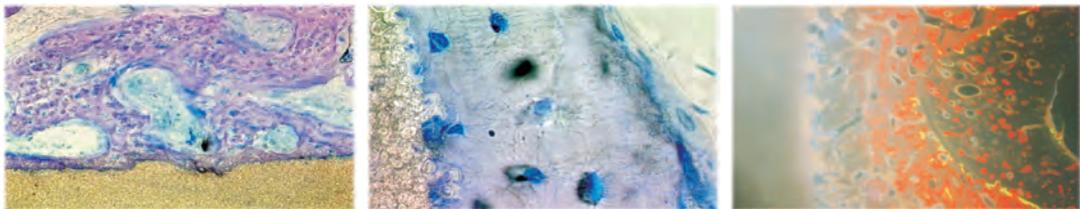


BIOMATERIALIEN IN DER MEDIZIN

GEWEBEREGENERATION UND BIOKOMPATIBILITÄT NACH IMPLANTATION VON HYDROXYLAPATIT- POLYETHYLEN (HAPEX™) IN WEICHGEWEBE UND ULNADEFEKT BEIM KANINCHEN

MAREN FRANKE



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Die Drucklegung dieser Arbeit wurde von der Firma
aap Implantate AG • Niederlassung Dieburg

Dr. E. Dingeldein

Lagerstrasse 11 – 15 • 64807 Dieburg

Tel.: + 49 6071 / 929-292

Fax.: + 49 6071 / 929100

Email: e.dingeldein@aap.de

unterstützt.

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2007

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

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Aus der Klinik für Kleintiere – Innere Medizin und Chirurgie
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Betreuer: Prof. Dr. K.H. Bonath

**Geweberegeneration und Biokompatibilität nach Implantation
von Hydroxylapatit-Polyethylen (HAPEX™) in Weichgewebe
und Ulnadefekt beim Kaninchen**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet. beim
Fachbereich Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

MAREN FRANKE

Tierärztin aus Mannheim

Gießen 2007

**Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. K. H. Bonath
PD Dr. M. Gerwing

Tag der Disputation: 01.02.2007

Inhaltsverzeichnis		Seite
I	Einleitung	1
II	Literaturübersicht	6
II.1	Polyethylen und Hydroxylapatit	
II.1.1	Biokompatibilität	
II.1.1.1	<i>Biokompatibilität von Polyethylen im Weichgewebe</i>	
II.1.1.2	<i>Biokompatibilität von Hydroxylapatit im Weichgewebe</i>	7
II.1.2	Osteokompatibilität und Osteoinduktion / -konduktion	9
II.1.2.1	<i>Polyethylen und Knochengewebe</i>	
II.1.2.2	<i>Hydroxylapatit und Knochengewebe</i>	10
II.1.3	Biodegradation / Bioresorption	17
II.1.3.1	<i>Polyethylen</i>	
II.1.3.2	<i>Hydroxylapatit</i>	18
II.1.4	Klinische Bedeutung von Polyethylen und Hydroxylapatit in Human- und Veterinärmedizin	20
II.1.4.1	<i>Klinischer Einsatz von Polyethylen</i>	
II.1.4.2	<i>Kontraindikationen und Schwierigkeiten beim Einsatz von Polyethylen</i>	22
II.1.4.3	<i>Klinischer Einsatz von Hydroxylapatit</i>	23
II.1.4.4	<i>Kontraindikationen und Schwierigkeiten beim Einsatz von Hydroxylapatit</i>	27
II.1.5	HAPEX™	29
II.1.5.1	<i>Entwicklung und Materialeigenschaften</i>	
II.1.5.2	<i>Biokompatibilität</i>	32
II.1.5.3	<i>Bedeutung und klinischer Einsatz von HAPEX™ in der Humanmedizin</i>	33

II.2	Theoretische Grundlagen	35
II.2.1	Anatomie und Physiologie des Knochens	
II.2.1.1	<i>Knochenaufbau</i>	
II.2.1.2	<i>Knochenzellen und Interzellulärsubstanz</i>	36
II.2.1.3	<i>Knochenarten</i>	39
II.2.1.4	<i>Osteogenese und Mineralisation</i>	41
II.2.1.5	<i>Knochenumbau (Remodeling)</i>	43
II.2.1.6	<i>Reparation, Regeneration und Frakturheilung</i>	45
III	Eigene Untersuchungen	48
III.1	Material und Methoden	
III.1.1	Versuchstiere	
III.1.1.1	<i>Identität der Tiere</i>	
III.1.1.2	<i>Haltungsbedingungen</i>	
III.1.2	Implantate	49
III.1.2.1	<i>Beschreibung der verwendeten Implantate</i>	
III.1.2.2	<i>Zusammensetzung und Eigenschaften der Implantate</i>	
III.1.2.3	<i>Materialvorbereitung</i>	52
III.1.3	Präoperative Maßnahmen	
III.1.3.1	<i>Quarantäne und klinische Untersuchung der Versuchstiere</i>	
III.1.4	Ulnateilosteotomie und Implantation	53
III.1.4.1	<i>Operationsvorbereitung, Prämedikation und Anästhesie</i>	
III.1.4.2	<i>Operationsprotokoll</i>	

III.1.5	Operative Nachsorge	56
<i>III.1.5.1</i>	<i>Kontrolle der Futteraufnahme, des Körpergewichts, der Nutzung der operierten Gliedmaße sowie der Körperinnentemperatur</i>	
<i>III.1.5.2</i>	<i>Behandlung einzelner erkrankter Tiere</i>	57
III.1.6	Röntgenkontrollen	
III.1.7	Fluorochrommarkierung	58
<i>III.1.7.1</i>	<i>Bezeichnung und Eigenschaften der verwendeten Farbstoffe</i>	
III.1.8	Euthanasie und Perfusion	59
<i>III.1.8.1</i>	<i>Prämedikation und Anästhesie zur Vorbereitung der Perfusion</i>	
<i>III.1.8.2</i>	<i>Perfusionsfixation des Knochengewebes</i>	
III.1.9	Probengewinnung für die histologische Untersuchung	60
III.1.10	Herstellung der Knochen- und Muskelschnitte sowie der Dünnschliffe	
<i>III.1.10.1</i>	<i>Färbung der Knochenschliffe und histologische Untersuchung</i>	61
III.1.11	Fluoreszenzdarstellung	62
<i>III.1.11.1</i>	<i>Bewertungsschlüssel für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung</i>	
III.2	Ergebnisse	64
III.2.1	Zusammenfassende Darstellung von Futteraufnahme und Gewichtsentwicklung	
<i>III.2.1.1</i>	<i>Futteraufnahme</i>	
<i>III.2.1.2</i>	<i>Gewichtsentwicklung</i>	
<i>III.2.1.3</i>	<i>Zusammenfassende Darstellung des Gliedmaßengebrauchs post operationem</i>	68
III.2.2	Zusammenfassende Darstellung der Röntgenbefunde	70
<i>III.2.2.1</i>	<i>HAPE-Implantate / massiv und perforiert</i>	

III.2.2.2	<i>PE-Implantate / massiv und perforiert</i>	72
III.2.3	Zusammenfassende Darstellung der histologischen Befunde der Knochenimplanate	74
III.2.3.1	<i>Histologische Befunde der Tiere mit 5-wöchiger Nachbeobachtungszeit</i>	
III.2.3.1.1	<i>HAPE-Implantate / massiv und perforiert</i>	
III.2.3.1.2	<i>PE-Implantate / massiv und perforiert</i>	75
III.2.3.2	<i>Histologische Befunde der Tiere mit 20-wöchiger Nachbeobachtungszeit</i>	76
III.2.3.2.1	<i>HAPE-Implantate / massiv und perforiert</i>	
III.2.3.2.2	<i>PE-Implantate / massiv und perforiert</i>	77
III.2.4	Darstellung der histologischen Befunde der Muskelimplantate	83
III.2.4.1	<i>Histologische Befunde der Tiere mit 5-wöchiger Nachbeobachtungszeit</i>	
III.2.4.1.1	<i>HAPE-Implantate / massiv und perforiert</i>	
III.2.4.1.2	<i>PE-Implantate / massiv und perforiert</i>	84
III.2.4.2	<i>Histologische Befunde der Tiere mit 20-wöchiger Nachbeobachtungszeit</i>	85
III.2.4.2.1	<i>HAPE-Implantate / massiv und perforiert</i>	
III.2.4.2.2	<i>PE-Implantate / massiv und perforiert</i>	86
III.2.5	Zusammenfassung der fluoreszenzmikroskopischen Befunde	90
III.2.5.1	<i>Knochenneubildungsraten</i>	
III.2.5.2	<i>Befunde der Gruppe mit 5-wöchiger Nachbeobachtungszeit</i>	
III.2.5.3	<i>Befunde der Gruppe mit 20-wöchiger Nachbeobachtungszeit</i>	

IV	Diskussion	95
IV.1	<i>Diskussion des Tier- und Operationsmodells</i>	
IV.2	<i>Diskussion von Futterraufnahme und Entwicklung der Körpermasse sowie des Gliedmaßengebrauchs post operationem</i>	98
IV.2.1	<i>Futterraufnahme</i>	
IV.2.2	<i>Entwicklung der Körpermasse in den beiden Materialgruppen (HAPE / PE) und Beobachtungszeiträumen (5 / 20 Wochen)</i>	99
IV.2.3	<i>Beurteilung des Gliedmaßengebrauchs post operationem</i>	101
IV.3	<i>Diskussion der Fluorochrommarkierung</i>	103
IV.4	<i>Diskussion von Trenn-Dünnschliff-Technik und Knochenfärbung</i>	105
IV.5	<i>Diskussion der fluoreszenzmikroskopischen Befunde</i>	107
IV.6	<i>Diskussion der Röntgenkontrollen</i>	109
IV.7	<i>Diskussion der Geweberegeneration und Biokompatibilität von Polyethylen und HAPEX™ im Weichgewebe</i>	112
IV.8	<i>Diskussion der histologischen Befunde nach Implantation von Polyethylen und HAPEX™ in einen Knochendefekt</i>	117
IV.9	<i>Diskussion der Knochenheilung unter dem Einfluß von Polyethylen und dem Knochenersatzmittel HAPEX™</i>	121
IV.10	<i>Schlußbetrachtung und Ausblick</i>	125
V	Zusammenfassung	127
	Summary	130
VI	Literaturverzeichnis	133
VII	Anhang	152
VII.1	<i>Herstellungsvorschriften für die Perfusionslösungen</i>	
VII.2	<i>Herstellungsvorschrift für die Toluidinblau-Färbelösung</i>	153
VII.3	<i>Zusammensetzung von T 61®</i>	
VII.4	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	154
	Danksagung	155
	Erklärung	

I Einleitung

In der orthopädischen Chirurgie versucht man bereits seit Mitte des vorigen Jahrhunderts, Defekte des Knochens mittels Knochentransplantation zur Ausheilung zu bringen (REFIOR, 1998). Probleme bei der autogenen, allogenen und xenogenen Knochentransplantation, wie beispielsweise die Notwendigkeit des zweiten chirurgischen Eingriffs und der verlängerten Operationsdauer sowie die Gefahr der Übertragung viraler und bakterieller Infektionen, bedingten jedoch bald die intensive Suche nach geeigneten Ersatzmaterialien. Zahlreiche Forschergruppen beschäftigten sich bereits zu Beginn des vergangenen Jahrhunderts, zunehmend aber seit Mitte der 60er Jahre, mit der Entwicklung von Substanzgruppen, die anstelle autogenen Knochens zur Defektauffüllung eingesetzt werden können. Mittlerweile stehen zahlreiche Substanzen zur Verfügung, deren unterschiedliche Eigenschaften eine allgemein gültige Klassifizierung erschweren. Eine Einteilung in resorbierbare (z.B. Trikalziumphosphat-Keramiken) und nicht resorbierbare Materialien (z.B. Hydroxylapatit-Implantate) ermöglicht einen groben Überblick.

OSBORN (1979) nahm eine Einteilung vor, die nicht nur allen zu seiner Zeit verfügbaren, sondern auch den zukünftigen Materialien gerecht wird. Er berücksichtigt dabei sowohl die Reaktionen des jeweiligen Implantatlagers als auch die biodynamischen Eigenschaften des Werkstoffes. Daraus ergibt sich die Einteilung der Substanzgruppen in *biotolerante*, *bioinerte* oder *bioaktive* Materialien. Zur Gruppe der *biotoleranten* Materialien gehören z.B. rostfreier Stahl und Knochenzement, die durch Ausbildung einer dicken fibrösen Grenzschicht von mineralisiertem Knochengewebe getrennt werden. Diese verhindert die Kraftschlüssigkeit zwischen Implantat und Knochen, so dass hier lediglich von einer *Distanzosteogenese* gesprochen werden kann. Bei den *bioinerten* Materialien (Aluminiumoxid-Keramiken, Kohlenstoff-Werkstoffe) kommt es zur *Kontaktosteogenese*, die eine mechanische Verzahnung des Implantates mit dem Knochenlager zur Folge hat. Die *Verbundosteogenese* der *bioaktiven* Substanzen, wie der verschiedenen Kalzium-Phosphat- und Hydroxylapatit-Keramiken oder des Bioglas, resultiert aus der Freisetzung von Calcium- und Phosphationen aus diesen Werkstoffen, sobald sie in das Körpermilieu gelangen. Das hat zur Folge, dass Keramik und Knochen im Zuge des Reifungsprozesses des neu gebildeten Knochens zu

Lamellenknochen „ineinander übergehen“. Dieser Verbund gilt als charakteristisches Merkmal regelrecht eingeeilter Hydroxylapatit-Keramiken (OSBORN et al., 1980; OSBORN, 1985; RUDELT, 1989)

Auch HEIMKE und GRISS (1980) stellen bei ihrer Einteilung die Reaktionen des Gewebes am Implantationsort in den Vordergrund. Sie unterscheiden zwischen *bioinerten* (hochreine Oxidkeramiken z.B. aus Aluminium, Magnesium sowie Metallimplantate), *biodegradiblen* (Plaster of Paris, verschiedene Kalziumphosphat-Keramiken) sowie *bioaktiven* Keramiken (diverse Glas-Keramiken, dichtes Trikalziumphosphat). Außerdem nennen sie blutkompatible Ersatzstoffe, wozu einige Formulierungen aus Karbon gehören.

Nach REFIOR und Mitarbeitern (1998) sowie RUEGER (1996, 1998) werden heute folgende Klassen unterschieden:

1. Biologische, organische Substanzen (z.B. mineralisierte / demineralisierte Knochenmatrix)
2. Synthetische, anorganische Materialien (z.B. Biogläser / Glaskeramiken)
3. Synthetische, organische Verbindungen (organische Polymere wie Polyester etc.)
4. Kompositwerkstoffe (Mischungen bzw. Kombinationen von Substanzen aus den Klassen 1, 2 und 3)

Zu den Kompositwerkstoffen (auch Komposits) gehören Implantate aus den unterschiedlichsten Materialien wie z.B. Metallspungiosa, kombiniert mit autogener Spungiosa oder deaktivierte allogene Matrix mit einem rekombinanten Wachstumsfaktor.

Bei der Verwendung von Komposits ist es das Ziel, die Aktivität des entstehenden Werkstoffes durch die Beimischung eines oder mehrerer Biomaterialien noch über den rein additiven Effekt hinaus zu steigern. Mit Hilfe der neuen Formulierung können eventuell bestehende Applikationsprobleme von Monosubstanzen umgangen werden (SOLTESZ, 1988; RUEGER, 1996, 1998).

Letztlich zeigt aber die Vielzahl der unterschiedlichen Kombinationen, dass bisher für die Auffüllung von Knochendefekten keine adäquate Alternative zum autogenen Knochenersatz

gefunden wurde. Andererseits steht die große Varianz der Materialien aber auch für die zahlreichen Einsatzmöglichkeiten von Knochenersatzstoffen. Dabei decken sich die Indikationen in Human- und Veterinärmedizin weitgehend. Einsatzgebiet in der Orthopädie und Traumatologie ist beispielsweise die Überbrückung von Knochendefekten nach Trümmerfrakturen oder auch nach einer Tumorsektion. Dabei kann gerade in der Tumorchirurgie mit der Auffüllung eines Defektes vor allem die Wiederherstellung der Knochenkontur erreicht werden. In der Oralchirurgie finden Knochenersatzmaterialien ihre Verwendung nach Substanzverlusten an Alveolen und / oder Kieferknochen. Letztlich können einige Materialien auch als Trägersubstanz für Antibiotika, Zytostatika oder osteogene Stoffe direkt in das zu therapierende Gebiet eingebracht werden. All diese Erkenntnisse lassen den Schluss zu, dass Knochenersatzstoffe Biomaterialien sind.

Die European Society for Biomaterials definiert „*Biomaterial*“ in Übereinstimmung mit WILLIAMS (1986) als „*eine nicht lebensfähige Substanz, die nach medizinischer Anwendung mit einem biologischen System interagiert.*“

Diese stark vereinfachte Definition wurde mittlerweile folgendermaßen modifiziert (RUEGER, 1998): „*Ein Biomaterial ist eine nicht körpereigene Substanz, die nach der Implantation in einen Organismus dort vorhandene strukturelle Elemente, ganze Gewebe und deren (Teil-) Funktionen ergänzt oder ersetzt.*“

Mit den unterschiedlichen Einsatzgebieten steigen zwangsläufig auch die Anforderungen an die Materialeigenschaften von Knochenersatzstoffen. Dennoch sind die Ziele, die mit der Implantation eines Ersatzstoffes erreicht werden sollen, auf nahezu allen Gebieten die gleichen. Unabhängig von der Qualität des Lagerknochens soll die knöcherne Heilung hinsichtlich der Menge des neugebildeten Knochens, seiner Qualität und der Zeit, in der die Neubildung stattfindet, positiv beeinflusst, besser noch beschleunigt werden (RUEGER, 1996, 1998).

Die zur lokalen Auffüllung von Knochendefekten verwendeten Materialien dürfen vor allem keinen hemmenden Einfluß auf die Knochenheilung haben und müssen sich durch eine gute Gewebeverträglichkeit auszeichnen. Außerdem dürfen sie weder immunogen, noch

kanzerogen oder toxisch wirken. Weiterhin ist die rasche Vaskularisierung im Interface für die Einwanderung knochenbildender Zellen von ausschlaggebender Bedeutung. Darüber hinaus sind die leichte und kostengünstige Verfügbarkeit sowie eine sicher durchzuführende Sterilisation des Materials von Vorteil. Lässt sich das Material dann noch mit einfachen Mitteln auch während der Operation bearbeiten und formen, erfüllt es alle Anforderungen, die an ein ideales Knochenersatzmittel zu stellen sind.

Mit **HAPEX™** steht seit den frühen 80er Jahren ein Knochenersatzmaterial aus der Klasse der Kompositwerkstoffe zur Verfügung. Die Grundkomponenten Polyethylen (PE) und Hydroxylapatit (HA) sind seit Jahrzehnten bekannt. Es liegen ausreichend klinische Erfahrungen mit der Verwendung von Hydroxylapatit-Keramiken als Knochenersatz sowie mit Polyethylen in der Hüft- und Knieendoprothetik vor. Beide Ausgangsmaterialien sind vergleichsweise einfach zu gewinnen, das Komposit ist sterilisierbar und mit gängigen chirurgischen Instrumenten wie z.B. einem Skalpell modulierbar (TANNER et al., 1994). Eine ausgezeichnete Biokompatibilität konnte für das Komposit ebenfalls nachgewiesen werden (BONFIELD, 1988; TANNER et al., 1994), um nur die wichtigsten Eigenschaften zu nennen. Klinisch hat sich HAPEX™ in der Humanmedizin bereits als Implantat im Innenohr bewährt (MEIJER et al., 2002; NEUGEBAUER, 2004). Weitere Einsatzmöglichkeiten in der Orthopädie, Traumatologie und rekonstruktiven Chirurgie sind in der Erprobung. Denn vor dem Einsatz in jeder weiteren und völlig anders gearteten Indikation muss zunächst die Eignung des Materials für diese neue Anwendung ermittelt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sollen in die Entwicklung einer modularen Schulterprothese einfließen. Die häufig sehr umfangreichen Defekte in diesem Gebiet bedürfen meist einer Überbrückung mit Metallimplantaten, deren Weichteildeckung sehr problematisch ist. Denn die bisher häufig verwendeten Polyethylenhülsen, die die Metalloberflächen abdecken, gehen keine Verbindung mit dem umliegenden Gewebe ein. Der Verbund zwischen Knochen- und Weichgewebe ist aber für die volle Funktionsfähigkeit eines künstlichen Schultergelenkes unabdingbar. Diese Anforderungen stehen bei der Entwicklung im Vordergrund.

Für Human- wie Veterinärmedizin resultiert daraus die Frage, inwieweit das Kompositmaterial sowohl einen Verbund mit neu gebildetem Knochengewebe als auch mit Bindegewebsfasern eingeht, und ob durch eine Veränderung der Oberflächenstruktur das bindegewebige Attachment erreicht werden kann. Diese Eigenschaft würde einen entscheidenden Vorteil gegenüber den bisher zur Verfügung stehenden Materialien darstellen.

Die Eignung des Kompositwerkstoffes **HAPEX™** für die beschriebene Indikation sollte anhand folgender Fragen geklärt werden:

- Gibt es zwischen HAPE-Implantaten (**HAPEX™**) und Knochengewebe deutlich mehr direkte Knochenkontaktzonen als zwischen reinen PE-Implantaten und Knochengewebe?
- Nimmt der Kontakt zwischen HAPE und Knochen im Laufe der Nachbeobachtungszeit zu oder ab?
- Gibt es Unterschiede hinsichtlich der Adhäsion von Bindegewebe zwischen HAPE- und PE-Implantaten?
- Ist die Anhaftung von Bindegewebe bei perforierten Implantaten größer?

II Literaturübersicht

II.1 Polyethylen und Hydroxylapatit

II.1.1 Biokompatibilität

„Biokompatibilität ist die Fähigkeit eines Materials mit einer angemessenen Wirtsreaktion bei spezifischer Applikation zu reagieren“ (WILLIAMS, 1988).

Werkstoffe, die langfristig in Kontakt mit lebenden Geweben stehen sollen oder sogar in diese eingebracht werden, müssen das Kriterium der Biokompatibilität erfüllen. Biokompatibilität betrifft alle Wechselwirkungen zwischen dem devitalen Fremdgewebe und dem vitalen Organismus (OSBORN, 1985). Dabei bestimmen sowohl implantatspezifische Faktoren, als auch Eigenschaften des Wirtsgewebes die Biokompatibilität eines Materials. Dazu gehören unter anderem die Zusammensetzung des verwendeten Implantates, seine Form und Oberflächenbeschaffenheit, der Ort der Implantation, der Zustand des Implantationsbettes sowie die chirurgische Technik und nicht zuletzt die mechanische Belastung des manipulierten Bereiches (ROSENGREN, 1999; THULL, 2003).

Über viele Jahrzehnte wurden Biomaterialien vor allem nach den Kriterien der mechanischen Integrität entwickelt. Die schnell zunehmenden molekularbiologischen Erkenntnisse verdeutlichen aber immer mehr die subtilen Anforderungen des biologischen Umfeldes an die Biokompatibilität eines Werkstoffes (THULL, 2003).

II.1.1.1 Biokompatibilität von Polyethylen in Weichgewebe

Die Implantation von Polyethylen in Muskel- und Bindegewebe hat weder eine Gewebenekrose noch eine Fremdkörperreaktion zur Folge. In der Umgebung verschiedener Testkörper kann lediglich eine milde entzündliche Reaktion mit dem Auftreten von Makrophagen, einigen Lymphozyten und vereinzelt Plasmazellen beobachtet werden (TURNER et al., 1973; KLAWITTER et al., 1976). Fremdkörper- oder Abstoßungsreaktionen mit massivem Auftreten von vielkernigen Zellen oder der Ausbildung von Granulomen können nicht festgestellt werden. VORONOV und Mitarbeiter (1998) untersuchten in-vitro die Fähigkeit von Makrophagen Polyethylen-Partikel zu phagozytieren. Die kleineren Partikel (4-10 µm) aus hochdichtem Polyethylen werden innerhalb von zwei Stunden phagozytiert und liegen dann, umgeben von Doppelmembranen, innerhalb der Freßzellen in Vakuolen. Aus der

Tatsache, dass diese Zellen weiterhin in der Lage sind sich zu teilen und zu vermehren, schließen die Autoren, dass die aufgenommenen Partikel keinen toxischen Effekt auf die Zellen haben. Die größeren Partikel aus ultrahochmolekularem Polyethylen (18-20 µm) lösen hingegen eine Fremdkörperreaktion mit dem Vorkommen zahlreicher Riesenzellen aus. KLAWITTER und Mitarbeiter (1976) entdeckten in einigen porösen Probenkörpern morphologisch atypische Zellen bei gleichzeitig verminderter Vaskularisierung. Beides führen sie auf die Porengröße ihrer Zylinder von unter 100 µm zurück. Sogar in einem septischen Aufnahmelager attestieren HANDROCK und Mitarbeiter (1979) porösem Polyethylen eine gute Einheilung und rasche Integration durch Einsprossen von Gefäßen und Bindegewebe. SAUER und LADE (1982) bestätigen für poröses Polyethylen die beste Eignung als Material zur Herstellung von Implantaten, die eine Inkorporation in umgebendes Gewebe erfordern. ROSENGREN und Mitarbeiter (1999) ermitteln regelmäßig die Ausbildung einer bindegewebigen Kapsel um ihre Testkörper. Die Dicke der Kapsel sowie das Vorkommen von Makrophagen in unmittelbarer Nähe verändert sich nicht nur im Laufe der Zeit, sondern vor allem auch im Zusammenhang mit Modifikationen der Oberflächenbeschaffenheit. Eine raue Oberfläche ruft deutlich weniger Gewebereaktionen hervor als glattere Flächen. Demnach ist Polyethylen nicht toxisch, sondern im Weichgewebe gut biokompatibel.

II.1.1.2 Biokompatibilität von Hydroxylapatit im Weichgewebe

Hydroxylapatit gilt als atoxisch, nicht antigen, nicht kanzerogen und ist ein nicht (CHANG et al., 1983; KLEIN et al., 1983; DROBECK et al., 1984; OSBORN, 1985; EGGLI et al., 1987, 1988) oder nur schwer resorbierbares Material (LEGEROS et al., 1988; SPECTOR, 1991). Aufgrund der Tatsache, dass sich das chemotechnische vom biologischen Hydroxylapatit nicht unterscheidet, ist auch das synthetische Hydroxylapatit ideal biokompatibel. Diese Eigenschaft hat auch ein Werkstoff, der ausschließlich aus Hydroxylapatit, ohne zusätzliche Bindemittel, hergestellt wird (OSBORN, 1987). Entsprechende Beobachtungen werden auch nach der Implantation von Hydroxylapatit in Weichgewebe gemacht (DENISSEN et al., 1980; PIECUCH, 1982; DROBECK et al., 1984; HARVEY et al., 1985; OSBORN; 1985; SUN et al., 1997). Übereinstimmend beobachten die genannten Autoren sowohl nach subkutaner wie auch nach intramuskulärer Implantation die Ausbildung einer bindegewebigen Kapsel um das Fremdmaterial. Die verschiedenen Testkörper verursachen, wenn überhaupt, nur eine milde Entzündung, die jedoch klinisch nicht manifest wird, sondern nur histologisch

nachzuweisen ist (DROBECK et al., 1984). In Implantatnähe werden häufig einkernige Makrophagen angetroffen. MISIEK und Mitarbeiter (1984) konnten nachweisen, dass die Entzündungsreaktion in Gegenwart von abgerundeten Hydroxylapatit-Körpern deutlich schneller abklingt als bei scharfkantigen Partikeln.

Nach subkutaner (DENISSEN et al., 1980) oder intramuskulärer Implantation (PIECUCH, 1982) konnten bisher weder die Auslösung einzelner Kristalle aus dem Keramikverbund (die dann frei in der Umgebung des Implantates liegen bleiben) noch deren Inkorporation in Makrophagen beobachtet werden. Langzeitstudien haben gezeigt, dass Hydroxylapatit auch über Jahre vom Organismus toleriert wird (DROBECK et al., 1984; GUMAER et al., 1986). Jedoch finden sich gelegentlich auch bei nur kurzer Implantationsdauer einzelne, verstreut liegende Fremdkörperriesenzellen (DENISSEN et al., 1980; HEISEL, 1987; YAMASAKI und SAKAI, 1992; YANG et al., 1997).

Im Zuge der Diskussion um das osteoinduktive oder -konduktive Potential wurde Hydroxylapatit immer wieder extraskeletal eingesetzt. Dabei konnten sowohl WINTER und Mitarbeiter (1981) als auch HEISEL (1987) und RUDELDT (1989) im Weichgewebe keine Knochenneubildung um Hydroxylapatit-Körper feststellen. Hingegen fanden YAMASAKI und SAKAI (1992) drei Monate nach der Implantation in Weichgewebe bei sechs von zehn Hunden neu gebildetes Knochengewebe rund um poröses Hydroxylapatit-Granulat. Nach sechs Monaten konnte diese Entdeckung bei allen zehn Tieren dieser Gruppe gemacht werden. Die zeitgleich in einer anderen Gruppe implantierten, dichten Hydroxylapatit-Partikel waren ausschließlich von Bindegewebe umgeben. In ihrer Umgebung gab es keine Anzeichen einer Verkalkung oder Ossifikation. Die Fähigkeit von Hydroxylapatit zur Osteoinduktion im Weichgewebe wird von YANG und Mitarbeitern (1997) bestätigt. Versuche mit einer zweiphasigen Keramik (Hydroxylapatit : Trikalziumphosphat im Verhältnis 65 % : 35 %) zeigen, dass nicht nur verschiedene Eigenschaften der Keramik wie Mikro- und Makroporosität sowie die Phasenzusammensetzung eine Rolle spielen, sondern auch die für das Experiment gewählte Tierart. Bei Hunden und Schweinen kann, im Gegensatz zu Ziegen, Kaninchen und Ratten, eine extraskeletale Osteogenese nachgewiesen werden.

II.1.2 Osteokompatibilität und Osteoinduktion / -konduktion

„Osteoinduktion ist die Fähigkeit eines Materials die Differenzierung unspezifischer mesenchymaler Zellen zu Chondro- und Osteoblasten zu bewirken“ (MANDELKOW et al., 1990). Hingegen versteht man unter „Osteokonduktion die Eignung eines Materials einwachsendem Knochengewebe als Leitgerüst zu dienen. Solches Material dient dann auch bei größeren Defekten als Träger und Leitschiene, so dass Gebiete knöchern gefüllt werden, die sonst nicht oder nur teilweise überbrückt würden“ (PARSONS et al., 1988; SCHENK, 1991; RUEGER, 1996).

KÖSTER und seine Mitarbeiter (1976) bewerten Keramiken als biokompatibel mit Knochengewebe (*osteokompatibel*), wenn neu gebildeter Knochen direkten Kontakt zur Keramik hat. Nicht biokompatibel sind Keramiken, wenn im Interface eine bindegewebige Trennschicht entsteht.

II.1.2.1 Polyethylen und Knochengewebe

Polymere Stoffe wie Polyethylen werden nach OSBORN und Mitarbeitern (1980) den bioinerten Materialien zugeordnet. Ihre Implantation führt zu keinerlei chemischer Irritation des periimplantären Gewebes. Physiologische Stoffwechselprozesse werden an ihrer Oberfläche abrupt unterbrochen. Es kommt regelmäßig zur Kontaktosteogenese ohne Auftreten einer intermediären Bindegewebsschicht. Die Verankerung des implantierten Materials erfolgt rein mechanisch durch Einwachsen von Knochen in die dafür vorgesehenen und bereits bei der Herstellung des Implantates vorgeformten Aussparungen. Die Grenzflächen dieser Biomaterialien sind elektroneutral, so dass ihre Oberflächenaktivität nur von der freien Oberflächenenergie bestimmt wird. Diese ist so eingestellt, dass die Polymere hydrophob sind. Das hat eine irreversible Adsorption von Proteinen zur Folge, so dass sich in kürzester Zeit ein stabiler und definitiver Zustand zwischen den epiimplantären Proteinschichten und der angrenzenden Phase des Organismus einstellt. Die Polymere sind also nicht bioaktiv, sie sind elektroneutral und hydrophob (OSBORN, 1985). Versuche mit anderen Kunststoffen sind ebenfalls aufgrund ihrer hydrophoben Oberfläche eingeschränkt. Deshalb lässt sich z.B. das zweiphasige Palavit nicht direkt auf den vitalen Knochen aufpolymerisieren, geht aber mit totem Knochen eine sehr feste Verbindung ein. Zur Trennung der beiden muss der Knochen zerstört werden (IDELBERGER, 1959).

SPECTOR und Mitarbeiter (1975) stellten fest, dass das Gewebe, welches in poröse Polyethylen-Pellets einwächst, zunächst aus den Zellen eines Hämatoms und fibrösem Material besteht. Besonders auffällig scheint dabei eine direkt auf der inneren Oberfläche der Poren auftretende, azelluläre Schicht, die Ähnlichkeit mit fibrösem Bindegewebe hat. 14 Tage nach der Implantation ist ein Großteil des Blutkoagels durch neugebildete Knochen trabekel ersetzt. KLAWITTER und Mitarbeiter (1976) fanden das Innere poröser Polyethylen-Körper mit verschiedenen Porendurchmessern gut vaskularisiert vor und beobachteten in einer 16-wöchigen Nachbeobachtungszeit die Ausbildung von Lamellenknochen im Inneren der Poren. Sie registrieren Knocheneinwuchs in Polyethylen-Körper mit einer Porengröße von 40 µm. Das Auftreten einiger atypischer Zellen bei zwei Testkörpern führen die Autoren auf den geringen Porendurchmesser zurück, der eine adäquate Perfusion und Ernährung des Gewebes im Inneren des Probenkörpers nicht mehr zulässt. MAYER und Mitarbeiter (1983) zeigten, dass eine Verweildauer von drei bis sechs Monaten nötig ist, damit poröse und hochdichte Polyethylen-Körper mit 153 µm Porengröße vollständig von neugebildetem Knochen durchwachsen werden.

Da sich Polyethylen bioinert verhält, ist kein osteoinduktives Vermögen zu erwarten. Trotz intensiver Literaturrecherche konnten keine Aussagen zur osteokonduktiven Potenz des Kunststoffes gefunden werden. Die Versuche von SPECTOR und Mitarbeitern (1975), KLAWITTER und Mitarbeitern (1976) sowie MAYER und Mitarbeitern (1983) zeigen aber, dass durch eine offenporige Gestaltung der verwendeten Implantate ein Leitschieneffekt zu erreichen ist.

II.1.2.2 Hydroxylapatit und Knochengewebe

Hydroxylapatit-Keramik ist mit Hydroxylapatit, dem Hauptbestandteil der anorganischen Knochensubstanz, chemisch weitgehend identisch. Hochtemperaturbehandelte Hydroxylapatit-Keramik unterscheidet sich im Wesentlichen nur in Form und Größe der Kristallite vom Hydroxylapatit des natürlichen Knochens (LIEBENDÖRFER und TRÖSTER, 1997). Aufgrund des günstigen Komponenten-Verhältnisses dieser Kalzium-Phosphat-Keramik ($Ca / P = 1,67$) kommt es zu einem *osteotropen* Grenzflächenmechanismus. Das heißt Hydroxylapatit setzt als bioaktiver Werkstoff im Organismus Kalzium- und Phosphationen frei. Daraus resultiert eine mikromorphologische Verankerung enossaler Implantate. Es kommt zu einem nicht mehr abgrenzbaren Keramik-Knochen-Verbund, der sog. „Verbundosteogenese“ (OSBORN et al., 1980). Dabei spielt es keine Rolle, ob die

Hydroxylapatit-Keramiken natürlichen oder synthetischen Ursprungs sind. Auch HA-Partikeln in Nanogröße wird in-vitro eine geringe Zytotoxizität bei gutem Zellattachement und –wachstum von humanen Osteoblasten bestätigt (HUANG et al., 2004).

Nach KÖSTER und Mitarbeiter (1976) ist die Gewebeverträglichkeit verschiedener Kalzium-Phosphat-Keramiken von der mineralogischen und chemischen Zusammensetzung des Materials abhängig. Keramiken mit einem $\text{CaO} : \text{P}_2\text{O}_5$ -Verhältnis von 2 : 1 bis 4 : 1 erweisen sich als gut biokompatibel, optimal ist das Verhältnis von 3 : 1. Dies entspricht Trikalziumphosphat-Keramiken. Auch KLEIN und Mitarbeiter (1983) bescheinigen allen Kalzium-Phosphat-Keramiken mit einem Ca : P-Verhältnis von 10 : 6 oder 3 : 2 eine gute Biokompatibilität. In ihren Untersuchungen wird zunächst normal strukturierter Geflechtknochen, ohne Ausbildung einer bindegewebigen Trennschicht, direkt auf der Keramik abgelagert und später durch Lamellenknochen ersetzt. Entzündliche Reaktionen treten nicht auf. Diesen Befunden schließen sich in den folgenden Jahren zahlreiche weitere Forschungsgruppen an (TOPOLL, 1984; ROTHSTEIN et al., 1984; TRACY et al., 1984; DONATH et al., 1985; GUMAER et al., 1986; NAJJAR et al., 1991; KRÜGER et al., 1997; GABRIELLI et al., 2001).

Lediglich LEHTINEN und Mitarbeiter (1990) stellten nach Implantation von Hydroxylapatit in Knochendefekte milde Entzündungsreaktionen im Markraum fest. Diese heilen jedoch binnen sechs bis acht Wochen vollständig ab. Dabei spielt die Form der eingebrachten Partikel im Gegensatz zu den Reaktionen im Weichgewebe keine Rolle. Im allgemeinen können auch keine Fremdkörper- oder Abstoßungsreaktionen beobachtet werden (CHANG et al., 1983; RENOOIJ, 1985). Nur FRAME und Mitarbeiter (1987) fanden in der Umgebung von dichten Hydroxylapatit-Keramiken einzelne, verstreut liegende Fremdkörperriesenzellen. So wird Hydroxylapatit eine gute Osteokompatibilität zugeschrieben.

Nicht ganz so einstimmig sind die Meinungen hinsichtlich der osteoinduktiven und / oder osteokonduktiven Potenz dieses Materials. Die Mehrheit der Autoren spricht Hydroxylapatit-Keramiken jede osteoinduktive Fähigkeit ab (CHANG et al., 1983; ALBERS, 1990; HEISE et al., 1990; MANDELKOW et al., 1990; SCHENK, 1991). Auch SIEBERT und Mitarbeiter (1987) sehen bei allen zu dieser Zeit verfügbaren Kalzium-Phosphat-Keramiken keine oder nur eine geringe Stimulation der Knochenneubildung. Erst die Kombination mit Knochengelatine führt zur Osteoinduktion. Auch HEISEL (1987) attestiert Hydroxylapatit-Keramiken einen solchen Effekt, hält dann aber die Anwesenheit von osteogenetischen Zellen für unabdingbar.

Hingegen sprechen REUTERS und Mitarbeiter (1985) diesen Keramiken durchaus die Eigenschaft zu, die Knochenneubildung bei bindegewebiger Abkapselung vom Defektrandknochen anzuregen. KLEIN und Mitarbeiter (1983) folgern aus ihren Beobachtungen, dass Hydroxylapatit ein höheres osteogenetisches Potenzial besitzt als Trikalziumphosphat. In einem Zeitraum von drei Monaten bildet sich nach Implantation von Hydroxylapatit mehr und vor allem kompakteres Knochengewebe als nach dem Einbringen von Trikalziumphosphat in einen vergleichbaren Defekt.

Lediglich YAMASAKI und SAKAI (1992) weisen für Hydroxylapatit ein gewisses osteogenetisches Vermögen nach; so führt die subkutane Implantation von porösem Material zur heterotopen Knochenbildung, die der dichten Form dagegen nicht. Bezüglich des Mechanismus nehmen sie an, dass die porösen Partikel entweder Kalziumphosphationen freisetzen oder die Knochenbildung im Zuge einer Ionenaustausch-Reaktion mit dem umgebenden Gewebe stimuliert wird. WEINLÄNDER und Mitarbeiter (1987) versagen Hydroxylapatit ebenfalls jegliche osteoinduktive Wirkung, kommen aber zu der Erkenntnis, dass es die Fähigkeit hat, osteogenetisch aktive Zellen zur Knochenneubildung anzuregen. Demzufolge kann Hydroxylapatit als Träger und Leitschiene für osteogene Zellen angesehen werden. Nach OSBORN (1985) hat es die Fähigkeit der *Osteokonduktion*. Dieser Aussage schließen sich wiederum zahlreiche weitere Autoren an (WANG et al., 1993; KRÜGER et al., 1997; STÜTZLE et al., 1998; KURIOKA et al., 1999). KURIOKA und Mitarbeiter (1999) bemerken, dass das osteokonduktive Vermögen von Hydroxylapatit-Granulat von dessen Form abhängig ist. Besonders gute Ergebnisse erzielen sie mit einem polygonalen Granulat, das zudem durchgehende Poren mit Durchmessern zwischen 30 und 200 µm hat.

Verschiedene Autoren ordnen Hydroxylapatit der Klasse der bioaktiven Werkstoffe zu (OSBORN, 1979; HEIMKE und GRISS, 1980; HENCH, 1988; YAMAMURO et al., 1988; EITENMÜLLER et al., 1990; GÜNTHER et al., 1998). „*Bioaktivität*“ ist definiert als die charakteristische Eigenschaft eines Implantatmaterials, die es ihm ermöglicht eine echte chemische Verbindung mit dem auf seiner Oberfläche angelagerten Knochengewebe einzugehen. Es kommt zu einem stoffschlüssigen Knochenanbau oder „bone-bonding“ (HENCH, 1988; SCHENK, 1991).

Hingegen bezeichnet ALBERS (1990) Hydroxylapatit-Keramik als ein nicht bioaktives, sondern höchstens als ein biotolerantes Material. Das geht aus der Implantation soliden Hydroxylapatit-Keramik-Granulates in artefizielle Kieferdefekte bei Hunden hervor. Das

Material wird allenfalls vom Gewebe toleriert, d.h. ortsständige Zellpopulationen werden in ihrer spezifischen Aktivität nicht gestört.

Nach OSBORN (1985) ist die Oberfläche von Hydroxylapatit-Keramiken *osteotrop*, d.h. dass sie, analog zu einer natürlichen Knochenoberfläche, als Matrix für die Differenzierung der Osteoblasten und die Mineralisationsvorgänge dient. Somit schreibt OSBORN der reinen kristallinen Hydroxylapatit-Keramik neben ihrer passiven, aber idealen Biokompatibilität, eine aktive Grundeigenschaft zu. Das Material ist mitogen, es stimuliert die Zellvermehrung von Stützgewebezellen. Daraus folgert der Autor, dass die Osteogenese direkt und primär auf der Keramik einsetzt. Diese Auffassung unterstützen die Untersuchungsergebnisse von NERY und Mitarbeitern (1975), VAN BLITTERSWIJK und Mitarbeitern (1985) sowie BRILL und KATTHAGEN (1987). Hingegen fanden DONATH und Mitarbeiter (1985; 1987) ein Einheilungsmuster, das vielmehr dem von bioinertem Material entspricht. Auch andere Autoren registrierten zu keinem Zeitpunkt eine epiimplantär beginnende Osteogenese (MANDELKOW et al., 1990; SCHNETTLER et al., 1994; RÖSER et al., 1994). Entscheidend für die Formation neuen Knochens in direkter chemischer Verbindung zu den Keramikpartikeln ist das subperiostale Einbringen des Materials (CHANG et al., 1983; FRAME et al., 1987).

Untersuchungen mit synthetischen Hydroxylapatit-Implantaten zeigen, dass sich in-vivo eine mineralische Phase auf den Implantaten ablagert, die weitgehende Übereinstimmungen mit Knochenapatit aufweist. Das Elektronendiffraktionsmuster und die IR-Spektren dieser Schicht ähneln denen des natürlichen Knochenminerals, unterscheiden sich aber signifikant von synthetischem Hydroxylapatit. Aufgrund der Tatsache, dass sich dieser biologische Apatit schon innerhalb der ersten 24 Stunden nach Implantation eines kalziumhaltigen Materials auf dessen Oberfläche ablagert, geht man davon aus, dass diese Ablagerung eine obligatorische Vorläuferphase darstellt. Die biologische Apatitschicht dient vermutlich als Substrat für die nachfolgende Proteinadsorption sowie die Anhaftung von Knochenzellen (SPECTOR, 1991). Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Interface liefern Erkenntnisse bis zur Ultrastruktur der Grenzfläche Hydroxylapatit-Keramik / Knochen (DIELERT et al., 1988). Demnach enthält der neue Knochen im Interface Hydroxylapatit-Kristalle der selben Größe und Form wie normaler Knochen (TRACY und DOREMUS, 1984). Außerdem zeigt sich bei elektronenmikroskopischer Vergrößerung weder ein Spalt noch Fremdgewebe zwischen Knochen und Implantat (BHASKAR et al., 1971). Feinste Ausläufer treten von dem neu gebildeten Knochen auf die strukturierte Apatitoberfläche über,

die Apatitkörner werden dreidimensional ummantelt. Sie sind regelrecht in neues Knochengewebe eingemauert. Eine 2000-fache Vergrößerung zeigt Kollagenfasern, die von neu gebildetem Knochen auf die Hydroxylapatit-Oberfläche übergreifen. Dadurch erklärt sich u.a. die mechanische Festigkeit der entstandenen Verbindung (BRILL und KATTHAGEN, 1987). Morphologisch läßt sich das Implantat nicht mehr von dem neu entstandenen Knochengewebe im Reifestadium abgrenzen (RUDEL, 1989). Im Rasterelektronenmikroskop (REM) ist zu erkennen, dass die Mineralphase des Knochens und des Implantates ineinander übergehen (OSBORN, 1985). Es erfolgt demnach eine vollständige Integration des Biomaterials in den Knochen (OSBORN, 1985; BAUER et al., 1988; NAIJAR et al., 1991).

Bei dem neu gebildeten Knochen handelt es sich um normal strukturierten Geflechtknochen, der durch Gefäßreichtum und große Osteozytendichte gekennzeichnet ist (FRAME, 1981; KLEIN et al., 1983; BRILL und KATTHAGEN, 1987). Allmählich wird der primitive Geflechtknochen durch Lamellenknochen ersetzt. Die Knochenneubildung läuft bei Zusatz von autogenem Knochen nicht nur schneller ab (BLOCK et al., 1987), das Gefäßsystem sowie die Havers'schen Systeme sind auch besser ausgebildet (BLOCK und KENT, 1985).

Als unabdingbare Voraussetzung für die völlige Integration des implantierten Materials und eine ungestörte Knochenbildung gelten sowohl formschlüssiges Implantieren als auch eine Primärstabilität des Implantates. Beides wird durch „Presssitz“ (press-fit) erreicht, so dass in den ersten Wochen nach der Implantation mit mechanischer Ruhe im Implantatbett gerechnet werden kann (SCHENK, 1991). Denn Mikrobewegungen verhindern eine primäre knöcherne Einheilung des Knochenersatzstoffes (HEISE et al., 1990; LIEBENDÖRFER und TRÖSTER, 1997).

RENOIJ (1985) bezeichnet den Kontakt zwischen Hydroxylapatit und Knochen als extensiv. JARCHO (1992) spricht von kontinuierlichem, ununterbrochenem Kontakt zwischen keramischem Hydroxylapatit und dem Knochenmineral auf kristalliner Ebene. Knochenkontakt in dieser Form kommt nur bei Hydroxylapatit und bei keinem anderen Biomaterial vor. Knochen und Implantat bilden eine derart feste Einheit, dass es nicht gelingt das implantierte Material experimentell mittels eines „push-out-Tests“ wieder zu lösen. Diese mechanische Trennung erfordert Kräfte, die sowohl die mechanische Belastbarkeit des Knochens als auch diejenige des Hydroxylapatit übersteigen. Daher kommt es bei diesen Versuchen immer zu Brüchen auf beiden Seiten des Interface, aber nie in diesem selbst (DENISSEN et al., 1980; EITENMÜLLER et al., 1990; SIMONS und VIZETHUM, 1997).

Entscheidend für die Geschwindigkeit der Integration des Fremdmaterials in den Knochen und für das Ausmaß, in dem Knochen in das Implantat einwächst, ist die Architektur oder Makrostruktur einer Hydroxylapatit-Keramik. Während sich dicht gesinterte Keramik zwar durch große Stabilität und enorme Druck- und Zugfestigkeit auszeichnet (JARCHO, 1981), ermöglicht sie jedoch nur in sehr geringem Maß das Einwachsen von Knochen in die aufgefüllten Regionen (YAMAZAKI, 1988). Hinsichtlich ihrer knöchernen Integration wies RUDELT (1989) für die dicht gesinterte Hydroxylapatit-Keramik Apaceram nach, dass bereits eine Woche nach ihrer Implantation an den Randbereichen des Materials Ossifikationsvorgänge ablaufen. Nach drei Monaten verbindet kompakter Knochen die Keramik mit vitalem Knochen, eine Unterscheidung von reifem Knochen ist nicht mehr möglich. In einer einjährigen Studie mit solidem Hydroxylapatit-Keramik-Granulat im Hundegebiß wies auch ALBERS (1990) eine knöcherne Einlagerung dieses Materials nach. Er sieht grundsätzlich keine Unterschiede in der osteotropen Leistungsfähigkeit von solider und poröser Hydroxylapatit-Keramik. Ähnliches wird von anderen Autoren bestätigt (KENNEY et al., 1985; MOORE et al., 1986).

Im Gegensatz dazu finden sich die Aussagen von FROUM und Mitarbeitern (1982) sowie von MOSKOW und Mitarbeitern (1983). Sie sehen solide Hydroxylapatit-Keramik regelmäßig nur von Bindegewebe umgeben. OSBORN und FRENTZEN (1988) fanden nach enossaler Implantation von porösem Hydroxylapatit-Keramik-Granulat signifikant mehr Knochenneubildung als bei der kompakten Form. Nach parodontaler Implantation von kompakten Granulaten zeigt sich stets nur bindegewebiges Stroma um die Partikel, obwohl diese häufig direkten Kontakt zum Originalknochen haben. Mit der Verwendung von porösen Implantaten versucht man gewissermaßen die knöcherne Idealstruktur der Spongiosa zu imitieren (SCHENK, 1991). Die Knochenregeneration kann dabei dem angebotenen Leitgerüst folgen, eine offenporöse Struktur begünstigt das rasche Einwachsen von Knochengewebe in die Keramik (KÖSTER et al., 1976; YAMAZAKI, 1988).

Eine hohe Porosität hat aber auch eine verminderte mechanische Stabilität zur Folge. Die Druckfestigkeit kompakter Kalzium-Phosphat-Keramiken liegt deutlich über der von kortikalem Knochen, ihre Biegefestigkeit ist jedoch geringer. Die Druckfestigkeit poröser Keramiken hängt exponentiell vom Volumenanteil der Poren ab. Je größer ihr Anteil ist, desto weniger belastbar ist das Implantat. Daher empfiehlt SCHENK (1991) für Kalzium-Phosphat-Keramiken eine Volumendichte von mindestens 50%, damit sie einer physiologischen Belastung Stand halten können.

Auf KLAWITTER und HULBERT (1971) gehen die Mindestanforderungen an den Porendurchmesser zurück, um das Einwachsen physiologischer Gewebeformationen zu gewährleisten. Bindegewebe kann bereits bei einem Durchmesser von 5 -15 μm einwachsen, mineralisiertes Knochengewebe benötigt etwa 100 μm . Für das Einwachsen von Osteonen in Makroporen wird heute allgemein eine Minimumweite von 100 μm akzeptiert (OSBORN, 1987).

Hingegen wächst nach KATO und Mitarbeitern (1979) mineralisiertes Gewebe, unabhängig von der Porengröße, in synthetische Hydroxylapatit-Keramik ein. Sie stellten fest, dass Keramiken mit höherer Dichte schneller und besser von neugebildetem Knochengewebe durchdrungen werden. Bei der Untersuchung von sechs verschiedenen Hydroxylapatit-Granulaten hinsichtlich ihres Lösungsverhaltens und ihrer Osteokonduktivität sehen KURIOKA und Mitarbeiter (1999) Knochen, der in Poren mit einem Durchmesser von 50 μm und kleiner einwächst. Auch OSBORN (1985) sieht in den untereinander verbundenen Poren eine wesentliche Voraussetzung für die knöcherne Integration eines porösen Werkstoffes. EGGLI und Mitarbeiter (1988) betonen ebenfalls die Notwendigkeit eines interkonnektierenden Porengefüges für das Einwachsen von Knochen in Keramiken. Die tatsächliche Größe der Poren sehen sie nicht als entscheidend an.

DINGELDEIN und Mitarbeiter (1994) stellten fest, dass es durch das Einwachsen von Knochen in offenporige Keramik, verbunden mit der manschettenartigen Auflagerung des Knochens auf den Keramiktrabekeln, zu einer Veränderung der mechanischen Eigenschaften des Implantates kommt. Kleinere und größere Defekte werden mit mineralisierendem Osteoid aufgefüllt, wodurch die Rigidität der Keramik deutlich herabgesetzt wird. Als Voraussetzung sehen die Autoren auch hier ein weit offenes, interkonnektierendes Porengefüge, das weder blind endende noch „flaschenhalsförmig“ eingeschnürte Einzelporen enthält. Untersuchungen mit der kommerziell erhältlichen, porösen Hydroxylapatit-Keramik Endobon[®] zeigen eine mit zunehmendem Einwachsen von Knochen in die Keramik deutlich steigende Druckfestigkeit des Materials. Fünf Wochen nach der Implantation ist diese um 300 % gestiegen. Parallel dazu steigt auch die Resistenz gegen Scherkräfte im Interface und erreicht nach fünf Wochen ihr Maximum mit ca. 3 MPa (HING et al., 1997; 1999).

II.1.3 Biodegradation / Bioresorption

„Biodegradabel oder resorbierbar ist eine Substanz, die nach der Implantation abgebaut wird, ohne eine Abwehrreaktion oder Irritation des Implantatbettes hervorzurufen (HEIMKE und GRISS, 1980).

