz. *Deutsches Ärzteblatt*; 33: p. 1443 -1447.
- Wichmann M.W., Remmers D, Ayala A, Chaudry IH (1998) Contribution of soft tissue trauma and/or bone fracture to immune suppression after hemorrhagic shock in the animal experiment. *Der Unfallchirurg*; 101: 37-41.
- Willert H.G., Semlitsch M. (1980) Zur Morphologie der Knochenreaktion auf Gelenkimplantate und deren Verschleißprodukte. In: Jäger M., Hackenbroch M.H., Refior J.J. (Hrsg.): *Grenzschichtprobleme der Verankerung von Implantaten unter besonderer Berücksichtigung von Endoprothesen*, Thieme, Stuttgart New York, 128-132.

-
- Willert H., Buchhorn G. (1999) Osseointegration of cemented and noncemented implants in artificial hip replacement: long-term findings in man. *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants*; 9: 113-130.
 - Willert H.G., Buchhorn G., Semlitsch M. (1980) Die Reaktion des Gewebes auf Verschleißprodukte von Gelenk-Endoprothesen der oberen Extremitäten. *Orthopäde*; 9: 94-107.
 - Williams H.J., Ward J.R., Egger M.J., Neuner R., Brooks R.H., Clegg D.O. et al. (1993) Comparison of naproxen and acetaminophen in a two-year study of treatment of osteoarthritis of the knee. *Arthritis and Rheumatology*; 36: 1196-1206.
 - Willmann G. (1992) Materialeigenschaften von Hydroxylapatit-Keramik. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*; 23: 107-110.
 - Witte S., Lasek R., Victor R. (2002) Wirksamkeit von Ademetionin und Oxaceprol für die Behandlung von Arthrosen – eine Metaanalyse. *Orthopäde*, 31: 1058-1065.
 - Zimmerli W., Lew P.D., Waldvogel F.A. (1984) Pathogenesis of foreign body infection. Evidence for a local granulocyte defect. *Journal of Infectious Diseases*; 73: 1191-1200.

10 PUBLIKATIONEN

Alt V., Bitschnau A., Böhner F., Heerich K. E., Magesin E., Sewing A., Pavlidis Th., Szalay G., Heiss Ch., Thormann U., Hartmann S., Pabst W., Wenisch S., Schnettler R. (2011) Effects of gentamicin and gentamicin–RGD coatings on bone ingrowth and biocompatibility of cementless joint prostheses: An experimental study in rabbits. *Acta Biomaterialia* 7: 1274–1280

Bitschnau A., Alt V., Böhner F., Heerich K. E., Margesin E., Hartmann S., Sewing A., Meyer C., Wenisch S., Schnettler R. (2009) Comparison of new bone formation, implant integration, and biocompatibility between RGD-hydroxyapatite and pure hydroxyapatite coating for cementless joint prostheses - an experimental study in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 88 (1): 66-74.

11 ERKLÄRUNG

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Ort, Datum

Unterschrift

12 DANKSAGUNG

Für die Überlassung der Arbeit und die Möglichkeit der Durchführung durch Bereitstellung von Labor und Klinik möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Schnettler und Prof. Dr. med. Dr. biol. hom. Alt für seine Betreuung danken. Er stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite.

Der Firma Biomet Deutschland, Berlin, gebührt Dank für die finanzielle Unterstützung der Studie und das Überlassen der Implantate. In diesem Zusammenhang sei stellvertretend für die gesamte Firma Herrn Dr. Sewing gedankt.

Außerdem gilt mein Dank für die Einarbeitung und Unterstützung bei der Auswertung der Präparate dem Team des Labors für experimentelle Unfallchirurgie, besonders Frau Prof. Sabine Wenisch, der ehemaligen Leiterin des Labors, Frau Anne Hild und Frau Dipl. Biologin Sonja Hartmann. Desweiteren danke ich für Ihre Mitarbeit während des experimentellen Teils den Mitarbeitern der Tierklinik Bad Langensalza, hier sei besonders die Tierärztin Frau Kussmann erwähnt. Herrn Dr. Pabst und Herrn Dr. Bödecker möchte ich für die hervorragende Betreuung bei der statistischen Auswertung der Daten danken. Auch meinen Mitdoktorandinnen, Jana Österling, Felicitas Böhner und Erika Margesin, möchte ich für deren Mitarbeit Danke sagen.

Schließlich gilt mein besonderer Dank meiner Familie, für Ihre Unterstützung und Ihren Rückhalt. Ich weiß, Ihr seid immer für mich da.