II.1.3.1 Polyethylen

Nach drei Monaten wiesen die von MAYER und Mitarbeitern (1983) gewonnenen Proben noch keine Mineralisation auf. Nach sechs Monaten konnten dagegen vollständige knöcherne Integration und Mineralisation ermittelt werden. Allerdings ist eine Zunahme der Bruchfestigkeit, wie sie eigentlich zu erwarten gewesen wäre, nicht festzustellen. Die Autoren führen dies auf eine gleichzeitig stattfindende Degradation des Polyethylen zurück. WEIMER und SCHALDACH (1984) gelang es mittels Ramanmikroanalyse diese biologischen Abbauvorgänge an hochdichtem Polyethylen nachzuweisen. Bereits bei der Bearbeitung des Materials entstehen Oberflächenschäden, die dann einen bevorzugten Abbau der Oberfläche ermöglichen. Schon nach kurzer künstlicher Alteration in isotoner NaCl-Lösung beobachteten die Autoren Rissbildungen an der Oberfläche. Diese führen sie jedoch nicht auf die hydrolytische Spaltung von Molekülketten, sondern auf die Umorientierung der verschiedenen Segmente innerhalb des Materials nach der Quellung zurück.

Die Untersuchungen von JEROSCH und Mitarbeitern (1995) weisen darauf hin, dass es durch die Bestrahlung von ultrahochmolekularem Polyethylen mit Gamma-Strahlen zu einer chemischen Veränderung des Werkstoffes kommt. Gamma-Strahlen, wie sie zur Sterilisation des Werkstoffes vor einer medizinischen Anwendung lange Jahre eingesetzt wurden, haben den großen Vorteil, dass keinerlei weitere Nachbehandlung mehr nötig ist. Andererseits induzieren sie durch die Bildung freier Radikale eine Oxidation, die auch nach der Implantation noch fortschreitet und eine beschleunigte und verstärkte Alterung des Werkstoffes zur Folge hat. Eine Reduzierung der strahleninduzierten Oxidation kann durch Ausschluss von Sauerstoff erreicht werden. Durch Bestrahlung in Stickstoffatmosphäre können die positiven Effekte der Strahlensterilisation vorteilhaft zur Vernetzung von Polyethylen genutzt werden. Es entsteht sog. hochvernetztes oder „highly cross linked“ Polyethylen, das im Labor eine extreme Reduktion der Abriebwerte zeigt (STREICHER und THOMSEN, 2003). Um die Nachoxidationseffekte zu minimieren, wird auch die weitere Lagerung in einer Schutzgasatmosphäre empfohlen. COLLIER und Mitarbeiter (1996)

bestätigen eine erhöhte Oxidation von Polyethylen in der Folge einer Gamma-Bestrahlung unter Sauerstoff, gefolgt von einer deutlichen Abnahme seiner mechanischen Eigenschaften. Als alternative Methoden testeten sie die Gamma-Bestrahlung unter Schutzgasatmosphäre bzw. im Vakuum, die Sterilisation mit Ethylenoxid sowie das Plasma-Gas-Verfahren.

Auch wenn das Langzeitverhalten alternativ bestrahlter Polyethylen-Implantate noch unklar ist, zeigen alle derart sterilisierten Proben bereits vor der Implantation eine deutlich geringere Degradation. Gleichzeitig wird auch die Alterung des Materials durch Postoxidation minimiert (GOLDMANN und PRUITT, 1998).

II.1.3.2 Hydroxylapatit

Sowohl nach extraskeletaler wie auch nach enossaler Implantation gilt Hydroxylapatit als schwer resorbierbares Material. Dagegen sind andere Kalzium-Phosphat-Keramiken wie Trikalziumphosphat (TCP) leicht resorbierbar. Auf der Suche nach Gründen für dieses unterschiedliche Verhalten diskutieren verschiedene Forschergruppen diverse Antworten. EGGLI und Mitarbeiter (1988) sehen die Zusammensetzung des Biomaterials als entscheidenden Faktor an. Diese kann nicht zuletzt auch aufgrund von Phasenunreinheiten der Rohstoffe variieren. Andererseits kann aber auch das Kalzium-Phosphat-Verhältnis der Keramiken eine Rolle spielen (HA: 1,67; TCP: 1,5) oder die differierende kristallographische Struktur (HA: Apatitform; TCP: β -Whitlockit) und letztlich auch die Geometrie der einzelnen Keramikpartikel (KLEIN et al., 1983).

Nach Versuchen mit sechs verschiedenen porösen Kalzium-Phosphat-Keramiken vermuten KÖSTER und Mitarbeiter (1976), dass die Resorbierbarkeit dieser Materialien von den am Aufbau beteiligten kristallinen und glasigen Phasen und zusätzlich vom Gefüge abhängt. Je lockerer das Gefüge und je größer die Oberfläche des Werkstoffes, desto schneller verläuft die Resorption. Die Untersuchungen von WINTER und Mitarbeitern (1981) mit soliden und porösen HA- und TCP-Keramiken zeigen, dass sich die porösen Formulierungen lange Zeit ähnlich verhalten, während zwei dichte Hydroxylapatit-Körper deutliche Zeichen von Degradation aufweisen. Die Autoren schließen daraus, dass nicht nur die Dichte des Materials seine Biodegradation beeinflusst. Sie sehen Variationen in der Herstellung (Sinteremperatur) als ebenso wichtig an wie Phasenunreinheiten. KLEIN und Mitarbeiter (1983) halten die Porosität (Makro- und Mikroporen) des eingesetzten Kalzium-Phosphat-Werkstoffes zwar für notwendig, aber nicht allein verantwortlich für die Biodegradation. Denn zahlreiche andere Faktoren beeinflussen wiederum die Auflösungsrate von Kristallgrenzen, die durch die Mikroporosität ermöglicht wird. Dazu gehören u.a. der pH-Wert, der Gehalt an

Spurenelementen und die Serumproteinkonzentration. KRÜGER und Mitarbeiter (1997) sehen die Resorption von Hydroxylapatit durch biochemische und mechanische Faktoren beeinflusst. So erfolgt eine rasche Auflösung von Hydroxylapatit in einem Milieu mit pH-Wert 4,2 oder kleiner, wie es z.B. durch massive Makrophagenaktivität im Rahmen einer Entzündung vorliegen kann. WEINLÄNDER und Mitarbeiter (1987) halten es für möglich, dass Mikroporen die Bioresorption fördern, indem sie die mikroskopische Aufspaltung („break up“) an den Kristallgrenzen ermöglichen. Dabei kommt es zur Lösung der Verbindungen („necks“), welche die einzelnen Kristalle im Verbund halten. Die Kristalle können herausgelöst und phagozytiert werden. Diese Vermutungen konnten durch die Beobachtung multinukleärer Zellen mit inkorporierten Keramikpartikeln bestätigt werden. Ähnliches fanden DINGELDEIN und Mitarbeiter (1994) nach Implantation einer natürlichen Hydroxylapatit-Keramik in ein spongiöses Knochenlager beim Kaninchen. An der Keramik treten Risse und Fissuren auf, die man auf nicht ausreichende Brückenbildung beim Sintervorgang zurückführt. Dadurch kommt es zu Auflösungserscheinungen und einer Anhäufung von freien Kristallen, die von zahlreichen Makrophagen aufgenommen werden. Dennoch sprechen die Autoren nicht von einem Abbau der Spongiosakeramik, da sie nicht unmittelbar einer Resorption durch Osteoklasten unterliegt und ihr Gerüst nicht in das Remodeling des aufgelagerten Knochens einbezogen wird. Angelöste Kristallite, die teilweise von Makrophagen phagozytiert werden, beobachten auch andere Autoren (RÖSER et al., 1994; STEA et al., 1995; LIEBENDÖRFER und TRÖSTER, 1997). REY (1990) sieht die Resorption von Kalzium-Phosphat-Keramiken durch zwei Faktoren ausgelöst. Zum einen durch eine Phasenumwandlung der Partikel zu Kristallen und zum anderen durch die Auflösung der Kristalle selbst. Daher hält er kristallographische Struktur und Phasen(un)reinheiten für die wichtigsten Gründe der so unterschiedlichen Resorptionsraten der Kalzium-Phosphat-Keramiken.

Nach SPECTOR (1991) ist mit dem Ausdruck „resorbierbar“ die osteoklastäre Resorption gemeint. Diese konnte aber für keine der synthetischen Kalzium-Phosphat-Keramiken nachgewiesen werden. Er verwendet den Begriff „dauerhaft“ und weist nach, dass alle als dauerhaft bezeichneten Substanzen einem gewissen biologischen Abbau unterliegen. Dieser erfolgt entweder durch chemisch-physikalische Auflösung und / oder Fragmentation. Obwohl der genaue Mechanismus noch nicht geklärt ist, sieht der Autor diesen Tatbestand auch für synthetisches Hydroxylapatit gegeben, obgleich es aufgrund seiner geringen Löslichkeit in biologischen Flüssigkeiten als langlebiger Werkstoff angesehen werden kann.

II.1.4 Klinische Bedeutung von Polyethylen und Hydroxylapatit in der Human- und Veterinärmedizin

II.1.4.1 Klinischer Einsatz von Polyethylen

Der Ersatz geschädigter Gelenke durch Kunstgelenke hat sich zu einem weltweit praktizierten Standardverfahren entwickelt (LAMPE et al., 1998). In der Humanmedizin werden heute beinahe alle großen Gelenke ersetzt. Dies gilt nicht für die Veterinärmedizin, da die Entwicklung einer Prothese sehr zeit- und kostenintensiv ist, und die Indikationen für Ellbogen- und Kniegelenkersatz relativ selten sind. Außerdem gestaltet die sehr unterschiedliche Körpergröße des Patientengutes die Endoprothetik in der Tiermedizin zusätzlich schwierig. Standardmäßig und klinisch erfolgreich seit den 70er Jahren werden bisher nur Hüftprothesen beim Hund eingesetzt. Erste Experimente zum künstlichen Kniegelenkersatz beim Hund werden aber bereits durchgeführt (OLMSTEAD und HOHN, 1980; OLMSTEAD, 1987).

Seit Beginn der Endoprothetik wurden einige polymere Materialien als Kontaktflächenersatz eingesetzt, darunter auch Polyethylen in verschiedenen Formen: als hochdichtes Polyethylen (high-density Polyethylen / HDPE), ultrahochmolekulares Polyethylen (ultra high molecular weight polyethylene / UHMWPE), wie es heutzutage bei einer humanmedizinischen Standardprothese der Hüfte verwendet wird, und carbonverstärktes UHMWPE (JEROSCH et al., 1995).

Sir John Charnley begann im Jahr 1958 mit dem klinischen Einsatz seiner „low-friction-arthroplasty“ (LFA) als Hüftgelenkersatz. Nachdem es unter Verwendung von Polytetrafluoroethylen (PTFE = Teflon) für die Hüftpfanne zu massivem Abrieb und nachfolgenden Fremdkörperreaktionen kam, folgte 1962 der Einsatz von ultrahochmolekularem Polyethylen (UHMWPE) (CHARNLEY, 1970). Durch ein entsprechendes Design und Implantationsverfahren konnten für diese Prothesen Standzeiten von über 15 Jahren erreicht werden (CHARNLEY, 1975). Die LFA nach Charnley wird nun seit vielen Jahrzehnten erfolgreich praktiziert und kann als „Goldener Standard“ des zementierten Hüftgelenkersatzes angesehen werden (WROBLEWSKI und SINEY, 1993). Für den zementfreien Ersatz hat sich die direkte Verankerung von UHMWPE-Pfannen im Knochen nicht bewährt, da Knochengewebe mit dem bioinerten Polyethylen keine Verbindung eingeht. Durch Relativbewegungen gegenüber dem 5-fach härteren Knochen kommt es in der Folge zu massivem Verschleiß (STREICHER und THOMSEN, 2003).

In der Veterinärmedizin war bis etwa 1990 die sog. „fixed-head“-Prothese (= Femurkopf, -hals und -schaft in einem Guß, aus Kobalt-Chrom) mit einer Polyethylen-Pfanne großer Dichte im Einsatz. In neuerer Zeit findet immer häufiger ein modulares System Verwendung, bestehend aus einem Kobalt-Chrom-Schaft, einem separaten Kobalt-Chrom-Femurkopf und PE-Pfannen in verschiedenen Größen. Die Verankerung in Femur und Acetabulum erfolgt mit dem „Knochenzement“ Polymethylmethacrylat (PMMA). Die Prothese kann bei Hunden ab einem Körpergewicht von 14 kg ohne Gewichtsbeschränkung nach oben eingesetzt werden (OLMSTEAD und BONATH, 1998).

Im Gegensatz zu den Variationen in der Hüftendoprothetik hat sich in der humanen Knieendoprothetik eine einzige Standardgleitpaarung bzw. Oberflächenersatzprothese etabliert. Am distalen Femur wird ein metallischer Gelenkflächenersatz (Kobalt-Chrom oder Titan-Legierung) mit oder ohne Patellaschild befestigt. Diese metallischen Kondylen artikulieren gegen ein UHMWPE-Onlay, das die proximale Gelenkfläche der Tibia ersetzt (BÄDORF und WILLMANN, 1998). Durch ein verändertes Herstellungsverfahren („Verstreckung“) des Polymers Polyethylen, wodurch es der mikrostrukturellen Architektur des Gelenkknorpels besser angepasst werden kann, scheint die mechanische Belastbarkeit im System der Kniegelenksprothese zu steigen (WIRTZ et al., 2001).

Etwa gleichzeitig mit dem routinemäßigen Einsatz von Polyethylen beim Gelenkersatz nutzte man auch beim Ersatz von Gehörknöchelchen die positiven Eigenschaften dieses Materials. Die Entwicklung poröser Polyethylen-Körper brachte dann den entscheidenden Fortschritt im totalen Ersatz von Gehörknöchelchen (total ossicula replacement prosthesis / TORP). Heute steht mit HAPEX™ ein Material zur Verfügung, das, basierend auf diesen ersten Erfahrungen, stetig weiterentwickelt und optimiert wird.

Nach dem heutigen Stand der Technik ist UHMWPE für den Gebrauch in der Endoprothetik und zahlreichen verwandten Gebieten das am besten geeignete Material. Dieser Werkstoff hat einen geringen Reibungskoeffizienten in unterschiedlichen Gleitpaarungen, gute Materialeigenschaften und wenig Abrieb (JEROSCH, 1996). Durch entsprechende Modifikationen bei der Herstellung, Bearbeitung und Sterilisation können diese Eigenschaften weiter optimiert und den jeweiligen mechanischen und tribologischen Erfordernissen besser angepaßt werden (STREICHER und THOMSEN, 2003).

II.1.4.2 Kontraindikationen und Schwierigkeiten beim Einsatz von Polyethylen

Je nach geplanter Verweildauer im Organismus unterscheidet man in der Endoprothetik zwischen Kurz- und Langzeitimplantaten (BENSMANN, 1996). Die Dauer wird dabei nicht zuletzt vom Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Implantation, also vom maximal zu erwartenden Lebensalter bestimmt. Durch die zunehmende Anzahl von endoprothetischen Eingriffen bei jüngeren Patienten entstand eine Diskussion über Standzeiten und Gründe für die aseptischen Lockerungen von Totalendoprothesen (BÄDORF und WILLMANN, 1998).

Bereits Mitte der 80er Jahre mehrten sich die Anzeichen dafür, dass auch der Werkstoff Polyethylen einen limitierenden Faktor für die Lebensdauer von Endoprothesen darstellt. Mittlerweile gilt es als gesichert, dass PE-Abriebpartikel als eine Hauptursache für aseptische Prothesen-Lockerungen anzusehen sind (JEROSCH et al., 1995). Partikelförmige Abrieb- und Zerrüttungsprodukte der Implantatmaterialien lösen in der Umgebung der Prothesen Fremdkörperreaktionen im Bindegewebe aus. Histiozyten und Riesenzellen phagozytieren die freien Partikel und bilden Granulome. Diese induzieren an der Implantat-Knochen-Grenze Umbau und Resorption des Knochens. Die entstandenen Osteolysen können zur Lockerung der Implantate führen („Partikelkrankheit / wear disease“) (HOWIE et al., 1988; WILLERT et al., 1989; ALLEN et al., 1996).

Angesichts des kontinuierlichen Anfalls von Kunststoffabrieb mit der entsprechenden Gewebereaktion, des damit verbundenen Anstiegs des Reibungskoeffizienten bis hin zur mangelnden Gleitfähigkeit des Prothesenkopfes in der PE-Pfanne sehen WEBER und FIECHTER (1989) generell keine Zukunft mehr für den Gleitpartner Polyethylen in der Endoprothetik. Nach eingehenden Werkstoffprüfungen kommt auch BENSMANN (1996) zu dem Schluß, dass im tribologischen System der Hüftendoprothesen das Polyethylen derzeit die Schwachstelle ist. Zu den zahlreichen bekannten Faktoren, die den Abrieb der verschiedenen Materialien fördern, gehört unter anderem die Art des Sterilisationsverfahrens (siehe dazu Kap. II.1.3.1). Andere Einflüsse werden bisher nur diskutiert und müssen noch eingehender untersucht werden (JEROSCH et al., 1995). Mit der Entwicklung sogenannter „Hart-Hart-Paarungen“ (Metall-Metall; Keramik-Keramik) konnte in der Hüftendoprothetik die Abriebrate jedoch deutlich verringert werden (WIRTZ et al., 2001).

Auf den ersten Blick scheinen die Verhältnisse in der Knieendoprothetik sehr ähnlich zu sein. Die Verweildauer einer Knieprothese korreliert mit den Versagensmechanismen des Polyethylens. Bei genauerer Betrachtung zeigt sich aber, dass sich der Materialabtrag bei Knieendoprothesen signifikant von dem der Hüftprothesen unterscheidet. Das Polyethylen

wird nicht oberflächlich an der Kontaktzone zum Kugelkopf abgerieben, sondern die polyradiäre Formgebung der Femurkomponenten sowie die kombinierte Roll-Gleitbewegung des Gelenkes bedingen komplexere Versagensmechanismen. Während sich die Abriebraten in der Hüftendoprothetik durch die Verwendung von Keramikköpfen halbieren lassen, verbietet sich der Einsatz keramischer Implantatkomponenten in der Kniegelenkendoprothetik. Keramik hat eine viel geringere Bruchfestigkeit als Polyethylen und ist damit den Spannungsspitzen, wie sie im komplexen Bewegungsmuster des Kniegelenkes auftreten können, nicht gewachsen. Es kann zum Implantatbruch kommen (WIRTZ et al., 2001).

Die Problematik einer zu kurzen Lebensdauer der Hüftendoprothesen stellt sich in der Veterinärmedizin nicht. Die durchschnittliche Lebenserwartung eines Hundes übertrifft nur selten die Standzeit einer Prothese von 15 Jahren. OLMSTEAD und BONATH (1998) geben an, dass in der Mehrzahl der Fälle die Prothese das ganze Lebensalter des Tieres hält. Die geschilderte aseptische Lockerung der Prothesen in der Humanmedizin tritt zwar durchaus auch als Komplikation nach einer THEP beim Hund auf, die häufigste Komplikation ist aber die Luxation. Zusätzlich optimieren die Konstruktionsverbesserungen des Modular-Systems und die Vorgehensweise der Vakuumzementiertechnik die Ergebnisse.

II.1.4.3 Klinischer Einsatz von Hydroxylapatit

In erster Linie dient Hydroxylapatit der Rekonstruktion knöcherner Läsionen in der Kiefer- und Gesichtschirurgie. Hier werden traumatogene oder osteolytische Defekte sowie durch Altersinvolution hervorgerufene Knochenmangelzustände des Kiefers mit Hydroxylapatit-Keramik behandelt. In der Orthopädie, Traumatologie und Neurochirurgie wird Hydroxylapatit als Osteoplastik bei Verletzungen, nach Entfernung benignen Tumoren und zur Stabilisierung der Wirbelsäule erfolgreich eingesetzt (OSBORN, 1985). In der Otologie wird poröse Hydroxylapatit-Keramik z.B. bei der Herstellung von Steigbügelprothesen eingesetzt (TREACE, 1994). Gemäß dieser sehr unterschiedlichen Indikationen findet Hydroxylapatit als Granulat oder in Pellet- bzw. Blockform, dicht gesintert oder porös Verwendung (ROTHSTEIN et al., 1984; DONATH et al., 1985; GUMAER et al., 1986; FRAME et al., 1987; FRENTZEN et al., 1988; RAWLINGS et al., 1988; SCHMIDT et al., 1988; ALBERS, 1990).

Hydroxylapatit ist in der Lage, autologe Transplantate teilweise zu ersetzen (KÖSTER et al., 1976). Denn die Kalzium-Phosphat-Keramik fördert als Füll- und Gerüstsubstanz durch Osteokonduktivität die Knochenregeneration (SPECTOR, 1991). Begünstigt wird dies

besonders bei der Verwendung großporiger Hydroxylapatitblöcke, die mit ihrem interkonnektierenden Porengefüge die Architektur der Knochenspongiosa nachahmen (OSBORN, 1985). Die Keramik wird vollständig in den Knochen inkorporiert. Da sie über eine ausgezeichnete Stabilität verfügt, ist sie auch noch nach Jahren nahezu unverändert in augmentierten Kieferbögen anzutreffen (BLOCK und KENT, 1985).

TOPOLL (1984) erzielte in einem Fall gute Ergebnisse bei der Therapie eines parodontalen Knochendefektes mit Hydroxylapatit. Dabei wird das Material nicht in Alveolarknochen umgewandelt, sondern es kommt zu Knochenapposition und reaktionsloser Einheilung. Vor der routinemäßigen Implantation empfiehlt der Autor allerdings in solchen Fällen die Ergebnisse von Langzeitstudien abzuwarten. ROTHSTEIN und Mitarbeiter (1984) veröffentlichten Ergebnisse einer klinischen Studie, in der atrophische Kieferknochen bzw. Alveolen mit Hilfe von Hydroxylapatit-Keramik rekonstruiert wurden. Die Studie umfaßt 110 Patienten, die über 33 Monate nachbeobachtet werden konnten. Im allgemeinen werden gute Resultate erzielt, denn Festigkeit, Umfang, Kontur und Form der Kieferknochen werden nachhaltig und auf Dauer verbessert. Die Mukosa über dem Implantat verheilt gut und ist fest mit der Keramik verbunden. Auch unter ästhetischen Gesichtspunkten ist der Ersatz ein voller Erfolg. Zudem können die Patienten bereits nach wenigen Wochen wieder eine Prothese tragen.

OSBORN (1985) berichtet von der Rekonstruktion einer primär infizierten offenen Unterarmfraktur. Autologe Spongiosa und Hydroxylapatit im Verhältnis 1 : 4 werden als Osteoplastik verwendet. Bei voller Belastung des Armes nach fünf Monaten zeigt sich ein vollständiger knöcherner Durchbau von Radius und Ulna. Bis auf eine mäßige Einschränkung des Armes in der Pro- und Supination ist die volle Funktionsfähigkeit wieder hergestellt worden.

In fast 100 Fällen verwendeten SCHMIDT und Mitarbeiter (1988) Hydroxylapatit-Granulat mit einem Porenvolumen von 60 bis 80 % zur Auffüllung von Spongiosaentnahmegebieten an Gliedmaßen. Sie berichten von durchweg guter Verträglichkeit des Materials und können keine allergischen oder toxischen Reaktionen beobachten. In einigen Fällen kam es jedoch bei der Verwendung von reinem Hydroxylapatit ohne Zusatz eines Antibiotikums zu Reinfektionen und Fistelbildung. HEISE und Mitarbeiter (1990) setzen eine poröse Hydroxylapatit-Keramik als Implantat zum extensiven Knochenersatz immer dann ein, wenn autologes Material nicht zu beschaffen oder insuffizient ist. Sie erzielen gute Ergebnisse auch im Vergleich zu Patientengruppen, die ausschließlich autologen Knochen erhalten.

Unabdingbare Voraussetzung dafür ist jedoch absolute mechanische Ruhe im Implantationsbett.

Bei der chirurgischen Behandlung von Pseudarthrosen ist der Einsatz von Autotransplantaten zusammen mit Hydroxylapatit nicht zufriedenstellend. Hier wird ein Material mit enormer osteogenetischer Potenz benötigt. LIEBENDÖRFER und TRÖSTER (1997) entnahmen bei planmäßigen Metallentfernungen oder Revisionen Gewebeproben von knöchernem Reparaturgewebe mit einer Hydroxylapatit-Keramik. Sie stellten fest, dass der klinische Befund nicht immer mit dem histologischen Ergebnis korreliert. Bei gutem klinischen Befund zeigte sich in mehreren Fällen eine deutliche Bindegewebsschicht zwischen Knochen und Keramiken. Trotzdem attestieren die Autoren dem Implantationsmaterial im spongiösen Lager Sicherheit und Eignung zur Auffüllung kleiner Knochendefekte.

Vom biomechanischen Standpunkt her bieten also folgende Defekte eine ideale Indikation für den Einsatz von Hydroxylapatit: Kürettage nach gutartigen Tumoren, Defekte am Spenderknochen nach Spongiosaentnahme und Knochenzysten. Sofern beim Vorliegen eines bösartigen Tumors der Erhalt einer Gliedmaße das Ziel der Operation ist, kann die Keramik auch hier von Nutzen sein. Bei Eingriffen an der Wirbelsäule verwendet man in der Regel eine Mixtur aus autologem Knochen und Hydroxylapatit-Granulat. Im Rahmen einer Revisionsoperation einer Prothese (z.B. Hüfte) leistet Hydroxylapatit bei der Rekonstruktion des Knochenlagers gute Dienste (HEISE et al., 1990). Außerdem kann Hydroxylapatit als Trägermedium für antimikrobielle Stoffe, Wachstumsfaktoren oder osteogenetisch wirksame Substanzen dienen (EGGLI et al., 1987; 1988; SPECTOR, 1991; LIEBENDÖRFER und TRÖSTER, 1997).

Der klinische Einsatz von Hydroxylapatit beschränkt sich allerdings nicht nur auf die Verwendung von Formkörpern und Granulaten zur Defektauffüllung und Augmentation von Knochen, sondern findet auch Verwendung bei der Oberflächenbeschichtung von Prothesen. Als kraftragendem Implantat sind dem Einsatz von Hydroxylapatit beispielsweise in der Hüftendoprothetik Grenzen gesetzt. Trotz einer hohen Kompressionsfestigkeit weist das Material nur eine geringe Bruchfestigkeit auf (STEA et al., 1995). Eine Alternative dazu könnte die Beschichtung bruchfesterer Materialien mit Hydroxylapatit sein. Es ist zu erwarten, dass durch eine HA-Beschichtung die Biokompatibilität von bioinerten Materialien wie Metallen steigen würde, und eine bessere Einbindung in das knöcherne Lager erreicht werden könnte (LANCEFELD, 1988). Die Beschichtung fungiert nachweislich auch als Diffusionssperre für Titan-Ionen. Deren Anwesenheit beeinflusst lokal die

Knochenmineralisation und somit die Knochenqualität des Implantatlagers. Die Insertion HA-beschichteter Implantate ist demnach bei lokal und systemisch verminderter Knochenqualität angezeigt und bietet vor allem in der frühen Funktionsphase Vorteile gegenüber reinen Titan-Implantaten (SIMONS und VIZETHUM, 1993). Wegen seiner hohen Bioaktivität und festen Bindung zu neuem Knochen empfehlen BRILL und KATTHAGEN (1987) Hydroxylapatit zur Oberflächenbeschichtung von Implantaten. RUDEL (1989) sieht entsprechende Vorteile auch für die dentale Chirurgie. Die bioreaktive Oberfläche eines dicht gesinterten Hydroxylapatit-Keramik-Implantates mit einem Titan-Innenteil ermöglicht es auf eine mechanische Verankerung der Implantate zu verzichten. Es können einfache zylindrische Körper konstruiert werden, die ohne aufwendiges Instrumentarium eingesetzt werden. Die erzielten biomechanischen Eigenschaften solcher Implantate entsprechen in etwa denen eines natürlichen Zahnes. Bei physiologischer Belastung besteht keine Bruchgefahr. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die biologische Antwort des Wirtsgewebes wesentlich von der Größe, Morphologie und Struktur der für die Beschichtung verwendeten HA-Partikel abhängt (NINOMIYA et al., 2001; HUANG et al., 2004). So fördern beispielsweise Hydroxylapatitpartikel in Nanogröße das Attachment und Wachstum von humanen Osteoblasten, bei nur geringer Zytotoxizität (HUANG et al., 2004).

Die Qualität der Beschichtung hängt wesentlich vom Beschichtungsverfahren ab (LEGEROS et al., 1988; LEMONS et al., 1988; KRÜGER et al., 1997). Gewöhnlich wird das Vakuumplasmasprayverfahren favorisiert. Unabhängig von der Technik der Beschichtung wird das Interface zwischen Beschichtung und Metall der Schwachpunkt im System, sobald die Verbindung zum Knochen hergestellt ist (WEI et al., 1999). Zudem ist die Beschichtung aus Kalzium-Phosphat bioaktiv und im Körpermilieu löslich, so dass alle HA-Beschichtungen die Tendenz haben ihre mechanische Beständigkeit zu verlieren. Dies gilt insbesondere für Langzeitimplantate (JARCHO, 1992).

WANG und Mitarbeiter (1993) verglichen die osteoinduktive Potenz und das Maß der Osteointegration HA-beschichteter und reiner Titan-Implantate. Trotz eines Primärspaltes von über 1mm konnten sie direkten Knochenkontakt für die beschichteten Implantate nachweisen. Im Interface zu unbeschichteten Implantaten entsteht eine fibröse Membran. Reine Titan-Implantate werden nicht knöchern integriert. Außerdem erhöht die HA-Beschichtung deutlich das osteokonduktive Vermögen des implantierten Materials. Diese Aussagen bestätigen STEA und Mitarbeiter (1995) sowie POMMER und Mitarbeiter (1998). Letztere finden als Ausdruck einer besseren mechanischen Verankerung HA-beschichteter Pins beim Fixateur externe ein signifikant höheres Ausdrehmoment als bei herkömmlichen Stahlschrauben.

Außerdem können die Lockerungs- und Infektionsraten an den Eintrittsstellen der Schrauben deutlich gesenkt werden. Auch RIEGER und Mitarbeiter (1998) sehen in der vollständigen knöchernen Integration HA-beschichteter Pins oder Schrauben einen entscheidenden Vorteil. Da keine Verbindung zwischen Markraum und Hautoberfläche besteht, sinkt das Risiko für Bohrlochinfektionen und / oder Osteomyelitiden. Somit ist die Verwendung HA-beschichteter Knochenschrauben insbesondere bei mehrmonatiger Fixationszeit gerechtfertigt (POMMER et al., 1998). Einen weiteren positiven Effekt der Hydroxylapatit-Beschichtung wiesen RAHBECK und Mitarbeiter (2000) nach. Durch den direkten Kontakt zwischen Knochen und Beschichtung kann die Migration von Polyethylen-Partikeln ins Knochen-Implantat-Interface verhindert werden. Dadurch werden Prothesen selbst bei erheblichem Abrieb des Kunststoffes und langen Standzeiten vor Osteolysen und Lockerung geschützt. Die klinischen Ergebnisse mit Hydroxylapatit-Beschichtungen in der Literatur sind jedoch bisher stellenweise widersprüchlich und für die einzelnen Anwendungen uneinheitlich. Zweifelsohne können Oberflächenmodifikationen von Implantaten aber die Prognose für die Therapie verbessern (THULL, 2003).

Während Kalzium-Phosphat-Keramiken in der Humanmedizin breite Anwendung finden, werden sie in der Veterinärmedizin nicht zuletzt aus Kostengründen nur selten eingesetzt. Ähnlich wie andere Ersatzstoffe ist auch Hydroxylapatit in der Veterinärmedizin hauptsächlich im experimentellen Bereich von Bedeutung (RECHENBERG und DINGELDEIN, 1998).

II.1.4.4 Kontraindikationen und Schwierigkeiten beim Einsatz von Hydroxylapatit

Ein großer Nachteil der Hydroxylapatit-Keramiken ist die für kraftaufnehmende Implantate unzureichende mechanische Belastbarkeit. Während die Druckfestigkeit sehr hoch ist, ist die Resistenz gegen Torsions- und Scherkräfte extrem niedrig (LANCEFELD, 1988; JARCHO, 1992; STEA et al., 1995; LIEBENDÖRFER und TRÖSTER, 1997).

Für Hydroxylapatit-Keramiken, die zur Herstellung belasteter Formteile eingesetzt werden sollen, empfiehlt OSBORN (1987) durch Verfahren zur Materialoptimierung die maximal erreichbare Kompaktheit von $3,16 \text{ g / cm}^3$ herbeizuführen. Für die dentale Chirurgie fordert RUDEL (1989) keine Belastung in der Frühphase der Implantation, um die Osteogenese nicht zu gefährden. CHANG und Mitarbeiter (1983) raten nach einer Kiefer-Augmentation

mit dichter Hydroxylapatit-Keramik erst sechs Monate nach Applikation die volle Kaubelastung zu gestatten.

Besondere Anforderungen werden zudem an die porösen Keramiken gestellt. Zum einen sollen sie durch ihr interkonnektierendes Porensystem ein gutes und schnelles Einwachsen von Knochengewebe ermöglichen. Zum anderen müssen sie aber eine ausreichende Druckfestigkeit aufweisen. Darüberhinaus ist z.B. für den Einsatz im Unterkiefer Resorptionsbeständigkeit erwünscht, bei anderen Indikationen dagegen eine gezielte Resorption (BAUER et al., 1988). Da die Osteoaffinität des Werkstoffes mit dem Grad der Porosität und der Porengröße zunimmt, seine Festigkeitseigenschaften jedoch abnehmen, ergibt sich die endgültige Architektur des Implantatmaterials aus einem Kompromiss zwischen beiden Forderungen (KLEINFELDER, 1987). Ähnlich eingeschränkt ist die Verwendung von Hydroxylapatit-Granulat. A priori kann damit keine kontinuierlich form- und kraftschlüssige Osteoplastik hergestellt werden. Granuläres Hydroxylapatit eignet sich lediglich als Füllsubstanz bei erhaltener mechanischer Stabilität des entsprechenden Knochenabschnitts (OSBORN, 1987). Im Gegenzug entfällt die bei den Keramikblöcken notwendige Bearbeitung des Materials zur Einpassung in den Defekt.

Ein weiteres Problem betrifft hauptsächlich die Granulatform des Implantatmaterials. Nach dem Einsetzen ist eine zufriedenstellende Fixation der Hydroxylapatit-Partikel nur schwer zu erreichen. Eine feste Bindung zwischen den Partikeln fehlt, sie wandern ins periimplantäre Gewebe und es kommt letztlich zum Verlust der rekonstruierten Knochenkontur (HARVEY et al., 1985). Beim Einsatz am Kieferknochen kann die Migration von Partikeln zu Irritationen des Nervus mentalis führen (ROTHSTEIN et al., 1984). Daher ist man bemüht Hydroxylapatit-Partikel mit anderen biokompatiblen Substanzen zu mischen, welche die Partikel binden ohne jedoch die positiven Eigenschaften des Hydroxylapatits zu beeinflussen. Solche Substanzen können z.B. Kalziumsulfat (FRAME et al., 1987; RAWLINGS et al., 1988; NAJJAR et al., 1991) oder ein mikrofibrilläres Material aus denaturiertem bovinem Kollagen (AVITENE®) sein. Beide Zusätze erleichtern die klinische Verarbeitung von Hydroxylapatit erheblich. Allerdings verursacht AVITENE®, vermutlich aufgrund einer geringen Restantigenität, leichte Entzündungsreaktionen im Gewebe (HARVEY et al., 1985). Schwierigkeiten mit HA-beschichteten Implantaten gibt es bei einem infizierten Implantatbett. Über die daraus resultierende pH-Wert Absenkung und / oder zelluläre Degradation kann auch die Hydroxylapatit-Schicht zerstört werden (SIMONS und VIZETHUM, 1993; KRÜGER et al., 1997). NINOMIYA und Mitarbeiter (2001) konnten in vitro nachweisen, dass auch Abriebpartikel von HA-beschichteten Implantaten die Sekretion

von Zytokinen und Proteasen fördern, die die Resorption von Knochengewebe verursachen. Dies kann Osteolysen und Implantatlockerung zur Folge haben.

Abschließend bleibt festzustellen, dass Hydroxylapatit in allen Einsatzgebieten, vor allem wegen seiner osteokonduktiven Eigenschaften, favorisiert wird, gleichzeitig aber nach wie vor umstritten bleibt. Die Problematik dieses Knochenersatzstoffes ist multifaktoriell und liegt vor allem in seiner Langzeitstabilität (KRÜGER et al., 1997).

II.1.5 HAPEX™

II.1.5.1 Entwicklung und Materialeigenschaften

Auf der Suche nach einem Knochenersatzmaterial, das die hervorragenden Eigenschaften autologer Spongiosa wenigstens erreichen, wenn nicht übertreffen könnte, fand sich in den frühen 80er Jahren eine Gruppe von Forschern des Queen Mary College, London und der Brunel University, Uxbridge zusammen. Man wollte einen synthetischen Kompositwerkstoff entwickeln, der in seinem Elastizitätsmodul und seiner Biokompatibilität dem natürlichen Knochen möglichst ähnlich sein sollte (BONFIELD et al., 1981).

Bei der Entwicklung eines mechanisch äquivalenten Knochenersatzes ist es hilfreich, sich zunächst noch einmal die Mikrostruktur eines Knochens vor Augen zu führen. Die hauptlasttragenden Knochen bestehen aus einer äußeren kortikalen oder kompakten Schicht und einem Markraum, der spongiösen Knochen beherbergt. Die Osteone verlaufen bevorzugt parallel zur Längsachse des Knochens. Dazwischen liegen Bereiche mit ungeordnet ausgerichtetem Knochen. Osteone setzen sich aus konzentrischen Lamellen zusammen, die ihrerseits aus zwei Hauptkomponenten aufgebaut sind: Kollagen und Hydroxylapatit (BONFIELD et al., 1988).

Obwohl der Volumenanteil von Hydroxylapatit im reifen Knochen nur 0,5 % beträgt, ist sein Elastizitätsmodul wesentlich größer als das des Kollagen (~114 GPa : ~1 GPa). Daher ist Hydroxylapatit die kraftaufnehmende Komponente in diesem System. Dem Kollagen fällt die Rolle der Matriz zu, in der die HA-Partikel gelöst sind. Die mechanische Funktion der Kollagenmatriz wird bei der Herstellung des Komposits durch das dehnbare Polymer Polyethylen ersetzt, dessen Elastizitätsmodul dem von natürlichem Kollagen vergleichbar ist (BONFIELD et al., 1981). Durch den Zusatz von Hydroxylapatit als verstärkende Komponente des Kompositwerkstoffes wird dieser potentiell bioaktiv. Das An- und

Einwachsen von Knochengewebe in ein solches Implantat wird möglich (BONFIELD et al., 1984). Zur Herstellung des Komposits werden HA-Partikel (natürlichen oder synthetischen Ursprungs) mit hochdichtem Polyethylen gemischt. Dabei werden sowohl die Masse und Dichte der Matrice als auch Zusammensetzung, Volumenanteil und Verteilung der Partikelgröße des Hydroxylapatits variiert (BONFIELD et al. 1981, 1988; DOYLE et al., 1990; WANG et al., 1994; SUWANPRATEEB et al., 1995; NAZHAT et al., 2000).

Untersuchungen mit einem Volumenanteil Hydroxylapatit von 0,1 - 0,6 % zeigen, dass mit zunehmendem Anteil von Hydroxylapatit die Zug- und Zerreißfestigkeit des Materials zunimmt, während gleichzeitig die Bruchfestigkeit abnimmt. Eine optimale Kombination beider Eigenschaften konnte mit einem Volumenanteil von 0,4 - 0,5 % erreicht werden. Mit 5 GPa ($< 0,4$ %) bzw. 9 GPa (0,45 - 0,5 %) erzielt das Komposit dann ein Elastizitätsmodul, das kurz unterhalb bzw. an der unteren Grenze der Werte für kortikalen Knochen liegt (BONFIELD et al., 1984). Die elastischen Eigenschaften der bisher verwendeten Legierungen (z.B. Kobalt-Chrom) oder Keramiken liegen zum Teil erheblich über denen von kortikalem Knochen. Wird nun ein solch steifes Material mit direktem Kontakt zum Knochen („bone-bonding“) belastet, dann wird diese Beanspruchung auf beide Seiten des Interface verteilt. Bei extrem differierenden Elastizitätsmodulen entstehen enorme Scherkräfte in der Kontaktzone, die dort zum „de-bonding“ und letztlich zur Implantatlockerung führen können (BONFIELD et al., 1981).

Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop zu verschiedenen Zeitpunkten des Herstellungsverfahrens zeigen, dass sich die Hydroxylapatit-Partikel grundsätzlich gut und gleichmäßig in der Matrice verteilen (WANG et al., 1994). Allerdings bemerken die Autoren, dass bei einem Volumenanteil von über 40 % einige Agglomerate der HA-Partikel während der Herstellung nicht aufgelöst werden und dadurch Defekte in den entstandenen Werkstücken bilden. Diese Materialfehler können Rissbildungen hervorrufen und die Festigkeit des Komposits erheblich reduzieren.

SUWANPRATEEB und Mitarbeiter (1995) untersuchten die Abriebfestigkeit des Materials. Mit dem Einschluß von HA-Partikeln in eine Polyethylen-Matrice verbessert sich zumindest in der Kurzzeitbeobachtung die Abriebfestigkeit. Wiederum steigt diese mit zunehmendem Volumenanteil von Hydroxylapatit (WANG et al., 1998). Neuere in-vitro Untersuchungen von WANG und Mitarbeitern (2002) zeigen aber, dass dieser positive Effekt nur bis zu einem Volumenanteil von 10 % Hydroxylapatit zu erzielen ist. Größere Beimengungen verschlechtern die tribologischen Eigenschaften nachhaltig. Außerdem konnte nachgewiesen

werden, dass die Abriebfestigkeit von HAPEX™ bei Immersion in Ringer-Lösung bei 37° C deutlich nachlässt. Da die Kunststoffmatrize hydrophob ist, absorbiert das Füllmaterial Hydroxylapatit den größten Teil der Flüssigkeit. Die Flüssigkeit unterbricht das Interface zwischen den Partikeln und der Matrize, was Deformationen des Materials und Veränderungen der Elastizität zur Folge hat. Das erklärt auch die Tatsache, dass ein Komposit mit 40 vol % Hydroxylapatit fast doppelt so viel Flüssigkeit aufnimmt wie ein Stück mit 20 vol % HA. Zudem spielt die Dauer der Immersion eine entscheidende Rolle. Im Gegensatz dazu können bei reinem Polyethylen nach 150 Tagen in Ringer Lösung weder Anzeichen für ein verändertes Elastizitätsmodul noch Gewichtszunahmen festgestellt werden (SUWANPRATEEB et al., 1997).

Prinzipiell kommen HUANG und seine Mitarbeiter (1997) zu den gleichen Ergebnissen, nachdem sie HAPEX™ (40 vol % HA) über einen Zeitraum von einem und drei Monaten bei 37° und bei 70° C künstlicher Körperflüssigkeit ausgesetzt hatten. Die Gewichtszunahmen der Testkörper sind dabei jedoch so gering, dass sie kaum messbar sind. Die Zugfestigkeit lässt mit zunehmender Immersionsdauer nach; bei 70° C schneller und stärker, aber beide Werte sind nicht signifikant. Daher kommen die Autoren zu dem Schluss, dass HAPEX™ eine Lebenserwartung hat, wie sie für Langzeitimplantationen nötig ist. Dies könnte der entscheidende Vorteil gegenüber reinem Polyethylen sein.

Auch die Untersuchungen über die Auswirkungen verschiedener Sterilisationsverfahren auf das Material stehen im Zusammenhang mit der Langzeitstabilität und Abriebfestigkeit (SUWANPRATEEB et al., 1998). Im Gegensatz zu Polyethylen hat die Sterilisation durch Gamma-Strahlen mit einer Dosis von 2,5 Mrad weder einen Effekt auf die Dichte noch auf die Kristallinität von HAPEX™. Die Festigkeit des Materials nimmt sogar zu. Dies wird auf die Ausbildung von Querverbindungen innerhalb des Polymers zurückgeführt, die ein Gleiten der Molekülketten verhindern. Dadurch erhöht sich letztlich auch die Abriebfestigkeit des Materials. Durch vorhergehendes Heißtempern („thermal annealing“) bei 140°C vergrößert sich die Dichte durch die Zunahme des kristallinen Teils der Matrize zusätzlich. Verfährt man in umgekehrter Reihenfolge, kann diese Zunahme und somit eine erhöhte Abriebfestigkeit nicht erreicht werden.

WANG und Mitarbeiter (1998) sowie NAZHAT und Mitarbeiter (2000) wiesen nach, dass die Größe der Partikel und die Morphologie des pulverförmigen Grundstoffes Hydroxylapatit einen deutlichen Einfluß auf die mechanischen Eigenschaften des Endproduktes HAPEX™ haben. Das synthetische HA-Pulver mit den kleineren Partikeln ist als Füllsubstanz durchweg

erfolgreicher. Je kleiner die Partikel sind, desto größer sind Scherfestigkeit, Zug- und Zerreißfestigkeit sowie die Dehnbarkeit des Produktes. Die Druckfestigkeit lässt jedoch nach. Eine weitere Verbesserung der Materialeigenschaften hinsichtlich des Zellattachment und damit auch der Osseointegration kann durch verändertes Design der Implantatoberfläche erreicht werden. In vitro verzeichnet man schnellere und großflächigere Adhäsion von humanen Osteoblasten an HAPEXTM-Implantaten, deren Oberfläche zunächst geschliffen und dann aufgeraut wurde, als an nur geschliffenen oder unbehandelten Oberflächen (DALBY et al., 2002). Die Versuche von REA und Mitarbeitern (2004) deuten sogar darauf hin, dass die Effekte einer entsprechenden Oberflächenmodifikation größere Auswirkungen auf die Zellantwort haben als die chemische Zusammensetzung des Komposits. Für die knöcherne Integration von HAPEXTM liegt der optimale Volumenanteil der Füllsubstanz Hydroxylapatit bei 40 %. Das Elastizitätsmodul des Werkstoffes erreicht dann die untere Grenze des Moduls von natürlichem Knochen, während die Bruchfestigkeit höher ist und das Material eine Dehnungstoleranz von ca. 30 % behält (BONFIELD, 1988; SUWANPRATEEB et al., 1995).

II.1.5.2 Biokompatibilität

Sowohl Polyethylen als auch Hydroxylapatit sind als biokompatible Werkstoffe bekannt (HANDROCK et al., 1979; SAUER und LADE, 1982; KLEIN et al., 1983; HARVEY et al., 1985; OSBORN, 1985). Damit auch das Produkt ihrer Kombination diesen Anspruch erfüllt, ist es entscheidend, dass keine Bindemittel eingesetzt werden (BONFIELD, 1988). Die Verbindung zwischen den beiden Komponenten ist rein mechanischer Art. Nach dem Herstellungsprozess zieht sich die Kunststoffmatrize beim Abkühlen um die HA-Partikel zusammen und hält sie in ihrer Position (SUWANPRATEEB et al., 1995).

Im Anschluss an die Sterilisation mit Gamma-Strahlen zeigt das Komposit in der Zellkultur keine Anzeichen zytotoxischer Eigenschaften auf fötales Lungengewebe. In einer Zellkultur mit Osteoblasten wird Osteoid direkt auf der Oberfläche des Werkstoffes abgelagert (BONFIELD et al., 1981; BONFIELD, 1988). HUANG und Mitarbeiter (1997) wiesen für HAPEXTM einen stimulativen Effekt auf humane Osteoblasten nach. Sie führen dies auf die Anwesenheit von HA-Partikeln an der Oberfläche des Implantates zurück. Dadurch wird eine entsprechend große und günstige Oberfläche für die Adsorption von Proteinen geschaffen. Die Autoren bezeichnen das Hydroxylapatit als „Mikro-Anker“ bei der Entstehung eines direkten Knochenkontaktes. Auch REA und Mitarbeiter (2004) registrieren die bevorzugte

Adhäsion von Zellen an den Keramikpartikeln innerhalb der Matrizen. DALBY und Coautoren (2002, 2003) weisen im Vergleich zu herkömmlichem Zement (Polymethylmethacrylat; PMMA) für HAPEX™ nicht nur mehr Zellkontakte nach, sondern auch eine beschleunigte Zelldifferenzierung und -proliferation von humanen Osteoblasten.

Diese guten Ergebnisse werden durch in-vivo-Studien bestätigt. Dazu werden sterilisierte Pins mit einem Durchmesser von 2,5 mm und Volumenanteilen von 30, 40 und 50 % Hydroxylapatit jeweils in die lateralen Femurkondylen der rechten und linken Gliedmaße von Kaninchen eingesetzt. Es besteht Kontakt zu kortikalem und spongiosen Knochen (BONFIELD et al., 1986). Nach einem Monat sind die Pins von einer 20 µm dicken, fibrösen Schicht umgeben, die bei längerer Implantationsdauer durch Knochengewebe ersetzt wird. Ähnliche histologische Ergebnisse fanden DOYLE und Mitarbeiter (1990) für das 40-vol %-Komposit. Nach einem Monat trennt eine etwa 6 µm dicke bindegewebige Schicht das Implantat von Knochengewebe. Nach sechs Monaten ist auf etwa 40 % des Implantates direkt Knochen aufgewachsen. Die Schichtdicke der Kapsel hat sich auf 2 µm reduziert. Es entsteht eine feste Verbindung zwischen Implantat und Knochen. Die Tatsache, dass die Gliedmaßen nicht immobilisiert wurden, sondern einer physiologischen Belastung ausgesetzt waren, betonen die hervorragende Antwort des knöchernen Lagers auf den Werkstoff. Die mechanische Verträglichkeit zwischen beiden führt zu einem stabilen Interface, in dem keine Relativbewegungen auftreten (BONFIELD, 1988). Das zum Vergleich eingesetzte reine Polyethylen wird dauerhaft bindegewebig eingebunden, so dass die Stärke des Interface im push-out Test konstant bei 1,4 MPa liegt. Im Gegensatz dazu steigert sich dieser Wert für ein 40-vol %-Komposit mit der Zeit um das Fünffache auf ca. 6,6 MPa. Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl kortikaler als auch spongioser Knochen positiv auf HAPEX™ reagieren. In beiden knöchernen Lagern wird angrenzend an das Implantat Knochengewebe gebildet (BONFIELD et al., 1986).

II.1.5.3 Bedeutung und klinischer Einsatz von HAPEX™ in der Humanmedizin

Schon früh bewies HAPEX™ seine Eignung als mechanisch kompatibles Implantatmaterial im Knochen (BONFIELD, 1981). Möglicherweise könnte es bei der Defektauffüllung in wenig belasteten Regionen sogar ein Konkurrent zum autologen Knochen werden (BONFIELD, 1986). Durch die variablen Volumenanteile an Hydroxylapatit kann das bioaktive Komposit in der Endoprothetik sowohl als vollständiger Ersatz als auch in Kombination mit anderen Materialien in den Bereichen eingesetzt werden, in denen bisher

allein Polyethylen verwendet wurde (z.B. Hüftpfanne oder Tibiaplateau). HAPEX™ bietet die Vorteile einer hervorragenden Osteokompatibilität mit einer adäquaten Bruchfestigkeit (BONFIELD, 1986; 1988).

Interessant ist auch der Austausch der bisher eingesetzten Polyethylen-Schrauben durch HAPEX™-Schrauben bei der „mitwachsenden“ Stanmore-Prothese, die nach der Tumorchirurgie an den Gliedmaßen junger Patienten Verwendung findet. Die Schrauben aus Komposit bieten den Vorteil der stabileren und sichereren Verankerung. Eine weitere Indikation für HAPEX™ findet sich in der Otologie (MEIJER et al., 2002; NEUGEBAUER, 2004). Seit 1995 wird das Komposit mit 40 vol % Hydroxylapatit in Form des „Goldenberg“-Mittelohrimplantates zum Ersatz krankhafter Gehörknöchelchen kommerziell klinisch angewendet (BONFIELD und TANNER, 1997). Seit 1997 wird das Material in 22 verschiedenen Designs bei mehreren tausend Patienten implantiert (GUILD und BONFIELD, 1998). Ebenfalls klinisch erfolgreich etabliert ist HAPEX™ in der Ophthalmologie (TANNER et al., 1994; NAZHAT et al., 2000). Es wurde nach Orbitabodenfrakturen und bei einem Post-Enukleations Augenhöhlen Syndrom (post-enucleation socket syndrome / PESS) verwendet. Die entscheidenden Vorteile liegen dabei im unproblematischen intraoperativen Handling des Materials (zuschneiden, anbohren etc.) sowie in der Tatsache, dass das Biomaterial in den Knochen integriert wird. Dadurch wird die Wanderung oder ein Herausfallen des Implantates unmöglich.

Das Ziel bei der Verwendung von Knochenersatzmaterialien ist die Entstehung eines reifen Knochens am Implantationsort, der osteonal und trajektorieell aufgebaut, mechanisch belastbar ist und dem physiologischen (Re)Modeling unterworfen werden kann. Heute ist abzusehen, dass ein solch ideales Knochenersatzmittel wahrscheinlich ein Komposit sein muss, um der Komplexität der Steuerung der Knochenregeneration gerecht zu werden. Nur dann können die oben aufgeführten Ziele (siehe auch Kap. I) erreicht und ein Knochenersatzmittel entwickelt werden, das die Ansprüche der unterschiedlichen Fachspezialitäten befriedigt (KINZL, 1996).

II.2 Theoretische Grundlagen

II.2.1 Anatomie und Physiologie des Knochens

Knochengewebe gehört zu den Binde- und Stützgeweben und übernimmt als solches im Körper sowohl mechanische als auch metabolische Aufgaben. Der Knochen dient mechanisch als Stützorgan und schützt überdies das in seinem Inneren gelegene Knochenmark. Als wichtigster Kalziumspeicher des Organismus hat dieses metabolische Aufgaben. Makroskopisch wie ultrastrukturell wird die Organisation des Knochengewebes durch beide Funktionen geprägt (JUNQUEIRA und CARNEIRO, 1996; SCHENK, 1998).

II.2.1.1 Knochenaufbau

Makroskopisch werden lange, kurze und flache Knochen unterschieden. Prinzipiell besteht jeder Knochen aus einer äußeren, kompakten Schicht (*Substantia compacta*, *S. corticalis*) und der *Spongiosa* (*S. spongiosa*), die mit ihrem schwammartigen Bälkchenwerk Teile des Inneren eines Knochens ausfüllt. Die einzelnen Knochen werden hinsichtlich der Ausprägung dieser beiden Elemente unterschieden.

Lange Knochen werden auch als *Röhrenknochen* bezeichnet und sind typisch für die Extremitäten. Die Röhrenknochen gliedern sich in folgende Abschnitte:

- Diaphyse (Knochenschaft, Korpus),
- Epiphysen an beiden Enden des Schaftes
- Metaphyse, die zwischen den beiden anderen Abschnitten liegt.

Die *Diaphyse* ist durch eine sehr dicke und homogen erscheinende *Substantia compacta* und nur wenige ihr unmittelbar anliegende Knochenbälkchen charakterisiert. Dadurch wird im Knocheninneren eine zusammenhängende Knochenhöhle geformt, die das Knochenmark aufnimmt. Im Bereich der *Epiphysen* ist die Kortikalis vergleichsweise dünn, viele Knochenbälkchen (*Spongiosa*) füllen aber den Hohlraum aus. Stellenweise liegt der Kompakta Knorpel auf, womit die Epiphysen an der Gelenkbildung beteiligt sind. Die *Metaphysen* mit ihren *Epiphysenfugen* stellen die Wachstumszone eines Knochens dar.

Kurze Knochen, wie z.B. Wirbelkörper, weisen eine dünne *Substantia compacta* auf und werden völlig von *Spongiosa* ausgefüllt. Hingegen liegt bei den flachen Knochen zwischen dünnen Kompaktaschichten eine ebenfalls schmale *Spongiosa* (JUNQUEIRA und CARNEIRO, 1996).

An seiner äußeren Oberfläche ist der Knochen vom *Periost* bedeckt, einer Bindegewebeschicht, deren Dicke von der lokal herrschenden, mechanischen Belastung abhängt. Lediglich an den Gelenkflächen und Ansatzstellen von Sehnen und Bändern fehlt diese Knochenhaut. Am Periost lassen sich zwei Schichten unterscheiden: die innere, das *Kambium (Stratum osteogenicum)*, die als zelluläre Schicht über eine osteogene Potenz verfügt und die äußere Faserschicht (*Fibrosa, Stratum fibrosum*) aus kollagenen und elastischen Fasern, die vorwiegend mechanische Aufgaben erfüllt. Über zahlreiche kollagene Fasern, die sog. „*Sharpey-Fasern*“, ist das Periost fest mit dem Knochen verbunden (ROHEN und LÜTJEN-DECROLL, 1990; WIESNER und RIBBECK, 1991). Die innere Oberfläche eines Knochens wird von Endost ausgekleidet (ERIKSEN, 1994), einer dünnen Bindegewebsmembran, welche die Knochenhöhle einschließlich der Spongiosabälkchen bedeckt und auch nutritive Knochenkanälchen auskleidet (JUNQUEIRA und CARNEIRO, 1996).

II.2.1.2 Knochenzellen und Interzellulärsubstanz

Wie alle Stützgewebe ist Knochen mesenchymaler Herkunft und setzt sich aus Knochenzellen und Interzellulärsubstanz zusammen. Die große Stabilität des Knochens beruht einerseits auf der besonderen Anordnung der organischen Interzellulärsubstanz und andererseits auf deren Fähigkeit zur Einlagerung von anorganischen Stoffen (Mineralstoffe), die dem Knochen die notwendige Härte und Festigkeit verleihen (SAJONSKI und SMOLLICH, 1990).

Mit etwa 90 % bilden *Kollagenfasern* den Hauptbestandteil der organischen Knochengrundsubstanz. Bei der Mineralisierung des Knochens dienen die Fasern als Kristallisationskerne für die Anlagerung der kristallinen Kalziumphosphatverbindungen.

1-2 % der Knochenmatrix bestehen aus Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen. Die Lipide haben einen Anteil von 5 -10 %. Insgesamt machen die organischen Bestandteile etwa ein Drittel der Trockenmasse des Knochengewebes aus.

Die anorganische Knochengrundsubstanz besteht aus Kalziumphosphat (85-90 %), Kalziumkarbonat (8-10 %), Magnesiumphosphat (1,5 %) und Kalziumfluorid (0,3 %). Sie stellt damit die übrigen zwei Drittel der Trockensubstanz des Knochengewebes. Mineralien liegen im Knochen in Form von *Apatitkristallen* vor, Kalziumphosphatverbindungen, die hexagonale, nach dem Prinzip eines Raumgitters gebaute Kristalle bilden. Dabei überwiegt das Hydroxylapatit. Die Kristalle sind nadelförmig, unterschiedlich groß und liegen außerhalb oder auch in den Kollagenfibrillen. Härte und Festigkeit des Knochens werden durch die

Verbindung zwischen Hydroxylapatit und Kollagenfasern bestimmt (JUNQUEIRA und CARNEIRO, 1996; LIEBICH, 1999).

Gegenüber der Interzellulärsubstanz treten die verschiedenen Knochenzellen quantitativ in den Hintergrund. Aus der undifferenzierten Mesenchymzelle entwickeln sich die *Vorläuferzellen* (Osteoprogenitor-Zellen) zu *Präosteoblasten*, aus denen *Osteoblasten* und dann *Osteozyten* hervorgehen. Hingegen kommen die *Osteoklasten* aus dem Stamm der Granulozyten-Makrophagen des Knochenmarkes, auch wenn die einzelnen Stufen ihrer Entwicklung bis heute nicht eindeutig geklärt sind (SCHENK, 1998, in BONATH und PRIEUR, 1998).

Bei den Stammzellen der Osteoblasten muss zwischen den *determinierten Osteoprogenitor-Zellen* („determined osteogenic precursor cells“, DOPC) und den *induzierbaren Osteoprogenitor-Zellen* („inducible osteogenic precursor cells“, IOPC) unterschieden werden (FRIEDENSTEIN, 1973). Die DOPCs kommen ausschließlich in Knochennähe vor, also in Periost und Knochenmark, und stehen immer in Verbindung zu Blutgefäßen. Sie sind zu spontaner Knochenneubildung befähigt (OWEN, 1978). Bei den IOPCs handelt es sich um undifferenzierte Mesenchymzellen an der Knochenoberfläche, unter dem Periost, die sich in Gegenwart eines induzierenden Agens zu Osteoblasten differenzieren und Knochen bilden.

Aktive *Osteoblasten* (20-30 µm) haben eine elliptische bis kuboide Form und sind an der Oberfläche von Knochenbälkchen zu finden. Hier reihen sie sich nach Art eines einschichtigen Epithels dicht aneinander (Osteoblastenlayer). Ihr Zellkern liegt oft exzentrisch im stark basophilen Zytoplasma, das in Kernnähe durch das Golgi-Negativ aufgehellert ist. Über feine zytoplasmatische Fortsätze stehen Osteoblasten untereinander in Verbindung (COOPER et al., 1966). Sie sind für die Synthese des organischen Anteils der Knochenmatrix verantwortlich. Mit abnehmender Syntheseleistung flachen die Zellen spindelförmig ab.

Bei der Geflechtknochenbildung (s.Kap.II.2.1.3) erfolgt die Kollagenproduktion durch die Osteoblasten noch allseitig perizellulär. Die für die Entstehung des Lamellenknochens (s.Kap.II.2.1.3) verantwortlichen Osteoblasten sind polarisierte Zellen, d.h. die Abgabe der Syntheseprodukte erfolgt nur dort, wo Kontakt zur Knochengrundsubstanz besteht (SCHENK und WILLENEGGER, 1977). Hier werden später auch die Matrixvesikel abgeschnürt, die der Mineralisation dienen.

Die neu gebildete, noch nicht verkalkte Grundsubstanz, die von den Osteoblasten sezerniert wird, nennt man *Osteoid*. Die Feinstruktur des Osteoids variiert je nach entstehender Knochenart. Im Geflechtknochen sind die kollagenen Fibrillen zufällig angeordnet, während Lamellenknochen bereits im Osteoid die typische lamelläre Anordnung der kollagenen Faserbündel erkennen lässt. Die durchschnittliche Matrixproduktion in gesundem Knochengewebe beträgt etwa 1 μm pro Tag. FROST (1963, 1966, 1969) führte dafür den Begriff der „appositional bone formation rate“ (ABFR) ein.

Zum Ende einer Anbauphase flachen die Osteoblasten ab, der Anbau verlangsamt sich und wird schließlich eingestellt. An der Oberfläche bleiben *Knochenbelegzellen* („bone lining cells“) zurück, die über Zytoplasmafortsätze den Kontakt zu Osteozyten aufrecht erhalten. Diesen Zellen ordnet man außerdem verschiedene Rollen bei der Regulation des Knochenumbaus zu.

Der *Osteozyt* ist die reife Knochenzelle, die aus dem Osteoblasten hervorgeht. In der Phase des Knochenanbaus werden regelmäßig Osteoblasten determiniert, d.h. sie stellen die Osteoidproduktion ein und werden von den benachbarten Zellen mit Matrix bedeckt. Diese gegenüber den Osteoblasten verminderte Syntheseaktivität wird anhand der minimalen Ausstattung mit Organellen und des dichten chromatinreichen Kerns der Osteozyten deutlich. Diese Knochenzelle dient der Erhaltung des Knochens. Degeneriert sie in großen Mengen, geht auch die Matrix zugrunde. Osteozyten sind flache, dendritische Zellen mit zahlreichen langen, filopodienartigen Fortsätzen. Die Zellen liegen in Knochenhöhlen, ihre Fortsätze verlaufen in *Knochenkanälchen* (Canaliculi ossei), die radiär von den Knochenhöhlen ausgehen. Untereinander durch Gap junctions verbunden, dienen die Zellausläufer dem Transport kleiner Moleküle und Ionen. Die innerste Lage hat Verbindung zu den Knochenkapillaren (JUNQUEIRA und CARNEIRO, 1996; LIEBICH, 1999).

Die langgestreckten *Knochenhöhlen* (Lakunen) haben einen Durchmesser von etwa 30 μm und liegen zwischen oder innerhalb von Lamellen. Zwischen Osteozyt und Lakunenwand sowie den Zellfortsätzen und der Wand der Kanälchen ist eine 0,2 bis 2 μm breite Zone mit unverkalkter Matrix zu finden (COOPER et al., 1966).

Die *Osteoklasten* erhielten 1873 ihren Namen von KÖLLIKER, der ihnen auch die Verantwortung für die Knochenresorption zuschrieb. Sie gehören zur Familie der vielkernigen Riesenzellen und sind auf die Resorption verkalkter Gewebe sowie auf die alleinige Auflösung der anorganischen Substanz spezialisiert. Der Durchmesser ihres Zelleibes (10-100 μm) variiert ebenso wie die Zahl ihrer Zellkerne (10 bis 20, maximal bis zu 100 Kerne /

Zelle). Einkernige Riesenzellen liegen an der Knochenoberfläche und bewirken den physiologischen Knochenumbau (TONNA, 1960; HORN et al., 1975). Mehrkernige Zellen liegen erst dahinter in der zweiten Reihe. Aktive Osteoklasten haften an der Knochenoberfläche, die Resorption findet nur in diesem Areal statt. Sie hinterlässt Spuren in Form von Grübchen, den *Howshipschen Lakunen*. Die der Knochengrundsubstanz zugewandte Oberfläche der Osteoklasten wird durch ein System dicht stehender Falten vergrößert („*ruffled border*“). Diese Membranvergrößerung dient in erster Linie der HCl-Produktion. Dadurch sinkt der pH-Wert und das Knochenmineral wird aufgelöst. Außerdem verfügt diese Resorptionsstruktur u.a. über Karboanhydrase, ATPase, über saure und neutrale Phosphatasen sowie über Zytochromoxidasen (BLAIR, 1989, 1993). In einer an die *ruffled border* angrenzenden Resorptionskammer wird die freigelegte organische Matrix durch lysosomale und nicht lysosomale Proteasen aufgelöst. Desweiteren sind Osteoklasten sehr mobile Zellen, wobei die Matrixstruktur des Knochens eine große Rolle spielt. Nach der Resorption lösen sich Osteoklasten von der Knochenoberfläche ab, wandern zu einer anderen Oberfläche und beginnen dort erneut mit dem Abbau (LIEBICH, 1999). Pro Zeiteinheit baut ein Osteoklast bis zu drei mal mehr Knochenmatrix ab, als von Osteoblasten aufgebaut wird (JUNQUEIRA und CARNEIRO, 1996; LIEBICH, 1999).

II.2.1.3 Knochenarten

Histologisch sind zwei Arten von Knochengewebe zu unterscheiden, der Geflecht- oder Faserknochen und der Lamellenknochen. Qualitativ ist ihre Zusammensetzung aus zellulären, kollagenfaserigen und mineralischen Bestandteilen gleich, aber es bestehen quantitative Unterschiede.

Geflechtknochen

Die entwicklungsgeschichtlich einfachere Form des Knochens kann im weitesten Sinne als ein verknöchertes Bindegewebe angesehen werden. Bei jeder Knochenneubildung, sei es im Rahmen der embryonalen Entwicklung oder im Zuge einer Frakturheilung, wird das Stadium des Geflechtknochens durchlaufen. Dieser wird viel schneller gebildet als Lamellenknochen, da die Zeitspanne zwischen Osteoidproduktion und Mineralisation sehr kurz ist (SCHENK und WILLENEGGER, 1977). Nach der Geburt wird diese Knochenart rasch durch den differenzierteren Lamellenknochen ersetzt. Nur an wenigen Stellen im adulten Organismus bleibt zeitlebens der einfachere Geflechtknochen erhalten, z.B. im Gehörgang.

Der Geflechtknochen ist zellreich und die Verteilung der Osteozyten unterliegt keiner erkennbaren Ordnung. Die geformte Grundsubstanz ist von einem Geflecht aus groben und feinen Kollagenfaserbündeln durchzogen, die keine einheitliche Verlaufsrichtung zeigen (ERIKSEN, 1994). Der Mineraliengehalt im Geflechtknochen ist geringer als im Lamellenknochen, dagegen ist der Gehalt an Osteozyten höher. Diese Knochenart ist besonders widerstandsfähig gegen Zug und Biegung (JUNQUEIRA und CARNEIRO, 1996; LIEBICH, 1999).

Lamellenknochen

Der Lamellenknochen ist durch die nach statisch-funktionellen Gesichtspunkten orientierte Ordnung der Kollagenfasern (*Knochenlamellen*) charakterisiert. Diese Ordnung lässt sich anhand eines Querschnittes durch die Kompakta eines Röhrenknochens gut erkennen.

Die einzelnen Lamellen werden von parallel angeordneten kollagenen Fasern und mineralisierter Matrix gebildet. Die Fasern haben dabei üblicherweise einen schraubenförmigen Verlauf. Von Lamelle zu Lamelle ändert sich regelmäßig die Verlaufsrichtung, so dass ein Gitter aus sich annähernd rechtwinklig kreuzenden Bahnen entsteht. Außerdem treten aus jeder Lamelle einzelne Fasern in die benachbarte Lamelle über, woraus der Lamellenverbund resultiert, eine mit Sperrholz vergleichbare Konstruktion (ERIKSEN, 1994).

In den Lamellen oder an ihren Grenzen liegen die Osteozyten in abgeflachten Kochenhöhlen. Von funktioneller Bedeutung ist, dass die Kollagenfibrillen im Knochen immer in gestreckter Form vorliegen und nicht wie im Bindegewebe gewellt. So entsteht ein Konstruktionsprinzip, das den Knochen bei Zug- und Druckbelastungen stabilisiert.

Die beschriebenen Lamellen bilden so die strukturelle Grundlage des Lamellenknochens. Zwischen 5 und 20 Lamellen sind konzentrisch um einen Kanal gelagert, der mit mesenchymalem Bindegewebe gefüllt ist und ein kleines Blutgefäß (*Havers-Gefäß*) führt. Dieser Kanal wird *Havers'scher-Kanal* genannt und bildet zusammen mit den Lamellen (*Speziallamellen*) ein *Havers'sches-System* oder *Osteon*. Osteone verlaufen in der Regel in Längsrichtung des Knochens, parallel zur Knochenoberfläche. Ein Osteon kann mehrere Zentimeter lang sein, der Außendurchmesser variiert zwischen 100 und 500 µm. Die Enden der Osteone anastomosieren untereinander.

Zusätzlich zum *Havers'schen-Gefäß* besteht über die quer durch die Osteone verlaufenden *Volkman-Gefäße* eine Verbindung zur inneren und äußeren Knochenhaut. Die in den Knochenkanälchen verlaufenden Zytoplasmafortsätze der Osteozyten, deren innerste Lage

Anschluss an den *Havers'schen Kanal* hat, ermöglichen den Stofftransport zu jeder Stelle der Knochenmatrix sowohl in zentripetaler wie zentrifugaler Richtung. Dieses kommunizierende Netz von Gefäßen macht Knochen zu einem gut vaskularisierten Gewebe.

Neben den Speziallamellen im *Havers'schen-System* gibt es noch die *äußeren* und *inneren Grundlamellen* sowie die *Schaltlamellen*. An den inneren und äußeren Knochenoberflächen sind die Lamellen plattenartig geschichtet. Die *äußere Grundlamelle* liegt unmittelbar unter dem Periost und verläuft parallel zur Oberfläche des Knochens. Die *innere Grundlamelle* begrenzt die Substantia compacta nach innen, liegt also an der Grenze zum Markraum, direkt unter dem Endost und ist parallel zur äußeren Grundlamelle angeordnet. Jede Änderung der statisch-mechanischen Belastung des Knochens führt zu einer funktionellen Anpassung seiner inneren Struktur. Dabei werden Osteone abgebaut, ihre Reste füllen die Zwischenräume neugebildeter Osteone aus. Man nennt sie *Schaltlamellen*.

II.2.1.4. Osteogenese und Mineralisation

Die Knochenbildung (Osteogenese) kann auf zweierlei Arten ablaufen. Wenn Knochengewebe direkt aus mesenchymalem Bindegewebe entsteht, dann spricht man von einer direkten oder primären, auch desmalen Ossifikation. Wird jedoch primär ein Knorpelmodell gebildet, das sekundär, d.h. im Anschluß schrittweise abgebaut und durch Knochen ersetzt wird, dann läuft die indirekte, sekundäre oder auch chondrale Ossifikation ab. Auf diesem Wege entsteht der größte Teil des knöchernen Skeletts, während die Schädelknochen sowie Anteile der Gesichtsknochen ohne die knorpelige Zwischenstufe geformt werden.

Generell gilt, dass zunächst immer Geflechtknochen entsteht, der im Zuge der weiteren Knochenentwicklung wieder abgebaut und durch Lamellenknochen ersetzt wird.

Desmale Ossifikation

Im Rahmen der desmalen Ossifikation gehen zunächst Osteoblasten über Vorläuferzellen aus Mesenchymzellen hervor. Durch die permanente Synthese unverkalkter Matrix (Osteoid) mauern sich die Osteoblasten ein. Dabei bleiben sie aber stets über ihre Zellausläufer in Verbindung.

Mit zunehmender Mineralisierung der Knochengrundsubstanz werden die Osteoblasten zu Osteozyten. Das derart entstandene osteoide Gewebe ist peripher immer mit den sich neu aus den Mesenchymzellen differenzierenden Osteoblasten besetzt. Durch deren Tätigkeit nimmt

das Gewebe an Umfang zu. Letztlich kommt es durch die Vereinigung kleiner osteoider Inseln zur Ausbildung eines dreidimensionalen Bälkchensystems, in dessen Zwischenräumen sich primäres Knochenmark ausbildet (LIEBICH, 1999; SAJONSKI und SMOLLICH, 1990).

Chondrale Ossifikation

Während der indirekten Ossifikation dient ein Modell aus hyalinem Knorpel als Platzhalter und Grundlage für das Längenwachstum des Knochens. Letzteres endet erst mit dem Schluss der Epiphysenfugen. Grundsätzlich laufen bei der chondralen Ossifikation zwei Vorgänge ab:

- eine perichondrale Ossifikation und
- eine enchondrale Ossifikation

Zu Beginn der Entwicklung langer Knochen entsteht um ihre Diaphyse mittels desmalen Osteogenese aus den Chondroblasten des Perichondriums eine *perichondrale Knochenmanschette*, die aufgrund ihrer appositionellen Bildung keine Knorpelreste enthält. Sie dient bei gleichzeitigem Knorpelabbau der Aufrechterhaltung der Stützfunktion. Der unter der Manschette gelegene Knorpel degeneriert, verkalkt und wird abgebaut. Im Anschluss dringen Bindegewebe und Blutgefäße in die freigewordenen Räume ein. Unter ständigem Auf- und Abbau von Knochengewebe entwickelt sich eine primäre Markhöhle (Spongiosabildung). Durch zunehmende Umwandlung des Bindegewebes in hämoretikuläres Gewebe entsteht das sekundäre Knochenmark (rotes Knochenmark).

Indem das knorpelige Modell vollständig abgebaut und knöchern ersetzt wird, beginnt die *enchondrale Ossifikation*. Dabei kommt es im Prinzip zunächst wieder zu einer Hypertrophie und zum Abbau von Chondrozyten. Es bleiben Lakunen zurück, in die Blutkapillaren und Mesenchymzellen einwachsen. Daraus differenzieren sich Osteoblasten, die mit der Knochenbildung beginnen. Auf diese Weise entsteht dort Knochengewebe, wo vorher Knorpel war. Eine direkte Umwandlung von Knorpel in Knochen erfolgt jedoch nicht.

So setzt sich die enchondrale Ossifikation zu beiden Enden des Knochens fort, solange bis vom knorpeligen Grundmodell nur noch ein Überzug an den Epiphysen (Gelenkknorpel) und bis zum Abschluss des Längenwachstums die knorpelige Wachstums- oder Epiphysenfuge erhalten ist (JUNQUEIRA und CARNEIRO, 1996; LIEBICH, 1999; SAJONSKI und SMOLLICH, 1990).

Mineralisation (Verkalkung)

Die Mineralisation eines Knochens ist ein vielschichtiger und in vielen Details nach wie vor ungeklärter Vorgang (COOPER et al., 1966; SCHNETTLER et al., 1994; SCHENK, 1998). Dabei spielen Osteoblasten und Kollagenfasern die wichtigste Rolle. Die spezifische Zelleistung der Osteoblasten besteht hierbei nicht nur in der Bildung der Vorstufen der organischen Knochenmatrix, sondern auch in der Bereitstellung der anorganischen Phase in Form von Matrixvesikeln (OSBORN, 1985).

Durch die Fragmentierung von Zytoplasmafortsätzen der Osteoblasten entstehen die sog. *Matrixbläschen* oder *-vesikel*, membranumhüllte, sphärische Bläschen mit einem Durchmesser von 100 bis 200 nm, die in die Interzellulärsubstanz einwandern. Sie enthalten Kalziumkomplexe von Phospholipiden und basischen Proteasen, u.a. auch alkalische Phosphatase sowie Pyrophosphatase.

Die ersten Präzipitate des Kalziumphosphats (Hydroxylapatitkristalle) treten an der Innenfläche der Membran auf und werden nach deren Ruptur freigesetzt. Zusammen mit anderen Ionen wirkt das freigesetzte Kalziumphosphat als Keimbildner („*calcification nodules*“) an extrazellulären Nukleationsstellen (MARTINO et al., 1979; STÜNZI und WEISS, 1990). Auch die weitere Mineralisation verläuft extrazellulär. Die Kristalle treten an die Kollagenfibrillen heran. Dabei richten sie ihre Längsachse parallel zur Längsachse der Fibrillen aus (COOPER et al., 1966). Zunächst erfolgt die Bildung mineralisierter Inseln entlang der Fasern (HÖHLING et al., 1974; MARTINO et al., 1979). Schließlich wird die Mineralisation durch die Ausbildung von intra- und interfibrillären Kristallen erreicht (JUNQUEIRA und CARNEIRO, 1996; LIEBICH, 1999).

Durch die innige Verbindung der zugfesten Kollagenfibrillen mit den anorganischen Kristallen entsteht die Druckfestigkeit eines Knochens (SAJONSKI und SMOLLICH, 1990). Da die Kollagensynthese zeitlich vor der Mineralisation beginnt, wird klar, dass die Textur der Kollagenfasern den Charakter des entstehenden Knochens bestimmt (OSBORN, 1985).

II.2.1.5 Knochenumbau (Remodeling)

Neben der für ein Stützgewebe zu erwartenden Eigenschaft der Festigkeit zeichnet sich Knochengewebe immer auch durch ein hohes Mass an biologischer Plastizität aus. Dies scheint zunächst im Widerspruch zur Festigkeit zu stehen. Dabei ist mit dem Begriff der Plastizität die Fähigkeit zum Umbau gemeint, wobei ein Teil der Strukturen abgebaut und durch neue ersetzt wird. Derartige Umstrukturierungen werden im Laufe des Lebens aufgrund

der sich ändernden Beanspruchungen des Skelettsystems notwendig (FROST, 1963, 1966, 1969). Eine entscheidende Voraussetzung für die verschiedenen Umbauvorgänge ist der enge Kontakt zwischen Knochengewebe und Blutgefäßen einerseits und dem sie umgebenden Bindegewebe andererseits. Darin enthaltene Zellen können sich bei Bedarf in Osteoblasten umwandeln.

Physiologisch und im Zuge einer Bruchheilung entstandenes Knochengewebe ist zunächst immer Geflechtknochen. Dieser wird aus dem umgebenden Bindegewebe heraus vaskularisiert. Es differenzieren sich Osteoblasten, die mit der Ausscheidung von Interzellulärsubstanz die Bildung von Lamellenknochen in Gang setzen. Mit der Entstehung des höher entwickelten Knochens ist der Knochenumbau aber keineswegs abgeschlossen, sondern hält auch im adulten Organismus an. Beim Umbau von Lamellenknochen werden bereits gebildete Osteone (*primäre Osteone*) wieder abgebaut und durch eine neue Generation von Osteonen ersetzt (*sekundäre Osteone*). Zurück bleiben die Reste der primären Osteone in Form der Schaltlamellen. Besonders intensive Umbauvorgänge kommen im Vorherrschen von Schaltlamellen zum Ausdruck.

Demnach sind Knochenaufbau (Apposition) und -abbau (Resorption) immer miteinander verbunden. Der äußeren Apposition steht immer die innere Resorption gegenüber (HUNTER, 1798). Dabei sind die Abläufe in Kompakta und Spongiosa prinzipiell ähnlich. In beiden Fällen finden sich die im Umbau begriffenen Osteone als Umbaueinheiten, die auch als **Bone Multicellular Unit** = „**BMU**“ (FROST, 1963, 1966, 1969) oder **Bone Remodeling Unit** = „**BRU**“ (RASMUSSEN und BORDIER, 1974) bekannt sind.

In der Spitze eines osteonalen Resorptionskanals liegt eine Ansammlung von Osteoklasten („Osteoklastenbohrkopf“ oder *cutting cone*), während dicht dahinter bereits neue Knochenlamellen durch Osteoblasten abgelagert werden. Eine mitlaufende Kapillarschlinge hält weitere Osteoprogenitorzellen bereit (SCHENK, 1978; ERIKSEN, 1994).

Ebenfalls auf Arbeiten von FROST ist die ausschließlich auf kompaktes Knochengewebe anzuwendende „**ARF-Regel**“ zurückzuführen. Damit sind **Aktivierung-Resorption-Formation** gemeint, die jedes Osteon in dieser Reihenfolge durchläuft. Die Menge des neu gebildeten Knochens pro Zeiteinheit hängt aber nicht alleine von der Aktivität der Osteoklasten und Osteoblasten ab, sondern ebenso von der Anzahl der aktiven Umbaueinheiten pro Knochenabschnitt (SCHENK, 1991; ERIKSEN, 1994). Die einzelnen Schritte dieser Abfolge sind durch Latenzzeiten von zwei bis drei Wochen Dauer getrennt (URIST, zitiert nach OSBORN, 1985).

II.2.1.6 Reparatur, Regeneration und Frakturheilung

Eine Fraktur ist die Zusammenhangstrennung eines Knochens, die entsteht, wenn das einwirkende Trauma größer ist als Biege-, Dreh-, Stauchungs-, Zug- und / oder Druckfestigkeit des Knochens (WIESNER und RIBBECK, 1991). Auch die experimentelle Entnahme von Knochenteilen, mit nachfolgender Implantation unterschiedlichster Ersatzmaterialien stellt eine Zusammenhangstrennung mit den entsprechenden Folgen, wie Zerstörung und Unterbrechung von Periost und Blutgefäßen dar.

Alle Stützgewebe sind regenerationsfähig, d.h. zerstörte Zellen werden durch morphologisch und funktionell gleichwertige Zellen ersetzt. Nach Abschluss der Wachstumsvorgänge ist die Ausgangssituation wieder erreicht, man spricht von einer *Regeneration* oder *Restitutio ad integrum*. Anders ausgedrückt: Knochen heilt durch Bildung neuen Knochens (BRAND und RUBIN, 1990). Hingegen entsteht beim Vorgang der *Reparation* ein funktionell minderwertiges Gewebe, da die nachwachsenden Zellen den verlorengegangenen weder strukturell noch funktionell gleichen.

Die Frakturheilung kann auf direktem (primären) oder indirektem (sekundärem) Wege erfolgen. Für beide Formen kann die ARF-Regel nicht angewendet werden, da die osteoklastäre Resorptionsphase entfällt (OSBORN, 1985). Der Raum für die Osteogenese wurde durch die unterbrochene Kontinuität des Knochens künstlich herbeigeführt (SCHENK, 1978).

Die primäre Knochenbruchheilung setzt ideale Bedingungen voraus. Dazu gehören vor allem das kongruente Aufeinanderpassen der Bruchenden unter dem nötigen Druck sowie eine hohe Belastungsstabilität der Region. In einem sehr engen Frakturspalt entstehen dabei in gegenüberliegenden Havers'schen Systemen Osteoklasten, die zunächst das nekrotische Gewebe aus dem Spalt entfernen und die Gefäßkanäle erweitern. Erst danach können die aus ruhenden Zellen des Peri- und Endost sich entwickelnden Osteoblasten Knochengewebe bilden. Der Frakturspalt wird direkt von Osteonen überbrückt. Man spricht von *Kontaktheilung* (SCHENK und WILLENEGGER, 1977). Wenn trotz ausreichender Stabilität ein zu weiter Bruchspalt den direkten Fragmentkontakt verhindert, kommt es zur *Spaltheilung* (RAHN et al., 1971). Es sprossen zunächst Kapillaren aus dem Periost und den verbliebenen Havers'schen Kanälen ein. Mesenchymale Zellen aus dem perivaskulären Gewebe proliferieren und differenzieren sich zu Osteoblasten. Sie füllen den Spalt vorerst mit

lamellärem Knochen, der sich an der Spaltebene orientiert, bevor die Fraktur dann mittels Havers'schem Remodeling durchbaut wird.

Kennzeichnend für die indirekte oder sekundäre Knochenbruchheilung ist die Bildung eines Ersatzgewebes, das nach und nach durch Knochen ersetzt wird. Unter instabilen Verhältnissen können verschiedene Phasen der Heilung beobachtet werden (CRUESS und DUMONT, 1975). Am Anfang steht die Phase der *Entzündung*. Dieser Abschnitt ist die Grundlage für jede Form der Frakturheilung, auch für die direkte Heilung. Bereits wenige Minuten nach dem Trauma erreichen neutrophile und basophile Granulozyten sowie mononukleäre Phagozyten auf dem Wege der Chemotaxis den Ort des Geschehens. Infolge der Freisetzung von Histamin aus Gewebemastzellen kommt es im Anschluss an die vorübergehende Konstriktion der Blutgefäße zu einer Vasodilatation mit erhöhter Durchblutung und Gefäßpermeabilität im Defektgebiet. Es entsteht ein Hämatom, das sich nach wenigen Tagen organisiert. Das nekrotische Gewebe wird durch Phagozytose und mittels lysosomaler Enzyme beseitigt. Dieses Debridement nimmt einige Wochen in Anspruch.

Es schließt sich die *reparative Phase* an, mit der Ausbildung eines *weichen* und eines *harten Kallus*. MÜLLER und PERREN (1972) definieren den Kallus als eine Gewebeneubildung, die eine ossäre Vereinigung zweier Knochenfragmente einleitet und bewerkstelligt. Er ist als die Gesamtheit der bindegewebigen, knorpeligen und knöchernen Verbindungsgewebe anzusehen. Entlang des im Frakturhämatom entstehenden Fibringerüsts erfolgt der Ersatz durch Granulationsgewebe. In diesem sind Entzündungszellen, Fibroblasten, Kollagen und neue Gefäße enthalten. Die Fragmentenden sind zunächst noch grob gegeneinander verschieblich. Die Menge des gebildeten Kallus hängt direkt von der mechanischen Belastung im Defektgebiet ab. Je mehr interfragmentäre Beweglichkeit vorhanden ist, desto mehr Kallus entsteht.

Während dieses Stadiums werden alle lokalen Osteone für den Knochenumbau aktiviert, man spricht von *Induktion*. Diese Zeit ist auf dem Röntgenbild durch eine vermehrte Knochendichte gekennzeichnet. Die schrittweise Stabilisierung der Fragmente wird durch den Einsatz von Geweben mit zunehmender Festigkeit und sinkender Dehnungstoleranz erreicht (PERREN und CORDEY, 1977). Während Granulationsgewebe noch eine Dehnung bis zu 100 % toleriert, besitzt der im Anschluss gebildete Faserknorpel nur ein Zehntel dieser Dehnungsfähigkeit. Er wird zunächst in der Peripherie des Kallus gebildet. Dort setzt auch seine Mineralisierung ein, mit der die Phase des *harten Kallus* beginnt. Die Mineralisation

schreitet von der Peripherie zum Zentrum des Kallus fort. Dabei stellt das mineralisierte Gewebe einen mechanischen Schutz für das feine Kapillarnetz dar, das im Gefolge der Resorptionskanäle aus Osteoklasten und Chondroklasten einwächst. Anschließend wird die Wand dieser Kanäle mineralisiert und dient so als Gerüst für die Ablagerung des neuen Knochengewebes. Der erste Knochen, der entsteht, ist Geflechtknochen. Die Fragmentenden sind nun nicht mehr gegeneinander verschieblich.

Allmählich wird die unregelmäßige Struktur der Trabekel durch lamellären Knochen ersetzt. Es beginnt die längste Phase der Frakturheilung, die *Phase des Remodeling*. Dabei wird der periostale und endostale Kallus vollständig resorbiert und die Kortikalis im Defektgebiet zu normaler Havers'scher Architektur umgebaut. Ebenso wird der Markraum wieder hergestellt. Der reparierte Knochen erhält seine alte Form und Stärke zurück. Dieser Prozess kann Jahre in Anspruch nehmen (MÜLLER und PERREN, 1972; BRAND und RUBIN, 1990; STÜNZI und WEISS, 1990).

III Eigene Untersuchungen

III.1 Material und Methoden

III.1.1 Versuchstiere

III.1.1.1 Identität der Versuchstiere

Die Untersuchung wurde an 24 weiblichen Kaninchen der Rasse „Weiße Neuseeländer Riesen“ vorgenommen. Diese kamen aus der hessischen Landesanstalt für Tierzucht Neu-Ulrichstein, Homberg (Ohm).

Zu Beginn des Versuches waren die Tiere etwa 12 Monate alt und wogen durchschnittlich 3,34 kg. Sie wurden bei der Aufnahme randomisierend mit fortlaufenden Nummern von 1 bis 24 mit wasserunlöslicher Farbe in beiden Ohrmuscheln markiert. Diese Nummern wurden bis zum Versuchsende in wöchentlichen Abständen nachgezogen.

Es wurde mit vier verschiedenen Implantaten gearbeitet, so dass vier Gruppen zu je sechs Tieren aufgestellt werden mussten. Aus Gründen von Unverträglichkeiten innerhalb der Tiergruppen wurde aber noch eine fünfte Box eingerichtet.

III.1.1.2 Haltungsbedingungen

Über die gesamte Versuchszeit wurden die Kaninchen in den Stallungen der Abteilung für allgemeine und experimentelle Chirurgie der Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig-Universität Gießen gehalten. Die Boxen waren 2 x 3 m groß und wurden mit Stroh eingestreut. Jeder Gruppe stand eine Kunststoffkiste mit zwei Öffnungen zur Verfügung, deren Dach auch als Liegefläche genutzt werden konnte. Die Reinigung dieser Boxen erfolgte mindestens zweimal wöchentlich. Mittels einer Belüftungsanlage wurde die Raumtemperatur konstant bei $+20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ gehalten. Der Kunstlicht-Dunkel-Rhythmus betrug 12:12 Stunden. Pelletiertes Kraftfutter (Ringkanin Universal – Alleinfuttermittel für Kaninchen und Angorakaninchen) der Firma Raiffeisen und Wasser wurde den Tieren in offenen, standsicheren Metallnapfen angeboten. Wasser stand stets ad libitum zur Verfügung und wurde einmal täglich erneuert. Das Kraftfutter wurde einmal täglich angeboten. Zweimal täglich bekamen die Tiere Heu als Rauhfutter.

III.1.2 Implantate

III.1.2.1 Beschreibung der verwendeten Implantate

Die Implantate wurden von Herrn Prof. Dr. William Bonfield am Queen Mary and Westfield College, London angefertigt. Für die enossale Implantation standen ovale Zylinder mit einem Durchmesser von 7 x 6 mm und einer Höhe von 8 mm zur Verfügung. Jeder dieser Zylinder hatte eine durchgehende, zentrale Ausbohrung von 2 mm Durchmesser (siehe Abb. 1, oben). Die Hälfte dieser Implantate hatte außerdem 0,6 mm starke Perforationen, die gleichmäßig über den gesamten Zylinder verteilt waren und alle in den Zentralkanal mündeten. Für das Weichgewebe standen Scheiben von ebenfalls 6 mm Durchmesser, jedoch nur 3 mm Höhe zur Verfügung (siehe Abb. 1, unten). Die Hälfte dieser Scheiben hatte Perforationen von 0,6 mm Durchmesser.

III.1.2.2 Zusammensetzung und Eigenschaften der Implantate

Aufgrund der unterschiedlichen Ausgangsmaterialien gab es zwei Arten von Implantaten. Der eine Teil bestand aus dem Kunststoff Polyethylen (high density polyethylene (HDPE) / Rigidex HM4560XP, BP Chemical Ltd., UK), im weiteren Verlauf mit **PE** bezeichnet. Der andere wurde aus dem Polymer Polyethylen hergestellt, dem 40 Vol % Hydroxylapatit in Pulverform (Grade P205, Plasma Biotol Ltd., UK) zugesetzt waren. Beide Stoffe wurden in zahlreichen Arbeitsschritten miteinander vermengt und standen letztlich, in Blockform ausgehärtet, zur Verfügung (BONFIELD et al., 1984; WANG et al., 1994; WANG et al., 1998). Aus diesen Blöcken wurden dann die Implantate mit den o.g. Abmessungen gewonnen. Das Endprodukt ist unter dem Namen **HAPEX™** (HA(40vol%)-HDPE) bekannt und wird bereits klinisch eingesetzt (BONFIELD et al., 1988; TANNER et al., 1994; BONFIELD et al., 1997; MEIJER et al., 2002). Im nachfolgenden Text wird dieser Kompositwerkstoff als **HAPE** bezeichnet.

Die organischen PE-Zylinder wiesen eine durchschnittliche Dichte von 0,949 g / cm³ (± 0,001) auf und waren nicht röntgendicht. Makroskopisch hatten sie eine milchig-weiße Farbe (siehe Abb.1, rechts und links außen). Die Form der Implantate konnte für die Implantation auf einfache Weise mit einem Skalpell bearbeitet werden.

Die HAPE-Implantate hatten eine durchschnittliche Dichte von 1,782 g / cm³ (± 0,004) und waren röntgendicht. Dabei entsprachen 40 Vol % Hydroxylapatit etwa 68,97 wt %. Aufgrund ihrer hellbeigen Färbung (siehe Abb.1, Mitte) unterschieden sich die HAPE-Implantate schon makroskopisch von den milchig-weißen PE-Proben. Durch die Beimengung von

Hydroxylapatit waren diese Implantate deutlich härter und deshalb schwieriger manuell dem Defekt anzupassen. Beide Implantatarten waren strahlensterilisierbar.

Der Hauptbestandteil des Hydroxylapatitpulvers ist Hydroxylapatit mit der Substanzformel $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. Die durchschnittliche Größe der HA-Partikel betrug $4,4 \mu\text{m}$, der Peak in der Größenverteilung lag allerdings bei $3,3 \mu\text{m}$. Das Kalzium / Phosphat-Verhältnis des Pulvers betrug 1,695. Hinsichtlich der im HA-Material unerwünscht enthaltenen Substanzen wurden vom Hersteller folgende Werte angegeben:

SiO_2	0,49	SrO	0,04
MgO	0,28	Na_2O	0,03
Al_2O_3	0,12	TiO_2	0,01
Fe_2O_3	0,07	K_2O	0,01

Tab. 1: unerwünscht in HA-Pulver enthaltene Substanzen in Gewichtsprozenten (wt %)

Die folgenden vier Implantatformen standen zur Verfügung (siehe Abb. 1):

1. Reines Polyethylen, perforiert (PEp)
2. Hydroxylapatit-Polyethylen-Komposit, perforiert (HAPEp)
3. Hydroxylapatit-Polyethylen-Komposit, massiv (HAPEm)
4. Reines Polyethylen, massiv (PEm)

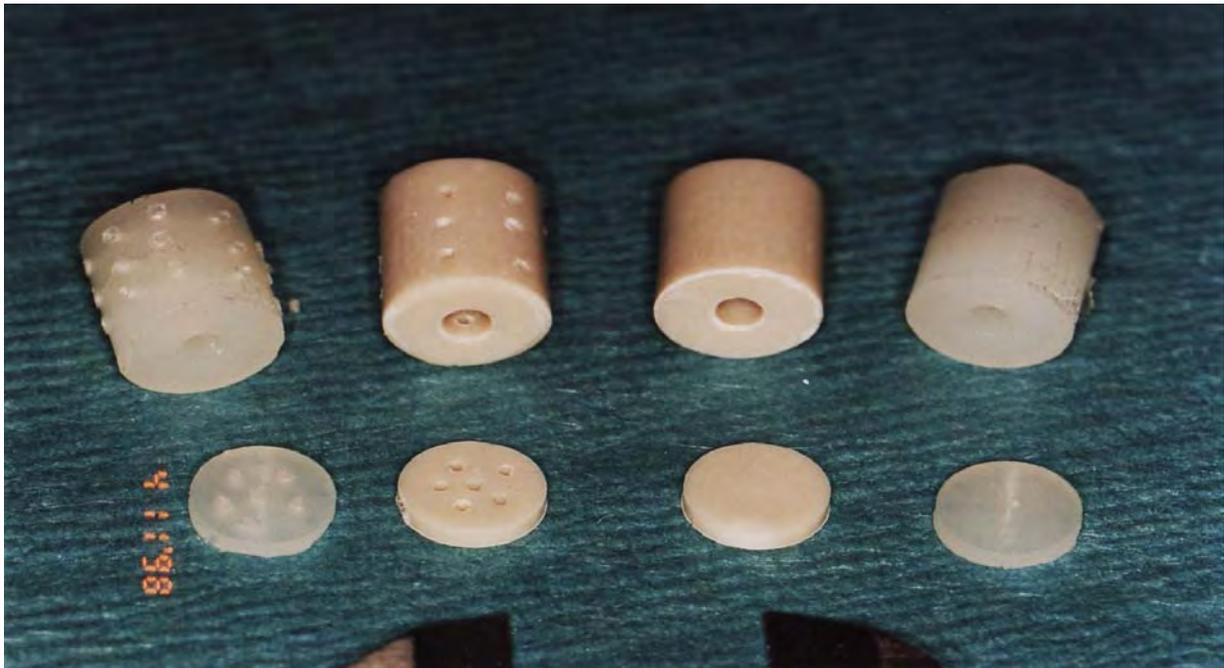


Abb. 1: Die vier Implantatformen (von li. nach re.): reines Polyethylen, perforiert (PEp), Hydroxylapatit-Polyethylen-Komposit, perforiert (HAPEp), Hydroxylapatit-Polyethylen-Komposit, massiv (HAPEm) und reines Polyethylen, massiv (PEm)

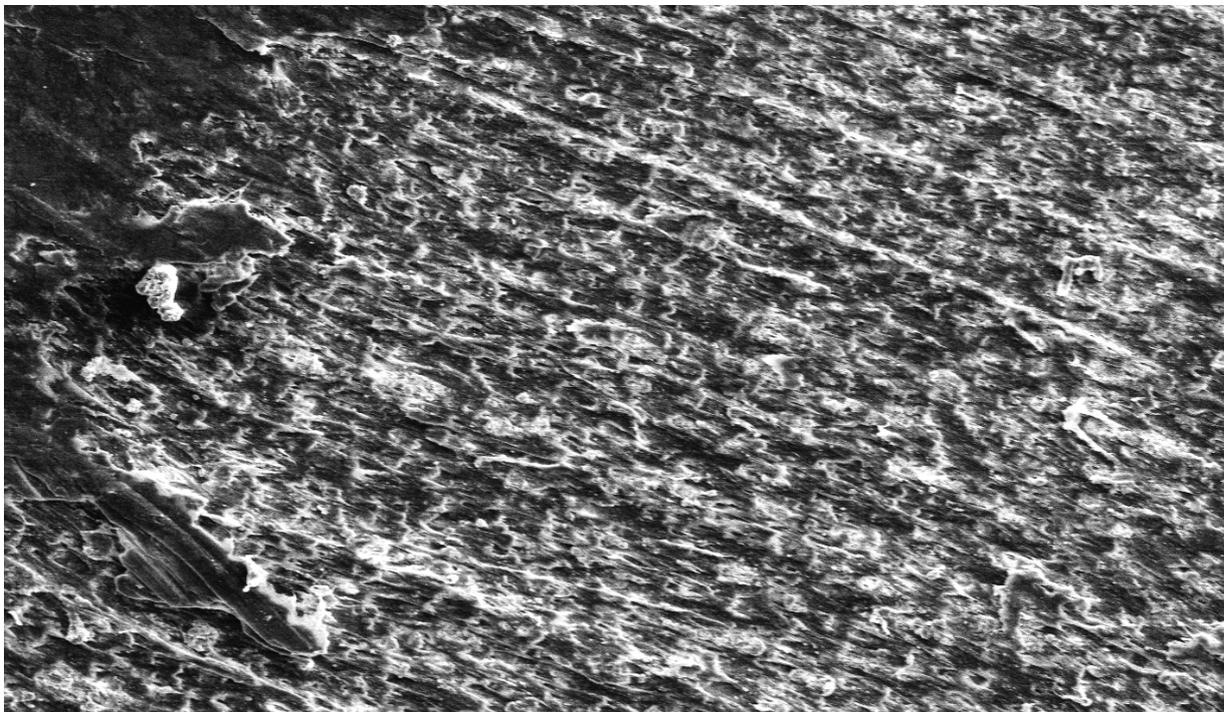


Abb. 2: Rasterelektronenmikroskopische Ansicht der Oberfläche eines Hydroxylapatit-Polyethylen-Implantates, 1070-fach vergrößert

III.1.2.3 Materialvorbereitung

Alle Proben wurden verpackt und anschließend mit einer Oberflächendosis von 25 kGy Gamma-Strahlen sterilisiert. Das Implantat wurde während der Operationen dem ausgebohrten Ulnadefekt durch Zuschneiden mit dem Skalpell individuell angepasst.

III.1.3 Präoperative Maßnahmen

III.1.3.1 Quarantäne und klinische Untersuchung der Versuchstiere

Bereits drei Monate vor Versuchsbeginn wurden die Tiere gruppenweise in die unter III.1.1.2 beschriebenen Boxen eingesetzt, um eine ausreichende Quarantäne- und Eingewöhnungszeit zu gewährleisten. Am Tage der Aufstallung wurden alle Tiere einer umfangreichen Allgemeinuntersuchung unterzogen. Dabei wurden folgende Parameter ermittelt und protokolliert:

- Körpergewicht
- Beschaffenheit von Haarkleid, Haut, Schleimhäuten und Lymphknoten
- Körpertemperatur
- Puls- und Atemfrequenz

Außerdem wurden alle großen Organsysteme klinisch anhand der üblichen Untersuchungsgänge überprüft. Zudem wurden von jeder Gruppe Kotproben für die parasitologische Untersuchung gewonnen. Alle Daten wurden für jedes Tier individuell in einer Patientenkartei festgehalten. Um stressinduzierte Veränderungen des Blutbildes zu vermeiden, wurden die ersten Blutproben erst eine Woche nach der Aufstallung gewonnen.

Folgende Untersuchungen wurden durchgeführt:

- Rotes Blutbild
- Weißes Blutbild
- Leberprofil
- Harnstoff und Kreatinin

Bis zu den Operationsterminen wurden die Kaninchen hinsichtlich ihres Allgemeinbefindens und der Futteraufnahme täglich kontrolliert. Die Körpergewichte wurden wöchentlich ermittelt. Stichprobenartig wurde die Körperinnentemperatur gemessen.

III.1.4. Ulnateilosteotomie und Implantation

III.1.4.1 *Operationsvorbereitung, Prämedikation und Anästhesie*

Am Tag vor dem Operationstermin erfolgte erneut eine Allgemeinuntersuchung, in deren Verlauf auch das aktuelle Körpergewicht ermittelt wurde.

Die Kaninchen wurden mit 10 mg Tiletamin-Zolazepam (Tilest[®] 500; Pharmacia) / kg KM intramuskulär sediert und mit einem Isofluran (Forene[®]; Abbott GmbH, Wiesbaden)-Sauerstoffgemisch über eine Atemmaske anästhesiert. Bei der Narkoseeinleitung betrug die Isoflurankonzentration 2,5 bis 3,0 Vol %, die Erhaltungsdosis lag je nach Wirkung bei 1,5 bis 2 Vol %. Der O₂-Fluss betrug 1,0 bis 1,2 l / min. Über die Sauerstoffsättigung und die Atemfrequenz gab während des Eingriffs ein Kapnograph Auskunft (Capnomac II, Datex). Alle Werte wurden fortlaufend protokolliert.

Die linke Vordergliedmaße wurde vom Karpalgelenk bis zum Buggelenk geschoren und dieser Bereich mit Alkohol und anschließend mit einer Polyvidon-Jod-Lösung (Braunol 2000[®]; Braun Melsungen) desinfiziert. Abschließend bekam jedes Tier einmalig 5 mg Gentamicin / kg KM i.m. (Gentamicin 50[®]; animedica). Auf dem Operationstisch wurden die Tiere in rechter Seitenlage bis auf die linke Vordergliedmaße vollständig mit sterilen Tüchern abgedeckt. Das Operationsfeld wurde nochmals mit der Polyvidon-Jod-Lösung desinfiziert.

III.1.4.2 *Operationsprotokoll*

Die Haut wurde über der kaudolateralen Fläche der Ulna, 2 – 3 cm unterhalb des Ellbogengelenkes, auf einer Länge von ca. 2 cm eröffnet. Durch Inzision der Unterhautfaszie und Spreizen der Wundränder konnten der M. extensor digitalis lateralis sowie der M. extensor carpi ulnaris, respektive ihre sehnigen Anteile, dargestellt werden. Sie wurden voneinander gelöst und nach kranial bzw. lateral verlagert, so dass die tiefe Unterarmfaszie sichtbar wurde. Faszie und Periost wurden durchtrennt.

Durch Anlegen einer Schablone wurde der genaue Ort für die Osteotomie im proximalen Diaphysendrittel der Ulna ermittelt (Abb. 3 a und b).

Mit einer wassergekühlten Diamanthohlfräse (Diamond Bone Cutting System, Merck, Darmstadt) der Größe 0,5 – 7,3 / 6,4 wurden knöcherne Defekte in die Ulna gefräst (Abb.3 e). Konnte das Knochenstück nicht direkt mit der Fräse ausgelöst werden, wurde ein Extraktor zu Hilfe genommen. Aus technischen Gründen ließ es sich nicht vermeiden, dass dabei in Einzelfällen auch die radiusnahe Kortikalis des Lagerknochens (im Weiteren häufig als „Restkortikalis“ bezeichnet) entfernt wurde. Knochenmehl wurde anschließend mit RINGER-Lösung ausgespült. Falls nötig wurde das Implantat individuell zugeschnitten und dann in das Knochenlager eingesetzt (zur Frage der Instabilität im Implantatlager siehe Diskussion, S.97). Faszie und Unterhaut wurden mit einer fortlaufenden Naht (3-0 Polysorb, 2 metric, USSC Sutures) und die äußere Haut mit Einzelheften aus 3-0 Polysorb (2 metric, USSC Sutures) verschlossen.

Erfahrungsgemäß ist eine zusätzliche Stabilisierung der osteotomierten Gliedmaße nicht erforderlich, da der Radius zusammen mit dem verbliebenen Teil der Ulna ausreichende Belastungsstabilität gewährleistet.

Zur Überprüfung der Verträglichkeit im Weichgewebe wurden proximal des Ellbogengelenkes Materialproben zwischen Caput longum und Caput laterale des M. triceps brachii eingebracht. Dazu wurden die Haut und die oberflächliche Schulterfaszie durchtrennt und anschließend das Material zwischen beide Muskelanteile eingebracht. Die Schulterfaszie wurde mit nicht resorbierbarem Faden wieder verschlossen (3-0 Ethibond, 2 metric, Ethicon Nordenstedt), wodurch das Wiederauffinden der Implantationsstelle erleichtert wurde. Zum Verschluss der äußeren Haut wurde, wie bei der Naht im Bereich der Ulna, resorbierbares Nahtmaterial in Einzelheften verwendet. Beide Operationsflächen wurden mit Nobecutan[®]-Spray (Astra GmbH, Wedel) abgedeckt.

In der Aufwachphase verblieben die Tiere zu mehreren in einer Aufwachbox unter Rotlichtbestrahlung. Erst danach wurden sie in die entsprechenden Stallgruppen zurückgesetzt und erhielten etwas Heu.

Tabelle 2 zeigt sowohl die Verteilung der Implantate als auch die Dauer der Nachbeobachtungszeit für jedes Tier.

Implantat	Nachbeobachtungszeit	Nachbeobachtungszeit
	5 Wochen	20 Wochen
PEp	Tier Nr. 13, 16, 24	Tier Nr. 5, 7, 9
PEm	Tier Nr. 6, 17, 19	Tier Nr. 2, 10, 15
HAPEp	Tier Nr. 8, 12, 14	Tier Nr. 3, 20, 23
HAPEm	Tier Nr. 1, 11, 18	Tier Nr. 4, 21, 22

Tab.2: Verteilung der Implantate und Zeiten bis zur Euthanasie (Nachbeobachtungszeit) der einzelnen Tiere

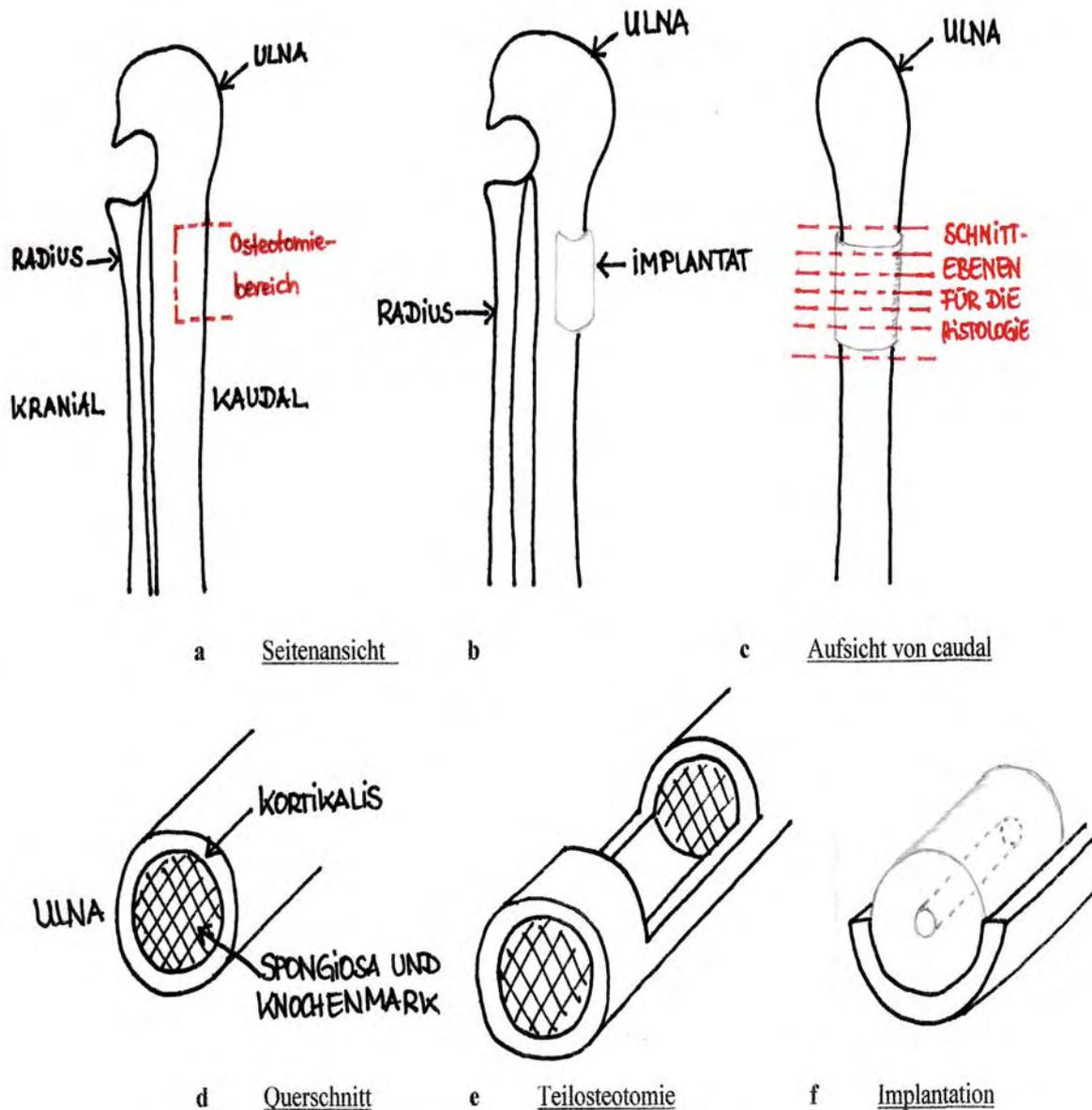


Abb. 3: Operations- und Präparationsschema

III.1.5 Operative Nachsorge

III.1.5.1 Kontrolle der Futteraufnahme, des Körpergewichts, der Nutzung der operierten Gliedmaße sowie der Körperinnentemperatur

Im Rahmen der postoperativen Kontrolle wurde die tägliche Futteraufnahme jedes einzelnen Tieres ermittelt. *Sehr gute Futteraufnahme* wurde mit der Ziffer 1 bewertet, bei nur *mäßigem Verzehr von Kraftfutter* wurde eine 2 und bei *fehlender Futteraufnahme* die Ziffer 3 eingesetzt. Tendenzen im Vergleich zum Vortag wurden mit einem + oder - vor der jeweiligen Zahl zum Ausdruck gebracht. Die Körpermasse wurde in kg festgehalten. In den ersten drei Wochen post op. wurden alle Kaninchen jeden dritten Tag gewogen, danach in wöchentlichen Intervallen. Ab der 5. Woche post op. wurden die verbliebenen Tiere im Abstand von 20 Tagen gewogen.

Die Nutzung (Lahmheit) der operierten Gliedmaße wurde gemäß nachfolgendem Schlüssel bewertet.

Bewertung	Bewertungsgrundlage
	Grad der Lahmheit der operierten Gliedmaße
3	„ <i>höchstgradige Lahmheit</i> “: vollständige Schonung in Ruhe und Bewegung
3+	„ <i>hochgradige Lahmheit</i> “: in Ruhestellung wird das Bein hin und wieder aufgesetzt, jedoch nicht in der Bewegung
2-	„ <i>mittel- bis hochgradige Lahmheit</i> “: häufige Benutzung in Ruhe und vereinzelt auch in Bewegung
2	„ <i>mittelgradige Lahmheit</i> “: volle Belastung in Ruhestellung und häufiger auch in der Bewegung
2+	„ <i>gering- bis mittelgradige Lahmheit</i> “: volle Belastung in Ruhe, in der Bewegung ab und zu Schonung
1-	„ <i>geringgradige Lahmheit</i> “: volle Belastung in Ruhe, nur vereinzelt Schonung bei Bewegung
1	„ <i>lahmheitsfrei</i> “: Belastung der operierten Gliedmaße weicht nicht von der Belastung des nicht operierten Beines ab

Tab.3 : Zahlenschlüssel zur Bewertung von Lahmheitsgraden der operierten Gliedmaße

Stichprobenhaft wurde in den ersten beiden Wochen nach der Implantation auch die Körperinnentemperatur gemessen.

III.1.5.2 *Behandlung einzelner erkrankter Tiere*

Bei Tier Nr. 9 war am 3. Tag post op. vermehrte Wärme und geringgradige Schmerzhaftigkeit der Implantatstelle an der Ulna zu verzeichnen. Daraufhin wurde der Bereich drei Tage lang mit Hirudoid-Salbe behandelt, bis die Veränderungen abgeklungen waren. Während dieser Zeit blieb die Futteraufnahme des Tieres ungestört.

Das Kaninchen Nr. 18 hatte sich am 12. Tag post op. die Hautfäden gezogen, so dass es zu Infektion und Eiterung aus dem proximalen Wundwinkel kam. Daraufhin wurde die Wunde mehrere Tage lang mit physiologischer Kochsalzlösung gespült bis klares Wundsekret abgesondert wurde. Danach verheilte die Wunde ohne weitere Komplikationen. Im gesamten Zeitraum blieben Allgemeinbefinden und Futteraufnahme des Tieres ungestört.

Das selbe Kaninchen gehörte auch zu einer Gruppe, die aufgrund einer Atemwegserkrankung über mehrere Tage Enrofloxacin (Baytril®) s.c. erhielt. Bei den Tieren Nr. 1, 6 und 18 konnten jeweils am Tag 13 starker Nasenausfluss, teilweise auch deutliche Atemgeräusche und Niesen festgestellt werden. Das vierte Tier (Nr. 17) aus dieser Gruppe zeigte diese Symptome erst am Tag 17 post op.. Alle betroffenen Tiere erhielten zehn Tage lang Enrofloxacin. Das Allgemeinbefinden war ungestört. Danach waren die Symptome zunächst verschwunden, traten aber vereinzelt immer wieder auf, so dass die Tiere schließlich der Gruppe mit der kurzen Nachbeobachtungszeit von 5 Wochen zugeordnet wurden.

III.1.6 *Röntgenkontrollen*

Noch in der Aufwachphase wurde von jedem Tier unter Verwendung feinzeichnender Folien (Lanex Fine, 13 x 18 cm, Fa. Kodak) eine Röntgenaufnahme der operierten Vordergliedmaße im latero-lateralen und anterior-posterioren Strahlengang angefertigt. Die gleichen Bilder wurden jeweils drei und fünf Wochen post op. erstellt. Die Tiere der 20-Wochen-Gruppe wurden zusätzlich nach 10 Wochen geröntgt, bevor dann nach Ablauf der Beobachtungszeit post mortem die letzten Bilder angefertigt wurden. Diese zeigen die Unterarmknochen der linken Vordergliedmaße mit umgebendem Weichteilmantel unmittelbar nach der Entnahme aus dem Tierkörper in latero-lateralem Strahlengang.

III.1.7 Fluorochrommarkierung

III.1.7.1 *Bezeichnung und Eigenschaften der Farbstoffe*

Fluorochrome lagern sich in neugebildetem Knochengewebe ein und ermöglichen dann sowohl die qualitative als auch quantitative Beurteilung der Knochenneubildung. Der Einsatz farblich verschiedener Fluorochrome erlaubte die zeitliche Einordnung von Umbau- und Heilungsvorgängen am Knochen (polychrome Sequenzmarkierung des Knochens).

Folgende Fluorochrome wurden verwendet :

Calcein

Alizarin complexone

Oxytetracyclin

Calcein hat die chemische Formel $C_{30}H_{26}N_2O_{13}$ und ein Molekulargewicht (M) von 622,55 g / mol. Bei der Betrachtung des histologischen Schnittes aus einem mit dieser Substanz markiertem Knochen stellen sich die Calcein-Moleküle unter ultraviolettem Licht deutlich grün dar.

Alizarin complexone hat die chemische Formel $C_{19}H_{15}NO_8 \times 2H_2O$ und ein Molekulargewicht von $M = 421,36$ g / mol. Im Knochenschnitt erscheint dieser Farbstoff unter UV-Licht tiefrot.

Oxytetracyclin ist ein antibiotischer Wirkstoff, der z. B. in der Injektionslösung Terramycin[®]-100 (Pfizer GmbH, Karlsruhe) enthalten ist. 1 ml dieser Lösung enthält 100 mg Oxytetracyclinhydrochlorid, das unter Bestrahlung mit ultraviolettem Licht im Schnitt an seiner gelben Farbe zu erkennen ist.

Die Markiersubstanzen lagern sich in der Appositionszone des Knochens ab und emittieren unter Verwendung bestimmter Filter bei UV-Bestrahlung einen charakteristischen Farbton. Allen Tieren wurden zwei der Farbstoffe jeweils zweimal im Abstand von fünf Tagen appliziert. Am 10. und 15. Tag post op. wurde Calcein subkutan unter das Nackenfell injiziert, an den Tagen 25 und 30 Alizarin complexone. Den Kaninchen mit der 20-wöchigen Nachbeobachtungszeit wurde außerdem an den Tagen 130 und 135 Oxytetracyclin s.c. verabreicht.

Prinzipiell zeichnen sich alle drei Farbstoffe durch eine gute systemische und lokale Verträglichkeit aus. Dennoch wurden Calcein und Alizarin unmittelbar vor der Applikation in einer zwei-prozentigen Natriumbikarbonatlösung aufgelöst, um ihre sauren pH-Werte zu neutralisieren. Einige Minuten vor der Applikation des Farbstoffes wurde das Injektionsgebiet mit 1,0 ml Xylocain® 1% (Astra GmbH, Wedel) lokal anästhesiert, wodurch jegliche Schmerzreaktion vermieden werden konnte.

Die Dosierungen betragen:

- 10 mg / kg KM Calcein
- 30 mg / kg KM Alizarin complexone
- 30 mg / kg KM Tetrazyklin

III.1.8 Euthanasie und Perfusion

III.1.8.1 *Prämedikation und Anästhesie zur Vorbereitung der Perfusion*

Nach 5 bzw. 20 Wochen wurden die Tiere mit 10 mg / kg KM Tiletamin-Zolazepam (Tilest®500; Pharmacia) i.m. sediert und anschließend über eine Atemmaske mit Isofluran-Sauerstoff anästhesiert. Isofluran wurde zunächst mit 2,5 bis 3,0 Vol % angeflutet, die Erhaltungsdosis lag je nach Wirkung bei 1,5 bis 2,0 Vol %. Die O₂-Flussrate betrug 1,0 bis 1,2 l / min.

III.1.8.2 *Perfusionsfixation des Knochengewebes*

Das Abdomen der Kaninchen wurde in der Linea alba vom Nabel bis zum Beckenkamm eröffnet. Nach Aufsuchen der Aorta abdominalis und der Vena cava caudalis wurden beide Gefäße von umliegendem Fettgewebe befreit. Um den kaudalen Abschnitt der Vene wurde ein Fadenriegel gelegt, der kraniale Abschnitt mit einer Gefäßklemme erfasst und zwischen beiden das Gefäß mit einem Querschnitt eröffnet. In Gegenrichtung des Blutflusses wurde ein Polyethylenkatheter (Meterware) in das Gefäß eingeführt und die Entblutung des Gefäßsystems eingeleitet. Die Ligatur um Gefäßwand und Katheter wurde angezogen, und damit der Katheter im Gefäß fixiert.

Eine weitere Ligatur wurde kaudal um den freipräparierten Abschnitt der Aorta gelegt, das Gefäß davor mit einer Klemme gefasst und die Wand quer inzidiert. In Richtung des Blutstromes wurde anschließend ebenfalls ein Katheter eingebracht, der mittels der

Fadenschlinge fixiert wurde. Über diesen Katheter wurde nun zunächst vorgewärmte RINGER-Lösung in den Körperkreislauf infundiert, bis die über den Venenkatheter abgehende Flüssigkeit nahezu farblos und somit das Gefäßsystem entsprechend blutleer war. Daraufhin wurden die Kaninchen durch intrakardiale Injektion mit 5 ml T 61[®] (Hoechst GmbH) schmerzfrei und exzitationslos getötet. Unmittelbar danach folgte die Konservierung des Knochengewebes, indem im Wasserbad auf 37 °C erwärmte KARNOVSKY-Lösung über den Katheter in die Aorta abdominalis eingeleitet wurde, bis die Muskulatur deutlich sichtbar erstarrte (Zusammensetzung bzw. Herstellungsvorschriften für die verwendeten Lösungen siehe Anhang).

III.1.9 Probengewinnung für die histologische Untersuchung

Direkt im Anschluss an die Perfusion wurde die linke Vordergliedmaße im Ellbogengelenk abgesetzt und Radius und Ulna mit umgebendem Weichteilmantel isoliert. Die Muskelimplantate wurden mit einem Muskelblock von etwa 1,5 x 1,5 x 1,0 cm Größe entnommen. Die Unterarmknochen wurden geröntgt und anschließend zusammen mit den Muskelblöcken in Schraubgefäßen mit Karnovsky-Lösung bei Kühlschranktemperatur (+4°C) gelagert.

III.1.10 Herstellung der Knochen- und Muskelschnitte sowie der Dünnschliffe

Nach ausreichender Fixation des Gewebes in der KARNOVSKY-Lösung wurde der Osteotomiebereich mit dem Ulnaimplantat mittels einer Diamantsäge quer in 1,5 mm dicke Scheiben geschnitten. Im allgemeinen wurden von jedem Präparat fünf Schnitte angefertigt (Abb.3 c). Jeder Schnitt wurde einzeln mit Gaze auf einem Plastikobjektträger fixiert. Alle Schnitte eines Tieres wurden in einem Plastikbehälter mit KARNOVSKY-Lösung und unter permanenter Kühlung der histologischen Aufarbeitung zugeführt. Diese erfolgte zusammen mit einer ersten Befundung am Ratne Institute des St. Thomas Hospital in London unter Leitung von Prof. Dr. W. Revell. Dort wurden nach dem gleichen Verfahren auch die Schnitte der Muskelimplantate hergestellt.

Zur Herstellung der Dünnschliffe aus nicht entkalktem Hartgewebe wurde die Trenn-Dünnschlifftechnik nach Donath (1987) eingesetzt.

Dazu wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, anschließend mit dem Kunststoff Technovit 7200 (Kulzer, Friedrichsdorf) infiltriert und darin eingebettet. Über mehrere Stunden erfolgte nun die Polymerisation bei Lampenlicht mit 400 bis 500 nm (Lichtpolymerisationsgerät, Fa. Exakt, Norderstedt). Die ausgehärteten Gewebelöcke wurden derart angeschliffen, dass die histologisch zu beurteilende Fläche an die Oberfläche trat. Die eigentliche Präparation der histologisch zu beurteilenden Blockoberfläche erfolgte mit dem Mikroschleifsystem (Fa. Exakt, Norderstedt). Der planparallele Gewebelöcke hatte eine glatte Oberfläche, so dass die auszuwertenden Strukturen im Anschliff sichtbar waren. Abschließend wurden mit dem Trenn-Schleifsystem (Exakt, Norderstedt) Trennschnitte hergestellt, aus denen Dünnschliffpräparate, für die fluoreszenzmikroskopische Beurteilung von 40 – 50 µm und für die histologische Untersuchung von ca. 10 µm Schnittstärke, gewonnen wurden.

III.1.10.1 Färbung der Knochenschliffe und histologische Untersuchung

Die Präparate wurden mit Toluidinblau gefärbt, wobei man sich das Phänomen der Metachromasie zu Nutzen macht, welches recht anschaulich die Beurteilung von Knochenan- und Abbau ermöglicht (Donath, 1993).

Arbeitsschritte der Toluidinblau-Färbung:

1. Dünnschliff mit Aceton-Alkohol (1:1) abwischen
2. 5 Minuten in 30% igem H₂O₂ bewegen
3. Gut unter fließendem Leitungswasser abspülen
4. 15 Minuten in Toluidinblau-Lösung einlegen
5. Abspülen unter Leitungswasser
6. Schliff trocknen und mit Aceton-Alkohol differenzieren
7. Nur kurz mit Zellstoff abwischen !
8. Eindecken

Die 10 µm dicken, gefärbten Knochenschliffe wurden lichtmikroskopisch (Axioplan II, Zeiss) beurteilt. Jeder Schliff wurde mittels einer angeschlossenen digitalen Kamera (Sony Cam 3 CCD) und der zugehörigen Software (IMIX) in einen Personal-Computer eingelesen.

Es wurden Übersichtsaufnahmen in 1,25-facher oder 2,5-facher Vergrößerung angefertigt. Danach wurden die für jedes Tier bzw. jede Gruppe spezifischen Detailaufnahmen mit bis zu 100-facher Vergrößerung in Ölimmersion hergestellt.

III.1.11 Fluoreszenzdarstellung

Für die Fluoreszenzdarstellung wurden nach dem oben beschriebenen Verfahren Knochenschliffe von 40 bis 50 µm Dicke angefertigt. Zur Beurteilung wurden ungefärbte Schliffe herangezogen.

Bei der Anregung der fluoreszierenden Strukturen kamen folgende Filter zum Einsatz:

	Wellenlängenbereich (nm)
Mehrfachanregung	400 / 495 / 570
Blauviolettanregung	395 - 440
Blauanregung	450 - 490
Grünanregung	530 - 585

Zur fotografischen Dokumentation wurde das Fotomodul AXIOPHOT II des Mikroskops AXIOPLAN II verwendet. Zunächst wurde von jedem Präparat eine Übersichtsaufnahme in 2,5-facher Vergrößerung auf lichtempfindlichen Filmen (Kodak Ektachrome Elite 400, Agfa HDC plus 400) angefertigt. Außerdem kam ein besonders lichtstarkes Objektiv mit zehnfacher Vergrößerung zum Einsatz, so dass Filme mit ISO 200 ausreichend waren (Kodak Elite Chrome 200).

III.1.11.1 Bewertungsschlüssel für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung

Fluoreszenzfarben:

Grünfluoreszenz: Diese wurde hervorgerufen durch den am zehnten und 15. Tag post op. verabreichten Farbstoff Calcein. Knochensubstanz, die in diesem Zeitraum gebildet wurde, stellt sich also grün dar.

Rotfluoreszenz: Der rote Farbstoff Alizarin complexone wurde am 20. und 25. Tag post op. injiziert. Demnach erscheint die in diesem Zeitraum neugebildete Knochenstruktur rot.

Gelbfluoreszenz: Am 130. und 135. Tag erhielten zwölf Tiere den Farbstoff Oxytetracyclin. Dieser emittiert nach Einlagerung in Knochengewebe unter UV-Licht eine deutlich gelbe Farbe.

Fluoreszenzstrukturen:

Schaumig-körnige Strukturen: Geflechtknochen besteht aus ungeordneten Kollagenfibrillen, weist also keine Lamellenstruktur auf. Lamellenknochen entsteht erst im Zuge des Remodeling. Abhängig vom Zeitpunkt seiner Entstehung wurde der Geflechtknochen mit dem entsprechenden Farbstoff angefärbt, und stellt sich grobkörnig bis schaumig dar.

Lamellenstruktur: Lamellenknochen wird durch Auflagerung von Osteoid auf vorhandene Strukturen gebildet oder entsteht im Zuge des Remodeling anstelle von Geflechtknochen. Er ist durch die typische Parallelanordnung seiner Lamellen gekennzeichnet.

Aufgrund der von uns durchgeführten doppelten Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen im Abstand von fünf Tagen stellen sich im Idealfall - abhängig von der Schnittebene des Präparates - zwei schmale, parallel zueinander verlaufende Doppellamellen dar. Bei schrägem Schnitt durch den Knochen kommt es häufig zu einer Überlagerung der Doppelbanden, so dass Einzelbanden nicht mehr zu differenzieren sind. Man erhält den Eindruck einer flächigen Färbung, die nur bei genauer Betrachtung und oftmals unter Zuhilfenahme der histologischen Schnitte von den Gebieten der Geflechtknochenbildung zu unterscheiden ist.

III.2 Ergebnisse

Aufgrund der großen Anzahl von Probanden und Daten wird hier auf die Wiedergabe der Ergebnisse jedes einzelnen Tieres verzichtet. Lediglich die in einigen Fällen stark vom Durchschnitt abweichenden Befunde werden aufgeführt. Bei Bedarf können die individuellen Werte für jedes Tier beim Promoventen eingesehen werden.

III.2.1 Zusammenfassende Darstellung von Futteraufnahme und Gewichtsentwicklung

III.2.1.1 Futteraufnahme

Noch am Abend des Operationstages nahmen alle Kaninchen Heu auf. Bereits vom nächsten Tag an zeigten vier Tiere eine absolut ungestörte Futteraufnahme (Grad 1; siehe Schlüssel Kap. III.1.5.1). Alle anderen Probanden hatten für wenigstens zwei weitere Tage einen nur mäßigen Appetit (Grad 2 bis 2-). Bei zwei Kaninchen hielt dieser Zustand fast eine Woche an, ab diesem Zeitpunkt hatten dann alle Tiere einen guten Appetit (Grad 1).

Im weiteren Verlauf konnte mangelhafte Futteraufnahme nur im Zusammenhang mit einer Erkrankung beobachtet werden. Fehlende Futteraufnahme wurde nicht registriert. Neben physiologischen Tagesschwankungen war die Futteraufnahme jedoch häufig auch im Zusammenhang mit Nestbauverhalten vermindert.

III.2.1.2 Gewichtsentwicklung

Zu Versuchsbeginn (= OP-Tag) betrug die Körpermasse aller 24 Tiere (Angaben in $\bar{x} \pm s$ = Mittelwert \pm Standardabweichung): $4,06 \pm 0,32$ kg

In den ersten sechs Tagen post op. hielten die Tiere zunächst ihr Körpergewicht oder nahmen geringfügig ab. Nach neun Tagen hatten außer drei Tieren zunächst alle zwischen 50-100 g zugenommen. Im Zeitraum 12. bis 18. Tag post op. stagnierte bei allen Tieren das Gewicht oder es war eine deutliche Abnahme (50 – 200 g) zu verzeichnen, so dass am 15. Tag die niedrigste Körpermasse post op. erreicht war.

Drei Kaninchen hatten bereits in den ersten Tagen nach der Implantation abgenommen (max. 100 g) und nahmen vom neunten Tag post op. wieder leicht zu. Nach 18 Tagen post op. nahmen alle Tiere kontinuierlich zu.

Nach fünf Wochen wogen alle 24 Tiere:

$4,06 \pm 0,36$ kg. Dies entspricht einer Zunahme von $0,01 \pm 0,22$ kg.

Körpermasse der HAPE-Tiere nach fünf Wochen:

$3,95 \pm 0,36$ kg. D.h. diese Tiere hatten durchschnittlich $0,09 \pm 0,22$ kg abgenommen.

Körpermasse der PE-Tiere nach fünf Wochen:

$4,26 \pm 0,3$ kg. Dies entspricht einer Gewichtsentwicklung von $+ 0,12 \pm 0,15$ kg.

Zwölf Kaninchen wurden über einen Zeitraum von 20 Wochen beobachtet. In dieser Zeit nahm die Körpermasse aller Tiere konstant zu und war nur gelegentlich von geringfügigen Abnahmen (max. 100 g) unterbrochen. Bei Versuchsende wogen alle zwölf Tiere der 20-Wochen-Gruppe:

$4,51 \pm 0,38$ kg. Sie hatten $0,52 \pm 0,275$ kg zugenommen.

Körpermasse der HAPE-Tiere bei Versuchsende:

$4,52 \pm 0,49$ kg. Gewichtsentwicklung: $+ 0,48 \pm 0,31$ kg.

Körpermasse der PE-Tiere bei Versuchsende:

$4,5 \pm 0,25$ kg. Sie hatten $0,55 \pm 0,24$ kg zugenommen.

Um mit Hilfe der Entwicklung der Körpermasse eine genaue Aussage über den Einfluss der verschiedenen Implantate (HAPE / PE; massiv / perforiert) auf den Heilungsverlauf machen zu können, wurden die verschiedenen Einflussfaktoren mittels einer dreifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen im Faktor „Zeit“ in Bezug zueinander gebracht. Für die Abbildungen 4 und 5 wurde das Material (M) mit PE = 1 und HAPE = 2 bezeichnet, während die Dichte (D) mit „massiv“ = 1 und „perforiert“ = 2 unterschieden wurde. So steht z.B. für die Gewichtsentwicklung der Kaninchen, welche die perforierten PE-Implantaten erhielten, die Kurve mit dem Kürzel M 1 / D 2 .

Zur statistischen Prüfung des Einflusses von

- Material und Dichte (MD)
- Zeit (Z)
- Zeit und Material (ZM)
- Zeit und Dichte (ZD)

wurde der Friedmann-Test durchgeführt. Dieser ergab:

	5-Wochen-Gruppe	20-Wochen-Gruppe
Material:	p = 0,1849	p = 0,9352
Dichte:	p = 0,0687	p = 0,0227
MD:	p = 0,6004	p = 0,6987
Zeit:	p < 0,0001	p < 0,0001
ZM:	p = 0,6990	p = 0,5709
ZD:	p = 0,3307	p = 0,8514
ZMD:	p = 0,9803	p = 0,6885

Es gelten folgende Signifikanzen :

$p \leq 0,001$: hoch signifikant

$p \leq 0,01$: signifikant

$p \leq 0,05$: schwach signifikant

$p > 0,05$: nicht signifikant

Demzufolge war in der 5-Wochen-Gruppe der Einfluss der Dichte der Implantate auf die Entwicklung der Körpermasse knapp nicht signifikant, während er in der 20-Wochen-Gruppe statistisch schwach signifikant war ($p = 0,0227$). Mit Hilfe der Abb. 4 und 5 lässt sich diese Aussage konkretisieren. Abb. 5 zeigt, dass die Kurven der perforierten Implantate (M1 / D 2; M 2 / D 2) dicht beieinander liegen und auch deutlich unter den beiden anderen Graphen verlaufen. Demnach gaben bei der Signifikanzberechnung der Dichte die Werte der perforierten Implantate den entscheidenden Ausschlag.

Erwartungsgemäß war der Einfluss der Zeit auf die Entwicklung der Körpermassen in beiden Gruppen hoch signifikant.

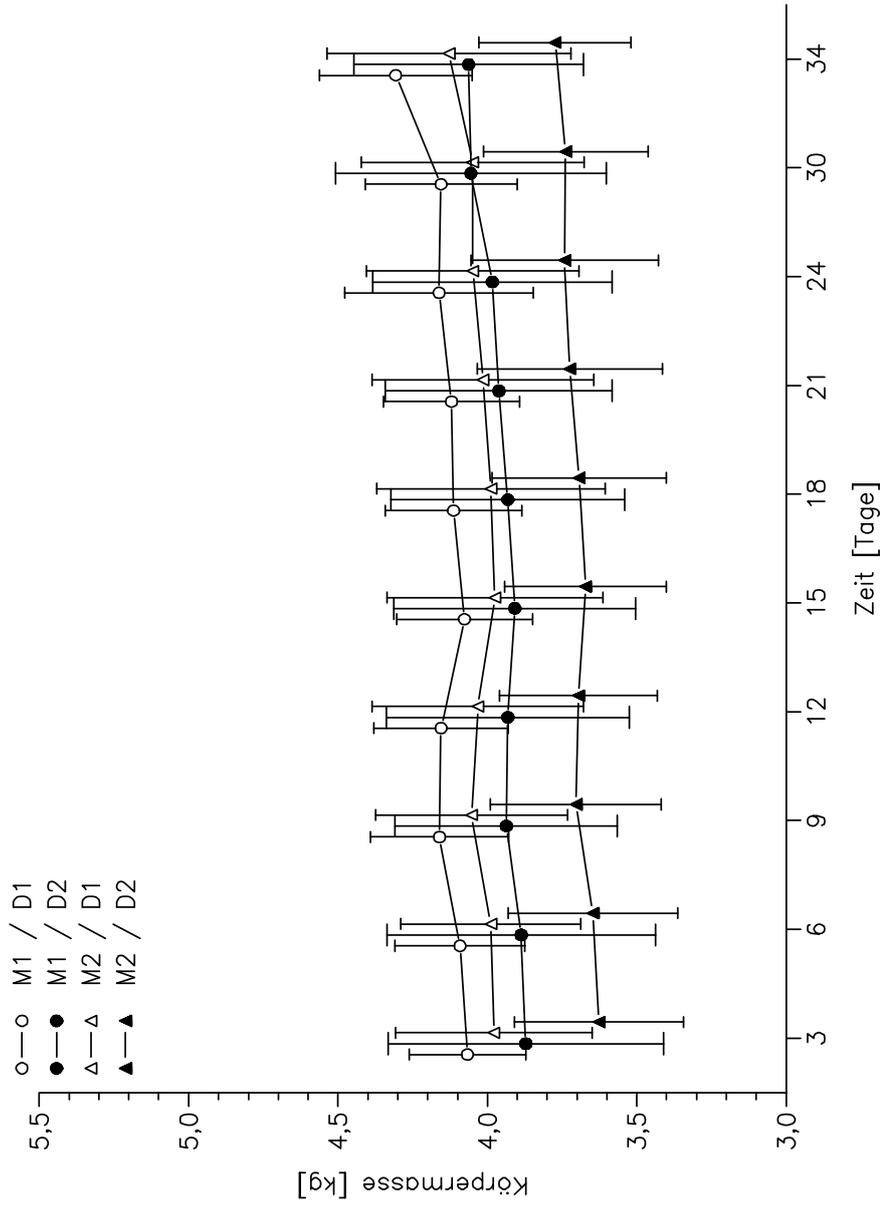


Abb.4: Entwicklung der Körpermasse über fünf Wochen (35 Tage)

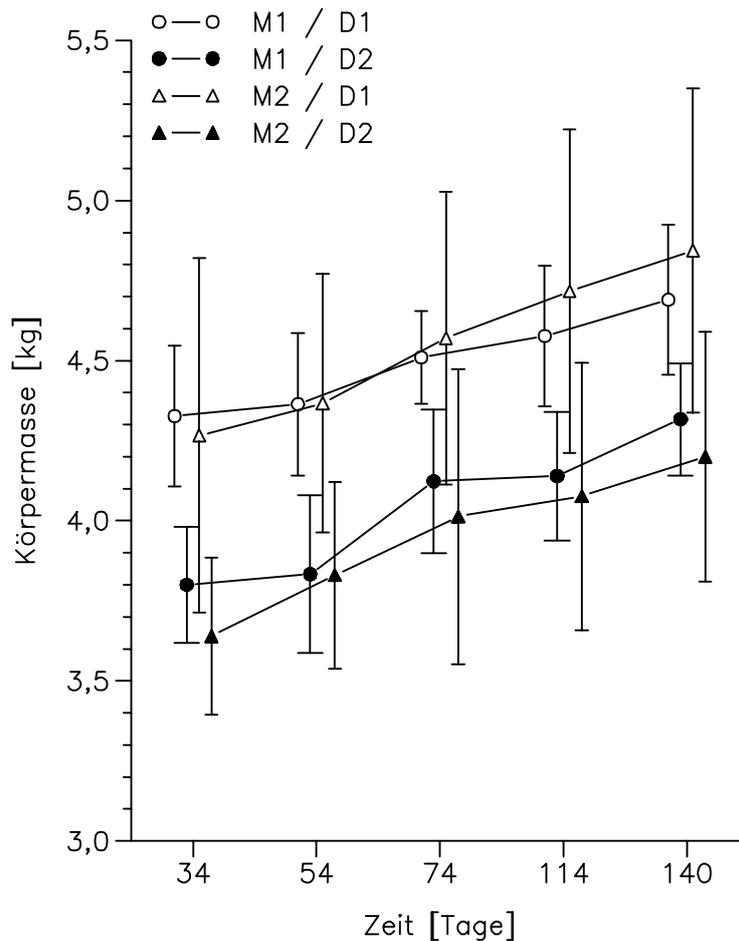


Abb. 5: Entwicklung der Körpermasse über 20 Wochen (140 Tage)

III.2.1.3 Zusammenfassende Darstellung des Gliedmaßengebrauchs post operationem

Grundlage der Bewertung einer Lahmheit der operierten Gliedmaße ist Tab. 3 in Kap. III.1.5.1.

Am Tag nach der Implantation zeigten viele Tiere eine mittelgradige Lahmheit (Grad 2) mit voller Belastung des Beines in Ruhe und häufigem Gebrauch in der Bewegung. Ebenso viele Kaninchen belasteten die Gliedmaße aber nur vereinzelt in der Bewegung und schonten auch in Ruhe häufig (Grad 2-). In der PE-Gruppe dauerte die Phase der mittel- bis hochgradigen Lahmheit durchschnittlich 13,5 Tage, während die Tiere mit HAPE-Implantaten sich bereits nach 12,5 Tagen besser bewegten.

Danach konnte in der HAPE-Gruppe über 10,5 Tage volle Belastung in Ruheposition, bei nur noch vereinzelter Schonung in Bewegung (Grad 1-) registriert werden. Bei den Tieren mit PE-Implantaten nahm diese Phase durchschnittlich 12,5 Tage in Anspruch. Etwa ab dem 25. Tag post op. konnten sich nahezu alle Tiere lahmheitsfrei bewegen. Ausnahmen stellten die Tiere Nr. 6, 9, 13 und 16 mit PE-Implantaten sowie die Kaninchen Nr. 1, 18, 21 und 23 mit HAPE-Implantaten dar.

Bei den PE-Probanden dauerte es 20 bis 27 Tage bis die mittelgradige Lahmheit der linken Gliedmaße in eine geringgradige Lahmheit überging. Lahmheitsfreie Bewegung war erst nach ca. 31 Tagen möglich. Die Tiere mit HAPE-Implantaten gingen 17 bis 22 Tage geringgradig lahm. Völlig lahmheitsfrei waren sie erst nach ca. 34 Tagen, Proband Nr. 21 sogar erst nach 44 Tagen.

Die nachfolgenden radiologischen, histologischen und fluoreszenzmikroskopischen Befunde sind jeweils zusammenfassend dargestellt. Auf die Wiedergabe der Einzeltierwerte wurde aufgrund der großen Datenmenge verzichtet. Bei Bedarf können diese aber jederzeit beim Promoventen eingesehen werden.

III.2.2 Zusammenfassende Darstellung der Röntgenbefunde

Im Folgenden werden die radiologischen Befunde eingehend beschrieben. Sie werden durch die histologischen Untersuchungen bestätigt. Auf die Abbildung der Röntgenaufnahmen haben wir verzichtet.

III.2.2.1 HAPE-Implantate / massiv und perforiert:

Röntgenbefunde unmittelbar post op.: Die HAPE-Zylinder konnten für die Tiere nur grob zugeschnitten werden, so dass sie teilweise nach lateral oder latero-palmar über das Ulnaprofil heraus ragten. In einem Fall war das Implantat fast vollständig disloziert, so dass nur noch ein Drittel des Materials Kontakt zum Lagerknochen hatte. Unmittelbar nach dem Wundverschluss war der Zylinder bei einem weiteren Kaninchen derart verrutscht, dass er schräg im Defekt zu liegen kam. Die mangelhafte Passgenauigkeit der Implantate hatte zur Folge, dass nur in einem Fall eine 100%ige Übereinstimmung der beiden Markraumanteile mit dem Zentralkanal des Implantates hergestellt werden konnte. Bei vier Tieren war dies gar nicht der Fall. Die Kontinuität der radiusnahen Kortikalis der Ulna (Restkortikalis, s. Kap. III.1.4.2) blieb in den meisten Fällen erhalten, in zwei Fällen war sie am Übergang zum distalen Teil der Ulna unterbrochen. Nur einmal wurde sie vollständig entfernt. Bei einem weiteren Tier blieb lediglich ein Knochenzapfen am proximalen Ulnaende erhalten.

Röntgenbefunde 3 Wochen post op.: Nur bei vier Kaninchen hatten die Implantate ihre Lage nicht oder nur geringfügig verändert. Bei den anderen war die Positionsveränderung deutlich zu sehen. In einem Fall war das zunächst nur nach palmar überstehende Implantat mittlerweile völlig aus dem Defekt herausgefallen. In allen Fällen waren die Osteotomiespalten durch Knochenabbau erweitert. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die meisten Kaninchen noch eine schwache Kallusproduktion auf, wobei die periostale Produktion größer war als die intramedulläre. Nur in einem Fall stellte sich der Zentralkanal des Implantates bereits röntgendichter dar. Bei fünf Tieren war der kortikale Steg zwischen den Ulnaenden gebrochen. Im Falle des proximalen Kortikaliszapfens hatte sich das distale Ulnafragment gegen den Radius verschoben. Bei einem Tier trat in der radiusnahen Kortikalis des proximalen Ulnafragmentes eine Schrägfraktur auf, die in Richtung Ellbogengelenk verlief. Bei sieben von zwölf Tieren konnten in Höhe des Ulnadefektes Verdichtungen oder Verbreiterungen der Kortikalis des Radius und Verschattungen seines Markraumes beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt wiesen vier Kaninchen eine deutliche Schwellung

des Weichgewebes im OP-Gebiet auf. Dabei handelte es sich um je zwei Tiere mit massivem und perforiertem Implantat.

Röntgenbefunde 5 Wochen post op.: Die Kallusbildung hatte sehr deutlich zugenommen, nur im Falle des schräg liegenden Zylinders war keine Kalluszunahme zu vermerken. Bei fünf Tieren stellte sich der Zentralkanal des Implantates wesentlich strahlendichter dar. Die Osteotomiespalten waren überbrückt bzw. annähernd geschlossen.

Trotz starker Kallusproduktion waren drei massive und ein perforiertes Implantat klar gegen ihre Umgebung abzugrenzen. Hingegen waren je ein perforierter und ein massiver Zylinder schon so gut eingebaut, dass beide radiologisch kaum noch von Knochengewebe zu unterscheiden waren, da auch die Grenzen zur Markhöhle diffus geworden waren. Der Markraum selbst hatte sich in beiden Fällen neu formiert, war aber noch stark verdichtet und nicht durchgängig. Die Frakturspalten der Restkortikalis waren in der Regel enger geworden oder bereits geschlossen. Bei drei Tieren konnten erst jetzt die oben beschriebenen Veränderungen am Radius beobachtet werden.

Röntgenbefunde 10 Wochen post op.: Mit Ausnahme der schräg liegenden waren alle anderen Implantate mittlerweile gut eingebaut und meist nicht mehr gegen das umliegende Gewebe abzugrenzen. Zentralkanäle und Perforationen waren häufig nicht mehr erkennbar, das Defektgebiet stellte sich einheitlich röntgendicht dar. Bei fünf Tieren waren die Defekte homogen durchbaut. Ebenso war die Markhöhle meist wieder vorhanden, aber noch verdichtet und nur in einem Fall teilweise durchgängig. Die genannten Veränderungen am Radius bestanden zum größten Teil noch.

Röntgenbefunde 20 Wochen post op.: Die Konsolidierung der Defekte war nahezu abgeschlossen. Spongiöse und kortikale Strukturen waren klar zu differenzieren, bis auf zwei Ausnahmen war die Markhöhle fast durchgängig.

Bei dem Tier mit schräg liegendem Implantat setzte erst jetzt der knöcherne Durchbau ein. Der Zylinder wurde nicht eingebaut.

III.2.2.2 PE-Implantate / massiv und perforiert:

Röntgenbefunde unmittelbar post op.: Bei fünf Tieren saß der Zylinder passgenau im Defekt. In fünf Fällen hatte sich das Implantat verlagert und stand gering- bis mittelgradig nach latero-palmar über. Bei zwei Kaninchen lag das Implantat vollständig außerhalb der Osteotomie, und hatte keinerlei Kontakt zum Lagerknochen.

Die radiusnahe Ulnakortikalis blieb bei elf Tieren erhalten. Lediglich bei je einem Tier wies sie einen Einschnitt der oszillierenden Säge auf oder war am Übergang zu den Ulnafragmenten frakturiert. In einem Fall blieben von der Restkortikalis entlang des Radius zwei Zapfen stehen, die von proximal und distal in den Defekt ragten.

Röntgenbefunde 3 Wochen post op.: Im Vergleich zur postoperativen Lage waren 75 % der Implantate disloziert. Bei einem Kaninchen war ein zunächst gut eingepasstes Implantat jetzt vollständig aus der Osteotomiestelle herausgeglitten. Die beiden außerhalb der Osteotomie liegenden Implantate hatten ihre Position nicht verändert, lediglich die Schwellung des umgebenden Weichgewebes hatte zugenommen. Ein bereits postoperativ nach distal gekippter Zylinder war in dieser Position verblieben. Eine Erweiterung der Osteotomiespalten war nur in wenigen Fällen zu sehen. Bei der Hälfte der Kaninchen war periostal wie intramedullär eine gute Kallusbildung zu verzeichnen.

Bereits zu diesem Zeitpunkt zeigten sich Unterschiede zwischen den massiven und den perforierten Implantaten. Um die PEM-Implantate war die Kallusproduktion bis auf einen Fall gut und ging von allen Bereichen der Osteotomie aus. Dagegen konnte bei den PEp-Implantaten nur zweimal gute und in vier Fällen geringe bis mäßige Kallusbildung beobachtet werden. Zwei dieser Implantate lagen von Anfang an, ein weiteres ab diesem Zeitpunkt ebenfalls vollständig außerhalb der Osteotomie.

Die radiusnahe Kortikalis war in vier Fällen frakturiert bzw. am Übergang zum proximalen oder distalen Ulnaanteil gebrochen. 75 % der Tiere dieser Gruppe zeigten deutliche Radiusveränderungen in Form von Verdichtung oder Verbreiterung der ulnanahen Kortikalis und / oder Verschattungen im Markraum.

Röntgenbefunde 5 Wochen post op.: In diesem Zeitraum hatte die Kallusproduktion bei elf von zwölf Tieren stark zugenommen. Zwischen beiden Teilen der Ulna war in den meisten Fällen eine Kallusbrücke entstanden. Der gesamte Osteotomiebereich stellte sich, wenn auch teilweise noch uneinheitlich strukturiert, strahlendichter dar. Lediglich bei dem Tier, dessen Implantat nach drei Wochen völlig disloziert war, hatte die Kallusbildung nicht zugenommen.

Die Frakturlinien der Restkortikalis waren zwar meist schon überbrückt, aber nur in einem Fall vollständig geschlossen. Bei drei Tieren mit PEm-Implantaten hatte sich die Markhöhle neu formiert, war aber noch nicht durchgängig. Die PEm-Implantate waren zu diesem Zeitpunkt bereits gut von Kallus ummantelt. Die Implantatbereiche stellten sich durchweg strahlendichter dar und zeigten nahezu homologe Struktur. Die Osteotomiespalten waren überwiegend geschlossen. Dagegen waren bei den PEp-Implantaten Kallusproduktion, Durchgängigkeit des Markraumes und Strahlendichte des Defektes sehr uneinheitlich. Nur bei einem Tier war die Entwicklung mit der bei den PEm-Implantaten zu vergleichen.

Die Veränderungen am Radius bestanden nach wie vor.

Röntgenbefunde 10 Wochen post op.: Bei allen sechs Tieren hatte die homogene Durchbauung merklich zugenommen. Auch der Markraum hatte sich bei allen neu formiert, war aber in keinem Fall vollständig durchgängig. Aufgrund der guten Lage im Defekt waren die PEm-Implantate besser eingebaut, die Osteotomien waren nahezu konsolidiert. Die Unterschiede in der Entwicklung waren nicht mehr so deutlich erkennbar.

Bei vielen Tieren konnten die Radiusveränderungen noch festgestellt werden.

Röntgenbefunde 20 Wochen post op.: Die Osteotomiestellen waren vollständig knöchern durchbaut und die Markräume in vier Fällen annähernd durchgängig. Die Konsolidierung der Defekte war abgeschlossen. Die PEm-Implantate waren besonders gut eingebaut. In einem Fall war das Implantat nicht mehr von seiner Umgebung abzugrenzen.

Bei einem Kaninchen mit PEp-Implantat hatte sich eine Pseudarthrose gebildet.

III.2.3 Zusammenfassende Darstellung der histologischen Befunde der Knochenimplantate

III.2.3.1 Histologische Befunde der Tiere mit 5-wöchiger Nachbeobachtungszeit

III.2.3.1.1 HAPE-Implantate / massiv und perforiert:

In vier von sechs Fällen ist die Lage der Implantate im Verhältnis zum Lagerknochen nicht oder nur geringfügig verändert. Bei zwei Tieren ist der Zylinder deutlich nach kaudo-lateral verlagert.

Bei allen Tieren wurde neues Knochengewebe mit einem sehr unregelmäßigen Erscheinungsbild produziert. Es nimmt seinen Ursprung vom Periost und Endost des Lagerknochens und führt vor allem lateral zu starken periostalen Auflagerungen. Auch der Raum zwischen Restulna und Implantat ist damit weitgehend überbrückt. Oft sind vom Radius ausgehend periostale Knochenauflagerungen zu finden.

Der Knochenumbau als Anpassung an die veränderte Mechanik (Modeling) hat begonnen. Die Trabekel werden vor allem von osteozytenreichem Geflechtknochen geformt, der deutlich stärker angefärbt ist als der Lagerknochen. Besonders in Implantatnähe sind bereits klare Zeichen des Knochenumbaus zu sehen. Viele Trabekel zeigen auf der einen Seite knochenabbauende Osteoklasten während auf der gegenüberliegenden Seite Osteoblastensäume aufliegen. Diese produzieren Osteoid, das in der Nähe der stationären Knochen bereits häufig eine lamelläre Streifung erkennen lässt (Abb.6). Vereinzelt sieht man auch Osteone. Auf dem Implantat selbst sind keine Osteoblastenlayer zu finden.

Bei einem Tier wird dieses neue Knochengewebe von drei breiten, knorpeligen Bahnen durchzogen, die an einer Stelle direkten Kontakt mit dem Implantat haben. Auch die übrigen Proben weisen oft einzelne Knorpelzellen oder knorpelige Areale unterschiedlicher Größe meist in unmittelbarer Nähe zum Implantat auf.

Die äußere Oberfläche des Kallusgewebes ist nicht glatt begrenzt, sondern zeigt tiefe Resorptionslakunen, in denen zum Teil mehrkernige Osteoklasten liegen. Ein osteoklastärer Abbau der Implantate ist nicht zu verzeichnen.

Aufgrund der ausgeprägten Implantatdislokation ist der Zentralkanal nur bei vier Tieren teilweise knöchern gefüllt. Bei einem Tier handelt es sich überwiegend um lamellären Knochen. Ansonsten ist anteilig Granulationsgewebe zu finden. Darin kommen vor allem Makrophagen und Lymphozyten vor. Außerdem weist das Bindegewebe zahlreiche Kapillareinsprossungen auf. Ähnliche Beobachtungen können für die Perforationskanäle

gemacht werden. Auch diese sind nur bei einem Tier weitgehend knöchern gefüllt, während in den beiden anderen Fällen von außen Bindegewebe eingewachsen ist (Abb.9).

Bei zwei Tieren ist es auch auf die Verlagerung der Zylinder zurückzuführen, dass die Implantate vollständig durch eine Schicht aus straffem Bindegewebe von heranwachsendem Knochen getrennt wurden. Nur bei einem der sechs Tiere dieser Gruppe kann in einigen Schnittebenen von einer vollständigen Osseointegration im Sinne einer Verbundosteogenese des implantierten Materials gesprochen werden. In zwei weiteren Fällen ohne Verlagerung des Implantates besteht ein überwiegend guter und direkter Kontakt zwischen neu gebildetem Knochen und implantiertem Material (Abb.8). Bei den übrigen Tieren ist dieser Kontakt nur punktuell zu beobachten, während häufiger straffes Bindegewebe als Trennschicht auftritt.

III.2.3.1.2 PE-Implantate / massiv und perforiert:

Von fünf Tieren liegen auswertbare Dünnschliffe vor. Bei allen wurde viel neues Knochengewebe gebildet, das in zwei Fällen die Implantate sogar fast vollständig umwachsen hat. Stellenweise ragt es erheblich über das Niveau der Lagerknochen hinaus.

Seinen Ursprung nimmt dieses Gewebe an der osteotomierten Ulna, häufiger sind auch am Radius periostale Knochenauflagerungen zu finden. In der Nähe zum Lagerknochen zeichnen sich die neugebildeten Trabekel oftmals durch eine lamelläre Streifung aus. Vereinzelt kann man reife Osteone sehen. Hingegen überwiegt in Implantatnähe deutlich der Anteil an Geflechtknochen, der unterschiedlich stark mineralisiert ist (Abb.7). Eine ausgeprägte lakunäre Resorption und dichte Reihen von Osteoblasten sind klare Zeichen des Knochenumbaus. Der Anteil von Knorpel im neuen Gewebe ist verschieden hoch. Die An- und Umbauvorgänge bleiben stets auf das Knochengewebe begrenzt. Das Implantat selbst ist in keinem Fall betroffen.

In der Gruppe mit den massiven Implantaten fällt zwischen den proximalen und distalen Schnittebenen der unterschiedliche Entwicklungsstand des neuen Knochens auf. Während sowohl in den proximalen Schnittebenen als auch in Implantatnähe schon deutlich die Entwicklung von Lamellenknochen zu beobachten ist, beherrscht in den distalen Abschnitten vor allem Geflechtknochen das Bild. Granulationsgewebe füllt den Zentralkanal der perforierten Implantate aus, sofern er der Auswertung zugänglich ist. Dagegen finden sich bei den massiven Zylindern auch im Zentralkanal die beschriebenen differierenden Verhältnisse zwischen proximalen und distalen Schnittebenen. Lediglich in einem Fall wurden bei der Präparation der Schliffe einige Perforationskanäle angeschnitten. Diese sind ebenfalls mit Bindegewebe gefüllt.

Nur zwischen einem massiven Implantat und dem neuen Knochen kann von häufigem, direktem Kontakt zum Fremdmaterial gesprochen werden. Nur selten ist in diesem Fall eine bindegewebige Trennschicht zu finden, wie sie in allen übrigen Fällen auftritt. Dabei handelt es sich einmal um lockeres Bindegewebe, während ansonsten straffes Gewebe die Implantate umgibt.

III.2.3.2 Histologische Befunde der Tiere mit 20-wöchiger Nachbeobachtungszeit

III.2.3.2.1 *HAPE-Implantate / massiv und perforiert:*

Nach 20 Wochen Verweildauer beherrscht kompaktes Knochengewebe das Bild. Darin ist nur noch bei einem Tier der Lagerknochen zu erkennen. Zu seiner Umgebung ist das neue Knochengewebe glatt begrenzt und auch die wenigen, massiven Trabekel in seinem Inneren haben eine überwiegend ebene Oberfläche. Von sechs Implantaten ist eines deutlich nach lateral disloziert, ein weiteres wurde nahezu vollständig von neuem Knochen umwachsen.

Das Remodeling ist fast abgeschlossen. Es dominiert Lamellenknochen. Die Havers'schen Systeme sind deutlich erkennbar (Abb.10, oben). Besonders in der Nähe zum Lagerknochen sieht man sowohl primäre als auch sekundäre Osteone sowie einige Schaltlamellen (Abb.11, oben). Auch Volkmann'sche Kanäle sind hin und wieder angeschnitten. In Implantatnähe findet sich jedoch in geringem Ausmaß Geflechtknochen mit entsprechend aktiven Osteoblasten und Osteoklasten. Bei zwei Proben kann man auch Knorpelzellen entdecken.

Der Zentralkanal ist in vier von sechs Fällen weitgehend knöchern durchwachsen. Häufig handelt es sich dabei um Geflechtknochen oder um unreifen lamellären Knochen. Dieser ist durch seine vermehrte Anfärbbarkeit gegenüber dem blassen Altknochen gekennzeichnet. Die Zahl von Osteozyten pro Flächeneinheit und die Größe ihrer perizellulären Höfe nimmt ebenfalls ab (Abb.11, oben). Bei je einem massiven und einem perforierten Implantat findet sich im Zentralkanal mehr oder weniger zellreiches Bindegewebe. Die Perforationen sind sehr unterschiedlich gefüllt, teilweise sogar innerhalb eines Zylinders. Einerseits ist eine deutliche knöcherne Füllung mit hohem lamellären Anteil zu erkennen, andererseits überwiegt Bindegewebe. Dieses stammt aus der um die perforierten Implantate häufiger vorkommenden Schicht straffen Bindegewebes, die zwischen Implantat und neuem Knochen liegt. Abschnittsweise findet sich diese auch bei einem der massiven Implantate. Bei den beiden anderen massiven Zylindern ist durchweg ein guter, direkter Knochenkontakt auszumachen. Zeichen der guten Osseointegration ist der direkte Kontakt zwischen Osteonen und Implantat (Abb. 10, Abb. 11, oben).

Im Gegensatz zu den Proben der Kurzzeitgruppen sind in den wenigen kleinen und größeren intertrabekulären Hohlräumen univakuoläre Fettzellen vorhanden (Abb.10, unten). In einigen Fällen wurde die ursprüngliche Markhöhle wieder hergestellt.

III.2.3.2.2 PE-Implantate / massiv und perforiert:

Von den sechs auszuwertenden Implantaten ist eines komplett aus dem Osteotomiespalt herausgefallen und liegt, vollständig vom Weichgewebe des Unterarmes umgeben, in einem Winkel von 90° zum Lagerknochen. Wie bei den übrigen Tieren der Gruppe wurde auch in diesem Fall neues Knochengewebe gebildet, das mit nur wenigen intertrabekulären Zwischenräumen sehr kompakt ist. Diese massiven Gebilde sind zu ihrer Umgebung meist glatt begrenzt. Es handelt sich überwiegend um Lamellenknochen, der in Form von primären und sekundären Osteonen vorliegt. In Implantatnähe nimmt jedoch der Anteil an Geflechtknochen deutlich zu, es sind noch einige Osteoblastenverbände sowie Osteoklasten und Howship`sche Lakunen zu finden.

Nur bei der Hälfte der Tiere ist der Zentralkanal knöchern durchwachsen, wobei der eingewachsene Knochen in zwei Fällen direkte Verbindung mit dem Implantat hat. Andernfalls liegt - wie bei allen anderen Tieren dieser Gruppe - Bindegewebe dazwischen (Abb.11, unten).

Lediglich in einem Fall sind Perforationskanäle der Beurteilung zugänglich. Diese sind ebenfalls bindegewebig gefüllt. Zwei der perforierten Zylinder haben überhaupt keinen Kontakt zu dem neuen Knochen. Einer liegt in einer Bindegewebskapsel. Desweiteren hat einer der massiven Zylinder auf größeren Flächen guten Kontakt zu neuem Knochengewebe, während alle übrigen Implantate durch eine Bindegewebsschicht unterschiedlicher Ausprägung von neuem Knochen getrennt sind (Abb.11, unten). In den wenigen entstandenen Hohlräumen ist Fettmark zu erkennen.

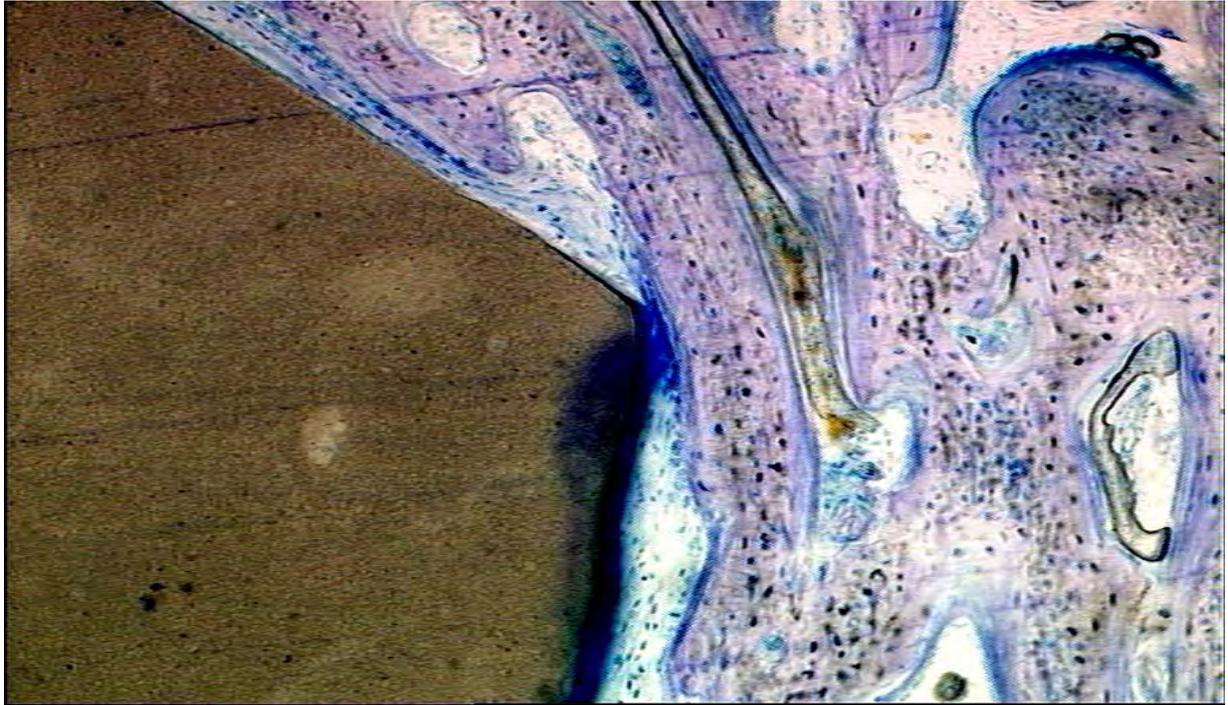


Abb. 6: 5 Wochen Implantationszeit

Neu gebildetes Knochengewebe steht partiell in Kontakt zu einem HAPE-Implantat. Es handelt sich hauptsächlich um reifen Geflechtknochen, der teilweise bereits eine lamelläre Ordnung erkennen lässt.

(Knochendünnschliff, Toluidinblau-Färbung; Tier Nr. 8, 10-fach vergrößert)

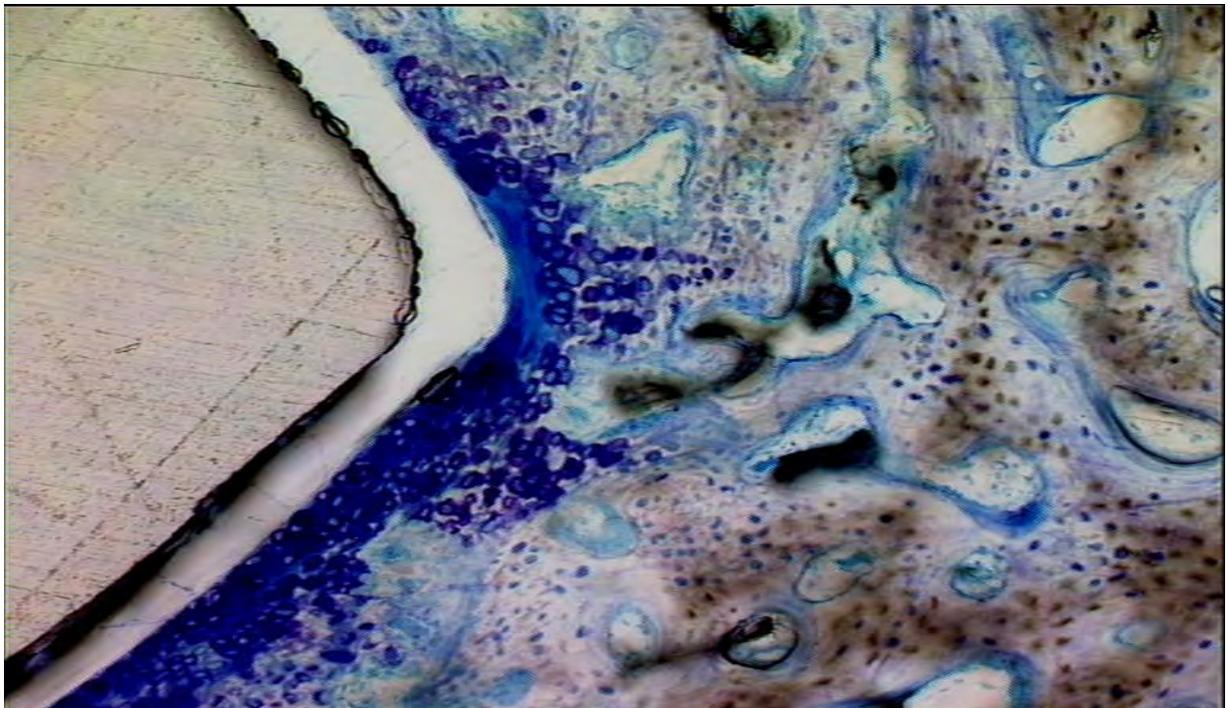


Abb. 7: 5 Wochen Implantationszeit

Der Geflechtknochen, der in der Nähe zu einem PE-Implantat auftritt, ist vergleichsweise unstrukturiert und jünger. Im Interface sind deutlich knorpelige Reste vorhanden. Aktive Osteoblasten sind an ihrer bläulichen Färbung zu erkennen.

(Knochendünnschliff, Toluidinblau-Färbung; Tier Nr. 13, 10-fach vergrößert)

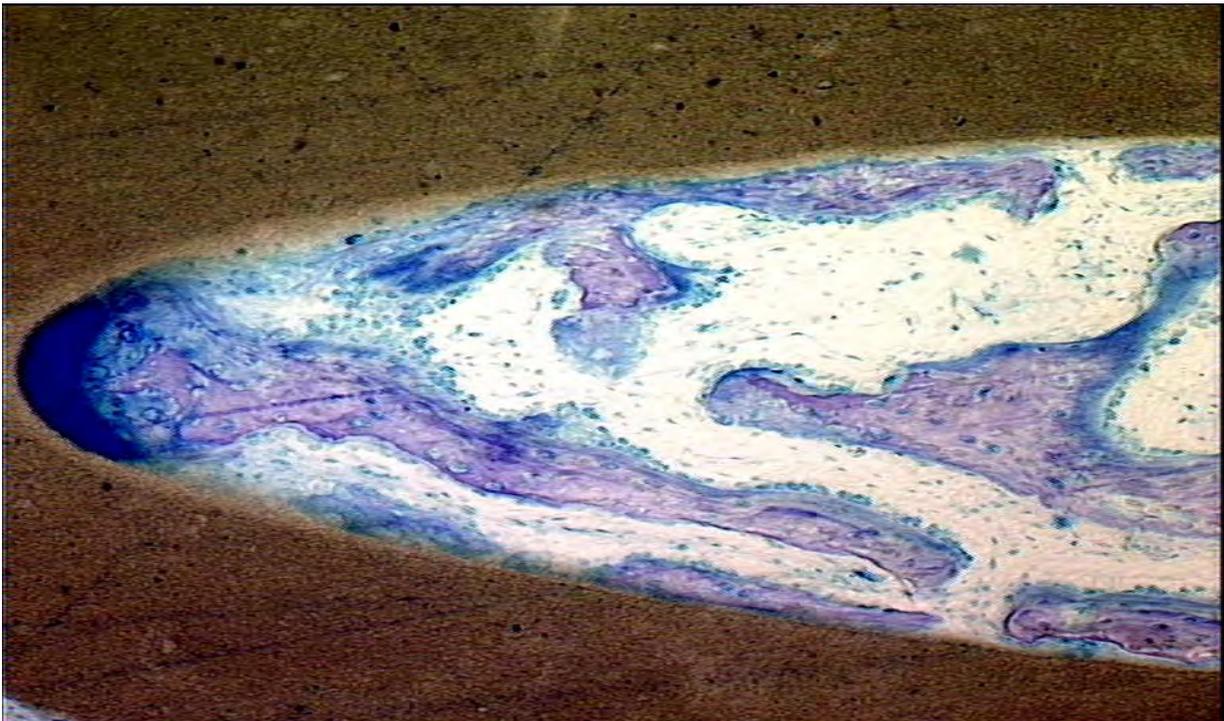
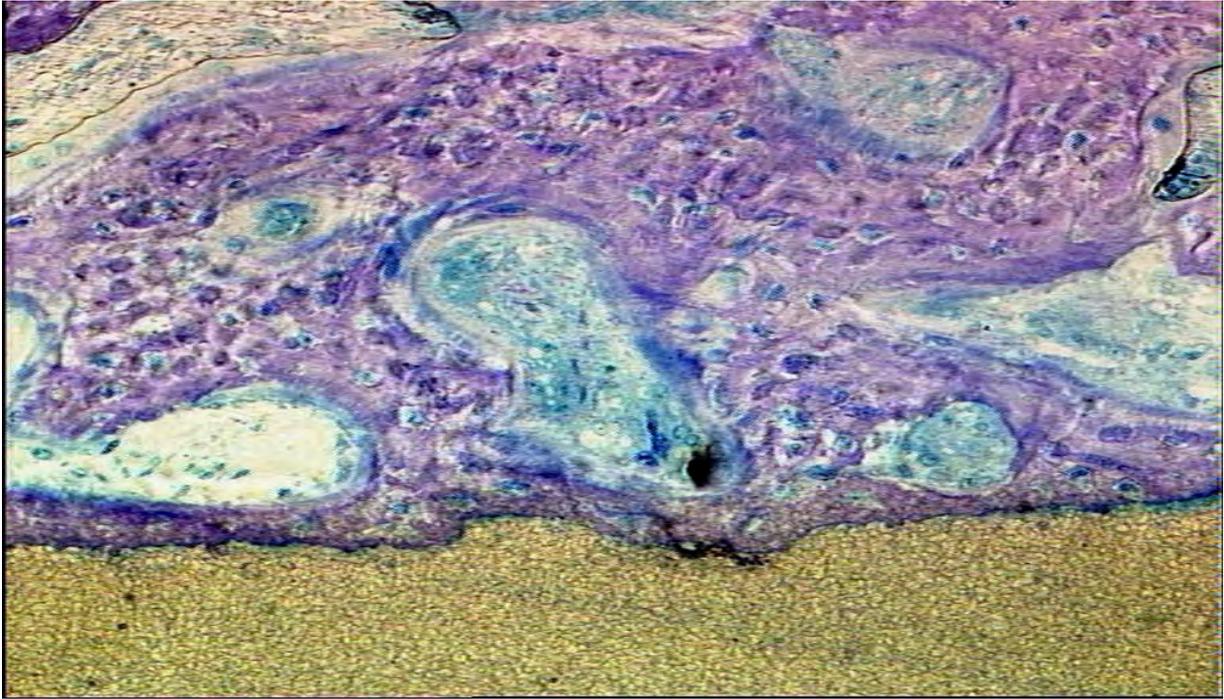


Abb. 8: 5 Wochen Implantationszeit / HAPE-Zylinder
Sowohl an der äußeren (oben) als auch an der inneren Oberfläche (unten, längsgeschnittener Perforationskanal) geht das neugebildete Knochengewebe häufig eine direkte Verbindung mit dem Implantat ein.
(Knochendünnschliffe, Toluidinblau-Färbung; Tier Nr. 8, oben 20-fach, unten 10-fach vergrößert)

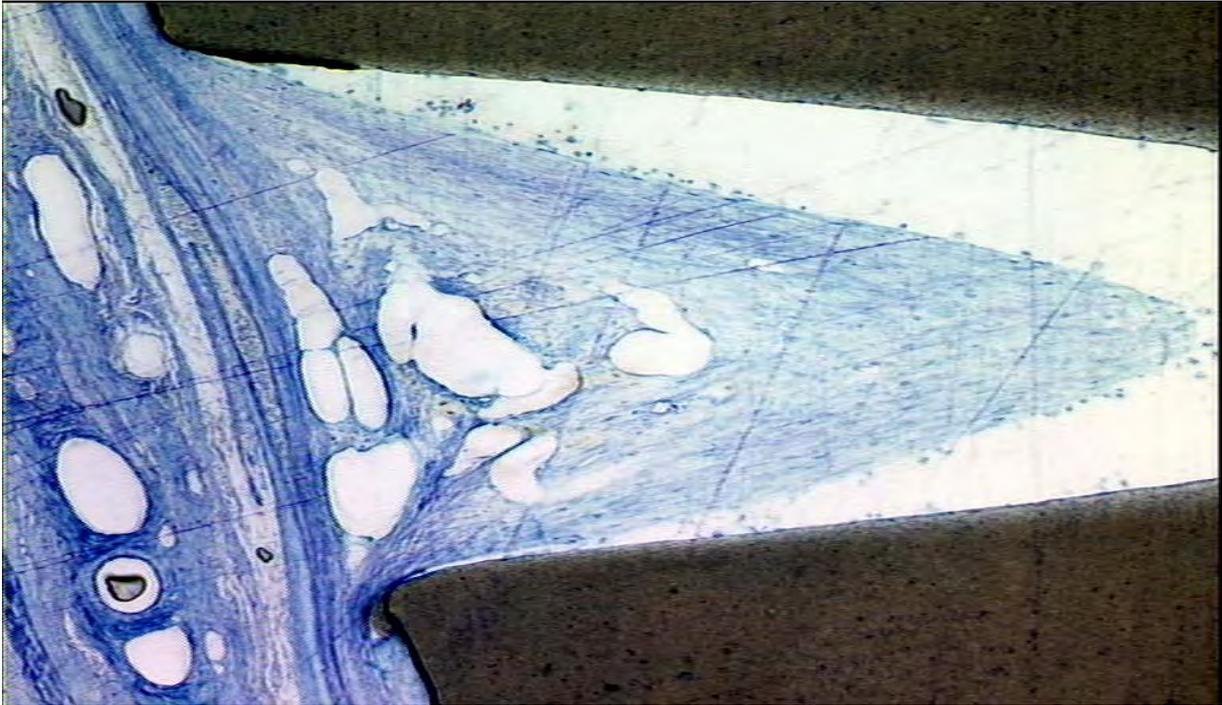


Abb. 9: 5 Wochen Implantationszeit

Besonders in Bereichen erhöhter Beweglichkeit des Implantates wächst oftmals ausschließlich Bindegewebe durch die Perforationen in die HAPE-Implantate ein.
(Knochendünnschliff, Toluidinblau-Färbung; Tier Nr. 12, 10-fach vergrößert)

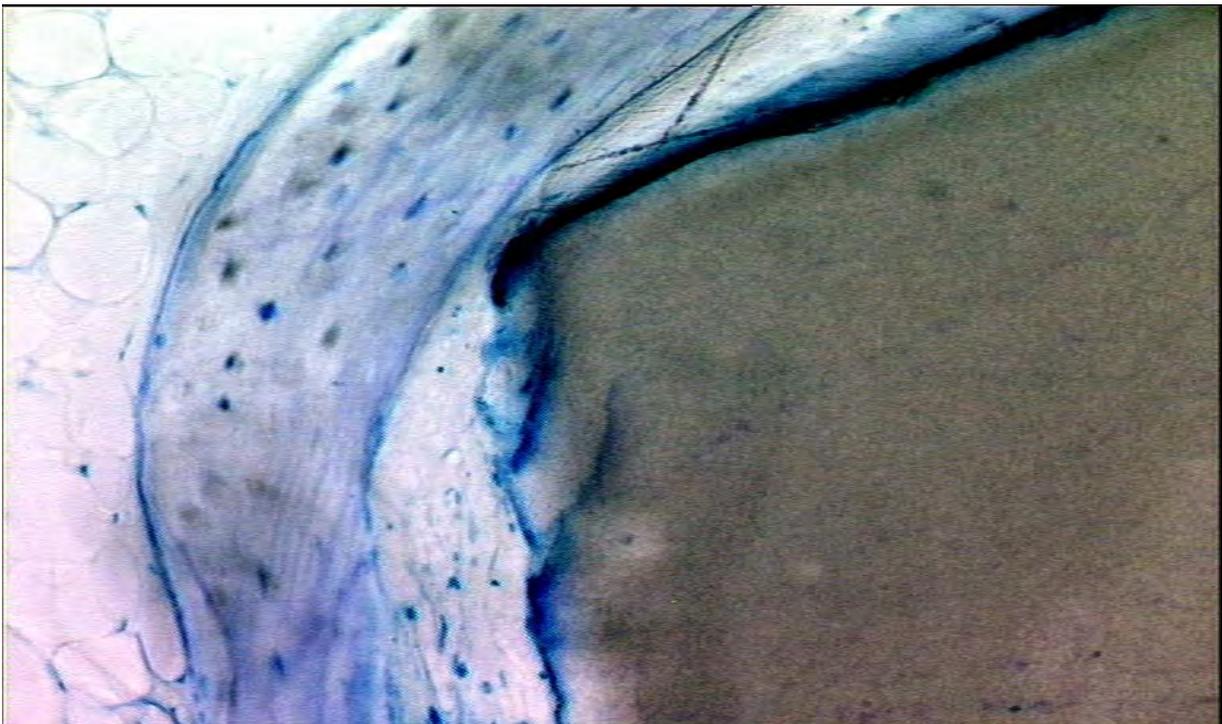
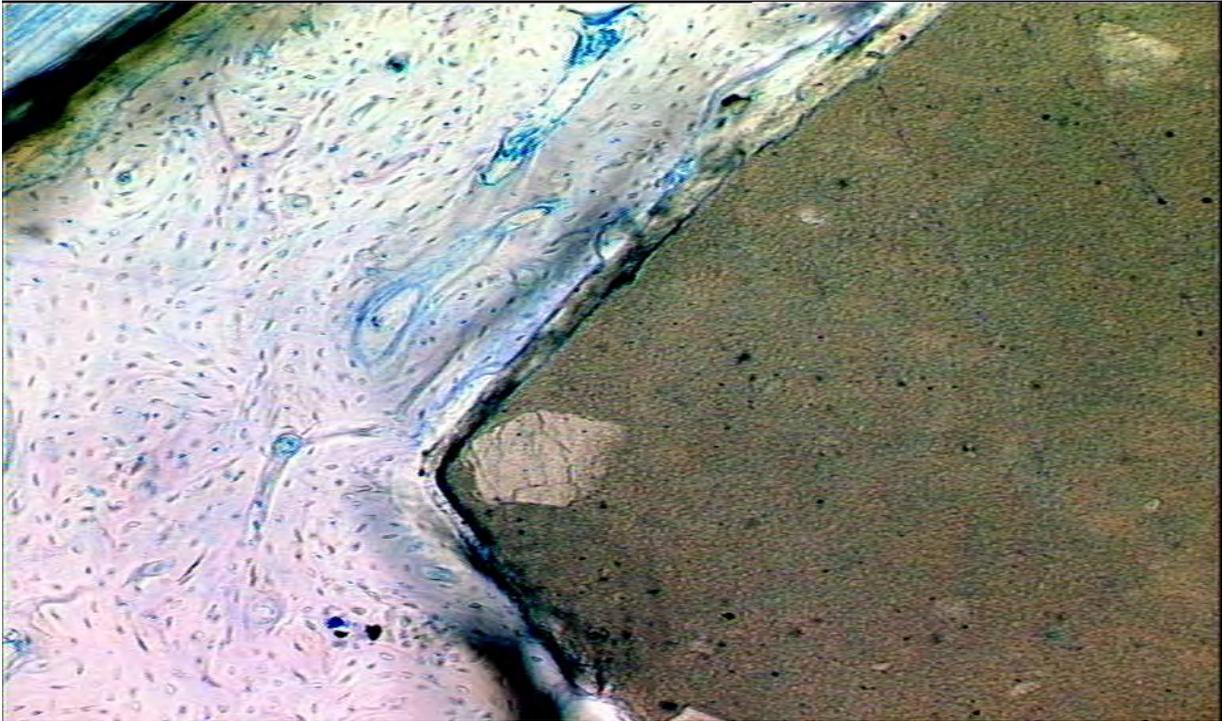


Abb. 10: 20 Wochen Implantationszeit / HAPE-Implantat
Lamellenknochen steht in unmittelbarem Kontakt zum Implantat. Auch das Fettmark hat sich regeneriert.
(Knochendünnschliffe, Toluidinblau-Färbung; oben Tier Nr. 21, 10-fach vergrößert, unten Tier Nr. 4, 20-fach vergrößert)

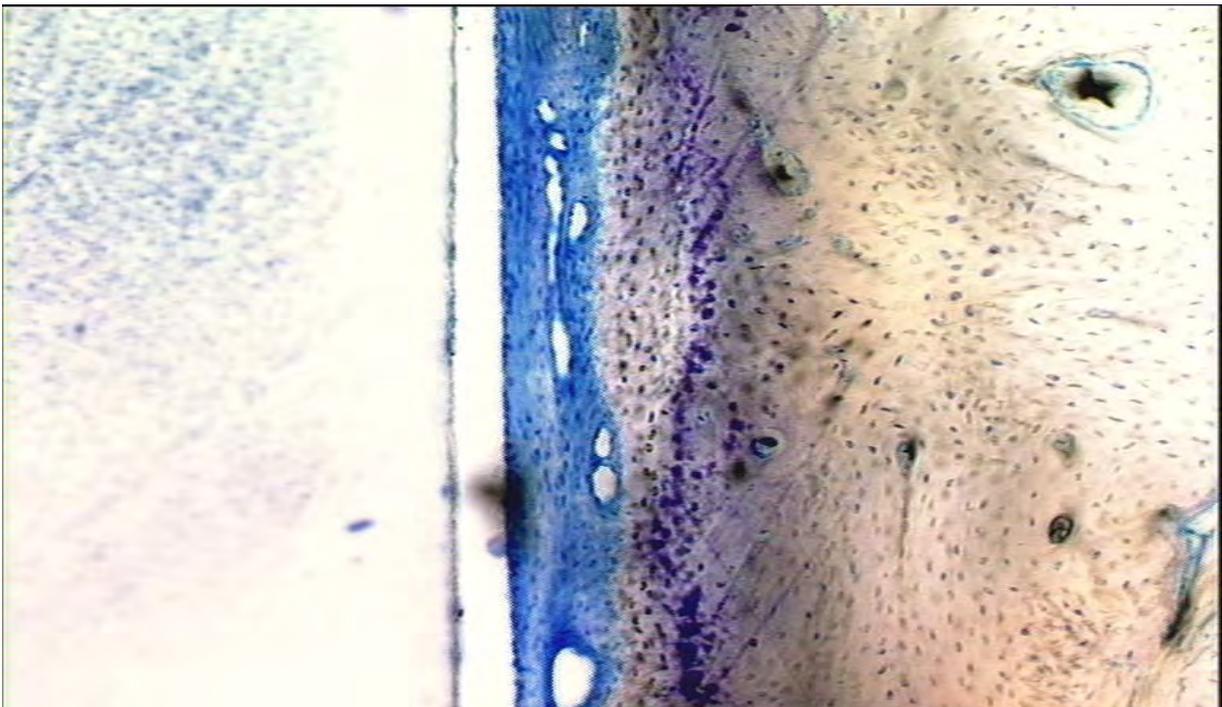
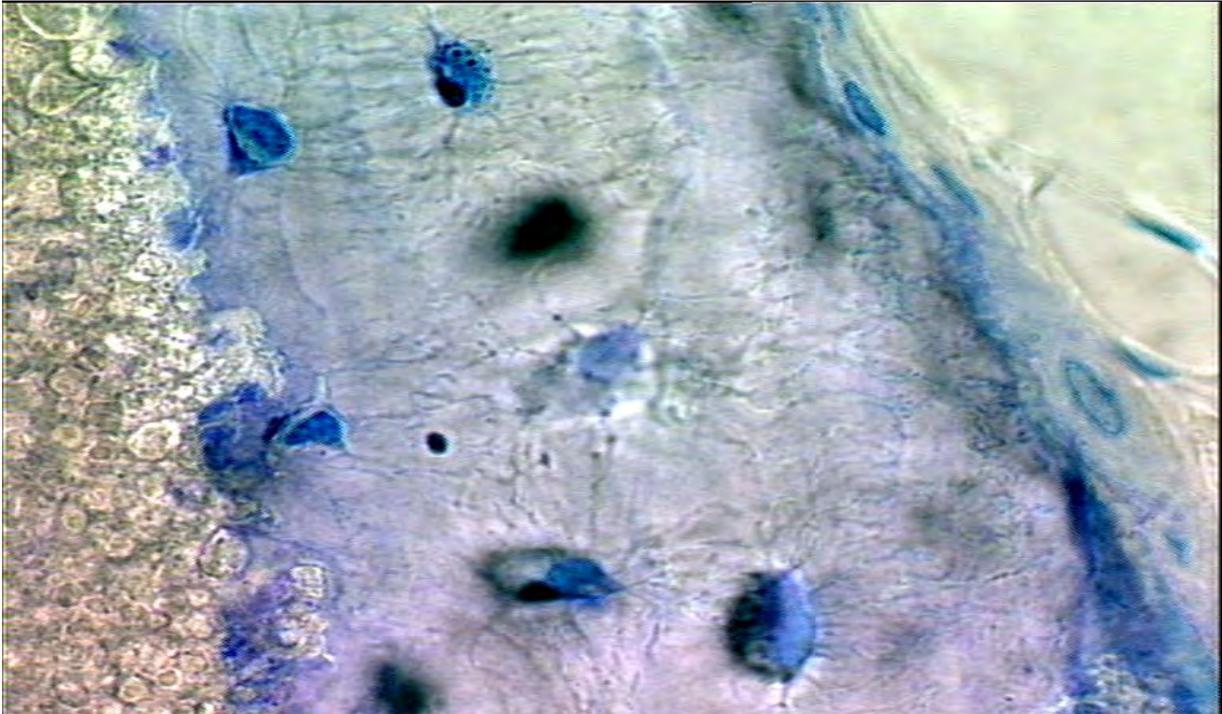


Abb. 11: 20 Wochen Implantationszeit

Während sich in unmittelbarer Nähe des HAPE-Implantates vitale Osteozyten zeigen (oben), ist im Interface zum PE-Implantat eine bindegewebige Trennschicht deutlich zu erkennen (unten). An der Grenzfläche der HAPE-Implantate sind HA-Kristalle deutlich erkennbar (oben).

(Knochendünnschliffe, Toluidinblau-Färbung; oben Tier Nr. 21, 40-fach vergrößert, unten Tier Nr. 2, 10-fach vergrößert)

III.2.4 Darstellung der histologischen Befunde der Muskelimplantate

III.2.4.1 Histologische Befunde der Tiere mit 5-wöchiger Nachbeobachtungszeit

III.2.4.1.1 HAPE-Implantate / massiv und perforiert :

Von den sechs Implantaten in dieser Gruppe wurden vier längs geschnitten. Die beiden anderen wurden quer getroffen, so dass sie sich als schmale Rechtecke darstellen. Jeweils drei Implantate kamen innerhalb eines Muskelbauches zu liegen, die drei anderen liegen zwischen zwei Muskelbäuchen im Perimysium.

Bei allen Präparaten dieser Gruppe schliesst sich an die regelrechte quergestreifte Muskulatur eine Bindegewebsschicht an, in der das Verhältnis Fasern : Zellen (Fibrozyten) zugunsten der Kollagenfasern ausfällt. Diese Schicht bildet meist sechs bis acht Lagen und ist bei den massiven und perforierten Implantaten annähernd gleich stark (Abb.12).

Die durch die Implantation verdrängten Muskelfasern umgeben den Fremdkörper „stromlinienförmig“, indem sie sich seinen Konturen anpassen und ihn auf kürzestem Wege umgehen. An den kurzen Seiten entstehen im sog. „Implantatschatten“ muskelfaserfreie Zonen, die mit lockerem, zellreichem Bindegewebe und kleineren Mengen Fettgewebe gefüllt sind (Abb.13). Gelegentlich finden sich hier einige Kapillareinsprossungen. In diesen Bereichen ist besonders gut zu sehen, dass viele Zellen und Bindegewebsfasern direkt am Implantat „inserteren“. An den langen Seiten besteht die Trennschicht zum implantierten Material aus straffem, parallelfaserigem Bindegewebe, das die bereits erwähnten Lagen bildet und über den Kanten der Implantate die geringste Stärke aufweist.

Auf die bindegewebige Schicht folgt zum Implantat hin eine einlagige Schicht aus großen Zellen mit kräftig gefärbten Kernen und ausgedehntem Zytoplasma (Abb.16, oben). Es handelt sich um Makrophagen, die in einigen Fällen in Gruppen zusammen liegen. Die Implantatoberfläche ist nicht ganz glatt, sondern erscheint ein wenig unscharf.

Die angeschnittenen Perforationen sind durchweg mit bindegewebigen Zapfen aus lockerem, zellreichem Gewebe gefüllt (Abb.12; 14). Diese Zapfen liegen der Wand der Kanäle in der Regel nicht an. Lediglich in zwei Perforationen eines Implantates haben sich mehrere Fibroblasten aus dem lockeren Gefüge gelöst und haften der Wand an. Nur vereinzelt finden sich in der periimplantären Gewebereaktion rundzellige Infiltrate wie Lympho- und Monozyten. In unmittelbarer Nähe der hin und wieder sichtbaren Reste des nicht resorbierbaren Fadenmaterials zeigen sich vereinzelt mehrkernige Riesenzellen.

III.2.4.1.2 PE-Implantate / massiv und perforiert:

Bei den insgesamt fünf auswertbaren, in das Weichgewebe implantierten Proben war in zwei Fällen die Auswertung erschwert, weil die Implantate im Zuge der Aufbereitung für die histologische Untersuchung nahezu ohne ihr umgebendes Weichgewebe erfasst worden waren. Vier Scheiben lagen jeweils innerhalb eines Muskelbauches. Drei Schnitte zeigen etwa die Hälfte der implantierten Scheibe, einmal ist diese sogar vollständig erhalten geblieben, jedoch fehlt hier ein Teil der Muskulatur. Ein weiteres Implantat wurde quer getroffen und stellt sich als Rechteck dar.

Auch in dieser Gruppe schliesst sich an die Skelettmuskulatur eine bindegewebige Zone an, die aber im Fall der massiven PE-Scheiben eine noch geringere Anzahl Fibrozyten aufweist als die Reaktionszone um die HAPE-Scheiben. Insgesamt erscheint auch die Anzahl der Zell-Lagen in dieser Gruppe geringer.

Die Ausprägung des epiimplantären Makrophagensaums ist bei den massiven PE-Implantaten nicht so deutlich. Hingegen ist bei zwei perforierten Scheiben das „Fasern : Zellen-Verhältnis“ eindeutig zugunsten der Zellen verschoben. Dabei handelt es sich größtenteils um Makrophagen, die jedoch mehr als eine Lage bilden. An manchen Stellen ist die Grenzschicht zum Implantat derart verdichtet und stark gefärbt, dass sich einzelne Zellen nicht differenzieren lassen. Es sind keine Leukozyteninfiltrate auszumachen.

Anhand des einen quer geschnittenen Implantates lässt sich der bereits für die HAPE-Implantate beschriebene „Implantatschatten“ mit der Bildung von muskelfaserfreien Bereichen beobachten (Abb.13). Auch bei den PE-Scheiben ist gelegentlich eine direkte Insertion von Bindegewebsfasern auf der Implantatoberfläche auszumachen. Häufiger aber sind Fibrozyten in Ansammlungen oder einzeln zu sehen, die sich aus dem Verbund gelöst haben und der Implantatoberfläche nun direkt anhaften. Der bindegewebige Saum liegt in diesen Fällen in einiger Entfernung zum Implantat.

Die Perforationen sind mit lockerem Bindegewebe gefüllt, wobei auch in dieser Gruppe kein flächiger Kontakt zwischen Wand und Füllung zu sehen ist (Abb.15). Wiederum kann man nur einige wenige Zellen, überwiegend Fibroblasten, erkennen, die sich aus dem Verband gelöst haben und jetzt der Wand anhaften.

Bei drei glatten sowie einem perforierten Implantat ist ein Spaltraum zum angrenzenden Weichgewebe zu erkennen. Da das Weichgewebe sich den Konturen des Implantates anpasst, ist dieser Spalt vermutlich während der Präparation entstanden.

III.2.4.2 Histologische Befunde der Tiere mit 20-wöchiger Nachbeobachtungszeit

III.2.4.2.1 HAPE-Implantate / massiv und perforiert:

Infolge der Dreidimensionalität der für die Histologie eingebetteten Muskelimplantate ergeben sich zwangsläufig Schnitte, deren Dimensionen von einer schmalen, halbmondförmigen Sichel bis zu der in einem Fall fast vollständig erhaltenen Scheibe reichen. Bei drei Tieren liegt der Testkörper genau innerhalb eines Muskelbauches, in einem anderen Fall zwischen zwei Muskeln. Die Lagebeurteilung bei den beiden übrigen Präparaten ist nicht eindeutig zu klären, da die Implantate abgelöst von ihrem umgebenden Weichgewebe vorliegen.

Die in der Kurzzeitgruppe mehrfach beobachtete Reaktion der Muskelfasern auf ihre Verdrängung durch das Implantat („Implantatschatten“), ist nach 20 Wochen nicht mehr so deutlich zu sehen. Mittlerweile liegen nahezu alle Implantate in einer stark aufgelockerten Gewebezone. Dabei bleibt Fettgewebe nicht mehr auf den „Windschatten“ der Testkörper beschränkt, sondern umgibt diese fast allseitig. Häufig schliesst sich das Fettgewebe mit seinen gefäßreichen Septen direkt an die Skelettmuskulatur an (Abb.13; Abb.16, unten).

Dem Implantat selbst liegt ein konsolidiertes und überwiegend zellarmes Narbengewebe aus vier bis maximal sechs Zell-Lagen auf. Wenn der Faseranteil lokal überwiegt, dann vermittelt das straffe und parallelfaserige Bindegewebe den Eindruck einer bandförmigen Kapsel. Nach wie vor ist die direkte Adhäsion von Fasern und Zellen auf der Implantatoberfläche zu erkennen (Abb.16, unten).

Es kommt vor, dass die Fettgewebeschicht fehlt, und die Muskulatur direkt an die dünne, kapselartige Schicht grenzt. An anderer Stelle ist das Gefüge etwas lockerer und der Zellgehalt geringgradig höher. Hier findet man dann nicht nur die Kerne einiger Fibrozyten, sondern auch Makrophagen. Viele dieser Zellen sind aber nicht mehr durch ihren stark gefärbten Zellkern in einem annähernd farblosen, ausgedehnten Zytoplasma charakterisiert. Stattdessen weist ihr Zytoplasma oft eine deutliche Körnung auf. Außerdem treten sie nicht mehr flächig oder in einer Schicht auf, sondern kommen nur noch gelegentlich und in Gruppen vor. Die Oberfläche der Implantate ist nicht glatt konturiert. In einigen wenigen Präparaten kann man kleine Körnchen finden, die aus dem Verbund des Implantates herausgelöst sind und frei im angrenzenden Gewebe liegen (vgl. Abb.11, Knochenimplantate).

Alle angeschnittenen Perforationskanäle sind mit lockerem Bindegewebe gefüllt, das Kontakt zur Kanalwand hat. Die Dicke dieses Gewebes ist unterschiedlich (Abb.14). Stets enthält das Zentrum der bindegewebigen Füllung Fettgewebe (Abb.15). Ein Kanal ist fast vollständig mit

Fettzellen gefüllt. In den Perforationen zeigen die Makrophagen überwiegend das Bild mononukleärer Zellen mit stark gefärbtem Kern in weitem Zytoplasma. Die innere Oberfläche in den Perforationen scheint weniger aufgelockert zu sein als die äußere Oberfläche einiger Implantate.

III.2.4.2.2 PE-Implantate / massiv und perforiert:

Von fünf auswertbaren Präparaten sind vier Scheiben ihrer Länge nach geschnitten worden, eine ist quer getroffen und präsentiert sich als schmales Rechteck.

Wie bereits für die HAPE-Implantate der Langzeitgruppe beschrieben, ist auch hier das Bild der stromlinienförmig um die Testkörper laufenden Muskelfasern nicht mehr so deutlich ausgeprägt. Die Reaktionszone ist insgesamt stark aufgelockert; Fettgewebe nimmt darin einen großen Teil des Raumes ein. Dieses verbindet häufig die Skelettmuskulatur und das faserreiche, straffe Bindegewebe, das die Scheiben wie eine Kapsel umgibt (Abb.13). Diese Schicht hat zwischen vier und sechs Zell-Lagen. Das direkte Anheften von Zellen oder Fasern an der Oberfläche des Implantates ist zu erkennen.

Allerdings kommt es auch vor, dass zwischen dem kapselartig organisierten Bindegewebe und dem Implantat ein Spalt liegt. Dieser scheint aber in den meisten Fällen ein präparationsbedingtes Artefakt zu sein. Gelegentlich fehlt in dieser Gruppe ebenfalls die Fettgewebeschicht, so dass ein direkter Kontakt zwischen Muskulatur und Kapsel besteht.

Die vereinzelt und meist in Gruppen an der Grenzschicht zum Implantat auftretenden, einkernigen Makrophagen haben den typisch gefärbten Kern, der von fast farblosen Zytoplasma umgeben ist. Im Übrigen finden sich rund um die Implantate wenig Zellen.

Im Gegensatz dazu stehen die Perforationskanäle und ihre Füllung. Auch hier kann man die im Zentrum liegende Fettgewebsschicht entdecken, die von einer mehr oder weniger dicken Schicht faserreichen Bindegewebes umgeben ist. Den Kontakt zur Wand des Kanals stellt aber eine Schicht mit hohem Zellgehalt her (Abb.15). Sowohl die äußere Oberfläche der Implantate als auch die Wände der Kanäle sind glatt konturiert.

Wiederum ist bei zwei glatten und einer perforierten Scheibe ein präparationsbedingtes Artefakt erkennbar. Das Weichgewebe wurde dabei vom Implantat abgelöst, ein Spalt ist entstanden. Im abgelösten Gewebe sind die Konturen der Probe deutlich sichtbar.

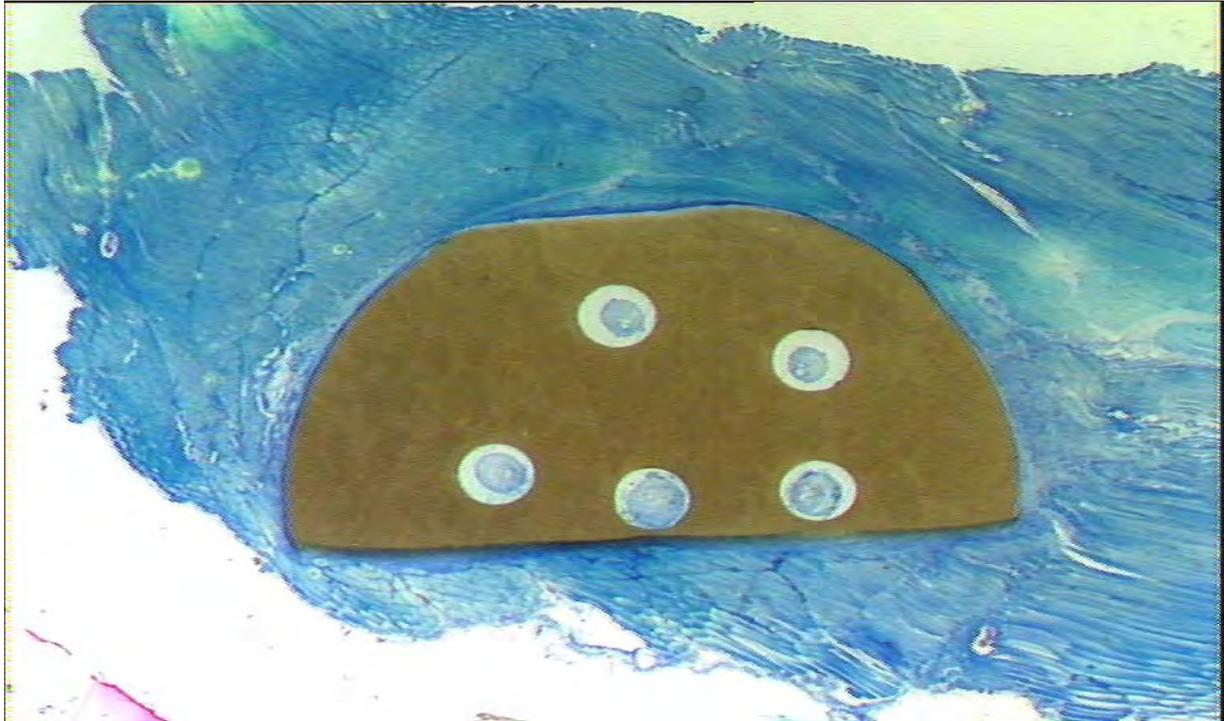


Abb. 12: 5 Wochen Implantationszeit / Perforiertes HAPE-Implantat im Muskel:
Das Implantat wird weitgehend reaktionslos integriert, in die Poren ist Bindegewebe eingewachsen. Anzeichen einer Entzündung sind nicht zu finden.
(Muskeldünnschliff, Toluidinblau-Färbung; Tier Nr. 14, 1,25-fach vergrößert)



Abb. 13: 20 Wochen Implantationszeit / Teilansicht eines PE-Implantates im Muskel:
Die Ausbildung einer kapselartigen Struktur um das Implantat ist zu erkennen.
(Muskeldünnschliff, Toluidinblau-Färbung; Tier Nr. 5, 2,5-fach vergrößert)

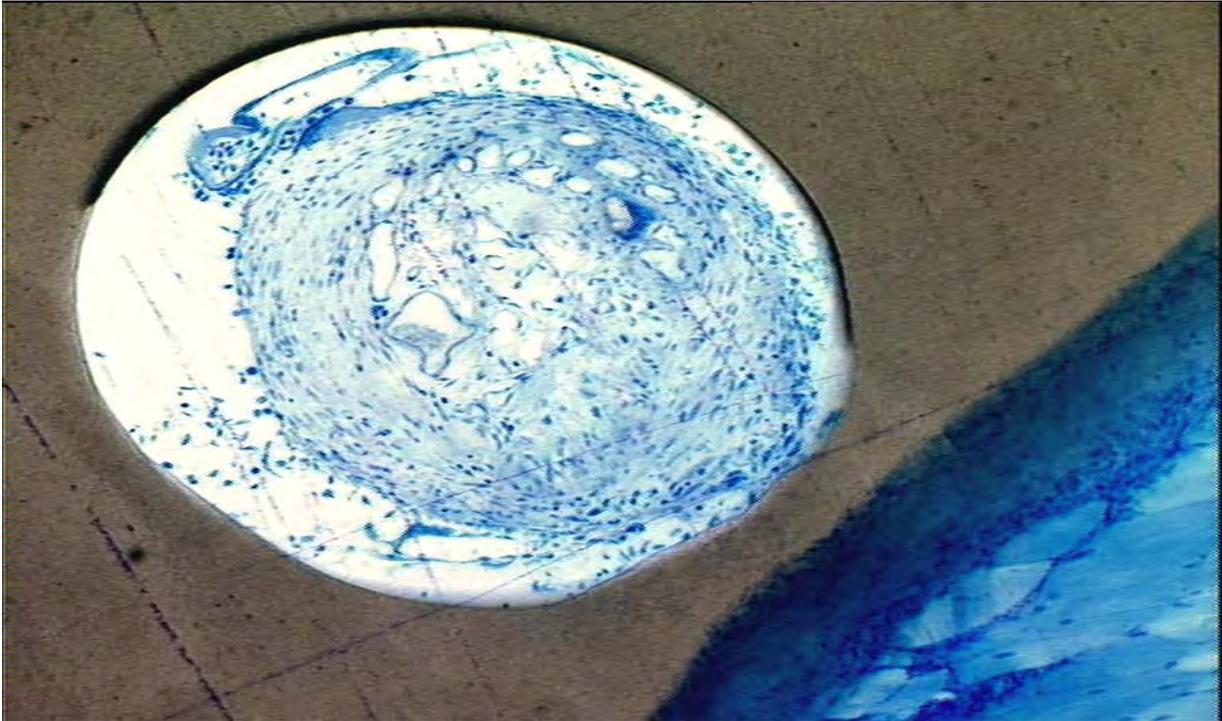


Abb. 14: 5 Wochen Implantationszeit / Perforiertes HAPE-Implantat im Muskel:
 Zellreiches Bindegewebe ist in die Poren eingewachsen, im epiimplantären Grenzbereich
 finden sich vor allem Makrophagen. Anzeichen einer Mineralisation sind nicht zu erkennen.
 (Muskeldünnschliff, Toluidinblau-Färbung; Tier Nr. 14, 10-fach vergrößert)

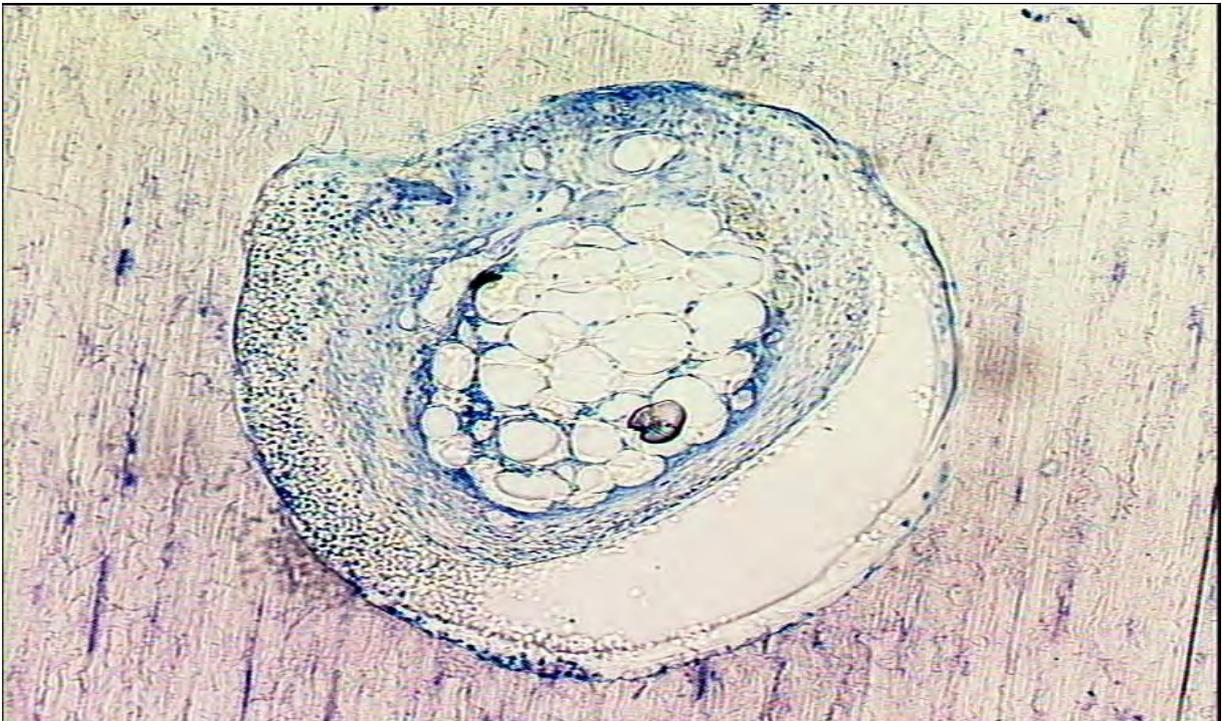


Abb. 15: 20 Wochen Implantationszeit / Perforiertes PE-Implantat im Muskel:
 Die Zahl der Zellen hat sich etwas reduziert, Fettgewebe wurde eingelagert.
 (Muskeldünnschliff, Toluidinblau-Färbung; Tier Nr. 9, 10-fach vergrößert)

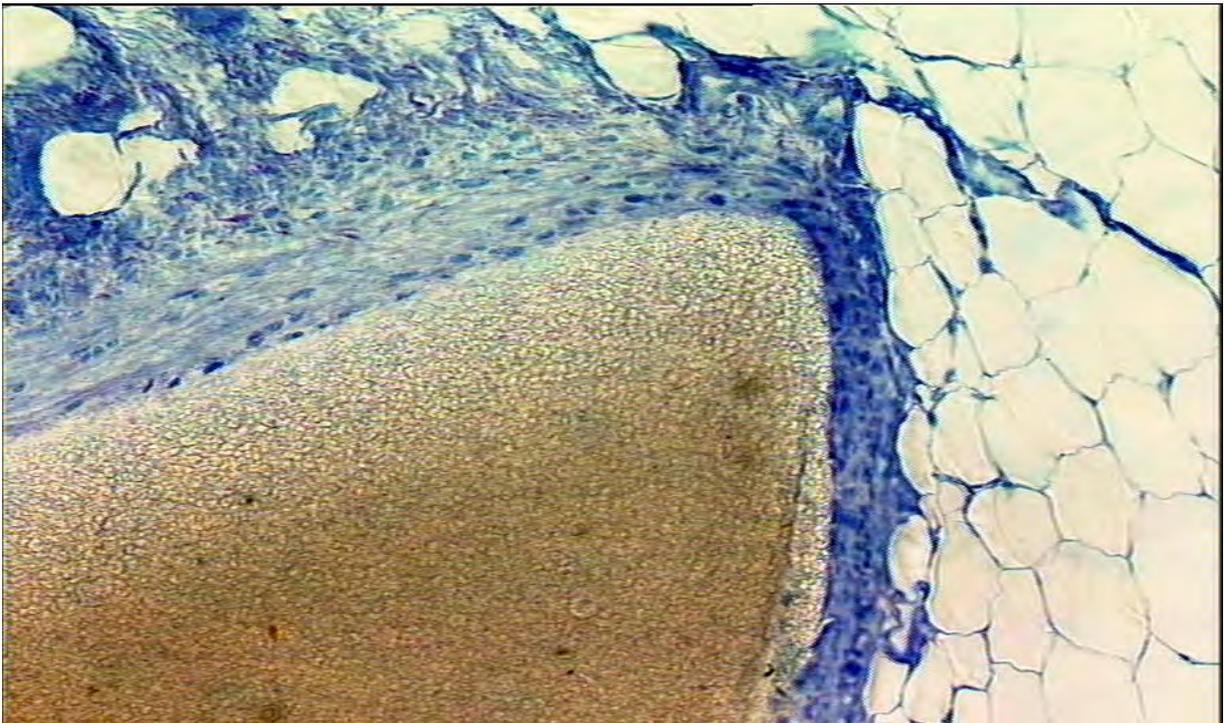
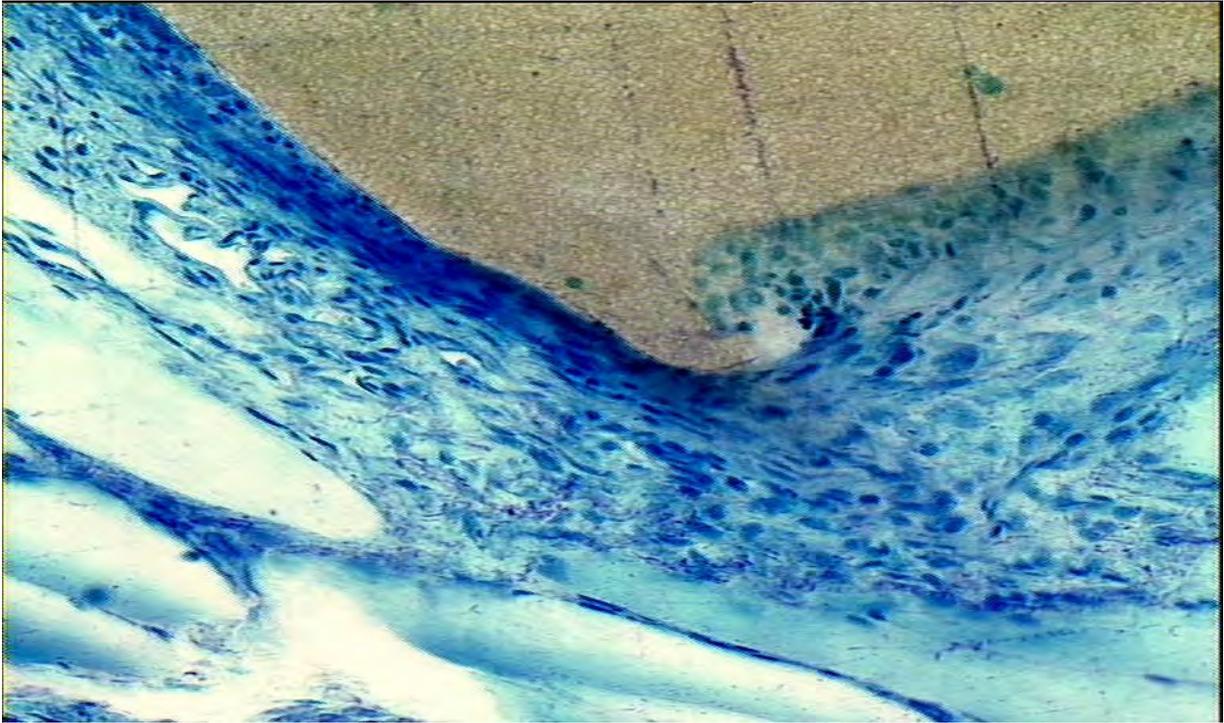


Abb. 16: Der epiimplantäre Grenzbereich eines HAPE-Implantates nach 5 Wochen (oben) und nach 20 Wochen (unten) Implantationszeit:
Nach 20 Wochen hat sich die Zahl der Zellen reduziert und Fettgewebe umgibt das Implantat, um das Gleiten der Muskelfasern zu erleichtern.
(Muskeldünnschliffe, Toluidinblau-Färbung; oben Tier Nr. 14, 20-fach vergrößert; unten Tier Nr. 23, 20-fach vergrößert)

III.2.5 Zusammenfassung der fluoreszenzmikroskopischen Befunde

III.2.5.1 Knochenneubildungsraten

Die Leistungsfähigkeit der Umbaueinheiten eines Knochens („bone remodelling units“) wird quantitativ anhand der Appositionsrate („Appositional Bone Formation Rate“) ermittelt. Diese lag für beide Zeiträume (fünf und 20 Wochen) sowie alle Implantatarten gemeinsam in den ersten beiden Markierungszeiträumen (Calcein / Alizarin complexone) zwischen 2,87 μm - 4,4 μm .

III.2.5.2 Befunde der Gruppe mit fünfwöchiger Nachbeobachtungszeit

Die Osteotomiespalten sind vor allem von rotmarkiertem Knochen ausgefüllt. Die Knochenbildung fand demnach überwiegend zwischen dem 25. und 30. Tag statt. Als Ausdruck der unterschiedlichen Entwicklungsstadien des neuen Knochengewebes liegt der neu gebildete Knochen in vielen Fällen bereits ausschließlich in Einzel- und Doppelbanden vor, als innerhalb einer Probe gleichzeitig in Bandenform und schaumig-körniger Struktur (Abb.17).

Hingegen markiert der grüne Farbstoff (Tag zehn und 15 post op.) größtenteils Gebiete der Geflechtknochenbildung oder anhand von Banden das physiologische Modeling des stationären Knochens, als Anpassung an die veränderte biomechanische Situation. Jedoch fallen bei den HAPE-Implantaten deutlich auch grüne Banden im Kallus auf.

Der neue Knochen steht in vielen Fällen in direktem Kontakt zu den HAPE-Zylindern (Abb.18), während die PE-Implantate stets durch eine ausgeprägte Bindegewebsschicht, die häufig noch chondroide Anteile enthält, abgegrenzt sind (Abb.19; 20). Diese Vorgänge können sowohl bei den massiven als auch bei den perforierten Implantaten beobachtet werden.

III.2.5.3 Befunde der Gruppe mit 20-wöchiger Nachbeobachtungszeit

Meistens sind gelbe und rote Marken gleich häufig vertreten oder es überwiegen in geringem Maße die gelben Marken. Diese kennzeichnen ausschließlich die Bildung von Lamellenknochen. Die rote Fluoreszenz markiert hingegen fast immer beide Stadien der Knochenbildung (Abb.21).

Grüne Marken treten nur vereinzelt und meist in der Nähe zum stationären Knochen auf und vertreten entweder dessen physiologischen Umbau oder aber neu gebildeten Geflechtknochen (Abb.19).

Auch in dieser Gruppe sind die Implantat-Knochenkontakte bei den HAPE-Zylindern besser, wenn auch nicht ganz so deutlich wie in der Kurzzeitgruppe. Die PE-Implantate sind alle bindegewebig vom Kallus getrennt (Abb.20).

Erwähnenswert bleibt, dass sowohl die weitgehend abgeschlossene Produktion von Geflechtknochen um Tag 25 / 30 post op. als auch das bereits einsetzende Remodeling zu Lamellenknochen am einheitlichsten in der Gruppe mit perforierten PE-Zylindern zu beobachten war.

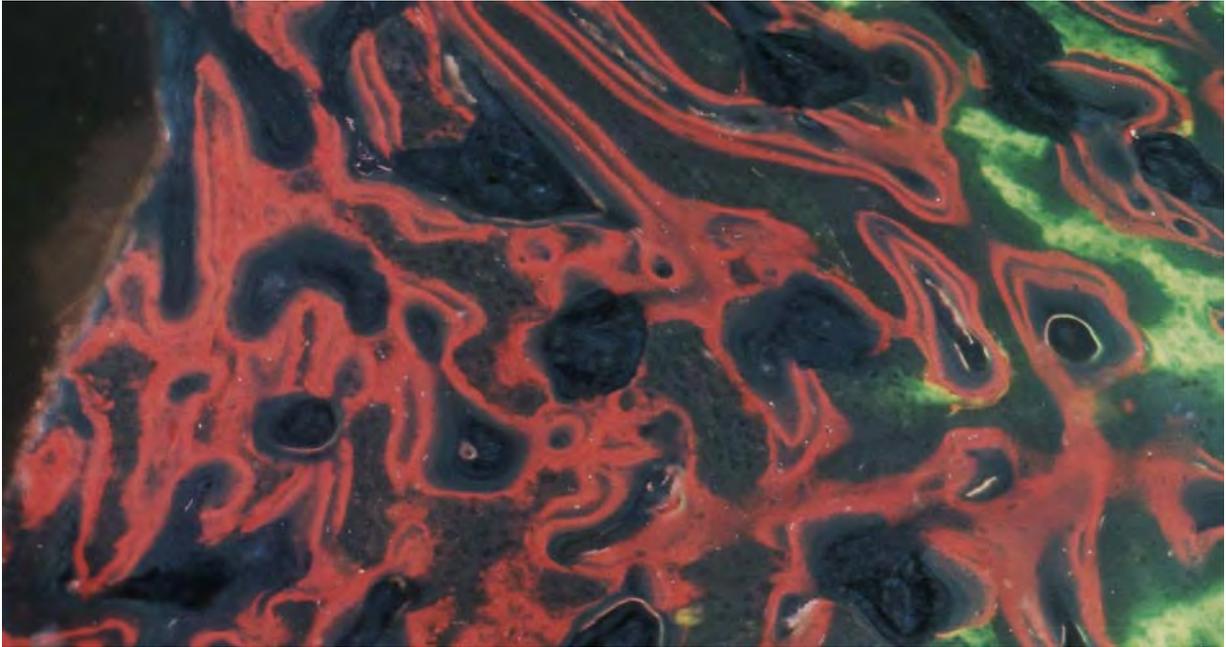


Abb. 17: 5 Wochen Implantationszeit / HAPE-Implantat:
 Grüne Marken (Calcein; Tag 10 / 15) kennzeichnen ausschließlich schaumig-körnige Areale der Geflechtknochenproduktion. Rote Marken (Alizarin compl.; Tag 25 / 30) liegen sowohl schaumig-körnig als auch, in den Gebieten der Lamellenknochenbildung, bandenförmig vor. Dazwischen liegen nicht markierte Bereiche der Knochenneubildung.
 (Knochendünnschliff, Tier Nr. 8, 10-fach vergrößert)



Abb. 18: 20 Wochen Implantationszeit / HAPE-Implantat, Ausschnitt aus dem Zentralkanal:
 Rote Marken (Tag 25 / 30) kennzeichnen Bereiche der Geflechtknochen- und der Lamellenknochenbildung, während die gelben Marken (Tag 130 / 135) ausschließlich in Bandenform auftreten. Davon stehen einige in direktem Kontakt zum Implantat (unten rechts).
 (Knochendünnschliff, Tier Nr. 21, 10-fach vergrößert)



Abb. 19: 20 Wochen Implantationszeit / HAPE -Implantat:
Alle drei Fluoreszenzmarken sind, ausgehend von der Restulna, in der zeitlichen Abfolge ihrer Anwendung zu sehen (von re. n. li.).
(Knochendünnschliff, Tier Nr. 22, 1,25-fach vergrößert)



Abb. 20: 20 Wochen Implantationszeit / PE-Implantat:
Im Interface findet sich eine ausgeprägte Bindegewebsschicht, wie sie besonders für die PE-Implantate typisch ist. Neu gebildetes Fettmark ist zu sehen.
(Knochendünnschliff, Tier Nr. 5, 2,5-fach vergrößert)

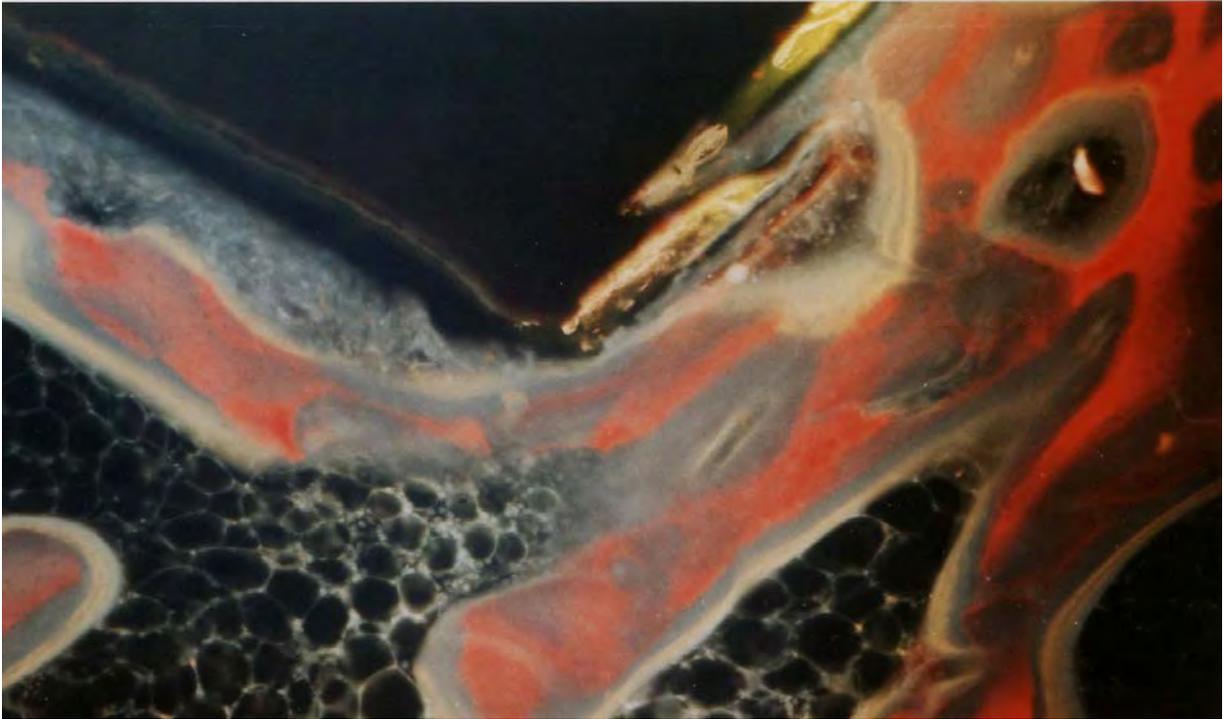


Abb. 21: 20 Wochen Implantationszeit / HAPE-Implantat:
In unmittelbarer Nähe zum Implantat markieren rote und gelbe Marken die neu gebildeten Knochentrabekel. Zwischen diesen liegt rekonstruiertes Fettmark.
(Knochendünnschliff, Tier Nr. 21, 10-fach vergrößert)

IV Diskussion

IV.1 Diskussion des Tier- und Operationsmodells

Die Auswahl der Tierart und die Operationsmöglichkeiten richten sich in erster Linie nach der Fragestellung und dem Ziel eines Versuchsvorhabens. Dabei wird üblicherweise sowohl bei der Wahl des geeigneten Versuchstieres als auch hinsichtlich einer möglichen Übertragung auf humanmedizinische Verhältnisse große Sorgfalt angewendet. Bedauerlicherweise mangelt es hingegen oftmals an Zeit und Mitteln, um die einzelnen Methoden zu standardisieren. Das erschwert den direkten Vergleich der Ergebnisse verschiedener Forschungsgruppen (DINGELDEIN et al., 1994). Auch die Operationstechnik ist schwer zu standardisieren. Beispielsweise ist der Grad der Traumatisierung nicht nur vom verfügbaren Instrumentarium, sondern auch vom jeweiligen Operateur abhängig.

Unseren Untersuchungen liegt ein Tiermodell zugrunde, das weitgehend standardisiert wurde, und sich in zahlreichen anderen Versuchsanordnungen hinreichend bewährt hat (EGGLI et al., 1987; HEISEL, 1987; WEINLÄNDER et al., 1987; LEHTINEN et al., 1990; NAJJAR et al., 1991; WAHLIG et al., 1991). Außerdem lässt die Größe der Versuchstiere i.d.R. eine kontrollierte Operationstechnik zu.

Dennoch ist bei der quantitativen Auswertung der histologischen Befunde im Hartgewebe das arteigene Ausmaß der Knochenneubildung zu beachten. Die „**Appositional Bone Formation Rate**“ (ABFR) weist sowohl unter den verschiedenen Versuchstierspezies als auch zwischen den verschiedenen Knochen eines Individuums erhebliche Unterschiede auf. OWEN (1971) ermittelte eine ABFR von 62 - 69 μm pro Tag für Kaninchen, gegenüber 1,0 - 1,5 μm / Tag beim Menschen. Die Ratte hingegen weist eine Knochenneubildungsrate von 6 - 7 μm / Tag auf, für den Hund wurden 1,5 - 2,0 μm / Tag ermittelt. Daher ist bereits der Vergleich von kaninchenspezifischen Befunden mit Resultaten aus Versuchen an anderen Tierarten nur sehr eingeschränkt möglich.

EITEL und Mitarbeiter (1981) legten dar, dass die bei bestimmten Hunderassen ermittelten Werte auf die Humansituation übertragen werden können, sofern Skeletalter und Skelettbeanspruchung vergleichbar sind. Ihrer Meinung nach weisen die morphologischen Strukturen von Schafen und Schweinen ebenso wenig Ähnlichkeiten mit den Verhältnissen beim Menschen auf wie die von niedrigeren Spezies (Ratten, Kaninchen, Mäuse etc.). Auch OSBORN (1985) sieht eine Übertragung der Ergebnisse aus enossalen Implantationsversuchen an Kaninchen auf humane Verhältnisse als unzulässig an.

SCHNETTLER und Mitarbeiter (1994) weisen auf die Normendifferenzen der ABFR hin, die eine Übertragung der Ergebnisse auf die Humansituation erheblich erschweren. Aufgrund der ähnlichen Verhältnisse im Knochenstoffwechsel wählten sie das Minischwein als Tiermodell.

Neuere Literaturquellen, die eine Gegenüberstellung der zeitlichen Abfolge osteogenetischer Prozesse bei den verschiedenen Spezies ermöglichen, machen jedoch deutlich, dass diese Aussagen nochmals genauer zu prüfen und kritisch zu hinterfragen sind. Hierzu seien als Beispiel nur die Arbeit von DINGELDEIN und Mitarbeitern aus dem gleichen Jahr wie die Untersuchung von SCHNETTLER und Mitarbeitern (1994) zitiert. Beide implantierten gleichartige poröse Keramikzylinder press-fit in einen vergleichbaren Defekt am Femurkondylus beim Kaninchen bzw. beim Minischwein. Die ermittelten Osteogeneseraten lagen in beiden Fällen innerhalb eines Zeitraumes von drei Monaten.

Kaninchen sind unproblematisch in Unterbringung und Haltung. Die Gruppenhaltung ausschließlich weiblicher Tiere ist problemlos. Durch die eingeschlechtliche Tierwahl können geschlechtsabhängige Stoffwechselunterschiede ausgeschlossen werden. Zudem waren unsere Tiere bei Versuchsbeginn ausgewachsen, so dass erhöhte Stoffwechselraten ausgeschlossen werden konnten und das Knochenwachstum abgeschlossen war (OSBORN, 1985). Eine angemessene Quarantäne- und Eingewöhnungszeit gewährleistete, dass zu Versuchsbeginn alle Tiere gesund waren.

Sowohl die Knochenheilung, als auch das Einwachsverhalten verschiedenster Knochenersatzmaterialien sind von BRILL und KATTHAGEN (1987), EGGLI und Mitarbeitern (1987) sowie WEINLÄNDER und Mitarbeitern (1987) am Femur des Kaninchens eingehend untersucht worden. WAHLIG und Coautoren (1991), DINGELDEIN und Mitarbeiter (1994) sowie STRAUß (1998) brachten Implantate in das femoro-patellare Gleitlager ein. KLEIN und Mitarbeiter (1983), HEISEL (1987), LEHTINEN und Mitarbeiter (1990) sowie NAJJAR und Coautoren (1991) osteotomierten hingegen die Tibia. Ebenso wie wir wählten BLENDINGER (2001) und HÄRTTER (1998) die Ulna als Implantationsort.

Bei der Wahl dieses Modells war uns die möglichst geringe Belastung der operierten Gliedmaße besonders wichtig. Das Kaninchen trägt den größten Teil seines Körpergewichtes auf den Hintergliedmaßen. Daher war zu erwarten, dass die Beweglichkeit der Tiere allenfalls mäßig und temporär eingeschränkt sein würde, zumal nur einseitig operiert wurde. Außerdem steht am Unterarm gleichzeitig auch der Radius zur Stabilisierung der Gliedmaße zur

Verfügung. Ferner bietet die Ulna einen vergleichsweise einfachen operativen Zugang mit geringer operativer Weichteiltraumatisierung.

Die Implantation der Proben erfolgte unter Berücksichtigung der gewünschten klinischen Anwendung sowohl enossal als auch intramuskulär. Für die Erprobung der Weichgewebeverträglichkeit wurde als Implantationsort die Muskulatur des gleichseitigen Oberarmes gewählt. Somit entfiel eine Umlagerung des Tieres während der Operation. Zum anderen stand bei eventuell auftretenden Wundheilungsstörungen, verbunden mit Lahmheiten, die kontralaterale Gliedmaße für die Fortbewegung uneingeschränkt zur Verfügung.

Die Implantation der Zylinder erfolgte bei allen Tieren unter den gleichen Bedingungen und wurde von dem selben Operateur vorgenommen. Das Anlegen einer Schablone stellte die stets gleiche Position von Osteotomie und Implantat sicher. Mit Hilfe des innen gekühlten Diamanthohlschleifsystems konnte ein nicht geschädigtes, vitales Implantatlager geschaffen werden.

Die weitgehend formschlüssig und in direktem Kontakt zum Lagerknochen eingebrachten Implantate verlagerten sich bei etwa 75 % der Tiere - unmittelbar post operationem oder in den ersten Tagen danach - mehr oder weniger stark nach lateral oder latero-palmar. Dennoch wurde auch im weiteren Verlauf auf eine zusätzliche Fixierung der Implantate im Osteotomiegebiet bewusst verzichtet, da zusätzliches Fremdmaterial die radiologische wie histologische Auswertung beeinflusst hätte. Wesentlich wurde also ein vergleichsweise instabiles Lager geschaffen und damit eine Situation simuliert, die allen vergleichbaren Relativbewegungen unfixierter Implantate eigen ist. Die Übertragung derartiger Verhältnisse auf ähnliche Situationen wird dadurch erleichtert.

Allerdings können instabile Defektmodelle auch die knöchernen Integration verfälschen (SCHNETTLER et al., 1994). Denn das Auftreten von Bindegewebe im knöchernen Gewebe ist entweder auf mechanische Instabilität während der Heilungsphase zurückzuführen (Mikrobewegungen beeinflussen die Zelldifferenzierung), oder es ist die Folge einwachsenden Reparationsgewebes aus dem umliegenden Weichgewebe in das Knochenlager (RÖSER et al., 1994). Demnach ist bei mechanischer Unruhe, auch bei initialem Kontakt zwischen Implantat und Lagerknochen, kein Implantat-Knochen-Kontakt zu erwarten (REUTERS et al., 1985).

Während der Nachbeobachtungszeit erkrankten vier Tiere, was jedoch weder auf den Eingriff noch auf das eingebrachte Material zurückzuführen war. Andererseits hatte weder der Verlauf

der Erkrankung noch die eingeleitete Therapie irgendeinen Einfluss auf die Knochenheilung. Ein weiteres Tier zog sich nach einigen Tagen selbst die Fäden, was zwar die Wundheilung verzögerte, die Vorgänge am Knochen jedoch nicht beeinflusste. Somit war der Verlauf der Untersuchungen nicht beeinträchtigt. Gewebereaktion und -regeneration sowie das histologische Bild der Implantat-(Knochen)-Gewebegrenze nach Einbringen von Polyethylen und Hydroxylapatit-Polyethylen wurden auch im zeitlichen Ablauf ihrer Entwicklung nicht gestört.

IV.2 Diskussion von Futteraufnahme und Entwicklung der Körpermasse sowie des Gliedmaßengebrauchs post operationem

IV.2.1 *Futteraufnahme*

Die Beurteilung der Futteraufnahme erlaubte Rückschlüsse auf das Allgemeinbefinden der Tiere. Bei gestörtem Allgemeinbefinden, beispielsweise durch Schmerz, war die Futteraufnahme im allgemeinen eingeschränkt.

Die bei fast allen Tieren in den ersten Tagen zu beobachtende, mäßige Aufnahme von Kraftfutter war mit Sicherheit auf die Auswirkungen der Narkose und den mit dem Eingriff verbundenen Stress zurückzuführen. Hingegen stand die bis zu sieben Tagen eingeschränkte Futteraufnahme einiger Tiere direkt mit der Osteotomie in Zusammenhang. Über den gleichen Zeitraum war nämlich bei diesen Probanden auch eine mittel- bis hochgradige Lahmheit (Grad 2 bis 2-) der teilosteotomierten Gliedmaße zu beobachten (siehe dazu auch Kap. III.1.5.1). Die eingeschränkte Futteraufnahme wird als Ausdruck von Schmerzhaftigkeit gewertet.

Diese Beobachtungen konnten in beiden Materialgruppen gemacht werden, so dass die Reaktionen nicht unmittelbar auf eines der beiden Implantatmaterialien zurückzuführen sind.

IV.2.2. Entwicklung der Körpermasse in den beiden Materialgruppen (HAPEX™ / PE) und Beobachtungszeiträumen (5 / 20 Wochen)

In Verbindung mit der Beurteilung der Futtermittelaufnahme konnten wir durch die regelmäßige Kontrolle der Körpermasse feststellen inwieweit der Eingriff selbst, das Implantat oder etwa die Fluorochrommarkierung das Allgemeinbefinden der Tiere nachhaltig beeinflussten. Die Entwicklung der Körpermasse stand in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Allgemeinbefinden der Tiere und konnte exakt bestimmt werden. Setzt man diese mittels einer dreifaktoriellen Varianzanalyse in Bezug zu den anderen Einflussfaktoren Dichte (perforiert / nicht perforiert) und Art des Materials (HAPE / PE), so kann man mit Messwiederholungen im Faktor „Zeit“ die verschiedenen Einflussgrößen testen. Dadurch können konkrete Aussagen über die Auswirkungen der Implantatgestaltung auf den Heilungsverlauf und das Wohlbefinden der Tiere gemacht werden (siehe dazu Kap. III.2.1.2).

Um zusätzlich zur subjektiven Beobachtung der Futtermittelaufnahme eine präzise Information über die Entwicklung der Körpermasse jedes einzelnen Tieres zu erhalten, wurde diese in den ersten drei Wochen post op. im Abstand von drei Tagen ermittelt. In dieser Zeit waren die größten Veränderungen zu erwarten. Dies bestätigte sich durch die unmittelbar nach der Operation infolge Operations-, Narkosestress und Schmerzen bei fast allen Tieren stagnierende Futtermittelaufnahme. Dennoch konnte bei allen Tieren nach 9 Tagen zunächst eine leichte Zunahme der Körpermasse registriert werden. Deutliche Gewichtsverluste setzten nach etwa 10 bis 14 Tagen ein und erreichten ihr Maximum nach 15 Tagen. Eigentlich hatten wir mit dieser Entwicklung bereits zu einem früheren Zeitpunkt nach dem Eingriff gerechnet. Denn im allgemeinen führt zu Beginn einer Frakturheilung die Phase der Entzündung und Hämatomorganisation zur größten Schmerzhaftigkeit im Versuchsverlauf, die ihren Ausdruck zumeist in einer reduzierten Futtermittelaufnahme und Körpermasse findet. Möglicherweise standen diese verspäteten Gewichtsverluste aber im Zusammenhang mit der ersten Fluorochrommarkierung (10. und 15. Tag p.op) und dem damit verbundenen Stress. Da jedoch nicht nur alle erdenklichen Vorkehrungen für eine möglichst schmerzfreie Injektion getroffen wurden, sondern auch in keinem anderen Markierungsintervall ein ähnlicher Verlauf beobachtet werden konnte, ist auch diese Interpretation weitestgehend ausgeschlossen. Eine schlüssige Erklärung fanden wir nicht.

Die zwischen Tag 6 und 9 post op. bei vielen Probanden zu verzeichnende Zunahme der Körpermasse lässt sich mit nachlassender Schmerzhaftigkeit der operierten Gliedmaße erklären, da sich zu diesem Zeitpunkt bei den meisten Tieren auch die Belastung sichtbar verbesserte. Obwohl ab Tag 18 post op. alle Kaninchen wieder kontinuierlich zunahmten, konnte nach 5 Wochen insgesamt nur bei elf Tieren eine Zunahme der Körpermasse im Vergleich zum Versuchsbeginn (= OP-Tag) registriert werden. Zwei Probanden hatten ihr Ausgangsgewicht wieder erreicht, während die übrigen elf einen Gewichtsverlust aufwiesen. Von diesen 11 Tieren waren 8 mit HAPE-Implantaten versorgt worden, was zunächst auf einen direkten Zusammenhang mit dem Material schließen ließ. Jedoch wurde für den Faktor „Material“ kein signifikanter Wert ermittelt ($p = 0,1849$). Der Faktor „Dichte“ war in der 5-Wochen-Gruppe nur knapp nicht signifikant ($p = 0,0687$).

Die graphische Darstellung der Entwicklung der Körpermasse in den vier verschiedenen Implantatgruppen konkretisiert diesen Befund (siehe Abb. 4 und 5, Kap. III.2.1.2). Sowohl die Kurve der perforierten PE-Implantate (M1 / D2), als auch die der perforierten HAPE-Implantate (M2 / D2) verläuft unterhalb der der massiven Implantate. Übereinstimmend mit dieser Aussage trugen fünf der acht HAPE-Tiere mit reduzierter Körpermasse ein perforiertes Implantat. Unter diesen Tieren war auch das Kaninchen mit der Nr. 23, das infolge stark dislozierten Implantates sowohl klinisch als auch radiologisch und histologisch einen deutlich verzögerten Heilungsverlauf aufwies. Dieses Tier hatte mit 0,58 kg die größte Gewichtsabnahme innerhalb der ersten 5 Wochen und erreichte bis zum Versuchsende (20 Wochen) lediglich sein Ausgangsgewicht vom OP-Tag wieder. Seine Werte führten zu einer merklichen Reduktion der mittleren Körpermasse der Gruppe mit perforierten Implantaten.

Desweiteren muss in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen werden, dass trotz zufälliger Auswahl der Tiere für die einzelnen Gruppen zu Versuchsbeginn unwissentlich eine ungleiche Ausgangssituation entstand. Sechs Kaninchen mit einem Ausgangsgewicht von weniger als 4,0 kg erhielten jeweils perforierte Implantate, darunter auch Proband Nr. 9 mit dem niedrigsten Ausgangsgewicht insgesamt (3,4 kg). Die durchschnittliche Körpermasse der Kaninchen mit perforierten Implantaten betrug am OP-Tag $3,61 \pm 1,06$ kg, die der Tiere mit massiven Implantaten $3,88 \pm 1,16$ kg.

Damit lässt sich der beinahe signifikante Wert, der für die Dichte ermittelt wurde, eindeutig erklären. Ebenso die graphische Darstellung der Körpermasseentwicklung mit den deutlich gruppierten und unterhalb der beiden anderen verlaufenden Kurven der perforierten Implantate. Beide Beobachtungen konnten nicht mit der Dichte der verwendeten Implantate in

Verbindung gebracht werden, sondern sind vielmehr auf ungleiche Ausgangssituationen zurückzuführen.

Nach 20 Wochen war die Entwicklung der Körpermasse zwischen den Materialgruppen (HAPE / PE) wesentlich einheitlicher. Wiederum wurde für das Material keine Signifikanz ($p = 0,9352$) ermittelt, während die Dichte signifikant war ($p = 0,0227$). Die oben bereits für den Zeitraum von 5 Wochen beschriebenen Verhältnisse lassen sich ohne weiteres übertragen, da sich die Ausgangssituationen nicht verändert hatten.

Dass sich in beiden Nachbeobachtungszeiträumen der Faktor „Zeit“ auf die Entwicklung der Körpermasse hoch signifikant ($p < 0,0001$) auswirken würde, war zu erwarten. Obwohl bei ausgewachsenen Probanden nicht mehr mit einer Größenzunahme zu rechnen ist, musste doch gerade bei einer auf Fleischproduktion gezüchteten Rasse wie dem Neuseeländer Riesen eine Erhöhung der Körpermasse, in einigen Fällen bis hin zum Erreichen des Mastendgewichtes, vorausgesetzt werden.

Die vorliegenden Befunde liefern keine Anhaltspunkte für einen nachteiligen Einfluss der implantierten Materialien oder der Fluorochrommarkierung. Hingegen lassen sich mangelhafte Futteraufnahme und Gewichtsverluste vermutlich auf den Eingriff zurückführen oder aber auf eine individuelle Erkrankung.

IV.2.3 Beurteilung des Gliedmaßengebrauchs post operationem

Die Beurteilung des Gliedmaßengebrauchs ermöglicht in besonderem Maße die Bewertung des Heilungsverlaufes. Darüber hinaus konnten aber auch Aussagen zur individuellen Schmerzhaftigkeit jedes einzelnen Tieres gemacht werden. Zusammen mit den Erkenntnissen über die Futteraufnahme haben sie die Einschätzung des Allgemeinbefindens erleichtert.

Viele Tiere zeigten am Tag nach der Operation eine mittel- bis hochgradige Lahmheit (Grad 2 bis 2-) der osteotomierten Gliedmaße (Tab. 3, Kap. III.1.5.1). Die eingeschränkte Nutzung dauerte in beiden Gruppen (PE / HAPE) etwa gleich lang (durchschnittlich 13,5 Tage bzw. 12,5 Tage). Bis zum lahmheitsfreien Gliedmaßengebrauch (Grad 1) vergingen noch 10,5 (HAPE) bzw. 12,5 (PE) Tage.

In beiden Gruppen gab es Tiere, die deutlich über den ermittelten Durchschnittswerten lagen. Bei den Tieren mit PE-Zylindern waren dies Kaninchen Nr. 6, Nr. 9, Nr. 13 und Nr. 16. Die verzögerte postoperative Entwicklung bei Tier Nr. 9 ließ sich auf die starke Verlagerung des Implantates mit Weichteilschwellung zurückführen. Röntgenologisch war bereits unmittelbar

post op. eine Zusammenhangstrennung der radiusnahen Kortikalis (Restkortikalis; siehe dazu Kap. III.1.4.2) zu erkennen, die nach fünf Wochen wieder geschlossen war. Da ab Tag 28 eine lahmheitsfreie Fortbewegung bei diesem Probanden beobachtet wurde, schien die Konsolidierung dieses Defektes damit in direktem Zusammenhang zu stehen. Ähnlich waren die Befunde bei Tier Nr. 13. Auch hier war der radiusnahe, kortikale Steg direkt post op. frakturiert und nach fünf Wochen erst mäßig repariert. Lahmheitsfrei war das Tier ab Tag 29 post op. Bei den Kaninchen Nr. 6 und Nr. 16 wurde das Implantat vergleichsweise gut eingepasst. In der Zeit der Nachbeobachtung konnte nur eine geringgradige Verlagerung registriert werden. Auch röntgenologisch waren hier keine Anhaltspunkte für eine verzögerte klinische Ausheilung zu finden.

In der HAPE-Gruppe benötigten die Kaninchen Nr. 1, 18, 21 und 23 deutlich mehr Zeit bis sich die Lahmheit besserte. Ähnlich den Befunden aus der PE-Gruppe konnte auch bei den Tieren Nr. 1 und 18 eine Zusammenhangstrennung der Restkortikalis nachgewiesen werden. Diese war bis zur fünften Woche nach der Implantation nicht vollständig geheilt. Die Kaninchen erreichten erst am 31. respektive 29. Tag Grad 1 der Lahmheitsbewertung. Bei Tier Nr. 23 verrutschte das Implantat gleich nach dem Einsetzen und lag schräg im Osteotomiedefekt. Noch 20 Wochen danach war der Defekt nicht konsolidiert. Radiologisch beurteilt hatte sich das distale Ende der vollständig durchtrennten Ulna außerdem gegen den Radius verschoben. Möglicherweise waren das die Gründe für die länger andauernde Lahmheit des Tieres.

Am deutlichsten waren die radiologischen Befunde bei Tier Nr. 21. Nach drei Wochen zeigte sich im proximalen Abschnitt der osteotomierten Ulna eine Frakturlinie, die in Richtung auf das Ellbogengelenk verlief, was als Zeichen erhöhter Beweglichkeit im Defektgebiet und eventuell als der Beginn einer Pseudarthrose gewertet wurde. Auch der Steg der radiusnahen Restkortikalis war nach der Operation abgebrochen. Alle Zusammenhangstrennungen schlossen sich, wie die Osteotomiespalten, bis zur fünften Woche post op. Trotzdem war das Kaninchen erst 44 Tage nach der Implantation lahmheitsfrei. Letztlich kam es nicht zur Ausbildung einer Pseudarthrose, der Defekt heilte gut aus und das Implantat wurde integriert. Insgesamt benötigten also acht Kaninchen deutlich mehr Zeit bis zum lahmheitsfreien Gliedmaßengebrauch als die übrigen Tiere.

IV.3 Diskussion der Fluorochrommarkierung

Zur histologischen Beurteilung von Wachstums-, Umbau- und Heilungsvorgängen im Knochen verabreichten wir intravital Fluorochrome. Durch die parenterale Gabe dieser kalziumbindenden Substanzen erhält man die größte Farbintensität in den Wachstumszonen des Knochens. Während einzelne Marker Auskünfte über die Knochenapposition an einem bestimmten Ort und zu einem bestimmten Zeitpunkt geben, erlaubt die sequentielle Verwendung mehrerer, sich unterscheidender Farbstoffe die Beurteilung der zeitlichen Abfolge von Heilungsverläufen am Knochen und Einwachsverhalten von Knochenersatz (RAHN, 1976; STUART und SMITH, 1991).

Fluorochrome müssen einige Anforderungen erfüllen. Zunächst sollten sie gut verträglich sein und einen möglichst geringen Einfluss auf die Knochenbildung haben. Außerdem sollte die Fluoreszenzanregung weder durch die bei der Verarbeitung eingesetzten Chemikalien, noch durch das ultraviolette Licht beeinträchtigt werden. Ist ferner der Tatbestand der klaren Begrenzung der Fluoreszenz und einer einfachen Unterscheidung von anderen Substanzen gegeben, erfüllt eine Markiersubstanz alle wesentlichen Forderungen (RAHN und PERREN, 1971, 1972; RAHN, 1976).

Da Calcein grün, Alizarin complexone und Tetrazyklin diese Anforderungen weitgehend erfüllen und darüber hinaus besonders für eine intravitale Anwendung geeignet sind, entschieden wir uns für diese Fluorochrome. In der genannten Reihenfolge wurde jeder Farbstoff zweimal im Abstand von fünf Tagen subkutan verabreicht.

So konnten sowohl die zeitliche Folge der Knochenneubildung, als auch die Art des gebildeten Knochens ermittelt werden. Da letztlich nur das an Mineral fest gebundene Farbstoffmolekül im neuen Knochen sichtbar ist, während restliche Farbstoffe mit dem Blut abgeschwemmt werden, haben wir einige Tage zwischen der letzten Applikation und der Präparation der Proben verstreichen lassen.

Jede zusätzliche Farbe erhöht nicht nur den Informationsgehalt (RAHN, 1975), sondern erleichtert im vorliegenden Fall auch die Unterscheidung der Farbtöne grün (Calcein) und gelb (Tetrazyklin) (OLERUD und LORENZI, 1970).

Schon mit niedrigen Dosierungen von Calcein ist eine intensive grüne Fluoreszenz zu erreichen. Seine LD₅₀ liegt bei i.v. Applikation deutlich über den zur Markierung notwendigen Dosen. Außerdem zeichnet es sich durch eine gute Verträglichkeit und eine Resistenz gegen äußere Einflüsse wie Chemikalien und UV-Bestrahlung aus. Die deutliche

Preisdifferenz zu dem nahezu gleichwertigen Fluoreszeinderivat DCAF macht es zu einem idealen Knochenfluorochrom. Jedoch ist bei einer längerwelligen Anregung (405-435 nm) zu beachten, dass diese häufig eine Verschiebung der Farbintensität zur Folge hat. Das heißt, dass die grüne Fluoreszenz viel intensiver, also überbelichtet ist, während die anderen Farbtöne korrekt wiedergegeben werden. Dies ist vor allem bei einer fotografischen Dokumentation zu beachten. RAHN (1976) empfiehlt daher eine Reduktion der Dosis auf bis zu 5 mg / kg KM. Aufgrund der von uns eingesetzten Dosierung von 10 mg / kg ist das Problem der überhöhten Farbintensität in einigen Fällen aufgetreten. Die Fotodokumentation der Fluoreszenzschnitte war jedoch überwiegend unproblematisch.

Die tiefrote Farbe des Alizarin hebt sich im allgemeinen gut von den anderen Fluorochromen ab. Es ist ebenfalls gut verträglich, einzig die Einbettung in Kunststoff kann zu Farbveränderungen und nachlassender Intensität führen (RAHN, 1975). Diese Beobachtungen konnten wir nicht machen. Das Verhältnis zwischen nötiger Dosis und LD₅₀ ist bei Alizarin complexone besser als bei anderen roten Fluoreszenzmarken. Zudem hemmt es nicht die Knochenbildung und ist preislich günstiger als vergleichbare Substanzen (RAHN, 1972, 1976).

Bereits seit den 60er Jahren werden Tetrazykline zur Knochenmarkierung verwendet. Die verschiedenen Derivate fluoreszieren sämtlich im gelben Bereich; häufig wurden sie gemeinsam eingesetzt, was zu Unsicherheiten bei der Interpretation führte. Bei den Tetrazyklinen handelt es sich um antibiotische Wirkstoffe und die einzigen Knochenfluorochrome, die beim Menschen eingesetzt werden dürfen. Die Resistenzen gegen Chemikalien und Erregerlicht sind geringer als bei Alizarin complexone und Calcein (RAHN, 1972). Von allen in der vorliegenden Untersuchung eingesetzten Fluorochromen hat das Oxytetrazyklin nachweislich die größte hemmende Wirkung auf die Knochenneubildung (KÄMMERER und EGER, 1965; RAHN, 1972, 1975, 1976; OSBORN, 1985). Dieses Geschehen ist jedoch dosisabhängig und die von uns eingesetzte Menge zur erfolgreichen Markierung erwachsener Tiere liegt zuverlässig im atoxischen Bereich.

Die durch die Farbstoffe markierten Bereiche in Kompakta und Spongiosa eines Knochens stellen die Appositionszonen oder Mineralisationsfronten dar. Diese entsprechen den Osteoidsäumen. Die unverkalkte Knochenvorstufe enthält zwar keine Kalziumsalze, jedoch an saure Mukopolysaccharide gebundenes Kalzium. Mit der beginnenden Mineralisation

reduziert sich deren Gehalt, der Anteil an neutralen Mukopolysacchariden nimmt zu. Bei diesem Vorgang wird Kalzium frei und zeitgleich kommt es zu einer Anreicherung von Phosphat in der Grundsubstanz. So kann sich Kalziumphosphat niederschlagen und zu Apatit kristallisieren. Ein Teil der umgesetzten Kalziumionen bildet währenddessen einen Komplex mit den Fluorochrommolekülen. Diese Chelatbildung kann prinzipiell auch im Gewebe beobachtet werden, verschwindet dort aber nach wenigen Stunden wieder. Das macht klar, dass nicht allein die Komplexbildung für die dauerhafte Fixierung der Farbstoffe verantwortlich ist. Es wurde nachgewiesen, dass die Moleküle über das Kalzium an Phosphatsauerstoff des Apatits gebunden werden. Apatit ist seinerseits wiederum ein fester Bestandteil der Kollagenfibrillen, so dass die dauerhafte Verankerung im Knochen verständlich wird. Tetrazyklin-Markierungen sind noch nach vielen Jahren im Knochen nachweisbar (MILCH et al., 1957; KÄMMERER und EGER, 1965; RAHN, 1976).

Die Appositionszone (osteoider Saum) in einem Havers'schen Kanal setzt sich demzufolge aus zwei Schichten zusammen:

1. Einer inneren Schicht aus neu gebildeter Knochengrundsubstanz, die nur Kalzium enthält und
2. einer äußeren Schicht, die direkt an das vollständig mineralisierte Knochengewebe grenzt, in der nachweislich die Mineralisation mit den entsprechenden Farbstoffeinlagerungen stattfindet.

Diese Tatsache ermöglicht eine problemlose Abgrenzung zwischen unvollständig und fertig mineralisiertem Knochen anhand der polychromen Sequenzmarkierung. Demnach liegt die älteste Markierung immer entfernt vom Havers'schen Kanal, die jüngere Marke im Gebiet der Appositionszone am Übergang zum mineralisierten Knochen (FROST und VILLANEUVA, 1959; KÄMMERER und EGER, 1965).

IV.4 Diskussion von Trenn-Dünnschliff-Technik und Knochenfärbung

Die 1982 von DONATH und BREUNER entwickelte *Trenn-Dünnschliff-Technik* ermöglicht auch bei nicht entkalktem, demzufolge nicht oder schwer schneidbarem Gewebe, die Herstellung von Schliffen mit einer Dicke unter 10 µm. Für uns Anlass die Knochenschliffe

für die histologische Untersuchung nach diesem Verfahren herzustellen. Die mit Hilfe der Trenn-Dünnschliff-Technik gewonnenen Proben erlauben sowohl eine lichtmikroskopische als auch fluoreszenzmikroskopische Betrachtung.

Die Moleküle der Fluorochrome sind fest mit dem Kalzium im Knochen verbunden, so dass die Proben nicht entkalkt werden dürfen. Dies ist ein entscheidender Faktor für die Herstellung von Schliffen, die der Fluoreszenzmikroskopie zugeführt werden sollen (KÄMMERER und EGER, 1965; FROST, 1969; RAHN, 1975). Gegenüber der Trenn-Dünnschliff-Technik verursacht das einfache Schneidverfahren unzählige Frakturen im Knochen, die eine mikroskopische Auswertung der Präparate weitgehend unmöglich machen. Uneingebettete Schliffe mit großem Spongiosa- und Weichgewebeanteil zerfallen schon während der Herstellung. Das machte für unsere Untersuchungen die Notwendigkeit der Einbettung deutlich. Trotz der aufwendigen und sorgfältigst durchgeführten Präparation kam es aufgrund des lockeren Verbundes und der unterschiedlichen Konsistenz der einzelnen Elemente zur Zerstörung bzw. zum Verlust von Strukturen der Schliffe (Implantat und / oder Knochen). So konnten nicht immer alle Proben aller Tiere in die Auswertung einbezogen werden.

Nach FROST und Mitarbeitern (1963) ist eine Schliffdicke von 25 bis 50 μm bereits ideal für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung. BIRKENHÄGER-FRENKEL und BIRKENHÄGER (1987) wiesen jedoch bei einer Dicke von 20 μm Überlappungen von Doppelbanden bei geometrischer Projektion nach und empfehlen daher, möglichst dünne Schliffe von 5 bis 20 μm herzustellen.

Der optische Weg bestimmt die Absorption der Strahlung und den Charakter der Fluoreszenzemission. Zu dünne Schliffe bewirken eine Verkürzung des optischen Weges und damit eine nur schwach sichtbare Fluoreszenz. Die Dicke unserer Schliffe für die Fluoreszenzdarstellung lag zwischen 40 und 50 μm . Die verschiedenen Strukturen waren in der Regel problemlos zu identifizieren, die Farbwiedergabe war überwiegend gut.

Eine Schliffdicke von etwa 10 μm für die lichtmikroskopische Untersuchung ermöglichte eine gute Differenzierung der unterschiedlichen Strukturen, Überlagerungen konnten vermieden werden.

Knochenschliffe für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung blieben ungefärbt, während für die histologischen Präparate die Toluidinblau-Färbung gewählt wurde. Sie ist schnell und einfach durchzuführen und wurde von DONATH (1987) als geeignet für die histologische

Routinediagnostik empfohlen. Man macht sich bei ihrer Anwendung das Phänomen der Metachromasie zu Nutze, wodurch bestimmte Gewebebestandteile basisch und damit in einem anderen Ton gefärbt werden als dem der eigentlichen Farblösung. Diese Eigenschaft lässt sich darauf zurückführen, dass Toluidinblau im fixierten Gewebe an saure Mukopolysaccharide gebunden wird. Da im Osteoid der Anteil dieser Glykosaminoglykane (GAG) gering ist, wird nur wenig chromotrope Substanz gebunden. Die Osteoidsäume stellen sich kräftig blau dar. Mit zunehmendem Reifegrad des Knochens erhöht sich auch sein Gehalt an GAG. Deshalb stellt sich junger Lamellenknochen hellblau bis violett dar, während ausgereifter Knochen ausgeprägt metachromatisch, d.h. rot bis rosa gefärbt wird (OSBORN, 1985).

Dieses Phänomen kam uns vor allem bei der Auswertung der 5-Wochen-Gruppe zu Gute. Denn auch andere Gewebearten, wie Knorpel oder verschiedene Zelltypen waren mit Hilfe dieser Färbemethode klar zu unterscheiden. Der Metachromasieeffekt ermöglicht also die färberische Differenzierung der Hartgewebsanteile nach ihrem Alter, was wiederum die Genauigkeit der Aussagen über die zeitliche Abfolge der Ausheilung der Knochendefekte erhöht. Durch eine gute topographische Relation zu den Befunden aus der Fluoreszenzmikroskopie konnten wir diese noch verbessern.

IV.5 Diskussion der fluoreszenzmikroskopischen Befunde

Fluorochrome lagern sich in neu gebildetem Knochengewebe ab, so dass seine Struktur sichtbar wird und die Morphologie der Defektheilung mit Polyethylen und Hydroxylapatit-Polyethylen beurteilt werden kann. Die sequentielle Verabreichung der Farbstoffe ermöglichte zudem eine Bewertung der zeitlichen Abfolge der Reparatur. Außerdem war eine erste Beurteilung des Interface zwischen neuem Knochen und Implantat möglich. Da nur verkalkte Substanz angefärbt wurde, liessen sich bindegewebige Trennschichten sehr leicht identifizieren. Der grüne Farbstoff Calcein wurde am zehnten und 15. Tag post op. verabreicht und ist seltener zu sehen als die roten Marken. Wir können also davon ausgehen, dass die Knochenreparation schon um den zehnten postoperativen Tag begann und bei den meisten Tieren bereits am 25. Tag abgeschlossen war. Das volle Ausmaß der Reparatur entwickelte sich aber erst um den 25. bis 30. Tag post op., zum Zeitpunkt der Applikation von Alizarin complexone. Am häufigsten sind rote Marken vertreten. Die körnig-schaumigen Strukturen, die grün und seltener auch rot gefärbt sind, markieren neu gebildeten

Geflechtknochen. Dieser Knochen wird im Zuge der Knochenheilung als erstes gebildet. Bandförmige Marken hingegen kennzeichnen den Lamellenknochen, der im Remodeling durch Umbau von Geflechtknochen entsteht. Demnach setzte das Remodeling nach drei bis vier Wochen ein.

Einzelne grüne Banden bei HAPE-Tieren machen deutlich, dass hier die Lamellenknochenbildung bereits nach zehn bis 15 Tagen begann. Nach 25 Tagen hatte roter Lamellenknochen das Implantat fast erreicht. Besonders deutlich ist diese Entwicklung bei den Probanden mit massiven HAPE-Implantaten. Hier erreichte neuer Knochen zehn bis 15 Tage früher als bei allen anderen das Implantat. Insgesamt gibt es bei den HAPE-Tieren in der Kurzzeitgruppe wesentlich mehr direkte Knochenkontaktzonen als bei den PE-Tieren.

Die Kaninchen der 20-Wochen-Gruppe erhielten zusätzlich am 130. und 135. Tage post op. den gelben Farbstoff Tetrazyklin. Aus der Beobachtung zahlreicher schaumig-körniger Areale von roter Farbe lässt sich folgern, dass die Geflechtknochenproduktion in der Langzeitgruppe nicht bis zum 25. Tag abgeschlossen war. Anhand der mit Tetrazyklin gelb markierten Bereiche, die ausschließlich in Einzel- oder Doppelbanden vorliegen, lässt sich ablesen, dass die verstärkte Bildung von Lamellenknochen erst zwischen dem 25. und 30. Tag einsetzte und bis zum 130. bzw. 135. Tag anhielt.

Besonders bei Tieren mit massiven HAPE-Implantaten können gelbe Marken beobachtet werden, die sich direkt auf dem Zylinder abstützen. Demnach sind auch in der Langzeitgruppe direkte Knochen-Implantat-Kontakte bei HAPE-Tieren häufiger. Lediglich bei den Tieren mit perforierten PE-Implantaten ist die Geflechtknochenbildung bis zur Applikation des roten Farbstoffes (25. / 30. Tag) annähernd abgeschlossen. Rote und gelbe Marken liegen in dieser Gruppe annähernd gleich häufig und fast ausschließlich in Bandenform vor.

Die einzelnen Stufen der Knochenheilung über Geflecht- zu Lamellenknochen sowie die zeitliche Abfolge der Reparation entsprechen prinzipiell der physiologischen Heilung eines Knochendefektes. Innerhalb unserer Untersuchung differiert die deutlich beschleunigte Entwicklung bei den Tieren mit massiven HAPE-Implantaten in der 5-Wochen-Gruppe, gegenüber den Ergebnissen der übrigen Tiere. Demzufolge könnte die Verwendung dieser Implantate einen positiven Effekt auf die Knochenheilung haben. Hingegen rechtfertigt die bei allen Tieren in der 20-Wochen-Gruppe etwas verzögerte Entwicklung eine solche Schlussfolgerung nicht.

IV.6 Diskussion der Röntgenkontrollen

Die Auswertung unserer Untersuchungsergebnisse stützt sich in erster Linie auf die Befunde der histologischen und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung. Die direkt post operationem angefertigten Röntgenaufnahmen gaben zusätzlich Aufschluss über Position und Größe der einzelnen Implantate. Während der Nachbeobachtungszeit ermöglichten die Röntgenkontrollen die Beurteilung des Heilungsverlaufes. Der Umfang der Kallusbildung, Spontanfrakturen oder Anzeichen einer Pseudarthrose konnten so in direkten Bezug zum klinischen Befinden der Tiere gebracht werden.

Entsprechend der unterschiedlichen anatomischen Gegebenheiten mussten die Implantate für alle Kaninchen mehr oder weniger stark zugeschnitten werden. Dennoch ragten die Implantate bei 75 % der Tiere über das Ulnaprofil heraus. Osteotomiespalten sind direkt post operationem nicht zu erkennen; Implantat und Knochenlager schliessen bündig ab.

In jeder Materialgruppe (HAPE / PE) gibt es zwei Probanden, deren Implantate sich direkt nach dem Wundverschluss derart verlagern, dass diese schräg oder vollständig außerhalb der Osteotomie liegen (siehe Kap. IV.1, S. 95).

Bei einigen Tieren lassen Weichteilschwellungen infolge dislozierter Implantate, verlängerte Lahmheitsphase, verminderte Futteraufnahme und reduziertes Allgemeinbefinden zunächst eine Verzögerung der Knochenheilung befürchten. Dies konnte aber zu keinem Zeitpunkt radiologisch bestätigt werden. Die histologischen Befunde unterstreichen diese Interpretation.

Die unmittelbar nach der Implantation angefertigten Röntgenbilder zeigen auch, dass es nicht in allen Fällen gelungen ist, die an den Radius grenzende Kortikalis der Ulna (Restkortikalis) vollständig zu erhalten. Die nach Ablauf von drei Wochen deutlich gestiegene Anzahl der Tiere mit gebrochener Restkortikalis ist ein Zeichen für erhöhte Beweglichkeit im Defektgebiet. Zusätzlich auftretende Frakturlinien in der Kortikalis des proximalen Ulnafragmentes, die in Richtung Ellbogengelenk verlaufen, stützen die Annahme einer instabilen Situation.

Die nach drei Wochen bei vielen Probanden am Radius erhobenen Befunde lassen sich auf die erhöhte Belastung des Knochens zurückführen. Bei vielen Kaninchen findet man radiologisch eine diffuse Markraumverschattung im Radius. Nach Ulnaosteotomie ist der Radius allein für die Belastungsstabilität der Gliedmaße zuständig. Die Spongiosa des Radius verstärkt sich radiologisch nachweisbar. Ihre Knochenbälkchen weisen eine im Verhältnis zum Volumen

relativ große Oberfläche auf und bedingen einen raschen, der veränderten Belastung angepassten Umbau. Strukturanpassungen der Kortikalis kommen sehr selten und fast nur im juvenilen Organismus vor. Sie laufen langsam und schwerfällig ab und können nur über einen externen (periostalen oder endostalen) Anbau vor sich gehen (PERREN, 1992). In unserer Untersuchung konnten solche zirkulären, periostalen Anlagerungen später anhand der histologischen Schnitte bestätigt werden. Ihr frühzeitiges, bereits nach drei Wochen radiologisch nachgewiesenes Vorkommen macht deutlich wie hoch die Belastung für den Radius war. Nach zehn Wochen sind die Veränderungen nicht mehr ganz so ausgeprägt.

Nach fünf Wochen ist radiologisch eine Verdichtung des unmittelbar an den Osteotomiebereich angrenzenden Ulnamarkraumes nachzuweisen. Stellenweise hat er eine ähnliche Dichte wie kortikaler Knochen, was auf das Einsprossen von Knochenbälkchen zurückzuführen ist. Die histologischen Befunde bestätigen, dass der Markraum massiv von Geflechtknochen durchwachsen ist. Dieser wird allmählich wieder abgebaut, so dass sich die Markhöhle nach zehn Wochen weniger strahlendicht präsentiert und nach 20 Wochen annähernd wieder durchgängig und von normalem Fettmark ausgefüllt ist.

Nach drei Wochen ist in der HAPE-Gruppe nur eine mäßige, in der PE-Gruppe dagegen vermehrte Kallusproduktion zu verzeichnen. Beiden Gruppen gemeinsam ist die ausgeprägte periostale Reaktion, die in einigen Fällen zu erheblichen lateralen Auflagerungen führt. Diese sind zunächst von wolkiger Struktur und haben unscharfe Konturen. Im Zuge der Konsolidierung der Defekte kann röntgenologisch eine zunehmende Verkalkung des periostalen Kallus beobachtet werden. Nach 20 Wochen ist er durchweg von der gleichen homogenen Struktur wie der Lagerknochen. Das Kaninchen reagiert bereits bei minimaler Irritation des Periosts mit enormer Kallusbildung (RAHN et al., 1971). Allein die mechanische Belastung durch die Osteotomie könnte also für die beschriebenen Formationen verantwortlich gewesen sein. Dennoch ist davon auszugehen, dass die erhöhte Beweglichkeit im Implantationsgebiet zur frühzeitigen Kallusbildung führte.

HUTZSCHENREUTER und Mitarbeiter (1969) wiesen den Zusammenhang zwischen erhöhter Fragmentbeweglichkeit und Ausbildung eines ausgeprägten Reizkallus mit unscharfen Rändern und unruhiger Struktur nach. Bei identischer Versuchsanordnung reagiert eine grob instabile Plattenosteosynthese an der Tibia des Schafes mit der Ausbildung eines Reizkallus im Gegensatz zu einem minimalen Fixationskallus nach rigider Fixation. Ähnliches hatten SEGMÜLLER und ALLGÖWER (1965) beobachtet. Auch MÜLLER und

PERREN (1972) führen die Kallusbildung auf Instabilität zurück, was von PERREN (1992) sowie GRUNDNES und REIKERAS (1993) bestätigt wird.

HUTZSCHENREUTER und Mitarbeiter (1969) fanden bei ausgeprägter Fragmentbeweglichkeit eine Verbreiterung des Osteotomiespaltes. Auch SCHENK und WILLENEGGER (1977) führen die Anzeichen initialer osteoklastischer Resorption entlang der Fragmentenden auf Instabilität zurück. Dagegen fehlt der osteoklastische Abbau unter absolut stabilen Bedingungen (SCHENK, 1978). In unserer Untersuchung konnte nach drei Wochen eine resorptive Erweiterung der Osteotomiespalten bei allen Tieren der HAPE-Gruppe nachgewiesen werden. In der PE-Gruppe war diese Beobachtung selten zu machen. Dennoch ist davon auszugehen, dass die mechanische Instabilität des Implantationslagers (siehe Kap. IV.1, S. 95) in beiden Gruppen vergleichbar war, da die Implantate bei fast allen Kaninchen verlagert waren.

Die nach drei Wochen radiologisch nachgewiesene Kallusbildung hat bis zur fünften Woche derart zugenommen, dass sie die beiden Ulnafragmente verbindet. Die Osteotomiespalten sind weitgehend geschlossen, die Frakturen der Restkortikalis zumeist durchbaut; teilweise beginnt die Neuformung der Markhöhle.

Nach Ablauf von zehn Wochen ist die Konsolidierung der Defekte schon weit fortgeschritten, jedoch erst nach 20 Wochen vollständig abgeschlossen. In zwei von 24 Fällen konnte keine Konsolidierung erreicht werden. Bei einem mit HAPE-Implantat versorgten Tier kann bis zu diesem Zeitpunkt keine Reparatoren des Osteotomiedefektes nachgewiesen werden. Das Implantat ist von Anfang an verlagert, die Kallusproduktion insgesamt stark verzögert. Bereits nach fünf Wochen kann man erkennen, dass der Markraum des proximalen Ulnafragmentes sich gegen die Umgebung abschliesst, während der distale Teil eine knöcherne Verbindung mit dem Radius eingeht. Erste Anzeichen für die Ausbildung einer Pseudarthrose bei einem PE-Tier zeigen sich erst nach zehn Wochen. Nach 20 Wochen wird die Diagnose bestätigt. Als Ursache gilt auch hier die übermäßige Bewegung im Defektbereich (SUMNER-SMITH und PRIEUR, 1998).

IV.7 Diskussion der Geweberegeneration und Biokompatibilität von Polyethylen und HAPEX™ im Weichgewebe

Mit der Durchführung dieser Studie sollten die Art und das Ausmass der Reaktion und Regeneration von Weichgewebe bei Kontakt mit dem Knochenersatzmaterial HAPEX™ geklärt werden. Aus Ablauf und Art der Regeneration lässt sich auch auf die Biokompatibilität des Materials schließen. In der Literatur wird der Kompositwerkstoff als gewebeverträglich beschrieben (BONFIELD et al., 1984; 1986; BONFIELD, 1988; TANNER et al., 1994; HUANG et al., 1997). Das vergleichsweise implantierte hochdichte Polyethylen (HDPE) führte gemäß Literatur zu einer milden entzündlichen Reaktion des Weichgewebes (TURNER et al., 1973; KLAWITTER et al., 1976). Beide Aussagen werden durch die vorliegende Untersuchung bestätigt.

Grundsätzlich ist kein Unterschied hinsichtlich der Adhäsion von Bindegewebe zwischen Polyethylen und HAPEX™ festzustellen. Allerdings besteht bei den 20-Wochen-Präparaten der PE-Tiere häufiger ein Spalt zwischen Implantat und Bindegewebe. Dieser ist zwar größtenteils als ein präparationsbedingtes Artefakt zu bewerten, zeigt aber dennoch, dass die Verbindungen zwischen Polyethylen und Bindegewebe weniger ausgeprägt und nicht stabil sind. Bei den HAPE-Präparaten ist die Zahl solcher Ablösungen deutlich geringer. Da nach HUANG und Mitarbeitern (1997) die Oberfläche von reinem Polyethylen für eine massive Anheftung und Proliferation von humanen Osteoblasten ungeeignet ist, musste mit einem solchen Ergebnis durchaus gerechnet werden.

Im Zuge der radiologischen Kontrollen konnte auch die Position der Muskelimplantate überprüft werden, die zu keinem Zeitpunkt ihre Position verändert hatten. In der klinischen Praxis hingegen wandern nicht selten in Weichgeweben liegende Fremdkörper (OSBORN, 1985).

Bei den reinen Polyethylen-Scheiben waren Zellgehalt und Anzahl der Zell-Lagen in der bindegewebigen Kapsel geringer als bei den HAPE-Implantaten. Das Verhältnis von Fasern zu Zellen war bei zwei der sechs perforierten PE-Proben zugunsten der Zellen verschoben. Zudem war die Kapsel deutlich dünner als in anderen Fällen. Um die massiven PE-Implantate war der periimplantäre Makrophagensaum nicht so deutlich ausgebildet. In beiden Kurzzeitgruppen hatten die perforierten Implantate im Poreninneren keinen Kontakt mit eingewachsenem Bindegewebe. Dieser konnte erst nach 20 Wochen registriert werden. Zu diesem Zeitpunkt kam es in beiden Materialgruppen auch häufiger vor, dass die interponierte

Fettschicht zwischen Muskulatur und Kapsel fehlte, so dass beide Strukturen direkten Kontakt hatten.

Der Zusatz von Hydroxylapatit (HA) zu Polyethylen rief grundsätzlich keine andersartigen Gewebereaktionen hervor als bisher beschrieben. Einzig auffällig ist, dass nach 20 Wochen das Zytoplasma der Makrophagen in der Grenzfläche häufig eine deutliche Körnung aufwies, während die Oberfläche der Proben stellenweise eine unruhige Kontur hatte. Ganz vereinzelt waren kleinere Körnchen und Partikel zu sehen, die aus dem Verbund herausgelöst, frei im angrenzenden Gewebe lagen. Zwar haben BONFIELD und Mitarbeiter (1986) nach enossaler Implantation von HAPEX™ keine freien Partikel im Interface nachgewiesen, verzeichneten aber nach sechs Monaten Implantationszeit einen merklichen Kalziumabbau an der Implantatoberfläche.

Hingegen konnten HUANG und Mitarbeiter (1997) auch nach dreimonatiger Inkubation bei 37° bzw. 70°C in physiologischer Lösung (pH-Wert 7,4) keine Degradation von HA-Partikeln feststellen. Während eine partikuläre Keramololyse unterschiedlichen Ausmaßes nach enossaler Implantation von dichten und makroporösen Hydroxylapatit-Keramiken bekannt ist (WINTER et al., 1981; REUTERS et al., 1985; WEINLÄNDER et al., 1987; DIELERT et al., 1988; EGGLI et al., 1988; DINGELDEIN et al., 1994; LIEBENDÖRFER und TRÖSTER, 1997), wird dieses Phänomen bei subkutan respektive intramuskulär eingebrachten Implantaten nicht (DENISSEN et al., 1980; PIECUCH, 1982) oder nur selten beobachtet (OSBORN, 1985). Vier Wochen nach Implantation einer dicht gesinterten HA-Keramik in die Rückenmuskulatur von Ratten bemerkte OSBORN (1985) erste Anzeichen einer Gefügedesintegration. Die Implantatgrenzen wurden unscharf. Einzelne Keramikpartikel lagen extrazellulär oder in einkernigen Makrophagen vor. Diese Gefügealteration schritt mit zunehmender Implantationsdauer fort.

Ein Grund für die in unserer Untersuchung ausschließlich im Weichgewebe aufgetretene Degradation von HAPEX™-Proben wird sein, dass die Hälfte der enossalen Langzeitimplantate gut bis vollständig knöchern integriert wurde. Durch das direkte „bone-bonding“ ist die Ausbildung eines Makrophageninterlayers zwischen Implantat und Knochen nicht möglich. Diese Erklärung wird auch durch Erkenntnisse von DINGELDEIN und Mitarbeitern (1994) gestützt. An enossal eingesetzten, makroporösen HA-Keramiken fanden sie ausschließlich bei den bindegewebig eingehielten Implantatabschnitten aus dem Gefüge herausgelöste Partikel. Die ersten Anzeichen der Desintegration von Partikeln zeigten sich

hier bereits nach sechs Wochen und nahmen bis zu einem Maximum nach sechs Monaten kontinuierlich zu.

Im Gegensatz dazu stehen die Befunde von LIEBENDÖRFER und TRÖSTER (1997). Sie registrieren, unabhängig von einer knöchernen oder bindegewebigen Integration, die oberflächliche Anlösung von Kristallgrenzflächen. In Arealen, die nicht knöchern eingebaut waren, wurden die 1 bis 3 μm großen Kristallite teilweise von Makrophagen aufgenommen. Die Autoren konnten keinen Zusammenhang mit der Verweildauer feststellen. Da es auch in der vorliegenden Untersuchung keine Anzeichen einer klassischen Degradation des Implantatmaterials durch phagozytosefähige Riesenzellen gab, stimmen wir mit SPECTOR (1991), DINGELDEIN und Mitarbeitern (1994) sowie LIEBENDÖRFER und TRÖSTER (1997) darin überein, dass hier kein zellvermittelter Abbau, sondern eine oberflächliche Ablösung von Partikeln vorliegt. Ob die Ursache dafür in einer partiellen Auflösung lag oder Einflüsse der Mikroumgebung verantwortlich waren bzw. beides ursächlich in Frage kommt, bleibt jedoch unklar. Ein Zusammenhang mit der für verschiedene reine Polyethylen-Implantate beschriebenen Degradation infolge einer Sterilisation durch Gamma-Strahlen (siehe Kap. II.1.3.1) konnte für die HAPEXTM-Proben weitgehend ausgeschlossen werden. Nachweislich erhöht sich bei dieser auch von uns angewandten Art der Sterilisation die Festigkeit des Komposits (SUWANPRATEEB et al., 1998).

Das beschriebene Einheilungsmuster mit Ausbildung einer kapselähnlichen Struktur ähnelt sowohl denen von Polyethylen- als auch Hydroxylapatit-Implantaten. DENISSEN und Mitarbeiter (1980), OSBORN (1985) sowie YANG und Mitarbeiter (1997) bemerkten regelmäßig nach intramuskulärer Implantation von dichten bzw. makroporösen HA-Keramiken die Ausbildung einer bindegewebigen Kapsel um die Implantate. Das gleiche konnten ROSENGREN und Mitarbeiter (1999) nach Implantation von Polyethylen-Scheiben feststellen. Auch OSBORN beschreibt, dass sich im Laufe der Nachbeobachtungsphase die Dichte dieser Kapsel verändert und der Fasergehalt zu Ungunsten der Zellen zunimmt. HULBERT und Mitarbeiter (1971; zitiert nach OSBORN, 1985) erwähnen, dass die Dichte einer solchen Kapsel generell mit den Bewegungen des Testkörpers im Gastgewebe korreliert. Außerdem fanden sie, dass bei kalziumhaltigen Keramiken die bindegewebige Einscheidung teilweise derart schwach ausgeprägt war, dass zwischen Implantatgrenzfläche und Muskulatur ein direkter Kontakt bestand. Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen dies nicht, da mit zunehmender Verweildauer die Kapseln sowohl um die HAPEXTM-Scheiben als auch um die nicht kalziumhaltigen Polyethylen-Implantate schwächer ausgeprägt waren. Allerdings

stimmen wir mit OSBORN (1985) insofern überein, als bei den porenhaltigen Scheiben die Kapsel weniger dick ist. Dabei handelt es sich nicht um signifikante Werte, die Beobachtung konnte nur im Zusammenhang mit Polyethylen-Implantaten gemacht werden.

Schlüssig scheint die Erklärung, die OSBORN für diese Erscheinung gab. Bei Bewegungen des Versuchstieres oder der implantattragenden Muskelpartie erlangen Gewebe- und Implantatmaterial eine kinetische Energie. Diese ist proportional zur jeweiligen Masse. Die Masse von Muskelgewebe liegt etwa bei $1,1 \text{ g / cm}^3$, die Masse der verschiedenen Implantatmaterialien ist i.d.R. höher. Das verwendete Polyethylen wies eine Masse von $0,949 \text{ g / cm}^3$ auf, HAPEXTM mit 40 vol % Hydroxylapatit hat eine Masse von $1,782 (+/- 0,004) \text{ g / cm}^3$. Die Differenz des kinetischen Potentials führt in der Trennebene zu Relativbewegungen, die von ihrem physikalischen Charakter her gegenläufig zu den Ortsveränderungen des Skelettmuskels sind und damit den biomechanischen Reiz zur Auslösung der Gewebeantwort darstellen. Diese besteht in der Bildung eines Intermediärgewebes, das die Beweglichkeit des Festkörpers unterbindet, um die Neutralisation der Energiedifferenz zu übernehmen. Durch das Hohlraumsystem großporiger Körper nähern sich die Massedichten von Muskulatur und Fremdkörper an. In der Folge muss in der Grenzfläche zwischen Muskulatur und Implantat weniger Energie neutralisiert werden. Dies findet seinen Ausdruck in einer im Vergleich zu massiven Implantaten geringeren Kapselstärke. Da die Polyethylen-Scheiben von Anfang an etwa die gleiche Masse hatten wie die umgebende Muskulatur, führten die Perforationen dieses Materials zu einer weiteren Reduktion der Differenz des kinetischen Potentials. Das erklärt warum bei zwei der perforierten Implantate die Kapsel so auffallend dünn war. Hingegen scheinen die Perforationen die Masse der HAPEXTM-Implantate nicht ausreichend minimiert zu haben, so dass diese Beobachtung hier nicht gemacht werden konnte.

Entgegen einiger Befunde nach HA-Implantation (DENISSEN et al., 1980; OSBORN, 1985; YANG et al., 1997) waren keine Riesenzellen im angrenzenden Gewebe zu finden. Als einzigen Ausdruck einer Abwehrreaktion auf das orts- und körperfremde Material fanden wir Makrophagen, die mehr- oder einkernig an der Grenzfläche zum Implantat auftraten. Diese milde Form einer Fremdkörperreaktion ist von Versuchen mit reinen Hydroxylapatit-Implantaten durchaus bekannt (WINTER et al., 1981; REUTERS et al., 1985; DONATH et al., 1987; FRAME et al., 1987). Ähnliche Beobachtungen konnten auch MATLAGA und Mitarbeiter (1976) an verschiedenen Kunststoffen machen. Sie bewerteten diese Reaktion des Gastgewebes nach der Insertion nicht toxischer Materialien in Weichgewebe als typisch und normal. Allerdings konnten die Autoren, je nach äußerer Form des implantierten Materials,

unterschiedliche Zellreaktionen nachweisen. Demnach provozieren dreieckige Körper die stärkste, polygonale eine geringere und runde Proben die geringste Ansammlung von phagozytosefähigen Zellen. Im Zusammenhang mit abgerundeten Hydroxylapatit-Körpern kamen MISIEK und Mitarbeiter (1984) zu den gleichen Ergebnissen. Aufgrund dieser Erkenntnisse wählten wir Scheiben für die intramuskuläre Implantation aus, um eine möglichst materialassoziierte und wenig strukturabhängige Zellantwort zu erhalten.

Auch nach 20-wöchiger Verweildauer der Implantate wurden keine Anzeichen von Mineralisation im Sinne einer Osteoinduktion im periimplantären Milieu der HAPEX™-Scheiben gefunden. Dies gilt sowohl für massive wie für perforierte Implantate. In die perforierten Scheiben war nach fünf Wochen ein lockeres und zellreiches Bindegewebe eingewachsen, gelegentlich fanden sich auch einige Kapillareinsprossungen. Nach 20 Wochen hatte der Anteil der Zellen deutlich nachgelassen, teilweise war jetzt auch das Innere der Poren von Fettgewebe ausgefüllt. Demnach kann dem Kompositwerkstoff die Fähigkeit einer extraskeletalen Osteoinduktion wohl abgesprochen werden.

Der von HUANG und Mitarbeitern (1997) in vitro nachgewiesene stimulative Effekt auf humane Osteoblasten durch HAPEX™ zeigt, dass dazu vermutlich mindestens die Anwesenheit osteogenetischer Zellen nötig ist. Da ein potentiell osteoinduktives Vermögen nur auf den Hydroxylapatit-Anteil von HAPEX™ zurückzuführen wäre, wir das aber nicht registrieren konnten, stehen diese Ergebnisse in Übereinstimmung mit der Aussage von WINTER und Coautoren (1981), HEISEL (1987) und RUDEL (1989). Sie sprechen Hydroxylapatit jegliches osteoinduktive Potential im Weichgewebe ab. Ebenso stützen wir die Ergebnisse von YANG und Mitarbeitern (1997), die im Gegensatz zu Versuchen mit Hunden und Schweinen bei Kaninchen keine extraskeletale Osteogenese durch Hydroxylapatit nachweisen konnten.

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass nach Implantation in Weichgewebe keine nennenswerten Unterschiede zwischen hochdichtem Polyethylen und dem getesteten Kompositwerkstoff HAPEX™ bestehen. Das periimplantäre Milieu ist bis auf minimale Unterschiede prinzipiell gleich. Während des gesamten Untersuchungszeitraumes treten um die Implantate weder deutliche Rundzellinfiltrate, noch Nekrosen oder Granulome auf. Es gibt keine Hinweise auf eine ausgeprägte entzündliche Reaktion des Wirtsgewebes auf das Implantatmaterial. Hinsichtlich der Biokompatibilität von HAPEX™ sind demnach die guten Ergebnisse von BONFIELD und Mitarbeitern (1984), BONFIELD (1988), TANNER und

Coautoren (1994) sowie HUANG und Mitarbeitern (1997) zu bestätigen. Die beschriebenen geringfügigen Divergenzen beziehen sich weniger auf die unterschiedlichen Materialeigenschaften (PE / HAPE), als vielmehr auf die äußere Form der Proben (massiv / perforiert). Jedoch kann in diesem Zusammenhang nicht von einer grundsätzlich besseren bindegewebigen Adhäsion bei perforierten Implantaten gesprochen werden. Der großflächigere Kontakt zwischen Bindegewebe und Poreninnerem steht eindeutig in direktem Zusammenhang mit einer längeren Verweildauer. Die angenommene stabilere Verbindung zwischen Bindegewebe und HAPEX™ lässt sich nur mit ultrastrukturellen Untersuchungen an den Grenzflächen klären. Ansonsten ist die Akzeptanz der Probekörper durch das Gastgewebe identisch.

IV.8 Diskussion der histologischen Befunde nach Implantation von Polyethylen und HAPEX™ in einen Knochendefekt

Die von BONFIELD und Mitarbeitern (1984; 1986) nachgewiesene bindegewebige Einscheidung von HAPEX™-Implantaten mit 30-50 vol % HA lässt sich teilweise für die hier eingesetzten Implantate bestätigen. Es wird eine dichte, fibröse Kapsel beschrieben, die nach sechs Wochen etwa 20 µm breit ist. Mit zunehmender Implantationszeit von bis zu sechs Monaten konnten die Autoren nach und nach den Ersatz dieser Kapsel durch neues Knochengewebe beobachten. Ganz ähnliche Befunde erhoben DOYLE und Mitarbeiter (1990) bei rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen ihrer 30-50 vol % HA enthaltenden Implantate. Die nach einem Monat ca. 6 µm dicke Kapsel reduzierte sich innerhalb von sechs Monaten auf 2 µm, während gleichzeitig der Anteil des direkten „bone-bondings“ auf 40 % zunahm. In Bereichen des direkten Knochenkontaktes fanden sie keine bindegewebigen Reste mehr.

Nach fünf Wochen zeigte sich häufiger auch bei einem Teil der HAPEX™-Implantate eine bindegewebige Trennschicht zum neuen Knochen, die nur in zwei Fällen auf eine Dislokation der Zylinder im Osteotomieareal zurückzuführen war. Im Interface zeigte sich als Rest von Granulationsgewebe ein relativ zellreiches und gut vaskularisiertes Bindegewebe. An den mit der Muskulatur in Kontakt stehenden Außenflächen aller Zylinder war die Ausbildung mehrerer Bindegewebslagen zu einer Kapsel deutlich zu erkennen. Diese Struktur unterlag während der Nachbeobachtungszeit keiner merklichen Veränderung. Hingegen nahmen der Zellgehalt und die Zahl der Kapillareinsprossungen im Interface deutlich ab. Eine Abnahme

der bindegewebigen Schichtdicke nach fünf Monaten konnten wir nicht erkennen. Während die Polyethylen-Implantate regelmäßig bindegewebig vom Knochengewebe abgegrenzt waren, war dies bei den Komposit-Implantaten meist nur punktuell oder in einzelnen Schnittebenen zu sehen. Eine vollständige Osseointegration konnte jedoch nur in einigen Schnittebenen von drei der zwölf HAPE-Proben nachgewiesen werden. Trotzdem ist HAPEX™ gemäß der Definition von KÖSTER und Mitarbeitern (1976) als biokompatibel mit Knochengewebe oder auch osteokompatibel einzustufen (siehe dazu Kapitel II.1.2). Diese Anforderung erfüllt Polyethylen nicht, denn unter den PE-Proben ist der Anteil der bindegewebigen Strukturen im Interface sehr hoch. Neben der fehlenden Primärstabilität führen wir das schlechte bone-bonding in diesen Fällen vor allem auf eine mangelhafte Bio- bzw. Osteokompatibilität zurück.

Die Beurteilung des Ausmaßes des direkten Knochenkontaktes oder „bone-bondings“ erfolgte in der vorliegenden Arbeit rein subjektiv, eine Flächenmessung wurde nicht vorgenommen. Allerdings wurde die Auswertung insofern erleichtert, als zwischen den HAPEX™-Zylindern und Knochengewebe wesentlich häufiger direkter Kontakt bestand als zwischen den Polyethylen-Implantaten und Knochen.

Dies war nach den Ergebnissen von BONFIELD und Mitarbeitern (1986) sowie DOYLE und Mitarbeitern (1990) zu erwarten. Beide registrierten die Apposition von Knochengewebe direkt auf der Implantatoberfläche. Auch wir konnten sowohl vitale Osteoblasten und Osteozyten in unmittelbarer Nähe als auch ganze Osteone ausmachen, die in direktem Kontakt zur Oberfläche des Implantates standen. Jedoch waren keine Osteoblastenlayer zu erkennen, die Osteoid direkt auf der Oberfläche des Komposits produzierten. Insofern stimmen wir nicht mit den Beobachtungen von HUANG und Mitarbeitern (1997) überein. Sie konnten in vitro zeigen, dass sich auf der Oberfläche von HAPEX™ deutlich mehr humane Osteoblasten anheften als auf Polyethylenflächen. DALBY und seine Mitarbeiter (2003) bestätigen diese Ergebnisse auch im Vergleich mit dem herkömmlichen Zement PMMA (**P**oly**m**ethyl**m**ethacrylat). Zudem ist auch die Proliferationsrate der Zellen auf dem Komposit wesentlich höher. Die Autoren vermuten daher, dass durch die Präsentation von Hydroxylapatit-Kristallen an der Oberfläche des Werkstoffes eine optimale Struktur für die Adsorption von Proteinen geschaffen wird. Deren Anlagerung ist wiederum unabdingbare Voraussetzung für die Auflagerung von Knochenzellen (SPECTOR, 1991). HUANG und Mitarbeiter (1997) bezeichnen Hydroxylapatit als „Mikro-Anker“ bei der Apposition von Knochengewebe auf der Oberfläche von HAPEX™ -Implantaten. REA und Coautoren (2004)

registrieren ebenfalls die bevorzugte Adhäsion von Zellen an unterschiedlichen keramischen Partikeln innerhalb einer identischen Matrize. Die gegenüber den HAPEX™ -Implantaten etwas bessere Bioaktivität von AWPEX-Proben (Apatit-Wollastonit in HDPE) führen sie auf die breitere Streuung der Partikelgröße zurück. Dadurch entstehen weniger Hohlräume, es folgt eine stärkere Ionenlösung, die wiederum die beschleunigte Ablagerung von Apatit zur Folge hat.

Dennoch konnte auch bei HAPE-Proben hin und wieder die Ausbildung einer bindegewebigen Schicht im Interface beobachtet werden. DOYLE und Mitarbeiter (1990) hatten ganz ähnliche Ergebnisse und versuchten durch Betrachtung der Grenzflächen in einem ultrahochauflösenden Transmissions-Elektronen-Mikroskop eine Erklärung dafür zu finden. Sie stellten fest, dass in den Bereichen des direkten Knochenkontaktes das Wachstum der Kristalle häufig epitaxial zu den nächstgelegenen Kristalliten des Komposits ist. Sind diese Kristallite nun, wie bei einem großen Teil der Implantatoberfläche, von einer dünnen Lage Polyethylen bedeckt, dann findet lokal vermutlich keine Mineralisation statt. Die Formation von Hydroxylapatit erfolgt in diesem Fall nur in einiger Entfernung zum Implantat, gewöhnlich in 2-6 µm Abstand. Da wir selbst keine ultrastrukturellen Untersuchungen durchgeführt haben und nur in zwei Fällen eine Dislokation des HAPEX™-Zylinders für die Interponation von Bindegewebe verantwortlich gemacht werden konnte, scheint uns dies eine mögliche und logische Erklärung. Andererseits gilt es, das instabile Defektmodell zu bedenken (siehe Kapitel IV.1). Während sich die Begründung der bindegewebigen Einscheidung bei den PE-Implantate sowohl aus einer mangelhaften Osteokompatibilität als auch aus mangelnder Primärstabilität ergibt, müssen bei den HAPEX™-Proben also die spezifischen Oberflächeneigenschaften berücksichtigt werden. Naheliegender ist jedoch, dass auch für diese Präparate die mechanische Unruhe während der Heilungsphase die entscheidende Rolle gespielt hat. Denn das verbreitete Auftreten von Knorpelzellen in fast allen Proben unterstreicht die fehlende mechanische Stabilität.

Die hier erhobenen Befunde gleichen in jeder Hinsicht den Geschehnissen bei der physiologischen Knochenheilung. Zunächst wurde normal strukturierter Geflechtknochen gebildet, der im Laufe des Remodeling durch Resorption und Apposition zu Lamellenknochen umstrukturiert wurde. Die Resorptionsareale waren überwiegend vergesellschaftet mit einkernigen Fresszellen. Besonders in den 5-Wochen-Proben war das intensive Einsprossen von Blutgefäßen zu erkennen, deren Anwesenheit für jede Art der

Knochenheilung unerlässlich ist. In beiden Materialgruppen konnte außerdem die Ansammlung von Makrophagen sowie wenigen Lymphozyten, vereinzelt Granulozyten und Plasmazellen beobachtet werden. Da diese mononukleären Zellinfiltrate in den 5-Wochen-Proben deutlich stärker ausgeprägt waren als in den Langzeitproben, und auch das Ausmaß der Vaskularisation nachließ, sind sie als Reste eines jugendlichen Granulationsgewebes zu sehen.

Das Vorhandensein von Makrophagen an der Grenzfläche, nicht nur zu Anfang, sondern auch nach 20 Wochen, ist als Abwehrreaktion gegenüber dem körperfremden Material zu bewerten. Wie bereits erwähnt, ist diese Beobachtung nach der enossalen Integration von Hydroxylapatit-Keramiken bekannt. Eine steigende Anzahl dieser Zellen, mit zunehmender Verweildauer, konnte entgegen den Befunden anderer Autoren nicht festgestellt werden (WINTER et al., 1981; REUTERS et al., 1985; DINGELDEIN et al., 1994). Dies ist damit zu begründen, dass wir bei unseren Proben keine ausgeprägte Degradation finden konnten, als deren Funktionsträger die phagozytosefähigen Makrophagen angesehen werden. Da die erwähnten Autoren im Laufe ihrer Versuche eine zunehmende Gefügealteration registrierten, erklärt sich auch das gestiegene Aufkommen an Fresszellen in ihren Proben.

Im Laufe der Zeit unterlag der spongiöse Knochen osteonalen Umbauvorgängen. Einerseits traten Resorptionszonen in Form Howship'scher Lakunen und Osteoklasten auf, andererseits gab es Bereiche von Knochenapposition. Ein Abbau des Knochenersatzmaterials durch Osteoklasten konnte jedoch nicht registriert werden. Zahlreiche Osteoblastenlayer sezernierten Osteoid, nach und nach entstand Lamellenknochen.

Die häufig, zumindest anteilig, knöchern gefüllte Markhöhle wurde allmählich wieder durchgängig und in den 20-Wochen-Proben zeigte sich durchweg Fettmark zwischen den wenigen Trabekeln des neu gebildeten Knochens. Die Wiederansiedelung dieses Gewebes ist als Zeichen der guten und physiologischen Regeneration der Defekte zu verstehen.

Nach einer Beobachtungszeit von 20 Wochen (135 Tage) war keine Degradation oder Resorption des Hydroxylapatit-Polyethylen-Gemisches zu registrieren. Damit werden sogar noch die in-vitro Ergebnisse von HUANG und Mitarbeitern (1997) übertroffen, die dieses Verhalten nur über einen Zeitraum von zwölf Wochen beobachteten. Die Autoren kommen daraufhin zu dem Schluss, dass HAPEX™ ein langzeitstabiles Implantatmaterial ist; wir können dies aufgrund unserer Erkenntnisse voll und ganz bestätigen. Sollten sich diese

Ergebnisse auch in Langzeitstudien über einen Zeitraum von mehreren Jahren zeigen, dass das Material über einen entscheidenden Vorteil gegenüber reinem Polyethylen verfügt. Die langfristigen Erfolge und unproblematischen Heilungsverläufe der bisher kommerziell eingesetzten HAPEX™-Implantate stützen diese Annahme.

IV.9 Diskussion der Knochenheilung unter dem Einfluss von Polyethylen und dem Knochenersatzmittel HAPEX™

Ein weiteres Ziel dieser Untersuchung lag in der Beantwortung der Fragen nach der Osteokompatibilität und dem Einfluss von HAPEX™ auf die Knochenheilung. In der Literatur wird die Oberfläche des Werkstoffes als bioaktiv beschrieben (BONFIELD et al., 1984). Es kommt zur direkten Apposition von Knochengewebe auf der Implantatoberfläche respektive zu einer knöchernen Integration (TANNER et al., 1994; BONFIELD und TANNER, 1997; HUANG et al., 1997). BONFIELD (1988) bezeichnet die Verbindung mit dem Knochen als sehr stabil. Sowohl kortikaler als auch spongiöser Knochen reagieren mit der Produktion von neuem Knochen positiv auf die Anwesenheit von HAPEX™ (BONFIELD et al., 1986). An dieser Stelle sei vorweggenommen, dass unsere Ergebnisse mit dieser Aussage übereinstimmen.

Im Vergleich zu Polyethylen, das als bioinertes Material allenfalls eine Kontaktosteogenese (OSBORN, 1980) oder Distanzosteogenese (BONFIELD, 1988) erwarten ließ, war davon auszugehen, dass HAPEX™ wesentlich besser integriert werden würde. Diese Erwartung wurde nicht zuletzt durch die immer wieder beschriebene, gute Osteokompatibilität von Hydroxylapatit gestützt (CHANG et al., 1983; ROTHSTEIN et al., 1984; HARVEY, 1985; GUMAER et al., 1986; FRAME et al., 1987). Nach Meinung von OSBORN (1985) dient Hydroxylapatit als Matrix für die Differenzierung von Osteoprogenitorzellen zu Osteoblasten sowie für die Mineralisationsvorgänge im Zuge einer Defektheilung. Der Autor kommt zu dem Schluss, dass die Osteogenese direkt und primär auf der Hydroxylapatit-Keramik einsetzt. Diese Aussage wird durch Untersuchungen von NERY und Mitarbeitern (1975), VAN BLITTERSWIJK und Coautoren (1985) sowie BRILL und KATTHAGEN (1987) gestützt.

Hingegen konnten andere Autoren zu keinem Zeitpunkt bei irgendeiner ihrer getesteten HA-Keramiken eine epiimplantär einsetzende Osteogenese feststellen (DONATH et al., 1985; 1987; MANDELKOW et al., 1990; SCHNETTLER et al., 1994; RÖSER et al., 1994). Vorab lässt sich festhalten, dass diese Form der Knochenneubildung auch im Zusammenhang mit

dem Werkstoff HAPEX™ nicht zu erkennen war. Gleichzeitig wurden die Erwartungen einer signifikant besseren, knöchernen Einheilung in diesem Maße nicht erfüllt, da nur für drei HAPE-Implantate teilweise eine Osseointegration nachgewiesen werden konnte.

Im Rahmen unserer Versuchsreihe führten wir erstmals am zehnten und 15. postoperativen Tag eine Fluorochrommarkierung mit dem grünen Farbstoff Calcein durch. Am 25. und 30. Tag erfolgte die Markierung mit dem roten Alizarin complexone. Da sich die Farbstoffe während der Mineralisation in neu gebildetem Knochengewebe ablagern, lassen sich Ort und Zeitpunkt der Osteogenese ziemlich genau festlegen. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie waren grüne Marken hauptsächlich in der Nähe des Lagerknochens nachweisbar. Bei den 5-Wochen-Proben der HAPE-Tiere traten sie jedoch auch innerhalb des Kallus auf. Allerdings waren in unmittelbarer Implantatnähe keine grünen Marken zu finden. Alle Präparate wurden von dem roten Farbton dominiert. Daraus konnten wir schliessen, dass die Osteogenese um den Tag zehn bis 15 post op. schon eingesetzt hatte. Besonders deutlich war dies bei den HAPEX™ -Tieren. Das Maximum der Knochenbildung lag zwischen Tag 25 und 30 post op. Auch BUTTS und Mitarbeiter (1989), WAHLIG und Mitarbeiter (1991) sowie GABRIELLI und Coautoren (2001) registrierten nach Implantation verschiedener makroporöser Hydroxylapatit-Keramiken die Formation neuen Knochengewebes in den ersten 14 Tagen. Bei DONATH und Mitarbeitern (1985) sowie OSBORN (1985) waren bereits innerhalb der ersten Woche (fünf bis sieben Tage) schmale Knochenbälkchen und Osteoblasten zu erkennen. Die zeitliche Abfolge der Defektheilung nach Implantation von HAPEX™ ist also durchaus mit den Ereignissen bei reinen HA-Keramiken zu vergleichen.

Die einzelnen Farbmarkierungen folgten recht deutlich abgesetzt in der Reihenfolge ihrer Applikation - ausgehend von den Rändern der Osteotomie, respektive dem Lagerknochen zum Implantat hin. Da die zuerst gesetzten grünen Marken im Bereich der Ulna und nicht in Implantatnähe oder im Zentralkanal auftraten, ließ sich folgern, dass die Osteogenese vom Lagerknochen ausging. Eine epiimplantär einsetzende Bildung neuen Knochengewebes konnten wir nicht erkennen. Die Betrachtung der Struktur und Verteilung des gebildeten Knochens unterstützt diese Aussage.

Als Zeichen der Produktion von Lamellenknochen zeigten sich im Bereich der Ulna auch in den 5-Wochen-Präparaten bereits bandenförmige Marken. Zeitgleich gab es in Implantatnähe häufig noch Areale mit der schaumig-körnigen Struktur des Geflechtknochens. Die Auswertung dieser Befunde stützte sich nicht zuletzt auch auf die Mechanismen der

physiologischen Frakturheilung, wie sie u.a. von CRUESS und DUMONT (1975), OSBORN (1985) und SCHENK (1991) beschrieben werden. Demzufolge verläuft die Reparation von Knochengewebe über die Zwischenstufe der Geflechtknochenbildung, bis zur Produktion von reifem lamellären Knochen. Unter dem Einfluss von HAPEX™ war normal strukturierter Geflechtknochen in Implantatnähe bzw. regelmäßig in direktem Kontakt zum Komposit auszumachen. Letzteres ist bei den Polyethylen-Implantaten seltener der Fall. Anschließend unterlag dieser Knochen einem normalen Reparationsschema und zeigte innerhalb von fünf Monaten Umstrukturierungen zu reifem Lamellenknochen. Wiederum entspricht dies durchaus Werten, die nach Implantation diverser HA-Keramiken erzielt wurden (OSBORN, 1985; WAHLIG et al., 1991; DINGELDEIN et al., 1994; HING et al., 1997; GABRIELLI et al., 2001).

Im Gegensatz zu den Versuchen von KLAWITTER und HULBERT (1971), bei denen mineralisiertes Knochengewebe etwa 100 µm Porendurchmesser zum Einwachsen benötigte, reichten im vorliegenden Versuch 60 µm aus. Die Perforationskanäle der Zylinder hatten einen Durchmesser von 60 µm, die Zentralkanäle maßen 200 µm. Da es sich in den 20-Wochen-Proben häufig sogar um lamellären Knochen handelte, der auch in die Perforationen eingewachsen war, können wir die postulierte Mindestweite von 100 µm (OSBORN, 1987) nicht bestätigen. Unsere Ergebnisse sind eher mit denen von KURIOKA und Mitarbeitern (1999) vergleichbar, die das Einwachsen von osteonal organisiertem Knochen in Poren mit 50 µm Durchmesser und kleiner registrierten.

Entsprechend der insgesamt besseren Osseointegration war der Anteil der knöchern gefüllten Perforationen und Zentralkanäle bei den HAPEX™-Präparaten deutlich höher. Im Zuge der radiologischen Kontrollen konnte man zum Teil gut erkennen wie das Knochengewebe im Laufe der Zeit dem angebotenen Weg folgte. Die zentralen Ausbohrungen wurden von proximal und distal durchwachsen, die Perforationskanäle von der Peripherie zum Zentrum, sofern sie überhaupt Kontakt zu Knochengewebe hatten. Gegenüber der Kurzzeitgruppe ist der Anteil der knöchern durchwachsenen „Poren“ in der Langzeitgruppe gestiegen. Gelegentlich erreichte der Knochen aus den Perforationen den Zentralkanal und fand Anschluss an das dortige Knochengewebe.

Vereinzelt konnten diese Befunde auch bei Polyethylen-Zylindern erhoben werden, aber keinesfalls so regelmäßig und in gleichem Umfang wie bei den HAPEX™-Proben. Im Gegensatz zu uns stellten MAYER und Mitarbeiter (1983) innerhalb von drei bis sechs Monaten fest, dass ihre porösen PE-Körper (Porendurchmesser: 153 µm) vollständig von neu

gebildetem Knochengewebe durchwachsen wurden. Die Divergenz dieser Ergebnisse mag zum Einen darin begründet sein, dass die verwendeten Poren wesentlich größer waren, zum Anderen darin, dass vermutlich aufgrund des instabilen Defektmodells (siehe Kapitel IV.1) bei den PE-Implantaten ein besonders hoher Anteil bindegewebig eingebundener Zylinder auftrat. Daher konnte gar kein Knochengewebe einwachsen. Die Tatsache, dass nach 20 Wochen auch nicht deutlich mehr der 200 µm großen Zentralkanäle knöchern gefüllt waren, betont den Zusammenhang zu der bindegewebigen Barriere. Denn sowohl Zeit als auch Raum standen in dieser Gruppe ausreichend zur Verfügung. Mit der offenporigen Gestaltung eines Teils der Proben können wir also einen gewissen „Leitschieneeffekt“ bestätigen. Im Laufe der Zeit folgte das Knochengewebe der angebotenen Struktur. Erwartungsgemäß war dies bei den HAPEX™-Proben stärker ausgebildet als bei den PE-Implantaten, da Hydroxylapatit als Träger und Leitschiene für osteogene Zellen gilt (OSBORN, 1985; WANG et al., 1993; KRÜGER et al., 1997; STÜTZLE et al., 1998).

Zahlreiche Autoren betonen, wie wichtig die mechanische Ruhe im Defektgebiet ist (REUTERS et al., 1985; HEISE et al., 1990; SCHENK, 1991; RÖSER et al., 1994; SCHNETTLER et al., 1994). Die Reparation mit reinem Knochengewebe kann nur auf einer stabilen Unterlage erfolgen. Wenn diese fehlt, kommt es zwangsläufig zur Kallusbildung mit bindegewebigen, chondroiden und knöchernen Anteilen (CRUESS und DUMONT, 1975). In dem primär instabilen Versuchsmodell, in welchem die Implantation der Zylinder nicht press-fit erfolgte, ließ sich zusätzlich noch ein Bereich mechanischer Unruhe ausmachen: die nicht immer erhalten gebliebene oder intakte, radiusnahe Kortikalis der Ulna (Restkortikalis). Tatsächlich bestätigt sich die verstärkte Kallusbildung bei Betrachtung der Röntgenbilder und der Knochenschliffe. Radiologisch konnte man teilweise schon nach drei Wochen an den Stellen eine deutliche periostale Kallusbildung erkennen, an denen das instabil eingesetzte Implantat Kontakt zu den Osteotomieändern seines Lagerknochens hatte. Häufig griff dieser Kallus im Laufe der Zeit weit nach proximal und distal auf die Ulnakortikalis über, so dass nicht unerhebliche Auftreibungen nach lateral entstanden. Auch an den Defektstellen der radiusnahen Ulnakortikalis formierte sich Kallusgewebe, oftmals bis in den Zwischenknochenraum zum Radius hin. In den Fällen, in denen der radiusnahe Teil der Ulnakortikalis vollständig entfernt wurde, zeigte der Radius periostale Auflagerungen. Dementsprechend zeigten sich bei den Kaninchen mit fünf Wochen Nachbeobachtungszeit mehr oder weniger zahlreich bindegewebige und chondroide Anteile im Kallus. An den Stellen größter mechanischer Unruhe konnten vereinzelt auch nach 20 Wochen noch

Knorpelreste im knöchernen Kallus beider Materialgruppen ausgemacht werden. Diese knorpeligen Strukturen sind auf die fehlende mechanische Stabilität im Bereich der Osteotomie zurückzuführen.

Die Frakturen der radiusnahen Ulnakortikalis wurden bei einigen Tieren nur sehr langsam und spät mineralisiert. Dies hätten Anzeichen einer beginnenden Pseudarthrosenbildung sein können. Bis auf einen wurden aber alle diese Defekte abschliessend knöchern durchbaut. Nach 20 Wochen war nur bei einem Versuchstier mit PE-Implantat eine Pseudarthrose entstanden.

Wie erwartet konnten bei den HAPEX™-Proben mehr Bereiche des „bone-bonding“ ermittelt werden. Bei den Polyethylen-Präparaten war eine deutlich schlechtere Einheilung zu beobachten. Dies bestätigt die Aussage von BONFIELD und Mitarbeitern (1986), dass sowohl kortikaler als auch spongiöser Knochen positiv auf HAPEX™ reagieren. Jedoch konnten wir bei physiologischer Belastung nicht in allen Fällen die Ausbildung eines stabilen Interface ohne Relativbewegungen (BONFIELD, 1988) beobachten. Andererseits spricht die Existenz zahlreicher direkter Knochen-Kontakte bei den HAPEX™-Proben unter diesen mechanisch unzureichenden Bedingungen für die gute Verträglichkeit und Osseointegration des Materials. Es hat keinerlei negativen Einfluss auf die Knochenheilung. Abschließend bleibt zu sagen, dass die Knochenheilung unter dem Einfluss von HAPEX™ weder verzögert noch gestört ist. Am Knochen treten keine Reaktionen auf, die nicht unter vergleichbaren Bedingungen auch bei der normalen Frakturheilung vorkommen.

IV.10 Schlussbetrachtung und Ausblick

Zwischen den HAPEX™-Implantaten und Knochengewebe ließen sich histologisch bereits 5 Wochen nach der Implantation deutlich mehr direkte Kontakte nachweisen als zwischen Polyethylen und Knochen. Bei dem neu gebildeten Knochen handelte es sich um normal strukturiertes Gewebe, das dem physiologischen Remodeling von Geflechtknochen zu Lamellenknochen unterlag. Im Laufe der Nachbeobachtungszeit konnte keine deutliche Zunahme der Bereiche mit direktem Knochenkontakt beobachtet werden. Allerdings trat auch keine Reduktion der Kontaktzonen ein. Aufgrund des instabilen Defektmodells war die Beurteilung der Osseointegration insgesamt jedoch etwas erschwert.

Hinsichtlich der Adhäsion von Bindegewebe waren grundsätzlich keine Unterschiede zwischen perforierten oder massiven Probekörpern festzustellen. Die Beobachtung vermehrter, vermutlich präparationsbedingter Ablösungen des Bindegewebes von den PE-Proben könnte allerdings für eine weniger stabile Insertion der bindegewebigen Fasern und Zellen an diesem Implantatmaterial sprechen. Bei den HAPEX™-Implantaten wurde diese Beobachtung seltener gemacht, wenngleich statistisch nicht gesichert.

Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen die günstigen Materialeigenschaften von HAPEX™. Der Werkstoff ist sowohl mit Weichgewebe als auch mit Knochengewebe kompatibel. Bei mechanischer Ruhe im Defektgebiet wird er vollständig knöchern integriert. Trotz häufiger Instabilität bzw. Fraktur oder vollständig entfernter Ulnakortikalis kam es in 20 Wochen nur bei einem Tier mit HAPEX™-Implantat nicht zur Konsolidierung des Defektes. Bei einem Versuchstier mit Polyethylen-Implantat konnte nach 20 Wochen die Ausbildung einer Pseudarthrose beobachtet werden. In keinem Fall kam es zu einer Abstossung des Materials oder zu ausgeprägten Fremdkörperreaktionen. Als Ausdruck der Abwehr zeigte sich lediglich eine moderate Anzahl von Makrophagen. Osteoinduktive Eigenschaften konnten für das Knochenersatzmittel HAPEX™ nicht nachgewiesen werden.

Diversen Literaturangaben zu Folge (BONFIELD, 1981; BONFIELD, 1986, 1988; SUWANPRATEEB et al., 1995; HUANG et al., 1997; WANG et al., 1998) sind die mechanischen Eigenschaften des Materials, wie Stabilität, Bruch- und Abriebfestigkeit, ganz hervorragend. Da sich diese Eigenschaften je nach Indikationsstellung durch die veränderlichen Anteile von Hydroxylapatit im Komposit in einem gewissen Rahmen variieren lassen, ist nicht nur der Ersatz von auto- oder allogenen Knochentransplantaten im lastfreien oder wenig lasttragenden Knochenlager denkbar. Auch die Verwendung als totaler Knochenersatz zur Überbrückung knöcherner Defekte im lasttragenden Lager (z.B. nach Tumorresektion, Osteomyelitis etc.) über einen längeren Zeitraum scheint möglich. Die in-vitro Studie von DALBY und Mitarbeitern (2002) bestätigt die Möglichkeit der lasttragenden Anwendung nach entsprechender Oberflächenmodifikation von HAPEX™. Ebenso betonen die Untersuchungen von THULL (2003) sowie REA und Mitarbeitern (2004) die Bedeutung der Oberflächenbeschaffenheit von HAPEX™ besonders für die verbesserte Osseointegration. Der frühe, initiale Zellkontakt und die gute Zellproliferation an der Implantatoberfläche bestimmen wesentlich die Langzeitstabilität des Materials (DALBY et al., 2003).

Unsere Untersuchung bestätigt vor allem die höhere Langzeitstabilität von HAPEX™ im Vergleich zu reinem Polyethylen. Demnach könnte in vielen Bereichen HAPEX™ anstelle von Polyethylen eingesetzt werden. Überall dort, wo die mangelhafte Verbindung mit

Weichgewebe und Knochen sowie die unzureichende Abriebfestigkeit dieses Kunststoffes seine Verwendung limitieren, ist der Gebrauch von HAPEX™ denkbar. Inwieweit die werkstoffseitigen Modifikationen des Biomaterials Polyethylen (z.B. durch Verstreckung; WIRTZ et al., 2001) auch bei der Herstellung des Komposits berücksichtigt werden können und dadurch eine weitere Optimierung des Materials erreicht wird, müssen weitere Materialstudien zeigen. Auch stellt sich die Frage, ob eine verbesserte Morphologie der HA-Partikel (HUANG et al., 2004) ebenfalls in die Weiterentwicklung des Komposits einfließen kann oder lediglich der Beschichtung von Implantaten vorbehalten bleibt. Die Materialeigenschaften von HAPEX™ lassen sich jedenfalls durch ein verändertes Oberflächendesign verbessern (DALBY et al., 2002, 2003; REA et al., 2004), was den Schluss nahelegt, dass in dem biokompatiblen Werkstoff eine funktionelle Trennung von Eigenschaften erreicht werden kann. Solche optimierten Biomaterialien sollten demnach aus einem funktionsorientiert mechanisch definierten Volumenwerkstoff und einem an den Erfordernissen des biologischen Umfeldes und dessen erwünschten Reaktionen orientierten Oberflächenwerkstoff bestehen (THULL, 2003). Wir können diese Forderung bestätigen, da die Osseointegration der HAPEX™-Proben trotz instabilem Defektmodell erkennbar gut war. Die Adhäsion von Bindegewebszellen wie sie speziell auch für die eingangs erwähnte Schulterprothese benötigt würde, muss aber noch verbessert werden. Daher sind weitere Untersuchungen mit unterschiedlichen Modifikationen des Komposits an einem stabilen Defektmodell unabdingbar.

Inwieweit die guten Ergebnisse mit reinem Hydroxylapatit als Beschichtung für Metalle (SIMONS und VIZETHUM, 1993; WANG et al., 1993; STEA et al., 1995; POMMER et al., 1998; RIEGER et al., 1998; RAHBECK et al., 2000) auch mit HAPEX™ zu erzielen sind, ist noch fraglich und bedarf ebenfalls der präklinischen Abklärung.

V Zusammenfassung

Geweberegeneration und Biokompatibilität nach Implantation von Hydroxylapatit-Polyethylen (HAPEX™) in Weichgewebe und Ulnadefekt beim Kaninchen.

Die vorliegende Arbeit überprüft die lokale Verträglichkeit von Polyethylen (PE) und Polyethylen mit 40 vol % Hydroxylapatit (HAPE / HAPEX™) nach Implantation in die Oberarmmuskulatur und in einen Ulnadefekt beim Kaninchen. Die Untersuchungen sollen

Aufschluss geben über die Adhäsion von Bindegewebe im Interface und die Beschaffenheit des Interface zwischen Knochengewebe und dem Kompositwerkstoff. Die Ergebnisse dienen der Entwicklung einer modularen Schulterprothese, um die schwierige, aber zur vollständigen Wiederherstellung der Funktion notwendige Weichteilabdeckung zu verbessern.

Dazu wurde bei 24 adulten Kaninchen der Rasse „Neuseeländer Riesen“ die linke Ulna im proximalen Drittel teilsteotomiert und ein 7 mm langes Ulnateilstück entfernt. Bei jeweils zwölf Tieren wurde ein 7 x 6 x 8 mm großer Zylinder aus PE bzw. aus HAPE ohne zusätzliche Fixation in diesen Defekt eingelegt. Alle Zylinder hatten eine zentrale Ausbohrung von 200 µm Durchmesser. Jeweils die Hälfte der Zylinder beider Materialgruppen war mit 60 µm großen Kanälchen perforiert, die alle in der zentralen Ausbohrung endeten.

In der Schultermuskulatur der selben Gliedmaße wurde eine Implantatscheibe von 3 mm Höhe und 6 mm Durchmesser aus dem gleichen Material implantiert.

Als Vorbereitung für die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der knöchernen Gewebereaktion wurden den Kaninchen am zehnten und 15., 25. und 30. sowie am 130. und 135. postoperativen Tag subkutan die Fluorochrome Calcein, Alizarin complexone und Tetrazyklin injiziert. Direkt post operationem sowie nach 3, 5, 10 und 20 Wochen fanden Röntgenkontrollen statt. Nach 5 bzw. 20 Wochen Beobachtungszeit wurden jeweils 12 Tiere getötet. Die Tierkörper wurden mit Karnovsky-Lösung perfundiert. Radius und Ulna mit anhaftendem Weichgewebe sowie die Muskelblöcke mit den implantierten Probenscheiben wurden entnommen und der histologischen respektive fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung zugeführt.

Die zeitliche Zuordnung der Fluorochrome im neu gebildeten Knochengewebe und dessen Struktur veranschaulichten, dass die Geflechtknochenbildung im Defekt bereits um den 10. postoperativen Tag einsetzte. Das volle Ausmaß der Regeneration entwickelte sich zwischen 25. und 30. Tag. Das Remodeling von Geflecht- zu Lamellenknochen war 130 Tage nach der Osteotomie so weit vorangeschritten, dass die Konsolidierung der Defekte in fast allen Fällen annähernd erreicht war.

Histologisch überwog in der Nähe des Lagerknochens nach fünf Wochen bereits Lamellenknochen, während in Implantatnähe noch Geflechtknochen mit Osteoblastensäumen

und Osteoklasten vorherrschte. Bei den HAPE-Implantaten wurde deutlich früher Knochen in Implantatnähe gebildet als bei den Polyethylen-Implantaten. Im Interface zu den PE-Implantaten trat besonders häufig eine bindegewebige Schicht auf. 20 Wochen nach der Implantation beherrschte ein kompaktes Knochengewebe den Bereich der Osteotomie. Dabei handelte es sich überwiegend um Lamellenknochen in Havers'schen Systemen. Der Anteil an Geflechtknochen war nur noch gering. Das Remodeling war fast abgeschlossen, und Fettmark hatte sich wieder ausgebildet. Der hohe Anteil an Knorpelzellen in nahezu allen Proben sprach für fehlende Primärstabilität.

Die intramuskulären Implantate heilten nahezu reizlos ein. Sie waren von mehreren Schichten straffen Bindegewebes umgeben, das nach 20 Wochen eine Kapsel gebildet hatte. Anzeichen einer Mineralisation des benachbarten Gewebes waren nicht zu bemerken. Hingegen konnte nach 20 Wochen vereinzelt eine geringgradige Degradation der HAPE-Implantate beobachtet werden. An beiden Materialien war der enge Kontakt zu Fasern und Zellen zu erkennen. Allerdings erschien die Verbindung mit HAPEX™ stabiler.

In den meisten Fällen hatte eine vollständige Konsolidierung der Ulnadefekte stattgefunden. Die Bildung neuen Knochengewebes war nach fünf Wochen bei den HAPE-Implantaten etwas weiter fortgeschritten als bei den PE-Implantaten. Nach 20 Wochen war das Bild einheitlicher. Zu beiden Nachbeobachtungszeitpunkten gab es zwischen HAPEX™ und Knochen deutlich mehr direkten Kontakt als zwischen Polyethylen und Knochen. Eine Zunahme dieser Areale war jedoch nicht zu bemerken. Eine vollständige knöcherne Integration konnte nur bei drei von zwölf HAPE-Proben nachgewiesen werden. Die Adhäsion von Bindegewebe erschien bei den HAPE-Präparaten dauerhafter. Die Perforationen brachten keine weitere Optimierung.

Die Ergebnisse unserer Studie bestätigen die guten Materialeigenschaften von HAPEX™, das sowohl mit Knochengewebe als auch Weichgewebe kompatibel ist. Ein osteoinduktives Verhalten des Materials ist nicht nachzuweisen. Die hervorragenden mechanischen und tribologischen Eigenschaften des Komposits, die durch veränderliche Anteile von Hydroxylapatit bedarfsweise variiert werden können, machen einen Einsatz im lastfreien oder wenig lasttragenden Knochenlager denkbar. Die variablen Gestaltungsmöglichkeiten sowohl der Einzelkomponenten Polyethylen und Hydroxylapatit als auch das veränderliche Gesamtdesign des Komposits bieten das besondere Potential für die Endoprothetik, auch bei

lasttragenden Anwendungen. Diese werkstoffseitigen Modifikationen sowie Untersuchungen mit stabilem Defektmodell erscheinen dringend notwendig bevor HAPEX™ die Eignung zur Verwendung bei der eingangs erwähnten Schulterprothese zugesprochen werden kann.

V.1 Summary

Regeneration of tissues and biocompatibility after implantation of HAPEX™ into soft tissue and segmental defects in the rabbit ulna.

Local tissue tolerance of the bone graft substitutes polyethylene (PE) and polyethylene reinforced with 40 vol % hydroxyapatite (HAPE / HAPEX™) was examined in the muscular system of the upper arm and in an ulna defect of 24 white New Zealand rabbits. The aim of this study was to investigate the possibility of soft tissue adherence to the composites as well as the interface between these composites and the bone tissue. The results support the development of a modular shoulder prosthesis in order to improve the overall soft tissue adherence. This is a difficult but necessary task to recover its function entirely.

In the caudal aspect of the upper third of the ulna bone fragment of 7 mm length was removed and subsequently substituted for a cylindrical implant. 12 of the animals received PE-implants while the second half received HAPE, both in dense and perforated form. The cylinders were all 7 x 6 x 8 mm and had a central tube of 200 µm. The perforations were 60 µm in diameter and ended all in this central tube. There was no additional stabilisation of the cylinders in the bony defect.

Discs with a diameter of 6 mm and a height of 3 mm were implanted into the muscles of the upper arm of the same extremity.

On day 10, 15, 25, 30, 130 and 135 after implantation the animals were labelled with the fluorochromes Calcein, Alizarin complexone and Tetracycline. X-ray controls were taken immediately after implantation as well as 3, 5, 10 and 20 weeks after surgery. 6 animals of each group were euthanised on week 5 and 20 respectively. Following body perfusion with Karnovsky solution the treated part of the extremity and the soft tissue implants were investigated using light microscopy together with immunofluorescence techniques.

The chronological classification of the fluorochromes in the structure of new grown bone tissue showed that the formation of woven bone already started around day 10. The maximum of new bone production was reached between days 25 to 30 after surgery. In most cases the maturation of woven bone to lamellar bone was finished by day 130.

After 5 weeks the histological data already showed lamellar bone next to the ulna, while immature bone predominantly surrounded the implant. The bone production started remarkably earlier in specimens treated with HAPE compared to PE implants. At the interface to the plain polyethylene implants a distinct layer of connective tissue could be detected. 20 weeks after implantation mainly lamellar bone, a small amount of woven bone and bone marrow were found pointing to the end of the remodeling process. A great amount of chondrocytes in almost every case revealed the lack of stability in the defects.

In the muscle tissue the implants were encapsulated by a thin layer of connective tissue showing no signs of inflammation in this fibrous capsule or in the muscle tissue. The soft tissue gave no evidence of mineralisation and just little signs of degradation of HAPE implants after 20 weeks. Soft tissue adherence to both materials could be found while the connection with HAPE was stronger.

In most cases bone healing was complete. The production of bony tissue was performed faster in the HAPE samples after 5 weeks but at the end of the study the results of both materials were similar. There was a higher but not significant increase in direct bone contact zones at the interface between HAPE and bone compared to the interface between plain PE and bone. Later points in time did not show any difference in these areas. A complete osseointegration could just be detected in 3 of 12 HAPE samples. Soft tissue adherence seemed to be more durable with HAPEX™. The perforations did not lead to further improvement regarding soft tissue adherence in both materials.

These results confirm the good properties of HAPEX™ and its compatibility with both, bony and soft tissue. The capacity of osteoinduction just could not be proved. Because of the variable part of HA in the composite its excellent mechanical features can be adapted to different needs in surgery and traumatology. Compared to polyethylene the composite is definitely more suitable for long-term application. The variability of design of the components polyethylene and hydroxylapatite as well as the design of the ready for use

composit HAPEX™ offer great potential in implantology even in weight-bearing applications.

Before certifying the suitability of HAPEX™ for a new modular shoulder prosthesis there must be some more studies with modifications in material and especially with stability in the defect.

VI Literaturverzeichnis

- ❖ Albers, K.H.
Tierexperimentelle Untersuchungen zur Behandlung von parodontalen Knochentaschen mit Hilfe von Hydroxylapatitkeramik
ZWR – Deutsches Zahnärzteblatt 99 (9), 1990; 714-721
- ❖ Allen, M., Brett, F., Millet, P. et al.
The effects of particulate polyethylene at a weight-bearing bone-implant interface
J. Bone Joint Surg. B-78, 1996; 32-37
- ❖ Bädorf, D., Willmann, G.
Polyethylen in der Totalendoprothetik – Eine Sackgasse für Dauerimplantate?
Biomed. Technik 43 (5), 1998; 151-154
- ❖ Bauer, G., Donath, K., Kroha, E. et al.
Hydroxylapatitkeramik auf Knochenbasis
1988; 78-81
zitiert nach Härter, S. , Vet. med. Diss., Gießen 1998
- ❖ Bensmann, G.
Welcher Werkstoff ist für welche Endoprothese geeignet?
In: Jerosch, Effenberger, Fuchs (Hrsg.) Hüftendoprothetik
Thieme Verlag Stuttgart-New York, 1996
- ❖ Bhaskar, S.N., Brady, J.M., Getter, L. et al.
Biodegradable ceramic implants in bone – electron and light microscopic analysis
Oral Surgery 32 (2), 1971; 336-346
- ❖ Birkenhäger-Frenkel, D.H., Birkenhäger, J.C.
Bone appositional rate and percentage of doubly and singly labeled surfaces:
Comparison of data from 5 and 20 µm sections
Bone 8, 1987; 7-12
- ❖ Blair, H.C., Teitelbaum, S.L., Ghiselli, R. et al.
Osteoclastic bone resorption by polarized vacuolar proton pump
Science 245, 1989; 855-857
- ❖ Blair, H.C., Schlesinger, P.H., Ross, P.F. et al.
Recent advance towards understanding osteoclast physiology
Clin. Orthop. 294, 1993; 7-22
- ❖ Blendinger, C.
Experimentelle Untersuchung zur Überbrückung eines knöchernen Defektes beim Kaninchen mit einer Hydroxylapatitkeramik in Kombination mit oder ohne Wachstumsfaktor bFGF (basic Fibroblast Growth Factor)
Vet.Med.Diss, Gießen, 2002
Fachverlag Köhler, Gießen, Biomaterialien in der Medizin, ISBN 3-935713-16-9

- ❖ Blitterswijk van, C.A., Grote, J.J., Kuypers, W. et al.
Bioreactions at the tissue / hydroxyapatite interface
Biomaterials 6, 1985; 243-251
- ❖ Bonath, Klaus H., Prieur, Wolf D.
Kleintierkrankheiten Band 3: Orthopädische Chirurgie und Traumatologie
Ulmer, Stuttgart, 1998
- ❖ Bonfield, W.
Hydroxyapatite-reinforced polyethylene as an analogous material for bone replacement
Ann.- N.Y. Acad. Sci. 1988; 173-177
- ❖ Bonfield, W.
Composites for bone replacement
J. Biomed. Eng. 10, 1988; 522-526
- ❖ Bonfield, W., Grynblas, M.D., Tully, A.E. et al.
Hydroxyapatite reinforced polyethylene – a mechanically compatible implant material for bone replacement
Biomaterials, Vol. 2, 1981; 185-186
- ❖ Bonfield, W., Behiri, J.C., Bowman, J. et al.
Hydroxyapatite reinforced polyethylene composites for bone replacement
In: Ducheyne et al. (eds.), Biomaterials and Biomechanics 1983
Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1984; 421-426
- ❖ Bonfield, W., Doyle, C., Tanner, K.E.
In vivo evaluation of hydroxyapatite reinforced polyethylene composites
In: Christel et al., Biological and Biomechanical Performances of Biomaterials
Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1986; 153-158
- ❖ Bonfield, W. Tanner, K.E.
Biomaterials – a new generation
Materials World, 1997; 18-20
- ❖ Brand, R.A., Rubin, C.T.
Fracture Healing
Surgery of the Musculoskeletal System 1990; 93-114
zitiert nach Härtter, S., Vet. med. Diss., Gießen 1998
- ❖ Brill, W., Katthagen, B-D.
Die Grenzschicht zwischen Hydroxylapatitkeramik und neugebildetem Knochen im Rasterelektronenmikroskop
Z. Orthop. 125, 1987; 183-187
- ❖ Butts, T., Peterson, L., Allen, D.
Early soft tissue ingrowth into porous block hydroxyapatite
J. Oral Maxillofac. Surg. 47, 1989; 475-479

- ❖ Chang, C-S., Matukas, V.J., Lemons, J.E.
Histologic study of hydroxylapatite as an implant material for mandibular augmentation
J. Oral Maxillofac. Surg. 41, 1983; 729-737
- ❖ Charnley, J.
Total hip replacement by low-friction arthroplasty
Clin. Orthop. Rel. Res., 72, 1970; 7-22
- ❖ Charnley, J., Halley, K.H.
Rate of wear in total hip replacement
Clin. Orthop. Rel. Res., 112, 1975; 170-180
- ❖ Collier, J.P., Sutula, L.C., Currier, B.H. et al.
Overview of polyethylene as a bearing material: comparison of sterilization methods
Clin. Orthop. Rel. Res. 333, 1996; 76-86
- ❖ Cooper, R., Milgram, J.W., Robinson, R.A.
Morphology of the osteon
J. Bone Joint Surg. 48-A, No. 7, 1966; 1239-1271
- ❖ Cruess, R.L., Dumont, J.
Healing of bone, tendon and ligament
In: Rockwood, C.A., Green, D.P. (eds): Fractures
JB Lippincott, Philadelphia, 1975; s. 27
- ❖ Dalby, M.J., Di Silvio, L., Gurav, N. et al.
Optimizing HAPEX™ topography influences osteoblast response
Tiss. Eng. Vol. 8 (3), 2002; 453-467
- ❖ Dalby, M.J., Bonfield, W., Di Silvio, L.
Enhanced HAPEX™ topography: comparison of osteoblast response to established cement
J. Mat. Sci. Mat. Med. 14, 2003; 693-697
- ❖ Daculsi, G., Dard, M.
Bone-calcium-phosphate ceramic interface
Osteo. Int. 2, 1994; 153-156
- ❖ Denissen, H.W., de Groot, K., Makkes, P.Ch. et al.
Tissue response to dense apatite implants in rats
J. Biomed. Mater. Res. 14, 1980; 713-721
- ❖ Dielert, E. Fischer-Brandies, E., Bagambisa, F.
REM-Untersuchungen an den Grenzschichtstrukturen Hydroxylapatit / Knochen
Dtsch. Zahnärztl. Z. 43, 1988; 22-25
- ❖ Dingeldein, E., Donath, K., Wahlig, H. et al.
Einheilung einer porösen Hydroxylapatit-Keramik biologischer Herkunft im spongiösen Knochenlager von Kaninchen
Osteo. Int. 2, 1994; 112-116

- ❖ Donath, K.
Die Trenn-Dünnschliff-Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht
schneidbaren Geweben und Materialien
EXAKT- / Kulzer-Druckschrift, Norderstedt 1987

- ❖ Donath, K., Hörmann, K., Kirsch, A.
Welchen Einfluß hat die Hydroxylapatitkeramik auf die Knochenbildung?
Dtsch. Z. Mund Kiefer Gesichts Chir. 9, 1985; 438-440

- ❖ Donath, K., Rohrer, M.D., Beck-Mannagetta, J.,
A histologic evaluation of a mandibular cross section one year after augmentation with
hydroxyapatite particles
Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. 63, 1987; 651-655

- ❖ Doyle, C., Luklinska, Z.B., Tanner, K.E. et al.
An ultra-structural study of the interface between hydroxyapatite / polymer composite and
bone
In: Heimke et al., Clinical implant materials – advances in biomaterials , Vol. 9
Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1990; 339-344

- ❖ Drobeck, H.P., Rothstein, S.S., Gumaer, K.I. et al.
Histologic observation of soft tissue responses to implanted, multifaceted particles and
discs of hydroxylapatite
J. Oral Maxillofac. Surg. 42, 1984; 143-149

- ❖ Eggli, P.S., Müller, W., Schenk, R.K.
The role of pore size on bone ingrowth and implant substitution in hydroxyapatite and
tricalcium-phosphate ceramics: a histologic and morphometric study in rabbits
In: Biomaterials and clinical applications (ed.): Pizzoferrato, A. et al.
Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1987

- ❖ Eggli, P.S., Müller, M.D., Schenk, R.K.
Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size
ranges implanted in the cancellous bone of rabbits
Clin. Orthop. Rel. Res. 232, 1988; 127-137

- ❖ Eitel, F., Seier, H., Schweiberer, L.
Vergleichende morphologische Untersuchungen zur Übertragbarkeit tierexperimenteller
Ergebnisse auf den Regenerationsprozeß des menschlichen Röhrenknochens
Teil I: Untersuchungsmethoden
Teil II: Untersuchungsergebnisse
Unfallheilkunde 84, 1981; 250-264

- ❖ Eitenmüller, J., Schmickal, T., David, A. et al.
Vergleichende Untersuchungen über das Anwachsverhalten und die Knochenhaftung
verschiedener Implantatwerkstoffe
Unfallchirurg 93, 1990; 405-411

- ❖ Eriksen, E.F., Axelrod, D.W., Melsen, F.
Bone histomorphometry
Raven Press, New York, 1994
- ❖ Frame, J.W., Rout, P.G., Browne, R.M.
Ridge augmentation using solid and porous hydroxylapatite particles with and without autogenous bone or plaster
J. Oral Maxillofac. Surg., 45, 1987; 771-777
- ❖ Frentzen, M., Osborn, J.F., Nolden, R.
Untersuchungen zur bindegewebigen Regeneration des desmodontalen Systems nach Implantation von poröser Hydroxylapatitkeramik (Osprovit®) im Tierversuch
Dtsch. Zahnärztl. Z. 43, 1988; 738-741
- ❖ Friedenstein, A.J.
Determined and inducible osteogenic precursor cells
In: Hand tissue growth repair and remineralization
Ciba Foundation Symposium Elsevier, Excerpta-Medica, Amsterdam, 1973
- ❖ Frost, H.M., Villaneuva, A.R.
Tetracycline staining of newly forming bone and mineralizing cartilage in vivo
Stain technol. 35, 1959; 135-38
- ❖ Frost, H.M.
Bone remodelling dynamics
Springfield, III.: Thomas 1963
- ❖ Frost, H.M.
Bone dynamics in Osteoporosis and Osteomalacia
Springfield, III.: Thomas 1966
- ❖ Frost, H.M.
Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling
Calc. Tiss. Res. 3, 1969, 211-237
- ❖ Froum, S.J. et al.
Human clinical and histological responses to Durapatite implants in intraosseous lesions-
Case reports
J. Periodont. 53, 1982; 719-725
- ❖ Gabrielli, M., Marcantonio jr., E., Goissis, G. et al.
Hydroxylaptite implants with or without collagen in the zygomatic arch of rats.
Histological study.
Braz. Dent. J. 12 (1), 2001; 9-15
- ❖ Goldmann, M., Pruitt, L.
A comparison of the effects of gamma radiation and plasma sterilization on the molecular structure, fatigue resistance and wear behaviour of UHMWPE
J. Biomed. Mat. Res.40, 1998; 378-384

- ❖ Grundnes, O., Reikeras, O.
The role of hematoma and periosteal sealing for fracture healing in rats
Acta Orthop. Scand. 64 (1), 1993; 47-49
- ❖ Günther, K.P., Scharf, H.-P., Pesch, H.J. et al.
Einwachsverhalten von Knochenersatzstoffen – Tierexperimentelle Untersuchungen
Z. Orthop. 27, 1998; 105-117
- ❖ Guild, F.J., Bonfield, W.
Predictive modelling of the mechanical properties and failure processes in hydroxylapatite-polyethylene (HAPEX™) composite
J. Mat. Sci. Mat. Med. 9, 1998; 497-502
- ❖ Gumaer, K.I., Sherer, A.D., Slighter, R.G. et al.
Tissue response in dogs to dense hydroxylapatite implantation in the femur
J. Oral Maxillofac. Surg. 44, 1986; 618-627
- ❖ Härtter, S.
Experimentelle Untersuchung zum Einfluß von Kalziumsulfat auf die Knochenheilung bei Kaninchen
Vet. med. Diss., Gießen, 1998
Fachverlag Köhler, Gießen, *Biomaterialien in der Medizin*, ISBN 3-922306-61-6
- ❖ Härtter, S.
Knochenersatzstoffe – Therapeutika der Zukunft in der Kleintierpraxis
Kleintierpraxis 43, 1998; 813-826
- ❖ Handrock, M., Mulch, G., Handrock, C.
The applicability of porous polyethylene for tympanoplasty – an animal experimental study
Arch. Otorhinolaryngol. 224, 1979; 193-206
- ❖ Harvey, W.K., Pincock, J.L., Matukas, V.J. et al.
Evaluation of a subcutaneously implanted Hydroxylapatite-Avitene mixture in rabbits
J. Oral Maxillofac. Surg. 43, 1985; 277-280
- ❖ Heimke, G., Griss, P.
Ceramic implant materials
Med. Biol. Eng. Comput.; (18) 1980; 503-510
- ❖ Heise, U., Osborn, J.F., Duwe, F.
Hydroxyapatite ceramic as a bone substitute
Internat. Orthop. 14, 1990; 329-338
- ❖ Heisel, J.
Tierexperimentelle Untersuchungen zur Kallusformation durch Hydroxylapatit-Injektion
Unfallchirurgie 13 (4), 1987; 179-186

- ❖ Hench, L.L.
Bioactive ceramics
Ann.-N.Y. Acad. Sci. 1988; 55-71
- ❖ Hing, K.A., Best, S.M., Tanner, K.E. et al.
Biomechanical assessment of bone ingrowth in porous hydroxyapatite
J. Mat. Sci. Mat. Med. 8, 1997; 731-736
- ❖ Hing, K.A., Best, S.M., Tanner, K.E. et al.
Quantification of bone ingrowth within bone-derived porous hydroxyapatite implants of varying density
J. Mat. Sci. Mat. Med. 10, 1999; 663-670
- ❖ Höhling, H.J., Steffens, H., Ashton, B.A.
Molekularbiologie der Hartgewebsbildung
Verh. Dtsch. Ges. Pathol. 58, 1974; 54-71
- ❖ Horn, V., Dvorak, M., Szarka, F.
Neue Ansichten über die Morphologie und Funktion der osteoklastischen Zellen
Z. Orthop. 113, 1975; 12-18
- ❖ Howie, D.W., Vernon-Roberts, B., Oakeshott, R. et al.
A rat model of resorption of bone at the cement-bone interface in the presence of polyethylene wear particles
J. Bone Joint Surg. 70-A, No. 2, 1988; 257-263
- ❖ Huang, J., Di Silvio, L., Wang, M. et al.
In vitro mechanical and biological assessment of hydroxyapatite-reinforced polyethylene composite
J. Mat. Sci. Mat. Med. 8, 1997; 775-779
- ❖ Huang, J., Best, S.M., Bonfield, W. et al.
In vitro assessment of the biological response to nano-sized hydroxyapatite
J. Mat. Sci. Mat. Med. 15, 2004; 441-445
- ❖ Hunter, J.
Experiments and observations on the Growth of Bones
In: Palmer, FF. (Ed.): Hunter's work. Logman, London (1798) 1837
- ❖ Hutzschenreuter, P., Perren, S.M., Steinemann, S.
Some effects of rigidity of internal fixation on the healing pattern of osteotomies
Injury 1, 77, 1969
- ❖ Idelberger, H.
Palavit in der operativen Orthopädie – Vorläufige Mitteilung über eine Serie von Tierversuchen
Verhandlg. Dt. orthop. Ges. 1959; 354-357

- ❖ Jarcho, M.
Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics
Clin. Orthop. Rel. Res. 157, 1981; 259-278
- ❖ Jarcho, M.
Retrospective analysis of hydroxyapatite development for oral implant applications
Dental Clinics of North America, Vol. 36, No. 1; 1992; 19-26
- ❖ Jerosch, J.
Probleme des Biomaterials Polyethylen
In: Jerosch, Effenberger und Fuchs (Hrsg.) Hüftendoprothetik
Thieme Verlag Stuttgart New York, 1996
- ❖ Jerosch, J., Fuchs, S., Liljenqvist, U. et al.
Auswirkungen unterschiedlicher Sterilisationsverfahren auf den Oxidationsgrad von ultrahochmolekularem Polyethylen (UHMWPE)
Biomed. Technik 40, 1995; 296-303
- ❖ Junqueira, L.C., Carneiro, J.
Histologie
Lehrbuch der Cytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen
Springer Verlag Berlin, 1996
- ❖ Kämmerer, H., Eger, W.
Tetracycline und Knochenstoffwechsel
Medizinische Welt 18, 1965; 986-991
- ❖ Kato, K., Aoki, H., Tabata, T. et al.
Biocompatibility of apatite ceramics in mandibles
Biomat. Med. Dev. Art. Org., 7 (2), 1979; 291-297
- ❖ Kenney, E.B. et al.
Bone formation within porous hydroxylapatite implants in human periodontal defects
J. Periodont. 57, 1985, 76-82
- ❖ Klawitter, J.J., Hulbert, S.F.
Application of porous ceramics for the attachment of load bearing internal orthopedic applications
J. Biomed. Mater. Res. 2, 1971; 161-168
- ❖ Klawitter, J.J., Bagwell, J.G., Weinstein, A.M.
An evaluation of bone growth into porous high density polyethylene
J. Biomed. Mater. Res. 10(2), 1976; 311-323
- ❖ Klein, C.P., Driessen, A.A., de Groot, K. et al.
Biodegradation behaviour of various calcium phosphate materials in bone tissue
J. Biomed. Mater. Res. 17, 1983; 769-784

- ❖ Kleinfelder, J.W.
Herkömmliche Transplantationsverfahren und neuere Implantatwerkstoffe in der parodontalen Knochentaschen-Chirurgie: eine Übersicht
Quintessenz 38 (1), 1987; 79-90
- ❖ Köster, K., Karbe, E., Krämer, H. et al.
Experimenteller Knochenersatz durch resorbierbare Calciumphosphat-Keramik
Langenbecks Arch. Chir. 341(2), 1976; 77-86
- ❖ Krüger, T., Reichel, H., Bernstein, A. et al.
Die Hydroxylapatitbeschichtung in der zementfreien Endoprothetik – Ergebnisse einer histologischen Studie
Osteo. Int. 5, 1997; 54-59
- ❖ Kurioka, K., Umeda, M., Teranobu, O. et al.
Effect of various properties of hydroxyapatite ceramics on osteoconduction and stability
Kobe J. Med. Sci. 45, 1999; 149-163
- ❖ Lacefield, W.R.
Hydroxyapatite coatings
Ann.-N.Y. Acad. Sci. 1988; 72-80
- ❖ Lampe, F., Grischke, M., Wimmer, M.A. et al.
Einfluß der Oberflächenhärte der Gelenkkugeln auf abrasive Verschleißmechanismen in der Paarung mit Polyethylen für künstliche Hüftgelenke
Biomed. Technik 43 (3), 1998; 58-62
- ❖ LeGeros, R.Z., Parsons, J.R., Daculsi, G. et al.
Significance of the porosity and physical chemistry of calcium phosphate ceramics
Ann.- N.Y. Acad. Sci. 1988; 268-271
- ❖ Lehtinen, R., Kuusilehto, A., Nikkanen, U.-M.
Bone responses to hydroxyapatite particles of different shapes in rabbit tibia
J. Oral. Maxillofac. Surg. 48, 1990; 1075-1078
- ❖ Lemons, J.E., Bajpai, P.K., Patka, P. et al.
Significance of the porosity and physical chemistry of calcium phosphate ceramics
Ann. - N.Y. Acad. Sci. 1988; 279-282
- ❖ Liebendörfer, A., Tröster, S.
Hydroxylapatitkeramik im klinischen Einsatz
Unfallchirurgie 23 (2), 1997; 60-68
- ❖ Liebich, H. G.
Funktionelle Histologie
Schattauer, Stuttgart-New York, 1999
- ❖ Mandelkow, H.K., Hallfeldt, K.K.J., Kessler et al.
Knochenneubildung nach Implantation verschiedener Hydroxylapatitkeramiken
Unfallchirurg 93, 1990; 376-379

- ❖ Martino, L.J., Yeager, V.L., Tylor, J.J.
An ultrastructural study of the role of calcification nodules in the mineralization of woven bone
Calcif. Tiss. Int. 27, 1979; 57-64
- ❖ Matlaga, B.F., Yasenchak, L.P., Salthouse, T.N.
Tissue response to implanted polymers: the significance of sample shape
J. Biomed. Mater. Res. Vol. 10, 1976; 391-397
- ❖ Mayer, R.D., Moyle, D.D., Sauer, B.W.
Fracture of porous polyethylene-bone composite
J. Biomed. Mater. Res., Vol.17, 1983; 59-70
- ❖ Meijer, A., Segenhout, H.M., Albers, F. et al.
Histopathology of biocompatible hydroxylapatite-polyethylene composite in ossiculoplasty
ORL 64, 2002; 173-179
- ❖ Misiek, D.J., Kent, J.N., Carr, R.F.
Soft tissue responses to hydroxylapatite particles of different shapes
J. Oral Maxillofac. Surg. 42, 1984; 150-160
- ❖ Milch, R.A., Rall, D.P., Tobie, J.E.
Bone localization of the tetracyclines
J. of the Nat. Cancer Inst. 19 (1), 1957; 87-91
- ❖ Mittelmeier, H., Katthagen, B.D.
Neue Wege des Knochenersatzes
Orthop. Praxis 5, 1984; 389-397
- ❖ Moore, R.L. et al.
Evaluation of coralline hydroxylapatite periodontal implant material
J. Dent. Res., 65; Special issue 305 / 1214, 1986
- ❖ Moskow, B.S., Lubarr, A.
Histological assessment of human periodontal defect after Durapatite ceramic implant – Reports of a case
J. Periodont. 54; 1983; 455-463
- ❖ Müller, M.E., Perren, S.M.
Callus und primäre Knochenheilung
Mschr. Unfallheilk. 75, 1972; 442-454
- ❖ Najjar, T.A., Lerdrin, W., Parsons, J.R. et al.
Enhanced osseointegration of hydroxylapatite implant material
Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. 71, 1991; 9-15

- ❖ Nazhat, S.N., Joseph, R., Wang, M. et al.
Dynamic mechanical characterization of hydroxyapatite reinforced polyethylene: effect of particle size
J. Mat. Sci. Mat. Med. 11, 2000; 621-628
- ❖ Nery, E.B., Lynch, K.L., Hirthe et al.
Bioceramic implants in surgically produced infrabony defects
J. Periodont. 46, 1975; 328-347
- ❖ Neugebauer, P.
Tympanoplastik mit kombinierten Keramik-Kunststoff-Prothesen
Laryng.- rhin.- oto. Vol. 83 (4), 2004; 226-231
- ❖ Ninomiya, J.T., Struve, J.A., Stelloh, C.T. et al.
Effects of hydroxyapatite particulate debris on the production of cytokines and proteases in human fibroblasts
J. Orth. Res. Vol 19 (4), 2001, 621-628
- ❖ Olerud, S., Lorenzi, G.L.
Triple fluorochrome labeling in bone formation and bone resorption
J. Bone Joint Surg., Vol. 52-A, No. 2, 1970; 274-278
- ❖ Olmstead, M.L., Hohn, R.B.
Ergebnisse mit der Hüfttotal-Prothese bei 103 klinischen Fällen an der Ohio State University
Klin. Prox. 25, 1980; 407
- ❖ Olmstead, M.L.
Total hip replacement in dog
Sem. Vet. Med. Surg. (Small Anim.) 2, 1987; 131
- ❖ Olmstead, M.L., Bonath, K.H.
Prothesen in der Veterinärmedizin
In: Bonath und Prieur, Kleintierkrankheiten Band 3 – Orthopädische Chirurgie und Traumatologie, Ulmer 1998
- ❖ Osborn, J.F.
Biowerkstoffe und ihre Anwendung bei Implantaten
Rev. Mens. Suisse Odonto-stomatol., 89 (11), 1979; 1138
- ❖ Osborn, J.F.
Implantatwerkstoff Hydroxylapatit – Grundlagen und klinische Anwendung
Quintessenz, Berlin-Chicago-London-Rio de Janeiro-Tokio, 1985
- ❖ Osborn, J.F.
Die physiologische Integration von Hydroxylapatitkeramik in das Knochengewebe
Hefte zur Unfallheilkunde, Heft 174; 1985; 101-105

- ❖ Osborn, J.F.
Hydroxylapatitkeramik-Granulate und ihre Systematik
Zahnärztl. Mitteilungen 77 (8), 1987; 840-852

- ❖ Osborn, J.F., Kovacs, E., Kallenberger, A.
Hydroxylapatitkeramik – Entwicklung eines neuen Biowerkstoffes und erste
tierexperimentelle Ergebnisse
Dtsch. Zahnärztl. Z. 35, 1980; 54-56

- ❖ Osborn, J.F., Frentzen, M.
Grundlagen der Anwendung von Hydroxylapatitkeramik-Implantaten
Dtsch. Zahnärztl. Z., 43, 1988; 646-655

- ❖ Owen, M.
Cellular Dynamics of bone
In: Biochemistry and Physiology of bone. 2nd ed. Vol. III
Development and growth Ed: G.H. Bourne Acad. Press N.Y.-London, 1971; 271-298

- ❖ Parsons, J.R., Ricci, J.L., Alexander, H. et al.
Osteoconductive composite grouts for orthopedic use
Ann.- N.Y. Acad: of Sci. 1988; 191-207

- ❖ Perren, S.M., Cordey, J.
Die Gewebsdifferenzierung in der Frakturheilung
Unfallheilkunde 80, 1977; 161-164

- ❖ Perren, S.M.
Biomechanische Grundlagen der Frakturbehandlung
Z. Orthop. 21, 1992; 3-10

- ❖ Picuch, J.F.
Extraskelatal implantation of a porous hydroxyapatite ceramic
J. Dent. Res. 61 (12), 1982; 1458-1460

- ❖ Pommer, A., David, A., Eitenmüller, J. et al.
Haftfestigkeit von Hydroxylapatit-beschichteten Fixateur-externe Pins in vivo
Osteo. Int. 6, 1998; 51-53

- ❖ Rahbek, O., Overgaard, S., Jensen, T.B. et al.
Sealing effect of hydroxyapatite coating
Acta Orthop. Scand. 71 (6), 2000; 563-573

- ❖ Rahn, B.A. et al.
Primary bone healing
J. Bone Joint Surg. Vol. 53-A, No.4, 1971; 783-786

- ❖ Rahn, B.A.; Perren, S.M.
Xylenol orange, a fluorochrome useful in polychrome sequential labeling of calcifying
tissues
Stain Technol. 46 (3), 1971; 125-129

- ❖ Rahn, B.A., Perren, S.M.
Alizarinkomplexon – Fluorochrom zur Markierung von Knochen- und Dentinanbau
Sep. Experientia 28, 180; 1972
- ❖ Rahn, B.A., Perren, S.M.
Die mehrfarbige Fluoreszenzmarkierung des Knochenabbaus
Chem. Rundschau 28, 1975; 12-15
- ❖ Rahn, B.A.
Die polychrome Fluoreszenzmarkierung des Knochenabbaus – Instrumentelle Aspekte
und experimentelle Anwendung
Zeiss information bulletin 22, Vol. 85; 1976
- ❖ Rasmussen, H., Bordier, P.
The physiological and cellular basis of metabolic bone disease
Williams & Williams, Baltimore, 1974
- ❖ Rawlings, C.E., Robert, M.D., Wilkins, M.D. et al.
Evaluation in cats of a new material for cranioplasty: a composite of plaster of Paris and
hydroxylapatite
J. Neurosurg. 69, 1988; 269-275
- ❖ Rea, S.M., Best, S.M., Bonfield, W.
Bioactivity of ceramic-polymer composites with varied composition and surface
topography
J. Mat. Sci. Mat. Med. 15, 2004; 997-1005
- ❖ Rea, S.M., Brooks, R.A., Schneider, A. et al.
Osteoblast-like cell response to bioactive composites-surface-topography and composition
effects
J. Biomed. Mat. Res. Vol. 70 B (2), 2004; 250-261
- ❖ Refior, H.J.; Hackenbroich, M., Wirth, C.J.
Knochenersatzstoffe
Z. Orthop. 27, 1998; 71
- ❖ Renoij, W.
Bioresorption of ceramic strontium-85-labeled calcium phosphate implants in dog femora
Clin. Orthop. Rel. Res. 197, 1985; 272-283
- ❖ Reuters, U., Osborn, J.F., Donath, K.
Untersuchungen nach Implantation von Hydroxylapatitkeramik in artefizielle
Kieferspalten von Ratten
Fortschr. Kiefer-Gesichtschír. 30, 1985; 190-192
- ❖ Rey, C.
Calcium phosphate biomaterials and bone mineral: differences in composition, structures
and properties
Biomaterials 11, 1990; 13-15

- ❖ Röser, K., Donath, K., Schnettler, R.
Histopathologische und histochemische Untersuchungen an unentkalkten
Schliffpräparaten zur Knochendefektheilung unter Verwendung allogener Transplantate
und poröser Hydroxylapatitkeramik-Implantate
Osteo. Int. 2, 1994; 128-134

- ❖ Rohen, J.W., Lütjen-Drecoll, E.
Funktionelle Histologie
Schattauer, Stuttgart New York, 1990

- ❖ Rosengren, A., Bjursten, L.M., Danielsen, N. et al.
Tissue reactions to polyethylene implants with different surface topography
J. Mater. Sci. Mat. Med. 10, 1999; 75-82

- ❖ Rothstein, S.S., Paris, D.A., Zacek, M.P.
Use of hydroxylapatite for the augmentation of deficient alveolar ridges
J. Oral Maxillofac. Surg., 42, 1984; 224-230

- ❖ Rudelt, H-G.
Dicht gesinterte Hydroxylapatitkeramik als Material der zahnärztlichen Implantologie
Phillip Journal 5, 1989; 275-278

- ❖ Rueger, J.M.
Knochenersatzmittel – Sate of the art und wohin gehen wir?
Unfallchirurg 99, 1996; 228-236

- ❖ Rueger, J.M.
Knochenersatzmittel – Heutiger Stand und Ausblick
Z. Orthop. 27, 1998; 72-79

- ❖ Sajonski, H., Smollich A.
Zelle und Gewebe
S. Hirzel Verlag Leipzig, 1990

- ❖ Sauer, B.W., Lade, R.B.
Porous high density polyethylene (PHDPE) - autogenous tissue tracheal prosthesis
Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs. 28, 1982; 369-373

- ❖ Schenk, R.K., Willenegger, H.R.
Zur Histologie der primären Knochenheilung- Modifikationen und Grenzen der
Spaltheilung in Abhängigkeit von der Defektgröße
Unfallheilkunde, 80 (5), 1977; 155-160

- ❖ Schenk, R.K.
Die Histologie der primären Knochenheilung im Lichte neuer Konzeptionen über den
Knochenbau
Unfallheilkunde 81, 1978; 219-227

- ❖ Schenk, R.K.
Zur Problematik der Knochenersatzstoffe: Histophysiologie des Knochenumbaus und der Substitution von Knochenersatzstoffen
Hefte zur Unfallheilkunde 216, 1991; 23-35

- ❖ Schenk, R. K.
Struktur und Funktion des Knochens
In: Bonath, K.H., Prieur, W.D.; Orthopädische Chirurgie und Traumatologie, 34-46
UTB. Ulmer Stuttgart, 1998

- ❖ Schmidt, H.G., Neikes, M., Wittek, F.
Erfahrungen bei der Verwendung von Hydroxylapatit und Tricalciumphosphat
Hefte zur Unfallheilkunde, Heft 200, 1988; 661

- ❖ Schnettler, R., Dingeldein, E., Tausch, W. et al.
Untersuchungen zur knöchernen Integration einer Hydroxylapatit-Keramik (Endobon[®]) und „Fibroblast Growth Factor“ im Vergleich zu autogenen Spongiosazylindern
Osteo. Int. 2, 1994; 118-128

- ❖ Segmüller, G., Allgöwer, M.
Realität und Relativität der primären Knochenheilung
Der Chirurg 36 (11), 1965; 504- 507

- ❖ Siebert.H.R., Wagner, K., Rueger, J.M.
Biologische Wertigkeit verschiedener Knochenersatzmittel in der Behandlung von Knochendefekten
Unfallchirurgie 12 (2), 1986; 98-100

- ❖ Simons, B., Vizethum, F.
Hydroxylapatit-beschichtete Implantate – eine Standortbestimmung
Z. Zahnärztl. Implantol. IX, 1993; 75-81

- ❖ Soltesz, U.
Ceramics in composites – review and current status
Ann.- N.Y. Acad. of Science, Vol. 523, 1988; 137-156

- ❖ Spector, M., Flemming, W.R., Sauer, B.W.
Early tissue infiltrate in porous polyethylene implants into bone: a scanning electron microscope study
J. Biomed. Mater. Res., Vol.9, 1975; 537-542

- ❖ Spector M.
Charakterisierung biokeramischer Kalziumphosphatimplantate
Hefte zur Unfallheilkunde 216, 1991; 11-22

- ❖ Stea, S., Visentin, M., Savarino, L. et al.
Quantitative analysis of the bone-hydroxyapatite coating interface
J. Mater. Sci. Mater. Med. 6, 1995; 455-495

- ❖ Strauß, A.
Lokaler Antibiotikaträger aus Kalziumsulfat – Verträglichkeit im Gewebe und Pharmakokinetik der angewendeten Antibiotika nach Implantation in Kaninchen
Vet. med. Diss., Gießen, 1999
Fachverlag Köhler, Gießen, Biomaterialien in der Medizin, ISBN 3-934229-00-X

- ❖ Streicher, R.M., Thomsen, M.
Polyethylen als Implantatwerkstoff
Orthopäde 32, 2003; 23-31

- ❖ Stuart, A.J., Smith, D.A.
Use of the fluorochromes xylenol orange, calcein green and tetracycline to document bone deposition and remodeling in healing fractures in chicken
Avian Diseases 36, 1992; 447-449

- ❖ Stünzi, H., Weiss, E.
Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin
Paul Parey, Berlin – Hamburg, 1990

- ❖ Stützle, H., Hallfeldt, K., Mandelkow, H. et al.
Knochenneubildung durch Knochenersatzmaterialien
Z. Orthop. 27, 1998; 118-125

- ❖ Sumner-Smith, G., Prieur, W.D.
Fehlerhafte und verzögerte Frakturheilung, Pseudarthrose
In: Kleintierkrankheiten Band 3 – Orthopädische Chirurgie und Traumatologie
Bonath, K.H., Prieur, W.D.; Ulmer, Stuttgart, 1998

- ❖ Sun, J-S., Tsuang, Y-H., Yao, C-H. et al.
Effects of calcium phosphate bioceramics on skeletal muscle cells
J. Biomed. Mater. Res. 34, 1997; 227-233

- ❖ Suwanprateeb, J., Tanner, K.E., Turner, S. et al.
Creep in polyethylene and hydroxyapatite reinforced polyethylene composites
J. Mat. Sci. Mat. Med. 6, 1995; 804-807

- ❖ Suwanprateeb, J., Tanner, K.E., Turner, S. et al.
Influence of Ringer's solution on creep resistance of hydroxyapatite reinforced polyethylene composites
J. Mat. Sci. Mat. Med. 8, 1997; 469-472

- ❖ Suwanprateeb, J., Tanner, K.E., Turner, S. et al.
Influence of sterilization by gamma irradiation and of thermal annealing on creep of hydroxyapatite-reinforced polyethylene composites
J. Biomed. Mat. Res. 39 (1), 1998; 16-22

- ❖ Tanner, K.E., Downes, R.N., Bonfield, W.
Clinical applications of hydroxyapatite reinforced materials
Brit. Ceram. Trans. 93 (3), 1994; 104-107

- ❖ Thull, R.
Oberflächenmodifikationen zur Verbesserung von Biokompatibilität und mechanischen Eigenschaften von orthopädischen Implantaten
Orthopäde 32, 2003; 51-59
- ❖ Tonna, E.A.
Osteoclasts and the aging skeleton - A cytological, cytochemical and autoradiographic study
Anat. Rec. 137, 1960; 251-270
- ❖ Tonna, E.A.
Periosteal osteoclasts – skeletal development and ageing
Nature, Lond. 185, 1960; 405-407
- ❖ Topoll, H.
Hydroxylapatit – ein neues Implantationsmaterial für parodontale Knochendefekte
Die Quintessenz 11, 1984; 2103-2112
- ❖ Tracy, B.M., Doremus, R.H.,
Direct electron microscopy studies of the bone-hydroxylapatite interface
J. Biomed. Mater. Res., 18, 1984; 719-726
- ❖ Treace, H. T.
Biomaterials in ossiculoplasty and history of development of prosthesis for ossiculoplasty
Otolaryngol. Clin. North America 27 (4), 1994; 655-662
- ❖ Turner, J.E., Lawrence, W.H., Autian, J.
Subacute toxicity testing of biomaterials using histopathologic evaluation of rabbit muscle tissue
J. Biomed. Mater. Res. 7, 1973; 39-58
- ❖ Voronov, I., Santerre, J.P., Hinek, A. et al.
Macrophage phagocytosis of polyethylene particulate in vitro
J. Biomed. Mater. Res. 39 (1), 1998; 40-51
- ❖ Wahlig, H., Dingeldein, E., Draenert, K.
Comparison of four different hydroxyapatite ceramics by histomorphological evaluation using a standardized animal model
Combined meeting of the Orthopaedic Research Societies of USA, Japan and Canada, October 21-23, 1991; Banff, Alberta
- ❖ Wang, B.C., Chang, E., Yang, C.Y. et al.
A histomorphometric study on osteoconduction and osseointegration of titanium alloy with and without plasma-sprayed hydroxyapatite coating using back-scattered electron images
J. Mater. Sci. Mater. Med. 4, 1993; 394-403

- ❖ Wang, M., Porter, D., Bonfield, W.
Processing, characterisation and evaluation of hydroxyapatite reinforced polyethylene composites
Brit. Ceram. Trans. 93 (3), 1994; 91-95
- ❖ Wang, M., Joseph, R., Bonfield, W.
Hydroxyapatite-polyethylene composites for bone substitution: effects of ceramic particle size and morphology
Biomaterials 19, 1998; 2357-2366
- ❖ Wang, M., Hench, L.L., Bonfield, W.
Bioglass[®] / high density polyethylene composite for soft tissue applications: preparation and evaluation
J. Biomed. Mater. Res. 42 (4), 1998; 577-586
- ❖ Wang, M., Chandrasekaran, M., Bonfield, W.
Friction and wear of hydroxyapatite reinforced high density polyethylene against the stainless steel counterface
J. Mat. Sci. Mat. Med. 13, 2002; 607-611
- ❖ Weber, B.G., Fiechter, T.
Polyethylen-Verschleiß und Spätlockerung der Totalprothese des Hüftgelenkes
Z. Orthop. 18, 1989; 370-376
- ❖ Wei, M., Ruys, A.J., Swain, M.V. et al.
Interfacial bond strength of electrophoretically deposited hydroxyapatite coatings on metals
J. Mat. Sci. Mat. Med. 10, 1999; 401-409
- ❖ Weimer, R., Schaldach, M.
Biodegradation von Polyethylen und Polyäther-Polyurethan
Biomed. Technik 29, 1984; 218-225
- ❖ Weinländer, M., Grundschober, F., Plenk jr., H.
Tierexperimentelle Untersuchungen zur Auffüllung von Knochendefekten mit Hydroxylapatit
Z. Stomatol. 84, 1987; 195-205
- ❖ Wiesner, E., Ribbeck, R.
Wörterbuch der Veterinärmedizin
Gustav Fischer Verlag, Jena – Stuttgart, 1991
- ❖ Willert, H.-G., Buchhorn, G.H., Hess, Th.
Die Bedeutung von Abrieb und Materialermüdung bei der Prothesenlockerung an der Hüfte
Z. Orthop. 18, 1989; 350-369

- ❖ Williams, D.F.
Consensus and Definitions in Biomaterials
Advances in Biomaterials, Vol. 8; 11-16
Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam 1988

- ❖ Winter, M., Griss, P., de Groot, K. et al.
Comparative histocompatibility testing of seven calcium phosphate ceramics
Biomaterials 2, 1981; 159-161

- ❖ Wirtz, D.Ch., Schopphoff, E., Weichert, D. et al.
Verstrecktes Polyethylen (UHMWPE) – eine neue Werkstoffmodifikation zur
Abreibsminimierung beim künstlichen Kniegelenkersatz
Biomed. Techn. 46, 2001; 338-342

- ❖ Wroblewski, B.M., Siney, P.D.
Charnley low-friction arthroplasty of the hip – long term results
Clin. Orthop. Rel. Res., 292, 1993; 191-201

- ❖ Yamamuro, T., Shikata, J., Kakutani, Y. et al.
Novel methods for clinical applications of bioactive ceramics
Ann.- N.Y. Acad. of Sci. 1988; 107-114

- ❖ Yamasaki, H., Sakai, H.
Osteogenic response to porous hydroxyapatite ceramics under the skin of dogs
Biomaterials 13 (5), 1992; 308-312

- ❖ Yang, Z.J., Yuan, H., Zou, P. et al.
Osteogenic responses to extraskeletally implanted synthetic porous calcium phosphate
ceramics: an early stage histomorphological study in dogs
J. Mater. Sci. Mater. Med. 8, 1997; 697-701

VII Anhang

VII.1 Herstellungsvorschriften für die Perfusionslösungen

Ringerlösung pH 7,4

Bezeichnung	Formel	Einheit	Für 1 Liter	Für 2 Liter	Für 3 Liter
Natriumchlorid	NaCl	mg	8740	17480	43700
Kaliumchlorid	KCl	mg	414	828	2070
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	mg	203	406	1015
Calciumchlorid 95%	CaCl ₂	mg	180,8	361	904
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	C ₄ H ₁₁ NO ₃	mg	242	484	1210
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	mg	1000	2000	5000

Karnovsky-Lösung

Bezeichnung	Formel	Einheit	Für 1 Liter	Für 2 Liter	Für 3 Liter
Paraformaldehyd	HO(CH ₂ O) _n H	g	40	80	200
VE-Wasser		ml	500	1000	2500

Lösen bei 60-70 °C, ca. 1 h

Natronlauge 1N, zugeben bis „klar“	NaOH	ca. ml	1,2	2,4	6,0
Lösung auf ca. 20 °C abkühlen					
Glutardialdehyd 50%	OHC(CH ₂) ₃ CHO	ml	100	200	500

Gut mischen

Phosphatpuffer nach Sörensen		ad ml	1000	2000	3000
pH-Wert Kontrolle (Sollwert 7,2-7,4)					

VII.2 Herstellungsvorschrift für die Toluidinblau-Färbelösung

Herstellung von 1 Liter Toluidinblau-Färbelösung (Donath, 1987):

Substrate:

Na-Tetraborat (Borax)

Toluidinblau (Chroma)

Pyronin-G (Merck 7517)

Lösung A:

800 ml Aqua dest.

8 g Na-Tetraborat

8 g Toluidinblau

15 Minuten mit einem Magnetrührer mischen

Lösung B:

200 ml Aqua dest.

2 g Pyronin-G

15 Minuten mit einem Magnetrührer mischen

Abschließend werden Lösung A und B nochmals 15 Minuten mit einem Magnetrührer gemischt und danach zweimal filtriert.

VII.3 Zusammensetzung von T 61[®]

Laut Hersteller (Hoechst Veterinär GmbH, München) enthält 1 ml dieser Injektionslösung:

0,2 g Embutramid

0,05 g Mebenzoniumjodid

0,005 g Tetracainhydrochlorid

VII.4 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABFR	appositional bone formation rate
cm	Zentimeter
cm ³	Kubikzentimeter
° C	Grad Celsius
DCAF	di-Carbomethyl-Aminoethyl-Fluorescein
dest.	destillata
Fa.	Firma
g	Gramm
GPa	Giga Pascal
h	Stunde
HA	Hydroxylapatit
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
Kap.	Kapitel
kg	Kilogramm
kGy	Kilogray
KM	Körpermasse
l	Liter
LD ₅₀	Dosis letalis media
M	Molekülmasse
max.	maximal
mg	Milligramm
Min.	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mol	Stoffmenge
MPa	Mega Pascal
Mrad	Millirad
µm	Mikrometer
N	Normalität
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
op.	operationem
PE	Polyethylen
pH	Wasserstoffionenkonzentration
%	Prozent
s	Standardabweichung
s.c.	subkutan
Tab.	Tabelle
THEP	Totale Hüftendoprothese
VE	voll entsalztes (Wasser)
Vol %	Volumen Prozent
wt %	Gewichts Prozent
x	Mittelwert

Danksagung

Folgenden hilfreichen Händen und Köpfen möchte ich im Zusammenhang mit der Fertigstellung dieser Arbeit meinen besonderen Dank aussprechen :

Herrn Prof. Dr. Klaus H. Bonath für die Überlassung des Themas, für seine fachliche Unterstützung und Beratung, für die seelische Begleitung sowie für die mit der Durchsicht der vorliegenden Dissertation verbundene Arbeit.

Frau Dr. Elvira Dingeldein für die kompetente Betreuung dieser Arbeit, besonders bei der Auswertung der histologischen Proben sowie für die großzügige, finanzielle Unterstützung dieses Projektes.

Herrn Prof. Dr. W. Revell und seinen Mitarbeitern für die Herstellung der Knochenschliffe und deren erste Befundung.

Herrn Dr. Failing und Herrn Heiter von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung für die freundliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung und der graphischen Darstellung der Ergebnisse.

Ebenso Frau Dr. Sabine Wenisch, die sich kurzfristig zur abschließenden Durchsicht und Korrektur der Arbeit, besonders der histologischen Ergebnisse bereit erklärte.

Ein herzliches Dankeschön auch an den Tierpfleger Herrn Holger Wißmann und seine Kollegen der chirurgischen Veterinärklinik für die zuverlässige Betreuung und Pflege der Kaninchen und die Hilfe bei der Durchführung der Operationen.

Frau Astrid Gerlach und Herrn Walter Gilbert danke ich für Ihre Freundschaft und die allzeit gewährte seelische und moralische Unterstützung sowie Ihre Hilfsbereitschaft. Desweiteren haben die zum Zeitpunkt der Abfassung dieser Dissertation am Lehrstuhl für Allgemeine und Experimentelle Chirurgie tätigen Mitarbeiter und Doktoranden eine sehr angenehme Atmosphäre geschaffen, die mir meine Promotionszeit in guter Erinnerung bleiben lässt.

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, 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“ niedergeschrieben sind, eingehalten.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5170-X



9 783835 951709

